

# Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada

---

**Banožić, Marija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:344211>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**

REPOZITORIJ

**PTF OS**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Marija Banožić, mag. preh. ing.**

**PRIMJENA INOVATIVNIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE  
BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Osijek, siječnja 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam  
Smjer: Prehrambena tehnologija

### Zavod za procesno inženjerstvo

### Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 66.061 : 606:628.4(043.3)

663.97.05(043.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Znanstvena grana:** Inženjerstvo

**Tema rada** je prihvaćena na II. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 26.11.2019.

**Voditelj:** *prof. dr. sc. Stela Jokić*

### Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada

*Marija Banožić, 0113142689*

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj četiri inovativne tehnike ekstrakcije: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), superkritična CO<sub>2</sub> ekstrakcija (SC-CO<sub>2</sub>) te ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju (SWE) na iskorištenje i sadržaj bioaktivnih spojeva u duhanskom otpadu (refabrikat, prašina i rebro) koji nastaje tijekom industrijske prerade lista. U ekstraktima su primjenom tekućinske i/ili plinske kromatografije određeni isparljivi spojevi, fenolni spojevi te nikotin, a primjenom spektrofotometrijskih metoda određena je antiradikalna aktivnost i sadržaj ukupnih fenola. U SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima određen je i masnokiselinski sastav primjenom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom. Na temelju dobivenih rezultata uočen je značajan utjecaj primijenjenih procesnih parametara na promatrane odzive (iskorištenje ekstrakcije, sadržaj klorogenske kiseline i nikotina). Primjenom metode odzivnih površina određeni su optimalni parametri svake pojedine tehnike ekstrakcije. Od ispitivanih tehnika ekstrakcije, primjenom UAE dobiven je najveći sadržaj klorogenske kiseline, dok se MAE pokazala pogodnom za ekstrakciju nikotina. Primjenom SWE dobiveni su ekstrakti bogati fenolnim spojevima i nikotinom, no primjena viših temperatura (200-250 °C) uzrokovala je nastanak degradacijskih produkata. SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija pokazala se pogodnom za ekstrakciju nepolarnih spojeva (isparljivih spojeva i masnih kiselina), gdje je identificiran nikotin (1,6 %), a dominantna masna kiselina bila je palmitinska kiselina (21,84 %). Od promatrana tri otpada, refabrikat se pokazao najbogatijim bioaktivnim spojevima u usporedbi s listom duhana kao polaznom sirovinom. U konačnici, da bi se u potpunosti iscrpio biljni materijal, pristupilo se valorizaciji refabrikata kroz kombinaciju dvije ekstrakcijske tehnike (SC-CO<sub>2</sub> i SWE). Dvostupanjska ekstrakcija dala je najbolje rezultate, te predstavlja inovativan pristup valorizaciji ove vrste otpada istovremeno dajući maksimalno iskorištenje ekstrakcije (74,05 %), uz znatno veći zastupljenosti nikotina (4,67 %) i fenolnih spojeva: klorogenske kiseline (0,74 %), neoklorogenske kiseline (0,46 %), rutina (1,03 %).

**Ključne riječi:** *duhanski otpad, bioaktivni spojevi, inovativne tehnike ekstrakcije, optimizacija*

**Rad sadrži:** 187 stranica  
52 slike  
97 tablica  
200 literaturnih referenci  
3 priloga

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Igor Jerković</i>      | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Mojca Škerget</i>      | član          |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Senka Vidović</i> | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i>        | zamjena člana |

**Datum obrane:** 21.1. 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Postgraduate University Study-Food Technology and Nutrition**

**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering**

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**UDC: 66.061 : 606:628.4(043.3)**  
**663.97.05(043.3)**

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Scientific branch:** Engineering

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. II held on November 26, 2019.

**Mentor:** *Stela Jokić, PhD, full prof.*

**Application of innovative extraction techniques of bioactive compounds from tobacco waste**  
*Marija Banožić, 0113142689*

**Summary:** The aim of this study was to determine the influence of four innovative extraction techniques: ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), supercritical CO<sub>2</sub> extraction (SC-CO<sub>2</sub>) and subcritical water extraction (SWE) on the yield and content of bioactive compounds in tobacco waste extracts. Three fractions of tobacco waste, generated during the industrial processing of leaves (scrap, dust and midrib), were used for the extractions and were compared with the leaf as the starting material. Volatile compounds, phenolic compounds and nicotine were determined in the extracts using liquid and/or gas chromatography. Additionally, total phenol content and antioxidant activity were determined using spectrophotometric assays. In SC-CO<sub>2</sub> extracts, the fatty acid composition was determined using gas chromatography with a flame ionization detector. Based on the obtained results, a significant influence of the applied process parameters on the responses (extraction yield, chlorogenic acid content and nicotine) was observed. Using the response surface methodology, the optimal parameters of each extraction technique were determined. Of the four extraction techniques observed, UAE yielded the highest chlorogenic acid content, while MAE proved to be suitable for nicotine extraction. Using SWE, extracts rich in phenolic compounds and nicotine were obtained, but due to the application of higher temperatures (200-250 °C), the formation of degradation products was observed. SC-CO<sub>2</sub> showed high selectivity for the extraction of non-polar compounds, particularly targeted fatty acids (the dominant was palmitic acid) and volatile compounds (nicotine was the most abundant). Among the three wastes observed, the scrap proved to be the richest in bioactive compounds. In order to obtain completely exhaust waste material, a two-stage extraction process (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) was conducted on the scrap. With two-stage extraction (SC-CO<sub>2</sub> + SWE), the highest extraction efficiency (74.05%) and significantly higher abundance of nicotine (4.67%) and of phenolic compounds (chlorogenic acid (0.74%), neochlorogenic acid (0.46%) and rutin (1.03%)) were obtained. Therefore, two-stage extraction (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) represents an innovative approach to the valorization of tobacco waste.

**Key words:** *tobacco waste, bioactive compounds, innovative extraction techniques, optimization*

**Thesis contains:** 187 pages

52 figures  
97 tables  
200 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Igor Jerkiović, PhD, full prof</i>     | chair person |
| 2. <i>Mojca Škerget, PhD, full prof</i>      | member       |
| 3. <i>Senka Vidović, PhD, associate prof</i> | member       |
| 4. <i>Darko Velić, PhD, full prof</i>        | stand-in     |

**Defense date:** 21.1. 2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek.

*Najiskrenije zahvaljujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na prilici da dođem u Osijek i krenem putem znanosti, kao i na savjetima, podršci i svemu onom što sam naučila kroz ove četiri godine.*

*Cijenjenim članovima Povjerenstva iskreno zahvaljujem na konstruktivnim komentarima koji su zasigurno unaprijedili kvalitetu ove disertacije.*

*Veliko hvala profesorima, asistentima i suradnicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, kolegama s Fakulteta kemije i kemijske tehnologije u Mariboru, kolegama s Farmaceutskog fakulteta Medicinskog sveučilišta u Wrocławu, te kolegama s Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu na ustupljenoj opremi i pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela disertacije.*

*Hvala Fabrici duhana Sarajevo na ustupljenim uzorcima, a posebno gospođi Elmi Nukić-Hrastovina, dipl.ing. koja mi je mnogo pomogla oko karakterizacije uzoraka i razumijevanja procesa prerade duhana.*

*Hvala dragoj izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na „zлата vrijednim savjetima“ oko uspostave analitičkih metoda.*

*Veliko hvala mojoj seki mr. sc. Ivani Banožić Skoković na lektoriranju ove disertacije.*

*Hvala mojim dragim kolegicama s PTF-a na svim savjetima, razgovorima, kavama, smijehu i druženjima.*

*Hvala mojim prijateljicama na bezuvjetnoj podršci.*

*Najviše hvala mojoj prekrasnoj velikoj obitelji na ljubavi, podršci i razumijevanju za sve vrijeme koje nisam mogla provesti s njima protekle četiri godine, a posebno mami i tati koji su mi omogućili da studiram i uvijek vjerovali da mogu postići ono što poželim.*



*Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
2.1. DUHAN .....	5
2.1.1. Morfološke karakteristike duhana.....	5
2.1.2. Podjela duhana.....	6
2.1.3. Značaj i uporaba duhana .....	7
2.1.4. Prerada duhanskog lista .....	9
2.2. DUHANSKI INDUSTRIJSKI OTPAD.....	13
2.2.1. Bioaktivni spojevi u duhanskom otpadu .....	13
2.2.2. Ostali spojevi duhanskog otpada .....	18
2.2.3. Dosadašnja i potencijalna primjena duhanskog otpada.....	20
2.3. NEKONVENCIONALNE TEHNIKE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA.....	21
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	22
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	24
2.3.3. Ekstrakcija supkritičnom vodom (SWE).....	26
2.3.4. Ekstrakcija s CO <sub>2</sub> u superkritičnom stanju (SC-CO <sub>2</sub> ).....	27
2.4. EKSPERIMENTALNI DIZAJN I OPTIMIZACIJA PROCESA .....	29
2.4.1. Metoda odzivnih površina (RSM) .....	30
2.4.2. Prikladnost metode odzivnih površina za optimizaciju procesa ekstrakcije .....	31
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>33</b>
3.1. ZADATAK.....	34
3.2. MATERIJALI.....	36
3.2.1. Duhanski otpad.....	36
3.2.2. Kemikalije i standardi .....	36
3.3. METODE.....	37
3.3.1. Priprema materijala za ekstrakciju.....	37
3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) .....	38
3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) .....	40
3.3.4. Ekstrakcija sa supkritičnom vodom (SWE).....	42
3.3.5. Ekstrakcija s CO <sub>2</sub> u superkritičnom stanju (SC-CO <sub>2</sub> ) .....	43
3.3.6. Konvencionalna ekstrakcija u Soxhlet aparaturi .....	45
3.3.7. Spektrofotometrijske analize .....	45
3.3.8. Određivanje polarnih bioaktivnih spojeva u ekstraktima .....	46
3.3.9. Određivanje nepolarnih/isparljivih bioaktivnih spojeva.....	48
3.3.10. Određivanje sastava masnih kiselina u ekstraktima .....	49
3.3.11. Statistička analiza i optimizacija procesa.....	50
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>52</b>
4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA .....	53

4.2. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA UAE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG LISTA I OTPADA.....	54
4.2.1. Statistička analiza parametara UAE .....	67
4.3. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA MAE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG OTPADA .....	80
4.3.1. Statistička analiza parametara MAE.....	84
4.4. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA SWE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG OTPADA .....	97
4.4.1. Statistička analiza parametara SWE .....	105
4.5. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA SC-CO <sub>2</sub> EKSTRAKCIJE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG OTPADA.....	118
4.5.1. Statistička analiza parametara SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcije .....	124
4.5.2. Ekstrakcija duhanskog otpada primjenom dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO <sub>2</sub> + SWE) .....	126
4.5.3. Statistička analiza parametara dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO <sub>2</sub> + SWE ) .....	128
4.6. USPOREDBA UČINKOVITOSTI PRIMIJENJENIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE .....	130
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>133</b>
5.1. KARAKTERIZACIJA UZORAKA I ODABIR TEHNIKA EKSTRAKCIJE .....	134
5.2. UAE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA .....	134
5.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva .....	135
5.2.2. Ekstrakcija isparljivih spojeva .....	136
5.2.3. Statistička analiza parametara UAE .....	137
5.3. MAE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA .....	139
5.3.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva i nikotina .....	140
5.3.2. Statistička analiza parametara MAE.....	141
5.4. SWE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA .....	143
5.4.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva i nikotina .....	144
5.4.2. Statistička analiza parametara SWE .....	146
5.5. SC-CO <sub>2</sub> EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA .....	148
5.5.1. Ekstrakcija isparljivih spojeva, masnih kiselina i nikotina .....	149
5.5.2. Statistička analiza parametara SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcije .....	151
5.6. EKSTRAKCIJA DUHANSKOG OTPADA (REFABRIKATA) PRIMJENOM DVOSTUPANJSKE EKSTRAKCIJE (SC-CO <sub>2</sub> + SWE) .....	152
5.6.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva i nikotina .....	152
5.6.2. Statistička analiza parametara dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO <sub>2</sub> + SWE) .....	154
5.7. OPTIMIZACIJA I USPOREDBA UČINKOVITOSTI PRIMIJENJENIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE.....	155
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>157</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>160</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>175</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

3,4-DHBA	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (engl. <i>3,4-dihydroxybenzoic acid</i> )
5-MF	5-metilfurfural (engl. <i>5-methylfurfural</i> )
5-HMF	5-hidroksimetilfurfural (engl. <i>5-hydroxymethylfurfural</i> )
$\beta_0$	Konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
$\beta_i$	Koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
$\beta_{ii}$	Koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
$\beta_{ij}$	Koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
ANOVA	Analiza varijance (engl. <i>Analysis of variance</i> )
BBD	Box-Behnken plan pokusa (engl. <i>Box-Behnken design</i> )
CCD	Centralno kompozitni plan pokusa (engl. <i>Central composite design</i> )
CH <sub>3</sub> COOH	Octena kiselina (engl. <i>Acetic acid</i> )
C/N	Omjer kisika i dušika (engl. <i>Oxygen/nitrogen ratio</i> )
CO <sub>2</sub>	Ugljikov dioksid (engl. <i>Carbon dioxide</i> )
D	Ukupna željena funkcija (engl. <i>Desirability function</i> )
DAD	Detektor niza dioda (engl. <i>Diode-array detector</i> )
Df	Stupnjevi slobode (engl. <i>Degrees of freedom</i> )
DD	Doehlertov plan pokusa (engl. <i>Doehlert design - DD</i> )
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (engl. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> )
EtOH	Etanol (engl. <i>ethanol</i> )
FID	Plameno ionizacijski detektor (engl. <i>Flame ionization detector</i> )
FFD	Faktorijalni plan pokusa (engl. <i>Full factorial design</i> )
GAE	Ekvivalenti galne kiseline (engl. <i>Gallic acid equivalents</i> )
GC-FID	Plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. <i>Gas chromatography with flame ionization detector</i> )
GC-MS	Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> )
GRAS	Generalno prihvaćeno kao sigurno (engl. <i>Generally recognized as safe</i> )
HPLC	Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (engl. <i>High performance liquid chromatography</i> )
K	Broj faktora
MAE	Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. <i>Microwave assisted extraction</i> )
MS	Varijanca (engl. <i>Mean Square</i> )
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natrijev karbonat (engl. <i>Sodium carbonate</i> )
NaOH	Natrijev hidroksid (engl. <i>Sodium hydroxide</i> )
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natrijev sulfat (engl. <i>Sodium sulphate</i> )
PTFE	Politetrafluoroetilen (engl. <i>Polytetrafluoroethylene</i> )
R <sup>2</sup>	Koeficijent determinacije (engl. <i>Predicted r<sup>2</sup></i> )
RSM	Metoda odzivnih površina (engl. <i>Response surface methodology</i> )
SC-CO <sub>2</sub>	Superkritični CO <sub>2</sub> (engl. <i>Supercritical CO<sub>2</sub></i> )
SFE	Ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. <i>Supercritical fluid extraction</i> )
SWE	Ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju (engl. <i>Subcritical water extraction</i> )
SC-CO <sub>2</sub> + SWE	Dvostupanjska ekstrakcija (Ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju kojoj prethodi ekstrakcija sa superkritičnim CO <sub>2</sub> )
TSNAs	Kancerogeni nitrozamini specifični za duhan (engl. <i>Tobacco-specific nitrosamines</i> )
UAE	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. <i>Ultrasound-assisted extraction</i> )
UV/VIS	Ultraljubičasto/Vidljivo (engl. <i>Ultraviolet-visible</i> )

v/v	Volumni udio (engl. <i>Volume per volume</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World health organization</i> )
$X_{i,j}$	Ispitivane nezavisne varijable (Procesni uvjeti)
Y	Promatrani (praćeni) odziv



## **1. UVOD**

Konzumacija duhana kulturološko je, sociološko, ekonomsko, zdravstveno i okolišno pitanje današnjice. Arheološka istraživanja su pokazala da su još drevne Maje u Srednjoj Americi duhan koristile za pušenje, ali i u svetim i vjerskim obredima. U Europu je duhan stigao preko španjolskih i portugalskih moreplovaca. Stoljećima se smatrao lijekom da bi danas bio „glavni krivac“ za desetke tisuća smrti godišnje povezanih uz naviku pušenja. Biljka je to koja je odolijevala mnogim izazovima, kako klimatološkim tako i onim društvenim, a sve zbog svog specifičnog kemijskog sastava. Naime, duhan je prirodno najveći izvor nikotina, alkaloida sa specifičnim djelovanjem na ljudski živčani sustav. Dok u malim količinama djeluje kao stimulans, u većim djeluje kao sedativ, a koncentracije iznad 30 mg mogu biti letalne. Srećom, nikotin se brzo metabolizira i izlučuje iz ljudskog tijela, no ovisnost koju izaziva je puno trajnija. Ipak, nije samo nikotin i razvoj ovisnosti o njemu jedini razlog konzumacije duhana. Duhan je izrazito aromatična biljka, zahvaljujući cijeloj paleti isparljivih i polu-isparljivih spojeva. Mishra i Mishra (2013) navode da je u duhanu dosad otkriveno preko 2 000 različitih spojeva. Neki od tih spojeva oslobađaju se tek na visokim temperaturama izgaranja cigarete i tako daju duhanu svojstvo „uživala“.

Proizvodnja duhanskih proizvoda, davno je prerasla iz polja duhana i ručno motanih cigareta u visokospecifične duhanske proizvode koji potrošaču nude specifičan aromatski profil, standardiziran udio nikotina, a u posljednje vrijeme i proizvod smanjenog štetnog učinka na zdravlje. Upravo zbog toga je industrijska prerada duhana posao za „velike igrače“, pa je tržište duhana iznimno centralizirano ali i okrupnjeno. Prerada duhana od samog ubiranja lista, odvija se po točno određenim pravilima kako bi rezultirala ujednačenim i visokokvalitetnim proizvodima. S obzirom da je za takve proizvode, jedino lamina lista prikladna sirovina, svi ostali dijelovi biljke, ali i lista, isključuju se u određenim točkama iz procesa prerade te smatraju nusproizvodom odnosno otpadom (Banožić i sur., 2019). Takav otpad, s obzirom da potječe izravno od lista, i dalje predstavlja vrijedan izvor bioaktivnih spojeva, no zbog svojih tehnoloških svojstava ne koristi se u duhanskim proizvodima, ili se prerađen koristi u malim količinama za izradu proizvoda niske kvalitete. S obzirom da su prerađivači duhana odgovorni za nakupljeni otpad, njegovo odlaganje često moraju platiti jer se otpad bogat nikotinom smatra okolišno neprihvatljivim. S druge strane, takav otpad može služiti kao sirovina za dobivanje visokokvalitetnih spojeva uključujući i nikotin (Kučić Grgić i sur., 2019; Banožić i sur., 2020a).

U posljednjih 10 godina ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz agroindustrijskog otpada postala je rastući trend poglavito zbog ekološke prihvatljivosti jer se otpad koji često nema ekonomsku vrijednost ili mu je vrlo mala, iskorištava na nov način. Razvoj novih tehnika ekstrakcije kao i novih otapala, omogućili su da proces ekstrakcije bioaktivnih spojeva bude u potpunosti usklađen s principima zelene kemije (Gil i Tuberoso, 2021). Inovativne tehnike ekstrakcije razvijene su s ciljem prevladavanja ograničenja konvencionalnih tehnika ekstrakcije. Neka od

tih ograničenja su odvijanje procesa na visokim temperaturama gdje nerijetko dolazi do degradacije termolabilnih spojeva, visok utrošak štetnih organskih otapala, duže vrijeme ekstrakcije te niska selektivnost. Nasuprot tome, zelene tehnike ekstrakcije omogućavaju smanjenje potrošnje energije, uporabu alternativnih otapala i obnovljivih resursa. Osim toga, primjenom ovih tehnika dobivaju se ekstrakti visoke kvalitete i povećane sigurnosti za potrošača. Prema Chemat i sur. (2012) razvoj inovativnih tehnika ekstrakcije počiva na 6 glavnih načela, a to su: odabir alternativnih ili obnovljivih resursa, korištenje alternativnih otapala (uglavnom vode), smanjena potrošnja energije i korištenje inovativnih tehnologija, inzistiranje na nastanku nusproizvoda koji se mogu dalje koristiti umjesto generiranja otpada, smanjenje jediničnih operacija procesa gdje se prednost daje sigurnim, robusnim i kontroliranim procesima te u konačnici proizvodnja biorazgradivog ekstrakta bez tragova otapala ili drugih kemikalija.

Upravo zbog toga, znanstvena je zajednica u stalnoj potrazi za razvojem novih tehnologija kao i u pronalasku novih izvora vrijednih bioaktivnih spojeva. S obzirom da su agroindustrijski otpadi često visoko specifični, nije moguće primijeniti ujednačene procesne uvjete ekstrakcije za svaku vrstu otpada već je potrebno modificirati proces ekstrakcije i odabrati najbolji mogući pristup kako bi se bioaktivni spojevi iz takvih resursa iskoristili što je više moguće. Obzirom da je duhanska industrija, jedna od najvećih agroindustrija u svijetu, velike su količine otpada koji nastaje preradom lista. Također, otpad se odvaja u različitim dijelovima procesa i kao takav može se podijeliti na tri frakcije refabrikat, prašina i rebro. Eksperimentalni dio ove disertacije zasniva se na primjeni inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada te optimizaciji četiri takva postupka (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim CO<sub>2</sub> i ekstrakcija supkričnom vodom) gdje su definirani optimalni parametri za sve četiri primijenjene tehnike ekstrakcije na duhanskom otpadu. Također, valorizirane su i uspoređene navedene tri vrste duhanskog industrijskog otpada, kako bi se ukazalo na njihove razlike u kemijskom sastavu i moguću primjenu. Dat je prikaz tri glavne skupine spojeva u duhanskom otpadu, fenolnih spojeva, isparljivih spojeva i alkaloida (nikotina). Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka zaključeno je, kako je promjenom procesnih parametara moguće manipulirati kemijskim sastavom ekstrakata duhanskog otpada. Tako dobiveni ekstrakti, dodatno pročišćeni bi se potencijalno mogli koristiti kao sirovine u kemijskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Materijal koji zaostaje nakon ekstrakcije, moguće je odlagati u okoliš bez ograničenja ili koristiti kao sirovinu za kompostiranje. Time se ovaj „zeleni“ proces zaokružuje bez štetnih utjecaja na ljudsko zdravlje ili okoliš, dobivaju se novi proizvodi i unaprjeđuju već postojeći procesi.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. DUHAN

Duhan je biljka koja pripada carstvu Plantae, diviziji Magnoliophyta, razredu Magnoliopsida, redu Solanales, porodici Solanaceae i rodu *Nicotiana*. Poznate su 64 vrste roda *Nicotiana* od čega su samo dvije (*Nicotiana rustica* i *Nicotiana tabacum*) prikladne za ljudsku uporabu. Navedene dvije vrste se razlikuju po koncentraciji nikotina i po morfološkim obilježjima (*rustica* ima znatno veću koncentraciju nikotina i manje listove). *Nicotiana tabacum* se najčešće konzumira pušenjem i danas je važna poljoprivredna i gospodarska kultura koja se uzgaja širom svijeta za preradu osušenih listova u duhanskoj industriji. List duhana se konzumira zbog specifičnog i kompleksnog fiziološkog djelovanja sastojaka listova na središnji živčani sustav (Čagalj i sur., 2017a; Ivanov i sur., 2020).

### 2.1.1. Morfološke karakteristike duhana

Stabljika duhana koja se još naziva i struk je zeljasta i podijeljena na nodije (koljenca) i internodije (međukoljenca). Visina same stabljike i dužina internodija svojstvena je sorti duhana i agro-klimatskim uvjetima. Iz stabljike se u zemlju pruža glavni vretenasti korijen iz kojeg izbija plitko postrano korijenje (Butorac, 2009). Cvjetovi duhana mogu biti smješteni pojedinačno na biljci ili skupljeni u cvat na vrhu stabljike (Ivanov i sur., 2020). Iz cvijeta duhana se razvija plod (tobolac) u kojem se nalazi sjeme. Sjemenke duhana su okruglog oblika, smeđe boje i malih dimenzija te u jednom gramu može biti od 10 000 do 15 000 sjemenki. Duž stabljike, naizmjenično je smješteno 10 do 40 listova, čiji broj, oblik i nervatura ovise o sorti duhana. 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). Virginijski tip karakterizira izduženi list s naboranom površinom, dok je kod Burley tipa, list nešto širi i ravne površine. Listovi se, također, dijele s obzirom na kvalitetu i redoslijed branja i to na: podbir, nadpodbir, srednje listove, podvršak i ovršak (Butorac, 2009). Svaki list se sastoji od glavnog rebra i plojke lista. Kada se promatra poprečni presjek lista, uočava se epiderma, koja obavija list, mezofil (palisadno spužvasto tkivo i parenhim) i provodne žile. Vanjske stanice imaju zadebljalu stjenku te tako tvore kutikulu koja je prekrivena dlačicama. Dvije su vrste dlačica, dlačice za transpiraciju i žljezdaste dlačice. Žljezdaste dlačice imaju velik utjecaj na kvalitetu samog lista, s obzirom da sadržavaju smole i eterično ulje.

S obzirom na to da generacijsko vrijeme (period od sjemenke do osjemenjivanja) kod duhana iznosi oko 3 tjedna, biljka duhana se često koristi kao modelni organizam u različitim istraživanjima (Ganapathi i sur., 2004; Ivanov i sur., 2020). O kemijskom sastavu duhana je

nezahvalno govoriti s obzirom da se on mijenja tijekom rasta biljke, ali i tijekom procesa prerade lista. Za kemijski sastav duhana najznačajniji je nikotin i nikotinu slični alkaloidi. Nikotin nastaje u korijenu biljke te se odlaže u listovima, dok npr. sjeme duhana ne sadrži nikotin. Druga važna skupina su ugljikohidrati, čiji se sastav i količina značajno mijenja tijekom prerade lista gdje udio složenih ugljikohidrata opada, a udio reducirajućih ugljikohidrata proporcionalno raste (Banožić i sur., 2020b). Treća skupina spojeva su aromatski spojevi, bilo oni koji su prirodno prisutni u samoj biljci ili oni koji nastaju iz šećera, polifenola i alkaloida tijekom sagorijevanja duhana ili duhanskog proizvoda. Njihov udio i koncentracija ponajviše utječu na organoleptička svojstva duhanskih proizvoda i konzumnu kvalitetu (Bhisey, 2012).

### 2.1.2. Podjela duhana

Postoji nekoliko načina podjele duhana, s obzirom na boju lista, aromatičnost, kemijsku reakciju nastalog dima, načine sušenja i sl.. S obzirom na boju lista, dijeli se na svijetle i tamne duhane, s obzirom na aromatičnost aromatične i nearomatične duhane, s obzirom na kemijsku reakciju, nastalu izgaranjem, na kisele i alkalne duhane, a s obzirom na način konzumacije, na duhane za pušenje, duhane za žvakanje i duhane za šmrkanje (Davis i sur., 1999; Butorac 2009). Jedna od najčešće korištenih podjela je ona s obzirom na način sušenja (Butorac, 2009) pa tako imamo:

- duhane sušene toplim zrakom u posebno konstruiranim sušnicama (*flue-cured*),
- duhane sušene na zraku (*air-cured*),
- duhane sušene na suncu (*sun-cured*),
- duhane sušene iznad otvorene vatre (*fire-cured*).

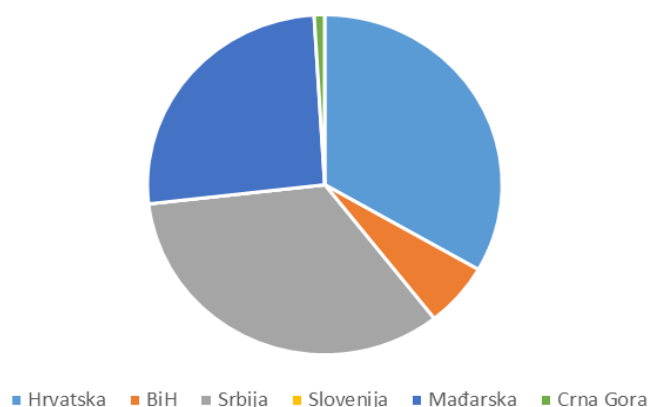
Naravno, duhani se često suše i na kombinirani način kako bi se dobila bolja kvaliteta finalnog proizvoda. *Flue-cured* duhani su najrasprostranjenija vrsta duhana na svijetu (Zhao i sur., 2014). Takvi duhani imaju ujednačenu zlatnožutu boju osušenih listova, s obzirom da takav način sušenja sprječava oksidaciju fenolnih spojeva, također, prirodno prisutni lipofilni spojevi ostaju očuvani dok se škrob razgrađuje u jednostavne šećere. Predstavnici ove skupine su svijetla Virginia i Amarelo. *Air-cured* duhani se suše na zraku, obično u sjenovitim prostorima, gdje su zaštićeni od izravnog djelovanja sunčevih zraka. U usporedbi sa sušenjem u sušnicama, sušenje na zraku traje mnogo duže te tijekom tog postupka dolazi do potpune hidrolize šećera, pa osušeni list sadrži šećere samo u tragovima. List nakon sušenja je izrazito tamne boje jer tijekom sušenja dolazi do oksidacije fenolnih spojeva u kinone i nastanka različitih melanoidnih spojeva. *Air-cured* duhani se mogu podijeliti na svijetle (*light*), tamne (*dark*) i cigarne duhane (*cigar*), a najpoznatiji predstavnici ove skupine su Burley i Maryland. Duhani sušeni na suncu su svjetlo žute boje. Njihova boja nije uzorkovana oksidacijom fenola,

već oksidacijom eteričnih ulja u listu. Zbog podneblja u kojem se uzgajaju (Mediteran) i procesa prerade koji prolaze (fermentacija i sušenje na suncu), ovakvi duhani su izuzetno aromatični, bogati šećerima te imaju nizak udio nikotina. U ovu skupinu spada Virginia *sun-cured* tip kao i različiti tipovi orijentalnih i poluorijentalnih duhana. Duhani sušeni na suncu (*sun-cured*) čine samo 1,4 % ukupne svjetske proizvodnje duhana. Za *fire-cured* duhane karakteristično je da se list suši iznad otvorene vatre pri čemu poprima miris drva koja se lože. Najpoznatiji predstavnik ove skupine je tamna Virginia, koja se konzumira kao duhan za šmrkanje, žvakanje i kao mješavina za lule (Butorac, 2009).

### 2.1.3. Značaj i uporaba duhana

Duhan je kultura koja je kroz povijest znatno utjecala na globalni, politički, ekonomski, socijalni i vjerski život svjetske populacije. Danas je tržište duhana iznimno centralizirano te najveći svjetski proizvođači diktiraju trendove globalnog tržišta (Čagalj i Ivanković, 2017b; Vuković i sur., 2012). Prema zadnje dostupnim podacima (Statista, 2016), najveći svjetski proizvođači cigareta su pet multinacionalnih kompanija, a to su China National Tobacco Corporation, Philip Morris International, British American Tobacco, Japan Tobacco International i Imperial Tobacco.

Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAOSTAT, 2019), duhan se u 2019. godini u svijetu uzgajao na 3 619 118 ha, poljoprivrednih površina, u ukupnoj količini od 6 685 611 tona, gdje je Kina najveći svjetski proizvođač s ukupno 2 610 507 tona proizvedenog duhana, a slijede je Indija sa 804 454 tone proizvedenog duhana i Brazil sa 769 801 tonu proizvedenog duhana. Podatci za 2020. još uvijek nisu dostupni. Najveći europski proizvođač je Italija, a slijede ju Grčka i Poljska, dok je u Republici Hrvatskoj proizvedeno 7880 tona duhana. U zemljama regije, Srbija i Mađarska imaju sličnu godišnju proizvodnju duhana kao i Republika Hrvatska, Bosna i Hercegovina i do pet puta manju, dok Slovenija i Crna Gora nemaju ili imaju prijavljene vrlo male količine proizvedenog duhana (Slika 1).



**Slika 1** Raspodjela proizvodnje duhana u zemljama regije (Izvor: FAOSTAT 2019)

## Uporaba duhana

Uporaba duhana zabilježena je već u 16. stoljeću, a zapisano je da se koristio kao lijek, kao sredstvo za opuštanje te u vjerskim obredima. Na sjevernoameričkom kontinentu duhan se isključivo koristio kao lijek zbog blagih analgetičkih i antiseptičkih svojstava te je primjenjivan prilikom zubobolje ili otvorenih rana. Primjena duhana od samih početaka kao lijeka se raširila i u novije vrijeme. Duhan se inhalirao, žvakao, jeo, pio, pušio, mazao po tijelu, koristio u kapima za oči i napicima, a u Americi se i prvi put počeo konzumirati pušenjem. Masivna komercijalizacija duhana započinje u 19. stoljeću pojavom prvih duhanskih industrija ([Čagalj i sur., 2017a](#); [Banožić i sur., 2019b](#)). Iako se duhanski proizvodi ne smatraju hranom, oni se parcijalno konzumiraju kroz probavni sustav (usta) te su njihova senzorička svojstva poput arome, okusa i mirisa najvažnije svojstvo koje određuje prihvaćanje duhana i duhanskih proizvoda od strane potrošača. Osim pušenjem, jedan se dio proizvedenog duhana konzumira snifanjem i žvakanjem ([Tayoub i sur., 2015](#)). Proizvodnja i uporaba duhanskih proizvoda bilježila je eksponencijalni porast u zadnjoj polovici prošlog stoljeća. Ipak, u zadnjih 20 godina, razvila se svijest potrošača o štetnim učincima pušenja na ljudsko zdravlje. Očekivalo se da će takav porast svjesnosti i pojačane kampanje "protiv pušenja" koje predvodi Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) te sve strože zakonske regulative vezane za konzumaciju ali i cijenu duhanskih proizvoda rezultirati krahom duhanske industrije. No, duhanska se industrija usmjerila na manje razvijene zemlje, kao i na azijsko tržište gdje se u tom periodu bilježi značajni rast broja aktivnih pušača. Iako potrošnja i proizvodnja duhanskih proizvoda u svijetu ne opada, duhanska industrija se već sprema na takvu mogućnost i ubrzano radi na razvoju i promociji novih tehnologija i proizvoda ([Banožić i sur., 2019b](#)). Jedan od primjera su „*heat not burn*“ proizvodi, koji su na tržištu poznati pod nizom komercijalnih naziva, a namijenjeni su potrošačima koji su zabrinuti zbog utjecaja duhana na zdravlje. S obzirom da se štetni utjecaj duhana povezuje s nastankom kancerogenih specifičnih nitrozamina (TSNAs) na temperaturama sagorijevanja, ovakvi proizvodi duhan zagrijavaju (ne dolazi do sagorijevanja) te je sadržaj TSNAs relativno nizak ([Stepanov i sur., 2006](#)), a prema nekim autorima i do 90 % niži od uobičajenih duhanskih proizvoda ([Hatsukami i sur., 2007](#)). Također, farmaceutski proizvodi koji pomažu u odvikavanju od pušenja (nikotinski flasteri, dražeji, sprejevi) zauzimaju važno mjesto na tržištu. Iako razvoj takvih proizvoda dovodi u pitanje budućnost primarnih proizvođača duhana, važno je napomenuti da je duhan prirodno najveći i jedini isplativ izvor nikotina za takve proizvode.

Dakako, treba spomenuti i velik ekonomski i socijalni učinak koji duhanska industrija ima u mnogim zemljama generirajući radna mjesta, protok novca i ekonomsku održivost ([Poltronieri i D'Urso, 2016](#)). Iako duhanska industrija neupitno prolazi kroz izazovna vremena i transformaciju iz „proizvodnje cigareta“ u „nikotinska uživala“, ekonomska snaga i veličina ove

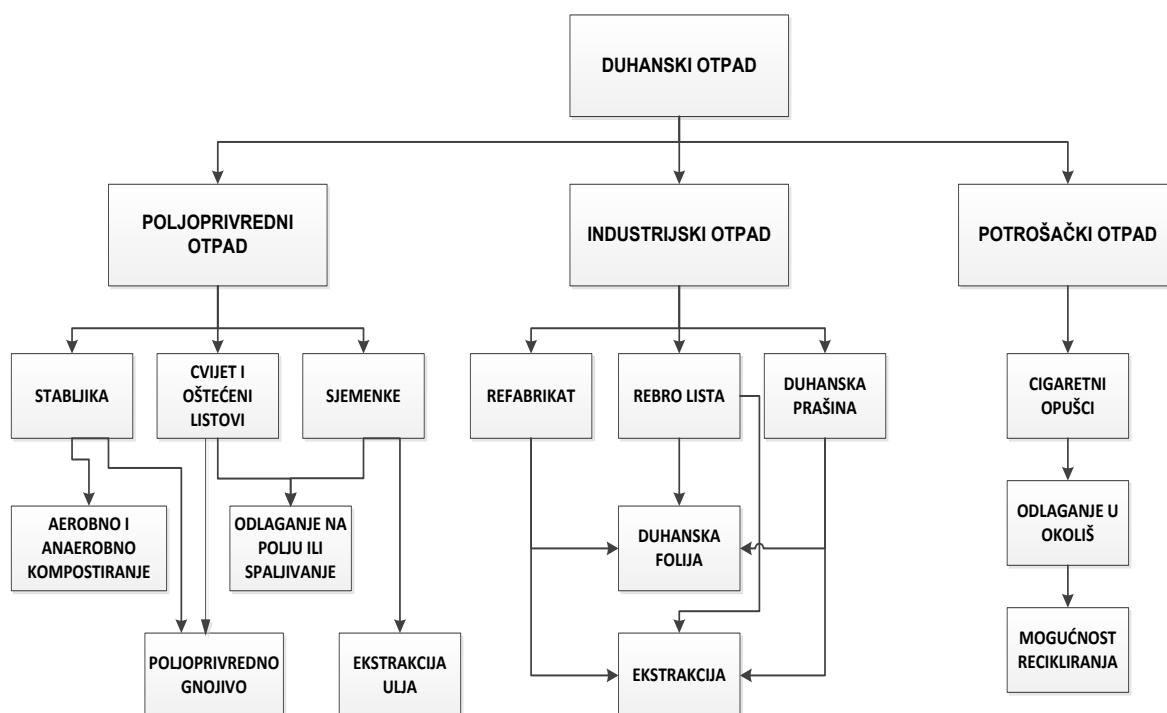


industrije, te ulaganje u nove tehnologije, omogućava im brzu prilagodbu na nova tržišta i osigurava održivost na tržištu.

#### 2.1.4. Prerada duhanskog lista

Promatrajući biljku duhana, jedino se list smatra komercijalno vrijednim te se koristi za daljnju preradu. List se bere izravno na polju, te dalje prerađuje, a ostali dijelovi biljke, korijen, stabljika, neodgovarajući listovi (oštećeni ili bolesni), cvijet i sjeme smatraju se poljoprivrednim otpadom (**Slika 2**), i obično odlažu na samom polju ili spaljuju.

Nakon sušenja (kako je to opisano u **Poglavlju 2.1.2.**) list duhana se podvrgava industrijskoj preradi i doradi. Industrijska prerada duhana uključuje niz različitih operacija kako bi se postigla odgovarajuća kemijska, fizikalna i organoleptička svojstva duhana. Za skladištenje i transport neobrađenog lista potrebno je osigurati odgovarajuće uvjete (zaštićenost od svijetla, prozračnost i vlažnost zraka 15-16 %) ([Banožić i sur., 2019b](#)).

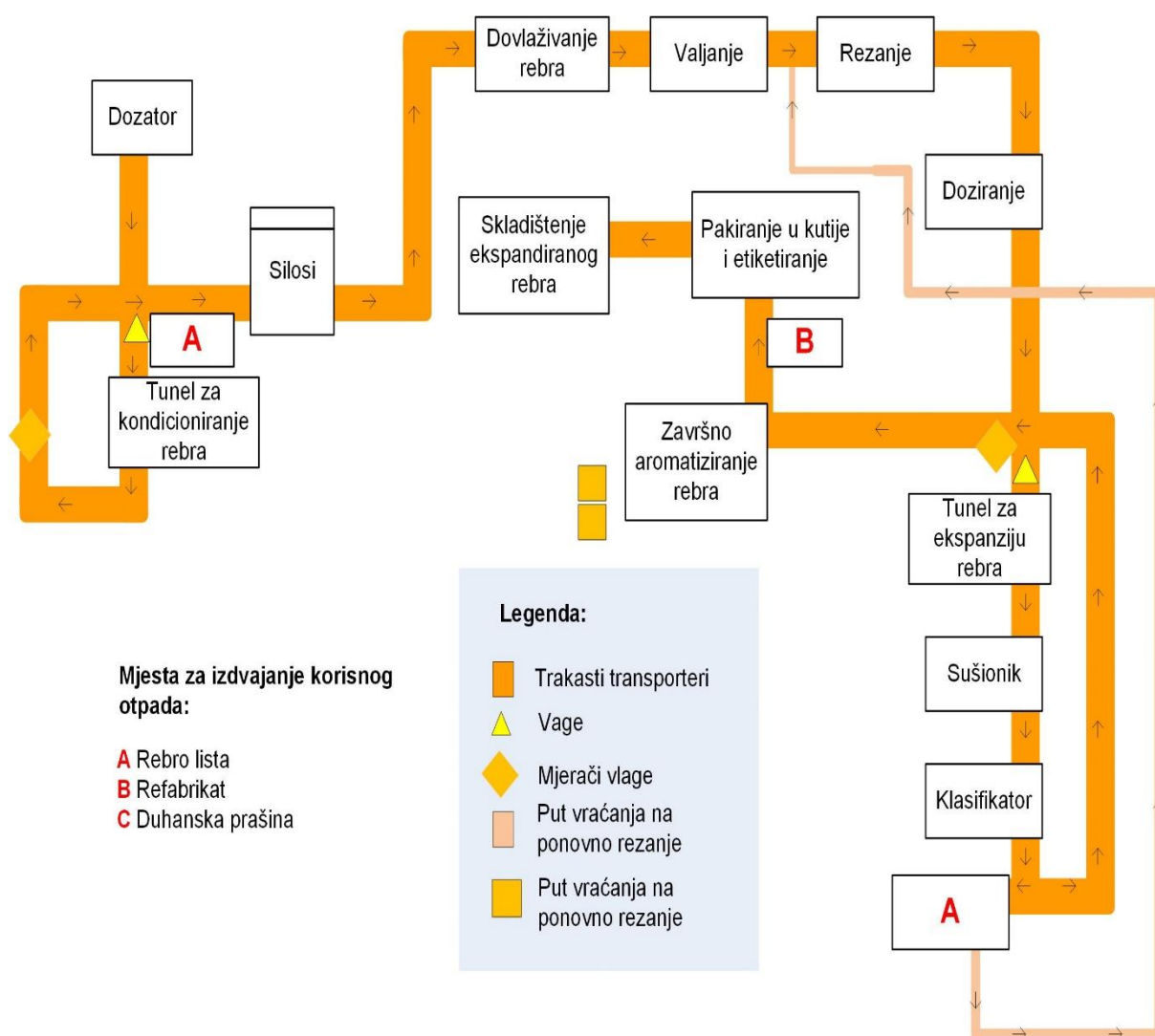


**Slika 2** Duhanski otpad (Izvor: [Banožić i sur., 2019b](#))

Tijekom prerade flue-cured duhana prvo se provodi proces iziljavanja, odnosno odvajanja glavnog rebra od plojke lista (strips). Taj proces provodi se na uređajima koji se nazivaju trešeri ([Butorac, 2009](#); [Đulančić i sur., 2014](#)). Strips ima visoku uporabnu vrijednost, ima više reducirajućih šećera i alkaloida i čini glavni sastojak cigaretnih i cigarnih punjenja. S druge strane rebro ima više kiselina (jabučna i oksalna) te minerala i smatra se nusproizvodom. Odvajanje rebra nužno je zbog osiguravanja kvalitete finalnog proizvoda. Prisutnost rebra u

punjenjima duhanskih proizvoda narušava kvalitetu proizvoda, javljaju se tzv. „rupe“ pri pušenju te druge nepoželjne organoleptičke promjene (Zielke i sur., 1997).

S obzirom na različitu kemijsku građu, rebro ima različite karakteristike izgaranja, brže sagorijeva od stripsa i negativno utječe na sporednu struju dima. Osim toga, rebro je tvrdo u kruto, i može probiti cigaretni papir ako dospije u sami proizvod. Duhanska industrija nastoji smanjiti nastanak industrijskog otpada jer on generira značajne ekonomske gubitke. Zbog toga je razvijen alternativni način obrade duhanskog rebra, nakon čega bi se on mogao koristiti u proizvodnji duhanske folije odnosno rekonstruiranog duhana (Gao i sur., 2014). Upravo zbog toga, danas nema moderne prerade duhana koja ne uključuje i posebne linije za obradu rebra. Jedan takav primjer prikazan je na **Slici 3**, gdje je prikazan postupak obrade rebra u tvornici za preradu duhana „Fabrika duhana Sarajevo“, iz koje su dobiveni uzorci korišteni u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

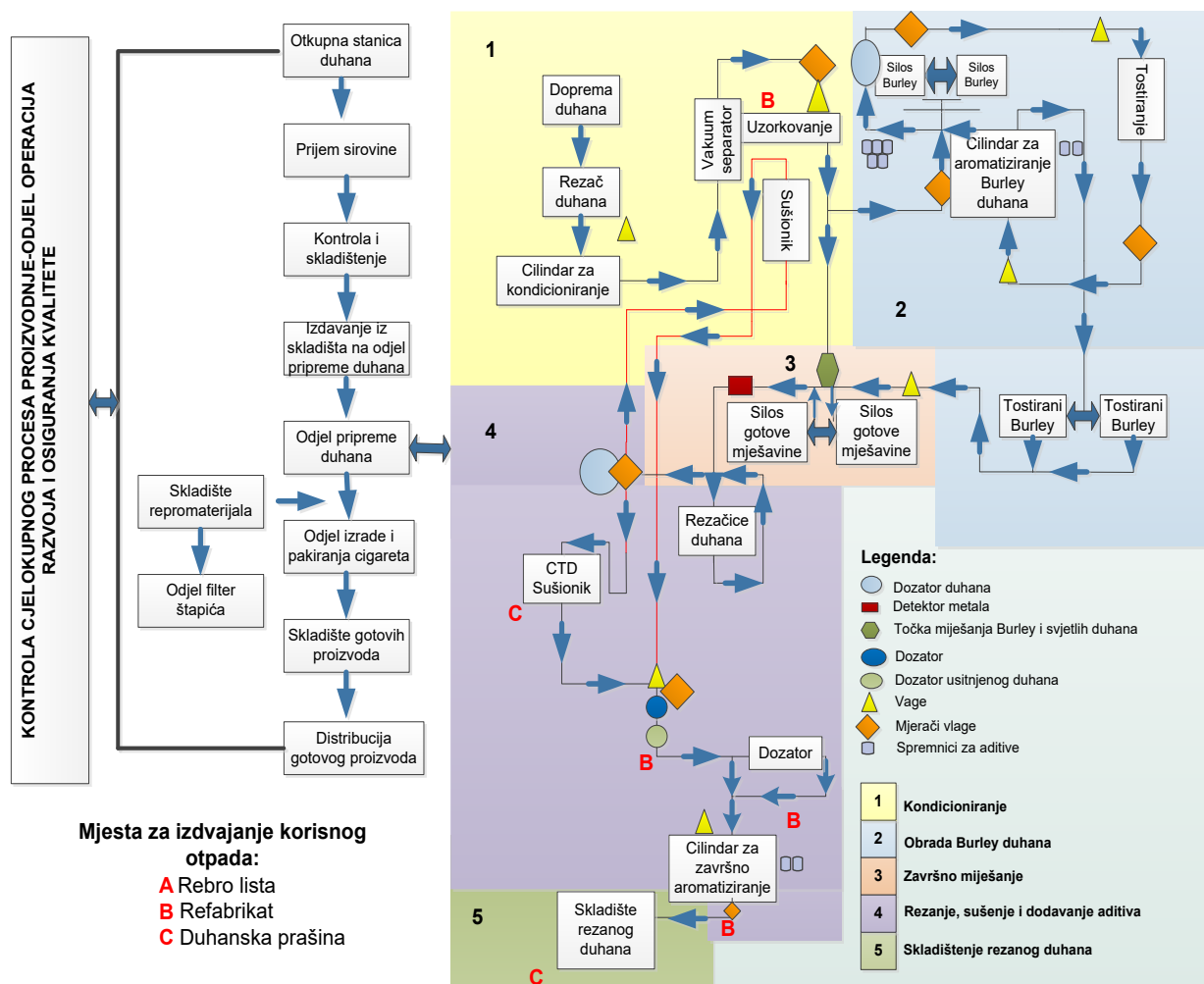


**Slika 3** Shema procesa obrade rebra s točkama koje prikazuju mjesta za skupljanje korisnog otpada u tvornici duhana Sarajevo (Izvor: Banožić i sur., 2019b)

Nakon procesa vlaženja i ekspandiranja rebra, ono se koristi u izradi duhanske folije. Osim rebra, za izradu duhanske folije koriste se drugi nusprodukti prerade duhana, celulozna vlakna i listovi lošije kvalitete. Upotreba duhanske folije u cigaretama i cigarama, značajno smanjuje cijenu gotovog proizvoda, ali s druge strane i narušava kvalitetu. Također važno je napomenuti da se s pojavom ekspandiranog duhana, duhanska folija sve manje koristi u duhanskoj industriji (Đulančić i sur., 2014; Butorac i sur., 2009).

Dva važna procesa tijekom prerade duhanskog lista su kondicioniranje i tostiranje. Kondicioniranje je postupak koji se može provoditi prije ili nakon iziljavanja gdje se na list nanosi voda i vodena para. U koliko se kondicionira cijeli list (zajedno s rebrom) tada se primjenjuju nešto više temperature (Butorac i sur., 2009). Prije završetka postupka kondicioniranja duhan ulazi u struju zraka koja odvaja listove jedan od drugog te se tako odstranjuju i prašina i lagane strane primjese. Na tom dijelu procesa nalaze se vibracijska sita na kojima se odvajaju različite frakcije duhanskog otpada-refabrikata (sitnjavine) i druge strane primjese. Po završetku kondicioniranja duhan je razlistan i znatno vlažniji u odnosu na vlažnost u početnom materijalu i kao takav je pogodan za nanošenje aditiva. Drugi postupak je tostiranje gdje se kroz kratki period duhan izlaže djelovanju visokih temperatura (do 100 °C) (Đulančić i sur., 2014). S obzirom da se postupku tostiranja podvrgavaju samo Burley duhani, on se često i naziva samo „obrada Burley duhana“. Tijekom oba postupka nastaje duhanski otpad koji zbog sadržaja vlage nema uporabnu vrijednost već se odlaže (Banožić i sur., 2019b). Nakon navedenih postupaka različite sorte i tipovi duhana se miješaju na liniji za miješanje (blendiranje) te se formira duhanski blend, koji sadrži Burley, Virginia i orijentalne duhane u točno određenom omjeru. Prije proizvodnje duhanskih proizvoda (cigarete, cigare), duhan se podvrgava rezanju, sušenju i dodavanju aditiva (tzv. sosiranje). Krajnji cilj ovih tehnoloških operacija je dobiti rastresitu duhansku masu pogodnu za izradu cigareta koja istovremeno ima najveći mogući volumen i najmanji mogući udio otpada (refabrikata i prašine). Sukladno tome, najveća količina duhanskog otpada koja je upotrebljiva nastaje upravo u ovim fazama obrade. Nakon završetka faze sušenja vlažnost materijala iznosi do 13 %.

Nakon navedenih tehnoloških operacija slijedi skladištenje i odležavanje radi ujednačavanja vlage te transport rezanog duhana. Tijekom transporta i manipulacije gotove duhanske mješavine nastaje manja količina duhanske prašine (Đulančić i sur., 2014, Butorac i sur., 2009). Dakle, tijekom dorade i prerade lista nastaje više vrsta upotrebljivog i neupotrebljivog duhanskog otpada, kako je to prikazano na **Slici 4**.



**Slika 4** Shema procesa prerade duhana s točkama izdvajanja otpada u tvornici duhana Sarajevo (Izvor: Banožić i sur., 2019b)

Struktura i sastav izdvojenog otpada ovisi od tipa duhana, klasi, vremenu berbe i porijeklu duhanske sirovine. Udio vlage (do 12 %) glavni je kriterij za korištenje otpada u proizvodnji duhanske folije. Također, otpad mora biti bez stranih primjesa (ostaci ambalaže, metal, zemlja, pijesak) te potjecati isključivo od biljke duhana. Shodno tomu, industrijski duhanski otpad se može podijeliti na:

- rebro-kao otpad koji nastaje postupkom iziljavanja,
- refabrikat/duhanska sitnjavina - koja se izdvaja prosijavanjem transportnim trakama i iz različitih pneumatskih sustava,
- duhanska prašina-kao najsitnija frakcija koja se izdvaja u različitim pneumatskim sustavima (Banožić i sur., 2020a).

## 2.2. DUHANSKI INDUSTRIJSKI OTPAD

Rebro, duhanska prašina i refabrikat tri su vrste otpada (nusproizvoda) koja nastaju tijekom industrijske prerade duhana kako je to već prethodno objašnjeno. Refabrikat je najbliži samom stripsu jer podrazumijeva manje fragmente plojke lista, dok duhanska prašina potječe i od rebra i od plojke lista. Kemijski sastav ovih sirovina blizak je kemijskom sastavu duhana i to onom od kojeg potječe. Kao i većina biljnih materijala, i ovi otpadi su građeni pretežno od celuloze, hemiceluloze i lignina (Valverde i sur., 2000). Celuloza čini oko 7-10 % suhe tvari duhana, pektin oko 10 % dok je lignina u listu duhana od 2 do 2,4 % (Baliga i sur., 2003), pa se u otpadu, s obzirom da potječe izravno od duhana, očekuje sličan sastav.

### 2.2.1. Bioaktivni spojevi u duhanskom otpadu

Bioaktivni spojevi se definiraju kao sekundarni metaboliti viših biljaka koji posjeduju različite biološke aktivnosti, a u biljkama nastaju kao evolucijski odgovor na biotičke i abiotičke stresove, kao što su suša, toplina/hladnoća, nedovoljno hranjivih tvari u tlu, napadi kukaca i drugo, dok primarni metaboliti služe za hranu. Prema Croteau i sur. (2020) bioaktivni spojevi u biljkama se mogu podijeliti u tri skupine: terpeni i terpenoidi, alkaloidi i fenolni spojevi. U posljednje vrijeme otkrivaju se različite biološke aktivnosti primarnih metabolita poput ugljikohidrata i proteina (Azmir i sur., 2013; Cvjetko Bubalo i sur., 2018). S obzirom da su sekundarni metaboliti često prisutni u vrlo niskim koncentracijama, pojavio se interes za pronalaskom novih, ekonomičnijih izvora ovih spojeva. Jedno od takvih rješenja su nusproizvodi biljnog podrijetla, čiji je sastav često sličan ili isti izvornoj sirovini, a cijena mala ili je uopće nema (Jayeola i sur., 2018).

Kemijski sastav duhanskog otpada ovisi o mnogo čimbenika, uključujući sortu i način uzgoja biljke od koje je nastao (duhana), načinu sušenja, obrade, uvjetima fermentacije, procesiranja i skladištenja (Banožić i sur., 2018). Autori navode različite skupine bioaktivnih spojeva čija je prisutnost potvrđena u duhanskom otpadu, uključujući, alkaloide (Shen i Shao, 2006), polifenole, terpeene i eterično ulje (Cvetanovska i sur., 2017; Popova i sur., 2015), alifatične alkohole i fitosterole (Liu i sur., 2010).

#### Alkaloidi

Piridinski alkaloidi su skupina alkaloida koja je karakteristična za *Nicotiana* rod, a karakterizirani su kao slabe organske baze. Oko 95 % alkaloida duhana čini nikotin, dok oko 5 % čine manje zastupljeni alkaloidi, kao što su nornikotin, anatabin, anabasin, miozmin, 2,3-dipiridil (Shen i Shao, 2006.), muskarin, atropin, kinin, morfij, strihnin (Vieira i sur., 2010), nikotein i nikotinim (Rawat i Mali, 2013). Alkaloidi su prepoznati kao i glavni prekursori već

spomenutih štetnih TSNAs. TSNAs nisu prisutni u značajnim koncentracijama u biljci duhana, no već tijekom procesa sušenja njihova se količina značajno povećava (Bush i sur., 2001). Kada se alkaloidi duhana, koji su sekundarni amini, nitriraju nastaju TSNAs. Nema dokaza da je ova reakcija reverzibilna, odnosno da se TSNAs mogu vratiti u ne-nitrirani oblik alkaloida.

Istraživanje koje su proveli Troje i sur. (1997) utvrdilo je povezanost sadržaja alkaloida s kvalitetom duhana, no njihova primarna funkcija u biljci duhanu je do danas ostala nepoznata, iako neki autori (Steppuhn i sur., 2004) navode da je sinteza nikotina biološki odgovor protiv napada kukaca i drugih nametnika. Osim nikotina, koji je dokazano odgovoran za razvijanje ovisnosti o duhanu, i drugi alkaloidi također imaju značajne fiziološke aktivnosti (Vieira i sur., 2010.), stoga postoji potreba za izolacijom čistih alkaloida duhana za proučavanje njihovih farmakoloških svojstava i toksikoloških procjena. Ipak ekstrakcija manje zastupljenih alkaloida nije tako dobro istražena, s izuzetkom alkaloida (npr. kotinin) koji se određuju u fiziološkim uzorcima, kao metaboliti nikotina.

### *Nikotin*

Nikotin je najzastupljeniji i najvažniji spoj u listu duhana. Formira se u korijenu metabolizmom ornitin dekarboksilaze, a akumulira u lišću tijekom rasta biljke. Osim duhana, sadrže ga i druge biljke iz porodice Solanaceae, uključujući lišće rajčice i krumpira. Literaturno se navode različite koncentracije nikotina u duhanu, od 0,3 do 3 % (Tayoub i sur., 2015). Molekula nikotina sadrži heterociklički pirolidinski i piridinski prsten. Ti prstenovi nastaju u metaboličkoj biosintezi, a kasnije se kondenziraju. Petočlani pirolidinski prsten nastaje iz ornitina preko simetričnog diamina, putrescina, kroz tri uzastopne reakcije katalizirane ornitin dekarboksilazom, putrescin *N*-metiltransferazom i *N*-metilputrescin oksidazom dok piridinski prsten nikotina nastaje iz nikotinske kiseline. Nikotinska kiselina pak nastaje iz aspartata koji se konvertira u mononukleotid nikotinske kiseline putem kinolinata uz djelovanje 3 enzima, aspartat oksidaze, kinolin sintaze i kinolinat fosforiboziltransferaze (Shoji i sur., 2020). Kemijski gledano, nikotin je tercijarni amin i može postojati u nekoliko oblika kao deprotonirani, protonirani i diprotonirani gdje pH utječe na stupanj protoniranja. Samo je deprotonirani oblik isparljiv i zapravo važan za same proizvođače duhana, dok su protonirani oblici, a koji su prisutni u većim količinama neisparljivi na temperaturama izgaranja cigarete. S obzirom na to da sami oblik ovisi o pH, mogući su određeni manevri tijekom proizvodnje da veći dio protoniranih oblika prijeđe u deprotonirani (Pankow i sur., 2020; Ashley i sur., 2009). Smatra se da deprotonirani oblik nikotina isparava pri temperaturama 246–247 °C (Al-Tamrah, 1999). Izgledom je bezbojna do blijedo žuta tekućina, uljastog izgleda i topljiv u vodi.

U malim količinama (do 1 mg) nikotin djeluje stimulatивно, dok su veće količine (30-60 mg) letalne zbog čega nikotin ima akutnu i kroničnu toksičnost te negativan utjecaj na respiratorni

gastrointestinalni i imunosni sustav. Ipak, nikotin se brzo metabolizira u kotinin i druge metabolite te izlučuje iz ljudskog tijela ([Karačonji i sur., 2006](#)).

### Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti duhana, a imaju važnu ulogu tijekom rasta (obrana) te direktno utječu na kvalitetu lista tijekom prerade. U pojedinim tipovima duhana (orijentalni) njihov udio može biti i do 3 % ([Docheva i sur., 2014](#)). Najveći udio fenolnih spojeva u listu duhana i duhanskom otpadu čine klorogenske kiseline, i to: klorogenska kiselina, kriptoklorogenska kiselina i neoklorogenska kiselina te flavonoidi, rutin i nikotiflorin ([Leffingwell, 1999](#)). U listovima duhana identificirane su i manje koncentracije drugih fenolnih kiselina: galne, protokatehinske, salicilne, vanilične, siringične, *p*-kumarinske, ferulične, cimetne i sinapične te kafeinske kiseline ([Popova i sur., 2015](#)).

#### *Klorogenske kiseline*

Klorogenske kiseline nastaju esterifikacijom između hidrokscimetnih kiselina (kafeinska, ferulična i *p*-kumarinska) s kininskom kiselinom. Klorogenske kiseline posjeduju antibakterijska, antivirusna i antikancerogena svojstva. U literaturi se pronalaze brojni učinci i primjene vezane za klorogenske kiseline. Ma i sur. ([2015](#)) navode da klorogenska kiselina poboljšava osjetljivost na inzulin te da se može primijeniti za prevenciju i liječenje dijabetesa tipa 2. Slična djelovanja navode Bagdas i sur. ([2014](#)) gdje se dugotrajnom uzimanju klorogenske kiseline pripisuje ublažavanje simptoma dijabetičke neuropatije. Klorogenska kiselina smanjuje stvaranje ugrušaka čime prevenira kardiovaskularne bolesti ([Fuentes i sur., 2014](#)) te djeluje antihipertenzijski ([Onakpoya i sur., 2015](#)). Najviše autora navodi antioksidacijsku aktivnost kao biološku aktivnost ekstrakata bogatih klorogenskim kiselinama ([Jiang i sur., 2000](#); [Sato i sur., 2011](#); [Bouayed i sur., 2007](#); [Mullen i sur., 2011](#)). Pronalazak učinkovite metode za ekstrakciju ovih spojeva je otežan jer su klorogenske kiseline osjetljive na povišene temperature što rezultira unutarmolekularnom izomerizacijom, transesterifikacijom i degradacijom klorogenskih kiselina ([Farah i sur., 2005](#); [Jaiswal i sur., 2012](#); [Xue i sur., 2016](#)). Zbog nestabilnosti i sličnosti struktura klorogenskih kiselina na tržištu postoji jako malo dostupnih komercijalnih standarda ovih spojeva ([Wianowska i Gil, 2018](#)). Komercijalni izvori klorogenske kiseline, biljke *Lonicera japonica* Thunb i *Eucommia ulmoides* Oliver su veoma ograničeni, stoga i skupi, te se iznova traže neki novi i ekonomičniji izvori ovih bioaktivnih spojeva ([Chen i sur., 2007b](#)).



### Flavonoidi

Flavonoidi su široko rasprostranjena skupina biljnih fenola, a uključuju flavone, flavonole, izoflavonole, antocijane, antocijanidine, proantocijanidine i katehine (Khoddami i sur., 2013). U većini biljaka, pa tako i u duhanu, flavonoidi se nalaze vezani u glikozidima, gdje hidroksilne skupine i šećeri povećavaju topivost flavonoida u vodi, a drugi supstituent, na primjer metil eter ili modificirane izopentenilne jedinice čine flavonoide lipofilnima. Orijentalni duhani, generalno imaju više flavonoida, te njihov udio može biti i do 1 % mase lista (Dagnon i Edreva 2003). U istraživanju Ru i sur. (2012) udio flavonoida u listu duhana bio je 49,82 mg/g. Flavonoidi duhana se najčešće karakteriziraju kao spojevi s antiradikalnom aktivnošću te se u tu svrhu obično provodi reakcija sa slobodnim radikalima 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH) *in vitro* (Docheva i sur., 2014). Istraživanje Ru i sur. (2012) također je potvrdilo da flavonoidi lista duhana imaju snažno antiradikalno djelovanje.

U istraživanju Docheva i sur. (2014) detektirani su rutin (kvercetin-3-rutinozid) i nikotiflorin (kemferol-3-O-rutinozid) kao dva glavna flavonoida u listu duhana nekoliko kultivara orijentalnog i Virginijskog duhana s područja Bugarske. U istom istraživanju uspoređen je i udio ukupnih flavonoida između listova spomenutih kultivara i otpada (refabrikat i prašina) gdje je udio ukupnih flavonoida u refabrikatu bio sličan listu, dok je prašina imala znatno niži udio flavonoida.

Rutin je najzastupljeniji flavonoid u listu duhana. Preradom duhana njegova se koncentracija smanjuje. Fathiazad i sur. (2005) navode da se fermentacijom listova duhana udio rutina smanjuje s 1,5 % na 0,5 %. Rutin ima dokazana antikancerogena (Lin i sur., 2012), antikoagulantna (Chan i sur., 2009) antiastmatska (Jung i sur., 2007) antidepresivna (Machado i sur., 2008), antihipertenzivna (Kim i sur., 2009) analgetična (Selvaraj i sur., 2014) antioksidacijska (Yang i sur., 2008), opioidna/sedativna (Hernández-Leon i sur., 2015) antihiperkolesterolna (da Silva i sur., 2002), antibakterijska (Dubey i sur., 2013) i antifungalna (Johann i sur., 2011) svojstva.

Nikotiflorin ima dokazano snažno antidijabetičko djelovanje zbog inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze u *in vitro* uvjetima. U istraživanju (Habtemariam, 2011) ovaj učinak nikotiflorina se pokazao boljim od komercijalno korištenog lijeka akarboze. Izuzev toga *in vivo* istraživanja su pokazala da nikotiflorin izoliran iz šafranike posjeduje hepatoprotektivno djelovanje (Wang i sur., 2015).

Ostali flavonoidi prisutni su u mnogo manjim koncentracijama, a određeni su ponajprije sortom duhana gdje orijentalni duhani imaju veću raznolikost, ali i veće koncentracije flavonoida. Ranije objavljeno istraživanje (Fathiazad i sur., 2005) potvrdilo je prisutnost rutina, apigenina i kvercetina u duhanskom otpadu. Istraživanje novijeg datuma (Sifola i sur., 2021) potvrdilo je



prisutnost flavonoida, i to izoskopoletina, rutina, izokvercetina i luteolin-rutinozida i luteolina u stabljikama duhana (poljoprivredni otpad).

### Isparljivi organski spojevi

Posljednjih desetljeća sve se više pozornosti pridaje isparljivim i polu-isparljivim organskim spojevima koji, iako prisutni u vrlo niskim koncentracijama, iskazuju snažan utjecaj na okus i miris različitih proizvoda, ali i posjeduju biološke aktivnosti (Nongonierma i sur., 2006). Isparljivi i polu-isparljivi spojevi uključuju aldehide, ketone, alkohole, estere (laktone) i alifatske spojeve i dr. (Qin i sur., 2021). U listu duhana, ovi spojevi sačinjavaju specifičnu aromu duhana i tako direktno utječu na kvalitetu i ekonomsku vrijednost lista. U lišću duhana aromatski spojevi mogu se naći u dva oblika: u slobodnom stanju i kao glikozidno vezani aromatski spojevi (Cai i sur., 2013). Isparljivi spojevi duhana nastaju pretežno razgradnjom nikotina, ali i degradacijom karotenoida, izoprenoida, monoterpena, seskviterpena, metabolita masnih kiselina, derivata fenilalanina i manje zastupljenih alkaloida (Lei i sur., 2013). U strukturi glikozida, isparljivi spojevi su glikozidnom vezom vezani na ugljikohidrate, a razgradnjom glikozidne veze oslobađaju se isparljivi spojevi. Ovaj postupak razgradnje uočen je tijekom uzgoja i prerade duhana, a posebno tijekom postupka sušenja i fermentacije.

Do sada su se za ekstrakciju isparljivih spojeva iz lišća duhana koristile konvencionalne tehnike ekstrakcije s metil-*tert*-butil eterom, petroleterom, 1,1,1,2-tetrafluoretanom i etanolom kao otapalima (Ding i sur., 2013). Zhang i sur. (2012) proveli su ekstrakciju lišća duhana gdje je nakon ekstrakcije petroleterom, heksanom, dietil-eterom i etil-acetatom u šaržnom ekstraktoru, dobiveni ekstrakt podvrgnut hidroddestilaciji. Također, na listu duhana primjenjivane su ekstrakcija s CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju (Xu i sur., 2004), mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (Yang i sur., 2002), hidroddestilacija (Popova i sur., 2015) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i mikrovalovima u kombinaciji s mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (Yang i sur., 2016). U navedenim istraživanjima kvaliteta i količina dobivenih izolata bili su izravno povezani s primijenjenom tehnikom izolacije. Malen je broj istraživanja koja se bave ispitivanjem isparljivih organskih spojeva u duhanskom otpadu, vjerojatno zbog pretpostavke da je aromatski profil takvih nusproizvoda sličan ili isti, sirovini od koje su dobiveni. Nekoliko autora navodi da bi isparljivi spojevi, prisutni u duhanskom otpadu, trebali bi biti usko povezani s isparljivim spojevima lista, jer duhanski otpad sadrži list i druge dijelove (Zielke i sur., 1997; Valverde i sur., 2000). Ipak, duhanski otpad se odvaja u različitim procesima (kako je to navedenu u **Poglavlju 2.1.4.**) te nije podvrgnut svim procesima kao strips, dok s druge strane se podvrgava drugim procesima (obrada rebra).

Neučinkovito gospodarenje duhanskim otpadom uzrokuje gubitak vrijednih spojeva koji bi se mogli koristiti u drugim proizvodima. Kalamanda (2010) je proveo hidrodestilaciju na duhanskom otpadu i identificirao 26 spojeva. Zhang i sur. (2012) identificirali su 91 spoj u eteričnom ulju duhanskog otpada. Kao najčešće isparljive spojeve u duhanskom otpadu autori navode nikotin, solanon, norsolanadion, neofitadien, nonadekan, ftalnu kiselinu, eikosan, epoksilabdenol, fitol (Kalamanda, 2010) i  $\beta$ -damaskon,  $\beta$ -damascenon, geranil-aceton,  $\beta$ -jonoceton dihidroaktinidiolid, megastigmatrienon, cembren i safranal (Zhang i sur., 2012).

### **2.2.2. Ostali spojevi duhanskog otpada**

Kako je već spomenuto, neki od primarnih metabolita mogu iskazivati određena biološka svojstva. Pa tako primjerice u duhanu, ugljikohidrati pored toga što služe kao rezerva energije, mogu posjedovati neka biološka svojstva poput antioksidacijskih. Osim toga, ovakvi su spojevi skloni degradaciji prilikom prerade i konzumiranja (izgaranje) duhana te izravno utječu na nastanak drugih bioaktivnih spojeva.

#### **Masne kiseline**

Jedan od najviše istraživanih spojeva prisutnih u duhanu (uz nikotin) je solanesol. Solanesol je aciklički triseskviterpen, izoprenoidni nezasićeni primarni alkohol sastavljen od devet izoprenskih jedinica. Izolacija solanesola kao i njegova djelovanja široko su istražena (Yan i sur., 2015; Taylor i sur., 2011; Machado i sur., 2010). Tang i sur. (2007) navode da solanesol u lišću duhana može biti prisutan u slobodnom i vezanom obliku kao ester. U esterima je solanesol esterificiran palmitinskom, linolnom, linolenskom, mirističnom i oleinskom kiselinom. U nekoliko istraživanja potvrđeno je da su sjemenke duhana (poljoprivredni otpad) bogat izvor nezasićenih masnih kiselina, posebno linolne, oleinske i palmitinske kiseline (Veljković i sur., 2006; Mukhtar i sur., 2007). Strezov i sur. (2012) proučavali su pirolizu duhanskog otpada koji se sastojao pretežno od duhanske prašine za dobivanje visokokvalitetnog pirolitičkog ulja. Dobiveno ulje je bilo bogato dekanskom i heksadekanskom kiselinom koje imaju mogućnost primjene u kozmetičkoj industriji i proizvodnji sapuna. Osim esterificirane sa solanesolom, masne kiseline dolaze i u sastavu smola prisutnih na samoj površini lista duhana. Duhanske smole i eterična ulja nastaju u supkutikularnom području glavice žljezdanih dlačica. Po kemijskom sastavu smole su esteri masnih kiselina, poput palmitinske, oleinske i stearinske sa visokomolekularnim alkoholima. Butorac (2009) navodi da je za kvalitetu duhana važniji kvalitativni sastav smola nego njihova količina. Sastav i udio masnih kiselina u duhanskom otpadu još uvijek nije istražen.

## Ugljikohidrati

Osim što služe kao izvor energije, ugljikohidrati duhana su prekursori arome duhana. Prisutni su i u svježem ali i osušenom lišću duhana dok njihova koncentracija ovisi o sorti, načinu i vremenu berbe, ali ponajviše o uvjetima sušenja (temperatura, trajanje sušenja i vlažnost zraka). Sušenje duhana pri visokim temperaturama daje visok udio šećera u konačnom proizvodu, dok niske temperature i blagi uvjeti sušenja daju niske koncentracije šećera (Banožić i sur., 2020b). Ugljikohidrati duhana podrazumijevaju jednostavne šećere, oligosaharide, celulozu, škrob i pektine. Tijekom prerade duhana, često se dodaju šećeri radi postizanja bolje i ugodnije arome tijekom pušenja. Međutim, duhanski ugljikohidrati mogu biti preteča mnogih štetnih spojeva, uključujući formaldehid i 5-hidroksimetilfurfural. Imajući na umu da su dodani šećeri u proizvodnji duhana neizbježni, važno je razumjeti sve promjene u ugljikohidratima od berbe do potrošnje kako bi se postigla bolja svojstva proizvoda i izbjeglo stvaranje štetnih spojeva. Najzastupljeniji jednostavni šećeri u listu duhana su glukoza, fruktoza i saharoza čiji udio varira ovisno o sorti duhana. Naime, Virginia ima visoku razinu šećera (8-30 %), dok Burley karakterizira nizak sadržaj šećera (Geiss i sur., 2007). S druge strane, orijentalni duhani posjeduju značajne količine šećera (10-20 %) i niske udjele proteina što se pripisuje uvjetima uzgoja na tlu, siromašnom dušikom i vodom te sušenju izravno na suncu (Roemer i sur., 2012). Budući da imaju nizak tlak para, jednostavni šećeri u duhanu su osjetljivi na visoke temperature i procese oksidacije. Neki od produkata degradacije reducirajućih šećera (glukoza, fruktoza) i saharoza su furani, osobito furfural i 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), zatim octena kiselina i levoglukozan. Isto je potvrđeno i u istraživanju koja su proveli Martin i sur. (2002) gdje je degradacijom pentozna i heksoza prisutnih u stabljikama duhana dobiven visok udio hidroksimetilfurfurala i furfurala.

Osim što mogu biti prekursori aromatičnih i štetnih spojeva, jednostavni šećeri u duhanu iskazuju i antioksidacijska svojstva. Takva svojstva šećera duhana, potvrđena su prvi put 2013. godine gdje se u ekstraktima lišća duhana pokazalo da sadržaj šećera snažno korelirao s antioksidacijskim djelovanjem (Xu i sur., 2013). Predloženi mehanizam sugerirao je da COOH i C=O skupine mogu zastaviti stvaranje slobodnih radikala doniranjem elektrona. Predloženim mehanizmom nastaju stabilniji oblici ili su oni uključeni u daljnje reakcije sa slobodnim radikalima. Slično je dobiveno i u drugom istraživanju (Liu i sur., 2015) gdje je u ekstraktima duhana sadržaj polisaharida povećavao antiradikalnu aktivnost. Tu aktivnost, autori su pripisali visokom sadržaju monosaharida.

### 2.2.3. Dosadašnja i potencijalna primjena duhanskog otpada

Primjena duhanskog otpada može se podijeliti u tri kategorije:

- proizvodnja duhanske folije/rekonstruiranog duhana,
- proizvodnja energije,
- ekstrakcija bioaktivnih spojeva.

Kako je već spomenuto, do sada se jedino proizvodnja rekonstruiranog duhana primjenjuje u industriji dok su ostale primjene još u fazi istraživanja (**Tablica 1**). Osim što se upotrebom duhanskog otpada za proizvodnju rekonstruiranog duhana dobiva proizvod niske kvalitete i ekonomske vrijednosti, tijekom njegove proizvodnje dolazi do gubitka potencijalno primjenjivih bioaktivnih spojeva. Naime, pri pripremi otpada za proizvodnju rekonstruiranog duhana, potrebna je obrada koja uključuje tretiranje vrućom vodom, što uzrokuje smanjenje koncentracija nikotina i drugih spojeva iz samog duhanskog otpada. Zeng i sur. (2012) navode da nakon tretiranja duhanske prašine i stabljike duhana vrućom vodom dolazi do smanjenja ukupne količine u vodi topljivih šećera, alkaloida i klorida. Također, radi postizanja boljih tehnoloških osobina, rekonstruiranog duhana, potrebno je prethodno ukloniti šećere topljive u vodi iz duhanskog otpada (Zhong i sur., 2010).

Nekoliko se istraživanja bavilo postupcima pirolize za dobivanje energenata iz duhanskog otpada (Strezov i sur., 2012; Pütün i sur., 2007; Encinar i sur., 1997; Valverde i sur., 2000). Tijekom pirolize, kao toplinski potpomognutog procesa duhanski se otpad razgrađuje na bioplin i bio-ulja, a dobiveni kruti proizvod je biogorivo. Ovaj proces može se odvijati uz ili bez prisutnosti kisika. Bioplin i bio-ulja imaju visoku kalorijsku vrijednost te se koriste kao energenti dok se tekuća biogoriva mogu koristiti za proizvodnju petrokemikalija i transportnih goriva (Strezov i sur., 2012).

Od alternativnih načina zbrinjavanja duhanskog otpada, proučavani su i aerobno kompostiranje (Briški i sur., 2003), te proizvodnja organskih gnojiva s obzirom da je duhanski otpad bogat s tri osnovna elementa u komercijalnim gnojivima (dušik, kalij i fosfor) (Chaturvedi i sur., 2008). Ipak nijedna od navedenih metoda nije dala zadovoljavajuće rezultate. Kompostiranje nije dovoljno učinkovito jer duhanski otpad ima nizak omjer C/N (ugljik/dušik), zbog čega je udio nastalog amonijaka mnogo veći od poželjnog (Kučić i sur., 2017). Osim smanjene učinkovitosti, postupci koji uključuju pirolizu su i štetni za okoliš (Zeng i sur., 2012). Sve navedeno navodi na zaključak da su dosadašnje primjene duhanskog otpada u ostale svrhe (izuzev ekstrakcije) smanjene učinkovitosti, zahtjevne, neisplative i često okolišno neprihvatljive. Stoga se ekstrakcija bioaktivnih spojeva nameće kao alternativni proces zbrinjavanja ove vrste otpada.

**Tablica 1** Literaturni pregled predloženih primjena industrijskog duhanskog otpada

Vrsta duhanskog otpada	Vrsta predtretmana/ obrade	Namjena	Literaturna referenca
Duhanska prašina i stabljika duhana	Ekstrakcija vrućom vodom	Proizvodnja rekonstruiranog duhana	Zeng i sur., 2012
Duhanska prašina	Piroliza	Proizvodnja energije	Valverde i sur., 2000
Duhanska prašina	-	Nadomjestak dijela substrata za uzgoj cvjetnica (geranija)	Tzavara i sur., 2019
Duhanska prašina	Kompostiranje	Odlaganje	Kopčić i sur., 2013
Duhanska prašina	Hidrodestilacija	Dobivanje eteričnog ulja	Kalamanda i sur., 2010
Duhanska prašina	Piroliza	Proizvodnja pirolitičkog ulja	Strezov i sur., 2012
Duhanski otpad*	Piroliza	Proizvodnja pirolitičkog ulja	Pütün i sur., 2007
Duhanski otpad*	Piroliza	Proizvodnja tekućeg goriva i plina bogatog vodikom	Encinar i sur., 1997
Duhanski otpad*	Aerobno kompostiranje	Proizvodnja biomase sa smanjenim udjelom nikotina (za 80 %)	Briški i sur., 2003
Duhanski otpad*	Kompostiranje i anaerobna digestija	Reduciranje mase krutog otpada i proizvodnja bioplina	Kučić i sur., 2017
Duhanski otpad*	-	Proizvodnja organskog gnojiva	Chaturvedi i sur., 2008

\* označava nespecificiran duhanski otpad (u radu nije specificirano o kojoj se vrsti otpada radi)

### 2.3. NEKONVENCIONALNE TEHNIKE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA

Ekstrakcija je važna tehnološka operacija, ne samo za razdvajanje ciljanih spojeva iz smjese, nego i kao predtretman čvrstih uzoraka za druge procese. Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz duhana primjenjivane su različite konvencionalne tehnike sa otapalima kao što su etanol, metanol, etil-acetat, aceton ili metilen-klorid (Duan i sur., 2016). Popova i sur. (2019) koristili su metanol za dobivanje ekstrakata duhana bogatih polifenolima s antimikrobnim djelovanjem, dok su Chen i sur. (2007b) koristili aceton i vodu za dobivanje ekstrakata bogatih klorogenskom kiselinom. Najčešće korištena tehnika za ekstrakciju solanesola iz lišća duhana je refluksiranje, a kao otapala korišteni su heksan, aceton, etanol, metanol ili etil-acetat (Zhou i Liu, 2006). Sun i sur. (2013) za ekstrakciju solanesola koristili su heksan kao otapalo, a materijal su prethodno macerirali s amonijakom. Wang i sur. (2013) koristili su ekstrakciju potpomognutu enzimima

za ekstrakciju solanesola. Za ekstrakciju nikotina korišten je heksan (Ikhsanov i sur., 2019), petroleter (Mulyadia i sur., 2013), dok su se octena kiselina i metanol pokazali manje selektivni za ekstrakciju nikotina, pri čemu su u ekstraktu osim nikotina dobiveni različiti alkaloidi i ugljikohidrati (Troje i sur., 1997).

U posljednjih nekoliko godina pojavila se tendencija smanjenja upotrebe konvencionalnih organskih otapala jer su štetna za ljudsko zdravlje, teško se odvajaju od ekstrakta i okolišno su neprihvatljiva. S druge strane, nove zelene tehnike ekstrakcije, poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima, ekstrakcije sa superkričnim otapalima provode se pri nižim temperaturama, traju kraće, pročišćavanje ekstrakta je jednostavnije, pri čemu se javlja bolje iskorištenje ekstrakcije, a uporaba organskih otapala je smanjena. Takve, nekonvencionalne tehnike ekstrakcije preferiraju se zbog okolišne prihvatljivosti, zdravlja potrošača i općenito sigurnosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Međutim, potpuna zamjena organskih otapala je i dalje nemoguća, jer je njihovom uporabom prijenos mase tijekom procesa ekstrakcije najveći. Iako nekonvencionalne ekstrakcijske tehnike imaju velik potencijal zamijeniti konvencionalne tehnike ekstrakcije, potrebno je dublje razjasniti njihov utjecaj na biljne materijale, kao i optimizirati i prilagoditi procesne uvjete (Banožić i sur., 2019a).

### **2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom**

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound assisted extraction* - UAE) jedna je od najčešće korištenih nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije pri čemu je prijenos mase poboljšan ultrazvučnim valovima koji prolaze kroz otapalo i rezultiraju kavitacijom. Povećavanje brzine prijenosa mase i pucanje staničnih stjenki zbog stvaranja mikrokavitacije uzrokuju brži prijenos mase i smanjenu potrošnju otapala. Mehanički učinci fenomena kavitacije (kao što su turbulencije i strujanje tekucine) olakšavaju prodiranje otapala u materijal i ubrzavaju proces ekstrakcije (Shirsatha i sur., 2008)

UAE je već korištena za ekstrakciju pojedinih spojeva iz duhana i duhanskog otpada (**Tablica 2**). Neke od prednosti ove ekstrakcijske tehnike su smanjena potrošnja otapala i energije, niska cijena opreme, veći prinos ekstrakcije. Nasuprot tome, postoje određeni nedostaci poput nastanka degradacijskih produkata i nastanka slobodnih radikala, jer implozijom kavitacijskih mjehurića nastaju mikrokruženja s visokim temperaturama i visokim tlakom (Gu i sur., 2005). Također, jedan od bitnih nedostataka je potencijalna industrijska primjenjivost odnosno „*scale up*“. Industrijska važnost ove tehnologije je upitna jer je fenomen kavitacije ograničen na reaktore manjih dimenzija (Cravotto i sur., 2018).

Za poboljšanje iskorištenja ekstrakcije, kinetike ekstrakcije i bolje selektivnosti moguće je optimizirati procesne uvjete ekstrakcije kao što su vrijeme, temperatura, frekvencija, snaga, tip otapala, omjer otapala i biljnog materijala. UAE se provodi na relativno niskim temperaturama

(do 70 °C) i kraće vrijeme u usporedbi s uobičajenim metodama ekstrakcije (do 2 h). Pokazalo se da je odabir otapala faktor koji ima najveći utjecaj na efikasnost i selektivnost ekstrakcije. Na primjer, za ekstrakciju solanesola iz duhanskog otpada najbolju učinkovitost su pokazale vodene otopine etanola (Chen i sur., 2007a; Zhao i sur., 2005; Banožić i sur., 2019a). Za ekstrakciju polifenola, korišten je širi raspon otapala poput acetona i vode u različitim omjerima, etil-acetata, metanola i etanola (Chen i sur., 2007b; Docheva i sur., 2014 ; Wang i sur., 2009).

Istraživanje koje su proveli Chen i sur. (2007b) pokazalo je kako se djelovanjem ultrazvuka smanjuje vrijeme ekstrakcije (od 2 na 15 min) te se postižu mnogo veće koncentracije polifenola (od 3,55 do 4,42 mg / ml) u ekstraktu u usporedbi s konvencionalnim tehnikama. Taj se učinak pripisuje snažnom utjecaju kavitacije uzrokovanoj djelovanjem ultrazvuka.

**Tablica 2** Prikaz objavljenih znanstvenih radova na bioaktivnim spojevima duhana i duhanskog otpada dobivenih postupkom UAE

Materijal	Uvjeti ekstrakcije					Ekstrahirani spojevi	Literaturna referenca
	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Otapalo	Omjer tekuće/kruće (ml/g)	Frekvencija (Hz) i snaga (W)		
List otpad	-	60	Etanol	10	-	Solanesol	Chen i sur., 2007a
Otpad	25	15	Aceton: voda (1:2 v/v)	9	100 W	Polifenoli	Chen i sur., 2007b
List otpad	40	30	Etil-acetat: metanol (1:1 v/v)	30	-	Fenolne kiseline Flavonoidi	Docheva i sur., 2014
Različiti dijelovi biljke duhana	45	15	85 % vodena otopina etanola	15	40 Hz	Solanesol	Zhao i sur., 2005
Duhanski otpad	-	120	70 % vodena otopina metanola	500/150	-	Klorogenska kiselina	Wang i sur., 2010



### 2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su elektromagnetni valovi koji se u spektru elektromagnetnog zračenja nalaze između X zraka i infracrvenog zračenja (Mandal i sur., 2007) u području frekvencija od 0,3 do 300 GHz. Obično se koriste na frekvenciji od 2,45 GHz (Kaufmann i Christen, 2002) i na valnim duljinama u rasponu od 1 cm do 1 m (Altemimi i sur., 2017). Djelovanjem mikrovalova, uzorak se izravno zagrijava, što za posljedicu ima brže zagrijavanje materijala. Pretvaranje mikrovalne energije u toplinsku provodi se u dva simultana procesa: dipolne rotacije i ionske kondukcije (Llompart i sur., 1997). Ionska kondukcija uzrokuje promjenjivo električno polje koje utječe na migracije iona. Rotacija je uzrokovana orijentacijskom polarizacijom dipola, koji su, također, rezultat promjene električnog polja (Mandal i sur., 2007). Radna frekvencija od 2,45 GHz koristi se zbog toga jer se samo na toj frekvenciji javlja zagrijavanje. Na toj se frekvenciji molekule pokušavaju prestrojivati, ali ne uspijevaju i počinju vibrirati i kao posljedica toga, generiraju toplinu (Mandal i sur., 2007). Na frekvenciji iznad 2,45 GHz dipoli nemaju dovoljno vremena da se uopće počnu prestrojivati dok na frekvenciji ispod 2,45 GHz molekule imaju dovoljno vremena za prestrojavanje, pa do zagrijavanja ne dolazi. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave assisted extraction* - MAE) predstavlja kombinaciju konvencionalnih tehnika ekstrakcije (upotreba otapala) s djelovanjem mikrovalova. Dodatno, visoki tlakovi tijekom procesa ekstrakcije omogućuju da otapalo ostane u tekućem stanju i iznad točke vrelišta (Budzinski i Letellier, 1999; Gil-Ramírez i sur., 2019). Općenito, ovu tehniku ekstrakcije karakteriziraju nizak utrošak otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i mala potrošnja energije (Kaufmann i Christen, 2002).

Nekoliko se autora do sada bavilo primjenom MAE na uzorcima duhana (Tablica 3) dok je kod samo jednog istraživanja naveden duhanski otpad kao predmet istraživanja (Chen i sur., 2007b). Primijenjene temperature bile su visoke (iznad 120 °C) uz izuzetno kratka vremena ekstrakcije (do 6 min). Djelotvornost MAE se povećava s porastom temperature jer se povećava difuzija otapala u unutarnje dijelove matrice uzoraka i olakšava desorpcija sastojaka s aktivnih mjesta matrice. Jedan od glavnih zahtjeva MAE je da otapalo mora apsorbirati mikrovalno zračenje ili se otapalu mora dodati neko drugo kootapalo koje dobro apsorbira mikrovalnu energiju (npr. voda) (Dvorščak, 2015). Kao otapala za MAE solanesola iz duhana navode se heksan i etanol (1:3 v/v) (Zhou i Liu, 2006.) gdje je heksan dobro otapalo za solanesol, a etanol dobro apsorbira mikrovalnu energiju. Machado i sur. (2010) uspoređivali su MAE solanesola iz lišća duhana i srodnih materijala s konvencionalnom ekstrakcijom i UAE. MAE i UAE su dali sličnu koncentraciju solanesola dok je ekstrakcija refluksiranjem dala mnogo niže koncentracije. U Tablici 3 vidljivo je da su se dosadašnja istraživanja na MAE iz duhana i duhanskog otpada pretežno fokusirala na ekstrakciju solanesola i nikotina, dok su se samo dva publicirana istraživanja bavila ekstrakcijom fenola, preciznije klorogenske kiseline



(Chen i sur., 2007b; Li i sur., 2010). U spomenutom istraživanju uspoređivana je MAE klorogenske kiseline iz duhanskog otpada s konvencionalnim metodama ekstrakcije kao što su maceriranje etanolom i smjesom aceton-voda. Utvrđeno je da MAE daje isto iskorištenje ekstrakcije za 90 s, kao i 2 h ekstrakcije s etanolom i 2 dana ekstrakcije sa smjesom aceton-voda.

**Tablica 3** Prikaz objavljenih znanstvenih radova na bioaktivnim spojevima duhana i duhanskog otpada dobivenih postupkom MAE

Materijal	Uvjeti ekstrakcije					Ekstrahirani spojevi	Literaturna referenca
	Omjer tekuće/ kruto (ml/g)	Otapalo	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)		
Listovi	10	Heksan i etanol (1:3, v/v)	700	<1	60	Solanesol	Zhou i Liu, 2006
Različiti dijelovi biljke	10	Heksan i etanol (1:3, v/v)	800	40	60	Solanesol	Machado i sur. 2010
Punjenje za cigarete	25	Izooktan i metanol	200	6	45,8	Nikotin	Ng i Hupe, 2003
Listovi	20/0,4	Klorovodična kiselina (10 mmol/L)	100	5	12	Ispaljive organske kiseline	Zhu i sur., 2006
Listovi	20,30, 40, 50, 60	Aceton i voda (3:7, v/v)	200, 300, 400, 700	1-6	-	Klorogenska kiselina	Li i sur., 2010
Oštećeni listovi	9	Aceton i voda (1:2, v/v)	900	1.5	95,8	Klorogenska kiselina	Chen i sur., 2007b
Listovi	5 12,5	Eutektička otapala	500, 220	<1 i 10	80 i 120	Ispaljivi spojevi	Nie i sur. 2017
Listovi	40	0,05M KOH/ L metanola	195-621	3-40	-	Alkaloidi	Joners i sur., 2001

### 2.3.3. Ekstrakcija supkritičnom vodom (SWE)

U posljednjih nekoliko godina sve se više primjenjuje i ekstrakcija supkritičnom vodom (engl. *Subcritical water extraction* - SWE) jer se pokazala kao čistija, brža i jeftinija metoda u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Voda je iznimno polarna što ograničava njenu primjenu kao otapalo, no s druge strane, nezapaljiva je, netoksična, lako dostupna i jeftina. Povećanjem tlaka i temperature vode smanjuje se polarnost vode i povećava selektivnost prema nepolarnijim spojevima (Brunner, 2014). To se svojstvo pokazalo iznimno korisnim u procesima ekstrakcije. Supkritična voda je voda na temperaturama iznad svoje točke vrenja (100 °C) i ispod svoje kritične točke (374 °C) pri tlaku kod kojeg još uvijek ostaje u tekućem stanju (Ramos i sur., 2002). Pri supkritičnim uvjetima, voda ima nižu viskoznost te veće vrijednosti koeficijenta difuzije i toplinske vodljivosti koje poboljšavaju prijenos mase i topline (Jokić i sur., 2018).

Ovom ekstrakcijskom tehnikom se uspješno ekstrahiraju i hidro- i liposolubilne komponente. Sposobnost otapanja nepolarnih organskih komponenti je slična organskim otapalima koji su skupi, potencijalno toksični i njihovo odlaganje ima negativan utjecaj na životnu sredinu. Korištenjem ove metode ekstrakcije skraćuje se vrijeme te potpuno isključuje uporaba toksičnih organskih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Pregledom znanstvene literature utvrđeno je da je SWE primarnih metabolita na duhanu i duhanskom otpadu bila predmet malog broja istraživanja (Tablica 4), dok SWE bioaktivnih spojeva koji su predmet ove doktorske disertacije iz duhana i duhanskog otpada nije istražena.

**Tablica 4** Prikaz objavljenih znanstvenih radova na spojevima duhana i duhanskog otpada dobivenih postupkom SWE

Materijal	Uvjeti ekstrakcije				Ekstrahirani spojevi	Literaturna referenca
	Omjer tekuće/ kruto (g/ml)	Tlak (bar)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)		
Listovi duhana	100/4,33	14-220	0.25	200-305	Šećeri	Kumar i sur., 2017
Stabljika duhana	15/1,2	80-420	60	300	Plinovi (vodik) Karboksilne kiseline	Madenoglu i sur., 2012

Kumar i sur. (2014) patentirali su postupak hidrolize ugljikohidrata iz stabljike duhana korištenjem supkritične vode. U navedenom istraživanju iz stabljike duhana kao biomase, dobiveni su jednostavni šećeri (heksoze i pentoze) u kratkom vremenskom roku. U drugom istraživanju (Madenoglu i sur., 2012) stabljike duhana su tretirane vodom u supkritičnom stanju gdje se dobila plinovita i tekuća frakcija. U tekućoj frakciji (ekstraktu) detektirane su pretežno karboksilne kiseline (hidroksiocetna kiselina, mravlja kiselina i octena kiselina), furfurali, fenoli (fenol i krezoli) i aldehida (formaldehid i acetaldehid). U oba navedena istraživanja tretirana je stabljika duhana kao poljoprivredni, lignocelulozni otpad gdje je u uvjetima supkritične vode došlo do degradacije složenih ugljikohidrata na jednostavnije spojeve. Degradacija složenih spojeva u supkritičnim uvjetima može biti pozitivna i negativna ovisno o degradacijskim produktima koji nastaju. Istraživanje Martin i sur. (2002) potvrdilo je da u duhanskom otpadu (stabljike duhana) tretiranjem na temperaturama iznad 200 °C nastaju furfural i HMF kao degradacijski produkti šećera (heksoza i pentoza). Upravo zbog praćenja nastanka degradacijskih produkata i manipuliranja istim, SWE se nametnula kao izuzetno korisna tehnika za tretiranje različitih biljnih materijala za smanjenje udjela nepoželjnih spojeva i nastanak poželjnih.

#### 2.3.4. Ekstrakcija s CO<sub>2</sub> u superkritičnom stanju (SC-CO<sub>2</sub>)

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. *Supercritical fluid extraction* – SFE) temelji se na činjenici da pojedini plinovi iznad svoje superkritične točke ili u njejoj blizini postaju izuzetno dobra otapala prirodnih spojeva. Kritična točka definira se kao točka (temperatura i tlak) iznad koje ne postoje zasebna plinovita i tekuća faza, već fluid sa pojedinim svojstvima tekućine i plina (Jokić i sur., 2011; Brunner i sur., 2005). U superkritičnom stanju gustoća fluida slična je gustoći tekućine, viskozitet viskozitetu normalnih plinova, a difuzija je i do dva puta veća nego kod tipičnih tekućina. CO<sub>2</sub> u superkritičnom stanju jedno je najčešće korištenih otapala u ekstrakciji superkritičnim fluidima. CO<sub>2</sub> prelazi u superkritično stanje pri uvjetima temperature od 31,06 °C i tlaka iznad 7,38 MPa (Aladić, 2015).

Procesni parametri koji utječu na SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju su tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije, protok CO<sub>2</sub>, dodatak kootapala te karakteristike samog materijala koji se ekstrahira (veličina čestica, oblik, raspodjela veličina čestica te poroznost čestica i sloja) (Reverchon i De Marco, 2006; Martinez, 2008).

Neke od prednosti korištenja SC-CO<sub>2</sub> kao otapala su:

- lako dostupan, jeftin, siguran za okoliš te označen kao GRAS otapalo,
- mogućnost ekstrahiranja termolabilnih spojeva,

- visoka efikasnost ekstrakcije uzrokovana svojstvima otapala (bolja difuzija, niža viskoznost i manja površinska napetost),
- separacija otapala od ekstrakta je brza i jednostavna,
- proces je primjenjiv na sustavima različitih kapaciteta od laboratorijskih do industrijskih (Jokić, 2011).

Neka od ograničenja ovog procesa su rad pri visokim tlakovima te cijena i dostupnost opreme za superkritičnu ekstrakciju.

SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija već je pronašla primjenu u industriji duhana kao sredstvo za uklanjanje nikotina odnosno proizvodnju duhana sa smanjenim udjelom nikotina. Tako se i većina do sada objavljenih istraživanja na SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji duhana i duhanskog otpada odnosila na ekstrakciju solanesola i nikotina (**Tablica 5**), a samo su se pojedini autori (Scrugli i sur., 2002; Rodriguez i sur., 2008) bavili ekstrakcijom drugih spojeva. Scrugli i sur. (2002) koristili su SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju s etanolom kao kootapalom te tako ekstrahirali alkaloidne, voskove i isparljive spojeve iz lista duhana. Smanjena selektivnost ove metode je jedan od nedostataka što su i naveli Coffa i sur. (2016) gdje su tijekom proizvodnje duhana sa smanjenim udjelom nikotina, također ekstrahirani neki drugi spojevi poput voskova i drugih alkaloida duhana. Osim toga primjena SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije rezultirala je promjenama u kemijskom sastavu dima duhana, dok promjena u citotoksičnosti i mutagenosti nije bilo.

Rincón i sur. (1998) publicirali su istraživanje na optimizaciji SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na duhanskom otpadu. Spomenuto istraživanje je pokazalo da se iskorištenje ekstrakcije povećava s povećanjem tlaka, dok je temperatura imala dvojak utjecaj. Najveće iskorištenje ekstrakcije bilo je pri temperaturama između 50-60 °C, a iznad 60 °C iskorištenje je bilo manje. Rodriguez i sur. (2008) koristili su SC-CO<sub>2</sub> za ekstrakciju solanesola iz lišća duhana. Uz solanesol, dobiveni ekstrakt karakterizirala je visoka razina nikotina i prisutnost  $\alpha$ -tokoferola. Primjena SC-CO<sub>2</sub> za ekstrakciju solanesola iz lista duhana bila je predmet istraživanja i drugih autora (Huang i sur., 2008; Wang i sur., 2018). Rezultati nedavnog istraživanja (Tita i sur., 2021) pokazali su da je tlak ključan parametar koji određuje selektivnost postupka SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, pri čemu se na nižim tlakovima dobivaju ekstrakti s većim udjelima solanesola, a pri višim tlakovima ekstrakti s većim udjelom nikotina.

**Tablica 5** Prikaz objavljenih znanstvenih radova na bioaktivnim spojevima duhana i duhanskog otpada dobivenih postupkom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije

Materijal	Uvjeti ekstrakcije				Ekstrahirani spojevi	Literaturna referenca
	Tlak (bar)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Kootapalo		
Listovi	100	-	40	Etanol/ KOH	Alkaloidi, Nikotin, Voskovi, Proteini	Scrugli i sur., 2002
Listovi	260	-	70	-	Nikotin	Coffa i sur., 2016
Duhanski otpad	150-300	180-300	50-70	-	Nikotin	Rincón i sur., 1998
Listovi	80-250	60	25-60	-	Solanesol, Nikotin, $\alpha$ -tokoferol	Rodriguez i sur., 2008
Oštećeni listovi	183-517	100-180	40-66.7	23 %tna vodena otopina etanola	Solanesol	Huang i sur., 2008
Duhanski otpad	100-300	120	40 -80	-	Solanesol	Wang i sur., 2018
Duhanski otpad-refabrikat	150-370	180	40-58	-	Solanesol i nikotin	Tita i sur., 2021

## 2.4. EKSPERIMENTALNI DIZAJN I OPTIMIZACIJA PROCESA

Eksperimentalni dizajn igra važnu ulogu u različitim područjima znanosti i industrije. Eksperiment je dio znanstvene metode, a podrazumijeva primjenu tretmana na eksperimentalnim jedinicama te se temelji na mjerenju jednog ili više odziva. Tradicionalan pristup optimizaciji podrazumijevao je analizu jednog po jednog faktora dok su danas razvijene

različite multivarijantne statističke tehnike kojima se može istovremeno odrediti utjecaj više nezavisnih varijabli kao i njihovih interakcija na proces.

### **2.4.1. Metoda odzivnih površina (RSM)**

Jedan od najčešće korištenih eksperimentalnih planova za optimizaciju je metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology* - RSM). Ova metoda se smatra izuzetno korisnim alatom jer omogućuje procjenu učinaka više čimbenika i njihovih interakcija na jednu ili više varijabli odziva. Parametri koji utječu na proces nazivaju se nezavisnim varijablama, dok se odzivi nazivaju zavisnim varijablama. Set eksperimenata određenih matricom, a koji predstavlja različite kombinacije nezavisnih varijabli, naziva se eksperimentalni dizajn ili plan pokusa (Bezzera i sur., 2008). Box-Behnkenov plan pokusa (engl. *Box-Behnken design* - BBD) i centralno-kompozitni dizajn (*Central composite rotatable design* - CCD) dva su najčešća eksperimentalna plana koja se koriste u metodi odzivnih površina. Faktorijalni plan pokusa (engl. *Full factorial design* - FFD) i Doehlertov plan pokusa (engl. *Doehlert design* - DD) također se primjenjuju u istraživanjima koja se bave optimizacijom (Baş i Boyaci, 2007; Bezzera i sur., 2008). Međusobno se razlikuju u odnosu na razinu ispitivanih varijabli, broj potrebnih pokusa i odabir eksperimentalnih točaka.

RSM je jedna je od najčešće korištenih multivarijantnih statističkih tehnika za procjenu utjecaja nezavisnih varijabli na zavisne. Za razliku od drugih statističkih tehnika, RSM zahtjeva manje vremena i manji broj eksperimenata kao bi se opisao modelni sustav, odnosno može se reći kako RSM daje mnogo informacija na osnovi manjeg broja eksperimenata. Ona predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koje se temelje na polinomnoj jednadžbi koja se formira na osnovi eksperimentalno dobivenih podataka (Bezzera i sur., 2008). Ova metoda provodi se u tri koraka, gdje se u prvom koraku tzv. preliminarnoj fazi, određuju nezavisni parametri i njihove razine. Nije uvijek moguće procijeniti sve parametre koji utječu na neki proces te se tada izdvajaju oni dominantni. Određivanje razine (eksperimentalnog ranga) obično se temelji na literaturno dostupnim ali i preliminarnim podacima. Pravilno postavljanje razina nezavisnih varijabli, važno je, jer dobiveni model kao i optimalni uvjeti vrijede samo unutar početno postavljenih razina nezavisnih varijabli.

U drugom koraku odabire se eksperimentalni dizajn te se na osnovi eksperimentalnih podataka formira, verificira model koji opisuje odnos između nezavisnih i zavisnih varijabli. U metodi odzivnih površina, teoretski se određuje model koji najbolje opisuje kako na zavisne varijable utječu nezavisne varijable.

Ovisno o složenosti procesa, ali i odabiru nezavisnih varijabli i njihovim razinama, rezultati se mogu aproksimirati funkcijama prvog ili drugog reda. Ukoliko eksperimentalni podatci ne tvore krivulje, tada se oni mogu aproksimirati linearnom funkcijom te kod takvih modela interakcije nezavisnih varijabli ne utječu na odziv. Tako dobivena aproksimacijska funkcija modela prvog reda glasi:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_i x_i + \varepsilon \quad (1)$$

Ukoliko se eksperimentalno dobiveni podatci ne mogu aproksimirati linearnom funkcijom, tada se koristi polinom drugog reda odnosno funkcija čiji opći oblik glasi:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Y – promatrani odziv

$\beta_0$  – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma;

$\beta_j$  – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

$\beta_{jj}$  – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

$\beta_{ij}$  – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma;

$X_i$  i  $X_j$  – kodirane nezavisne varijable (tlak i temperatura) (Baş i Boyaci, 2007).

Koeficijenti odzivne modela određuju se metodom najmanjih kvadrata, a nakon njihovog određivanja radi se analiza i test adekvatnosti odzivne funkcije primjenom analize varijance (ANOVA) ili studentovog t-testa. Pomoću njih određuju se one nezavisne varijable ili njihove interakcije koje značajno utječu na promatrani proces. Međutim, potrebno je eksperimentalno provjeriti pouzdanost teoretski određenih modela u optimalnim uvjetima. Chi-Square test i t-testovi najčešće se koriste za određivanje razlike između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti. Druga metoda za procjenu validacije modela je izračunavanje eksperimentalne pogreške između teorijskih i eksperimentalnih vrijednosti (Bezzer, 2008; Aydar, 2018). U zadnjem koraku izrađuju se trodimenzionalne odzivne površine kao funkcija nezavisnih parametara uz određivanje optimalnih točaka (3D dijagrami). Takvim grafičkim prikazom odzivnih površina u trodimenzionalnom obliku omogućava se vizualizacija i samim time bolje razumijevanje utjecaja nezavisnih varijabli na zavisne.

#### **2.4.2. Prikladnost metode odzivnih površina za optimizaciju procesa ekstrakcije**

Metoda odzivnih površina pokazala se prikladnom u optimizaciji različitih procesa ekstrakcije (Aydar, 2018). S obzirom da se kod biljnih materijala obično radi o nehomogenom uzorku i

velikoj raznolikosti prisutnih bioaktivnih spojeva, velik je broj nezavisnih varijabli koje mogu same ili u interakciji s drugim nezavisnim varijablama utjecati na ishod ekstrakcije. Stoga je ključan korak u procesu optimizacije ekstrakcije pravilan odabir nezavisnih varijabli i njihovih vrijednosti raspona podataka. Interakcije između pojedinih parametara, često su presudne za modeliranje odnosa između nezavisnih i zavisnih varijabli.

Said i sur. (2018) u svom preglednom radu navode da osim u definiranju optimalnih uvjeta procesa ekstrakcije, RSM može pomoći istraživaču ili industriji da se usredotoče na određene varijable koje najviše utječu na odziv. CCD i BBD uspješno mogu koristiti u optimizaciji procesa ekstrakcije kao ekonomičnija alternativa tradicionalnom pristupu optimizacije, gdje se pratio utjecaj jedne nezavisne varijable kroz vrijeme, te omogućava visok stupanj točnosti u predviđanju modela, koji opisuju procese ekstrakcije. BBD se obično koristi za tri nezavisne varijable te omogućuje dobro predviđanje procesa čak i kada su promatrane varijable u uskom rasponu ulaznih vrijednosti. S druge strane, CCD je prikladan za promatranje utjecanja 2 nezavisne varijable na proces ekstrakcije, no s obzirom da se kod njega koriste eksperimenti u ekstremnim točkama, nije prikladan za procese ekstrakcije temperaturno osjetljivih spojeva u širokom temperaturnom rasponu (visoke temperature) (Myers i sur., 2016). Yolmeh i Jafari (2017) ističu kako je tijekom procesa ekstrakcije ključna nasumična izvedba eksperimenata (randomizacija eksperimenata) te ponavljanja u središnjoj točki.

Prikladnost RSM-a u optimizaciji procesa ekstrakcije potvrđuje se visokim koeficijentom determinacije- $R^2$  (što bliže 1), i stupnjem statističke značajnosti ( $p$  vrijednost što bliže 0) te maloj razlici između modelom predviđenih i eksperimentalno dobivenih optimalnih uvjeta. Jedan od najvećih izazova u primjeni RSM-a u optimizaciji različitih procesa je bio pronalazak funkcije kojom bi se moglo istodobno optimizirati više nezavisnih varijabli. To je omogućeno 1980. kada su Derringer i Suich predstavili koncept željene funkcije (engl. *Desirability function*) (Derringer i Suich 1980). Ova funkcija temelji se na ideji da je kvaliteta proizvoda ili procesa koji je uvjetovan mnogim značajkama potpuno neprihvatljiv ako je vrijednost i jedne od tih značajki izvan "poželjne" granice.

Dakle, za konačni cilj, ova funkcija ima postavljanje procesnih uvjeta koji osiguravaju usklađenost sa svim prethodno zadanim kriterijima te u isto vrijeme pruža najbolju moguću kompromisnu vrijednost u željenom odgovoru (Candiotti i sur., 2014). Optimiranje se provodi na način da se praćeni odzivi ( $Y$ ) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću 0 - 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, odnosno 1, najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija ( $D$ ) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ove doktorske disertacije bio je:

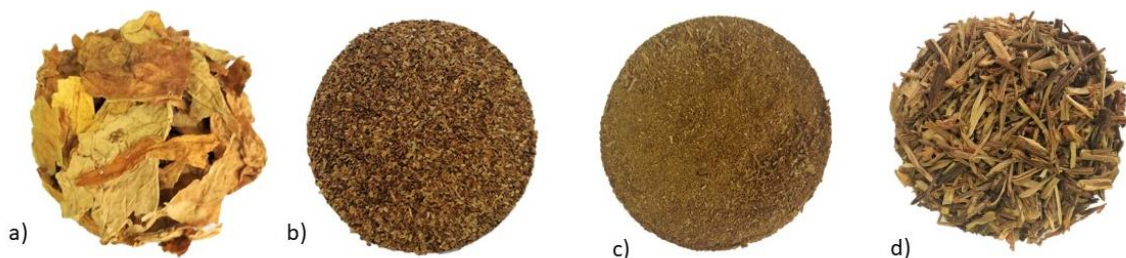
- prikupiti uzorke iz tvornice prerade duhana „Fabrika duhana Sarajevo“ Bosna i Hercegovina,
- pripremiti materijal za ekstrakciju odnosno provesti usitnjavanje uzoraka s ciljem povećanja površine uzorka (POLYMIXR LAB MILL PX-MFC 90 D, KINEMATICA GmbH),
- provesti postupak ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada primjenom standardne Soxhlet metode,
- provesti ekstrakciju bioaktivnih spojeva potpomognutu ultrazvukom iz duhanskog otpada na ultrazvučnoj kupelji te pri tome ispitati utjecaj parametara ekstrakcije (vrsta otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije, omjer tekuće/kruto) na iskorištenje ekstrakcije i udio bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima,
- provesti ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada s CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju te pri tome ispitati utjecaj parametara ekstrakcije (tlaka, temperature, vremena ekstrakcije) na iskorištenje ekstrakcije i udio bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima,
- provesti ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada vodom u supkričnom stanju te pri tome ispitati utjecaj parametara ekstrakcije (temperatura, vrijeme ekstrakcije i omjer tekuće/kruto) na iskorištenje ekstrakcije i na udio bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima,
- identificirati i kvantificirati nikotin, fenolne spojeve (klorogensku kiselinu, kafeinsku kiselinu, nikotiflorin, rutin) te degradacijske produkte (5-HMF, 5-MF, furfural, nikotinsku kiselina i nikotinamid) u dobivenim ekstraktima duhanskog otpada primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije sa detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD),
- identificirati i kvantificirati masne kiseline u ekstraktima dobivenim SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcijom i Soxhlet metodom pomoću plinske kromatografije sa plameno-ionizacijskim detektorom (GC - FID),
- spektrofotometrijski odrediti ukupni sadržaj fenola i antiradikalnu aktivnost dobivenih ekstrakata,

- statistički obraditi eksperimentalno dobivene podatke i optimirati uvjete za odabrane inovativne tehnike ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa *Design Expert*<sup>®</sup>.

## 3.2. MATERIJALI

### 3.2.1. Duhanski otpad

Duhanski blend (sastavljen od 26,7 % Orijentalnih duhana i 73,3 % Virginijskih duhana) i tri frakcije duhanskog otpada, refabrikat, prašina i rebro (**Slika 5**), nastale od istog blenda dobiveni su u travnju 2018. godine od tvornice prerade duhana „Fabrika duhana Sarajevo“, Bosna i Hercegovina, članice grupacije British American Tobacco.



**Slika 5** Uzorci za ekstrakciju: a) duhanski list (blend), b) refabrikat, c) duhanska prašina, d) rebro lista (Izvor: autor)

Frakcije duhanskog otpada odvojene su tijekom procesa prerade lista (kako je to opisano u teorijskom dijelu, **Poglavlje 2.1.4.**). Za ekstrakcije je korišten isključivo duhanski otpad čiji je inicijalni udio vlage bio ispod 12 % te nije sadržavao druge tvari koje ne potječu od samog lista.

### 3.2.2. Kemikalije i standardi

Za superkričnu CO<sub>2</sub> ekstrakciju korišten je CO<sub>2</sub> čistoće 99,95 % (v/v), proizvođača Messer (Ruše, Slovenija).

Za spektrofotometrijske analize korišteni su:

- 1,1-difenil-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina, čistoće 97,5 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- fenol, čistoće 99,0 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- glukoza, čistoće 96,0 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),

Pri HPLC analizi korišteni su sljedeći standardi:

- klorogenska kiselina, 96,63 % čistoće, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka),
- kafeinska kiselina, 97,7 % čistoće, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka),
- rutin, 94,56 %, čistoće, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka),

- nikotin, 99,0 % čistoće, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- 5-metilfurfural, 99,0 % čistoće, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, 97 % čistoće, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- nikotinamid, 99,5 % čistoće, Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švicarska),
- nikotinska kiselina 99,5 % čistoće, Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švicarska),
- furfural 99,0 % čistoće, Acros Organics™ (Geel, Belgija),
- 5-HMF 98,0 % čistoće, Acros Organics™ (Geel, Belgija),
- kriptoklorogenska kiselina, 98,0 % čistoće, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- neoklorogenska kiselina, 98,0 % čistoće, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- nikotiflorin,  $\geq 95,0$  % čistoće, PhytoLab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Njemačka).

Za pripremu mobilnih faza kod HPLC analiza korišten je metanol, J.T. Baker (Pennsylvania, SAD), HPLC čistoće, acetonitril, J.T. Baker (Pennsylvania, SAD), HPLC čistoće i ultračista Millipore voda, 0,054  $\mu\text{S}/\text{cm}$  dobivena na uređaju Simpapak®, Simplicity 185 (Molsheim, Francuska).

Za analizu isparljivih spojeva plinskom kromatografijom korištena je smjesa alkana C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub> proizvođača Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Njemačka). Za pripremu uzoraka za GC-MS analizu korišten je heksan, HPLC čistoće, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Francuska).

Za analizu masnih kiselina plinskom kromatografijom korišteni su standardi oleinske kiseline, čistoće  $\geq 99,0$  %, linolne kiseline, čistoće  $\geq 99,0$  %, linolenske kiseline, čistoće  $\geq 99,0$  %, stearinske kiseline, čistoće  $\geq 98,5$  % i palmitinske kiseline, čistoće  $\geq 99,0$  % proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka).

Od ostalih kemikalija korišten je heksan, HPLC čistoće, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Francuska), etanol 99,9 % čistoće, Gram Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), sumporna kiselina, klorovodična kiselina, trifluoroctena kiselina, NaOH i Na<sub>2</sub>EDTA analitičke čistoće, proizvođača Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Francuska).

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema materijala za ekstrakciju

Prije procesa ekstrakcije, uzorci su usitnjeni u mlinu MRC Sample mill (C-SM /450-C, Holon, Izrael) radi povećanja površine uzorka. Određena je veličina čestica pomoću standardne serija sita (Retsch AS 200, Njemačka) prema metodi autora Vidović i sur. (2011). Analiza je provedena u 3 ponavljanja.

### 3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada i lista potpomognuta ultrazvukom provedena je na ultrazvučnoj kupelji ELMA, Elmasonic P 120 H (Elma Schmidbauer GmbH, Njemačka) (**Slika 6**). UAE korištena je za ekstrakciju polarnih spojeva gdje su kao otapalo korišteni različite vodene otopine etanola kao i za ekstrakciju isparljivih spojeva gdje je kao ekstrakcijsko otapalo korišten heksan.



**Slika 6** Ultrazvučna kupelja ELMA, Elmasonic P 120 H ([Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021.](#))

Ekstrakcija je provedena na frekvenciji od 37 kHz koristeći *sweep mode* koji omogućava homogenu raspodjelu ultrazvučnih valova unutar vodene kupelji. Tikvice s materijalom i otapalom uvijek su postavljane na istom razmaku te tijekom ekstrakcije nije primjenjivano dodatno miješanje. Za ekstrakciju polarnih spojeva provedeno je 29 eksperimenata, uključujući pet ponavljanja u centralnoj točki, prema RSM metodi i BBD, a ispitivao se utjecaj temperature, vremena ekstrakcije, omjera tekuće/kruće te udjela etanola u vodi kao otapalu na iskorištenje polarnih bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima duhanskog otpada prema eksperimentalnom planu prikazanom u **Tablici 6**. Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani, upareni te čuvani na +4 °C do daljnjih analiza.

Za ekstrakciju isparljivih spojeva provedeno je 17 eksperimenata uključujući pet ponavljanja u centralnoj točki, prema RSM metodi i BBD, a ispitivao se utjecaj temperature, vremena ekstrakcije, omjera tekuće/kruće na iskorištenje isparljivih bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima duhanskog otpada prema eksperimentalnom planu prikazanom u **Tablici 7**. Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani, upareni te čuvani na +4 °C do daljnjih analiza.

**Tablica 6** Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije polarnih bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada potpomognute ultrazvukom prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruće (ml/g)	% Etanola u vodi
1.	70	30	30	80
2	50	30	30	60
3	50	30	30	60
4	70	45	30	60
5.	30	30	30	40
6.	50	15	10	60
7.	70	30	50	60
8.	50	30	30	60
9.	30	30	30	80
10.	50	30	30	60
11.	50	30	10	40
12.	50	30	50	80
13	50	30	50	40
14.	50	45	50	60
15.	30	15	30	60
16.	50	15	50	60
17.	50	45	30	80
18.	50	45	30	40
19.	50	45	10	60
20.	30	30	50	60
21.	50	15	30	80
22.	70	30	30	40
23.	70	30	10	60
24.	50	30	10	80
25.	30	45	30	60
26.	50	15	30	40
27.	50	30	30	60
28.	30	30	10	60
29.	70	15	30	60

**Tablica 7** Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije isparljivih spojeva iz duhanskog otpada potpomognute ultrazvukom prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)
1.	70	30	10
2	50	30	20
3	50	30	20
4	30	30	30
5.	70	15	20
6.	50	45	30
7.	70	30	30
8.	70	45	20
9.	50	15	10
10.	50	15	30
11.	30	30	10
12.	50	45	10
13	50	30	20
14.	30	45	20
15.	50	30	20
16.	50	30	20
17.	30	15	20

### 3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

MAE bioaktivnih spojeva iz lista duhana i duhanskog otpada je provedena u Milestone flexiWAVE uređaju za ekstrakciju i sintezu u zatvorenom načinu rada (Milestone Srl, Sorisole (BG), Italija) koristeći maksimalnu snagu mikrovalova od 700 W (**Slika 7**). Kako bi se temperatura održala konstantnom, maksimalna snaga nije primjenjivana tijekom cijelog eksperimenta. Navedeni uređaj koristi ukupnu snagu duplog magnetrona od 1900 W te tako omogućuje jednakomjernu raspodjelu snage.

Ekstrakcija je provedena prema RSM metodi i BBD danom u **Tablici 8** gdje je 50 %-tna vodena otopina etanola korištena kao otapalo, a kako bi se ispitaio utjecaj temperature, vremena i omjera tekuće/kruto na iskorištenje ekstrakcije i udio bioaktivnih spojeva u ekstraktima.





**Slika 7** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (Milestone flexiWAVE, Italija) ([Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021.](#))

**Tablica 8** Eksperimentalni uvjeti MAE bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada i lista prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)
1.	120	15	10
2	100	15	20
3	80	25	20
4	80	15	10
5.	120	15	30
6.	100	25	10
7.	100	15	20
8.	100	15	20
9.	80	15	30
10.	100	5	30
11.	80	5	20
12.	120	25	20
13	100	15	20
14.	120	5	20
15.	100	5	10
16.	100	25	30
17.	100	15	20

Rotor uređaja za MAE je podijeljen po segmentima s 15 pozicija za PTFE (politetrafluoroetilen) posude u koje se smješta reakcijska smjesa (uzorak i otapalo) i koji su prilagođeni za rad na temperaturama do 300 °C. Preko senzora u referentnoj posudi pratila se temperatura u realnom vremenu. Vrijeme predgrijavanja postavljeno je na 2 minute, a vrijeme hlađenja na 10 minuta za sve eksperimente. Tijekom ekstrakcije primjenjivano je dodatno miješanje pomoću magnetne miješalice postavljene u uređaju. Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani, upareni te čuvani na +4 °C do daljnjih analiza.

### 3.3.4. Ekstrakcija sa supkričnom vodom (SWE)

SWE je provedena koristeći šaržni reaktor kapaciteta 75 ml (serija 4740 Stainless Steel, Parr Instruments, Moline, IL, SAD) projektiran za maksimalnu radnu temperaturu od 540 °C i tlak od 580 bara (**Slika 8**). Tijekom ekstrakcije, reaktor je zagrijavan električnim grijačem, a smjesa miješana pri 600 rpm. Za kontrolu tlaka i uklanjanje prisutnog kisika (kako bi se izbjegle reakcije oksidacije) korišten je dušik. Nakon procesa ekstrakcije, reaktor je ohlađen, a sadržaj reaktora filtriran je vakuumskom filtracijom, uparen i čuvan na +4 °C do daljnjih analiza.



**Slika 8** Uređaj za ekstrakciju s vodom u supkričnom stanju (Parr Instrument Company, USA) (Izvor: autor)

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada i lista vodom u supkričnom stanju provedena je da bi se ispitao utjecaj temperature, vremena ekstrakcije i omjera tekuće/kruto na iskorištenje bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima prema RSM metodi i BBD prikazanom u **Tablici 9**.

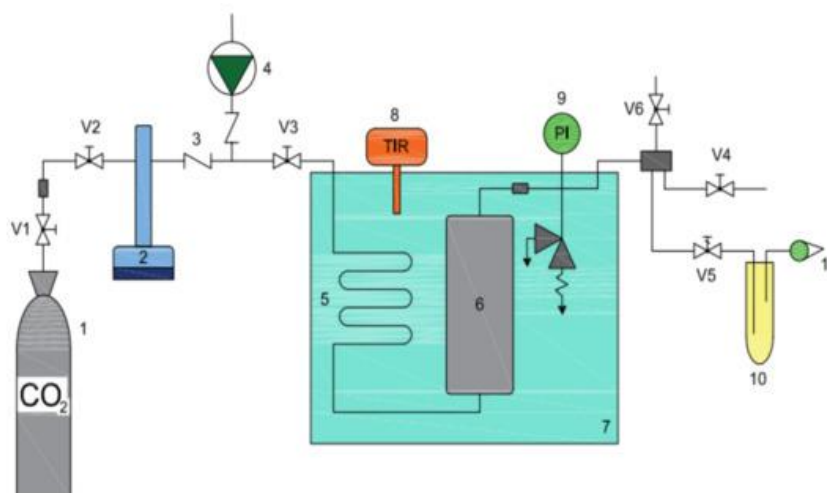
**Tablica 9** Eksperimentalni uvjeti SWE bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada i lista prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)
1.	150	5	20
2	250	5	20
3	150	25	20
4	250	25	20
5.	150	15	10
6.	250	15	10
7.	150	15	30
8.	250	15	30
9.	200	5	10
10.	200	25	10
11.	200	5	30
12.	200	25	30
13	200	15	20
14.	200	15	20
15.	200	15	20
16.	200	15	20
17.	200	15	20

### 3.3.5. Ekstrakcija s CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju (SC-CO<sub>2</sub>)

SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija je provedena na uređaju konstruiranom na fakultetu Kemije i kemijske tehnologije Sveučilišta u Mariboru, projektiranom za maksimalni radni tlak od 500 bara i temperaturu od 100 °C (**Slika 9**). Tijekom ekstrakcije ispitivan je utjecaj temperature i tlaka na proces ekstrakcije. 10 g usitnjenog materijala postavljeno je u reaktor ukupnog volumena od 60 ml. Reaktor je zagrijan u vodenoj kupelji na zadanu temperaturu. SC-CO<sub>2</sub> je proveden preko uzorka pomoću visokotlačne pumpe (ISCO syringe pump, model 260d, Lincoln, Nebraska, SAD). Protok CO<sub>2</sub> je održavan konstantnim (1 L/min) tijekom cijelog procesa. Postupak ekstrakcije trajao je 120 minuta. Uvjeti SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije određeni su CCD planom pokusa i prikazani su u **Tablici 10**. Dobiveni ekstrakti su izvagani i čuvani na +4 °C do daljnjih analiza. Ostatak iz reaktora je ponovno podvrgnut SWE prema prethodno ustanovljenim optimalnim uvjetima kako bi se ekstrahirali polarni spojevi, s obzirom da je SC-CO<sub>2</sub> kao otapalo visoko

selektivan prema nepolarnim spojevima, te kako bi se na taj način dodatno iscrpio biljni materijal.



**Slika 9** Procesna shema uređaja za ekstrakciju sa superkričnim CO<sub>2</sub> (Bizaj i sur., 2021)

**Tablica 10** Eksperimentalni uvjeti SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada prema CCD

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)
1.	100	40
2.	300	40
3.	100	80
4.	300	80
5.	100	60
6.	300	60
7.	200	40
8.	200	80
9.	200	60
10.	200	60
11.	200	60
12.	200	60
13.	200	60

### 3.3.6. Konvencionalna ekstrakcija u Soxhlet aparaturi

Konvencionalna ekstrakcija provedena je s heksanom kao otapalom u laboratorijskoj Soxhlet aparaturi sastavljenoj od hladila, ekstraktora, tuljka i tikvice. Odvagano je 50 g materijala i dodano 200 ml heksana. Ekstrakcija je trajala 2 sata (kao i SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija) te je provedena na temperaturi vrelišta otapala (65 °C). Nakon ekstrakcije, otapalo je otpareno pomoću vakuum uparivača, pri sobnoj temperaturi, do konstantne mase. Dobiveni ekstrakti čuvani su na +4 °C do daljnjih analiza.

### 3.3.7. Spektrofotometrijske analize

Spektrofotometrijske analize provedene su na UV/VIS spektrofotometru Boeco spectrophotometer S-220 UV/VIS (Boeco, Njemačka).

#### 3.3.7.1. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalna aktivnost dobivenih ekstrakata određena je DPPH metodom detaljno opisanoj u radu Jakobek i sur. (2007). Otopine za mjerenje pripravljene su dodatkom 1,2 ml ekstrakta (koncentracije 0,25 mg/ml) i 0,5 ml 0,2 mM svježe pripravljene DPPH otopine. Mjerenje se provelo u tri ponavljanja pri valnoj duljini od 517 nm. Rezultati su izračunati pomoću **Jednadžbe 3** i izraženi kao postotak inhibicije DPPH radikala (% DPPH).

$$\% DPPH = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (3)$$

gdje:  $A_{DPPH}$  – predstavlja kontrolu apsorbancije (umjesto uzorka dodan je metanol),  $A_b$  predstavlja apsorbanciju uzorka (umjesto DPPH otopine dodan je metanol),  $A_s$  predstavlja apsorbanciju uzorka pomiješanog s DPPH otopinom.

#### 3.3.7.2. Određivanje ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima određen je prema modificiranoj spektrofotometrijskoj metodi (Jakobek i sur., 2007) koristeći Folin-Ciocalteu reagens i galnu kiselinu kao kalibracijski standard. Otopine za mjerenje pripravljene su tako da je 20 µl uzorka koncentracije 1 mg/ml razrijeđeno s 1580 µl destilirane vode. Otopinama je dodano 100 µl nerazrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa, a nakon 3 minute dodano je 300 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> otopine (200 g/L). Pripremljeni uzorci termostatirani su na 40 °C kroz 30 minuta te nakon termostatiranja mjereni. Rezultati su izračunati prema kalibracijskoj krivulji, konstruiranoj za različite koncentracije galne kiseline (5-500 µg/ml) te izraženi kao % ekvivalenta galne kiseline (GAE) po masi suhog ekstrakta. Mjerenje je provedeno u tri ponavljanja na valnoj duljini od 765 nm.

### 3.3.7.3. Određivanje ukupnih ugljikohidrata

S obzirom da je u SWE ekstraktima bio očekivan nastanak degradacijskih produkata šećera zbog primjene visokih temperatura, u ekstraktima je određen i udio ukupnih ugljikohidrata kako bi se njihov udio mogao povezati s nastankom degradacijskih produkata. Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih ugljikohidrata korištena je metoda s fenolom i sumpornom kiselinom. Dodatak sumporne kiseline omogućava prevođenje svih nereducirajućih ugljikohidrata u reducirajuće. 2 ml ekstrakta pomiješano je s 1 ml 5 % vodene otopine fenola, nakon čega je dodano 5 ml koncentrirane sumporne kiseline. Smjesa je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 min te je stajala još 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do razvoja boje. Mjerenje je provedeno u tri ponavljanja na valnoj duljini od 490 nm. Rezultati su kvantificirani konstruiranjem kalibracijske krivulje za različite koncentracije standarda glukoze (10-500 µg/ml) te izraženi kao % ekvivalenta glukoze po masi suhog ekstrakta.

### 3.3.8. *Određivanje polarnih bioaktivnih spojeva u ekstraktima*

Identifikacija i kvantifikacija polarnih bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima provedena je metodom tekućinske kromatografije s visokim učinkom s detektorom niza dioda (HPLC/DAD). Analiza je provedena na uređaju za semipreparativnu tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 Infinity II device (Agilent, Santa Clara, SAD), koji se sastoji od kvarterne pumpe (G7111B), pećnice (G7116A) temperaturnog raspona od 10 do 85 °C, DAD detektora (G7115A), autosamplera (automatskog uzorkivača) (G7129A) kapaciteta od 36 viala i sakupljača frakcija (G1364E) (**Slika 10**). Obrada podataka i upravljanje sustavom vršilo se pomoću računalnog programa ChemStation. Prije HPLC analize, uzorci su profiltrirani kroz 0.2 µm najlon-filter pomoću odgovarajuće šprice.

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih spojeva provedena je pri sljedećim uvjetima:

- mobilna faza: A: 1 % CH<sub>3</sub>COOH; B: metanol,
- kolona: COSMOSIL 5C18-MS-11 (4,6 x 250 mm, 5 µm),
- eluiranje: gradijentno: 0-5 min, 20 % B; 5-15 min, 40-80 % B; 15-35 min, 80 % B; 35-40 min, 20-40 % B; 40-50 min, 80-40 % B pri 25 °C,
- injektirani volumen: 20 µl,
- brzina protoka: 1 ml/min,
- vrijeme analize: 50 min,
- valna duljina detektora: 210, 230, 250, 275, 300, 320, 360 nm



**Slika 10** Visoko djelotvorni tekućinski kromatograf sa detektorom s nizom dioda (Agilent Technologies 1260 Infinity, SAD) (Izvor: autor)

Kvalitativna i kvantitativna analiza degradacijskih produkata (5-MF, 5-HMF, furfurala, nikotinamida, nikotinske kiseline i 2,4-dihidroksibenzojeve kiseline) provedena je pri sljedećim uvjetima:

- mobilna faza: A: metanol; B: 0,1 % otopina trifluorooctene kiseline u vodi,
- kolona: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ )
- eluiranje: gradijentno: 0-18 min, 90 % B; 18-20 min, 65-90 % B; 20-30 min, 90 % B pri 25 °C,
- injektirani volumen: 10  $\mu\text{l}$ ,
- brzina protoka: 1 ml/min,
- vrijeme analize: 30 min,
- valna duljina detektora: 260 i 280 nm.

Kvalitativna i kvantitativna analiza nikotina provedena je pri sljedećim uvjetima:

- mobilna faza: A: acetonitril; B: 0,03 M karbonatni pufer (pH 10),
- kolona: Lab Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 150 mm, 4  $\mu\text{m}$ ),
- eluiranje: izokratično A: 20; B: 80, pri 35 °C,
- injektirani volumen: 10  $\mu\text{l}$ ,
- brzina protoka: 1 ml/min,
- vrijeme analize: 30 min,
- valna duljina detektora: 259 nm.

Kvalitativna analiza polarnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena u uzorku s retencijskim vremenom nakon injektiranja standarda određenog spoja poznate koncentracije. Kvantitativna analiza polarnih spojeva u uzorcima provedena je integriranjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje za svaki pojedinačni analizirani spoj. Otopine standarda pripravljene su u različitim koncentracijama i to: klorogenske kiseline (10-1000 µg/ml), neoklorogenske kiseline (10-100 µg/ml), kriptoklorogenske kiseline (10-1000 µg/ml), rutina (10-500 µg/ml), nikotiflorina (10-1000 µg/ml), 5-HMF (10-1000 µg/ml), furfurala (10-1000 µg/ml), 5-MF (10-1000 µg/ml), nikotinamida (10-500 µg/ml), nikotinske kiseline (10-500 µg/ml), kafeinske kiseline (10-1000 µg/ml), 2,4-dihidroksibenzojeve kiseline (10-500 µg/ml) i nikotina (0,78-250µg/ml).

Linearnom regresijom dobivena je jednačba pravca za svaki spoj te su izračunati koeficijenti korelacije koji iznose: 5-HMF ( $R^2=0,9993$ ), klorogenska kiselina ( $R^2=0,9991$ ), neoklorogenska kiselina ( $R^2=0,9995$ ), kriptoklorogenska kiselina ( $R^2=0,9989$ ), furfural ( $R^2=0,9988$ ), 5-metilfurfural ( $R^2=0,9989$ ), rutin ( $R^2=0,9984$ ), nikotiflorin ( $R^2=0,9999$ ), kafeinska kiselina ( $R^2=0,9989$ ), 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina ( $R^2=0,9978$ ), nikotinska kiselina ( $R^2=0,9981$ ), nikotinamid ( $R^2=0,9987$ ) i nikotin ( $R^2=0,9995$ ).  $R^2$  koji je u svim slučajevima viši od 0,995 potvrđuje da je metoda linearna u cijelom području ispitivanih koncentracija.

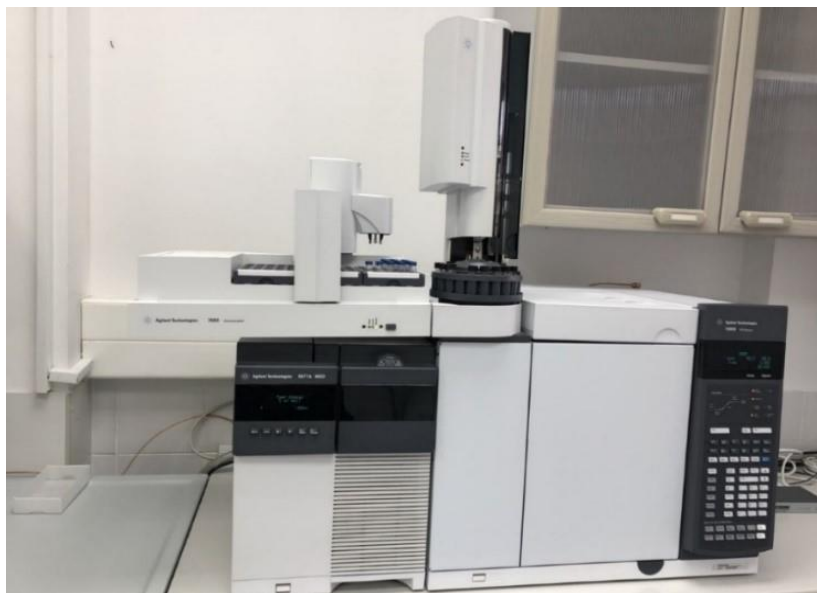
### **3.3.9. Određivanje nepolarnih/isparljivih bioaktivnih spojeva**

Identifikacija i kvantifikacija nepolarnih bioaktivnih spojeva u dobivenim UAE i SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima provedena je metodom plinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom. Za analizu nepolarnih (isparljivih) spojeva korišten je plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890B u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977A, spojenim na računalo (**Slika 11**). Separacija spojeva provedena je na kapilarnoj koloni H5-5MS (dužine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine sloja stacionarne faze 0,25 µm, J&W, SAD).

Analiza je provedena pri sljedećim uvjetima:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 3 °C/min do 200 °C te zadržavanje 18 min na 200 °C,
- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- plin nosač: helij,
- interval snimanja masa: 45-450 masenih jedinica.





**Slika 11** Vezani sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) (Izvor: autor)

Za svaki analizirani uzorak dobiven je kromatogram ukupne ionske struje, naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje i vrijeme zadržavanja pojedine komponente te relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Kvalitativna analiza provedena je integriranjem površina ispod pikova primjenom metode normalizacije (bez korekcijskih faktora). Strukturna identifikacija spojeva dobivenih u ekstraktu provedena je usporedbom masenih spektara na odgovarajućem retencijskom vremenu i masenog spektra iz baze podataka masenih spektara. Za tu identifikaciju korištene su komercijalne knjižnice Wiley 09 MS (Wiley, New York, NY, SAD) i NIST14 (Gaithersburg, MD, SAD). Također, retencijska vremena spojeva u uzorku uspoređena su u odnosu na C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub> *n*-alkane za kolonu HP-5MS.

Kvalitativna analiza provedena je konstruiranjem kalibracijske krivulje nikotina u rasponu koncentracija (20–750 µg/ml). Linearnost kalibracijske krivulje nikotina potvrđena je pomoću R<sup>2</sup>= 0,9997. Koncentracije ostalih spojeva izražene su kao ekvivalenti nikotina.

### **3.3.10. Određivanje sastava masnih kiselina u ekstraktima**

Sastav masnih kiselina određen je u ekstraktima dobivenim SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcijom i Soxhlet ekstrakcijom. Prije analize ekstrakti su podvrgnuti procesu saponifikacije prema modificiranoj metodi opisanoj u radu Kotnik i sur. (2014) kako bi se masne kiseline oslobodile iz estera. Otopina NaOH pripravljena je otapanjem 15 g NaOH i 0,15625 g Na<sub>2</sub>EDTA u 50 ml vode. Ovoj otopini dodano je 50 ml etanola. U 2,5 mg ekstrakta dodano je 5 ml otopine NaOH te je smjesa

zagrijana na 60 °C uz magnetsko miješanje pri 550 rpm kroz 1 h. Nakon 1 h smjesi je dodano 1 ml vode i 10 ml heksana te je smjesa miješana još 1 h na sobnoj temperaturi nakon čega su bila vidljiva dva sloja. Gornji sloj koji je sadržavao neosapunjive tvari se odvojio. U donji sloj dodano je 4 ml vode i odgovarajući volumen 32 % klorovodične kiseline do pH 1. Nakon toga donji sloj uklonjen je lijevkom za odjeljivanje. Gornji sloj koji sadrži slobodne masne kiseline osušen je bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a otapalo je otpareno pomoću vakuum uparivača. Prije ekstrakcije ekstrakti su otopljeni u heksanu.

Analiza masnih kiselina provedena je na plinskom kromatografu s plameno ionizacijskim detektorom (Agilent Technologies, SAD (Model 6890 KS SAD) i kapilarnoj koloni (HP-FFAP 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm). Analiza je provedena pri sljedećim uvjetima:

- temperaturni program kolone: 120 °C (1 min), 25 °C po minuti do 180 °C (1 min), 5 °C po minuti do 220 °C (10 min), 5 °C po minuti do 230 °C (30 min),
- temperatura injektora: 300 °C,
- plin nositelj: helij,
- protok plina: 64 ml/min.

Kvantitativna analiza pojedinačnih masnih kiselina provedena je konstruiranjem kalibracijskih krivulja za standardne otopine linolne, oleinske, stearinske i palmitinske kiseline, pri čemu su rasponi njihovih koncentracija bili sljedeći: linolna kiselina (61,2–611,7 µg/ml), oleinska kiselina (38,2–519,7 µg/ml), stearinska kiselina (45,1–451,1 µg/ml) i palmitinska kiselina (85,4–854,6 µg/ml).

### **3.3.11. Statistička analiza i optimizacija procesa**

Za analizu utjecaja parametara različitih tehnika ekstrakcije na ispitivane odzive te za optimizaciju procesa korištena je metoda odzivnih površina (RSM) pri čemu je za ispitivanje utjecaja nezavisnih varijabli tijekom UAE, MAE i SWE na eksperimentalni odgovor korišten BBD a za SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju CCD. Svaka od navedenih ekstrakcijskih tehnika je pojedinačno ispitana i optimirana pri čemu je ispitan utjecaj parametara procesa ekstrakcije na različite odzive (iskorištenje ekstrakcije i udio bioaktivnih spojeva).

Procjena koeficijentata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametra na promatrane ekstrakcijske procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametra provedena je primjenom softverskog paketa Design-Expert®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Test statističkih razlika temeljio se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %.

Adekvatnost dobivenih modela potvrđena je sljedećim parametrima: koeficijentom determinacije ( $R^2$ ),  $p$ -vrijednostima za model i nedostatkom modela (engl. *lack of fit*). Na osnovi

dobivenih matematičkih modela (polinoma) konstruirane su odzivne površine koje omogućavaju vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane odzive. Kao završni korak u metodi odzivnih površina provedeno je optimiranje promatranog procesa ([Myers i Montgomery, 1995](#)) temeljeno na konceptu željene funkcije.

## **4.REZULTATI**

## 4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA

S obzirom da veličina čestica ima značajan utjecaj na proces ekstrakcije proveden je uniformni način usitnjavanja i prosijavanje. S obzirom da je veličina čestica jedan od ključnih parametara koji utječu na iskorištenje ekstrakcije, nastojala se postići približno slična veličina čestica. Duhanska prašina, s obzirom na to da podrazumijeva duhanski otpad u obliku finog praha, nije dodatno usitnjavana, već joj je samo određena veličina čestica.

**Tablica 11** Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima duhanskog lista i otpada (refabrikat, prašina i rebro)

Redni broj.	Uzorak	Prosječna veličina čestica (mm)
1.	List	0,284 ± 0,006
2.	Refabrikat	0,288 ± 0,007
3.	Duhanska prašina	0,221 ± 0,058
4.	Rebro	0,303 ± 0,061

## 4.2. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA UAE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG LISTA I OTPADA

**Tablica 12** Udjeli fenolnih spojeva u ekstraktima lista duhana dobivenim primjenom ultrazvuka prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	% Etanola u vodi	Iskorištenje (%)	Klorogenska kiselina (%)	Kofeinska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	70	30	30	80	43,001	0,433	0,032	0,563	3,084	56,276
2.	50	30	30	60	44,120	0,763	0,034	0,797	4,781	79,693
3.	50	30	30	60	37,500	1,071	0,026	0,806	5,711	80,629
4.	70	45	30	60	42,200	0,900	0,039	0,910	5,546	91,008
5.	30	30	30	40	42,500	1,316	0,030	0,873	6,656	87,261
6.	50	15	10	60	49,500	2,222	0,032	0,889	9,427	88,947
7.	70	30	50	60	38,900	0,375	0,023	0,850	3,743	85,013
8.	50	30	30	60	41,400	1,083	0,027	0,768	5,634	76,845
9.	30	30	30	80	37,210	0,211	0,026	0,139	1,131	13,938
10.	50	30	30	60	45,620	0,852	0,033	0,752	4,911	75,234
11.	50	30	10	40	49,200	2,721	0,032	0,949	11,105	94,942
12.	50	30	50	80	42,400	0,221	0,000	0,788	3,029	78,831
13.	50	30	50	40	42,100	0,514	0,044	0,950	4,525	95,017
14.	50	45	50	60	39,010	0,375	0,033	0,804	3,634	80,367
15.	30	15	30	60	41,020	0,585	0,019	0,942	4,639	94,193
16.	50	15	50	60	42,100	0,382	0,024	0,784	3,569	78,419
17.	50	45	30	80	40,010	0,500	0,037	0,939	4,425	93,855
18.	50	45	30	40	41,280	1,405	0,028	0,940	7,119	94,005

19.	50	45	10	60	45,000	2,009	0,026	0,946	8,942	94,642
20.	30	30	50	60	38,069	0,274	0,018	0,934	3,681	93,443
21.	50	15	30	80	40,310	0,234	0,034	0,261	1,588	26,077
22.	70	30	30	40	45,300	1,192	0,032	0,746	5,908	74,560
23.	70	30	10	60	46,200	1,944	0,017	0,776	8,210	77,557
24.	50	30	10	80	48,960	1,713	0,025	0,498	6,706	49,756
25.	30	45	30	60	40,010	0,950	0,025	0,782	5,269	78,157
26.	50	15	30	40	42,480	1,422	0,029	0,745	6,586	74,485
27.	50	30	30	60	45,050	0,919	0,029	0,759	5,121	75,946
28.	30	30	10	60	49,180	2,319	0,031	0,872	9,663	87,186
29.	70	15	30	60	41,680	0,692	0,035	0,700	4,280	69,989

**Tablica 13** Udjeli **fenolnih spojeva** u ekstraktima **refabrikata** dobivenim primjenom ultrazvuka prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	% Etanola u vodi	Iskorištenje (%)	Klorogenska kiselina (%)	Kofeinska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	70	30	30	80	40,988	0,076	0,115	0,034	0,897	3,399
2.	50	30	30	60	42,108	0,350	0,117	0,251	2,873	25,120
3.	50	30	30	60	35,488	0,339	0,117	0,251	2,828	25,120
4.	70	45	30	60	40,188	0,352	0,109	0,291	3,010	29,110
5.	30	30	30	40	40,488	0,314	0,091	0,269	2,695	26,930
6.	50	15	10	60	47,488	0,556	0,082	0,346	3,936	34,577
7.	70	30	50	60	36,888	0,078	0,239	0,214	2,120	21,389
8.	50	30	30	60	39,388	0,340	0,109	0,255	2,814	25,526
9.	30	30	30	80	35,198	0,066	0,045	0,034	0,578	3,362

10.	50	30	30	60	43,588	0,340	0,130	0,242	2,851	24,233
11.	50	30	10	40	47,188	0,804	0,069	0,372	4,981	37,237
12.	50	30	50	80	40,388	0,131	0,172	0,183	1,947	18,323
13.	50	30	50	40	40,088	0,042	0,218	0,208	1,870	20,798
14.	50	45	50	60	36,998	0,055	0,214	0,170	1,753	16,993
15.	30	15	30	60	39,008	0,369	0,101	0,162	2,527	16,180
16.	50	15	50	60	40,088	0,081	0,212	0,287	2,322	28,740
17.	50	45	30	80	37,998	0,302	0,132	0,149	2,333	14,887
18.	50	45	30	40	39,268	0,323	0,088	0,328	2,954	32,804
19.	50	45	10	60	42,988	0,558	0,049	0,175	3,124	17,473
20.	30	30	50	60	36,057	0,089	0,238	0,264	2,368	26,450
21.	50	15	30	80	38,298	0,069	0,068	0,100	0,951	10,011
22.	70	30	30	40	43,288	0,345	0,087	0,333	3,060	33,321
23.	70	30	10	60	44,188	0,605	0,065	0,144	3,258	14,444
24.	50	30	10	80	46,948	0,425	0,054	0,135	2,456	13,521
25.	30	45	30	60	37,998	0,377	0,091	0,143	2,444	14,333
26.	50	15	30	40	40,468	0,322	0,076	0,199	2,388	19,948
27.	50	30	30	60	43,038	0,381	0,109	0,264	3,017	26,413
28.	30	30	10	60	47,168	0,654	0,094	0,243	3,963	24,344
29.	70	15	30	60	39,668	0,352	0,145	0,269	3,064	26,930



**Tablica 14** Udjeli **fenolnih spojeva** u ekstraktima **duhanske prašine** dobivenim primjenom ultrazvuka prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	% Etanola u vodi	Iskorištenje (%)	Klorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	70	30	30	80	38,971	0,070	0,077	0,440	6,980
2.	50	30	30	60	40,091	0,315	0,090	1,214	31,470
3.	50	30	30	60	33,471	0,324	0,087	1,233	32,390
4.	70	45	30	60	38,171	0,349	0,099	1,343	34,900
5.	30	30	30	40	38,471	0,294	0,057	1,051	29,380
6.	50	15	10	60	45,471	0,429	0,043	1,416	42,900
7.	70	30	50	60	34,871	0,076	0,173	0,749	7,620
8.	50	30	30	60	37,371	0,306	0,090	1,188	30,570
9.	30	30	30	80	33,181	0,060	0,039	0,296	5,990
10.	50	30	30	60	41,571	0,307	0,070	1,130	30,690
11.	50	30	10	40	45,171	0,508	0,042	1,650	50,840
12.	50	30	50	80	38,371	0,040	0,169	0,627	4,020
13.	50	30	50	40	38,071	0,112	0,167	0,836	11,150
14.	50	45	50	60	34,981	0,068	0,174	0,725	6,800
15.	30	15	30	60	36,991	0,321	0,059	1,141	32,090
16.	50	15	50	60	38,071	0,059	0,151	0,629	5,920
17.	50	45	30	80	35,981	0,259	0,097	1,067	25,880
18.	50	45	30	40	37,251	0,153	0,070	0,669	15,320
19.	50	45	10	60	40,971	0,458	0,058	1,549	45,800
20.	30	30	50	60	34,040	0,068	0,169	0,712	6,830
21.	50	15	30	80	36,281	0,070	0,078	0,444	7,030

22.	70	30	30	40	41,271	0,150	0,061	0,634	14,980
23.	70	30	10	60	42,171	0,463	0,043	1,516	46,270
24.	50	30	10	80	44,931	0,290	0,041	0,995	29,030
25.	30	45	30	60	35,981	0,313	0,076	1,165	31,270
26.	50	15	30	40	38,451	0,141	0,044	0,556	14,090
27.	50	30	30	60	41,021	0,311	0,080	1,172	31,080
28.	30	30	10	60	45,151	0,397	0,033	1,291	39,740
29.	70	15	30	60	37,651	0,319	0,080	1,196	31,900

**Tablica 15** Udjeli fenolnih spojeva u ekstraktima rebra dobivenim primjenom ultrazvuka prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	% Etanola u vodi	Iskorištenje (%)	Klorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	70	30	30	80	27,950	0,034	0,028	0,188	7,611
2.	50	30	30	60	29,070	0,059	0,015	0,220	17,509
3.	50	30	30	60	22,450	0,050	0,018	0,203	14,949
4.	70	45	30	60	27,150	0,063	0,020	0,247	10,000
5.	30	30	30	40	27,450	0,182	nd	0,545	17,679
6.	50	15	10	60	34,450	0,141	nd	0,424	13,549
7.	70	30	50	60	23,850	nd	0,042	0,125	18,362
8.	50	30	30	60	26,350	0,073	0,013	0,258	18,328
9.	30	30	30	80	22,160	0,025	0,014	0,118	6,143
10.	50	30	30	60	30,550	0,054	nd	0,163	15,392
11.	50	30	10	40	34,150	0,129	nd	0,386	24,744
12.	50	30	50	80	27,350	nd	0,048	0,143	7,406

13.	50	30	50	40	27,050	0,059	0,032	0,274	18,430
14.	50	45	50	60	23,960	0,025	0,044	0,209	13,413
15.	30	15	30	60	25,970	0,125	nd	0,374	9,113
16.	50	15	50	60	27,050	nd	0,039	0,118	11,468
17.	50	45	30	80	24,960	0,027	0,020	0,140	17,747
18.	50	45	30	40	26,230	0,060	nd	0,179	19,863
19.	50	45	10	60	29,950	0,165	nd	0,494	21,195
20.	30	30	50	60	23,019	0,018	0,058	0,228	11,297
21.	50	15	30	80	25,260	0,025	nd	0,075	5,700
22.	70	30	30	40	30,250	0,069	nd	0,208	17,270
23.	70	30	10	60	31,150	0,137	nd	0,411	14,437
24.	50	30	10	80	33,910	0,097	nd	0,291	10,683
25.	30	45	30	60	24,960	0,205	nd	0,616	12,833
26.	50	15	30	40	27,430	0,059	nd	0,178	16,587
27.	50	30	30	60	30,000	0,066	0,018	0,254	15,768
28.	30	30	10	60	34,130	0,062	0,020	0,245	11,877
29.	70	15	30	60	26,630	0,134	nd	0,403	17,440
nd-nije detektiran									

Tablica 16 Kemijski profil isparljivih spojeva u ekstraktima duhanskog lista dobiven primjenom ultrazvuka prema BBD

Br.	Spoj	RI	Broj eksperimenata																
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
1.	2-metilnonan	968	0,1	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	0,3	0,4	nd	0,3	0,3	0,3	0,6
2.	dekan	1000	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	0,2	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
3.	2,6-dimetilnonan	1026	0,5	1,1	1,0	1,6	nd	0,5	nd	0,2	1,1	0,9	1,0	1,4	0,8	1,2	1,0	1,1	1,8
4.	2-metildekan	1062	1,0	2,1	2,3	3,9	nd	0,9	nd	0,4	2,3	1,8	2,2	3,1	1,8	2,5	2,1	2,1	3,8
5.	2-metilundekan	1168	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	0,3	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
6.	dodekan	1200	0,2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	1,0
7.	tridekan	1300	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	0,5	0,6	nd	nd	nd	nd	nd
8.	nikotin	1345	57,2	46,7	56,6	49,7	57,3	40,0	71,7	59,6	13,3	40,9	8,3	12,4	37,4	32,3	49,6	45,0	23,6
9.	tetradekan	1400	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,7	nd	0,6	1,0	0,6	0,8	0,6	0,7	1,0
10.	pentadekan	1500	nd	1,4	1,4	2,4	nd	0,7	nd	0,3	2,1	1,2	2,2	2,5	1,2	1,8	1,4	1,9	2,4
11.	heksadec-1-en	1594	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	0,6	0,6	nd	nd	0,5	nd	nd
12.	heksadekan	1600	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	0,4	0,5	nd	nd	nd	nd	nd
13.	heptadekan	1700	0,7	1,6	1,7	2,2	nd	0,8	nd	nd	1,8	1,4	2,1	2,3	1,2	2,0	1,5	1,4	2,5
14.	oktadec-1-en	1794	1,5	3,0	3,1	4,5	nd	1,5	nd	0,5	4,3	2,5	5,1	6,0	2,8	4,5	3,5	3,8	6,8
15.	oktadekan	1800	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	0,2	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
16.	neofitadien	1841	7,5	6,1	6,3	7,1	6,0	3,6	4,0	5,4	3,9	4,5	4,1	5,3	5,4	6,8	6,3	6,8	8,1
17.	diizobutil-ftalat	1869	0,9	1,9	2,2	2,1	0,8	2,1	1,0	0,6	0,9	2,2	0,8	0,9	0,7	2,0	1,3	1,8	2,6
18.	eikos-1-en	1995	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,8	nd	1,1	1,3	0,6	1,2	1,2	0,8	1,5
19.	oktadekanal	2020	0,2	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	0,7	0,8	0,9	0,7	1,1	0,6	0,8	1,1
20.	10-metileikosan*	2079	nd	7,1	nd	nd	nd	18,2	nd	0,9	8,3	nd	0,2	0,3	14,6	nd	nd	nd	Nd
21.	heneikosan	2100	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	3,0	2,8	nd	nd	nd	nd	Nd
22.	dokos-1-en	2185	1,4	2,3	3,0	3,6	0,1	1,1	nd	0,6	3,3	2,5	4,4	5,0	2,7	4,0	3,2	3,6	6,0
23.	dokosan	2200	0,6	nd	nd	nd	2,4	nd	nd	1,9	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
24.	duva-4,8,13-trien-1,3-diol	2217	14,1	9,8	11,5	9,9	12,5	5,1	7,1	9,6	7,6	8,6	7,5	10,2	8,9	11,2	13,0	10,7	11,7
25.	trikosan	2300	1,3	nd	2,1	nd	6,3	nd	13,2	11,0	8,9	25,8	3,0	nd	nd	10,4	nd	0,5	nd
26.	tetrakosan	2400	2,4	9,1	nd	nd	14,1	23,0	3,0	5,5	nd	nd	nd	0,9	10,3	nd	nd	1,3	nd

RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); nd - nije detektiran; \*\* - točan izomer nije identificiran

Tablica 17 Kemijski profil isparljivih spojeva u ekstraktima refabrikata dobiven primjenom ultrazvuka prema BBD

Br	Spoj	RI	Broj eksperimenta																
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
1.	2,6-dimetilnonan	968	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	0,3	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
2.	dekan	1000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd
3.	2,6-dimetilnonan	1026	0,8	nd	nd	nd	0,5	0,8	nd	nd	0,9	0,5	1,1	1,1	0,8	nd	0,9	1,0	1,4
4.	2-metildekan	1062	1,7	1,1	1,3	2,1	1,2	1,5	0,5	0,3	1,9	1,1	2,3	2,3	1,8	1,7	1,8	2,0	2,8
5.	2-metilundekan	1168	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
6.	dodekan	1200	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	0,6	0,5	nd	nd	nd	nd	nd
7.	tridekan	1300	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	0,5	0,4	nd	nd	nd	nd	nd
8.	nikotin	1345	56,8	45,4	52,0	42,8	77,8	78,6	39,5	35,2	36,4	37,2	35,5	37,2	70,3	74,2	75,4	73,4	58,1
9.	tetradekan	1400	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	0,8	0,7	nd	nd	nd	nd	nd
10.	pentadekan	1500	1,3	nd	nd	1,6	0,8	0,9	0,4	0,3	1,4	0,8	1,8	2,0	1,3	nd	1,3	1,4	2,1
11.	heksadec-1-en	1594	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	0,7	nd	nd	nd	nd	nd
12.	heksadekan	1600	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	0,5	nd	nd	nd	nd	nd
13.	heptadekan	1700	1,3	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	nd	1,5	0,7	1,8	1,8	1,3	nd	nd	nd	2,4
14.	oktadec-1-en	1794	3,0	1,8	2,2	2,9	1,7	2,2	0,8	0,5	3,6	1,9	4,2	4,5	3,2	2,9	2,9	3,3	4,6
15.	neofitadien	1841	5,2	3,8	4,3	8,6	5,3	5,2	4,5	3,7	4,8	3,4	7,0	5,1	6,7	7,3	6,2	6,7	9,4
16.	diizobutil-ftalat	1869	nd	nd	nd	nd	1,0	nd	0,5	0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17.	oktadekanal	2020	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	0,6	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18.	10-metileikosan*	2079	nd	18,8	nd	nd	nd	nd	1,1	24,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19.	dokos-1-en	2185	3,0	0,2	0,1	3,5	1,5	2,5	0,9	0,7	3,2	1,8	4,4	4,0	3,5	3,7	3,1	3,0	3,9
20.	dokosan	2200	1,3	nd	nd	5,7	nd	nd	4,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
21.	duva-4,8,13-trien-1,3-diol	2217	10,6	6,2	5,7	0,5	6,9	5,1	3,6	4,2	7,5	1,9	9,0	8,4	7,3	6,5	4,6	5,4	4,2
22.	trikosan	2300	2,8	21,7	33,1	28,3	nd	nd	29,1	29,0	25,2	47,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
23.	tetrakosan	2400	6,5	nd	nd	nd	nd	nd	13,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); nd - nije detektiran; \*\* - točan izomer nije identificiran

Tablica 18 Kemijski profil isparljivih spojeva u ekstraktima duhanske prašine dobiven primjenom ultrazvuka prema BBD

Br.	Spoj	RI	Broj eksperimenta																
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
1.	1,2,4-trimetilcikloheksan**	886	0,2	0,2	0,3	0,6	0,6	0,5	0,6	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4
2.	1,2,4-trimetilcikloheksan**	889	0,4	0,6	0,7	1,3	1,0	1,2	1,3	0,6	0,3	0,8	0,3	0,2	0,8	0,9	0,9	0,8	1,2
3.	1-metil-2-propil-ciklopentan	891	0,5	0,8	0,9	1,7	1,2	1,5	1,4	0,7	0,3	0,9	0,4	0,2	1,0	1,1	1,1	0,9	1,4
4.	trans-1-etil-4-metilcikloheksan	894	1,4	2,3	2,1	4,1	2,9	3,8	3,7	1,7	0,8	2,4	1,0	0,4	2,4	2,8	2,6	2,2	3,5
5.	nonan	900	0,6	1,0	1,1	2,1	1,7	2,3	1,8	0,9	0,4	1,5	0,6	0,3	1,3	1,8	1,7	1,1	1,8
6.	cis-1-etil-4-metilcikloheksan	913	1,1	1,9	2,0	3,8	2,5	3,6	3,4	1,6	0,8	2,3	1,0	0,4	2,2	2,6	2,5	2,0	3,3
7.	2,2,3,3-tetrametilheksan*	920	0,7	1,3	1,4	2,6	1,7	2,2	2,2	1,1	0,5	1,6	0,7	0,3	1,5	1,8	1,8	1,4	2,1
8.	2,5-dimetiloktan**	928	0,7	1,2	1,3	2,5	1,6	2,2	2,2	1,0	0,5	1,4	0,6	0,3	1,3	1,7	1,6	1,3	2,0
9.	acetilcikloheksan	937	0,7	1,1	1,2	2,3	1,5	2,2	2,0	1,0	0,5	1,3	0,6	0,3	1,1	1,6	1,5	1,9	2,0
10.	trans-heksahidroindan	963	0,2	nd	nd	0,8	0,5	nd	0,7	0,3	0,3	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	0,6
11.	4-metilnonan	965	nd	nd	nd	1,0	nd	nd	0,8	0,4	0,3	nd	0,3	0,3	nd	nd	nd	0,9	0,8
12.	2-metilnonan	968	0,3	0,7	0,7	1,1	1,3	1,1	1,0	0,5	0,4	nd	0,5	0,5	nd	0,9	0,8	0,7	1,1
13.	3-metilnonan	974	0,2	nd	nd	0,7	nd	nd	0,6	0,3	0,7	nd	0,2	0,1	nd	nd	nd	0,4	0,6
14.	cis-heksahidroindan	993	nd	nd	nd	1,3	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	0,3	0,2	nd	nd	nd	0,7	1,2
15.	dekan	1000	0,3	0,4	1,4	1,2	0,1	0,1	0,8	0,6	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,9	0,9	0,7	1,0
16.	2,6-dimetilnonan	1026	0,5	0,7	0,7	1,1	0,1	0,1	0,1	0,6	0,8	0,1	1,0	1,0	0,9	1,2	1,1	0,9	1,4
17.	2-metildekan	1062	1,3	2,4	2,8	3,3	1,8	3,1	2,4	1,7	2,0	2,1	2,2	2,2	2,5	3,6	3,7	2,3	3,6
18.	undekan	1100	0,2	nd	nd	1,5	nd	nd	0,7	0,5	nd	nd	0,5	0,2	nd	nd	nd	0,7	nd
19.	2-metilundekan	1168	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	0,2	nd	nd	nd	nd	nd
20.	dodekan	1200	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	0,5	0,4	nd	nd	nd	nd	nd
21.	2,4-dimetilundekan	1212	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
22.	tridekan	1300	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	0,4	nd	nd	nd	nd	nd
23.	nikotin	1345	49,2	36,2	41,6	31,4	67,1	58,6	57,9	39,7	24,5	34,3	12,6	13,8	49,6	39,1	51,7	45,8	25,4

24.	3-metiltridekan	1367	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd
25.	tetradec-1-en	1393	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	nd	nd
26.	tetradekan	1400	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	0,7	0,6	nd	nd	nd	nd	nd
27.	pentadekan	1500	nd	0,9	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	1,3	nd	1,9	1,9	nd	1,5	1,3	1,0	1,5
28.	heksadec-1-en	1594	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	0,3	nd	0,5	0,5	nd	nd	nd	nd	nd
29.	heksadekan	1600	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
30.	heptadekan	1700	0,7	1,1	1,2	1,0	0,1	0,1	0,1	0,6	1,4	0,1	1,7	1,9	0,1	1,6	0,1	0,9	1,6
31.	oktadec-1-en	1794	1,4	2,1	2,7	2,3	1,2	2,2	1,0	1,4	3,0	1,6	3,6	4,3	2,5	3,7	3,1	2,2	3,4
32.	neofitadien	1841	5,0	3,7	4,0	5,3	4,6	4,1	4,5	4,0	3,4	2,7	4,0	2,8	4,9	5,4	5,7	4,5	5,7
33.	diizobutil-ftalat	1869	0,5	0,1	1,8	1,5	0,1	0,1	0,1	0,6	0,9	1,6	0,8	0,8	1,5	2,1	0,1	1,0	0,1
34.	eikos-1-en	1995	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,1	nd	0,9	0,9	nd	nd	nd	0,4	1,0
35.	oktadekanal	2020	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	0,7	0,6	nd	nd	nd	nd	0,8
36.	tunbergol	2044	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,7	nd	nd	0,5	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
37.	10-metileikosan*	2079	nd	12,0	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	13,9	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
38.	heneikosan	2100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	0,8	nd	0,4	0,9	nd	nd	nd	nd	nd
39.	dokos-1-en	2185	1,6	1,9	2,2	2,3	0,1	0,1	0,1	1,5	2,6	0,1	3,6	3,7	3,0	3,6	3,2	2,2	3,4
40.	dokosan	2200	0,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,6	nd	nd	0,4	0,1	nd	1,7	nd	nd	nd
41.	duva-4,8,13-trien-1,3-diol*	2217	16,2	6,9	7,3	4,6	8,1	5,6	6,3	11,2	9,1	3,0	8,1	8,3	8,8	8,7	7,1	8,8	5,2
42.	trikosan	2300	1,9	8,1	14,5	0,5	nd	nd	nd	9,3	16,1	38,5	10,5	0,2	nd	2,0	nd	nd	nd
43.	tetrakosan	2400	4,2	5,8	nd	nd	nd	nd	nd	4,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,5
RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na <i>n</i> -alkane (C <sub>9</sub> - C <sub>25</sub> ); nd - nije detektiran; ** - točan izomer nije identificiran																			

Tablica 19 Kemijski profil isparljivih spojeva u ekstraktima rebra dobiven primjenom ultrazvuka prema BBD

Br	Spoj	RI	Broj eksperimenata																
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
1.	1,2,4-trimetilcikloheksan**	886	nd	nd	nd	0,9	nd	0,6	nd	nd	0,1	0,3	0,1	0,2	nd	0,5	nd	nd	0,4
2.	1,2,4-trimetilcikloheksan**	889	nd	nd	nd	1,3	nd	0,9	nd	nd	0,1	0,5	0,2	0,3	nd	0,8	nd	nd	0,9
3.	<i>trans</i> -1-etil-4-metilcikloheksan	894	nd	nd	nd	3,7	nd	1,9	nd	nd	0,1	1,3	0,5	0,3	nd	2,1	nd	nd	2,8
4.	nonan	900	nd	nd	nd	1,9	nd	1,4	nd	nd	0,3	0,7	0,3	0,5	nd	1,4	nd	nd	1,9
5.	<i>cis</i> -1-etil-4-metilcikloheksan	913	nd	nd	nd	3,3	nd	2,4	nd	nd	0,3	1,2	0,4	0,7	nd	2,0	nd	nd	2,6
6.	2,2,3,3-tetrametilheksan*	920	nd	nd	nd	2,2	nd	1,7	nd	nd	0,2	0,8	0,3	0,5	nd	1,3	nd	nd	1,8
7.	2,5-dimetiloktan**	928	nd	nd	nd	2,1	nd	1,5	nd	nd	0,2	0,7	0,3	0,4	nd	1,3	nd	nd	1,7
8.	acetilcikloheksan	937	nd	nd	nd	3,0	nd	1,5	nd	nd	0,2	0,6	0,3	0,4	nd	1,2	nd	nd	1,6
9.	4-metilnonan	965	nd	nd	nd	0,9	nd	1,3	nd	nd	0,2	0,1	0,1	0,1	nd	1,0	nd	nd	nd
10.	2-metilnonan	968	nd	nd	nd	1,2	nd	1,1	nd	0,1	0,2	0,4	0,2	0,4	nd	0,6	nd	nd	0,8
11.	3-metilnonan	974	nd	nd	nd	0,6	nd	0,5	nd	nd	0,3	0,1	0,1	0,1	nd	1,0	nd	nd	1,2
12.	<i>cis</i> -heksahidroindan	993	nd	nd	nd	1,2	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13.	dekan	1000	nd	nd	nd	1,2	nd	0,9	nd	nd	0,3	0,4	0,3	0,4	nd	0,8	nd	nd	0,7
14.	2,6-dimetilnonan	1026	0,5	1,1	1,3	1,8	0,8	1,5	nd	0,3	0,2	0,6	1,1	1,5	nd	1,8	nd	nd	2,3
15.	2-metildekan	1062	1,0	2,4	2,2	4,6	1,7	3,4	nd	0,7	2,1	1,6	2,6	3,3	2,0	4,6	2,7	3,2	5,6
16.	undekan	1100	nd	nd	nd	1,4	nd	1,2	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	0,7	nd	nd	nd
17.	2-metilundekan	1168	nd	nd	nd	0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18.	dodekan	1200	nd	nd	nd	0,8	nd	0,5	nd	0,2	0,4	1,1	0,6	0,6	nd	0,8	nd	nd	1,0
19.	tridekan	1300	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	0,7	nd	nd	nd	nd	nd
20.	nikotin	1345	83,2	71,4	71,2	16,8	79,8	25,6	39,8	20,4	5,0	7,5	5,5	11,3	61,5	17,1	73,5	87,5	15,9
21.	tetradekan	1400	nd	nd	nd	1,1	nd	nd	nd	nd	0,7	nd	nd	1,0	nd	1,3	nd	nd	1,7
22.	pentadekan	1500	1,0	1,7	1,7	2,2	1,1	2,0	0,6	0,6	1,7	0,9	2,5	2,9	nd	3,4	nd	nd	3,5
23.	heksadec-1-en	1594	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	0,6	0,9	nd	1,1	nd	nd	1,2
24.	heksadekan	1600	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	0,7	0,7	nd	1,0	nd	nd	nd
25.	heptadekan	1700	1,0	2,1	1,9	2,6	nd	1,9	0,5	0,5	1,7	0,9	2,4	0,6	nd	3,1	nd	nd	3,8



26.	oktadec-1-en	1794	1,9	4,1	3,7	5,6	2,8	4,5	0,9	1,1	4,0	2,1	5,3	6,2	3,8	7,3	4,4	5,5	8,6
27.	oktadekan	1800	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	0,3	0,4	nd	nd	nd	nd	nd
28.	neofitadien	1841	2,7	3,1	2,9	1,3	2,6	0,9	1,7	0,5	0,4	nd	0,7	1,0	2,4	0,9	2,7	nd	nd
29.	diizobutil-ftalat	1869	1,1	2,6	2,3	2,8	2,1	1,4	1,2	0,4	0,7	0,6	1,1	1,0	2,8	1,2	3,1	nd	nd
30.	eikos-1-en	1995	nd	nd	nd	1,2	nd	0,9	nd	0,3	0,9	nd	1,3	1,3	nd	1,7	nd	nd	1,8
31.	oktadekanal	2020	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	0,9	1,0	nd	1,2	nd	nd	nd
32.	10-metileikosan*	2079	nd	1,0	nd	nd	nd	nd	1,2	11,7	17,0	nd	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd
33.	dokos-1-en	2185	2,1	4,1	5,0	4,6	2,6	3,5	nd	0,9	3,3	1,7	4,7	5,1	3,4	6,7	6,8	nd	7,2
34.	dokosan	2200	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,9	4,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	nd
35.	duva-4,8,13-trien-1,3-diol*	2217	2,9	2,7	3,1	nd	3,3	nd	nd	0,6	nd	nd	0,5	0,8	nd	nd	nd	nd	nd
36.	trikosan	2300	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,6	39,6	19,1	66,7	19,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
37.	tetrakosan	2400	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	14,8	12,4	4,2	2,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na <i>n</i> -alkane (C <sub>9</sub> - C <sub>25</sub> );      nd - nije detektiran;      ** - točan izomer nije identificiran																			

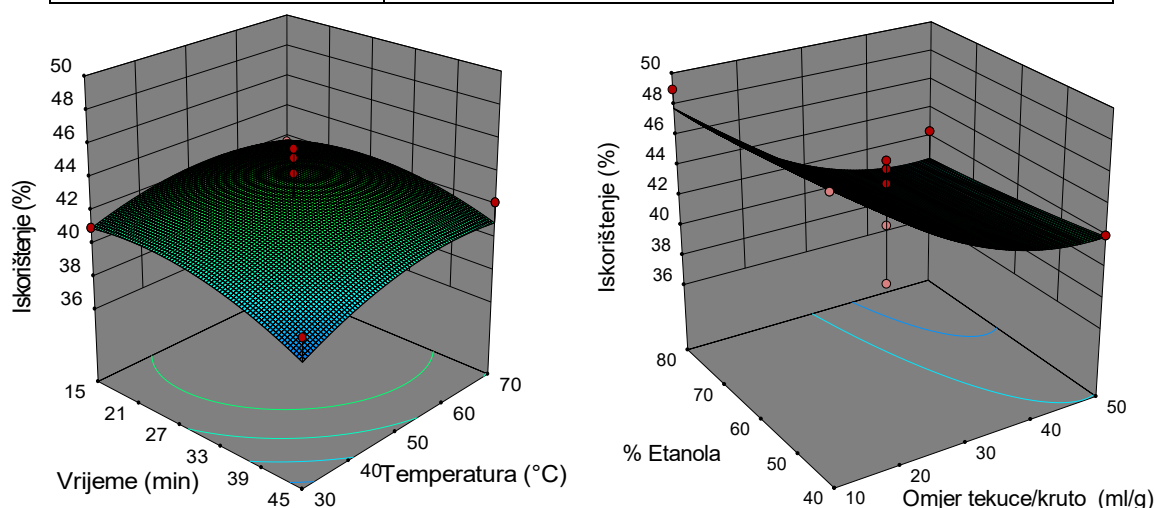
**Tablica 20** Kvantificirani udjeli nikotina, neofitadiena i 4,8,13-duvatrien-1,3-diola u ekstraktima duhanskog otpada i lista dobiveni primjenom ultrazvuka prema BBD

Broj eksperimenta	Nikotin (%)				Duva-4,8,13-trien-1,3-diol (%ekvivalenta nikotina)				Neofitadien (%ekvivalenta nikotina)			
	List	Refabrikat	Prašina	Rebro	List	Refabrikat	Prašina	Rebro	List	Refabrikat	Prašina	Rebro
1.	0,494	0,635	0,469	0,217	0,122	0,118	0,154	0,008	0,065	0,058	0,048	0,001
2.	0,264	0,448	0,304	0,149	0,035	0,061	0,058	0,006	0,035	0,038	0,031	nd
3.	0,309	0,647	0,425	0,184	0,063	0,049	0,077	0,008	0,064	0,037	0,051	nd
4.	0,185	0,103	0,181	0,120	0,037	0,001	0,027	nd	0,026	0,021	0,031	nd
5.	0,423	0,463	0,413	0,248	0,092	0,041	0,050	0,010	0,044	0,032	0,028	nd
6.	0,427	0,524	0,388	0,263	0,054	0,034	0,037	nd	0,038	0,035	0,027	nd
7.	0,659	0,584	0,480	0,331	0,065	0,053	0,052	0,005	0,037	0,067	0,037	0,001
8.	0,798	0,580	0,527	0,470	0,129	0,069	0,149	nd	0,072	0,061	0,053	0,001
9.	0,172	0,313	0,060	0,120	0,099	0,064	0,022	0,012	0,051	0,041	0,008	0,001
10.	0,290	0,329	0,337	0,126	0,061	0,017	0,030	0,013	0,032	0,030	0,027	nd
11.	0,128	0,194	0,106	0,101	0,115	0,049	0,068	nd	0,063	0,038	0,034	0,001
12.	0,403	0,514	0,488	0,163	0,332	0,116	0,294	nd	0,172	0,071	0,099	0,001
13.	0,325	0,481	0,296	0,196	0,077	0,050	0,052	0,010	0,047	0,046	0,029	nd
14.	0,204	0,321	0,024	0,151	0,071	0,028	0,005	nd	0,043	0,032	0,033	nd
15.	0,386	0,461	0,300	0,172	0,101	0,028	0,041	0,008	0,049	0,038	0,033	nd
16.	0,384	0,398	0,338	0,155	0,091	0,029	0,065	0,008	0,058	0,036	0,033	nd
17.	0,104	0,152	0,117	0,072	0,051	0,011	0,024	nd	0,036	0,025	0,026	nd
nd - nije detektiran												

### 4.2.1. Statistička analiza parametara UAE

**Tablica 21** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

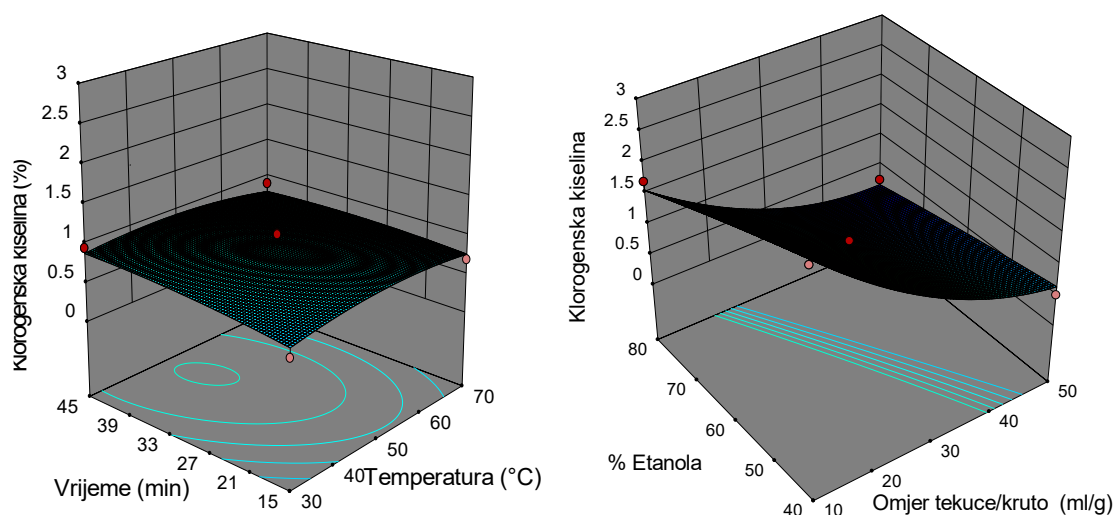
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	259,50	14	18,54	3,02	0,0235
X <sub>1</sub> -Temperatura	7,19	1	7,19	1,17	0,2969
X <sub>2</sub> -Vrijeme	7,65	1	7,65	1,25	0,2827
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	172,23	1	172,23	28,11	0,0001
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	10,03	1	10,03	1,64	0,2216
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,59	1	0,59	0,096	0,7618
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,63	1	3,63	0,59	0,4542
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	2,24	1	2,24	0,36	0,5555
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,50	1	0,50	0,081	0,7800
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,20	1	0,20	0,033	0,8584
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,073	1	0,073	0,012	0,9147
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	6,83	1	6,83	1,11	0,3091
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	7,98	1	7,98	1,30	0,2728
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	29,79	1	29,79	4,86	0,0447
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,16	1	0,16	0,027	0,8722
<b>Ostatak</b>	85,79	14	6,13		
<b>Nedostatak modela</b>	41,11	10	4,11	0,37	0,9089
<b>Pogreška</b>	44,67	4	11,17		
<b>Ukupno</b>	345,28	28			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,752	



**Slika 12** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **list duhana**

**Tablica 22** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za sadržaj **klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

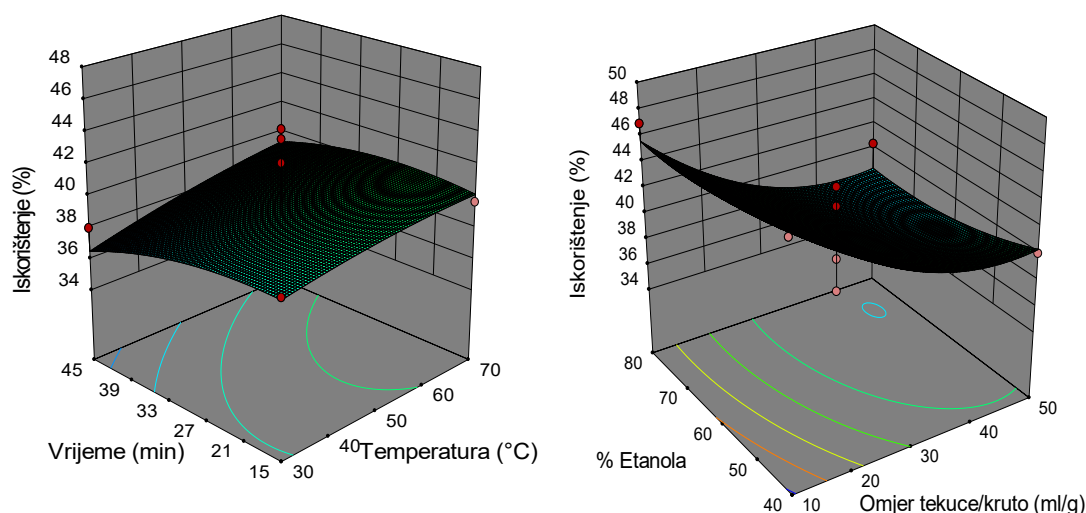
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	13,49	14	0,96	49,29	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0018	1	1,180 x10 <sup>-3</sup>	0,060	0,8095
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,030	1	0,030	1,55	0,2343
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	9,70	1	9,70	495,90	< 0,0001
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	2,30	1	2,30	117,79	< 0,0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0062	1	6,154 x10 <sup>-3</sup>	0,31	0,5836
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,056	1	0,056	2,88	0,1119
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0,030	1	0,030	1,54	0,2356
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,011	1	0,011	0,54	0,4739
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,020	1	0,020	1,02	0,3300
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,13	1	0,13	6,54	0,0228
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,075	1	0,075	3,85	0,0700
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,014	1	0,014	0,74	0,4046
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,92	1	0,92	47,15	< 0,0001
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,003	1	0,003	0,15	0,7055
<b>Ostatak</b>	<b>0,27</b>	<b>14</b>	<b>0,020</b>		
<b>Nedostatak modela</b>	<b>0,20</b>	<b>10</b>	<b>0,020</b>	<b>1,02</b>	<b>0,5395</b>
<b>Pogreška</b>	<b>0,077</b>	<b>4</b>	<b>0,019</b>		
<b>Ukupno</b>	<b>13,77</b>	<b>28</b>			
<b>R<sup>2</sup></b>				<b>0,980</b>	



**Slika 13** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **list duhana**

**Tablica 23** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

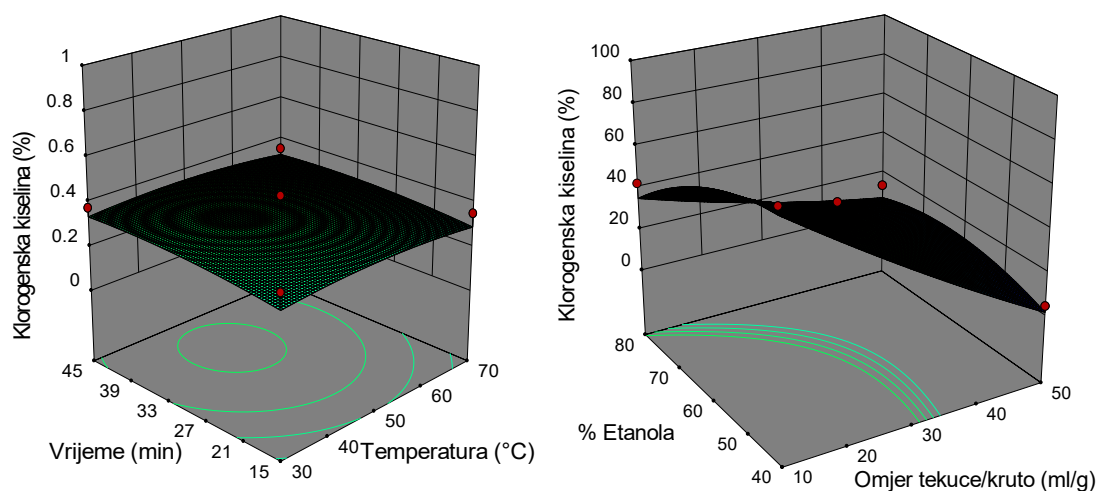
Izvor varijabilnosti	SS	Df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	270,33	14	19,31	2,67	0,0384
X <sub>1</sub> -Temperatura	12,59	1	12,59	1,74	0,2084
X <sub>2</sub> -Vrijeme	7,65	1	7,65	1,06	0,3214
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	172,23	1	172,23	23,80	0,0002
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	16,26	1	16,26	2,25	0,1561
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,59	1	0,59	0,081	0,7803
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,63	1	3,63	0,50	0,4904
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0,25 x10 <sup>-3</sup>	1	0,25 x10 <sup>-3</sup>	0,0345 x10 <sup>-3</sup>	0,9985
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,50	1	0,50	0,069	0,7971
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,20	1	0,20	0,028	0,8695
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,073	1	0,073	0,010	0,9215
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,49	1	0,49	0,068	0,7978
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	3,50	1	3,50	0,48	0,4982
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	41,12	1	41,12	5,68	0,0318
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	5,36	1	5,36	0,74	0,4038
Ostatak	101,33	14	7,24		
Nedostatak modela	59,81	10	5,98	0,58	0,7815
Pogreška	41,51	4	10,38		
Ukupno	371,66	28			
R <sup>2</sup>				0,727	



**Slika 14** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **refabrikat**

**Tablica 24** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

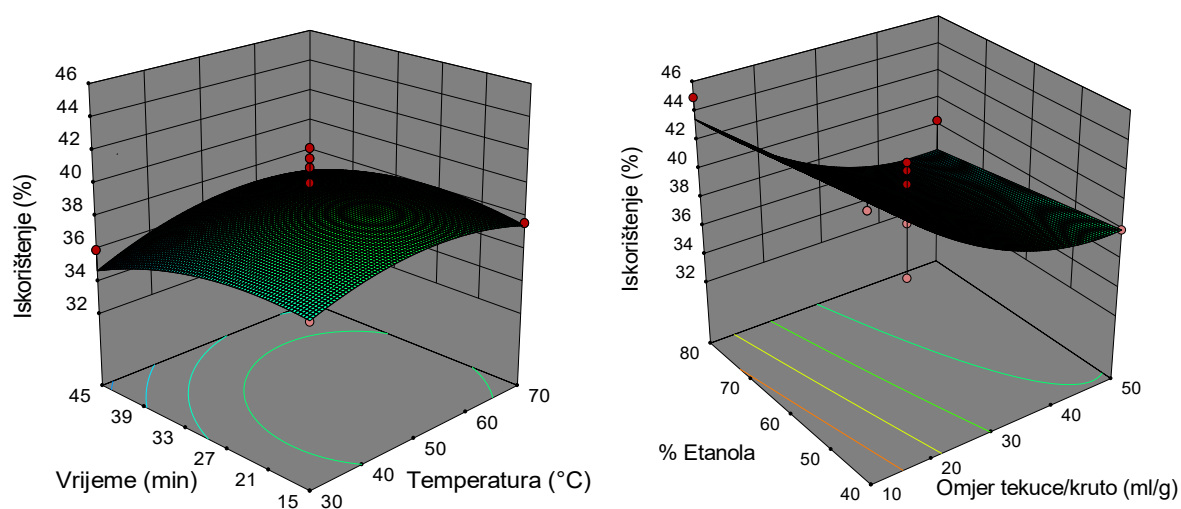
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	10434,74	14	745,34	15,15	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	3,00	1	3,00	0,061	0,8085
X <sub>2</sub> -Vrijeme	38,99	1	38,99	0,79	0,3883
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	8143,75	1	8143,75	165,57	< 0,0001
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	973,80	1	973,80	19,80	0,0005
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,13	1	0,13	0,002638	0,9598
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,39	1	3,39	0,069	0,7969
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	1,17	1	1,17	0,024	0,8798
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,95	1	1,95	0,040	0,8452
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	134,33	1	134,33	2,73	0,1207
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	549,90	1	549,90	11,18	0,0048
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	45,64	1	45,64	0,93	0,3517
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	29,95	1	29,95	0,61	0,4482
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	36,32	1	36,32	0,74	0,4047
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	453,08	1	453,08	9,21	0,0089
Ostatak	688,59	14	49,18		
Nedostatak modela	624,36	10	62,44	3,89	0,1013
Pogreška	64,23	4	16,06		
Ukupno	11123,33	28			
R <sup>2</sup>				0,938	



**Slika 15** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **refabrikat**

**Tablica 25** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

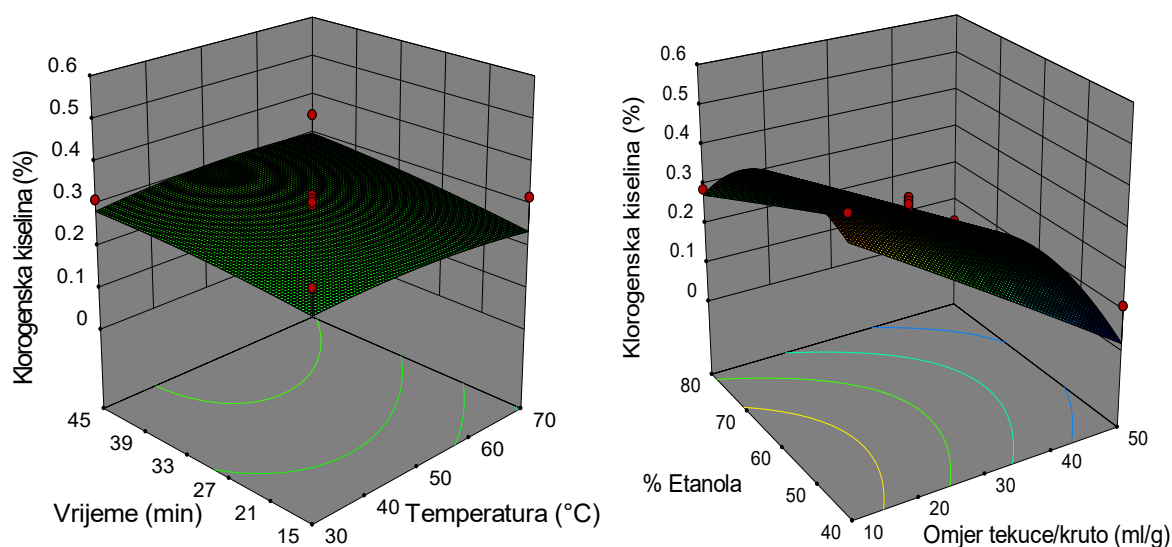
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	263,01	14	18,79	3,08	0,0218
X <sub>1</sub> -Temperatura	4,43	1	4,43	0,73	0,4083
X <sub>2</sub> -Vrijeme	7,65	1	7,65	1,25	0,2815
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	172,23	1	172,23	28,25	0,0001
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	14,02	1	14,02	2,30	0,1517
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,59	1	0,59	0,096	0,7613
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,63	1	3,63	0,60	0,4531
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0,25	1	0,25	0,040	0,8440
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,50	1	0,50	0,082	0,7794
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,20	1	0,20	0,033	0,8580
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,073	1	0,073	0,012	0,9145
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	9,22	1	9,22	1,51	0,2390
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	6,83	1	6,83	1,12	0,3078
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	32,15	1	32,15	5,27	0,0376
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,3528 x10 <sup>-3</sup>	1	0,3528 x10 <sup>-3</sup>	0,05787 x10 <sup>-3</sup>	0,9940
<b>Ostatak</b>	85,35	14	6,10		
<b>Nedostatak modela</b>	40,68	10	4,07	0,36	0,9111
<b>Pogreška</b>	44,67	4	11,17		
<b>Ukupno</b>	348,36	28			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,876	



**Slika 16** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **duhansku prašinu**

**Tablica 26** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,50	14	0,036	7,03	0,0004
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,5852 x10 <sup>-4</sup>	1	0,5852 x10 <sup>-4</sup>	0,011	0,9164
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,005651	1	0,005651	1,10	0,3115
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,38	1	0,38	73,25	< 0,0001
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	0,027	1	0,027	5,25	0,0379
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	3,648 x10 <sup>-4</sup>	1	3,648 x10 <sup>-4</sup>	0,071	0,7935
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	8,237 x10 <sup>-4</sup>	1	8,237 x10 <sup>-4</sup>	0,16	0,6945
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0,005921	1	0,005921	1,16	0,3006
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,020 x10 <sup>-4</sup>	1	1,020 x10 <sup>-4</sup>	0,020	0,8898
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,007762	1	0,007762	1,51	0,2387
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,005388	1	0,005388	1,05	0,3226
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,001472	1	0,001472	0,29	0,6003
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	3,775 x10 <sup>-4</sup>	1	3,775 x10 <sup>-4</sup>	0,074	0,7900
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	9,635 x10 <sup>-5</sup>	1	9,635 x10 <sup>-5</sup>	0,019	0,8929
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,074	1	0,074	14,40	0,0020
<b>Ostatak</b>	0,072	14	0,005124		
<b>Nedostatak modela</b>	0,066	10	0,006626	4,83	0,0713
<b>Pogreška</b>	0,005485	4	0,001371		
<b>Ukupno</b>	0,58	28			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,876	

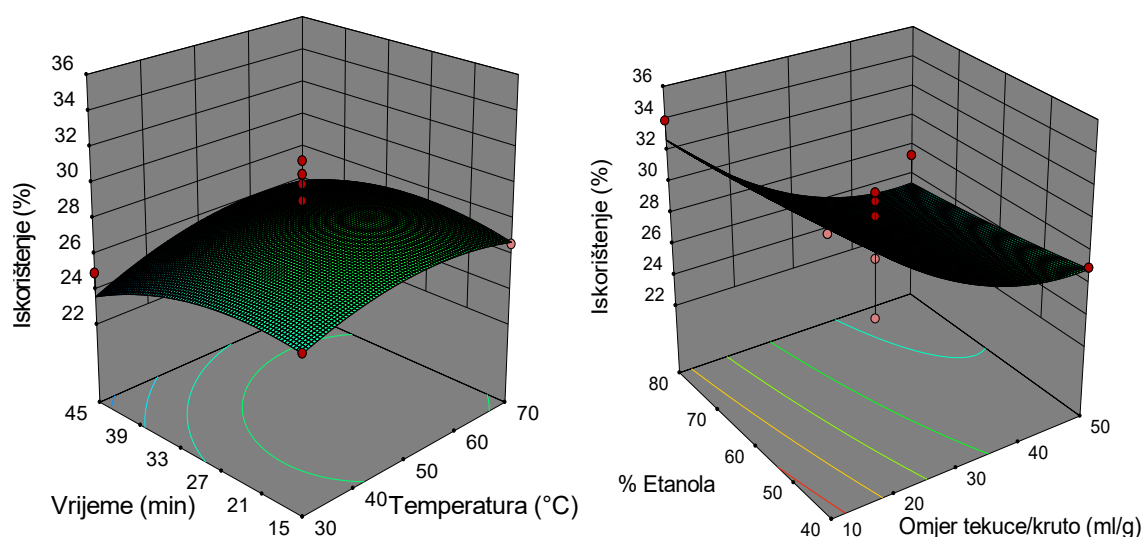


**Slika 17** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **duhansku prašinu**



**Tablica 27** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

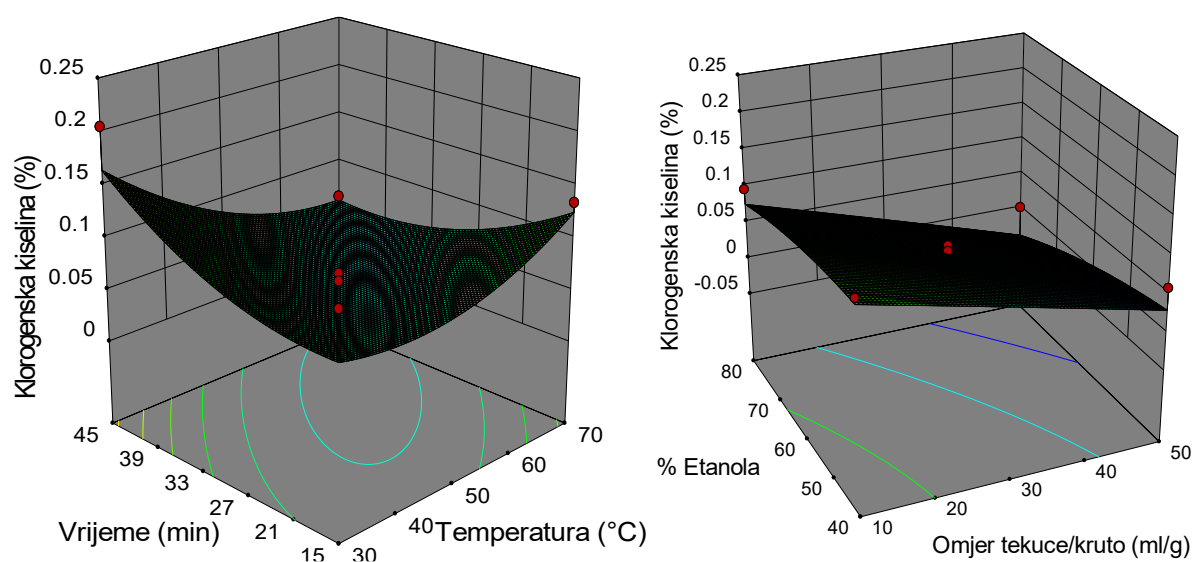
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	259,50	14	18,54	3,02	0,0235
$X_1$ -Temperatura	7,19	1	7,19	1,17	0,2969
$X_2$ -Vrijeme	7,65	1	7,65	1,25	0,2827
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	172,23	1	172,23	28,11	0,0001
$X_4$ -% Etanola u otapalu	10,03	1	10,03	1,64	0,2216
$X_1X_2$	0,59	1	0,59	0,096	0,7618
$X_1X_3$	3,63	1	3,63	0,59	0,4542
$X_1X_4$	2,24	1	2,24	0,36	0,5555
$X_2X_3$	0,50	1	0,50	0,081	0,7800
$X_2X_4$	0,20	1	0,20	0,033	0,8584
$X_3X_4$	0,073	1	0,073	0,012	0,9147
$X_1^2$	6,83	1	6,83	1,11	0,3091
$X_2^2$	7,98	1	7,98	1,30	0,2728
$X_3^2$	29,79	1	29,79	4,86	0,0447
$X_4^2$	0,16	1	0,16	0,027	0,8722
<b>Ostatak</b>	85,79	14	6,13		
<b>Nedostatak modela</b>	41,11	10	4,11	0,37	0,9089
<b>Pogreška</b>	44,67	4	11,17		
<b>Ukupno</b>	345,28	28			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,751	



**Slika 18** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **rebro**

**Tablica 28** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

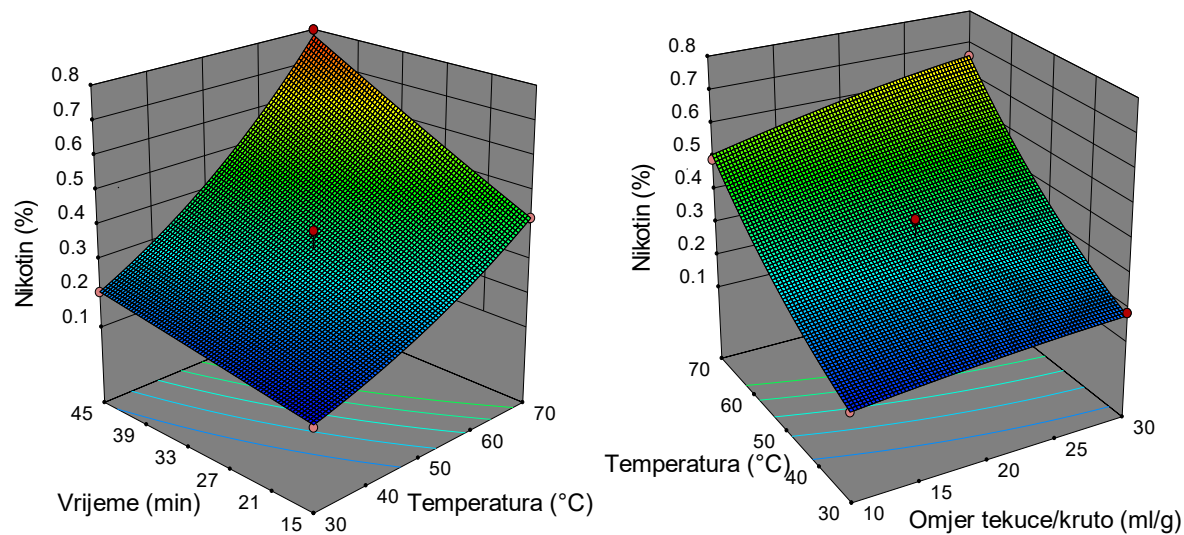
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,067	14	0,004806	3,17	0,0195
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,002658	1	0,002658	1,75	0,2069
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,297 x10 <sup>-3</sup>	1	0,297 x10 <sup>-3</sup>	0,20	0,6649
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,033	1	0,033	21,60	0,0004
X <sub>4</sub> -% Etanola u otapalu	0,010	1	0,010	6,73	0,0212
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,005806	1	0,005806	3,83	0,0707
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,002,195	1	0,002,195	1,45	0,2490
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0,003691	1	0,003691	2,43	0,1412
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,1 x10 <sup>-5</sup>	1	0,1 x10 <sup>-5</sup>	6,590 x10 <sup>-4</sup>	0,9799
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,3025 x10 <sup>-6</sup>	1	0,3025 x10 <sup>-6</sup>	1,994 x10 <sup>-4</sup>	0,9889
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,1891 x10 <sup>-3</sup>	1	0,1891 x10 <sup>-3</sup>	0,12	0,7294
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,004788	1	0,004788	3,16	0,0974
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,003722	1	0,003722	2,45	0,1396
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,201x10 <sup>-6</sup>	1	0,201x10 <sup>-6</sup>	0,001325	0,9715
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,5131 x10 <sup>-3</sup>	1	0,5131 x10 <sup>-3</sup>	0,34	0,5701
<b>Ostatak</b>	0,021	14	0,001517		
<b>Nedostatak modela</b>	0,021	10	0,002106	44,82	0,0011
<b>Pogreška</b>	1,879 x10 <sup>-4</sup>	4	1,879 x10 <sup>-4</sup>		
<b>Ukupno</b>	0,089	28			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,760	



**Slika 19** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi, omjeru tekuće/kruto i udjelu etanola u otapalu pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **rebro**

**Tablica 29** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

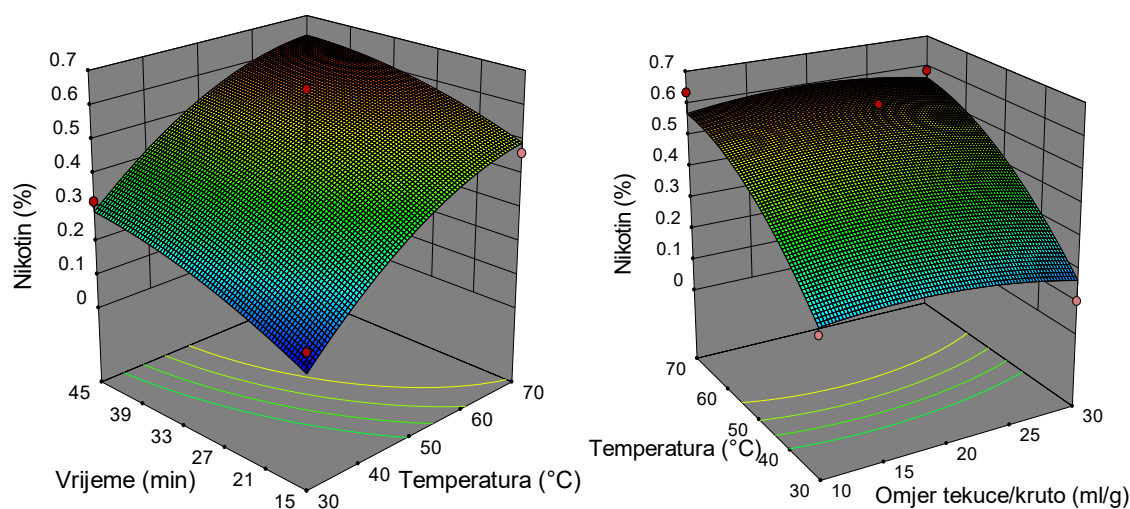
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,36	9	0,040	31,82	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,28	1	0,28	221,08	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,063	1	0,063	49,34	0,0002
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,013	1	0,013	10,30	0,0149
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,003211	1	0,003211	2,53	0,1556
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0003278	1	0,0003278	0,26	0,6268
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,002772	1	0,002772	2,19	0,1828
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,3550 x10 <sup>-3</sup>	1	0,3550 x10 <sup>-3</sup>	0,28	0,6131
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,1389 x10 <sup>-3</sup>	1	0,1389 x10 <sup>-3</sup>	0,11	0,7503
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,3952 x10 <sup>-3</sup>	1	0,3952 x10 <sup>-3</sup>	0,31	0,5941
Ostatak	0,008877	7	0,001268		
Nedostatak modela	0,6025	3	0,2008 x10 <sup>-3</sup> x10 <sup>-3</sup>	0,097	0,9576
Pogreška	0,008274	4	0,002069		
Ukupno	0,37	16			
R <sup>2</sup>				0,976	



**Slika 20** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **list duhana**

**Tablica 30** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

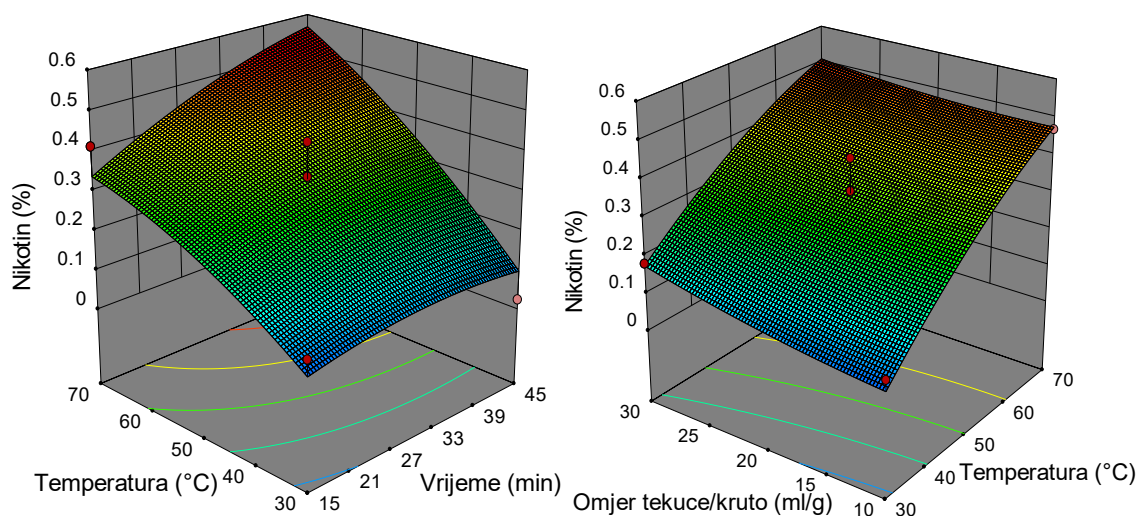
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,38	9	0,042	5,19	0,0205
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,28	1	0,28	34,70	0,0006
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,058	1	0,058	7,23	0,0311
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,001647	1	0,001647	0,21	0,6643
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	6,610 x10 <sup>-4</sup>	1	6,610 x10 <sup>-4</sup>	0,082	0,7824
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	4,008 x10 <sup>-4</sup>	1	4,008 x10 <sup>-4</sup>	0,050	0,8295
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,053 x10 <sup>-5</sup>	1	1,053 x10 <sup>-5</sup>	0,001312	0,9721
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,023	1	0,023	2,91	0,1319
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,004678	1	0,004678	0,58	0,4701
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,004772	1	0,004772	0,59	0,4659
<b>Ostatak</b>	0,056	7	0,008025		
<b>Nedostatak modela</b>	0,021	3	0,006844	0,77	0,5687
<b>Pogreška</b>	0,036	4	0,008910		
<b>Ukupno</b>	0,43	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,870				



**Slika 21** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **refabrikat**

**Tablica 31** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

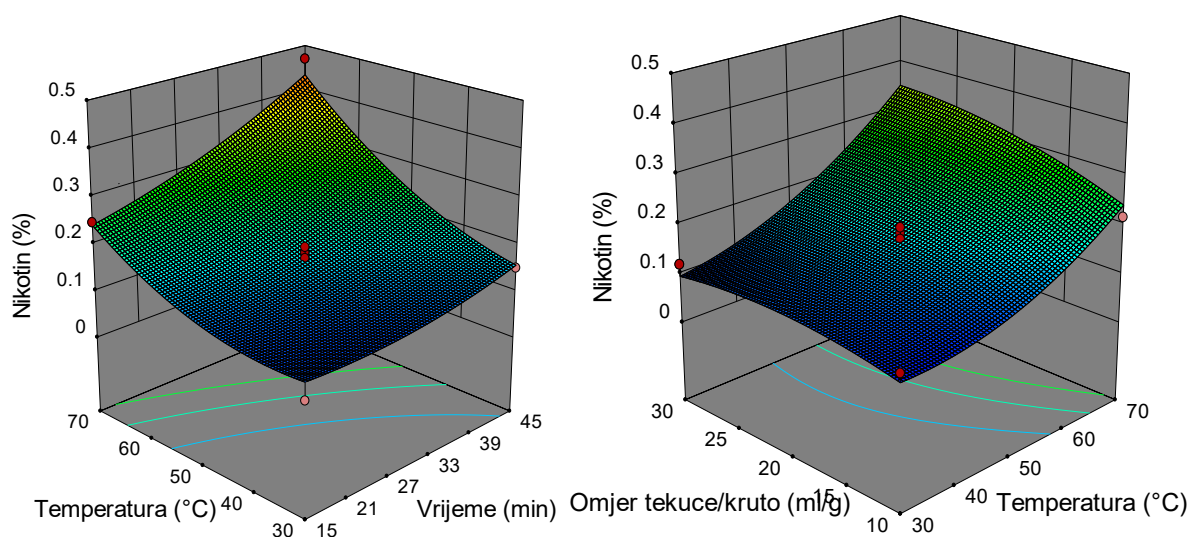
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,36	9	0,040	6,82	0,0096
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,27	1	0,27	45,11	0,0003
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,031	1	0,031	5,28	0,0552
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,008613	1	0,008613	1,46	0,2668
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,011	1	0,011	1,82	0,2192
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,001027	1	0,001027	0,17	0,6894
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,036	1	0,036	6,00	0,0441
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,005418	1	0,005418	0,92	0,3705
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,002901	1	0,002901	0,49	0,5064
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	6,295x10 <sup>-4</sup>	1	4,008 x10 <sup>-4</sup>	0,11	0,7538
<b>Ostatak</b>	0,041	7	0,005918		
<b>Nedostatak modela</b>	0,030	3	0,009886	3,36	0,1361
<b>Pogreška</b>	0,012	4	0,002942		
<b>Ukupno</b>	0,40	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,898				



**Slika 22** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **duhansku prašinu**

**Tablica 32** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,14	9	0,016	15,84	0,0007
$X_1$ -Temperatura	0,085	1	0,085	84,70	< 0,0001
$X_2$ -Vrijeme	0,029	1	0,029	28,97	0,0010
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,007187	1	0,007187	7,20	0,0314
$X_1X_2$	0,005118	1	0,005118	5,13	0,0580
$X_1X_3$	0,002310	1	0,002310	2,31	0,1720
$X_2X_3$	0,002253	1	0,002253	2,26	0,1767
$X_1^2$	0,008216	1	0,008216	8,23	0,0240
$X_2^2$	0,001716	1	0,001716	1,72	0,2312
$X_3^2$	0,002212	1	0,002212	2,22	0,1802
<b>Ostatak</b>	$9,984 \times 10^{-4}$	7	$9,984 \times 10^{-4}$		
<b>Nedostatak modela</b>	0,001823	3	0,001823	4,80	0,0820
<b>Pogreška</b>	$3,801 \times 10^{-4}$	4	$3,801 \times 10^{-4}$		
<b>Ukupno</b>	0,15	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,953				



**Slika 23** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom za **rebro**

**Tablica 33** Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda
<b>List</b>	
Iskorištenje (Y <sub>1</sub> )	$42,73 + 0,77X_1 - 0,8X_2 - 3,79X_3 - 3,91X_4 - 1,03X_1^2 - 1,11X_2^2 + 2,14X_3^2 + 0,16X_4^2 + 0,38X_1X_2 + 0,95X_1X_3 + 0,75X_1X_4 + 0,35X_2X_3 + 0,22X_2X_4 + 0,14X_3X_4$
Klorogenska kiselina (Y <sub>2</sub> )	$0,94 + 0,009917X_1 + 0,05X_2 - 0,9X_3 - 0,44X_4 - 0,11X_1^2 - 0,047X_2^2 + 0,38X_3^2 - 0,021X_4^2 - 0,039X_1X_2 + 0,012X_1X_3 + 0,087X_1X_4 + 0,051X_2X_3 + 0,071X_2X_4 + 0,18X_3X_4$
Nikotin (Y <sub>3</sub> )	$0,576 + 0,1872X_1 + 0,0884X_2 + 0,0404X_3 + 0,0092X_1^2 + 0,0057X_2^2 + 0,0097X_3^2 + 0,0283X_1X_2 + 0,0091X_1X_3 + 0,0263X_2X_3$
<b>Refabrikat</b>	
Iskorištenje (Y <sub>4</sub> )	$39,72 + 1,02X_1 - 0,79X_2 - 3,80X_3 - 1,16X_4 - 0,28X_1^2 - 0,73X_2^2 + 2,52X_3^2 + 0,91X_4^2 + 0,38X_1X_2 + 0,94X_1X_3 + 0,0025X_1X_4 + 0,35X_2X_3 + 0,219X_2X_4 + 0,139X_3X_4$
Klorogenska kiselina (Y <sub>5</sub> )	$0,36 - 0,005X_1 + 0,018X_2 - 0,26X_3 - 0,09X_4 - 0,027X_1^2 - 0,021X_2^2 + 0,024X_3^2 - 0,084X_4^2 - 0,0018X_1X_2 + 0,009295X_1X_3 - 0,0054X_1X_4 + 0,006975X_2X_3 + 0,058X_2X_4 + 0,12X_3X_4$
Nikotin (Y <sub>6</sub> )	$0,4869 + 0,1866X_1 + 0,0852X_2 - 0,0143X_3 - 0,0745X_1^2 - 0,0333X_2^2 - 0,0337X_3^2 - 0,0129X_1X_2 + 0,01X_1X_3 - 0,0016X_2$
<b>Duhanska prašina</b>	
Iskorištenje (Y <sub>7</sub> )	$38,71 + 0,61X_1 - 0,80X_2 - 3,789X_3 - 1,08X_4 - 1,19X_1^2 - 1,03X_2^2 + 2,23X_3^2 - 0,007375X_4^2 + 0,379X_1X_2 + 0,95X_1X_3 + 0,25X_1X_4 + 0,35X_2X_3 + 0,22X_2X_4 + 0,141X_3X_4$
Klorogenska kiselina (Y <sub>8</sub> )	$0,29 - 0,002208X_1 + 0,022X_2 - 0,18X_3 - 0,047X_4 - 0,015X_1^2 - 0,007629X_2^2 - 0,003854X_3^2 - 0,007375X_4^2 + 0,00955X_1X_2 - 0,014X_1X_3 + 0,038X_1X_4 - 0,00505X_2X_3 + 0,044X_2X_4 + 0,037X_3X_4$
Nikotin (Y <sub>9</sub> )	$0,3325 + 0,1827X_1 + 0,0625X_2 + 0,0328X_3 - 0,0359X_1^2 - 0,0262X_2^2 + 0,0122X_3^2 + 0,0519X_1X_2 - 0,0016X_1X_3 - 0,0943X_2X_3$
<b>Rebro</b>	
Iskorištenje (Y <sub>10</sub> )	$27,68 + 0,77X_1 - 0,801X_2 - 3,787X_3 - 0,91X_4 - 1,03X_1^2 - 1,11X_2^2 + 2,14X_3^2 + 0,16X_4^2 + 0,381X_1X_2 + 0,949X_1X_3 + 0,75X_1X_4 + 0,349X_2X_3 + 0,219X_2X_4 + 0,139X_3X_4$
Klorogenska kiselina (Y <sub>11</sub> )	$0,056 - 0,015X_1 + 0,00497X_2 - 0,052X_3 - 0,029X_4 + 0,027X_1^2 + 0,024X_2^2 - 0,0005567X_3^2 - 0,008894X_4^2 - 0,038X_1X_2 - 0,023X_1X_3 + 0,03X_1X_4 + 0,0005X_2X_3 + 0,000275X_2X_4 - 0,006875X_3X_4$
Nikotin (Y <sub>12</sub> )	$0,1709 + 0,1028X_1 + 0,0601X_2 + 0,03X_3 + 0,0442X_1^2 + 0,0202X_2^2 - 0,0229X_3^2 + 0,0358X_1X_2 - 0,0240X_1X_3 - 0,0237X_2X_3$

### 4.3. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA MAE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG OTPADA

**Tablica 34** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima lista duhana dobivenim primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Neoklorogenska kiselina (%)	Kriptoklorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Nikotiflorin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	120	15	10	57,700	2,442	0,966	0,409	0,432	0,327	0,067	72,611	4,144
2.	100	15	20	52,320	4,781	0,939	0,279	0,168	0,256	0,063	75,168	3,933
3.	80	25	20	44,080	5,095	1,423	0,291	0,399	0,161	nd	69,128	3,733
4.	80	15	10	46,340	1,512	0,145	0,054	0,017	0,111	nd	38,156	1,933
5.	120	15	30	60,780	3,565	1,143	0,344	0,401	0,399	0,072	76,350	4,000
6.	100	25	10	49,860	4,799	1,501	0,323	0,413	0,492	0,072	80,761	4,078
7.	100	15	20	48,120	5,106	0,979	0,244	0,229	0,250	0,044	75,328	3,800
8.	100	15	20	46,001	5,480	0,864	0,226	0,161	0,371	nd	76,926	4,000
9.	80	15	30	42,640	5,022	0,867	0,193	0,152	0,396	nd	80,153	3,400
10.	100	5	30	55,680	3,066	0,321	0,105	0,095	0,314	nd	53,404	3,000
11.	80	5	20	69,780	5,286	0,822	0,180	0,225	0,635	0,089	84,660	4,511
12.	120	25	20	56,520	4,248	0,479	0,218	0,210	0,341	0,071	71,492	4,444
13.	100	15	20	39,960	4,335	0,979	0,119	0,108	0,266	0,041	73,282	3,600
14.	120	5	20	53,040	4,335	0,653	0,166	0,162	0,504	0,071	81,400	3,800
15.	100	5	10	49,080	5,126	0,894	0,174	0,185	0,367	0,087	88,910	4,367
16.	100	25	30	19,402	4,733	0,839	0,206	0,187	0,534	0,076	83,190	3,644
17.	100	15	20	47,080	5,392	0,903	0,168	0,166	0,296	0,043	79,134	4,289

nd-nije detekiran



**Tablica 35** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima **refabrikata** dobivenim primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Neoklorogenska kiselina (%)	Kriptoklorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Nikotiflorin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	120	15	10	54,720	2,053	0,229	0,151	0,058	0,222	0,064	4,633	67,018
2.	100	15	20	52,960	2,976	0,329	0,197	0,050	0,256	0,042	3,622	43,635
3.	80	25	20	41,480	3,427	0,401	0,048	0,041	0,253	0,042	3,933	55,378
4.	80	15	10	35,980	2,843	0,468	0,081	0,068	0,464	0,082	4,133	54,084
5.	120	15	30	58,530	2,078	0,289	0,074	0,045	0,175	0,075	4,300	63,751
6.	100	25	10	47,200	2,758	0,430	0,075	0,050	0,326	0,053	4,567	62,730
7.	100	15	20	47,080	3,196	0,332	0,179	0,043	0,288	0,046	3,889	56,603
8.	100	15	20	50,120	3,327	0,367	0,154	0,030	0,265	0,043	3,633	55,514
9.	80	15	30	48,180	3,547	0,394	0,156	0,064	0,251	0,040	3,611	47,107
10.	100	5	30	42,240	3,117	0,312	0,138	0,056	0,307	0,052	4,011	42,478
11.	80	5	20	47,120	3,709	0,495	0,191	0,092	0,631	0,057	3,889	50,294
12.	120	25	20	69,081	1,886	0,180	0,169	0,057	0,130	0,057	4,244	47,759
13.	100	15	20	43,202	2,975	0,334	0,162	0,031	0,222	0,044	2,811	24,174
14.	120	5	20	43,960	3,115	0,525	0,256	0,136	0,469	0,083	4,711	66,351
15.	100	5	10	42,740	3,450	0,257	0,183	0,039	0,353	0,056	4,578	57,849
16.	100	25	30	46,380	3,331	0,449	0,188	0,082	0,312	0,050	3,611	50,038
17.	100	15	20	45,000	2,870	0,417	0,188	0,041	0,256	0,043	2,756	43,380

**Tablica 36** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima **duhanske prašine** dobivenim primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruće (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Neoklorogenska kiselina (%)	Kriptoklorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Nikotiflorin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	120	15	10	49,640	2,720	0,273	0,181	0,028	0,126	0,040	1,397	14,571
2.	100	15	20	38,560	3,270	0,880	0,226	0,066	0,514	0,090	1,840	21,793
3.	80	25	20	35,640	3,717	0,584	0,228	0,074	0,568	0,099	1,963	23,867
4.	80	15	10	42,920	3,505	0,425	0,177	0,038	0,313	0,050	1,480	18,335
5.	120	15	30	58,230	2,628	1,112	0,188	0,030	0,284	0,050	1,448	12,266
6.	100	25	10	37,820	3,930	0,454	0,235	0,059	0,501	0,088	2,027	26,658
7.	100	15	20	37,800	4,064	0,952	0,232	0,062	0,496	0,086	1,928	30,166
8.	100	15	20	47,960	3,238	1,019	0,245	0,116	0,505	0,070	2,257	36,389
9.	80	15	30	48,075	3,467	0,932	0,344	0,117	0,534	0,074	2,196	9,040
10.	100	5	30	47,520	4,840	0,945	0,119	0,012	0,218	0,039	2,763	12,343
11.	80	5	20	39,080	3,349	0,237	0,219	0,066	0,422	0,079	2,182	44,123
12.	120	25	20	52,880	2,654	0,484	0,274	0,219	0,180	0,041	1,922	19,565
13.	100	15	20	38,320	3,405	0,737	0,245	0,068	0,602	0,095	2,336	31,396
14.	120	5	20	46,440	3,293	0,546	0,203	0,036	0,333	0,051	2,277	26,709
15.	100	5	10	29,420	3,408	1,135	0,236	0,249	0,418	0,073	2,231	27,478
16.	100	25	30	40,680	3,196	0,473	0,245	0,243	0,534	0,092	2,657	32,241
17.	100	15	20	38,960	3,169	0,931	0,252	0,073	0,485	0,085	2,697	31,396

**Tablica 37** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima rebra dobivenim primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

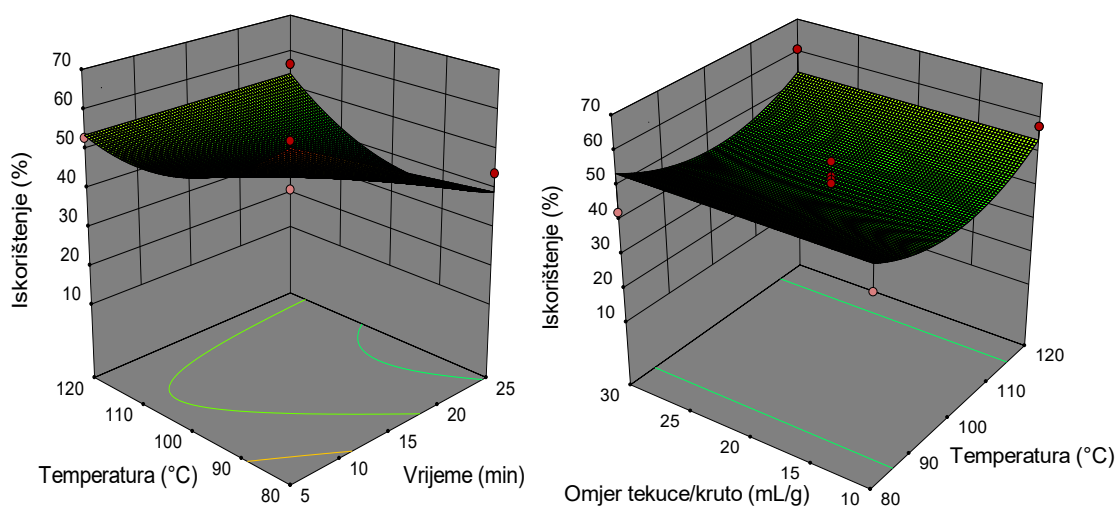
Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Neoklorogenska kiselina (%)	Kriptoklorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Nikotiflorin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	120	15	10	49,000	1,503	0,101	0,077	0,001	0,103	0,037	1,552	30,960
2.	100	15	20	52,760	1,310	0,192	0,069	Nd	0,100	nd	1,054	29,642
3.	80	25	20	49,280	1,656	0,153	0,056	Nd	0,104	nd	1,280	23,352
4.	80	15	10	42,520	1,619	0,014	0,323	0,444	0,166	0,075	2,806	59,896
5.	120	15	30	57,960	1,325	0,185	0,081	0,001	0,099	nd	1,288	32,553
6.	100	25	10	37,840	1,379	0,250	0,090	0,009	0,140	nd	1,484	40,716
7.	100	15	20	47,600	1,543	0,193	0,076	0,242	0,099	nd	1,328	38,173
8.	100	15	20	51,440	1,322	0,193	0,064	Nd	0,106	0,073	2,637	45,969
9.	80	15	30	53,100	1,323	0,208	0,070	Nd	0,119	nd	1,266	44,296
10.	100	5	30	47,160	0,867	0,212	0,056	Nd	0,113	nd	1,302	33,322
11.	80	5	20	43,600	1,628	0,190	0,055	Nd	0,094	nd	1,393	48,652
12.	120	25	20	52,400	1,247	0,113	0,090	Nd	0,096	0,074	1,713	31,014
13.	100	15	20	49,600	1,403	0,188	0,068	Nd	0,095	nd	2,294	45,902
14.	120	5	20	49,160	1,272	0,202	0,088	Nd	0,120	nd	2,261	42,623
15.	100	5	10	41,900	1,783	0,266	0,086	Nd	0,141	nd	1,479	36,132
16.	100	25	30	51,720	1,442	0,228	0,076	Nd	0,098	nd	1,274	42,489
17.	100	15	20	50,400	1,431	0,211	0,074	Nd	0,115	nd	1,238	43,961

nd- nije detektiran

### 4.3.1. Statistička analiza parametara MAE

**Tablica 38** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

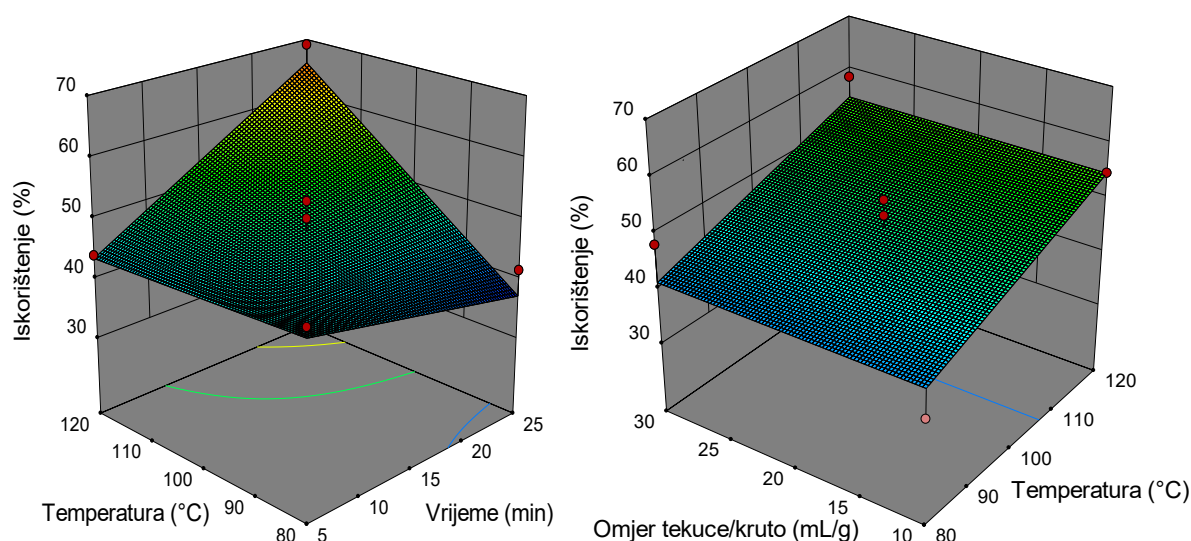
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1504,52	9	167,17	3,75	0,0476
X <sub>1</sub> -Temperatura	79,44	1	79,44	1,78	0,2236
X <sub>2</sub> -Vrijeme	416,31	1	416,31	9,34	0,0184
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	74,91	1	74,91	1,68	0,2359
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	212,72	1	212,72	4,77	0,0652
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	11,49	1	11,49	0,2579	0,6272
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	343,36	1	343,36	7,70	0,0275
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	322,98	1	322,98	7,25	0,0310
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,6678	1	0,6678	0,0150	0,9060
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	54,24	1	54,24	1,22	0,3064
<b>Ostatak</b>	<b>311,97</b>	<b>7</b>	<b>44,57</b>		
<b>Nedostatak modela</b>	<b>232,31</b>	<b>3</b>	<b>77,44</b>	<b>3,89</b>	<b>0,1113</b>
<b>Pogreška</b>	<b>79,66</b>	<b>4</b>	<b>19,92</b>		
<b>Ukupno</b>	<b>1816,49</b>	<b>16</b>			
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,828</b>				



**Slika 24** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **list duhana**

**Tablica 39** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje** ekstrakcije pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

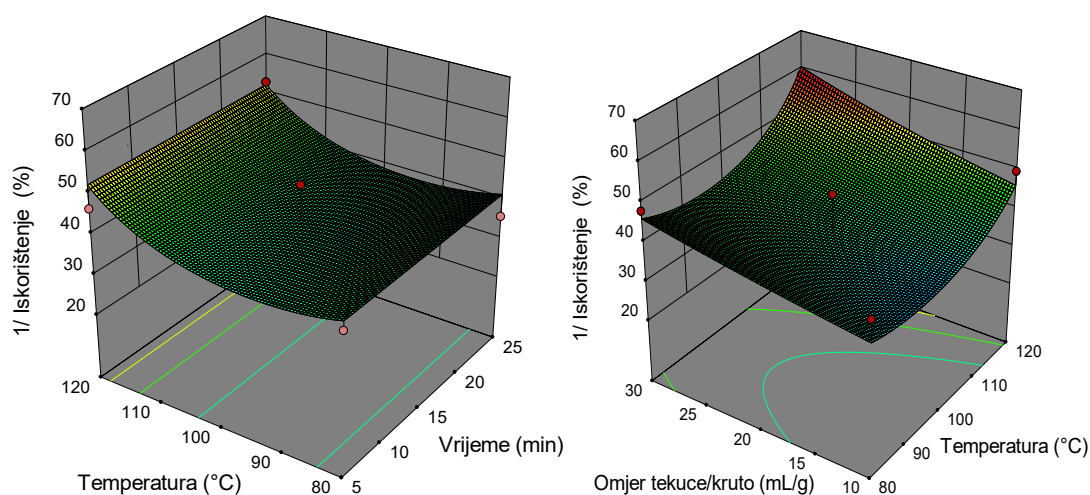
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	814,13	9	90,46	5,44	0,0181
$X_1$ -Temperatura	358,18	1	358,18	21,52	0,0024
$X_2$ -Vrijeme	98,56	1	98,56	5,92	0,0452
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	26,97	1	26,97	1,62	0,2436
$X_1X_2$	236,54	1	236,54	14,21	0,0070
$X_1X_3$	17,60	1	17,60	1,06	0,3380
$X_2X_3$	0,0256	1	0,0256	0,0015	0,9698
$X_1^2$	58,43	1	58,43	3,51	0,1031
$X_2^2$	4,10	1	4,10	0,2466	0,6347
$X_3^2$	17,60	1	17,60	1,06	0,3379
<b>Ostatak</b>	116,49	7	16,64		
<b>Nedostatak modela</b>	55,04	3	18,35	1,19	0,4182
<b>Pogreška</b>	61,44	4	15,36		
<b>Ukupno</b>	930,62	16			
<b><math>R^2</math></b>				0,875	



**Slika 25** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **refabrikat**

**Tablica 40** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje** ekstrakcije pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

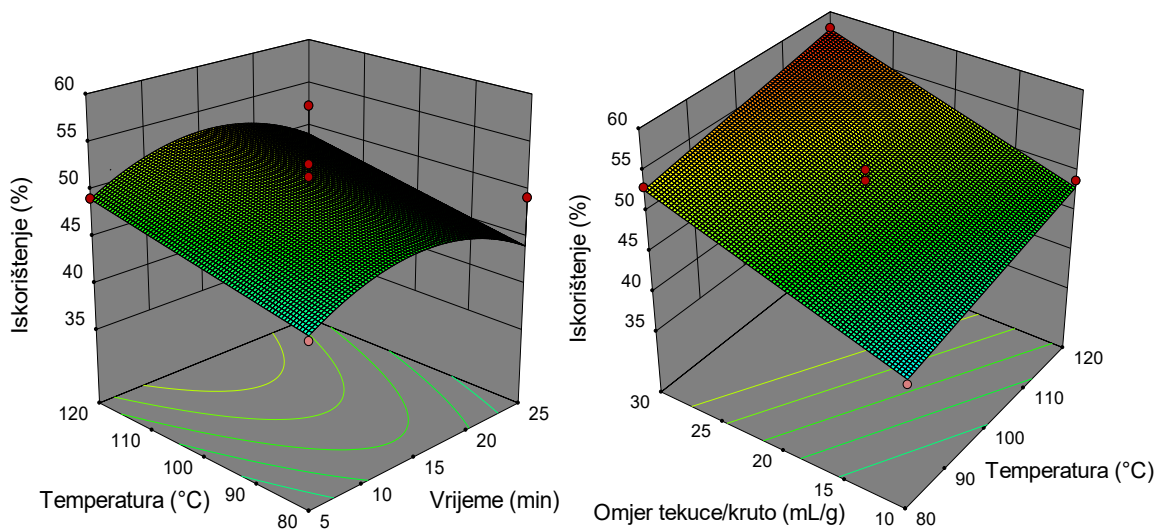
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0002	9	0,0000	4,40	0,0318
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0000	1	0,0000	8,79	0,0210
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,2167 x10 <sup>-5</sup>	1	0,2167 x10 <sup>-5</sup>	0,3815	0,5563
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0001	1	0,0001	9,05	0,0197
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,000006483	1	0,000006483	1,14	0,3208
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,5604 x10 <sup>-7</sup>	1	0,5604 x10 <sup>-7</sup>	0,0099	0,9237
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0000	1	0,0000	5,41	0,0529
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0001	1	0,0001	10,81	0,0133
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0000	1	0,0000	4,06	0,0837
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,2881 x10 <sup>-5</sup>	1	0,2881 x10 <sup>-5</sup>	0,5072	0,4994
Ostatak	0,0000	7	0, 5680 x10 <sup>-6</sup>		
Nedostatak modela	0,0000	3	0,5970 x10 <sup>-5</sup>	1,09	0,4485
Pogreška	0,0000	4	0,5463 x10 <sup>-5</sup>		
Ukupno	0,0003	16			
R <sup>2</sup>	0,850				



**Slika 26** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **duhansku prašinu**

**Tablica 41** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

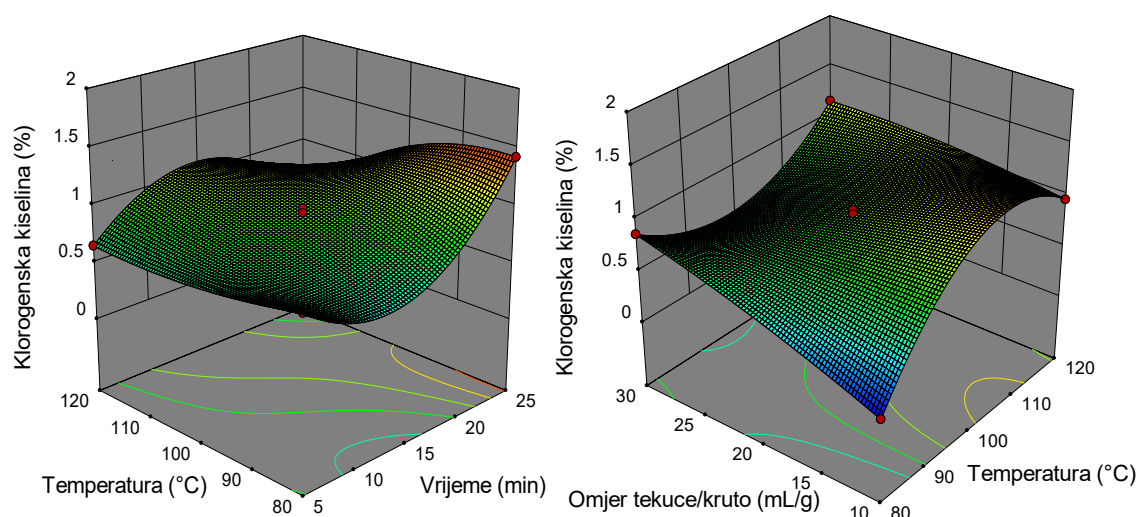
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	363,31	9	40,37	11,35	0,0021
$X_1$ -Temperatura	50,10	1	50,10	14,09	0,0071
$X_2$ -Vrijeme	11,09	1	11,09	3,12	0,1207
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	187,02	1	187,02	52,60	0,0002
$X_1X_2$	1,49	1	1,49	0,4186	0,5383
$X_1X_3$	0,6561	1	0,6561	0,1845	0,6804
$X_2X_3$	18,58	1	18,58	5,22	0,0562
$X_1^2$	18,92	1	18,92	5,32	0,0544
$X_2^2$	63,06	1	63,06	17,74	0,0040
$X_3^2$	14,18	1	14,18	3,99	0,0860
<b>Ostatak</b>	24,89	7	3,56		
<b>Nedostatak modela</b>	9,77	3	3,26	0,8611	0,5302
<b>Pogreška</b>	15,12	4	3,78		
<b>Ukupno</b>	388,20	16			
<b><math>R^2</math></b>				0,936	



**Slika 27** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **rebro**

**Tablica 42** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,84	10	0,1836	89,14	< 0,0001
$X_1$ -Temperatura	0,3012	1	0,3012	146,21	< 0,0001
$X_2$ -Vrijeme	0,3163	1	0,3163	153,58	< 0,0001
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,3814	1	0,3814	185,14	< 0,0001
$X_1X_2$	0,1501	1	0,1501	72,87	0,0001
$X_1X_3$	0,0741	1	0,0741	35,96	0,0010
$X_1^2$	0,0407	1	0,0407	19,75	0,0044
$X_2^2$	0,0121	1	0,0121	5,88	0,0516
$X_3^2$	0,0608	1	0,0608	29,50	0,0016
$X_1^2X_2$	0,5693	1	0,5693	276,38	< 0,0001
$X_1^2X_3$	0,6110	1	0,6110	296,65	< 0,0001
$X_1X_2^2$	0,0124	6	0,0021		
<b>Ostatak</b>	0,012	5	$2,392 \times 10^{-3}$		
<b>Nedostatak modela</b>	$2,028 \times 10^{-3}$	1	$2,028 \times 10^{-3}$	0,82	0,4172
<b>Pogreška</b>	$9,930 \times 10^{-3}$	4	$2,482 \times 10^{-3}$		
<b>Ukupno</b>	1,85	16			
<b><math>R^2</math></b>				0,994	

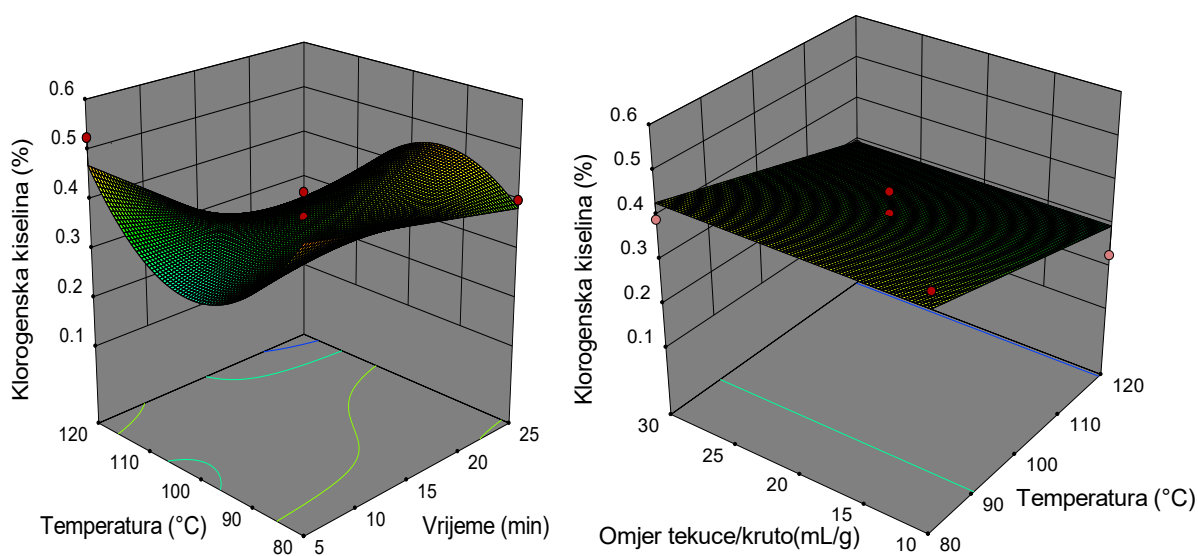


**Slika 28** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **list duhana**



**Tablica 43** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

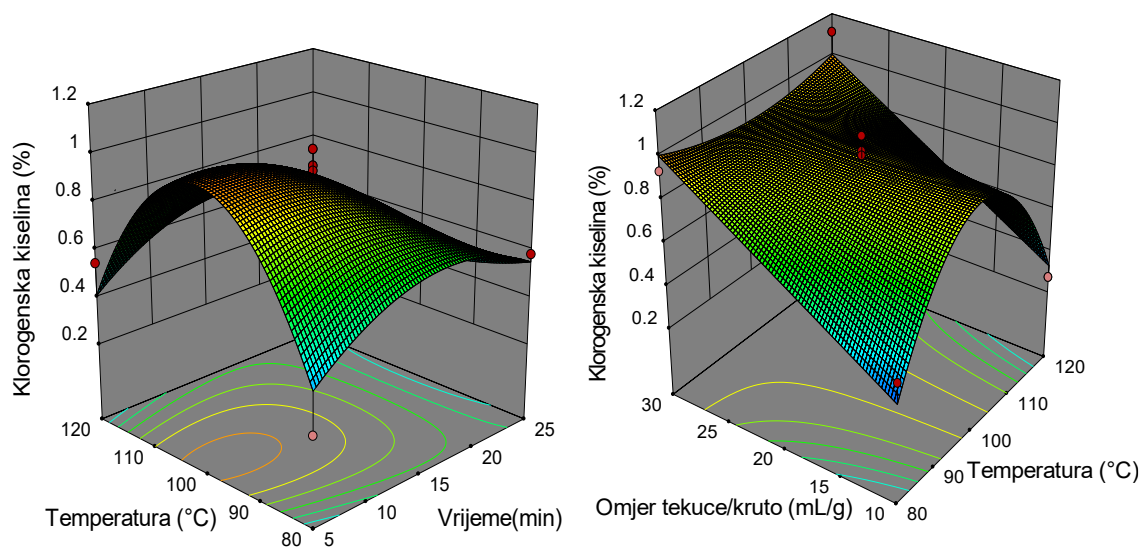
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,1398	11	0,0127	10,65	<0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0298	1	0,0298	24,96	0,0041
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,0240	1	0,0240	20,13	0,0065
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0157	1	0,0157	13,17	0,0151
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> X <sub>2</sub>	0,070	1	0,070	38,49	< 0,0001
Ostatak	0,022	12	1,822 x10-3		
Nedostatak modela	0,016	8	2,029 x10-3	1,44	0,3838
Pogreška	5,639 x10-3	4	1,410 x10-3		
Ukupno	0,15	16			
R <sup>2</sup>	0,850				



**Slika 29** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **refabrikat**

**Tablica 44** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

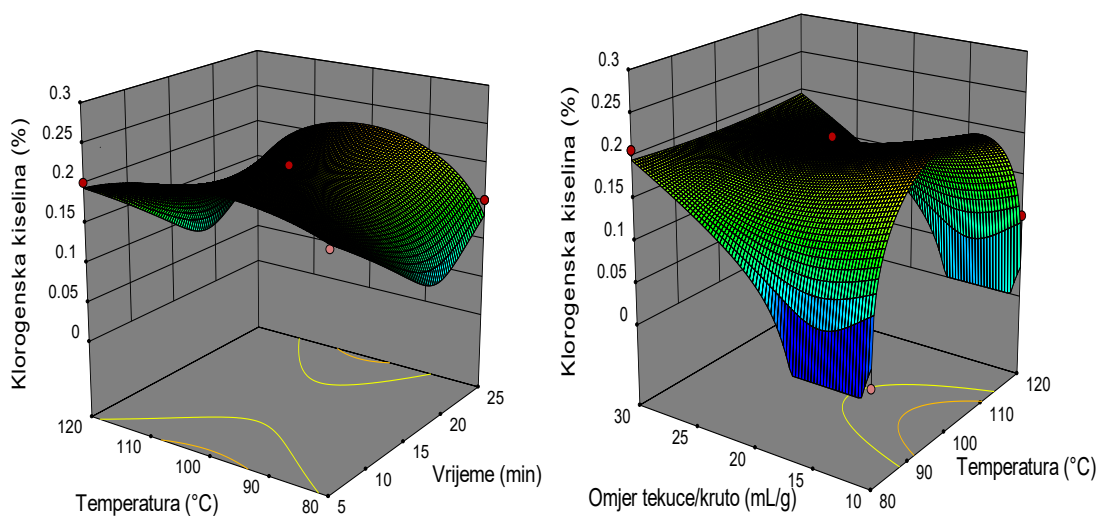
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,24	5	0,25	18,32	< 0,0001
$X_2$ -Vrijeme	0,33	1	0,33	24,51	0,0004
$X_1^2$	0,27	1	0,27	19,71	0,0010
$X_2^2$	0,15	1	0,15	10,74	0,0074
$X_1^2X_2$	0,26	1	0,26	19,08	0,0011
$X_2X_3^2$	0,45	1	0,45	33,43	0,0001
<b>Ostatak</b>	0,15	11	0,014		
<b>Nedostatak modela</b>	0,10	7	0,015	1,33	0,4115
<b>Pogreška</b>	0,045	4	0,011		
<b>Ukupno</b>	1,39	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,893				



**Slika 30** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruho pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **duhansku prašinu**

**Tablica 45** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske** kiseline pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

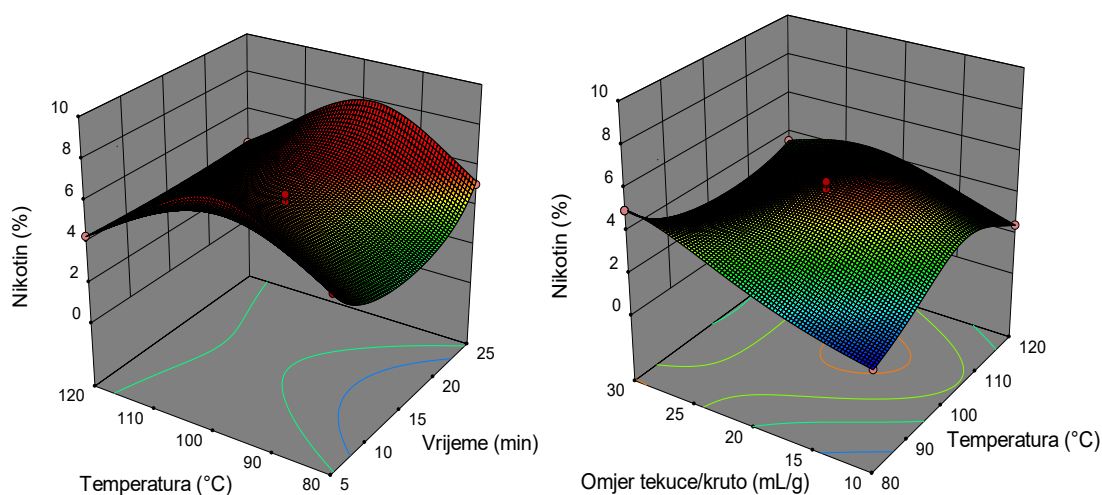
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	$3,643 \times 10^{-4}$	7	$5,204 \times 10^{-5}$	40,32	< 0,0001
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	$4,220 \times 10^{-5}$	1	$4,220 \times 10^{-5}$	32,70	0,0003
$X_2X_3$	$7,659 \times 10^{-6}$	1	$7,659 \times 10^{-6}$	5,93	0,0376
$X_1^2$	$1,605 \times 10^{-4}$	1	$1,605 \times 10^{-4}$	124,33	< 0,0001
$X_2^2$	$5,781 \times 10^{-5}$	1	$5,781 \times 10^{-5}$	44,79	< 0,0001
$X_3^2$	$3,239 \times 10^{-5}$	1	$3,239 \times 10^{-5}$	25,09	0,0007
$X_1^2X_2$	$2,532 \times 10^{-5}$	1	$2,532 \times 10^{-5}$	19,62	0,0016
$X_1^2X_3$	$9,296 \times 10^{-5}$	1	$9,296 \times 10^{-5}$	72,02	< 0,0001
<b>Ostatak</b>	$1,162 \times 10^{-5}$	9	$1,291 \times 10^{-6}$		
<b>Nedostatak modela</b>	$7,066 \times 10^{-6}$	5	$1,413 \times 10^{-6}$	1,24	0,4287
<b>Pogreška</b>	$4,550 \times 10^{-6}$	4	$1,137 \times 10^{-6}$		
<b>Ukupno</b>	$3,759 \times 10^{-4}$	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,969	



**Slika 31** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske** kiseline u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **rebro**

**Tablica 46** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

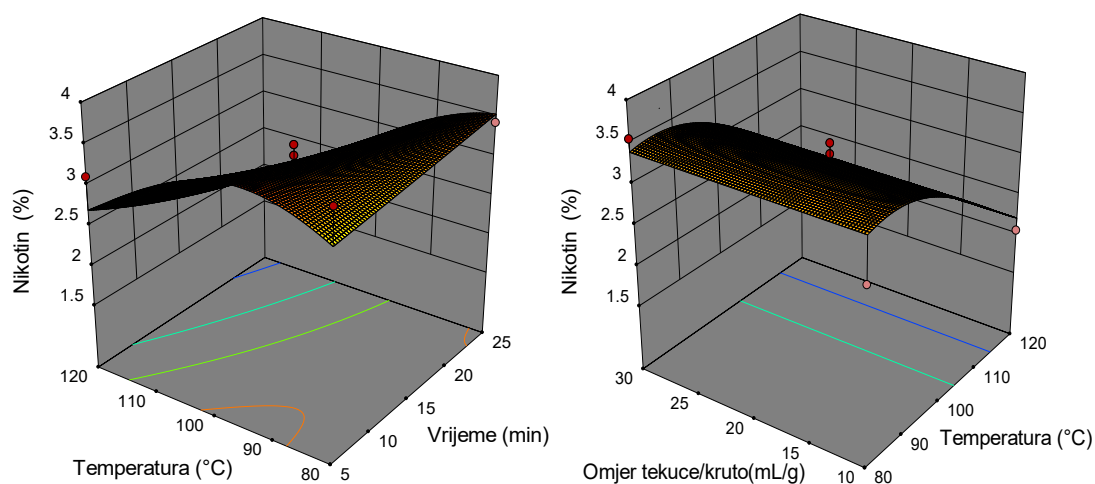
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0238	9	0,0026	3,78	0,0468
$X_1$ -Temperatura	0,0049	1	0,0049	6,93	0,0338
$X_2$ -Vrijeme	0,0039	1	0,0039	5,54	0,0508
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,0006	1	0,0006	0,8412	0,3896
$X_1X_2$	0,0032	1	0,0032	4,58	0,0696
$X_1X_3$	0,0014	1	0,0014	2,04	0,1965
$X_2X_3$	0,0000	1	0,0000	0,0206	0,8899
$X_1^2$	0,0060	1	0,0060	8,55	0,0222
$X_2^2$	0,0019	1	0,0019	2,69	0,1447
$X_3^2$	0,0021	1	0,0021	2,99	0,1273
<b>Ostatak</b>	0,0049	7	0,0007		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0027	3	0,0009	1,65	0,3137
<b>Pogreška</b>	0,0022	4	0,0005		
<b>Ukupno</b>	0,0288	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,829				



**Slika 32** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **list duhana**

**Tablica 47** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

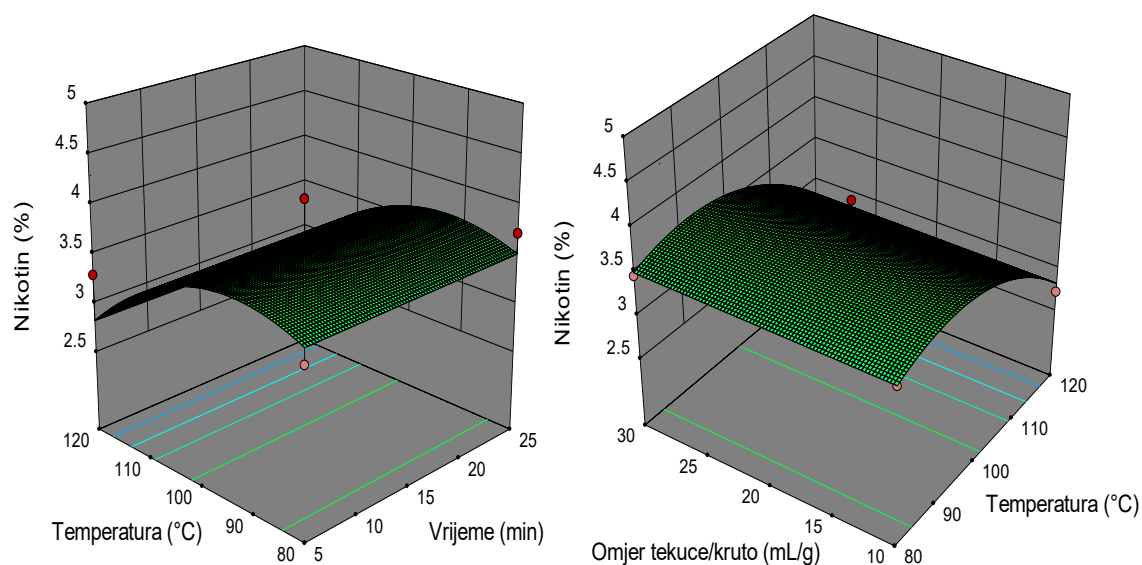
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	4,24	9	0,4712	10,88	0,0024
$X_1$ -Temperatura	2,41	1	2,41	55,72	0,0001
$X_2$ -Vrijeme	0,4943	1	0,4943	11,41	0,0118
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,1178	1	0,1178	2,72	0,1431
$X_1X_2$	0,2242	1	0,2242	5,18	0,0570
$X_1X_3$	0,1152	1	0,1152	2,66	0,1469
$X_2X_3$	0,2015	1	0,2015	4,65	0,0679
$X_1^2$	0,3381	1	0,3381	7,80	0,0268
$X_2^2$	0,2595	1	0,2595	5,99	0,0443
$X_3^2$	0,1025	1	0,1025	2,37	0,1679
<b>Ostatak</b>	0,3032	7	0,0433		
<b>Nedostatak modela</b>	0,1652	3	0,0551	1,60	0,3232
<b>Pogreška</b>	0,1380	4	0,0345		
<b>Ukupno</b>	4,54	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,933	



**Slika 33** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **refabrikat**

**Tablica 48** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

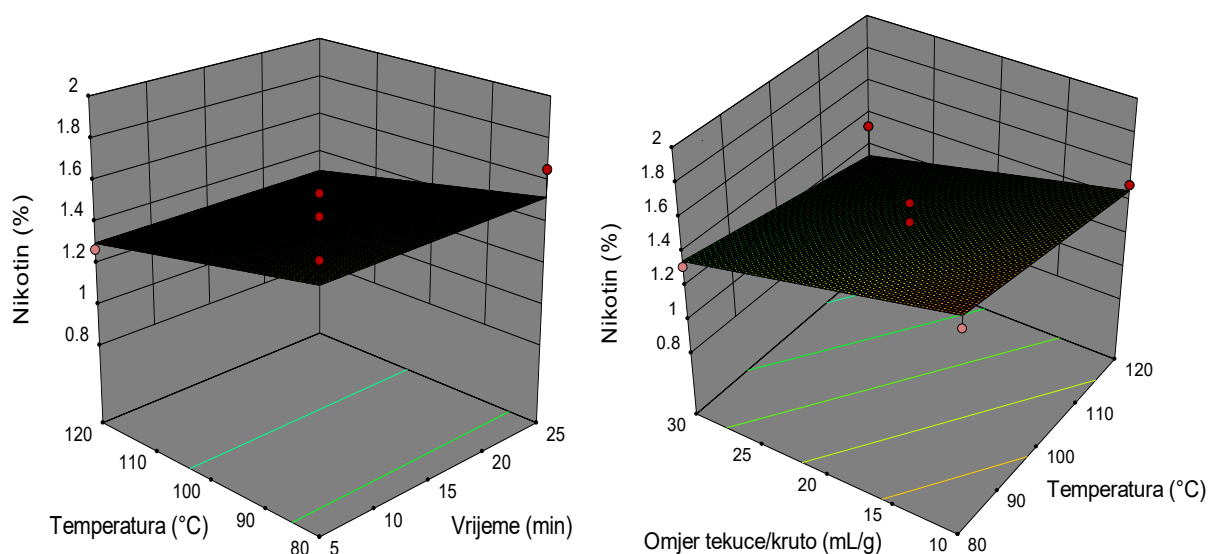
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	3,94	9	0,4374	4,13	0,0374
$X_1$ -Temperatura	0,9400	1	0,9400	8,87	0,0205
$X_2$ -Vrijeme	0,2427	1	0,2427	2,29	0,1739
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,0403	1	0,0403	0,3809	0,5567
$X_1X_2$	0,2533	1	0,2533	2,39	0,1659
$X_1X_3$	0,0007	1	0,0007	0,0068	0,9364
$X_2X_3$	1,17	1	1,17	11,08	0,0126
$X_1^2$	0,9281	1	0,9281	8,76	0,0211
$X_2^2$	0,3634	1	0,3634	3,43	0,1064
$X_3^2$	0,0613	1	0,0613	0,5786	0,4717
<b>Ostatak</b>	0,7415	7	0,1059		
<b>Nedostatak modela</b>	0,2084	3	0,0695	0,5212	0,6903
<b>Pogreška</b>	0,5331	4	0,1333		
<b>Ukupno</b>	4,68	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,842	



**Slika 34** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **duhansku prašinu**

**Tablica 49** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebzo**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,5816	9	0,0646	4,43	0,0313
$X_1$ -Temperatura	0,0970	1	0,0970	6,65	0,0366
$X_2$ -Vrijeme	0,0038	1	0,0038	0,2592	0,6263
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,2201	1	0,2201	15,09	0,0060
$X_1X_2$	0,0007	1	0,0007	0,0496	0,8301
$X_1X_3$	0,0035	1	0,0035	0,2377	0,6407
$X_2X_3$	0,2398	1	0,2398	16,43	0,0048
$X_1^2$	0,0113	1	0,0113	0,7739	0,4082
$X_2^2$	0,0022	1	0,0022	0,1526	0,7076
$X_3^2$	0,0041	1	0,0041	0,2827	0,6114
Ostatak	0,1021	7	0,0146		
Nedostatak modela	0,0744	3	0,0248	3,57	0,1251
Pogreška	0,0277	4	0,0069		
Ukupno	0,6837	16			
$R^2$				0,851	



**Slika 35** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima za **rebzo**

**Tablica 50** Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog i trećeg reda nakon implementacije BBD pri **ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima**

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda za iskorištenje i sadržaj nikotina te trećeg reda za sadržaj klorogenske kiseline
<b>List</b>	
Iskorištenje (Y <sub>1</sub> )	$45,28 - 7,21X_2 + 8,58X_1^2 + 7,29X_1X_2 - 9,27X_2X_3$
Klorogenska kiselina (Y <sub>2</sub> )	$0,9371 + 0,2744X_1 + 0,2812X_2 - 0,3088X_3 - 0,0982X_1^2 - 0,0535X_3^2 - 0,1937X_1X_2 - 0,1361X_1X_3 - 0,1743X_1^2X_2 + 0,5335X_1^2X_3 - 0,5527X_1X_2^2$
Nikotin (1/Y <sub>3</sub> )	$0,20 - 0,043X_1 + 0,033X_3 + 0,082X_1^2 - 0,07X_2^2 + 0,10X_3^2 + 0,083X_1X_3 - 0,032X_2X_3 - 0,17X_1^2X_3 + 0,063X_1X_2^2$
<b>Refabrikat</b>	
Iskorištenje (Y <sub>4</sub> )	$48 + 6,69X_1 + 3,51X_2 + 7,69X_1X_2$
Klorogenska kiselina (Y <sub>5</sub> )	$0,37 - 0,067X_1 + 0,078X_2 - 0,063X_1X_2 - 0,19X_1^2X_2$
Nikotin (Y <sub>6</sub> )	$0,32 - 0,078X_1 + 0,035X_2 + 0,054X_1^2 + 0,047X_1X_2$
<b>Duhanska prašina</b>	
Iskorištenje (Y <sub>7</sub> )	$0,026 - 2,498 \times 10^{-3}X_1 - 2,534 \times 10^{-3}X_3 - 3,735X_1^2 + 2,772 \times 10^{-3}X_2X_3$
Klorogenska kiselina (Y <sub>8</sub> )	$0,92 - 0,29X_2 - 0,25X_1^2 - 0,19X_2^2 + 0,36X_1^2X_2 + 0,34X_1^2X_3$
Nikotin (Y <sub>9</sub> )	$3,61 - 0,34X_1 - 0,45X_1^2 - 0,54X_2X_3$
<b>Rebro</b>	
Iskorištenje (Y <sub>10</sub> )	$50,49 + 2,50X_1 + 4,84X_3 - 3,85X_2^2$
Klorogenska kiselina (Y <sub>11</sub> ) <sup>3</sup>	$7,484 \times 10^{-3} - 0,0032X_3 - 0,0062X_1^2 + 0,0037X_2^2 + 0,0028X_3^2 + 0,0014X_2X_3 - 0,0023X_1^2X_2 + 0,0068X_1^2X_3$
Nikotin (Y <sub>12</sub> )	$1,41 - 0,11X_1 - 0,17X_3 + 0,24X_1X_3$



#### 4.4. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA SWE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG OTPADA

**Tablica 51** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima lista duhana dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	150	5	20	64,850	1,969	1,520	2,300	8,440	83,696
2.	250	5	20	31,182	4,311	0,094	Nd	14,339	93,274
3.	150	25	20	61,731	2,150	1,360	2,080	9,261	86,107
4.	250	25	20	30,470	3,640	0,086	Nd	17,320	93,750
5.	150	15	10	72,540	1,889	1,090	1,460	7,109	83,729
6.	250	15	10	31,261	3,901	0,055	Nd	13,884	94,769
7.	150	15	30	68,761	1,944	1,270	2,140	8,469	84,715
8.	250	15	30	39,82	3,279	0,078	Nd	17,600	94,124
9.	200	5	10	58,870	2,332	0,936	0,371	12,080	94,429
10.	200	25	10	45,750	2,854	0,394	Nd	13,192	94,633
11.	200	5	30	64,110	2,161	1,050	0,577	14,110	95,143
12.	200	25	30	50,920	2,650	0,524	Nd	14,568	93,954
13.	200	15	20	54,191	2,560	0,736	0,119	13,930	94,327
14.	200	15	20	50,774	2,721	0,721	0,087	13,082	94,497
15.	200	15	20	53,885	2,569	0,656	0,064	13,192	94,429
16.	200	15	20	47,320	2,919	0,725	0,110	15,340	94,395
17.	200	15	20	44,510	3,080	0,828	0,126	15,489	94,633
nd- nije detektiran									

**Tablica 52** Udjeli ukupnih šećera i degradacijskih produkata u ekstraktima lista duhana dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Ukupni šećeri (%)	Nikotinska kiselina (%)	Nikotinamid (%)	3,4-DHBA (%)	5-HMF (%)	Furfural (%)	5-MF (%)
1.	150	5	20	60,599	0,086	0,130	0,120	0,0643	0,066	0,050
2.	250	5	20	12,070	0,534	0,463	0,862	1,45	0,615	0,330
3.	150	25	20	53,911	0,104	0,146	0,257	0,292	0,148	0,054
4.	250	25	20	3,070	0,513	0,389	0,519	0,265	0,190	0,223
5.	150	15	10	54,272	0,078	0,095	0,133	0,166	0,035	0,023
6.	250	15	10	1,190	0,508	0,306	0,526	0,752	0,210	0,148
7.	150	15	30	43,040	0,084	0,130	0,182	0,138	0,067	0,049
8.	250	15	30	3,539	0,386	0,319	0,497	0,808	0,286	0,240
9.	200	5	10	25,302	0,168	0,113	0,301	1,050	0,191	0,127
10.	200	25	10	9,848	0,272	0,149	0,468	1,510	0,325	0,272
11.	200	5	30	31,802	0,148	0,139	0,305	1,120	0,192	0,156
12.	200	25	30	22,001	0,243	0,230	0,531	2,290	0,503	0,338
13.	200	15	20	25,912	0,231	0,168	0,425	1,650	0,362	0,239
14.	200	15	20	29,890	0,244	0,192	0,494	1,930	0,422	0,295
15.	200	15	20	24,720	0,217	0,177	0,458	1,920	0,360	0,255
16.	200	15	20	33,761	0,238	0,184	0,496	2,070	0,440	0,298
17.	200	15	20	36,551	0,262	0,198	0,509	2,120	0,511	0,320

**Tablica 53** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima **refabrikata** dobivenih primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	150	5	20	45,058	2,660	0,507	0,868	8,315	77,453
2.	250	5	20	42,927	4,432	0,096	Nd	11,546	94,014
3.	150	25	20	48,030	4,611	0,411	0,699	7,700	67,310
4.	250	25	20	40,510	2,991	0,065	0	12,238	95,178
5.	150	15	10	37,22	3,351	0,412	0,784	9,649	81,709
6.	250	15	10	35,063	5,140	0,072	Nd	12,803	92,784
7.	150	15	30	49,371	3,252	0,451	0,874	8,982	75,657
8.	250	15	30	31,951	4,241	0,096	Nd	13,623	93,282
9.	200	5	10	41,204	4,050	0,424	0,259	12,085	93,249
10.	200	25	10	43,701	4,254	0,100	Nd	10,238	89,924
11.	200	5	30	51,530	3,060	0,397	0,408	10,469	88,294
12.	200	25	30	49,702	3,942	0,217	Nd	12,623	94,047
13.	200	15	20	39,614	3,201	0,305	0,077	10,085	87,895
14.	200	15	20	38,793	3,711	0,243	0,064	10,418	89,957
15.	200	15	20	40,810	3,240	0,254	0,129	9,854	85,101
16.	200	15	20	44,794	3,241	0,246	0,115	10,367	90,622
17.	200	15	20	38,570	3,210	0,233	0,052	10,444	93,748
nd- nije detektiran									

**Tablica 54** Udjeli ukupnih šećera i degradacijskih produkata u ekstraktima refabrikata dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruće (ml/g)	Ukupni šećeri (%)	Nikotinska kiselina (%)	Nikotinamid (%)	3,4-DHBA (%)	5-HMF (%)	Furfural (%)	5-MF (%)
1.	150	5	20	15,856	0,178	0,242	0,172	0,030	0,088	0,048
2.	250	5	20	1,471	0,668	0,394	1,016	0,077	0,157	0,190
3.	150	25	20	23,002	0,319	0,369	0,358	0,049	0,104	0,0554
4.	250	25	20	0,220	0,484	0,389	0,744	0,030	0,129	0,118
5.	150	15	10	21,981	0,227	0,255	0,216	0,039	0,0626	0,032
6.	250	15	10	0,150	0,846	0,380	1,249	0,046	0,0933	0,128
7.	150	15	30	20,414	0,231	0,297	0,252	0,039	0,0929	0,051
8.	250	15	30	0,6313	0,620	0,400	0,953	0,049	0,146	0,164
9.	200	5	10	15,113	0,450	0,286	0,422	0,076	0,087	0,149
10.	200	25	10	5,172	0,513	0,311	0,701	0,075	0,098	0,191
11.	200	5	30	18,410	0,316	0,250	0,345	0,059	0,105	0,129
12.	200	25	30	10,480	0,472	0,358	0,671	0,103	0,149	0,241
13.	200	15	20	14,026	0,369	0,266	0,513	0,065	0,127	0,211
14.	200	15	20	12,430	0,433	0,308	0,554	0,091	0,146	0,228
15.	200	15	20	14,884	0,370	0,276	0,510	0,088	0,137	0,203
16.	200	15	20	11,465	0,388	0,281	0,467	0,084	0,133	0,289
17.	200	15	20	12,021	0,376	0,276	0,486	0,081	0,135	0,234

**Tablica 55** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima duhanske prašine dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	150	5	20	46,345	1,503	0,291	0,696	6,879	56,122
2.	250	5	20	41,234	2,281	0,059	Nd	9,649	93,808
3.	150	25	20	42,440	2,310	0,225	0,473	7,008	66,596
4.	250	25	20	40,940	1,799	0,058	Nd	8,597	93,489
5.	150	15	10	37,550	2,721	0,308	0,559	7,213	69,002
6.	250	15	10	32,948	2,750	0,033	Nd	10,418	92,640
7.	150	15	30	48,361	2,147	0,266	0,548	6,418	68,294
8.	250	15	30	39,691	3,219	0,110	Nd	13,008	93,701
9.	200	5	10	40,532	2,434	0,190	0,120	8,751	85,032
10.	200	25	10	42,553	2,950	0,059	Nd	9,238	86,306
11.	200	5	30	53,492	2,174	0,176	0,236	8,264	83,900
12.	200	25	30	41,991	2,363	0,116	Nd	9,110	91,260
13.	200	15	20	48,399	2,692	0,136	0,031	10,803	94,055
14.	200	15	20	45,854	2,801	0,146	0,036	9,444	92,180
15.	200	15	20	48,106	2,644	0,141	0,023	10,495	94,126
16.	200	15	20	48,710	2,454	0,105	0,021	11,264	93,701
17.	200	15	20	47,920	2,780	0,128	0,019	10,367	93,418
nd-nije detektiran									

**Tablica 56** Udjeli ukupnih šećera i degradacijskih produkata u ekstraktima duhanske prašine dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruće (ml/g)	Ukupni šećeri (%)	Nikotinska kiselina (%)	Nikotinamid (%)	3,4-DHBA (%)	5-HMF (%)	Furfural (%)	5-MF (%)
1.	150	5	20	14,765	0,150	0,212	0,162	0,0245	0,0878	0,0346
2.	250	5	20	1,144	0,360	0,255	0,637	0,0576	0,124	0,103
3.	150	25	20	26,501	0,163	0,215	0,212	0,0374	0,0916	0,0638
4.	250	25	20	0,180	0,422	0,290	0,620	0,0339	0,104	0,0987
5.	150	15	10	25,854	0,173	0,212	0,177	0,0313	0,0567	0,0391
6.	250	15	10	0,260	0,481	0,244	0,799	0,0485	0,0718	0,0779
7.	150	15	30	19,942	0,154	0,214	0,209	0,0300	0,0904	0,0682
8.	250	15	30	0,5990	0,511	0,368	0,922	0,0572	0,154	0,128
9.	200	5	10	19,132	0,276	0,181	0,369	0,0623	0,0812	0,101
10.	200	25	10	6,198	0,311	0,176	0,496	0,0707	0,0880	0,115
11.	200	5	30	17,130	0,216	0,204	0,324	0,0546	0,105	0,101
12.	200	25	30	9,270	0,243	0,206	0,439	0,0802	0,129	0,152
13.	200	15	20	14,351	0,317	0,251	0,521	0,0889	0,155	0,151
14.	200	15	20	12,354	0,326	0,260	0,528	0,0894	0,157	0,154
15.	200	15	20	13,099	0,310	0,242	0,511	0,0833	0,148	0,148
16.	200	15	20	14,310	0,276	0,227	0,444	0,0803	0,134	0,128
17.	200	15	20	14,491	0,327	0,258	0,503	0,0967	0,157	0,152

**Tablica 57** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima rebra dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD zajedno s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (ml/g)	Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
1.	150	5	20	60,640	0,907	0,123	0,116	6,649	28,585
2.	250	5	20	44,101	1,968	0,077	Nd	11,572	94,139
3.	150	25	20	55,383	1,233	0,098	0,107	4,521	42,927
4.	250	25	20	38,930	1,021	0,065	Nd	11,418	93,255
5.	150	15	10	54,047	1,301	0,100	0,137	4,264	39,915
6.	250	15	10	40,252	1,774	0,046	Nd	9,085	92,960
7.	150	15	30	58,211	1,104	0,118	0,121	2,059	15,062
8.	250	15	30	44,498	1,710	0,072	Nd	10,136	94,270
9.	200	5	10	49,349	1,482	0,076	0,034	7,828	81,663
10.	200	25	10	47,146	1,571	0,073	Nd	7,546	77,177
11.	200	5	30	56,871	1,251	0,115	0,079	7,392	73,346
12.	200	25	30	51,160	1,470	0,101	Nd	9,828	90,570
13.	200	15	20	57,940	1,298	0,092	Nd	6,777	78,356
14.	200	15	20	47,584	1,520	0,117	Nd	9,431	86,149
15.	200	15	20	52,862	1,334	0,093	Nd	8,469	82,187
16.	200	15	20	49,811	1,412	0,092	nd	7,469	77,472
17.	200	15	20	52,270	1,399	0,089	nd	9,315	91,421
nd-nije detektiran									

**Tablica 58** Udjeli ukupnih šećera i degradacijskih produkata u ekstraktima rebra dobivenim primjenom ekstrakcije supkritičnom vodom prema BBD

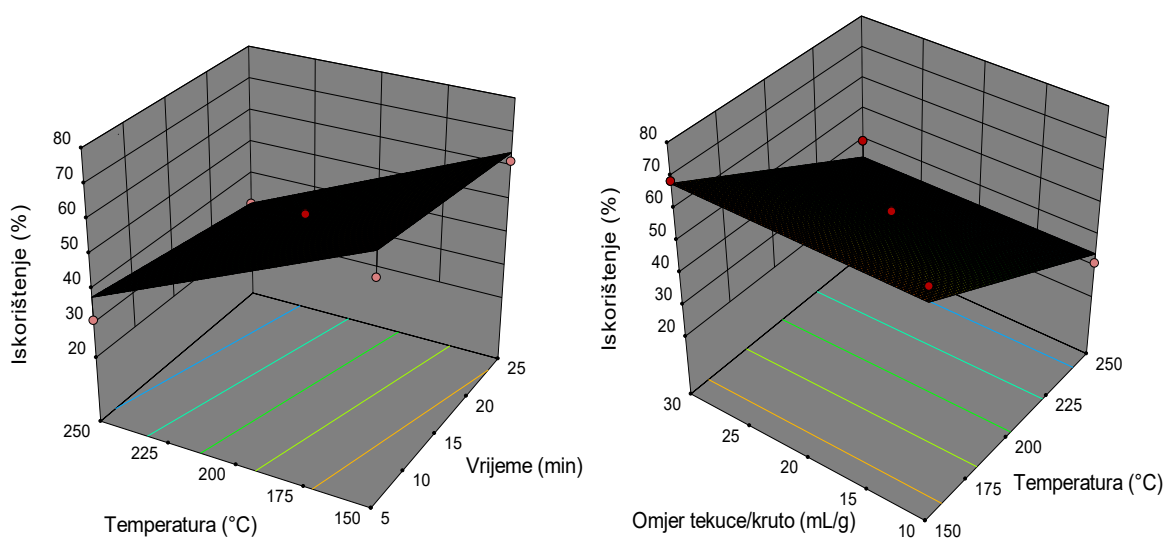
Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruće (ml/g)	Ukupni šećeri (%)	Nikotinska kiselina (%)	Nikotinamid (%)	3,4-DHBA (%)	5-HMF (%)	Furfural (%)	5-MF (%)
1.	150	5	20	25,266	0,087	0,105	0,118	0,044	0,068	0,048
2.	250	5	20	2,187	0,546	0,315	0,644	0,219	0,229	0,190
3.	150	25	20	20,211	0,123	0,115	0,239	0,084	0,079	0,055
4.	250	25	20	0,227	0,384	0,176	0,368	0,053	0,122	0,118
5.	150	15	10	20,801	0,141	0,096	0,201	0,047	0,048	0,032
6.	250	15	10	0,250	0,602	0,202	0,524	0,095	0,071	0,128
7.	150	15	30	20,952	0,100	0,113	0,178	0,065	0,071	0,051
8.	250	15	30	0,710	0,529	0,258	0,553	0,137	0,166	0,164
9.	200	5	10	16,532	0,280	0,113	0,334	0,156	0,163	0,149
10.	200	25	10	5,020	0,417	0,139	0,524	0,298	0,282	0,191
11.	200	5	30	19,909	0,199	0,135	0,311	0,260	0,142	0,129
12.	200	25	30	11,956	0,320	0,179	0,538	0,360	0,313	0,241
13.	200	15	20	10,365	0,282	0,164	0,415	0,274	0,298	0,211
14.	200	15	20	12,890	0,338	0,182	0,502	0,318	0,305	0,228
15.	200	15	20	11,590	0,302	0,175	0,446	0,256	0,420	0,203
16.	200	15	20	12,881	0,323	0,161	0,472	0,352	0,315	0,289
17.	200	15	20	9,201	0,323	0,190	0,482	0,322	0,302	0,234



#### 4.4.1. Statistička analiza parametara SWE

**Tablica 59** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

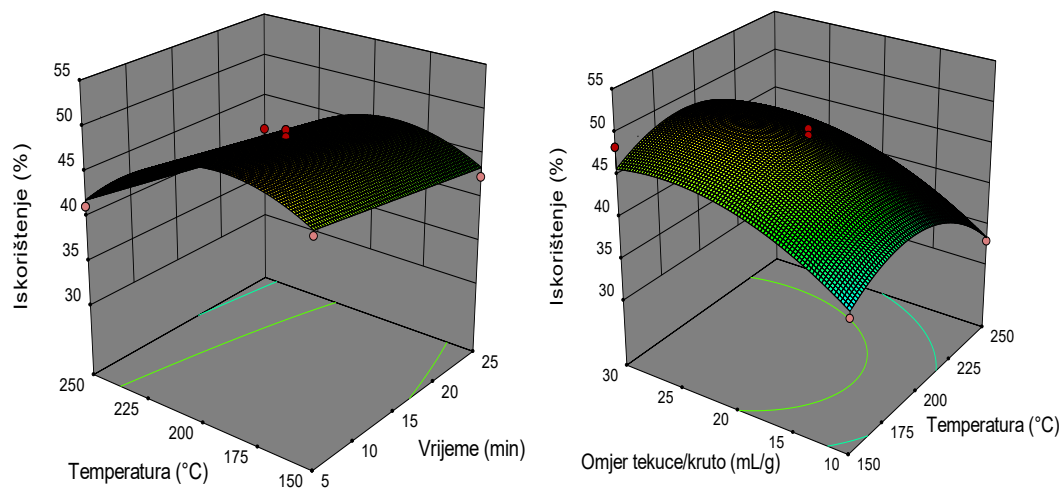
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	2609,12	9	289,90	14,39	0,0010
X <sub>1</sub> -Temperatura	2283,87	1	2283,87	113,34	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Vrijeme	113,48	1	113,48	5,63	0,0494
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	28,73	1	28,73	1,43	0,2714
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1,45	1	1,45	0,0721	0,7961
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	37,95	1	37,95	1,88	0,2123
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0009	1	0,0009	0,0000	0,9949
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	25,24	1	25,24	1,25	0,3000
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1,66	1	1,66	0,0825	0,7823
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	122,97	1	122,97	6,10	0,0428
<b>Ostatak</b>	141,05	7	20,15		
<b>Nedostatak modela</b>	70,61	3	23,54	1,34	0,3804
<b>Pogreška</b>	70,44	4	17,61		
<b>Ukupno</b>	2750,17	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,949				



**Slika 36** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **list duhana**

**Tablica 60** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

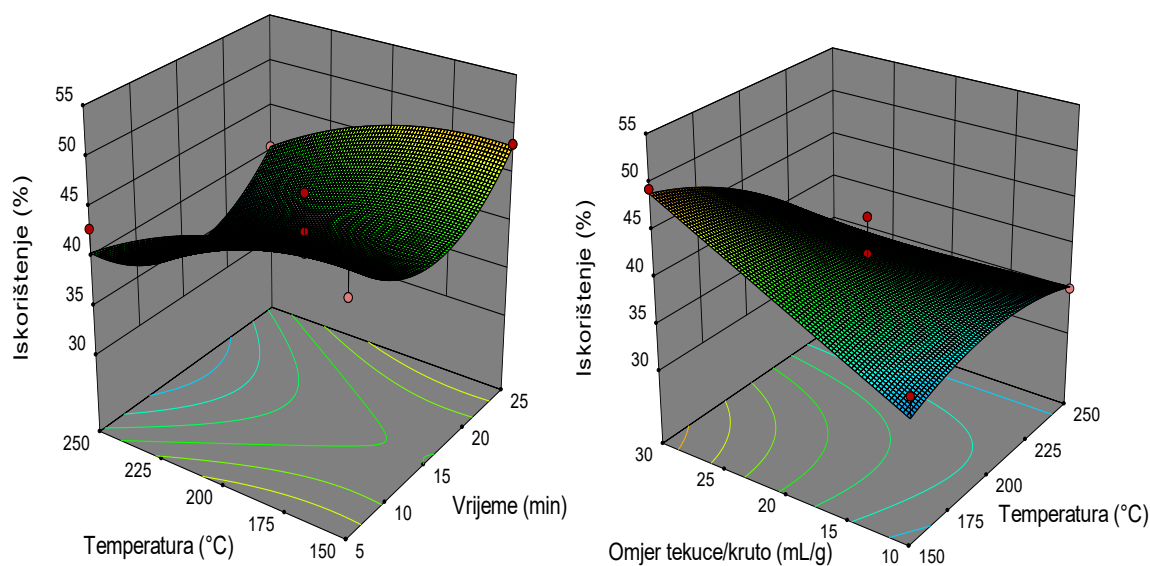
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	394,19	9	43,80	17,60	0,0005
$X_1$ -Temperatura	49,45	1	49,45	19,87	0,0029
$X_2$ -Vrijeme	23,39	1	23,39	9,40	0,0182
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	112,13	1	112,13	45,05	0,0003
$X_1X_2$	3,28	1	3,28	1,32	0,2890
$X_1X_3$	4,14	1	4,14	1,66	0,2381
$X_2X_3$	45,70	1	45,70	18,36	0,0036
$X_1^2$	106,50	1	106,50	42,79	0,0003
$X_2^2$	0,0030	1	0,0030	0,0012	0,9732
$X_3^2$	41,23	1	41,23	16,57	0,0047
<b>Ostatak</b>	17,42	7	2,49		
<b>Nedostatak modela</b>	12,33	3	4,11	3,23	0,1437
<b>Pogreška</b>	5,09	4	1,27		
<b>Ukupno</b>	411,62	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,958				



**Slika 37** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **refabrikat**

**Tablica 61** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje ekstrakcije** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

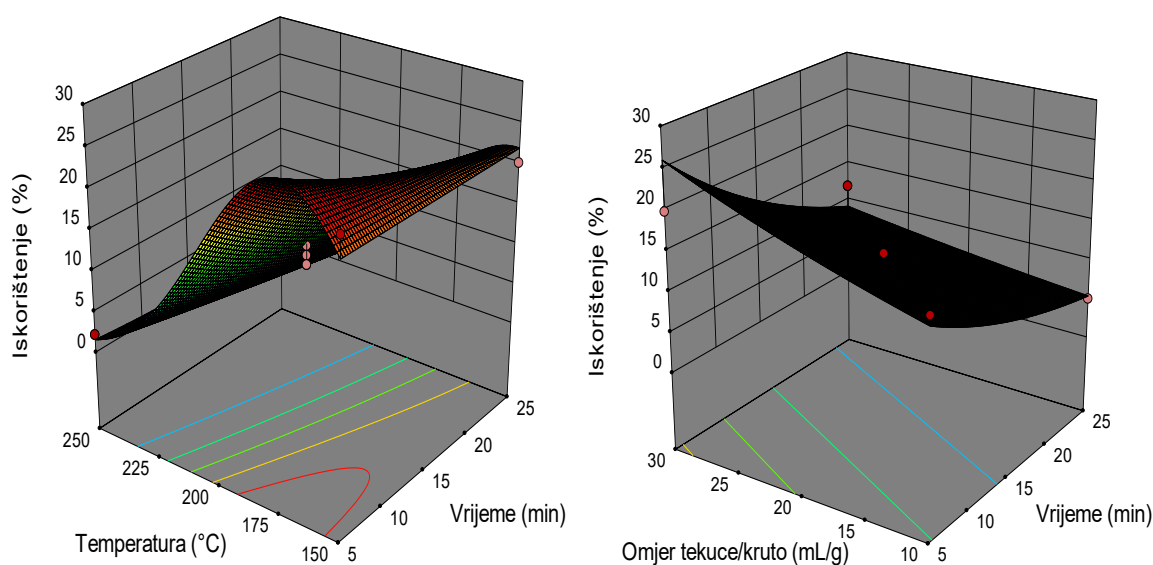
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	419,77	9	46,64	7,28	0,0079
$X_1$ -Temperatura	106,65	1	106,65	16,66	0,0047
$X_2$ -Vrijeme	0,1861	1	0,1861	0,0291	0,8695
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	80,58	1	80,58	12,58	0,0094
$X_1X_2$	7,26	1	7,26	1,13	0,3222
$X_1X_3$	58,37	1	58,37	9,12	0,0194
$X_2X_3$	4,69	1	4,69	0,7320	0,4206
$X_1^2$	21,50	1	21,50	3,36	0,1096
$X_2^2$	145,48	1	145,48	22,72	0,0020
$X_3^2$	0,0831	1	0,0831	0,0130	0,9125
<b>Ostatak</b>	44,82	7	6,40		
<b>Nedostatak modela</b>	18,88	3	6,29	0,9707	0,4892
<b>Pogreška</b>	25,94	4	6,49		
<b>Ukupno</b>	464,59	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,904	



**Slika 38** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **duhansku prašinu**

**Tablica 62** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje** ekstrakcije pri ekstrakciji supkričnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

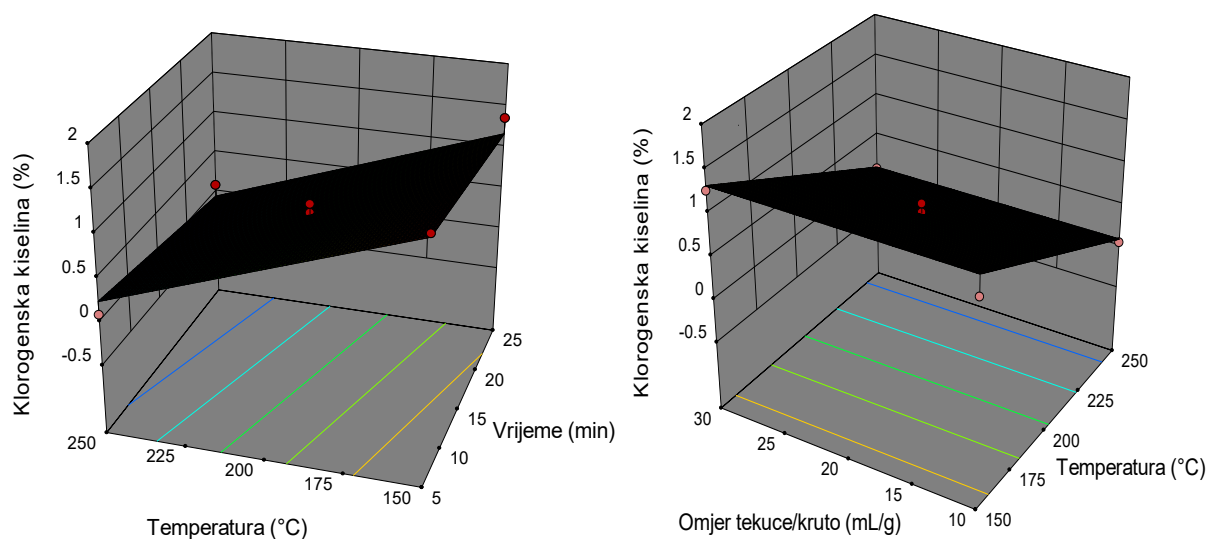
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	574,54	9	63,84	6,80	0,0096
X <sub>1</sub> -Temperatura	457,53	1	457,53	48,76	0,0002
X <sub>2</sub> -Vrijeme	42,04	1	42,04	4,48	0,0721
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	49,70	1	49,70	5,30	0,0549
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0020	1	0,0020	0,0002	0,9887
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0020	1	0,0020	0,0002	0,9887
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	3,08	1	3,08	0,3282	0,5846
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	18,58	1	18,58	1,98	0,2022
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,2052	1	0,2052	0,0219	0,8866
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2,25	1	2,25	0,2396	0,6395
<b>Ostatak</b>	65,68	7	9,38		
<b>Nedostatak modela</b>	5,76	3	1,92	0,1283	0,9384
<b>Pogreška</b>	59,92	4	14,98		
<b>Ukupno</b>	640,22	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,897	



**Slika 39** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkričnom vodom za **rebro**

**Tablica 63** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

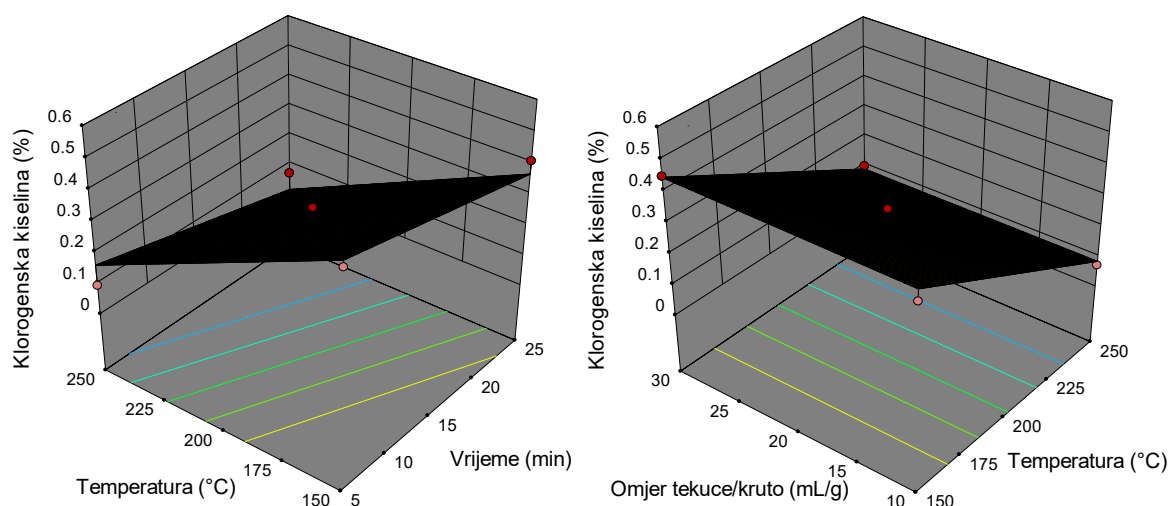
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	3,31	9	0,3676	17,80	0,0005
X <sub>1</sub> -Temperatura	3,03	1	3,03	146,91	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,1908	1	0,1908	9,24	0,0189
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0250	1	0,0250	1,21	0,3075
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0058	1	0,0058	0,2811	0,6124
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0061	1	0,0061	0,2968	0,6028
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0001	1	0,0001	0,0031	0,9572
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0053	1	0,0053	0,2565	0,6281
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0191	1	0,0191	0,9253	0,3681
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,0234	1	0,0234	1,13	0,3223
<b>Ostatak</b>	0,1446	7	0,0207		
<b>Nedostatak modela</b>	0,1294	3	0,0431	11,37	0,0199
<b>Pogreška</b>	0,0152	4	0,0038		
<b>Ukupno</b>	3,45	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,958	



**Slika 40** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **list duhana**

**Tablica 64** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

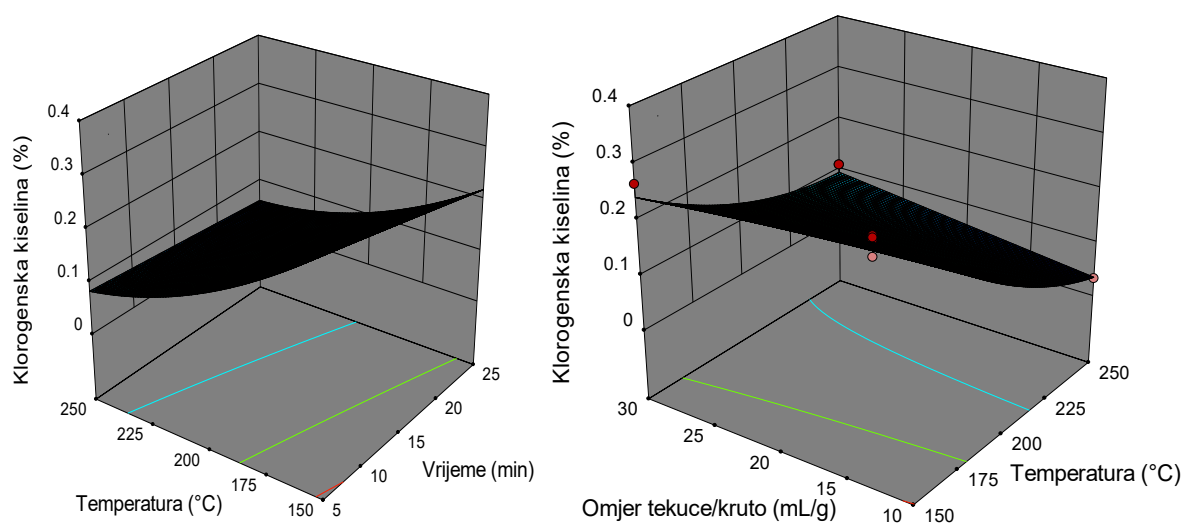
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,3248	9	0,0361	11,70	0,0019
$X_1$ -Temperatura	0,2637	1	0,2637	85,51	< 0,0001
$X_2$ -Vrijeme	0,0497	1	0,0497	16,11	0,0051
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,0029	1	0,0029	0,9464	0,3630
$X_1X_2$	0,0011	1	0,0011	0,3489	0,5733
$X_1X_3$	0,0001	1	0,0001	0,0187	0,8950
$X_2X_3$	0,0052	1	0,0052	1,68	0,2359
$X_1^2$	0,0002	1	0,0002	0,0604	0,8129
$X_2^2$	0,0017	1	0,0017	0,5599	0,4787
$X_3^2$	0,0003	1	0,0003	0,0885	0,7748
<b>Ostatak</b>	0,0216	7	0,0031		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0184	3	0,0061	7,65	0,0392
<b>Pogreška</b>	0,0032	4	0,0008		
<b>Ukupno</b>	0,3464	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,938	



**Slika 41** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **refabrikat**

**Tablica 65** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

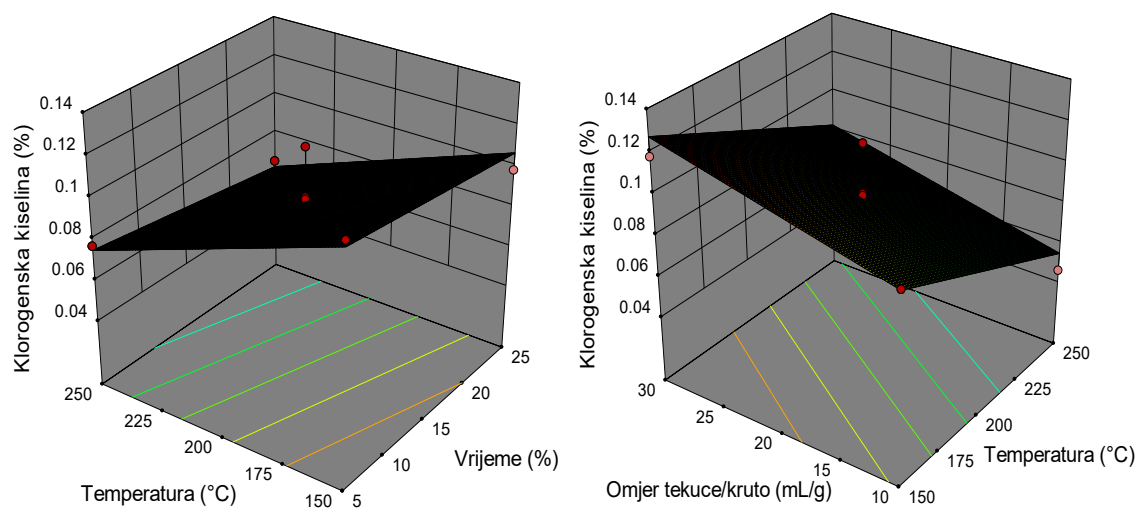
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,1075	9	0,0119	27,44	0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0861	1	0,0861	197,74	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,0084	1	0,0084	19,36	0,0032
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0008	1	0,0008	1,76	0,2261
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0010	1	0,0010	2,35	0,1695
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0035	1	0,0035	8,11	0,0248
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0013	1	0,0013	2,94	0,1303
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0054	1	0,0054	12,35	0,0098
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0003	1	0,0003	0,6909	0,4333
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,0007	1	0,0007	1,53	0,2560
<b>Ostatak</b>	0,0030	7	0,0004		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0020	3	0,0007	2,70	0,1804
<b>Pogreška</b>	0,0010	4	0,0003		
<b>Ukupno</b>	0,1105	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,972				



**Slika 42** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **duhansku prašinu**

**Tablica 66** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj klorogenske kiseline** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0064	9	0,0007	7,12	0,0085
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0040	1	0,0040	40,60	0,0004
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,0004	1	0,0004	3,60	0,0998
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0015	1	0,0015	15,39	0,0057
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0000	1	0,0000	0,3739	0,5602
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0000	1	0,0000	0,1608	0,7004
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0000	1	0,0000	0,3322	0,5824
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0002	1	0,0002	1,85	0,2157
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	2,746x10 <sup>-6</sup>	1	2,746x10 <sup>-6</sup>	0,0276	0,8728
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,0002	1	0,0002	1,60	0,2469
Ostatak	0,0007	7	0,0001		
Nedostatak modela	0,0002	3	0,0001	0,4374	0,7386
Pogreška	0,0005	4	0,0001		
Ukupno	0,0071	16			
R <sup>2</sup>				0,902	

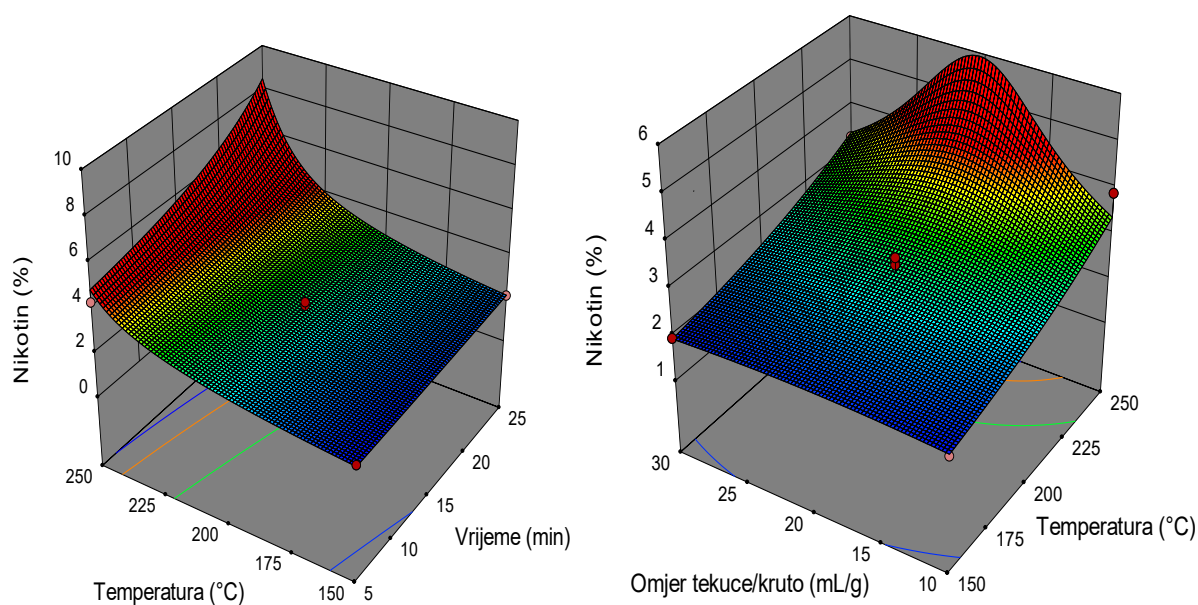


**Slika 43** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj klorogenske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **rebro**



**Tablica 67** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **list duhana**

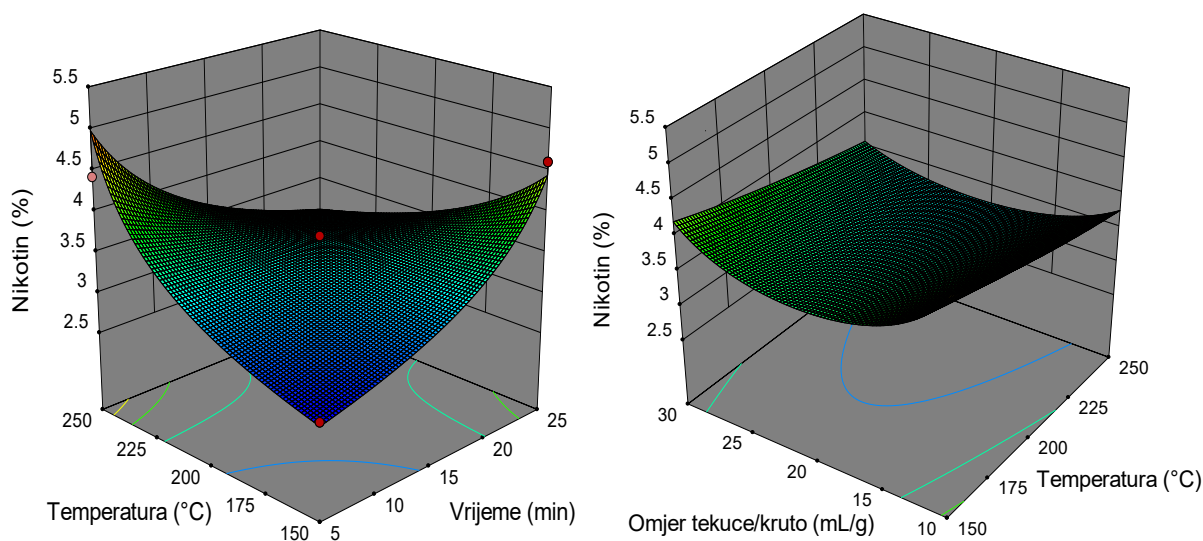
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0286	9	0,0032	17,38	0,0005
$X_1$ -Temperatura	0,0240	1	0,0240	131,15	< 0,0001
$X_2$ -Vrijeme	0,0013	1	0,0013	7,29	0,0306
$X_3$ -Omjer tekuće/kruto	0,0001	1	0,0001	0,6581	0,4439
$X_1X_2$	0,0004	1	0,0004	2,02	0,1984
$X_1X_3$	0,0001	1	0,0001	0,7006	0,4302
$X_2X_3$	0,0000	1	0,0000	0,1269	0,7322
$X_1^2$	0,0010	1	0,0010	5,68	0,0487
$X_2^2$	0,0000	1	0,0000	0,0865	0,7773
$X_3^2$	0,0014	1	0,0014	7,75	0,0272
<b>Ostatak</b>	0,0013	7	0,0002		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0008	3	0,0003	2,04	0,2512
<b>Pogreška</b>	0,0005	4	0,0001		
<b>Ukupno</b>	0,0299	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,902				



**Slika 44** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **list duhana**

**Tablica 68** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji supkričnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

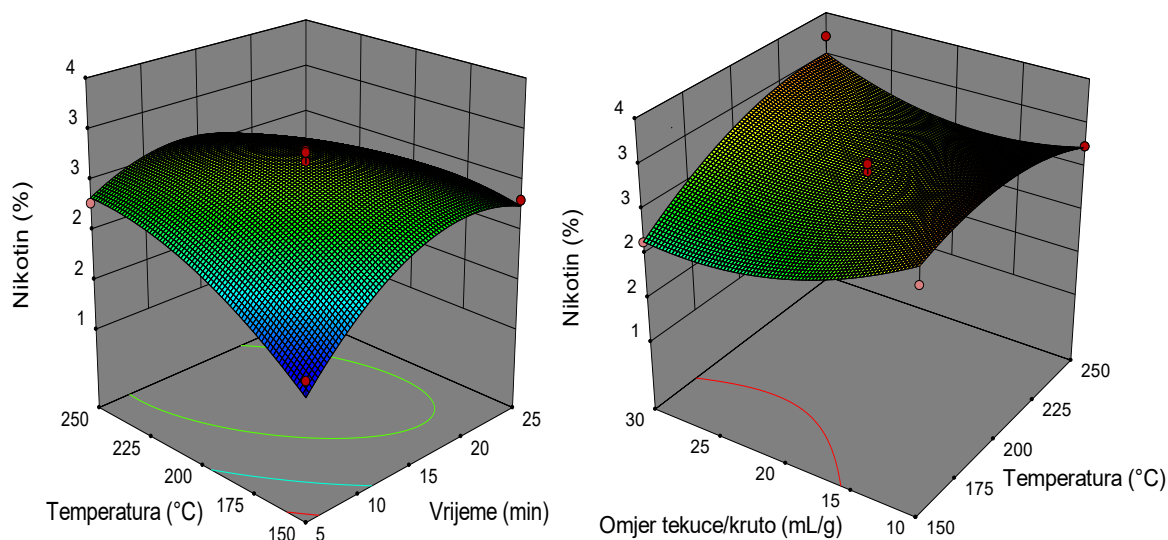
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0022	9	0,0002	9,97	0,0031
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0003	1	0,0003	12,74	0,0091
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,0002	1	0,0002	7,30	0,0306
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0001	1	0,0001	5,11	0,0583
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0012	1	0,0012	48,94	0,0002
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2,598 x10 <sup>-6</sup>	1	2,598 x10 <sup>-6</sup>	0,1073	0,7528
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0001	1	0,0001	2,82	0,1370
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	3,115 x10 <sup>-7</sup>	1	3,115 x10 <sup>-7</sup>	0,0129	0,9129
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1,085E-06	1	1,085E-06	0,0448	0,8384
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,0003	1	0,0003	12,58	0,0094
<b>Ostatak</b>	0,0002	7	0,0000		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0001	3	0,0000	1,29	0,3911
<b>Pogreška</b>	0,0001	4	0,0000		
<b>Ukupno</b>	0,0023	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,923				



**Slika 45** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkričnom vodom za **refabrikat**

**Tablica 69** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji supkritičnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **duhansku prašinu**

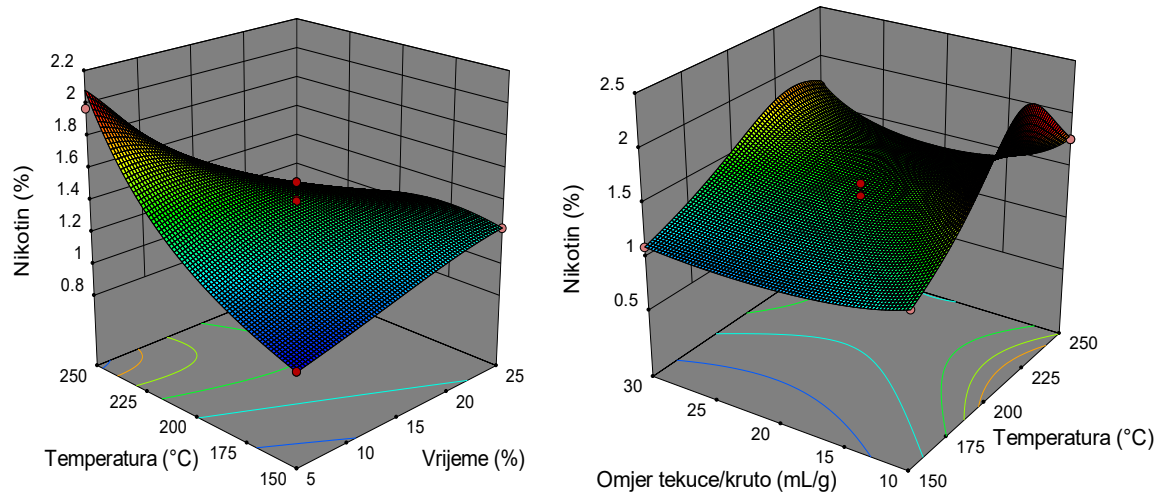
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0645	9	0,0072	33,98	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,0047	1	0,0047	22,28	0,0022
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,0041	1	0,0041	19,34	0,0032
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0012	1	0,0012	5,70	0,0483
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0228	1	0,0228	108,34	< 0,0001
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0012	1	0,0012	5,66	0,0490
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0000	1	0,0000	0,0951	0,7668
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0088	1	0,0088	41,88	0,0003
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0148	1	0,0148	70,36	< 0,0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,0074	1	0,0074	35,02	0,0006
<b>Ostatak</b>	0,0015	7	0,0002		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0011	3	0,0004	4,70	0,0847
<b>Pogreška</b>	0,0003	4	0,0001		
<b>Ukupno</b>	0,0659	16			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,978				



**Slika 46** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkritičnom vodom za **duhansku prašinu**

**Tablica 70** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri ekstrakciji supkričnom vodom polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **rebro**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,47	9	0,1628	43,62	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Temperatura	0,3324	1	0,3324	89,03	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Vrijeme	0,0071	1	0,0071	1,91	0,2099
X <sub>3</sub> -Omjer tekuće/kruto	0,0414	1	0,0414	11,10	0,0126
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,6515	1	0,6515	174,52	< 0,0001
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0191	1	0,0191	5,12	0,0581
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0054	1	0,0054	1,45	0,2677
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,1759	1	0,1759	47,10	0,0002
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,1026	1	0,1026	27,48	0,0012
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,1439	1	0,1439	38,55	0,0004
<b>Ostatak</b>	0,0261	7	0,0037		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0086	3	0,0029	0,6582	0,6192
<b>Pogreška</b>	0,0175	4	0,0044		
<b>Ukupno</b>	1,49	16			
<b>R<sup>2</sup></b>				0,983	



**Slika 47** Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i omjeru tekuće/kruto pri ekstrakciji supkričnom vodom za **rebro**

**Tablica 71** Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD pri **ekstrakciji supkritičnom vodom**

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda za iskorištenje i sadržaj nikotina te trećeg reda za sadržaj klorogenske kiseline
<b>List</b>	
Iskorištenje Ln(Y <sub>1</sub> )	$3,45 - 1,35X_1 - 0,35X_2 + 0,24X_3 - 0,31X_1X_2 + 0,33X_1X_3 - 0,59X_1^2 - 0,50X_3^2$
Klorogenska kiselina (Y <sub>2</sub> )	$0,71 - 0,62X_1 - 0,15X_2$
Nikotin (Y <sub>3</sub> <sup>-3</sup> )	$0,049 - 0,055X_1 - 0,013X_2 + 9,606 \cdot 10^{-3}X_1X_2 + 0,016X_1^2 + 0,018X_3^2$
<b>Refabrikat</b>	
Iskorištenje Ln(Y <sub>4</sub> )	$2,58 - 1,94X_1 - 0,40X_2 + 0,28X_3 - 0,57X_1X_2 + 0,38X_1X_3 - 1,41X_1^2 - 0,20X_3^2$
Klorogenska kiselina (Y <sub>5</sub> )	$0,27 - 0,18X_1 - 0,079X_2$
Nikotin (Y <sub>6</sub> <sup>-3</sup> )	$0,028 - 6,209 \cdot 10^{-3}X_1 - 4,699 \cdot 10^{-3}X_2 + 3,932 \cdot 10^{-3}X_3 + 0,017X_1X_2 - 4,131 \cdot 10^{-3}X_2X_3 - 8,489 \cdot 10^{-3}X_3^2$
<b>Duhanska prašina</b>	
Iskorištenje Ln(Y <sub>7</sub> )	$2,55 - 1,96X_1 - 0,38X_2 + 0,11X_3 - 0,61X_1X_2 + 0,27X_1X_3 + 0,13X_2X_3 - 1,45X_1^2$
Klorogenska kiselina (Y <sub>8</sub> )	$0,13 - 0,10X_1 - 0,032X_2 + 0,016X_1X_2 + 0,030X_1X_3 + 0,018X_2X_3 + 0,036X_1^2$
Nikotin (Y <sub>9</sub> <sup>-3</sup> )	$0,053 - 0,024X_1 - 0,023X_2 + 0,012X_3 + 0,076X_1X_2 - 0,017X_1X_3 + 0,046X_1^2 + 0,059X_2^2 - 0,042X_3^2$
<b>Rebro</b>	
Iskorištenje Ln(Y <sub>10</sub> )	$2,45 - 1,84X_1 - 0,52X_2 + 0,26X_3 - 0,51X_1X_2 + 0,26X_1X_3 - 1,21X_1^2$
Klorogenska kiselina (Y <sub>11</sub> )	$0,091 - 0,22X_1 - 6,688 \cdot 10^{-3}X_2 + 0,014X_3$
Nikotin (Y <sub>12</sub> <sup>-3</sup> )	$0,38 - 0,20X_1 + 0,072X_3 + 0,40X_1X_2 - 0,069X_1X_3 + 0,20X_1^2 + 0,16X_2^2 - 0,18X_3^2$

## 4.5. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA SC-CO<sub>2</sub> EKSTRAKCIJE NA SASTAV EKSTRAKATA DUHANSKOG OTPADA

**Tablica 72** Rezultati ispitivanja utjecaja **vremena** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **list duhana**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	50	30	0,592
2.	200	50	60	0,781
3.	200	50	90	1,844

**Tablica 73** Rezultati ispitivanja utjecaja **vremena** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **refabrikat**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	50	30	0,649
2.	200	50	60	1,329
3.	200	50	90	1,489

**Tablica 74** Rezultati ispitivanja utjecaja **vremena** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **duhansku prašinu**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	50	30	0,026
2.	200	50	60	0,097
3.	200	50	90	0,121

**Tablica 75** Rezultati ispitivanja utjecaja **vremena** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **rebro**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1	200	50	30	0,019
2	200	50	60	0,095
3	200	50	90	0,112

**Tablica 76** Rezultati ispitivanja utjecaja **temperature** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **list duhana**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	40	30	0,595
2.	200	50	30	1,477
3.	200	60	30	1,053

**Tablica 77** Rezultati ispitivanja utjecaja **temperature** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **refabrikat**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	40	30	0,662
2.	200	50	30	0,479
3.	200	60	30	0,506

**Tablica 78** Rezultati ispitivanja utjecaja **temperature** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **duhansku prašinu**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	40	30	0,015
2.	200	50	30	0,016
3.	200	60	30	0,020

**Tablica 79** Rezultati ispitivanja utjecaja **temperature** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **rebro**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	200	40	30	0,017
2.	200	50	30	0,019
3.	200	60	30	0,021

**Tablica 80** Rezultati ispitivanja utjecaja **tlaka** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **list duhana**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	100	40	30	0,178
2.	200	40	30	0,595
3.	300	40	30	0,790

**Tablica 81** Rezultati ispitivanja utjecaja **tlaka** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **refabrikat**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	100	40	30	0,058
2.	200	40	30	0,662
3.	300	40	30	1,150

**Tablica 82** Rezultati ispitivanja utjecaja **tlaka** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **duhansku prašinu**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	100	40	30	0,014
2.	200	40	30	0,015
3.	300	40	30	0,507

**Tablica 83** Rezultati ispitivanja utjecaja **tlaka** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije za **rebro lista**

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Iskorištenje (%)
1.	100	40	30	0,010
2.	200	40	30	0,017
3.	300	40	30	0,109

S obzirom na to da je SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija dala izuzetno niska iskorištenja za prašinu i rebro (**Tablice 74,75,79,78,82,83**) daljnje analize i optimizacija (prema **Tablici 10**) su provedeni na refabrikatu.



**Tablica 84** Kemijski profil **isparljivih spojeva** u ekstraktima **refabrikata** dobivenim primjenom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije prema CCD i u ekstraktima dobivenim konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom

Br.	Spoj	RI	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14. Soxhlet ekstrakcija
1.	Nikotin	1345	40,22	39,95	67,80	67,99	56,67	60,32	48,17	67,28	72,30	67,33	68,87	55,46	69,46	76,19
2.	2,3'-dipiridil	1517	0,49	0,27	0,43	0,34	0,45	0,38	0,34	0,31	0,28	0,40	0,34	0,33	0,31	nd
3.	3-okso- $\alpha$ -jonol	1635	0,51	0,38	0,52	0,34	0,41	0,37	0,33	0,30	0,29	0,25	0,29	0,32	0,33	nd
4.	Kotinin	1697	nd	0,21	nd	0,17	0,22	nd	nd	0,19	nd	nd	0,13	nd	nd	0,68
5.	Solavetivon	1787	0,43	0,29	0,23	0,18	0,24	0,20	0,22	0,30	0,20	0,17	0,20	0,24	0,17	nd
6.	Neofitadien	1829	17,58	15,08	11,02	6,76	10,09	9,74	14,99	7,71	7,48	9,20	8,71	11,47	8,39	5,63
7.	heksahidrofarnezil- aceton	1835	nd	0,21	0,26	0,12	0,15	nd	0,38	0,14	0,23	0,22	0,22	0,17	0,10	nd
8.	( <i>E,E</i> )-farnezil-aceton	1906	0,54	0,50	0,37	0,34	0,42	0,37	0,52	0,32	0,26	0,22	0,32	0,40	0,35	nd
9.	heksadekanska kiselina	1954	1,19	0,78	0,31	0,23	0,52	0,26	0,56	0,32	0,35	0,47	0,42	0,48	0,22	nd
10.	Tunbergol	2044	0,58	0,72	0,30	0,28	0,98	0,36	0,44	0,28	0,25	0,33	0,29	0,38	0,25	nd
11.	Fitol	2099	0,82	3,68	0,69	1,67	0,71	0,54	0,82	1,49	0,49	0,39	0,35	0,92	0,40	nd
12.	duva-4,8,13-trien-1,3- diol	2217	32,64	28,93	10,05	13,60	21,14	22,47	24,24	11,37	13,88	17,02	17,30	21,81	16,01	10,35

RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); nd - nije detektiran; \*\* - točan izomer nije identificiran

**Tablica 85** Kvantificirani udjeli **nikotina, neofitadiena i duva-4,8,13-trien-1,3-diola** u ekstraktima **refabrikata** dobiveni primjenom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije prema CCD

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Yield (%)	Nikotin (%)	Neofitadien (Y%)	duva-4,8,13-trien-1,3-diol (%)
1.	100	40	1,708	0,428	0,187	0,347
2.	300	40	2,001	0,574	0,217	0,416
3.	100	80	0,500	0,971	0,158	0,144
4.	300	80	3,682	1,443	0,141	0,283
5.	100	60	1,476	0,937	0,167	0,350
6.	300	60	4,030	1,585	0,256	0,590
7.	200	40	2,833	0,362	0,113	0,182
8.	200	80	3,528	1,152	0,132	0,195
9.	200	60	3,306	0,903	0,093	0,173
10.	200	60	3,594	0,796	0,109	0,201
11.	200	60	3,506	0,762	0,096	0,191
12.	200	60	3,479	0,831	0,112	0,227
13.	200	60	3,720	0,676	0,082	0,156
14.	Soxhlet ekstrakcija		4,580	0,834	0,062	0,113

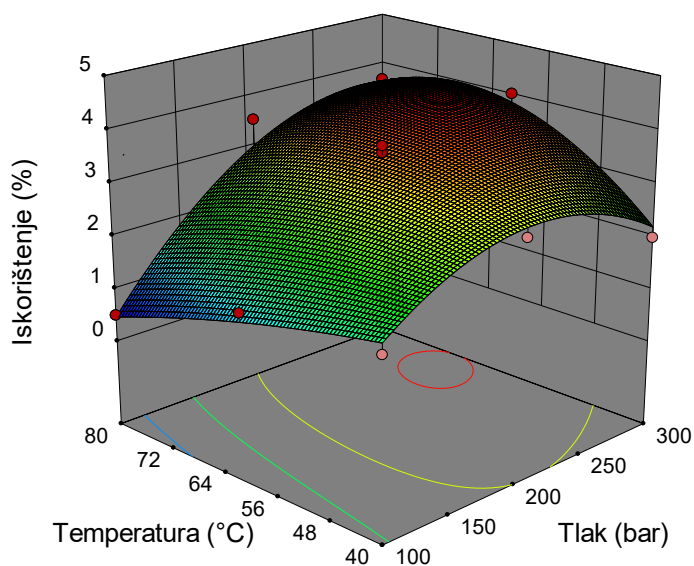
**Tablica 86 Masnokiselinski sastav ekstrakata refabrikata** dobiven primjenom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije prema CCD

Broj eksperimenta	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Palmitinska kiselina (%)	Stearinska kiselina (%)	Oleinska kiselina (%)	Linolna kiselina (%)	Linolenska kiselina (%)
1.	100	40	13,05	5,78	7,79	8,27	9,01
2.	300	40	4,10	3,84	4,09	4,57	4,63
3.	100	80	3,00	nd	nd	nd	nd
4.	300	80	8,02	4,96	5,93	6,53	7,22
5.	100	60	9,14	5,11	6,06	7,42	8,17
6.	300	60	9,41	4,94	6,55	7,08	8,06
7.	200	40	21,84	9,43	11,93	13,16	14,79
8.	200	80	7,97	4,63	5,89	6,21	6,71
9.	200	60	11,98	5,68	7,19	8,46	9,63
10.	200	60	7,99	4,77	5,69	6,65	7,26
11.	200	60	8,45	4,86	6,21	6,73	7,45
12.	200	60	7,87	4,62	6,05	6,54	7,32
13.	200	60	9,88	5,13	6,69	7,49	8,53
14.	Soxhlet ekstrakcija		13,90	0,93	1,73	10,81	9,37
nd-nije detektiran							

### 4.5.1. Statistička analiza parametara SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije

**Tablica 87** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje** SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

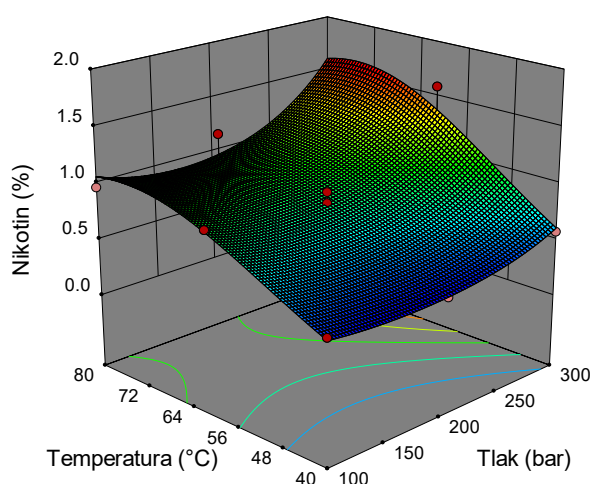
Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	13,52	5	2,70	32,51	0,0001
X <sub>1</sub> -Tlak	6,06	1	6,06	72,84	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Temperatura	0,2274	1	0,2274	2,73	0,1422
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2,09	1	2,09	25,09	0,0015
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	2,54	1	2,54	30,58	0,0009
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,7820	1	0,7820	9,40	0,0182
<b>Ostatak</b>	0,5822	7	0,0832		
<b>Nedostatak modela</b>	0,4510	3	0,1503	4,59	0,0877
<b>Pogreška</b>	0,1311	4	0,0328		
<b>Ukupno</b>	14,10	12			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,969				



**Slika 48** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za **iskorištenje ekstrakcije** u ovisnosti o temperaturi i tlaku pri SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji za **refabrikat**

**Tablica 88** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina** pri SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	2,05	4	0,51	28,92	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Tlak	0,0147	1	0,0147	158,89	< 0,0001
X <sub>2</sub> - Temperatura	0,0241	1	0,0241	260,35	< 0,0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0096	1	0,0096	103,94	< 0,0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0006	1	0,0006	6,51	0,0380
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0022	1	0,0022	23,24	0,0019
<b>Ostatak</b>	0,14	8	0,018		
<b>Nedostatak modela</b>	0,088	4	0,022	1,60	0,3299
<b>Pogreška</b>	0,055	4	0,014		
<b>Ukupno</b>	2,20	12			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,935				



**Slika 49** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za **sadržaj nikotina** u ovisnosti o temperaturi i tlaku pri SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji za **refabrikat**

**Tablica 89** Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije CCD plana pokusa pri **SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji**

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda za iskorištenje ekstrakcije i sadržaj nikotina
<b>Refabrikat</b>	
Iskorištenje (Y <sub>1</sub> )	$3,55 + 1,28X_1 - 0,96X_1^2 - 0,53X_2^2 + 0,72X_1X_2 - 0,41X_1X_2^2$
Nikotin (Y <sub>2</sub> )	$-0,19 + 0,20X_1 + 0,48X_2 + 0,30X_1^2 - 0,33X_2^2$

#### 4.6. Ekstrakcija duhanskog otpada primjenom dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE)

Dvostupanjska ekstrakcija primijenjena u ovoj disertaciji podrazumijevala je diskontinuirani proces, u kojem je duhanski otpad (refabrikat) podvrgnut SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji, a zatim supkritičnoj ekstrakciji. U svrhu potpunog iscrpljivanja biljnog materijala pristupilo valorizaciji ostataka iz reaktora nakon provedene SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije. Taj je ostatak podvrgnut SWE prema prethodno definiranim optimalnim parametrima (23 min, 150 °C, 28 ml/g), a kako bi se dobili polami spojevi.

**Tablica 90** Udjeli nikotina i fenolnih spojeva u ekstraktima dobiveni primjenom dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) na **refabrikatu** zajedno s antiradikalnom aktivnošću dobivenih ekstrakata

Broj eksperimenta	Uvjeti SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcije		Iskorištenje (%)	Nikotin (%)	Klorogenska kiselina (%)	Neoklorogenska kiselina (%)	Rutin (%)	Ukupni fenoli (%)	DPPH (%)
	Tlak (bar)	Temperatura (°C)							
1.	100	40	54,077	4,670	0,714	0,534	0	8,652	87,836
2.	300	40	59,150	4,210	0,636	0,464	0,966	8,883	81,590
3.	100	80	58,343	2,930	0,693	0,328	0,994	9,778	88,240
4.	300	80	74,052	1,610	0,493	0,240	0,932	8,027	77,891
5.	100	60	52,472	4,290	0,740	0,490	nd	9,559	87,603
6.	300	60	65,827	2,110	0,458	0,274	1,025	8,925	81,888
7.	200	40	51,391	4,560	0,685	0,459	nd	10,030	92,542
8.	200	80	54,501	1,950	0,544	0,334	nd	9,910	90,673
9.	200	60	53,620	3,140	0,725	0,420	nd	8,488	87,533
10.	200	60	56,501	3,640	0,671	0,455	nd	9,976	92,201
11.	200	60	60,419	3,000	0,592	0,392	0,866	10,110	93,347
12.	200	60	52,675	3,020	0,500	0,411	1,022	9,832	89,550
13.	200	60	54,771	2,870	0,591	0,384	nd	9,590	87,670
14.	Bez SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcija (kontrolni eksperiment)		54,571	3,818	0,415	nd	0,786	10,421	91,261

nd- nije detektiran

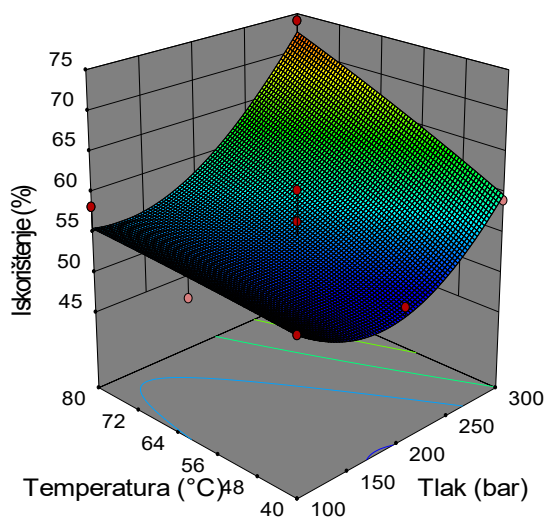
**Tablica 91** Udjeli **degradacijskih produkata** u ekstraktima dobiveni primjenom dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) na **refabrikatu**

Broj eksperimenta	Uvjeti SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcije		3,4 DHBA (%)	Nikotinamid (%)	Nikotinska kiselina (%)	5-HMF (%)	Furfural (%)	5-MF (%)
	Tlak (bar)	Temperatura (°C)						
1.	100	40	0,284	0,402	0,239	0,078	0,686	0,0407
2.	300	40	0,354	0,371	0,187	0,098	0,638	0,0378
3.	100	80	0,278	0,304	0,143	0,078	0,634	0,0367
4.	300	80	0,297	0,198	0,118	0,082	0,510	0,0292
5.	100	60	0,403	0,428	0,222	0,096	0,740	0,0441
6.	300	60	0,236	0,258	0,133	0,076	0,542	0,0316
7.	200	40	0,361	0,425	0,219	0,102	0,722	0,0453
8.	200	80	0,292	0,303	0,147	0,110	0,670	0,0390
9.	200	60	0,300	0,346	0,205	0,070	0,664	0,0397
10.	200	60	0,338	0,365	0,172	0,107	0,687	0,0390
11.	200	60	0,302	0,307	0,162	0,070	0,610	0,0362
12.	200	60	0,315	0,329	0,159	0,089	0,694	0,0398
13.	200	60	0,307	0,303	0,154	0,092	0,655	0,0382
14.	Bez SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcija (kontrolni eksperiment)		0,294	0,315	0,298	0,083	0,644	0,0382

### 4.5.3. Statistička analiza parametara dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE )

**Tablica 92** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **iskorištenje** ekstrakcije polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,684 x10 <sup>-6</sup>	4	1,684 x10 <sup>-6</sup>	17,19	0,0005
X <sub>1</sub> -Tlak	2,988 x10 <sup>-6</sup>	1	2,988 x10 <sup>-6</sup>	20,91	0,0026
X <sub>2</sub> -Temperatura	1,300 x10 <sup>-6</sup>	1	1,300 x10 <sup>-6</sup>	9,10	0,0195
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	5,668 x10 <sup>-6</sup>	1	5,668 x10 <sup>-6</sup>	3,97	0,0867
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1,445 x10 <sup>-6</sup>	1	1,445 x10 <sup>-6</sup>	10,11	0,0155
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	566,74	1	566,74	3,965 x10 <sup>-3</sup>	0,9516
<b>Ostatak</b>	7,838 x10 <sup>-5</sup>	8	97970,74		
<b>Nedostatak modela</b>	3,060 x10 <sup>-5</sup>	4	76499,41	0,6405	0,6617
<b>Pogreška</b>	4,778 x10 <sup>-5</sup>	4	1,194 x10 <sup>5</sup>		
<b>Ukupno</b>	7,522 x10 <sup>-6</sup>	12			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,896				

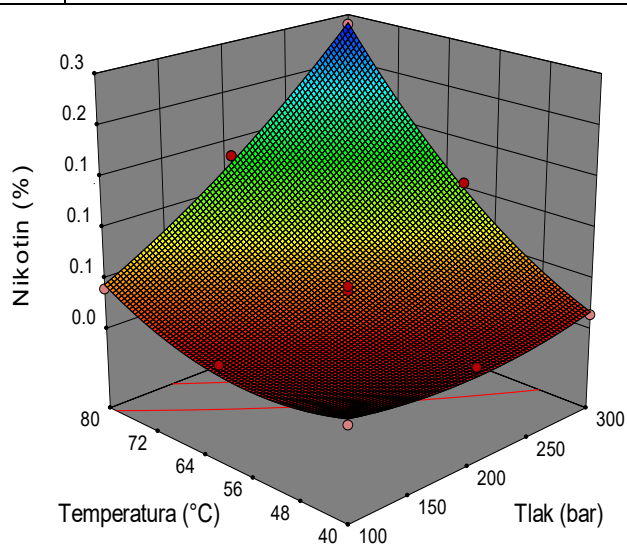


**Slika 50** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za **iskorištenje** dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) u ovisnosti o temperaturi i tlaku primjenjenom za vrijeme SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije za **refabrikat**



**Tablica 93** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za **sadržaj nikotina u ekstraktima** dobivenim dvostupanjskom ekstrakcijom (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) polinomnim modelom primjenom višestruke regresije za **refabrikat**

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0527	5	0,0105	113,79	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Tlak	0,015	1	0,015	158,89	< 0,0001
X <sub>2</sub> -Temperatura	0,024	1	0,024	260,35	< 0,0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	9,632 x10 <sup>-3</sup>	1	9,632 x10 <sup>-3</sup>	103,94	< 0,0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	6,031 x10 <sup>-4</sup>	1	6,031 x10 <sup>-4</sup>	6,51	0,0380
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	2,154 x10 <sup>-3</sup>	1	2,154 x10 <sup>-3</sup>	23,24	0,0019
<b>Ostatak</b>	0,0006	7	0,0001		
<b>Nedostatak modela</b>	0,0004	3	0,0001	1,97	0,2609
<b>Pogreška</b>	0,0003	4	0,0001		
<b>Ukupno</b>	0,0534	12			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,988				



**Slika 51** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za **sadržaj nikotina** u ekstraktima dobivenim dvostupanjskom ekstrakcijom (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) u ovisnosti o temperaturi i tlaku primjenjenom za vrijeme SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije za **refabrikat**

**Tablica 94** Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije CCD plana pokusa pri dvostupanjskoj ekstrakciji (**SC-CO<sub>2</sub> + SWE**)

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda za iskorištenje ekstrakcije i sadržaj nikotina
<b>Refabrikat</b>	
Iskorištenje (Y <sub>1</sub> <sup>-3</sup> )	3014,86 + 705,74X <sub>1</sub> + 376,44X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> + 717,97X <sub>1</sub> <sup>2</sup> + 615,90X <sub>1</sub> <sup>2</sup> X <sub>2</sub>
Nikotin (Y <sub>2</sub> <sup>-2</sup> )	0,0369 + 0,0495X <sub>1</sub> + 0,0634X <sub>2</sub> + 0,0491X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> + 0,0148X <sub>1</sub> <sup>2</sup> + 0,0279X <sub>2</sub> <sup>2</sup>

## 4.6. USPOREDBA UČINKOVITOSTI PRIMIJENJENIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

**Tablica 95** Prikaz izračunatih optimalnih uvjeta i iskorištenja za primijenjene inovativne tehnike ekstrakcije na listu duhana i duhanskom otpadu

Ekstrakcijska tehnika	Vrsta uzorka	Optimalni uvjeti	Iskorištenje ekstrakcije
UAE	list duhana	51,10 °C, 19,34 min, 10,11 ml/min, 49,22%tna otopina EtOH	49,524
UAE	refabrikat	56,76 °C, 22,92 min, 11,21 ml/min, 43,65%tna otopina EtOH	47,574
UAE	prašina	60,70 °C, 19,16 min, 10,10 ml/min, 40,03%tna otopina EtOH	45,538
UAE	rebro	51,23 °C, 16,23 min, 10,32 ml/min, 40,30%tna otopina EtOH	40,297
MAE	list duhana	80 °C, 5 min, 26,1 ml/g	68,624
MAE	refabrikat	80 °C, 5 min, 29,8 ml/g	49,868
MAE	prašina	80,31 °C, 5 min, 30,01 ml/g	48,888
MAE	rebro	80 °C, 25 min, 30 ml/g	53,455
SWE	list duhana	150 °C, 5 min, 20 ml/g	71,892
SWE	refabrikat	186 °C, 5,41 min, 29,9 ml/g	53,517
SWE	prašina	156,80 °C, 24,91 min, 29,79 ml/g	54,157
SWE	rebro	157,42 °C, 6,74 min, 27,67 ml/g	60,894
SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcija	refabrikat	300 bar, 61,22 °C	3,920
Dvostupanjska ekstrakcija (SC-CO <sub>2</sub> + SWE)	refabrikat	(300 bar, 79,81 °C) + (150 °C, 23 min, 28 ml/g)	72,610

**Tablica 96** Prikaz izračunatih optimalnih uvjeta i sadržaja klorogenske kiseline za primijenjene inovativne tehnike ekstrakcije

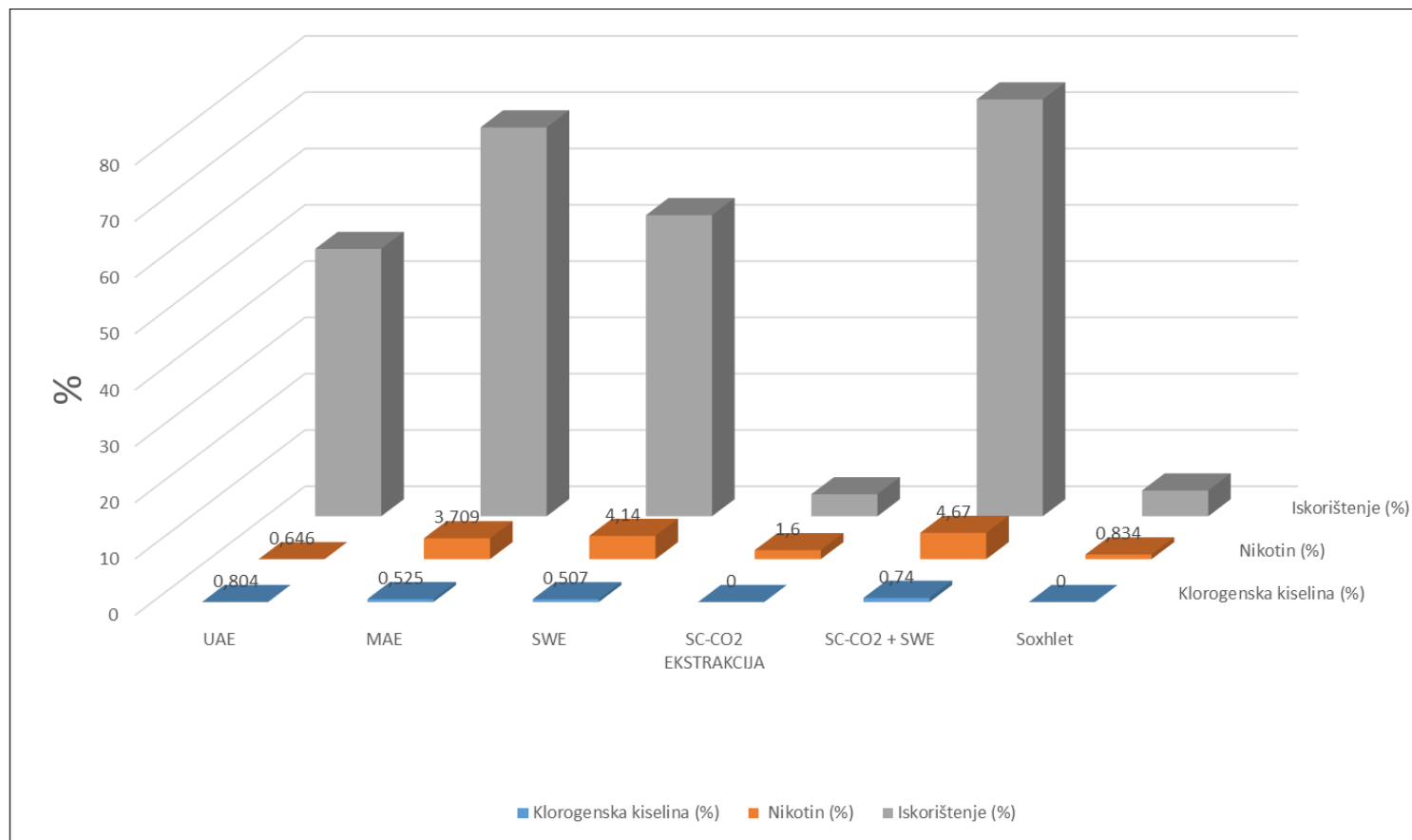
Ekstrakcijska tehnika	Vrsta uzorka	Optimalni uvjeti	Sadržaj klorogenske kiseline (%)
UAE	list duhana	44,5 °C, 17,23 min, 11 ml/g, 40,46 %tna otopina EtOH	2,767
UAE	refabrikat	46,69 °C, 15,19 min, 10 ml/g, 40% %tna otopina EtOH	0,785
UAE	prašina	53,59 °C, 38,31 min, 10 ml/g, 55,43% %tna otopina EtOH	0,494
UAE	rebro	30,14 °C, 38,31 min, 11 ml/g, 44,83% %tna otopina EtOH	0,122
MAE	list duhana	80 °C, 23,99 min, 22,63 ml/g	1,510
MAE	refabrikat	85 °C, 5 min, 20 ml/g	0,479
MAE	prašina	99,99 °C, 7,24 min, 29,99 ml/g	1,030
MAE	rebro	100 °C, 5 min, 10 ml/g	0,265
SWE	list duhana	160 °C, 25 min, 23 ml/g	1,175
SWE	refabrikat	150 °C, 23 min, 28 ml/g	0,384
SWE	prašina	160 °C, 20 min, 10 ml/g	0,285
SWE	rebro	150 °C, 25 min, 30 ml/g	0,099
SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcija	refabrikat	300 bar, 61,22 °C	-
Dvostupanjska ekstrakcija (SC-CO <sub>2</sub> + SWE)	refabrikat	(101,24 bar, 40,74 °C) + (150 °C, 23 min, 28 ml/g)	0,760

\*Kriteriji optimizacije za SWE postavljeni su tako da osim maksimalnog udjela klorogenske kiseline, ekstrakt ima minimalan udio degradacijskih produkata (5-HMF, 5-MF, furfural)

**Tablica 97** Prikaz izračunatih optimalnih uvjeta i sadržaja nikotina za primijenjene inovativne tehnike ekstrakcije

Ekstrakcijska tehnika / Vrsta otpada	Vrsta uzorka	Optimalni uvjeti	Sadržaj nikotina (%)
UAE	list duhana	70 °C, 45 min, 10 ml/g	0,723
UAE	refabrikat	70 °C, 50 min, 12,74 ml/g	0,986
UAE	prašina	70 °C, 45 min, 10 ml/g	0,991
UAE	rebro	70 °C, 20,19 min, 10 ml/g	0,832
MAE	list duhana	80 °C, 5 min, 26,1 ml/g	5,638
MAE	refabrikat	80 °C, 5 min, 29,8 ml/g	3,268
MAE	prašina	80,31 °C, 5 min, 30,01 ml/g	4,058
MAE	rebro	80 °C, 25 min, 30 ml/g	1,603
SWE	list duhana	160 °C, 25 min, 23 ml/g*	2,157
SWE	refabrikat	150 °C, 23 min, 28 ml/g*	5,140
SWE	prašina	160 °C, 20 min, 10 ml/g*	3,322
SWE	rebro	150 °C, 25 min, 30 ml/g*	1,357
SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcija	refabrikat	300 bar, 61,22 °C	2,101
Dvostupanjska ekstrakcija (SC-CO <sub>2</sub> + SWE)	refabrikat	(100 bar, 45,64 °C) + (150 °C, 23 min, 28 ml/g)	5,430

\*Kriteriji optimizacije za SWE postavljeni su tako da osim maksimalnog udjela nikotina, ekstrakt ima minimalan udio degradacijskih produkata (5-HMF, 5-MF, furfural)



**Slika 52** Sumarni grafički prikaz maksimalnih iskorištenja i sadržaja nikotina i klorogenske kiseline u ekstraktima **refabrikata** dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. KARAKTERIZACIJA UZORAKA I ODABIR TEHNIKA EKSTRAKCIJE

Na učinkovitost procesa ekstrakcije utječu brojni procesni parametri koji mogu djelovati u interakciji ili nezavisno jedan od drugoga. Odrediti sve procesne parametre koji imaju utjecaj na učinkovitost ekstrakcije te ih u konačnici kontrolirati, u praksi nije moguće. Zbog toga se pribjegava odabiru parametara s najvećim utjecajem, dok se ostali nastoje, koliko je to god moguće, držati konstantnim tijekom cijelog procesa.

Kao sirovina u ovom radu korištene su tri frakcije duhanskog otpada (refabrikat, duhanska prašina i rebro). Duhanski blend (list) korišten je kako bi se uzorci otpada usporedili s polaznom sirovinom od koje su nastali. U ispitivanom biljnom materijalu ukupna količina vlage iznosila je <12 %. Usitnjavanjem biljnog materijala, povećava se ukupna površina čestica što dovodi do povećane učinkovitosti ekstrakcije ([Makanjuola, 2017](#)). Prije određivanja veličine čestica svi uzorci, izuzev prašine su usitnjeni s ciljem povećanja površine uzorka i povećanja efikasnosti ekstrakcije. Prosječna veličina čestica za uzorke lista iznosila je  $0,284 \pm 0,006$  mm, dok je za uzorke refabrikata iznosila  $0,288 \pm 0,007$  mm, za uzorke prašine  $0,221 \pm 0,058$  mm i rebra  $0,3030 \pm 0,061$  mm. Za ispitivanje utjecaja učinkovitosti inovativnih tehnika ekstrakcije te njihovog utjecaja na sastav ekstrakata duhanskog otpada, odabrane su četiri inovativne tehnike ekstrakcije, UAE, MAE, SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija i SWE. Odabir tehnika ekstrakcije temeljio se na preliminarnim istraživanjima ([Banožić i sur., 2020c](#); [Banožić i sur., 2021c](#)) i literaturno dostupnim podacima ([Duan i sur., 2016](#); [Popova i sur., 2019](#); [Troje i sur., 2007](#); [Chen i sur., 2007b](#)) gdje su se ove četiri tehnike ekstrakcije pokazale učinkovitijim u pogledu iskorištenja, ali i sastava dobivenih ekstrakata, izuzev SWE koja je odabrana s obzirom da do sada nije publicirano niti jedno istraživanje koje se bavilo SWE bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada ili duhana. Budući da dosadašnja istraživanja nisu ispitivala razlike između različitih frakcija duhanskog otpada, rezultati ove disertacije doprinijet će valorizaciji i svake pojedinačne frakcije otpada, kao i definiranju optimalnih uvjeta promatranih ekstrakcijskih tehnika.

## 5.2. UAE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA

UAE je jedna od najčešće primjenjivanih inovativnih tehnika ekstrakcije. U usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, ova tehnika omogućava veće iskorištenje, kraće vrijeme ekstrakcije, niže primijenjene temperature i manji utrošak otapala ([Vinatorua i sur., 2017](#); [González de Peredo i sur., 2019](#)).

Zbog navedenih prednosti izabrana je UAE i to za ekstrakciju fenolnih spojeva prema BBD (**Tablica 6**) te nikotina i isparljivih spojeva (**Tablica 7**).

### **5.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva**

Tijekom ekstrakcije fenolnih spojeva promatrana su četiri parametra ekstrakcije i to: temperatura u rasponu od 30–70 °C, vrijeme od 15–45 min, omjer tekuće/kruće od 10–30 ml/g i udio etanola u otapalu (v/v) od 40–80 % prema BBD prikazanom u **Tablici 6**. Etanol je izabran kao otapalo za ekstrakciju jer su vodene otopine etanola jedno od najčešće korištenih otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka i srodnih materijala. Osim toga, vodene otopine etanola smatraju se zelenim otapalima, prihvatljivim za ljudsku prehranu te imaju nisku cijenu ([Da Silva Caetano 2011](#); [Cvjetko Bubalo 2018](#); [Azmir i sur., 2013](#)).

Prema dobivenim rezultatima, prikazanim u **Tablicama 12, 13, 14 i 15**, iskorištenje UAE se kretalo od 37,210 do 49,500 % za list, od 35,198 do 47,488 % za refabrikat, od 33,181 do 45,471 % za prašinu te od 22,160 do 34,450 % za rebro lista. Kada se usporede tri frakcije otpada može se zaključiti da je iskorištenje UAE za refabrikat najbližije listu, kao polaznoj sirovini. Sadržaj ukupnih fenola kretao se od 1,131 do 11,106 % za list, od 0,578 do 4,981 % za refabrikat, od 0,296 do 1,650 % za prašinu i 0,075 do 0,616 % za rebro lista.

HPLC metodom utvrđen je sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva. Utvrđeno je da je klorogenska kiselina, dominantni fenolni spoj, kako u ekstraktu lista tako i u ekstraktima otpada. Sadržaj klorogenske kiseline kretao se od 0,211 do 2,721 % za list, od 0,041 do 0,804 % za refabrikat, od 0,040 do 0,508 % za prašinu i do 0,205 % za rebro. Sljedeći po zastupljenosti bio je rutin, a njegov se sadržaj kretao od 0,139 do 0,950 % za list, od 0,034 do 0,372 % za refabrikat, od 0,033 do 0,174 % za prašinu i do 0,058 % za rebro. Najveći sadržaj klorogenske kiseline dobiven je pri uvjetima temperature 50 °C, vremena ekstrakcije 30 minuta, omjera tekuće/kruće od 10 ml/g i udjela etanola od 60 % za list, refabrikat i prašinu dok je za rebro najveći sadržaj klorogenske kiseline dobiven pri uvjetima temperature 30 °C, vremena ekstrakcije 45 minuta, omjera tekuće/kruće od 30 ml/g i udjela etanola od 60 %. Kada se promatra udio fenolnih spojeva u duhanskom otpadu, kako ukupnih tako i pojedinačnih, može se zaključiti da je refabrikat najbližiji listu, a slijede ga duhanska prašina pa zatim rebro.

Preliminarna istraživanja ([Banožić i sur., 2019a](#)) pokazala su da postoji korelacija između sadržaja pojedinačnih fenolnih spojeva (klorogenske kiseline i rutina) i antiradikalne aktivnosti ekstraktata duhanskog otpada pa je zbog toga u svim dobivenim ekstraktima izmjerena antiradikalna aktivnost izražena kao % inhibicije DPPH.

Antiradikalna aktivnost kretala se za uzorke otpada od 3,362 do 37,237 %, dok je u ekstraktima lista bila znatno viša u rasponu od 13,938 do 95,017 %. Od promatrana tri otpada, najveću

antiradikalnu aktivnost imao je ekstrakt refabrikata dobiven pri sljedećim uvjetima: temperatura 50 °C, vrijeme 30 minuta, omjer tekuće/kruto 10 ml/g i udio etanola od 40 %, dok je za list najveću antiradikalnu aktivnost pokazao ekstrakt dobiven pri sljedećem uvjetima: temperatura 50 °C, vrijeme ekstrakcije 30 minuta, omjer tekuće/kruto 50 ml/g i udio etanola od 40 %. Može se primijetiti da se uvjeti UAE pri kojima je dobivena maksimalna antiradikalna aktivnost za list i refabrikat razlikuju u samo jednom parametru (omjer tekuće/kruto).

### **5.2.2. Ekstrakcija isparljivih spojeva**

Tijekom ekstrakcije isparljivih spojeva promatrana su tri parametra ekstrakcije i to: temperatura u rasponu od 30–70 °C, vrijeme od 15–45 min i omjer tekuće/kruto od 10–30 ml/g prema BBD prikazanom u **Tablici 7**.

Heksan je odabran kao otapalo na osnovi preliminarnih i do sada publiciranih istraživanja. Heksan se koristi za proizvodnju duhanskog koncentrata koji se često koristi u industriji parfema i kozmetike i to obično za proizvodnju muških parfema s drvenim, zemljanim i orijentalnim notama (Brechbill, 2009; Nedeltcheva-Antonova i sur., 2016). Osim toga, preliminarna istraživanja (Banožić i sur., 2021a) pokazala su da je u usporedbi s benzenom i metanolom sadržaj nikotina u ekstraktima s heksanom veći.

Kemijski profili dobivenih ekstrakata duhana lista, refabrikata, prašine i rebra dati su u **Tablicama 16,17,18,19**. Može se vidjeti da su nikotin, neofitadien i duva-4,8,13-trien-1,3-diol dominantni spojevi prisutni u svim ekstraktima lista, refabrikata, prašine, s izuzetkom ekstrakata rebra, gdje je u svim ekstraktima bio prisutan samo nikotin. Maksimalni udjeli nikotina postignuti su pri temperaturi ekstrakcije od 70 °C i vremenu od 30 minuta (**Tablica 16, eksperiment 1, 3 i 7**) za ekstrakte lista bez obzira na utjecaj omjera tekuće/kruto. Isto tako, ekstrakti dobiveni pri uvjetima UAE na temperaturi 70 °C i 30 minuta s omjerom tekuće/kruto 30 ml/g pokazali su visok udio nikotina u svim uzorcima lista i otpada. U ekstraktima gdje je nikotin bio prisutan u visokim udjelima, ostali su spojevi bili prisutni u tragovima ili nisu detektirani.

Osim dominantnih spojeva, profili isparljivih spojeva lista pokazali su da list sadrži ravnolančane alkane kao što su dekan, dodekan, tridekan, tetradekan, pentadekan, heksadekan, heptadekan, oktadekan, heneikosan, dokosan, trikosan i tetrakosan. Zanimljivo je napomenuti da su trikosan i tetrakosan bili najzastupljeniji u eksperimentima 5, 6 i 10. Nekoliko alk-1-ena bilo je prisutno u manjim količinama (heksadec-1-en, oktadec-1-en, eikos-1-en i dokos-1-en), kao i 2-metil-alkani (2-metilnonan, 2-metildekan i 2-metilundekan). Profili isparljivih spojeva refabrikata također su sadržavali više alkane, poput trikosana i/ili tetrakosana, kao dominantne spojeve u eksperimentima 2, 3, 4, 7, 8, 9 i 10. Osim njih, alk-1-eni (dokos-1-en i oktadec-1-en) bili su prisutni u manjim udjelima, kao i 2-metildekan. Isparljivi



profili prašine pokazali su veću zastupljenost trikosana i/ili tetrakosana u ekstraktima 3, 9, 10 i 11. Također su bili prisutni i alk-1-eni (dokos-1-en, eikos-1-en, oktadec-1-en, heksadec-1-en i tetradec-1-en), kao i 2-metilalkani (2-metilnonan, 2-metildekan i 2-metilundekan) i drugi razgranati alkani. Osim toga, detektirani su i različiti derivati cikloheksana (koji nisu detektirani u listovima i refabrikatu), poput izomera 1,2,4-trimetilcikloheksana, *trans*-1-etil-4-metilcikloheksana, *cis*-1-etil-4-metilcikloheksana i acetilcikloheksana. Derivati cikloheksana mogu potjecati od razgradnje karotenoida. Isparljivi profili rebra pokazuju trikosan i/ili tetrakosan kao dominantne spojeve u ekstraktima 7, 8, 9, 10 i 11. Također su bili prisutni i alk-1-eni (heksadec-1-en, oktadec-1-en, eikos-1-en i dokos-1-en). U ekstraktima 4, 6, 9, 10, 11, 12, 14 i 17 nađeni su derivati cikloheksana: izomeri 1,2,4-trimetilcikloheksana, *trans*-1-etil-4-metilcikloheksana, *cis*-1-etil-4-metilcikloheksana i acetilcikloheksana.

U usporedbi s literaturno dostupnim istraživanjem (Kalamanda i sur., 2010) gdje je primjenjivana destilacija vodenom parom i Soxhlet ekstrakcija, evidentno je da su dobiveni rezultati u ovom istraživanju sličniji onima dobivenim Soxhlet ekstrakcijom u spomenutom istraživanju. Slično tim rezultatima, ekstrakti su karakterizirani visokom razinom nikotina i neofitadienom kao drugim najzastupljenijim spojem. Osim toga, u spomenutom istraživanju, udio nikotina u isparljivom profilu duhanskog otpada je iznosio 24 % dok je u ovom istraživanju njegov udio varirao između 5,0 i 87,5 % što upućuje na izravan utjecaj primijenjenih procesnih parametara na sadržaj nikotina. S druge strane profili isparljivih spojeva dobiveni u ovom istraživanju se razlikuju od onih dobivenih u radu Zhang i sur. (2012) gdje je na duhanskom otpadu primijenjena destilacija vodenom parom, hidrodestilacija i Soxhlet ekstrakcija. Razlike u profilu isparljivih spojeva vjerojatno su uzrokovane različitom tehnikom ekstrakcije koja je primijenjena. No i u spomenutom istraživanju, nikotin i neofitadien bili su dominantni spojevi u ekstraktima duhanskog otpada.

### **5.2.3. Statistička analiza parametara UAE**

U daljnjoj statističkoj analizi u obzir su uzeti iskorištenje ekstrakcije, sadržaj nikotina i sadržaj klorogenske kiseline kao dominantnog fenolnog spoja u svim ekstraktima dobivenih pomoću UAE. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva, za svaku pojedinačnu vrstu uzorka, evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 21-32**.

Regresijski modeli za sva tri ispitivana odziva, za otpad i tri frakcije duhanskog otpada pokazali su statistički značajni utjecaj s obzirom na promatrane *p*-vrijednosti (od <0,0001 do 0,0384) sa  $R^2$  vrijednostima u rasponu od 0,727 do 0,980. Također, *p*-vrijednost svih regresijskih modela bila je ispod 0,05, što ukazuje na statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive.

Nedostatak modela nije bio značajan ( $p > 0,05$ ) za sve promatrane odzive što potvrđuje adekvatnost dobivenog polinoma jednadžbe drugog i trećeg reda.

Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara, omjer tekuće/kruto imao je najveći statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) na iskorištenje ekstrakcije za list i sve tri frakcije otpada. Od ostalih parametara, jedino je još kvadratni član omjera tekuće/kruto imao statistički značajan utjecaj na iskorištenje ekstrakcije dok ostali parametri nisu imali statistički značajan utjecaj (**Tablica 21, 23, 25 i 27**).

Na sadržaj klorogenske kiseline statistički visoko značajan ( $p < 0,0001$ ) utjecaj je imao omjer tekuće/kruto za list, refabrikat i prašinu, dok je za rebro ovaj utjecaj bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ) (**Tablica 22, 24, 26 i 28**). Udio etanola u otapalu imao je visoko značajan utjecaj ( $p < 0,0001$ ) na sadržaj klorogenske kiseline u listu, dok je na sadržaj klorogenske kiseline u 3 frakcije otpada ovaj utjecaj bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Osim navedenog, na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu lista utjecala je i interakcija između omjera tekuće/kruto i udjela etanola u otapalu ( $p < 0,0001$ ) i kvadratni član omjera tekuće/kruto ( $p < 0,05$ ) (**Tablica 22**). Na sadržaj klorogenske kiseline u refabrikatu još je utjecala interakcija između omjera tekuće/kruto i udjela etanola u otapalu ( $p < 0,05$ ), te kvadratni član udjela etanola u otapalu ( $p < 0,05$ ) (**Tablica 24**). Na sadržaj klorogenske kiseline u prašini je još statistički značajno utjecao kvadratni član udjela etanola u otapalu ( $p < 0,05$ ) (**Tablica 26**). Ostale promatrane nezavisne varijable nisu pokazale statistički značajan utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktima dobivenim pomoću UAE.

Za potrebe optimizacije udjeli nikotina su kvantificirani (**Tablica 20**), metodom internog standarda preko kalibracijske krivulje kako je to objašnjeno u eksperimentalnom dijelu (**Poglavlje 3.3.9**). Sadržaj nikotina bio je u rasponu od 0,104 do 0,798 % za ekstrakte lista, od 0,103 do 0,647 % za ekstrakte otpada, od 0,024 do 0,527 % za ekstrakte prašine i od 0,072 do 0,470 % za ekstrakte rebra. U svim uzorcima (list i ekstrakti otpada) temperatura je imala statistički značajan utjecaj na sadržaj nikotina (**Tablica 29, 30, 31, 32**). Kod ekstrakta lista (**Tablica 29**), temperatura je imala statistički visoko značajan utjecaj ( $p < 0,0001$ ) na sadržaj nikotina, dok su vrijeme i omjer tekuće/kruto statistički značajno ( $p < 0,05$ ) utjecali na sadržaj nikotina. Kod refabrikata (**Tablica 30**), temperatura i vrijeme su statistički značajno ( $p < 0,05$ ) utjecali na sadržaj nikotina, dok su kod prašine (**Tablica 31**) na njegov sadržaj statistički značajno ( $p < 0,05$ ) utjecali temperatura i interakcija vremena i omjera tekuće/kruto. Kod rebra (**Tablica 32**) temperatura je imala statistički visoko značajan utjecaj ( $p < 0,0001$ ) na sadržaj nikotina, a vrijeme, omjer tekuće/kruto i kvadratni član temperature su statistički značajno ( $p < 0,05$ ) utjecali na sadržaj nikotina.

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za iskorištenje ekstrakcije, za list i otpad (**Slike 12,14,16,18**) može se vidjeti sličan trend za list i tri frakcije otpada gdje je s porastom temperature vidljiv i blagi porast iskorištenja, dok je porast vremena ekstrakcije i veći omjer tekuće/kruto negativno utjecao na iskorištenje ekstrakcije.

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za sadržaj klorogenske kiseline (**Slike 13,15,17,19**), za list i tri frakcije duhanskog otpada, vidljiv je sličan utjecaj temperature i vremena na sadržaj klorogenske kiseline, gdje temperatura nije imala utjecaj, a porast vremena ekstrakcije pozitivno je utjecao na sadržaj klorogenske kiseline. Porast omjera tekuće/kruto negativno je utjecao na sadržaj klorogenske kiseline. Omjer tekuće/kruto pokazao je visok utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline te je njegovim porastom opadao sadržaj klorogenske kiseline. Porastom udjela etanola u otapalu do 60 %, blago je rastao i sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu refabrikata i prašine, te je daljnjim povećanjem udjela etanola došlo do pada sadržaja klorogenske kiseline, dok je u ekstraktu lista i rebra s porastom udjela etanola u otapalo došlo do smanjenja sadržaja klorogenske kiseline.

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za sadržaj nikotina (**Slike 20,21,22,23**), vidljiv je sličan trend za list i tri frakcije otpada kada se radi o utjecaju temperature i vremena. Naime, s porastom temperature od 30 do 70 °C, snažno je rastao i sadržaj nikotina, dok je utjecaj vremena, iako slabije, također bio pozitivan. Omjer tekuće/kruto najmanje je utjecao na sadržaj nikotina, a kod refabrikata je vidljiv i blagi pad sadržaja nikotina s porastom omjera tekuće/kruto dok je kod lista i ostalih frakcija otpada taj trend bio blago pozitivan u cijelom promatranom eksperimentalnom rasponu.

Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD za UAE lista duhana i duhanskog otpada prikazani su u **Tablici 33**.

### 5.3. MAE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA

Primjena MAE se značajno povećala u posljednja dva desetljeća, osobito u području separacije bioaktivnih spojeva ([Garcia-Vaquero i sur., 2020](#); [Bagade i sur., 2019](#)). Dosadašnja istraživanja na duhanu i duhanskom otpadu s primjenom MAE su se uglavnom bazirala na ekstrakciji isparljivih spojeva ([Zhu i sur., 2006](#); [Nie i sur., 2017](#)) ili na ekstrakciji solanesola ([Zhou i Liu., 2006](#); [Machado i sur., 2010](#)). Za razdvajanje polarnih frakcija provedeno je samo jedno istraživanje gdje se MAE koristila u kombinaciji s elektroforezom kao predtretman za brzo određivanje klorogenske kiseline u duhanskom otpadu. Sva dosadašnja istraživanja na duhanskom otpadu koristila su otvoreni sustav te MAE na duhanskom otpadu u zatvorenom sustavu i određivanje polarnih spojeva u dobivenim ekstraktima do sada nije provedeno.

### 5.3.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva i nikotina

Tijekom MAE bioaktivnih spojeva promatrana su tri parametra ekstrakcije i to: temperatura u rasponu od 80–120 °C, vrijeme od 5–25 min, omjer tekuće/kruto od 500–700 ml/g prema BBD prikazanom u **Tablici 8**. Prema dobivenim rezultatima, prikazanim u **Tablicama 34, 35, 36, 37**, prinos ekstrakcije bio je u rasponu od 19,402 do 69,780 % za list duhana, od 35,980 do 69,081 % za refabrikat, od 29,420 do 58,230 % za prašinu i od 37,840 do 57,960 % za rebro. Za sve frakcije otpada najveći prinos ekstrakcije postignut je pri temperaturi od 120 °C. Tijekom MAE snaga mikrovalova bila je ovisna o temperaturi. Sa slike u **Prilogu 1** može se vidjeti da kada je temperatura postavljena na 80 °C, snaga mikrovalova doseže postavljeni maksimum (700 W) u prve 2 minute, a zatim se smanjuje na vrijednost od 100 W koja je konstantna tijekom procesa ekstrakcije. S druge strane, pri temperaturi ekstrakcije od 120 °C maksimalna snaga mikrovalova (700 W) je dosegnuta u prve 4 minute, a zatim je pala na vrijednost od 200 W tijekom cijelog procesa ekstrakcije. Stoga se pokazalo da je veći prinos ekstrakcije izravno povezan s primijenjenom snagom mikrovalova. Da je MAE pogodna za dobivanje visokih iskorištenja, potvrđuju i usporedbe s do sada publiciranim istraživanjima. npr. konvencionalnim postupkom ekstrakcije za komercijalni blend Virginia zabilježeno je iskorištenje ekstrakcije 34 % što je značajno manje nego u ovom istraživanju ([Docheva i sur., 2020](#)).

HPLC metodom utvrđen je sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva i nikotina. U svim ekstraktima nikotin je bio dominantni spoj s koncentracijama u rasponu 1,512–5,480 % za list, 1,886–3,709 % za refabrikat, 2,628 – 4,840 % za prašinu i 0,867–1,783 % za rebro. Osim nikotina koji je alkaloid, u ekstraktima lista i otpada detektirano je još pet fenolnih spojeva, klorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina, kriptoklorogenska kiselina, rutin i nikotiflorin (**Tablice 34, 35, 36, 37**). U usporedbi s ekstraktima lista, ekstrakti otpada bili su manje bogati sadržajem bioaktivnih spojeva što implicira mogući gubitak bioaktivnih spojeva tijekom prerade duhana. Klorogenska kiselina je detektirana u rasponu od 0,145–1,501 % za list, od 0,180–0,525 % za refabrikat, od 0,237–1,135 % za prašinu i od 0,014–0,265 % za rebro. Sadržaj neoklorogenske kiseline bio je u rasponu od 0,054–0,409 % za list, od 0,048–0,256 % za refabrikat, od 0,119–0,344 % za prašinu i od 0,055–0,323 % za rebro. Sadržaj kriptoklorogenske kiseline bio je u rasponu od 0,017–0,432 % za list, od 0,030–0,136 % za refabrikat, od 0,012–0,249 % za prašinu, odnosno do 0,444 % za rebro. Također su u dobivenim ekstraktima identificirana dva dominantna flavonoida, rutin (kvercetin 3–rutinozid) i nikotiflorin (kempferol–3–O–rutinozid). Sadržaj rutina bio je u rasponu od 0,111 do 0,635 % za ekstrakte lista, od 0,130 do 0,631 % za ekstrakte refabrikata, od 0,126 do 0,602 % za ekstrakte prašine i od 0,079 do 0,166 % u ekstraktima rebra dok se sadržaj nikotiflorina kretao do 0,089 % za list, od 0,040 do 0,083 % za refabrikat, od 0,039 do 0,099 % za prašinu i do 0,075 % u rebru.

Polifenolni profil ekstrakta lišća u skladu je s drugim istraživanjima (Popova i sur., 2018.; Wang i sur., 2010.) u kojima su primijenjene druge tehnike ekstrakcije. Sličan sadržaj klorogenske kiseline dobiven je i u istraživanju Wang i sur. (2010) gdje je ekstrakcija bila potpomognuta sonifikacijom. Također, uočeno je da je sadržaj nikotina u listu i refabrikatu sličan onom dobivenom u istraživanju autora Popova i sur. (2020) gdje je nikotin kao dominantni spoj rezinoida duhana bio prisutan u koncentracijama iznad 3 %.

### **5.3.2. Statistička analiza parametara MAE**

U daljnjoj statističkoj analizi MAE u obzir su uzeti iskorištenje ekstrakcije, sadržaj nikotina i sadržaj klorogenske kiseline kao dominantnog fenolnog spoja u svim ekstraktima dobivenim pomoću MAE. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva, za svaku pojedinačnu vrstu uzorka, evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 38-49**.

Regresijski modeli za sva tri ispitivana odziva, za otpad i tri frakcije duhanskog otpada za MAE pokazali su statistički značajni utjecaj s obzirom na promatrane  $p$ -vrijednosti (od  $<0,0001$  do  $0,0476$ ) sa  $R^2$  vrijednostima u rasponu od  $0,828$  do  $0,994$ . Također,  $p$ -vrijednost svih regresijskih modela bila je ispod  $0,05$ , što ukazuje na statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive.

Nedostatak modela nije bio značajan ( $p>0,05$ ) za sve promatrane odzive što potvrđuje adekvatnost dobivenih polinoma jednadžbi drugog i trećeg reda.

Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara, temperatura je imala statistički značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) na iskorištenje ekstrakcije za sve tri frakcije otpada dok za list nije imala statistički značajan utjecaj. Kod ekstrakata lista, za MAE statistički značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) je imalo vrijeme ekstrakcije, interakcija između vremena ekstrakcije i omjera tekuće/kruto, te kvadratni član utjecaja temperature (**Tablica 38**). Za refabrikat, na iskorištenje ekstrakcije, osim temperature, statistički značajno ( $p<0,05$ ) je utjecalo vrijeme ekstrakcije i interakcija između vremena i temperature ekstrakcije (**Tablica 39**) dok je za ekstrakte prašine pri MAE statistički značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) imao omjer tekuće/kruto i kvadratni član utjecaja temperature (**Tablica 40**). Na iskorištenje MAE, za rebro, statistički značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) je, osim temperature, imao omjer tekuće/kruto i kvadratni član vremena ekstrakcije (**Tablica 41**).

Za MAE na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu lista statistički visoko značajno ( $p<0,0001$ ) je utjecala temperatura, vrijeme, omjer tekuće/kruto te interakcija kvadratnog člana temperature s vremenom i temperature s kvadratnim članom vremena. Interakcija temperature i vremena te temperature i omjera tekuće/kruto imali su statistički značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) na

sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu lista, kao i kvadratni član za temperaturu i omjer tekuće/kruto (**Tablica 42**). Na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu refabrikata pri MAE, statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) imala temperatura, vrijeme, interakcija između temperature i vremena te interakcija između kvadratnog člana temperature i vremena (**Tablica 43**). Na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu prašine pri MAE, statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) imalo je vrijeme, kvadratni član temperature i vremena, interakcija između kvadratnog člana temperature s vremenom i interakcija temperature s kvadratnim članom vremena (**Tablica 44**). Na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu rebra pri MAE, visoko značajno ( $p < 0,0001$ ) je utjecao kvadratni član temperature, kvadratni član vremena i interakcija između kvadratnog člana vremena i omjera tekuće/kruto dok su omjer tekuće/kruto, interakcija između vremena ekstrakcije i omjera tekuće/kruto, kvadratni članovi vremena i omjera tekuće/kruto imali statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) (**Tablica 45**).

Na sadržaj nikotina u ekstraktu lista, statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) je imala temperatura i kvadratni član temperature (**Tablica 46**) dok je na sadržaj nikotina u ekstraktu refabrikata, statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) je imala temperatura, vrijeme, kvadratni član temperature i kvadratni član vremena (**Tablica 47**). Na sadržaj nikotina u ekstraktu prašine, statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) je imala temperatura, interakcija između vremena i omjera tekuće/kruto te kvadratni član temperature (**Tablica 48**). Pri MAE rebra, statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) je imala temperatura, omjer tekuće/kruto i interakcija između vremena i omjera tekuće/kruto (**Tablica 49**).

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za iskorištenje ekstrakcije, za list i otpad (**Slike 24, 25, 26, 27**), vidljiv je sličan trend gdje iskorištenje ekstrakcije raste s povećanjem temperature. Budući da je snaga mikrovalova u ovom eksperimentu bila izravno ovisna o temperaturi (temperatura je postavljena kao maksimalna vrijednost), pri višim temperaturama je isporučena veća energija mikrovalova. Time je proces difuzije između materijala i otapala postao brži. S druge strane, za list i prašinu s porastom vremena nije uočen značajan porast u iskorištenju. Slično je uočeno u istraživanju Kamaruddin i sur. (2018) gdje produljeno vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na iskorištenje ekstrakcije. Hu i sur. (2009) su uočili da se iskorištenje ekstrakcije smanjuje već od 4 minute procesa ekstrakcije. Taj fenomen je obično povezan s razgradnjom osjetljivih spojeva tijekom duljeg izlaganja materijala mikrovalovima. Omjer tekuće/kruto pokazao je različite učinke na različite vrste materijala. U slučaju lista i prašine, iskorištenje ekstrakcije se blago smanjuje s povećanjem omjera tekuće/kruto, dok se za refabrikat i rebro iskorištenje neznatno povećava s većim omjerom tekuće/kruto. Pozitivan utjecaj omjera tekuće/kruto može se objasniti međudjelovanjem sadržaja vlage i mikrovalnog zračenja. Naime, s povećanjem razine vlage u materijalu dolazi do povećanog rotiranja dipolnih molekula (molekula vode). Zbog toga stanice pucaju i postiže se veće iskorištenje

ekstrakcije. Negativan utjecaj omjera tekuće/kruto može biti povezan s neprikladnim miješanjem zbog većeg volumena otapala. Alara i sur. (2018) utvrdili su da veći volumen otapala zahtjeva i apsorbira i veću količinu mikrovalne energije i što rezultira smanjenom količinom energije koja dolazi do samog materijala, nedovoljnom za pucanje stanične stjenke. Iz navedenog može se zaključiti da utjecaj omjera tekuće/kruto prvenstveno ovisi o samom biljnom materijalu i tome koji će od navedenih fenomena biti dominantan.

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za sadržaj klorogenske kiseline (**Slika 28, 29, 30, 31**) vidljiv je pozitivan utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj klorogenske kiseline za list i refabrikat u cijelom promatranom eksperimentalnom rangu, dok za prašinu i rebro taj utjecaj nije vidljiv. Temperatura je imala dvojak utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline u ispitivanim materijalima. Za list evidentan je porast sadržaja klorogenske kiseline s porastom temperature (**Slika 28**), dok je za rebro i prašinu sadržaj klorogenske kiseline rastao s porastom temperature od 80 do 100 °C, a s daljnjim porastom temperature došlo je do pada sadržaja klorogenske kiseline (**Slika 30 i 31**). Za refabrikat porast temperature je imao blago negativan utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline (**Slika 29**). Povećanje omjera tekuće/kruto imalo je negativan utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline u promatranom eksperimentalnom rangu za list i rebro, dok na sadržaj klorogenske kiseline u refabrikatu i prašini, ova varijabla nije imala utjecaj.

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za sadržaj nikotina (**Slika 32, 33, 34, 35**) za list, i sve frakcije otpada povećanje temperature je imalo negativan utjecaj na sadržaj nikotina. Vrijeme ekstrakcije nije pokazalo utjecaj na sadržaj nikotina u ispitivanom rangu za frakcije otpada, dok je za list imalo dvojak utjecaj, odnosno do 15 minute ekstrakcije je imalo negativan utjecaj dok je daljnjim povećanjem vremena ekstrakcije došlo do povećanja sadržaja nikotina u ekstraktu. Povećanje omjera tekuće/kruto nije značajno utjecalo na sadržaj nikotina u ekstraktima otpada, dok je za list povećanje omjera tekuće/kruto iznad 20 ml/g čak imalo negativan utjecaj.

Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD za MAE lista duhana i duhanskog otpada prikazani su u **Tablici 50**.

#### **5.4. SWE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA**

SWE se već pokazala kao izvrsna zamjena za konvencionalne tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala. Ova tehnika se karakterizira kao sigurna, učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda za ekstrakciju različitih bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Ono što je specifično za ovu tehniku ekstrakcije je uporaba vode u supkritičnom stanju kao otapala koje je netoksično, nezapaljivo, jeftino i općeprihvaćeno ([Cvijetko Bubalo i sur., 2015](#)). Osim toga, za razliku od drugih nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije, SWE podrazumijeva primjenu



visokih temperatura i nastanak nepoželjnih degradacijskih produkata (Martin i sur., 2002). Sve navedeno, govori u prilog tome da je procesne uvjete SWE potrebno optimizirati kako bi se dobio maksimalan sadržaj željenih spojeva uz minimalan nastanak neželjenih degradacijskih produkata. Također, važno je napomenuti, da ova tehnika ekstrakcije do sada nije primjenjivana niti na duhanu niti na duhanskom otpadu.

#### **5.4.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva i nikotina**

Tijekom SWE bioaktivnih spojeva promatrana su tri parametra ekstrakcije i to: temperatura u rasponu od 150–250 °C, vrijeme od 5–25 min, omjer tekuće/kruto od 500–700 ml/g prema BBD prikazanom u **Tablici 9**. Prema dobivenim rezultatima, prikazanim u **Tablicama 51, 53, 55, 57**, iskorištenje ekstrakcije se kretalo od 30,470 do 72,540 % za list, od 31,951 do 51,530 % za refabrikat, od 32,948 do 53,492 % za prašinu i od 38,930 do 60,640 % za rebro.

HPLC metodom utvrđen je sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva i nikotina, dok su antiradikalna aktivnost, ukupni fenoli i ukupni ugljikohidrati određeni spektrofotometrijski.

Rezultati prikazani u **Tablicama 51, 53, 55, 57** pokazuju da ekstrakti lista duhana imaju najveći ukupni sadržaj fenola i najveću antiradikalnu aktivnost. Pri višim temperaturama (200 i 250 °C) veći je sadržaj ukupnih fenola (17,600 %) u ekstraktima dobivenim omjerom tekuće/kruto od 30 ml/g, dok je pri nižim temperaturama (150 °C) najveći ukupni sadržaj fenola (9,261 %) dobiven pri omjeru tekuće/kruto od 30 ml/g. Općenito, sadržaj fenola se povećavao s povećanjem omjera tekuće/kruto, što je vjerojatno posljedica veće količine otapala koja okružuje biljni materijal i omogućava bolju difuziju bioaktivnih spojeva. Najniža antiradikalna aktivnost (15,062 %) i najniži ukupni sadržaj fenola (2,059 %) izmjereni su u ekstraktu rebra dobivenom pri uvjetima SWE od 150 °C, 15 minuta. Općenito, može se zaključiti da antiradikalna aktivnost i ukupni sadržaj fenola slijede trend list > refabrikat > prašina > rebro.

Od detektiranih pojedinačnih spojeva, nikotin se nalazio u najvećim koncentracijama. U ekstraktu lista kretao se od 1,889 do 4,311 % (**Tablica 51**), u ekstraktima refabrikata od 3,060 do 5,140 % (**Tablica 53**), u ekstraktima prašine od 1,503 do 3,219 % (**Tablica 55**) i u ekstraktima rebra od 0,907 do 1,968 % (**Tablica 57**). Ekstrakti refabrikata i lista imali su značajno veći sadržaj nikotina od rebra i prašine. Ovi rezultati se podudaraju s onima u istraživanju autora Tayoub i sur. (2015) za uzorke lista i Rincón i sur. (1998) za ekstrakte otpada dobivene drugim tehnikama ekstrakcije. Najveća koncentracija nikotina bila je 5,140 %, a dobivena je iz ekstrakta refabrikata pri uvjetima SWE od 250 °C, 15 minuta i omjeru tekuće/kruto 10 ml/g. Sadržaj nikotinamida i nikotinske kiseline (**Tablica 52, 54, 56 i 58**) također se povećava s vremenom i temperaturom reakcije, ali se pri 250 °C smanjivao od 5 do 25 minute. Samo u slučaju ekstrakata prašine, koncentracije ova dva spoja rastle su s vremenom ekstrakcije za svaku temperaturu. S obzirom da ovi spojevi nisu detektirani u



ekstraktima dobivenim drugim tehnikama ekstrakcije može se zaključiti da se radi o degradacijskim produktima koji vjerojatno potječu od samog nikotina. U preliminarnom istraživanju objavljenom u radu Jokić i sur. (2019) predložen je mehanizam degradacije nikotina pri uvjetima SWE. Pod uvjetima SWE pirolidinski prsten nikotina se otvara te nastaje nestabilan intermedijer 5'-hidroksinikotin. Daljnja degradacija pirolidinskog prstena uzorkovana uvjetima supkritične vode i visokih temperatura dovodi do stvaranja nikotinamida, a daljnjom deaminacijom nikotinamida nastaje nikotinska kiselina. Rezultati pokazuju da je u svim dobivenim ekstraktima koncentracija nikotinamida općenito veća na temperaturi od 150 °C u usporedbi s nikotinskom kiselinom. To se počinje mijenjati pri višim temperaturama od 200 i 250 °C gdje sadržaj nikotinske kiseline postaje veći od sadržaja nikotinamida, stoga se može zaključiti da se na temperaturama višim od 200 °C nikotinamid zbog reakcije deaminacije počinje pretvarati u nikotinsku kiselinu.

Od pojedinačnih fenolnih spojeva detektirani su rutin i klorogenska kiselina. Sadržaj klorogenske kiseline kretao se od 0,055 do 1,525 % u ekstraktima lista, od 0,065 do 0,507 % u ekstraktima refabrikata, od 0,033 do 0,308 % u ekstraktima rebra. Koncentracije rutina i klorogenske kiseline opadale su s porastom temperature i vremenom ekstrakcije. Slične rezultate dobili su i Singh i sur. (2011) kod primjene supkritične vode za ekstrakciju klorogenske kiseline iz otpada krumpira. Naime, u navedenom istraživanju sadržaj klorogenske kiseline se počinje smanjivati na temperaturi od 160-180 °C, a potpuna razgradnja klorogenske kiseline zabilježena je iznad 180 °C. Također, u ovom istraživanju sadržaj rutina se počeo smanjivati na 200 °C nakon 25 minuta, dok na 250 °C više nije bio prisutan u ekstraktima. Slične rezultate za rutin dobili su Ravber i sur. (2015) koji su proučavali hidrolizu rutina u supkritičnoj vodi i primijetili da je gotovo sav rutin hidrolizira na temperaturama višim od 196 °C.

Koncentracije 3,4-DHBA rastle su s vremenom ekstrakcije i s porastom temperature, dok su se na 250 °C počele smanjivati s porastom vremena ekstrakcije što dovodi do zaključka da je 3,4-DHBA produkt degradacije fenolnih spojeva na visokim temperaturama.

Procese koji se odvijaju na visokim temperaturama u koje ubrajamo i SWE obično prate promjene kemijskog sastava materijala koje su obično karakterizirane smanjenjem sadržaja nekih spojeva i istodobnim povećanjem sadržaja drugih spojeva, poput furfurala i 5-HMF-a (Martin i sur., 2002). S obzirom da je duhan bogat ugljikohidratima (Banožić i sur., 2020b), za pretpostaviti je bilo da bi se degradacijski produkti šećera mogli naći u ekstraktima duhanskog otpada. U **Tablicama 52, 54, 56 i 58** prikazani su udjeli ukupnih šećera te 5-HMF-a, furfurala i 5-MF-a u ekstraktima lista, refabrikata, prašine i rebra. Najveći sadržaj ugljikohidrata bio je u ekstraktu lista (60,599 %) dobiven pri uvjetima SWE od 150 °C, 5 minuta i omjeru tekuće/kruto

od 20 ml/g. Ukupni sadržaj ugljikohidrata u svim ekstraktima pokazao je trend smanjenja s povećanjem temperature i vremena ekstrakcije. Takvo smanjenje sadržaja ugljikohidrata moglo bi biti uzrokovano degradacijom šećera u HMF, furfural, 5-MF i slične spojeve pri višim temperaturama. Izuzetak su bili samo ekstrakti refabrikata i prašine dobiveni pri temperaturi od 150 °C gdje se ukupni sadržaj ugljikohidrata povećava s 5 na 25 minuta pri omjeru otapala i krutine od 20 ml/g. Slične rezultate dobili su i Jing i sur. (2016) gdje je povećanje temperature iznad 90 °C, kao i produljeno vrijeme ekstrakcije vrućom vodom, smanjilo ukupni sadržaj polisaharida u duhanskom otpadu.

Koncentracije 5-HMF-a, furfurala i 5-MF-a rasle su s vremenom ekstrakcije i temperature, dok su se na 250 °C počele smanjivati s vremenom ekstrakcije. Najviše koncentracije ta tri spoja detektirane su u ekstraktima iz lista duhana (2,290 % 5-HMF i 0,338 % za 5-MF) pri uvjetima SWE od 200 °C, 25 minuta i omjeru tekuće/kruto 30 ml g i 0,615 % za furfural u uvjetima 250 °C, 5 minuta i uz omjer tekuće kruto od 20 ml/g. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti vrlo bliska veza između sadržaja ugljikohidrata i sadržaja 5-HMF-a, furfurala i 5-MF-a. Smanjenje sadržaja ugljikohidrata prati povećanje 5-HMF-a, furfurala i 5-MF-a. Ovi su rezultati potvrdili da su 5-HMF, furfural i 5-MF proizvodi hidrotermalne razgradnje ugljikohidrata kod SWE te su u skladu s drugim istraživanjima. Na primjer, u istraživanju koje su proveli Martin i sur. (2002) furfural i HMF dobiveni su kao produkt dehidracije pentoza i heksoza pod utjecajem visoke temperature i produljenog vremena obrade.

#### **5.4.2. Statistička analiza parametara SWE**

U daljnjoj statističkoj analizi SWE u obzir su uzeti iskorištenje ekstrakcije, sadržaj nikotina i sadržaj klorogenske kiseline kao dominantnog fenolnog spoja u svim ekstraktima dobivenih pomoću SWE. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva, za svaku pojedinačnu vrstu uzorka, evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 59-70**.

Regresijski modeli za sva tri ispitivana odziva, za otpad i tri frakcije duhanskog otpada pri SWE pokazali su statistički značajni utjecaj s obzirom na promatrane  $p$ -vrijednosti (od  $<0,0001$  do  $0,0096$ ) sa  $R^2$  vrijednostima u rasponu od  $0,897$  do  $0,983$ . Također,  $p$ -vrijednost svih regresijskih modela bila je ispod  $0,05$ , što ukazuje na statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive.

Nedostatak modela nije bio značajan ( $p>0,05$ ) za sve promatrane odzive što potvrđuje adekvatnost dobivenih polinoma jednadžbi drugog i trećeg reda.

Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara na iskorištenje ekstrakcije, temperatura je jedini parametar koji je imao statistički značajan utjecaj za list i sve tri frakcije otpada i to za list

visoku statističku značajnost ( $p < 0,0001$ ), a za refabrikat, prašinu i rebro statističku značajnost na razini  $p > 0,05$ . Na iskorištenje za SWE lista, statistički značajno ( $p > 0,05$ ) je utjecalo vrijeme i kvadratni član omjera tekuće/kruto (**Tablica 59**), dok je pri SWE refabrikata statistički značajno ( $p > 0,05$ ) utjecalo vrijeme ekstrakcije, omjer tekuće/kruto, interakcija između vremena i omjera tekuće/kruto te kvadratni članovi temperature i omjera tekuće kruto (**Tablica 60**). Za iskorištenje SWE prašine statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) su imali omjer tekuće/kruto, interakcija temperature i omjera tekuće/kruto i kvadratni član vremena ekstrakcije (**Tablica 61**). Na iskorištenje rebra, ostali parametri nisu imali statistički značajan utjecaj (**Tablica 62**).

Temperatura je imala statistički značajan utjecaj i na sadržaj klorogenske kiseline, i to visoko značajan statistički utjecaj ( $p < 0,0001$ ) kod ekstrakata lista, refabrikata i prašine i značajan utjecaj kod ekstrakta rebra ( $p > 0,05$ ). Od ostalih parametara, na sadržaj klorogenske kiseline u listu i refabrikatu statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) je imalo vrijeme (**Tablica 63 i 64**), dok je kod SWE prašine statistički značajan ( $p > 0,05$ ) utjecaj još imalo vrijeme, interakcija temperature i omjera tekuće/kruto te kvadratni član temperature (**Tablica 65**). Na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu rebra pri SWE statistički značajan ( $p > 0,05$ ) utjecaj, osim temperature, imali su vrijeme i omjer tekuće/kruto (**Tablica 66**).

Kao i u slučaju iskorištenja i sadržaja klorogenske kiseline, tako i za sadržaj nikotina temperatura je imala statistički značajan utjecaj za list i sve tri frakcije rebra i to visoku statističku značajnost ( $p < 0,0001$ ) za list i rebro i statističku značajnost na razini  $p > 0,05$  za refabrikat i prašinu. Od ostalih parametara na sadržaj nikotina u ekstraktu lista, statistički značajno su utjecali vrijeme, kvadratni član temperature i kvadratni član omjera tekuće/kruto (**Tablica 67**) dok su na sadržaj nikotina u ekstraktu refabrikata statistički značajno utjecali ( $p > 0,05$ ) vrijeme, interakcija temperature i vremena i kvadratni član omjera tekuće/kruto (**Tablica 68**). Na sadržaj nikotina u ekstraktu prašine pri SWE statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) je imalo vrijeme, omjer tekuće/kruto, interakcija vremena i omjera tekuće/kruto, kvadratni član temperature i kvadratni član omjera tekuće/kruto dok su interakcija temperature i vremena te kvadratni član vremena imali statistički visoko značajan utjecaj ( $p < 0,0001$ ) (**Tablica 69**). Na sadržaj nikotina u ekstraktu rebra pri SWE statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) je imao omjer tekuće/kruto i kvadratni članovi temperature, vremena i omjera tekuće/kruto, dok je interakcija temperature i vremena imala visoko značajan statistički utjecaj ( $p < 0,0001$ ) (**Tablica 70**).

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za iskorištenje ekstrakcije, za list i otpad (**Slike 36, 37, 38, 39**), vidljiv je sličan trend za iskorištenje u pogledu utjecaja temperature, gdje se s porastom temperature smanjivalo iskorištenje ekstrakcije. Kod lista duhana, refabrikata i rebra zajedno s povećanjem vremena ekstrakcije, došlo je do blagog pada u iskorištenju ekstrakcije, dok je

za prašinu utjecaj vremena bio dvojak, odnosno s povećanjem vremena ekstrakcije od 5 do 15 minuta, iskorištenje je opadalo nakon čega je od 15 do 25 minute raslo. Također, s porastom omjera tekuće/kruto, vidljiv je blagi porast u iskorištenju za sve promatrane uzorke. Iz svih dijagrama za sadržaj klorogenske kiseline (**Slike 40, 41, 42, 43**) vidljivo je da u cijelom eksperimentalnom rangu s porastom temperature opada sadržaj klorogenske kiseline, vjerojatno zbog degradacije na visokim temperaturama. Također, produženo vrijeme ekstrakcije imalo je blago negativan utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline, dok je za porast omjera tekuće/kruto jedino vidljiv porast sadržaja klorogenske kiseline u ekstraktima rebra.

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) za sadržaj nikotina primjetno je da se sadržaj nikotina u ekstraktima povećava s vremenom ekstrakcije. Kod lista je s porastom omjera tekuće/kruto od 10 do 20 ml/g došlo do porasta sadržaja nikotina, ali s daljnjim povećanjem omjera tekuće/kruto, sadržaj nikotina opada. Kod otpada je vidljiv nešto drugačiji trend gdje je s porastom omjera tekuće kruto od 5 do 25 ml/g sadržaj nikotina opadao, a zatim do 30 ml/g rastao. Za ekstrakte lista temperatura je imala pozitivan utjecaj na sadržaj nikotina, dok je za sve uzorke otpada zajedno s porastom temperature opadao sadržaj nikotina.

Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije za MAE lista duhana i duhanskog otpada prikazani su u **Tablici 71**.

## **5.5. SC-CO<sub>2</sub> EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ DUHANSKOG OTPADA**

Značajan je broj parametara koji utječu na SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju, stoga je izuzetno važno odrediti utjecaj onih najznačajnijih parametara na konačni sastav ekstrakata duhanskog otpada i iskorištenje ekstrakcije. U **Tablicama 72-75** prikazan je utjecaj vremena ekstrakcije na iskorištenje gdje je vidljivo da s povećanim vremenom ekstrakcije raste i iskorištenje ekstrakcije. U **Tablicama 76-79** prikazan je utjecaj temperature ekstrakcije na iskorištenje gdje je kod lista najveće iskorištenje postignuto pri temperaturi od 50 °C. Za refabrikat je to bila temperatura od 40 °C. S obzirom da su iskorištenja kod ekstrakata prašine i rebra izuzetno mala, ne može se govoriti o izravnom utjecaju temperature na njih. Najveći utjecaj na iskorištenje ekstrakcije je imao tlak gdje je kod lista i sve tri frakcije vidljiv porast iskorištenja s porastom tlaka (**Tablice 80-83**). S obzirom na to da je SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija dala izuzetno niska iskorištenja za prašinu i rebro, daljnje analize i optimizacija (prema **Tablici 10**) su provedeni na refabrikatu. Također, s obzirom da je SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija tehnika koja zahtjeva iznimno visoka ulaganja u opremu, provođenje dugotrajnih ekstrakcija s vrlo malim iskorištenjem nije ekonomski opravdano.

### 5.5.1. Ekstrakcija isparljivih spojeva, masnih kiselina i nikotina

Tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz refabrikata promatrana su dva parametra ekstrakcije i to: temperatura u rasponu od 40–80 °C i tlak od 100 do 300 bara prema CCD prikazanom u **Tablici 10**. U dobivenim ekstraktima primjenom plinske kromatografije određeni su profili isparljivih spojeva (**Tablica 84**), sadržaj nikotina (**Tablica 85**) i masno-kiselinski sastav (**Tablica 86**). Prema dobivenim rezultatima, prikazanim u **Tablici 85**, iskorištenje ekstrakcije se kretalo od 0,500 do 4,030 %. Najveće iskorištenje dobiveno je pri najvišem tlaku od 300 bara i temperaturi od 60 °C. U usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, najveće dobiveno iskorištenje SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcijom (4,030 %) slično je iskorištenju dobivenom Soxhlet ekstrakcijom (4,580 %). Na 200 bara, iskorištenje se povećavalo s porastom temperature od 40 °C do 60 °C, nakon čega se nije značajno mijenjalo. Pri 300 bara, iskorištenje je također raslo od 40 °C do 60 °C, a zatim blago opadao, dok se pri 100 bara iskorištenje smanjivalo u cijelom i promatranom temperaturnom rangu. Kada se promatra temperatura od 40 °C, iskorištenje raste s povećanjem tlaka od 100 do 200 bara, a zatim se smanjuje, dok na temperaturama od 60 i 80 °C iskorištenje raste s povećanjem tlaka. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Xu i sur. (2004) gdje je provedena SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija s ciljem dobivanja isparljivih spojeva iz lista duhana. U spomenutom istraživanju iskorištenje ekstrakcije se značajno povećavalo do 60 °C, a daljnjim povećavanjem temperature se smanjivalo, vjerojatno zbog povećanja isparljivosti ovih spojeva na višim temperaturama.

Profil isparljivih spojeva važan je čimbenik pri određivanju kvalitete lista duhana jer izravno utječe na kvalitetu arome i ekonomsku vrijednost lista. Osim toga, ti spojevi doprinose različitim bioaktivnostima lista duhana, uključujući antimikrobno, antikorozivno (Stojanović i sur., 2000; Popova i sur., 2015) i antidijabetičko djelovanje (Zaidan i sur., 2019). Primijenjene niske temperature tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije mogu pomoći u izbjegavanju toplinskih degradacija termolabilnih spojeva i povećati učinkovitost ekstrakcije (Ormeño i sur., 2011). U **Tablici 84** prikazani su isparljivi spojevi identificirani u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima. Općenito, profil isparljivih spojeva bio je sličan u svim SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima, ali značajno različit od ekstrakta dobivenim konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom.

Nikotin, neofitadien i duva-4,8,13-trien-1,3-diol bili su dominantni spojevi prisutni u svim SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima kao i u UAE ekstraktima (**Tablice 16-20**). Međutim, postoje značajne razlike u profilima isparljivih spojeva dobivenih pomoću ove dvije tehnike ekstrakcije. Naime, u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima refabrikata detektirano je 12 spojeva dok su u UAE ekstraktima refabrikata detektirana 23 spoja što ukazuje na veću selektivnost SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije. Također, 2,3'-dipiridil, 3-okso- $\alpha$ -ionol, kotinin, solavetivon, heksahidrofarnezil-aceton, (*E,E*)-farnezil-aceton i heksadekanska kiselina bili su prisutni samo u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima, dok u UAE ekstraktima

nisu detektirani. Slični profili isparljivih spojeva mogu se naći i u literaturno dostupnim podacima, npr. u istraživanju koju su objavili Stojanović i sur. (2000) na listu duhana. Također, dobiveni rezultati su sličnim onima dobivenim u istraživanju Xu i sur. (2004) gdje su SC-CO<sub>2</sub> ekstrakti lista duhana sadržavali neofitadien, nikotin, heksadekansku kiselinu i oktadeka-9,12,15-triensku kiselinu kao dominantne spojeve.

Ekstrakt dobiven konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom pokazao je značajno drugačiji profil isparljivih spojeva pri čemu su u ekstraktu detektirani samo nikotin, neofitadien, duva-4,8-13-trien-1,3-diol i kotinin. Također, u svim SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima određen je fitol kao diterpenoid karakterističan za duhan koji pokazuje antibakterijsko djelovanje (Rajab i sur., 1998). Zanimljivo je da je u nekim ekstraktima detektiran kotinin, metabolit nikotina. Od literaturno dostupnih podataka, jedino je u istraživanju Radulović i sur. (2006) detektiran kotinin u etil acetatnim ekstraktima lista duhana (tip: Otlja). Najveća koncentracija (*E,E*)-farnezil-acetona bila je prisutna u SC-CO<sub>2</sub> ekstraktima dobivenim pri najnižoj temperaturi (40 °C). Prema Lewinsohn i sur. (2005) (*E,E*)-farnezil-aceton potječe od fitoena ili fitofluena. Koristi se u industriji mirisa zbog cvjetnog, kremastog i slabog vinskog mirisa (Leffingwell i sur., 2013).

Nikotin je bio dominantni spoj u svim ekstraktima te je njegov sadržaj kvantificiran pomoću eksternog standarda. Sadržaj nikotina u ekstraktu refabrikata kretao se od 0,362 do 1,585 %. Pri tlakovima od 100 i 200 bara količina ekstrahiranog nikotina povećavala se s porastom temperature, dok se za tlak od 300 bara količina nikotina povećavala od 40 do 60 °C, a zatim se smanjivala. Također, sadržaj nikotina je rastao s povećanjem tlaka. Najveći sadržaj nikotina dobiven je pri uvjetima ekstrakcije od 300 bara i 60 °C. Slično je dobiveno u istraživanju Rincón i sur. (1998) gdje je najveća koncentracija nikotina postignuta pri temperaturnom rasponu od 50-60 °C tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, a iznad 60 °C koncentracija nikotina počela se smanjivati. Ekstrakt dobiven konvencionalnom ekstrakcijom pokazao je slične koncentracije nikotina. Također, dobivene koncentracije nikotina bile su nešto niže nego u istraživanju autora Fischer i sur. (1996). Međutim, u tom istraživanju korišteni su listovi duhana, te s obzirom da se u ovom slučaju radi o otpadu, niže koncentracije su očekivane.

Procesom saponifikacije, slobodne masne kiseline su oslobođene iz estera cijepanjem esterskih veza te određene pomoću GC-FID metode. Prethodno objavljena istraživanja potvrdila su da solanesol u listu duhana može biti prisutan u slobodnom i vezanom obliku kao ester (Yan i sur., 2015; Zhu i sur., 2006). U esterima je solanesol esterificiran palmitinskom, linolnom, linolenskom, miristinskom i oleinskom kiselinom (Tang i sur., 2007). To je potvrđeno i u ovom istraživanju s malim razlikama, budući da miristinska kiselina nije identificirana, ali je stearinska kiselina pronađena u značajnoj količini. Koncentracije slobodnih masnih kiselina u ekstraktima refabrikata prikazane su u **Tablici 86**. Osim ekstrakta 2 (dobivenog pri 300 bara i

40 °C) i ekstrakta 3 (dobivenog pri 100 bara i 80 °C) svi ekstrakti sastojali su se od više od 30 % masnih kiselina. Dominantna masna kiselina identificirana u svim ekstraktima bila je palmitinska kiselina, a zatim su slijedile linolna i linolenska kiselina, dok su stearinska i oleinska kiselina zastupljene u manjim količinama.

Razlike u masnokiselinskom sastavu između ekstrakata bile su minimalne i gotovo neovisne o primijenjenim uvjetima ekstrakcije. Općenito, najniži sadržaj masnih kiselina dobiven je pri najnižem tlaku (100 bara) i pri najvišoj temperaturi (80 °C). Najveći sadržaj masnih kiselina dobiven je pri 40 °C, iz čega proizlazi, da je ekstrakcija masnih kiselina bila najučinkovitija pri temperaturi od 40 °C i tlaku od 100 i 200 bara. Kod ekstrakta dobivenog konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom, palmitinska kiselina je bila dominantna (13,9 %) masna kiselina, zatim su slijedile linolenska i linolna kiselina. Sadržaj stearinske i oleinske kiseline bio je značajno niži nego kod SC-CO<sub>2</sub> ekstrakata.

### **5.5.2. Statistička analiza parametara SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije**

U daljnjoj statističkoj analizi SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije u obzir su uzeti iskorištenje ekstrakcije i sadržaj nikotina. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva, evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 87 i 88**.

Regresijski modeli za dva ispitivana odziva za refabrikat pokazali su statistički značajan utjecaj s obzirom na promatrane  $p$ -vrijednosti ( $p=0,0001$  i  $p<0,0001$ ) sa  $R^2$  vrijednostima 0,969 i 0,935. Također,  $p$ -vrijednost svih regresijskih modela bila je ispod 0,05, što ukazuje na statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive.

Nedostatak modela nije bio značajan ( $p>0,05$ ) za sve promatrane odzive što potvrđuje adekvatnost dobivenih polinoma jednadžbi drugog i trećeg reda.

Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara na iskorištenje ekstrakcije, tlak je imao statistički visoko značajan utjecaj ( $p<0,0001$ ), dok su interakcija između tlaka i temperature, te kvadratni članovi tlaka i temperature, imali značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) (**Tablica 87**).

Na sadržaj nikotina, statistički visoko značajan utjecaj ( $p<0,0001$ ) imali su tlak, temperatura i njihova interakcija, dok su kvadratni članovi tlaka i temperature imali značajan utjecaj ( $p<0,05$ ) (**Tablica 88**).

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) vidljiv je izuzetno značajan utjecaj tlaka na iskorištenje SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije refabrikata (**Slika 48**). U istraživanom području, s porastom tlaka raslo je i iskorištenje ekstrakcije. U području od 100 do 200 bara porast iskorištenja je značajan, dok je od 200 do 300 bara iskorištenje konstantno. S porastom temperature od 40 do 64 °C,

iskorištenje je raslo s porastom temperature, dok daljnjim porastom temperature do 80 °C dolazi i do blagog pada iskorištenja.

Porastom tlaka od 100 do 200 bara dolazi do blagog pada sadržaja nikotina, dok se daljnjim povećanjem tlaka u ispitivanom području (do 300 bar) sadržaj nikotina povećava. Također, s porastom temperature rastao je i sadržaj nikotina u cijelom ispitivanom području i to u području od 40 do 64 °C taj je rast bio intenzivan, a daljnjim povećanjem temperature do 80 °C porast je bio blag (**Slika 49**).

Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije CCD plana pokusa za SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju refabrikata prikazani su u **Tablici 89**.

## **5.6. EKSTRAKCIJA DUHANSKOG OTPADA (REFABRIKATA) PRIMJENOM DVOSTUPANJSKE EKSTRAKCIJE (SC-CO<sub>2</sub> + SWE)**

Dvostupanjska ekstrakcija primijenjena u ovoj disertaciji je podrazumjevala proces SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, nakon čega je ostatak iz reaktora podvrgnut SWE kako je to opisano u **Poglavlju 4.5.2**. Glavni cilj dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) bio je dobiti ekstrakte bogate nikotinom i fenolnim spojevima. Naime, SC-CO<sub>2</sub> je poznat kao iznimno dobro nepolaro otapalo te je ovom ekstrakcijskom tehnikom dobiven ekstrakt koji sadrži manje polarne spojeve (nikotin, masne kiseline i isparljive spojeve). Iz tog se razloga, a u svrhu potpunog iscrpljivanja biljnog materijala, pristupilo se valorizaciji ostataka iz reaktora nakon provedene SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije. Taj je ostatak podvrgnut SWE prema prethodno definiranim optimalnim parametrima (23 min, 150 °C, 28 ml/g), a kako bi se dobili polarniji spojevi.

### **5.6.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva i nikotina**

Iskorištenja dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) prikazana su u **Tablici 90**. Za usporedbu učinkovitosti predložene tehnike ekstrakcije, ekstrakcija refabrikata je provedena pri istim uvjetima SWE, ali bez prethodne SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije. Uspoređujući iskorištenja ekstrakcije, primjetno je da su najveća iskorištenja dobivena pri 80 °C i 300 bara (74,052 %) i 60 °C i 300 bara (65,827 %) koji su bili znatno veći nego kod refabrikata ekstrahiranog sa supkritičnom vodom (54,571 %). Može se zaključiti da ekstrakcija nekih spojeva iz biljnog materijala SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcijom dovodi do oslobađanja nekih drugih spojeva iz biljnog materijala koji su topljivi u supkritičnoj vodi. Također, nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije nepolarnih spojeva, zaostali materijal iz reaktora je bio koncentriraniji sa bioaktivnim spojevima.

HPLC metodom utvrđen je sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva, nikotina i degradacijskih produkata, dok su antiradikalna aktivnost i ukupni fenoli određeni spektrofotometrijski (**Tablica**



**90 i 91**). U dobivenim ekstraktima nikotin je bio dominantni spoj. U ekstraktima 1, 2, 5 i 7 dobiven je najveći sadržaj nikotina. Primjetno je da je za te ekstrakte, pri SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciji dobiven niži sadržaj nikotina, a masne kiseline u većim koncentracijama. Isto tako, najniže koncentracije nikotina dobivene su u ekstraktima 4, 6 i 8, upravo u onim uzorcima koji su tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije imali najveći sadržaj nikotina. Također, sadržaj nikotina dobivenog u ekstraktu bez prethodne SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije bio je niži od onih dobivenih dvostupanjskom ekstrakcijom (SC-CO<sub>2</sub> + SWE). Pretpostavka je da se tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije eliminiraju nepolarni spojevi što omogućava lakšu difuziju i otapanje polarnih spojeva u supkritičnoj vodi.

Povećanje sadržaja nikotina može se objasniti s kemijskim svojstvima nikotina. Nikotin se u listu duhana nalazi u tri oblika kao slobodan, monoprotoniran (+1) i diprotoniran (+2). Slobodni oblik ima nepolarni karakter i lako isparava. Protonirani oblici nikotina imaju polarni karakter i neisparljivi su (Pankow i sur., 2020; Ashley i sur., 2009). Dakle, slobodni oblik nikotina isparava na nižim temperaturama od onih potrebnih za isparavanje protoniranih oblika. Niske primijenjene temperature tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije i nepolarni karakter SC-CO<sub>2</sub> utjecale su na ekstrakciju samo slobodnog oblika nikotina, dok su na višim temperaturama SWE ekstrahirani protonirani oblici (koji su također prisutni u većim količinama od slobodne baze). Rezultate dobivene u ovoj disertaciji moguće je usporediti s onima od Callicutt i sur. (2006) gdje je utvrđeno da dodavanje amonijaka tijekom proizvodnje cigareta može poboljšati prijelaz protoniranih oblika u slobodni oblik i time povećati ukupnu količinu dostupnog hlapljivog nikotina.

Od fenolnih spojeva detektirani su klorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina i rutin (**Tablica 90**). Sadržaj klorogenske kiseline bio je u rasponu od 0,458 do 0,740 %, neoklorogenske kiseline od 0,240 do 0,534 %. Sadržaj rutina bio je do 1,025 %. Najveći sadržaj klorogenske kiseline i neoklorogenske kiseline utvrđen je kod uzorka koji je ekstrahirano pomoću SC-CO<sub>2</sub> pri 100 bara i 40 °C. Dobiveni ekstrakti pokazali su antiradikalno djelovanje u rasponu od 77,891 do 93,347 %, slično rezultatima dobivenim za UAE i SWE.

Nastanak degradacijskih produkata tijekom SWE moguć je zbog visokih temperatura kako je to već spomenuto u **Poglavlju 2.3.3.** Međutim, u ovom slučaju SWE je provedena na relativno niskoj temperaturi (150 °C) po prethodno uspostavljenim optimalnim parametrima. U **Tablici 91** prikazane su koncentracije 5-HMF-a, furfurala i 5-MF-a u ekstraktima dobivenim dvostupanjskom ekstrakcijom duhanskog otpada. Općenito, dobivene koncentracije ovih spojeva bile su niske i niže od onih kod SWE, vjerojatno zbog niske temperature od 150 °C tijekom SWE.

### 5.6.2. Statistička analiza parametara dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE)

U daljnjoj statističkoj analizi dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) promatran je utjecaj parametara SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije kao prvog stupnja ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije i sadržaj nikotina. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva, evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 92 i 93**.

Regresijski modeli za dva ispitivana odziva za refabrikat pokazali su statistički značajan utjecaj s obzirom na promatrane  $p$ -vrijednosti ( $p=0,0005$  i  $p<0,0001$ ) sa  $R^2$  vrijednostima 0,896 i 0,988. Također,  $p$ -vrijednost svih regresijskih modela bila je ispod 0,05, što ukazuje na statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive.

Nedostatak modela nije bio značajan ( $p>0,05$ ) za sve promatrane odzive što potvrđuje adekvatnost dobivenih polinoma jednadžbi drugog i trećeg reda.

Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara na iskorištenje ekstrakcije, tlak i temperatura primijenjeni tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije imali su statistički značajan ( $p<0,05$ ) utjecaj na iskorištenje nakon dvostupanjske ekstrakcije SC-CO<sub>2</sub> + SWE. Također, statistički značajan ( $p<0,05$ ) utjecaj imala je i interakcija tlaka i temperature, kao i kvadratni član tlaka.

Na sadržaj nikotina nakon dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) visoko statistički značajno ( $p<0,0001$ ) su utjecali tlak, temperatura i njihova interakcija dok su kvadratni članovi temperature i tlaka imali statistički značajan utjecaj ( $p>0,05$ ).

Iz trodimenzionalnih dijagrama (3D) vidljiv je izuzetno značajan utjecaj tlaka na iskorištenje dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) refabrikata (**Slika 50**). U istraživanom području, s porastom tlaka raslo je i iskorištenje ekstrakcije. U području od 100 do 150 bar taj je porast blag, dok je od 150 do 300 bara intenzivan. Također je porast temperature tijekom SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije imao pozitivan utjecaj na porast iskorištenja nakon dvostupanjskog procesa SC-CO<sub>2</sub> + SWE u cijelom ispitivanom rasponu.

Na sadržaj nikotina nakon dvostupanjske ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) pozitivan utjecaj je imao i porast tlaka i porast temperature gdje je s njihovim porastom rastao i sadržaj nikotina u ekstraktu refabrikata u cijelom ispitivanom rasponu (**Slika 51**).

Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda, nakon implementacije CCD za dvostupanjsku ekstrakciju (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) refabrikata, prikazani su u **Tablici 94**.

## 5.7. OPTIMIZACIJA I USPOREDBA UČINKOVITOSTI PRIMIJENJENIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

Primjenom različitih ekstrakcijskih tehnika, kao i izmjenom procesnih uvjeta uočene su promjene u kemijskom sastavu dobivenih ekstrakata, što direktno upućuje na izravnu povezanost kako primijenjene ekstrakcije tehnike tako i procesnih parametara na kvalitetu i količinu dobivenog ekstrakta. Primjena UAE kao i MAE omogućila je ekstrakciju fenolnih spojeva kao i nikotina (**Tablice 12-19 i 34-37**). Ipak, primjena UAE u industrijskom mjerilu je još uvijek u razvoju te rezultati dobiveni u laboratorijskom mjerilu nisu u potpunosti mjerodavni. S druge strane, primjena mikrovalova je uključivala relativno visoke temperature (80-120 °C), ali prijenos topline (što je vidljivo u **Prilogu 1**) je bio izuzetno brz i efikasan, te nije uočen značajan pad sadržaja bioaktivnih spojeva, unatoč primijenjenim temperaturama (**Tablice 34-37**). Primjenom obje metode detektirani su nikotin kao dominantni spoj te klorogenska kiselina i rutin kao dominantni fenolni spojevi. Primjena SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije dala je mnogo niža iskorištenja (**Tablica 84**), no s obzirom na to da se radi o izrazito nepolarnom otapalu, a udio nepolarnih spojeva u listu i otpadu duhana je prirodno mnogo manji, ova tehnika ekstrakcije se ne može smatrati manje učinkovitom. Tome u prilog govore i spojevi detektirani u ovim ekstraktima, nikotin, masne kiseline i isparljivi spojevi (**Tablica 84 i 86**). S obzirom na to da je SWE podrazumijevala primjenu jako visokih temperatura (150-250 °C) mnogo je širi raspon detektiranih spojeva (klorogenska kiselina, rutin, nikotin, 3,4-DHBA, nikotinamid, nikotinska kiselina, 5-HMF, 5-MF, furfural) (**Tablice 51-58**). Porastom koncentracija pojedinih spojeva (3,4-DHBA, nikotinamid, nikotinska kiselina, 5-HMF, 5-MF, furfural) na višim temperaturama, došlo se do zaključka da se radi o degradacijskim produktima. S obzirom na dobivene razlike ali i primijećena ograničenja, nameće se potreba za optimizacijom navedenih procesa ekstrakcije.

Primjenom metode odzivnih površina u ovom istraživanju definirani su optimalni procesni uvjeti za svaku od primijenjenih inovativnih tehnika ekstrakcija, UAE, MAE, SWE i SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, kao i za dvostupanjsku ekstrakciju (SC-CO<sub>2</sub> + SWE). Kriteriji za optimizaciju MAE i UAE bili su maksimalno iskorištenje te maksimalan sadržaj nikotina i klorogenske kiseline, za SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju su to bili maksimalno iskorištenje i maksimalan sadržaj nikotina, dok su za SWE to bili maksimalno iskorištenje te maksimalan sadržaj nikotina i klorogenske kiseline, te minimalan sadržaj nepoželjnih degradacijskih produkata (5-HMF, furfural, 5-MF). Kod dvostupanjskog procesa ekstrakcije definirani su optimalni uvjeti prvog stupnja ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija), dok su za drugi stupanj (SWE) korišteni prethodno definirani optimalni parametri. Dobiveni optimalni parametri prikazani su u **Tablicama 95, 96 i 97**. Iz navedenih tablica vidljivo je da se optimalni parametri razlikuju za svaku frakciju otpada, odnosno da je

pravilno razdvajanje otpada tijekom prerade lista i rukovanje istim ključno kako bi se duhanski otpad kasnije mogao valorizirati kao polazni materijal za ekstrakcije. Također, u usporedbi s listom, kao polaznom sirovinom od koje nastaje otpad, vidljivo je da je refabrikat kao frakcija najbližiji listu, a slijede ga prašina pa zatim rebro. Također, pokazano je da ne postoji uniformna metoda ekstrakcije, niti procesni parametri koji bi bili primjenjivi za svaku vrstu otpada. Za svaku pojedinačnu tehniku ekstrakcije kao i frakciju otpada potrebno je definirati optimalne uvjete, posebno kada se radi o SWE gdje je primjena visokih temperatura rezultirala pojavom degradacijskih produkata.

**Slika 52** prikazuje sumarni grafički prikaz maksimalnih iskorištenja, maksimalnih udjela klorogenske kiseline i nikotina u ekstraktima duhanskog otpada (refabrikata) dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije. Za refabrikat najveće iskorištenje ekstrakcije dobiveno je primjenom dvostupanjske ekstrakcije (74,05 %), zatim primjenom MAE (69,08 %), a slijede ih SWE (53,49 %) i UAE (47,49 %). Sadržaj nikotina je također bio najviši u ekstraktima dobivenim primjenom dvostupanjske ekstrakcije (4,67 %), a zatim u ekstraktima dobivenim SWE (4,14 %) i MAE (3,71 %). U slučaju klorogenske kiseline, najveći sadržaj je dobiven primjenom UAE (0,804 %) dok je nešto niži sadržaj (0,740 %) dobiven primjenom dvostupanjske ekstrakcije. Najprikladnijom tehnikom ekstrakcije se pokazao dvostupanjski proces (SC-CO<sub>2</sub> + SWE) koji omogućava uklanjanje nepolarnih spojeva u prvom stupnju te povećano iskorištenje i ekstrakciju željenih spojeva u drugom stupnju. Također, kombinacijom ove dvije tehnike ekstrakcije moguće je ekstrahirati različite forme nikotina. U usporedbi s konvencionalnom tehnikom ekstrakcije te literaturno dostupnim podacima za konvencionalne ekstrakcije, ove četiri ekstrakcijske tehnike pokazale su se superiornim u pogledu iskorištenja ali i sadržaja bioaktivnih spojeva.

Rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na mogućnost primjene različitih inovativnih tehnika ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada. Tako dobiveni ekstrakti imaju mogućnost primjene u drugim procesima ili proizvodima. Također, materijal koji zaostaje nakon ekstrakcije postaje prikladan za odlaganje ili kao sirovina za anaerobno ili aerobno kompostiranje.

## **6. ZAKLJUČCI**

Slijedom rezultata dobivenih u ovoj disertaciji može se zaključiti sljedeće:

- usporedbom tri frakcije otpada (refabrikat, duhanska prašina i rebro) s listom kao polaznom sirovinom od koje oni nastaju, uočeno je kako je refabrikat najbliži listu po sadržaju bioaktivnih spojeva, a slijede ga prašina, dok se rebro ponajviše razlikuje od lista,
- refabrikat predstavlja frakciju otpada koja ima najveću uporabnu vrijednost, u pogledu valorizacije otpada kroz ekstrakcije bioaktivnih spojeva, gdje se dobiva ekstrakt koji ima značajnu veću ekonomsku vrijednost od alternativnih načina uporabe refabrikata (duhanska folija),
- duhanski otpad pokazao se bogatim izvorom nikotina i klorogenske kiseline, dok su ostali fenolni i isparljivi spojevi bili prisutni u nižim koncentracijama,
- u rezultatima ove disertacije utvrđen je značajan utjecaj procesnih parametara četiri inovativne tehnike ekstrakcije (UAE, MAE, SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija i SWE), na iskorištenje, i sadržaj ciljanih spojeva (klorogenska kiselina i nikotin) u ekstraktima duhanskog otpada,
- sve četiri primijenjene ekstrakcijske tehnike, pokazale su se učinkovitim kako u pogledu iskorištenja ekstrakcije, tako i u dobivenom sadržaju bioaktivnih spojeva, a osobito kada se usporede s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije,
- SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcija pokazala je visoku selektivnost prema nepolarnim spojevima (masne kiseline, isparljivi spojevi i nikotin),
- UAE i MAE pokazale su se učinkovitim za ekstrakciju fenolnih spojeva i nikotina,
- SWE se pokazala visokoselektivnom i najpogodnijom za ekstrakciju nikotina i fenolnih spojeva, no na višim temperaturama zabilježena je pojava degradacijskih produkata,
- dvostupanjska ekstrakcija SC-CO<sub>2</sub> + SWE dala je najbolje rezultate te predstavlja inovativan pristup valorizaciji ove vrste otpada; također, ovom tehnikom ekstrakcije bilo je moguće dobiti znatno veći sadržaj nikotina, što se može pripisati različitim svojstvima neprotiniranih i protoniranih oblika nikotina,
- dobiveni rezultati ukazuju na prednosti primjene inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada pri čemu je primijenjeno kratko vrijeme ekstrakcije (maksimalno 45 minuta), a uporaba organskih otapala potpuno izbjegnuta,
- također, kombinacijom inovativnih tehnika ekstrakcije, moguće je dobiti materijal, potpuno iscrpljen od bioaktivnih spojeva, prikladan za odlaganje, kompostiranje ili proizvodnju energenata,

- konačno, dobiveni rezultati mogli bi imati važan utjecaj na rješavanje povećane količine duhanskog otpada i tako doprinijeti globalnom održivom gospodarenju industrijskim otpadom,
- provedeno istraživanje ima mogućnost primjene i u drugim industrijskim sektorima koji se susreću s problemom otpada koji sadrži različite visokovrijedne spojeve koji se mogu inkorporirati u nove proizvode; u konačnici, dobiveni rezultati su u skladu s trenutnim istraživačkim trendovima na međunarodnoj razini, a sve elaborirano ranije ukazuje na važnost tematike ove disertacije koja nadilazi nacionalne okvire i u skladu je s UN-ovim Ciljevima održivog razvoja.

## **7. LITERATURA**



- Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S: Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing* 87:145–151, 2009
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkričnim CO<sub>2</sub> iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno–tehnoški fakultet Osijek, Osijek, 2015.
- Alara OR, Abdurahman NH, Olalere OA: Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing* 107:36–48, 2018.
- Al–Tamrah SA: Spectrophotometric determination of nicotine. *Analytica Chimica Acta* 379:75–80, 1999.
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson, DG, Lightfoot DA: Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 6:42, 2017.
- Ashley DL, Pankow JF, Tavakoli AD, Watson CH: Approaches, challenges, and experience in assessing free nicotine. U *Nicotine Psychopharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology*, str. 437–456. Springer, Berlin, 2009.
- Aydar AY: Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. U *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*, str.157–169. InTech, London, 2018.
- Azmir J, Zaidula SM, Rahmana MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul F MHA, Ghafoorc K, NAN, Omar AKM: Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering* 117:426–436, 2013.
- Babić J, Jokić S, Strelec I, Jozinović A: Katalog opreme (Equipment catalouge), Prehrambeno–tehnoški fakultet Osijek, Osijek, 2021. <http://www.ptfos.unios.hr/images/dokumenti/katalog-opreme-ptf-2021-01.pdf>
- Bagade SB, Patil M: Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: A review. *Critical reviews in analytical chemistry* 15:1-12, 2019.
- 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.
- Baliga V, Sharma R, Miser D, McGrath T, Hajaligol M: Physical characterization of pyrolyzed tobacco and tobacco components. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 66:191–215, 2003.
- Banožić M, Aladić K, Jerković I, Jokić S: Volatile organic compounds of tobacco leaves versus waste (scrap, dust, and midrib): extraction and optimization. *Journal of the science of food and agriculture* 101:1822-1832, 2021.a
- Banožić M, Babić J, Jokić S: Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste—a review. *Industrial Crops and Products* 144:112009, 2020.a
- Banožić M, Banjari I, Flanjak I, Paštar M, Vladić J, Jokić S: Optimization of MAE for the separation of nicotine and phenolics from tobacco waste by using the response surface methodology approach. *Molecules* 26:4363, 2021.b

- 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* 24:1611, 2019.a
- Banožić M, Jokić S, Ačkar Đ, Blažić M, Šubarić D: Carbohydrates—Key players in tobacco aroma formation and quality determination. *Molecules* 25:1734, 2020.b
- Banožić M, Jozinović A, Grgić J, Miličević B, Jokić S: High voltage electric discharge for recovery of chlorogenic acid from tobacco waste. *Sustainability* 13:4481, 2021.c
- Banožić M, Matić M, Šafranko S, Cikoš AM, Jakovljević M, Molnar M, Jokić S: Extraction of bioactive compounds from tobacco waste using deep eutectic solvents. *Kemija u industriji* 69:1-10, 2020.c
- Banožić M, Nukić–Hrastovina E, Jokić S: Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda duhanske industrije. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*, str. 219–240. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno–tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2019.c
- Banožić M, Šubarić D, Jokić S: Duhanski otpad Bosne i Hercegovine—problem ili vrijedna sirovina. *Glasnik Zaštite Bilja* 41:64–72, 2018.
- Baş D, Boyaci IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78:836–845, 2007.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965–977, 2008.
- Bhisey R: Chemistry and toxicology of smokeless tobacco. *Indian Journal of Cancer* 49:364–72, 2012.
- Bizaj K, Škerget M, Košir IJ, Knez Ž: Sub- and supercritical extraction of Slovenian hops (*Humulus lupulus* L.) aurora variety using different solvents. *Plants* 10:1137, 2021.
- Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R: Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the neurological sciences* 262:77–84, 2007.
- Brechbill GO: An essential oil guide. Fragrance Books Inc., New Jersey, 2009.
- Briški F, Horgas N, Vuković M, Gomzi Z: Aerobic composting of tobacco industry solid waste—simulation of the process. *Clean Technologies and Environmental Policy* 5:295–301, 2003.
- Brunner G: Hydrothermal and supercritical water processes. U *Supercritical fluid science and technology series*, str. 569–588. Elsevier, Amsterdam, 2014.
- Brunner G: Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* 67:21–33, 2005.
- Budzinski M, Letellier H: Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis* 27: 259–271, 1999.
- Bush LP, Cui M, Shi H, Burton HR, Fannin FF, Lei L, Dye N: Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco. *Recent Advances in Tobacco Science* 27:23-46, 2001.
- Butorac J: *Duhan*. Kugler d.o.o., Zagreb, 2009.

- Cai K, Xiang Z, Pan W, Zhao H, Rena Z, Lei B, Geng Z: Identification and quantitation of glycosidically bound aroma compounds in three tobacco types by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1311:149–156, 2013.
- Callicutt CH, Cox RH, Hsu F, Kinser RD, Laffoon SW, Lee PN, Seeman JI: The role of ammonia in the transfer of nicotine from tobacco to mainstream smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46:1–17, 2006.
- Candiotti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC: Experimental design and multiple response optimization using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124:123–138, 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* 61:451–458, 2009.
- Chatuverdi S, Upreti DK, Tandon DK, Sharma A, Dixit A: Bio–waste from tobacco industry as tailored organic fertilizer for improving yields and nutritional values of tomato crop. *Journal of Environmental Biology* 29:759–763, 2008.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G: Green extraction of natural products: concept and principles. *International journal of molecular sciences* 13:8615–8627, 2012.
- Chen J, Liu X, Xu X, Lee FS, Wang X: Rapid determination of total solanesol in tobacco leaf by ultrasound–assisted extraction with RP–HPLC and ESI–TOF/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43:879–885, 2007.a
- Chen Y, Jimmy Yu Q, Li X, Luo Y, Liu H: Extraction and HPLC characterization of chlorogenic acid from tobacco residuals. *Separation Science and Technology* 42:3481–3492, 2007.b
- Coffa BG, Coggins CRE, Werley MS, Oldham MJ, Fariss MW: Chemical, physical, and in vitro characterization of research cigarettes containing denicotinized tobacco. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 79:64–73, 2016.
- Cravotto G, Mariatti F, Gunjevic V, Secondo M, Villa M, Parolin J, Cavaglià G: Pilot scale cavitation reactors and other enabling technologies to design the industrial recovery of polyphenols from agro–food by–products, a technical and economical overview. *Foods* 7:130, 2018.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG: Natural products (secondary metabolites). U *Biochemistry and molecular biology of plants*, str:1250–1319. American society of plant physiologists, Rockville, 2000.
- Cvetanovska A, Krstic M, Cvetanovska L: Content of total phenolic compounds and antioxidant potential of oriental tobacco varieties (*Nicotiana tabacum* L.). *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 4:2223–2228, 2017.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90:1631–1639, 2015.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing* 109:52–73, 2018.

- Čagalj M, Gugić J, Strikić F: Povijesni pregled uzgoja duhana u Dalmaciji. U *Zbornik radova: Duhana u Bosni i Hercegovini – jučer, danas i sutra*, str:48–60. Federalni agromediteranski zavod, Mostar, 2017.a
- Čagalj M, Ivanković M: Temeljne značajke duhanske industrije u EU – s posebnim osvrtom na Republiku Hrvatsku. U *Zbornik radova: Duhana u Bosni i Hercegovini – jučer, danas i sutra*, str:153–156. Federalni agromediteranski zavod, Mostar, 2017.b
- Da Silva Caetano AC, De Araújo CR, Galvão De Lima VLA, Sucupira Maciel MI, De A Melo E: Evaluation of antioxidant activity of agro–industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. *Food Science and Technology* 31:769–775, 2011.
- Da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, González–Gallego J, Erdtmann B: Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology* 40:941–947, 2002.
- Dagnon S, Edreva A: Application of pattern recognition method for color assessment of oriental tobacco based on HPLC of polyphenols. *Beiträge zur Tabakforschung International* 20:355–359, 2003.
- Davis DL, Nielsen MT: *Tobacco. Production, Chemistry and Technology*. Blackwell Science Ltd., Oxford, 1999.
- Derringer G, Suich R: Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology* 12:214–219, 1980.
- Ding YL, Zhu L, Liu S, Yu H, Dai Y: Analytical method of free and conjugated neutral aroma components in tobacco by solvent extraction coupled with comprehensive two–dimensional gas chromatography–time–of–flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1280:122–127, 2013.
- Docheva M, Dagnon S, Statkova–Abeghe S: Flavonoid content and radical scavenging potential of extracts prepared from tobacco cultivars and waste. *Natural Product Research* 28:1328–1334, 2014.
- Docheva MH, Kochev YG, Kirkova DM, Stoilova AB: Antioxidant activity and chemical composition of crude extracts from different tobaccos and tobacco blends. *Bulgarian chemical communications* 52:149–154, 2020.
- Duan C, Du Y, Hou X, Yan N, Dong W, Mao X, Zhang Z: Chemical basis of the fungicidal activity of tobacco extracts against *Valsa mali*. *Molecules* 21:1743, 2016.
- Dubey S, Ganeshpurkar A, Shrivastava A, Bansal D, Dubey N: Rutin exerts antiulcer effect by inhibiting the gastric proton pump. *Indian Journal of Pharmacology* 45:415–417, 2013.
- Dvorščak M: Analiza tragova postojanih organoklorovih spojeva u tlu i lebdećim česticama u zraku. *Doktorska disertacija*. Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb, 2015.
- Đulančić N: *Obrada i prerada duhana*. Poljoprivredno–prehrambeni fakultet, Sarajevo, 2014.
- Encinar JM, Beltran FJ, Gonzalez JF, Moreno MJ: Pyrolysis of maize, sunflower, grape and tobacco residues. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 70:400–410, 1997.

- FAOSTAT: Korporativna statistička baza podataka koje prikuplja i održava Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *The Food and Agriculture Organization*) <http://www.fao.org/faostat/en> (Pristupljeno: 1.8.2021)
- 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.
- Fathiazad F, Delazar A, Amiri R, Sarker SD: Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *The Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 3:222–227, 2005.
- Fischer M, Jefferies TM: Optimization of nicotine extraction from tobacco using supercritical fluid technology with dynamic extraction modelling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44:1258–1264, 1996.
- 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.
- Ganapathi TR, Suprasanna P, Rao PS, Bapat VA: Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)—A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology* 3:171–184, 2004.
- Gao W, Chen K, Yang R, Yang F: Rheological property of reconstituted tobacco coatings. *Industrial Crops and Products* 60:45–51, 2014.
- Garcia-Vaquero M, Ummat V, Tiwari B, Rajauria G: Exploring ultrasound, microwave and ultrasound–microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Marine drugs* 18:172, 2020.
- Geiss O, Kotzias D: *Tobacco, cigarettes and cigarette smoke an overview*. Institute for Health and Consumer Protection, Luksemburg, 2007.
- Gil KA, Tuberoso CIG: Crucial challenges in the development of green extraction technologies to obtain antioxidant bioactive compounds from agro-industrial by-products. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 35:105–138, 2021.
- Gil-Ramírez A, Smiderleb FS, Moralesc D, Iacomini M, Soler-Rivasc C: Strengths and weaknesses of the aniline-blue method used to test mushroom (1→3)-β-D-glucans obtained by microwave-assisted extractions. *Carbohydrate Polymers* 217:135–143, 2019.
- González de Peredo AV, Vázquez-Espinosa M, Espada-Bellido E, Ferreiro-González X, Amores-Arrocha A, Palma M, Barbero GF, Jiménez-Cantizano A: Alternative ultrasound-assisted method for the extraction of the bioactive compounds present in myrtle (*Myrtus communis* L.). *Molecules* 24:882, 2019.
- Gu X, Cai J, Zhu X, Su Q: Dynamic ultrasound-assisted extraction of polyphenols in tobacco. *Journal of Separation Science* 28:2477–2481, 2005.
- Habtemariam S: A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. *Natural Product Communications* 6:201–203, 2011.
- Hatsukami DK, Joseph AM, LeSage M, Jensen J, Murphy SE, Pentel PR, Kotlyar M, Borgida E, Le C, Hecht SS: Developing the science base for reducing tobacco harm. *Nicotine & Tobacco Research* 9:537–553, 2007.

- 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* 20:274–283, 2015.
- Hu F, Deng C, Liu Y, Zhang X: Quantitative determination of chlorogenic acid in Honeysuckle using microwave-assisted extraction followed by nano-LC-ESI mass spectrometry. *Talanta* 77:1299–1303, 2009.
- Huang W, Li W, Niu H, Wang J, Qin Y: Bioactivity of solanesol extracted from tobacco leaves with carbon dioxide–ethanol fluids. *The Biochemical Engineering Journal* 42:92–96, 2008.
- Ikhsanov YS, Nauryzbaev M, Musabekova A, Alimzhanova M, Burashev E: Study of *Nicotiana Tabacum* L extraction, by methods of liquid and supercritical fluid extraction. *Journal of Applied Engineering Science* 17:338–353, 2019.
- Ivanov NV, Sierro N, Peitsch MC: *The Tobacco Plant Genome*. Springer, New York, 2020.
- 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.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M: Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 103:369–377, 2007.
- Jayeola CO, Adebowale BA, Yahaya LE, Yahaya LE, Ogunwolu SO, Olubamiwa O: Production of bioactive compounds from waste. U *Therapeutic, probiotic, and unconventional food*, str 317–340. Academic Press, London, 2018.
- Jiang Y, Satoh K, Kusama K, Watanabe S, Sakagami H: Interaction between chlorogenic acid and antioxidants. *Anticancer Research* 20:2473–6, 2000.
- Jing Y, Gao Y, Wang W, Cheng Y, Lue P, Maf 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, Aladić K, Šubarić D: Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Annual of the Croatian Academy of Engineering* 21:247–258, 2018.
- 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* 153:104593, 2019.
- Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO<sub>2</sub>. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Joners NM, Bernardo-Gil MG, Lourenço MG: Comparison of methods for extraction of tobacco alkaloids. *Journal of AOAC International* 84:309–316, 2001.

- 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* 318:476–83, 2006.
- Kalamanda O: Isolation, chemical and microbiological characterization of essential oils from tobacco waste. *Multifunctional agriculture and rural development* 186:186–191, 2010.
- Kamaruddin MJ, Hamid SRA, Othman SIA, Alam MNHZ, Zaini MAA, Zakaria ZY: The effects of conventional and microwave heating techniques on extraction yield of *Orthosiphon stamineus* leaves. *Chemical Engineering Transactions* 63:601-606, 2018.
- Karačonji BI: Facts about nicotine toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 56:363–371, 2006.
- Kaufmann B, Christen P: Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis* 13:105–113, 2002.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH: Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18:2328–2375, 2013.
- 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* 23:993–998, 2009.
- Koç B, Kaymak–Ertekin F: Response surface methodology and food processing applications. *Gida–Journal of food* 7:1–8, 2009.
- Kotnik P, Škerget M, Knez Ž: Phase equilibria of free fatty acids enriched vegetable oils and carbon dioxide: Experimental data, distribution coefficients and separation factors. *The Journal of Supercritical Fluids* 87:65–72, 2014.
- Kučić D, Kopčić N, Briški F: Biodegradation of Agro–industrial Waste. *Chemical and Biochemical Engineering* 31:369–374, 2017.
- Kučić Grgić D, Briški F, Očelić Bulatović V, Vuković Domanovac M, Domanovac T, Šabić Runjavec, M, Miloloža M, Cvetnić, M: Kompostiranje agroindustrijskog otpada, biootpada i biorazgradljivog komunalnog otpada u adijabatskom reaktoru. *Kemija u industriji* 68:381–388, 2019.
- Kumar S, Moscoso JLG, Bobe I, Majeranowski P: Green process to hydrolyze carbohydrates from tobacco biomass using subcritical water, U.S. Patent2014/0331993 A1, 2014.
- Leffingwell J: Leaf Chemistry - Basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. U *Tobacco: production, chemistry, and technology*, str. 265–284. Blackwell Science, New Jersey, 1999.
- Leffingwell JC, Alford ED, Leffingwell D: Aroma constituents of a supercritical CO<sub>2</sub> extract of kentucky dark fire cured tobacco. *Leffingwell Reports* 5:1-21, 2013.
- Lei B, Zhao XH, Zhang K, Zhang J, Ren W, Ren Z, Chen Y, Zhao HN, Pan WY, Chen W, Li XH, Deng WY, Ding FZ, Lu K: Comparative transcriptome analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves to identify aroma compound-related genes expressed in different cultivated regions. *Molecular biology reports* 40:345–357, 2013.

- Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Meir A, Zamir D, Tadmor Y: Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3142–3148, 2005.
- Li Z, Huang D, Tang Z, Deng C, Zhang X: Fast determination of chlorogenic acid in tobacco residues using microwave-assisted extraction and capillary zone electrophoresis technique. *Talanta* 82:1181–1185, 2010.
- 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* 27:480–484, 2012.
- Liu S, He P, Tian Z, Li X, Xu C: Ultrasound-assisted extraction and characterization of polysaccharide from Maryland tobacco leaves. *Journal of the Chilean Chemical Society* 60:2761–2768, 2015.
- Liu Y, Yong G, Xu Y, Zhu D, Tong H, Liu S: Simultaneous Determination of Free and Esterified Fatty Alcohols, Phytosterols and Solanesol in Tobacco Leaves by GC. *Chromatographia* 71:727–732, 2010.
- Llompart MP, Lorenzo RA, Cela R, Jocelyn Paré JR: Optimization of a microwave-assisted extraction method for phenol and methylphenol isomers in soil samples using a central composite design. *Analyst* 122:133–137, 1997.
- Ma Y, Gao M, Lio D: Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Pharmaceutical 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.
- Machado PA, Fu H, Kratochvil RJ, Yuan Y, Hahm TS, Sabliov CM, Wei C, Lo, YM: Recovery of solanesol from tobacco as a value-added byproduct for alternative applications. *Bioresource technology* 101:1091–1096, 2010.
- Madenoglu TG, Kurt S, Saglam S, Yüksel M, Gökaya D, Ballice L: Hydrogen production from some agricultural residues by catalytic subcritical and supercritical water gasification. *The Journal of Supercritical Fluids* 67:22–28, 2012.
- Makanjuola SA: Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. *Food Science & Nutrition* 5:1179–1185, 2017.
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S: Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews* 1:7–18, 2007.
- Martin C, Fernandez T, Garcia R, Carrillo E, Marcet M, Galbe M, Jönsson LJ: Preparation of hydrolysates from tobacco stalks and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:857–862, 2002.
- Martinez JL: *Supercritical fluid extraction of naturaceuticals and bioactive compounds*. CRC Press Taylor i Francis Group, Boca Raton, 2008.



- Mishra S, Mishra MB: Tobacco: Its historical, cultural, oral, and periodontal health association. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 3:12–18, 2013.
- Montgomery DC: *Design and analysis of experiments: Response surface method and designs*. John Wiley and Sons, New Jersey, 2005.
- Mukhtar A, Ullah H, Mukhtar H: Fatty acid composition of tobacco seed oil and synthesis of alkyd resin. *Chinese Journal of Chemistry* 25:705–708, 2007.
- Mullen W, Nemzer B, Ou B, Stalmach A, Hunter J, Clifford MN, Combet E: The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:3754–3762, 2011.
- Mulyadia AF, Wijana S, Wahyudi AS: Optimization of nicotine extraction in tobacco leaf (*Nicotiana tabacum* L.): (Study: Comparison of ether and petroleum ether. U *The International Conference on Chemical Engineering UNPAR*, str. 110–120, Kuta, Bali, 2013.
- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM: *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2016.
- Nedeltcheva-Antonova D, Ivanova D, Antonov L, Abe I: Insight into the aroma profile of Bulgarian tobacco absolute oil. *Industrial crops and products* 94:226–232, 2016.
- Ng LK, Hupe M: Effects of moisture content in cigar tobacco on nicotine extraction. Similarity between Soxhlet and focused open-vessel microwave-assisted techniques. *Journal of Chromatography A* 1011:213–219, 2003.
- Nie Y, Yu G, Song Z, Wang X, Li Z, Shea Y, Lee M: Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction coupled with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS for the analysis of volatile compounds from tobacco. *Analytical Methods* 9:856–863, 2017.
- Nongonierma A, Voilley A, Cayot P, Le Quéré J-L, Springett M: Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters. *Food Reviews International* 22:51–94, 2002.
- 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.
- Ormeño E, Goldstein A, Niinemets Ü: Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *Trends in Analytical Chemistry* 30:978–989, 2011.
- Pankow JF, Duell AK, Peyton DH: Free-base nicotine fraction in non-aqueous vs. aqueous solutions: electronic cigarette fluids without vs. with dilution with water. *Chemical Research in Toxicology* 33:1729–1735, 2020.
- Poltronieri P, D'Urso OF: Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products. U *The Food, Feed, Fibre, Fuel (4F) Economy*, str. 161–187. Elsevier, Amsterdam, 2016.
- 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, Ivanova T, Stoyanova A, Georgiev V, Hristeva T, Nikolova V, Docheva M, Nikolov N, Damianova S: Phytochemicals in leaves and extracts of the variety "Plovdiv 7" of Bulgarian oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Trends in phytochemical research 2*: 27–36, 2018.
- Popova V, Ivanova T, Stoyanova A, Nikolova V, Hristeva T, Docheva M, Nikolov N, Iliev I: Polyphenols and triterpenes in leaves and extracts from three *Nicotiana* species. *Journal of Applied Biology and Biotechnology 7*:45–49, 2019.
- Popova VT, Ivanova TA, Stoyanova AS, Nikolova VV, Docheva MH, Hristeva TH, Nikolov NP: Chemical constituents in leaves and aroma products of *Nicotiana rustica* L. tobacco. *The International Journal of Food Studies 9*:146–159, 2020.
- Pütün AE, Önal E, Uzun BB, Özbay N: Comparison between the "slow" and "fast" pyrolysis of tobacco residue. *Industrial Crops and Products 26*:307–314, 2007.
- Qin G, Zhao G, Ouyang C, Liu J: Aroma components of tobacco powder from different producing areas based on gas chromatography ion mobility spectrometry. *Open Chemistry 19*:442–450, 2021.
- Radulovic N, Stojanovic G, Palic R, Alagic S: Chemical composition of the ether and ethyl acetate extracts of serbian selected tobacco types: Yaka, Prilep and Otlja. *Journal of Essential Oil Research 18*:562–565, 2006.
- Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH: Antimycobacterial activity of (e)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta Medica 64*:2–4, 1998.
- Ramos L, Kristenson EM, Brinkman UT: Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A 975*:3–29, 2002.
- Ravber M, Knez Ž, Škerget M: Optimization of hydrolysis of rutin in subcritical water using response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids 104*:145–152, 2015.
- Rawat A, Mali RR: Phytochemical properties and pharmacological activities of *Nicotiana tabacum*: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research 1*:74–82, 2013.
- Reverchon E, De Marco I: Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids 38*:146–166, 2006.
- Rincón J, Lucas AD, García MA, García A, Alvarez A, Carnicer A: Preliminary study on the supercritical carbon dioxide extraction of nicotine from tobacco wastes. *Separation Science and Technology 33*:411–423, 1998.
- Rodriguez RA, Bronze MR, da Ponte MN: Supercritical fluid extraction of tobacco leaves: A preliminary study on the extraction of solanesol. *The Journal of Supercritical Fluids 45*:171–176, 2008.
- Roemer E, Schorp MK, Piadé J-J, Seeman JI, Leyden DE, Haussmann HJ: Scientific assessment of the use of sugars as cigarette tobacco ingredients: A review of published and other publicly available studies. *Critical Reviews in Toxicology 42*:244–278, 2012.

- 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* 17:11281–11291, 2012.
- Ruiz-Rodriguez A, Bronze M-R, da Ponte MN: Supercritical fluid extraction of tobacco leaves: A preliminary study on the extraction of solanesol. *The Journal of Supercritical Fluids* 45:171–176, 2008.
- Said KAM, Amin MAM: Overview on the response surface methodology (RSM) in extraction processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering* 2:8–17, 2015.
- Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K: In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics* 403:136–138, 2011.
- Scrugli S, Frongia M, Muscas M, Loi G, Pinna MB, Crobu V, Carta D: A preliminary study on the application of supercritical antisolvent technique to the fractionation of tobacco extracts. U *Proceedings of the 8th Meeting on Supercritical Fluids*, Bordeaux, 2002.
- Selvaraj G, Kaliamurthi S, Thirungnasambandam R, Vivekanandan L, Balasubramanian T: Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. *Biomedical and Environmental Science* 27:295–299, 2014.
- Shen J, Shao X: Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography–mass spectrometry using cloud point extraction as a preconcentration step. *Analytica Chimica Acta* 561:83–87, 2006.
- Shirsatha SR, Sonawanea SH, Gogate PR: Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53:10–20, 2008.
- Shoji T: Nicotine Biosynthesis, transport, and regulation in tobacco: Insights. U *The Tobacco Plant Genome*, str. 147–155. Springer, Cham, Švicarska, 2020.
- Sifola MI, Carrino L, Cozzolino E, Piano LD, Graziani G, Ritieni A: potential of pre-harvest wastes of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) crops, grown for smoke products, as source of bioactive compounds (Phenols and Flavonoids). *Sustainability* 13:2087, 2021.
- Singh PP, Saldaña MDA: Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International* 44:2452–2458, 2011.
- Statista: Udio na tržištu po tvrtkama u duhanskoj industriji. 2020 <http://www.statista.com/statistics/279873/global-cigarette-market-share-by-group> (datum pristupa: 1.8.2021.)
- Stepanov I, Jensen J, Hatsukami D, Hecht SS: Tobacco-specific nitrosamines in new tobacco products. *Nicotine & Tobacco Research* 8:309–313, 2006.
- Steppuhn A, Gase K, Krock B, Halitschke R, Baldwin IT: Nicotine's defensive function in nature. *PloS Biology* 2:1074–1080, 2004.
- Stojanovic G, Palic R, Alagic S, Zeković Z: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO<sub>2</sub> extracts of semi-oriental tobacco, Otlja. *Flavour and Fragrance Journal* 15:335–338, 2000.

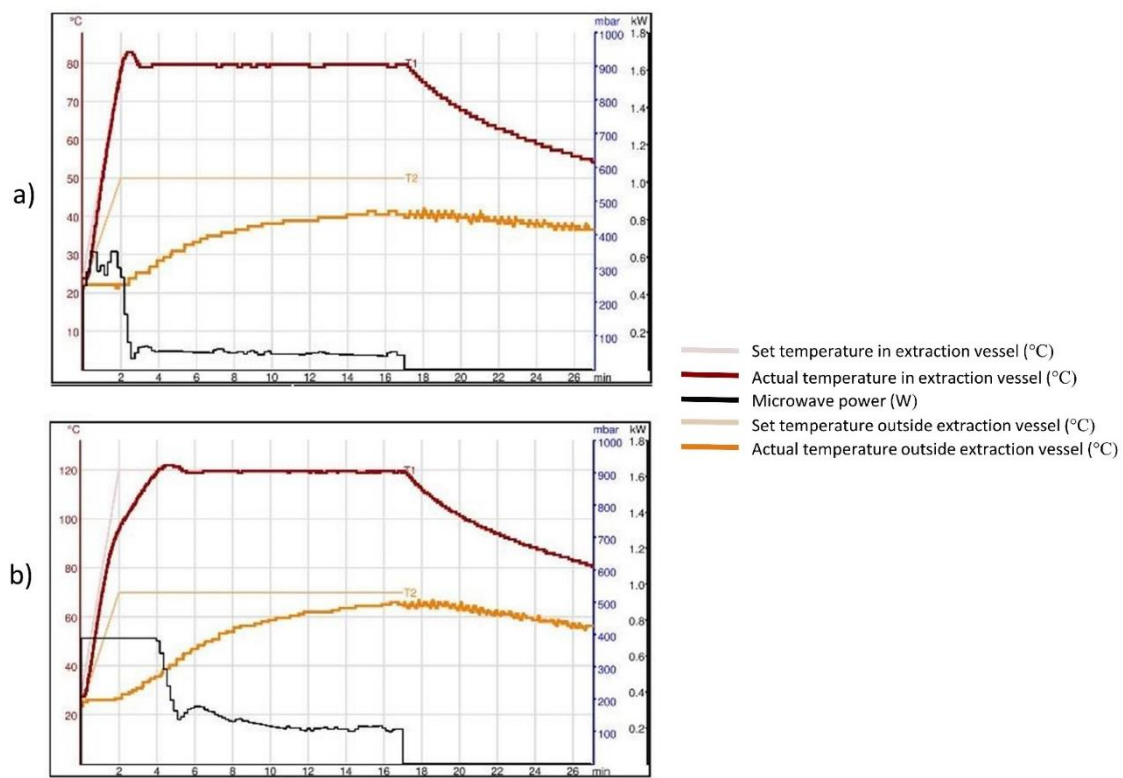
- Strezov V, Popovic E, Filkoski RV, Shah P, Evans T: Assessment of the thermal processing behavior of tobacco waste. *Energy & Fuels* 26:5930–5935, 2012.
- Sun Y, Huang R, Xing X, Qi W, Su R, He Z: Enhanced extraction of solanesol from tobacco leaves by a new ammonia leaching pretreatment method. *Fine Chemicals* 30:32–35, 2013.
- Tang DS, Zhang L, Chen HL, Liang YR, Lu JL, Liang HL, Zheng XQ: Extraction and purification of solanesol from tobacco:(I). Extraction and silica gel column chromatography separation of solanesol. *Separation and purification technology* 56:291–295, 2007.
- Taylor MA, Fraser PD: Solanesol: Added value from Solanaceous waste. *Phytochemistry* 72:1323–1327, 2011.
- Tayoub G, Sulaiman H, Alorfi M: Determination of nicotine levels in the leaves of some *Nicotiana tabacum* varieties cultivated in Syria. *Herba Polonica* 61:23–30, 2015.
- Tita GJ, Navarrete A, Martín Á, Cocero MJ: Model assisted supercritical fluid extraction and fractionation of added-value products from tobacco scrap. *The Journal of Supercritical Fluids* 167:105046, 2021.
- Troje JZ, Frobe Z, Perovic O: Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco extract. *Journal of Chromatography A* 775:101–107, 1997.
- Valverde JL, Curbelo C, Mayo O, Molina CB: Pyrolysis kinetics of tobacco dust. *Chemical Engineering Research and Design* 78:921–924, 2000.
- Veljković VB, Lakićević SH, Stamenković OS, Todorović ZB, Lazić ML: Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids. *Fuel* 85:2671–2675, 2006.
- Vieira CA, de Paiva SAA, Funai MNS, Bergamaschi MM, Queiroz RC, Giglio JR: Quantification of nicotine in commercial brand cigarettes. *Biochemistry and molecular biology education* 38:330–334, 2010.
- Vinatorua M, Mason TJ, Calinescu I: Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in analytical chemistry* 97:159–178, 2017.
- Vuković M, Ćosić I, Kolačko K, Briški F: Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada. *Kemija u industriji* 61:417–425, 2012.
- 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 LCMS/MS. *The Journal of the Serbian Chemical Society* 75:875–891, 2010.
- Wang J, Lu D, Zhao H, Ling XQ, Jiang B, Ouyang PK: Application of response surface methodology optimization for the production of caffeic acid from tobacco waste. *African Journal of Biotechnology* 8:1416–1424, 2009.
- Wang X, Zhang Y, Zhang G, Yin Z: Improved extraction of solanesol from tobacco waste by enzymatic cell wall breaking. *Chinese Journal of Biotechnology* 29:1706–1710, 2013.
- Wang Y, Gu W: Study on supercritical fluid extraction of solanesol from industrial tobacco waste. *The Journal of Supercritical Fluids* 138:228–237, 2018.

- Wang Y, Tang C, Zhang H: Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl<sub>4</sub>-induced oxidative liver injury in mice. *Journal of Food and Drug Analysis* 23:310–317, 2015.
- Wianowska D, Gil M: Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochemistry Reviews* 18:273–302, 2018.
- Xu CP, Xiao Y, Mao DB: Antioxidant activities of polysaccharide fractions isolated from burley tobacco flowers. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 5:46–52, 2013.
- Xu ZG, Zheng L: Comparison of volatile and semivolatile compounds from commercial cigarette by supercritical fluid extraction and simultaneous distillation extraction. *Universitas Scientiarum* 5:1528–32, 2004.
- 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 N, Liu Y, Gong D, Du Y, Zhang H, Zhang Z: Solanesol: A review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 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.
- Yang S, Huang C, Smetena I: Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for volatile components in tobacco. *Journal of Chromatography A* 942:33–39, 2002.
- Yang, Y, Chu G, Zhou G, Jiang J, Yuan K, Pan Y, Song Z, Li Z, Xia Q, Lu X, Xiao W: Rapid determination of the volatile components in tobacco by ultrasound-microwave synergistic extraction coupled to headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation sciences* 6:1173–1181, 2016.
- Yolmeh M, Jafari, SM: Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food and Bioprocess Technology* 10:413–433, 2017.
- Zaidan UH, Zen NIM, Amran NA, Shamsi S, Gani SSA: Biochemical evaluation of phenolic compounds and steviol glycoside from *Stevia rebaudiana* extracts associated with in vitro antidiabetic potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18:101049, 2019.
- Zeng J, Chen K, Xie J, Xu G, Li J, Rao G, Yang F, Gao W: Study on tobacco stem and tobacco dust making reconstituted tobacco paper-base. *Advanced Materials Research* 550: 3316–3322, 2012.
- Zhang XH, Gao L, Zhang D, Liu X Ye: 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 CJ, Li CY, Fu YJ, Zu YG: Extraction and determination of solanesol in waste tobacco leaves by ultrasonic and HPLC. *Chinese Journal of Applied Chemistry* 22:1265–1267, 2005.

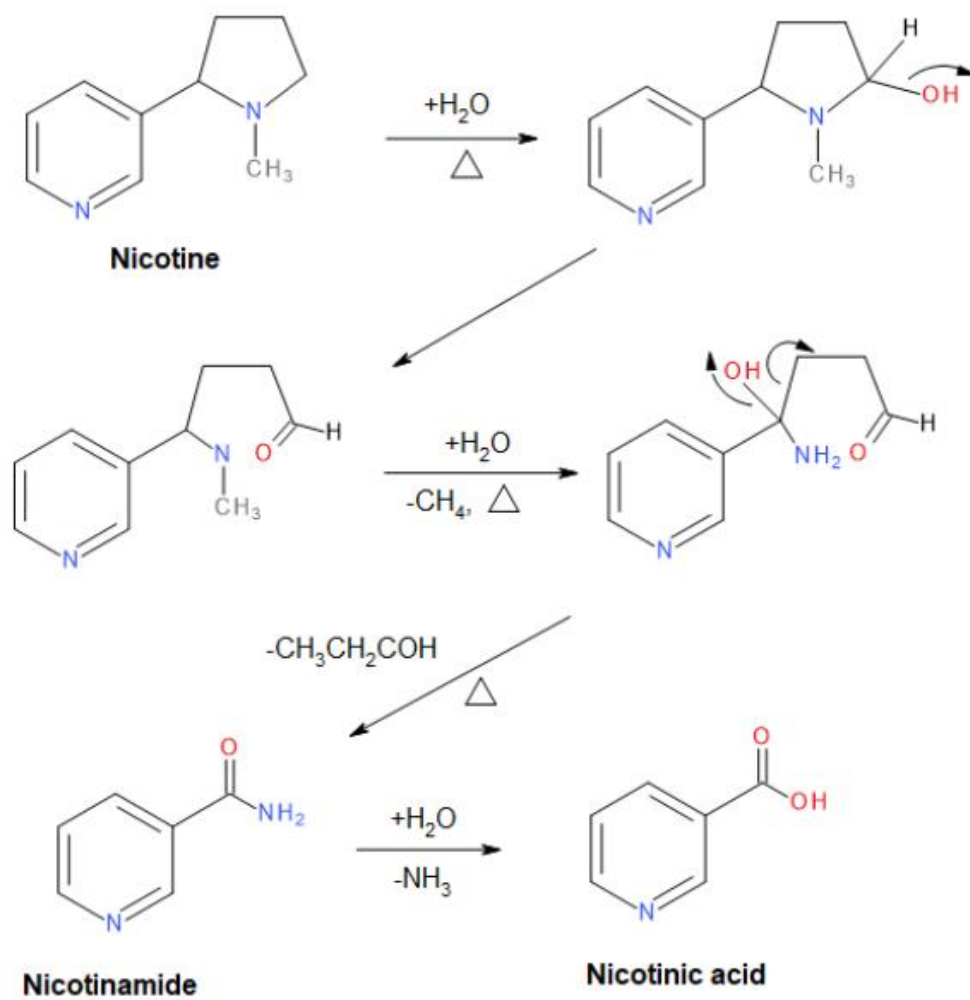
- Zhao Y, Zhao C, Li Y, Chang Y, Zhang J, Zeng Z, Lu X, Xu G: Study of metabolite differences of flue-cured tobacco from different regions using a pseudotargeted gas chromatography with mass spectrometry selected-ion monitoring method. *Journal of separation science* 37:2177–84, 2014.
- Zhong W, Zhu C, Shu M, Sun K, Zhao L, Wang C, Ye Z, Chen J: Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD. *Bioresource Technology* 101:6935–6941, 2010.
- Zhou HY, Liu CZ: Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A* 1129:135–139, 2006.
- Zhu X, Su Q, Cai J, Yang J: Optimization of microwave-assisted solvent extraction for volatile organic acids in tobacco and its comparison with conventional extraction methods. *Analytica Chimica Acta* 579:88–94, 2006.
- Zielke D, Liebe R: The removal of stems from cut tobacco. *Beiträge zur Tabakforschung International* 17:49–55, 1997.

## **8. PRILOZI**

**Prilog 1:** Usporedba snage mikrovalova pri temperaturi ekstrakcije od 120 i 80 °C (Banožić i sur., 2021)





**Prilog 2:** Predloženi mehanizam degradacije nikotina u supkričnoj vodi (Jokić i sur., 2019)

## Prilog 3 Znanstveni radovi i poglavlja u knjigama objavljeni iz teme doktorske disertacije

J. of Supercritical Fluids 153 (2019) 104593



## Separation of active compounds from tobacco waste using subcritical water extraction



Stela Jokić<sup>a,\*</sup>, Tanja Gagić<sup>b</sup>, Željko Knez<sup>b,c</sup>, Marija Banožić<sup>a</sup>, Mojca Škerget<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Food Technology, Jozip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, HR-30000 Osijek, Croatia

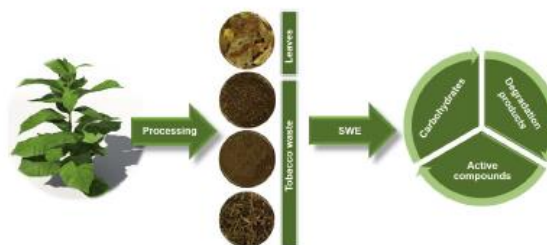
<sup>b</sup> Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor, Smetanova 17, SI-2000 Maribor, Slovenia

<sup>c</sup> Faculty of Medicine, University of Maribor, Taborska ulica 8, SI-2000 Maribor, Slovenia

### HIGHLIGHTS

- Tobacco waste – material which contain important active compounds.
- Striking differences between tobacco waste and leaves.
- With SWE a considerable amount of extracted active compound can be achieved.
- Production of some unwanted compounds can be avoided with proper optimization of SWE process.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 28 March 2019  
Received in revised form 13 August 2019  
Accepted 14 August 2019  
Available online 16 August 2019

**Keywords:**  
tobacco waste  
subcritical water extraction  
active compounds

### ABSTRACT

Three fraction of tobacco waste (scrap, midrib and dust) were subjected to subcritical water in a temperature range (150–250 °C), using solvent-solid ratio (10–30 mL/g) for periods from 5 to 25 min in a batch reactor and compared with tobacco leaves to determine the changes in content of compounds during tobacco processing. Optimal extraction conditions were established using RSM. Depending on applied extraction conditions as well as waste fraction, different concentrations of active compounds were determined. Tobacco waste extracts were characterized with high level of nicotine from 0.907 to 4.610%, and considerable amounts of 3,4 DHBA from 0.118 to 1.249%, chlorogenic acid from 0.033 to 0.507% and rutin up to 0.874%. Moreover, in all extracts some tobacco specific compounds were detected, namely nicotinic acid 0.087–0.846% and nicotinamide 0.095–0.400% as a product of nicotine hydrothermal degradation. At higher temperatures the presence of 5-HMF, furfural and 5-MF was detected.

© 2019 Published by Elsevier B.V.


### 1. Introduction

Industrial waste is a prominent problem in developed countries which has economic, environmental and social consequences. Because of that, waste management attracted a great deal of attention over the past few years [1]. Industrial processing of tobacco generates considerable amount of waste, composed by scrap, midrib and dust. Mostly those waste are released directly

\* Corresponding author.  
E-mail addresses: stela.jokic@ptfos.hr (S. Jokić), tanja.gagic@um.si (T. Gagić), zeljko.knez@um.si (Z. Knez), mbanozic@ptfos.hr (M. Banožić), mojca.skerget@um.si (M. Škerget).

Article

## Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Some Bioactive Compounds from Tobacco Waste

Marija Banožić, Ines Banjari, Martina Jakovljević, Drago Šubarić, Srećko Tomas, Jurislav Babić and Stela Jokić \* 

Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek 31000, Croatia; marija.banozic@ptfos.hr (M.B.); ines.banjari@ptfos.hr (I.B.); mjakovljevic@ptfos.hr (M.J.); dsubaric@ptfos.hr (D.Š.); srecko.tomas@ptfos.hr (S.T.); jbabic@ptfos.hr (J.B.)

\* Correspondence: stela.jokic@ptfos.hr; Tel: +385-31-224-333

Received: 30 March 2019; Accepted: 22 April 2019; Published: 24 April 2019



**Abstract:** This is the first study on ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from different types of tobacco industry wastes (scrap, dust, and midrib). The obtained results were compared with starting raw material (tobacco leaves) to see the changes in bioactive compounds during tobacco processing. Results suggested that tobacco waste extracts possess antioxidant activity and considerable amounts of targeted bioactive compounds (phenolics and solanesol). The content of chlorogenic acid varied between 3.64 and 804.2 µg/mL, caffeic acid between 2.34 and 10.8 µg/mL, rutin between 11.56 and 93.7 µg/mL, and solanesol between 294.9 and 598.9 µg/mL for waste and leaf extracts, respectively. There were noticeable differences between bioactive compounds content and antioxidant activity in extracts related to applied UAE conditions and the used type of tobacco waste. Results show that optimal UAE parameters obtained by response surface methodology (RSM) were different for each type of material, so process optimization proved to be necessary. Considering that tobacco waste is mostly discarded or not effectively utilized, the results clearly show that tobacco waste could be used as a potential source of some bioactive compounds.

**Keywords:** tobacco waste; ultrasound-assisted extraction; biocompounds; process optimization

### 1. Introduction

Tobacco is the most widely cultivated plant in the world which is not consumed as food. Leaves are the most valuable part of tobacco plant and other parts like stem, root, midrib are considered as a waste. Tobacco is part of *Solanaceae* family such as potatoes and tomatoes [1]. Tobacco can be used as a valuable source of bioactive compounds, which could be recovered and used in cosmetics, perfumes and pharmaceuticals [2]. Interest in bioactive compounds extracted from tobacco and tobacco waste increased over the past years [3]. As a result of that growing interest, ultrasound-assisted extraction (UAE) has been widely used for the extraction of bioactive compounds from tobacco leaves (Table 1). However, there is a limited number of publications about the extraction of bioactive compounds from tobacco waste. Moreover, previously mentioned studies have been focused on tobacco waste in general, and not on different types of tobacco waste. Besides already mentioned UAE, other techniques, like microwave extraction and extraction with supercritical fluids, are gaining more attention within the waste management and utilization procedures. UAE has many advantages due to causing smaller structural and molecular changes in material [4]. Additionally, some reported advantages are higher yield of extracted compounds, shorter extraction time, lower extraction temperatures [5], and reducing cost and volume of the used solvent [6].

## Research Article



Received: 4 February 2020

Revised: 6 May 2020

Accepted article published: 7 September 2020

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.10796

# Volatile organic compounds of tobacco leaves versus waste (scrap, dust, and midrib): extraction and optimization

Marija Banožić,<sup>a\*</sup> Krunoslav Aladić,<sup>a</sup> Igor Jerković<sup>b\*</sup> and Stela Jokić<sup>a</sup>



## Abstract

**BACKGROUND:** Volatile organic compounds are present at very low concentration but exhibit an important influence on flavor and aroma of tobacco leaves and products. During tobacco processing, at different stages, tobacco wastes occur. Since they are delivered directly from the tobacco plant, they are expected to have a similar aroma profile.

**RESULTS:** The volatile composition of three types of tobacco waste (scrap, dust, and midrib) was characterized for the first time and compared with tobacco leaves' volatile composition. Ultrasound-assisted extraction with hexane followed by gas chromatography–mass spectrometry was successfully applied. Different ultrasound-assisted extraction parameters (temperature, time, and solvent:solid ratio) showed a significant influence on the volatile profiles of the extracts obtained. The most important compounds in tobacco leaves, scrap, and dust with the highest abundance were nicotine (up to 87.5%), 4,8,13-duvatriene-1,3-diol (up to 16.2%), and neophytadiene (up to 9.4%). In midrib, only nicotine was present in all extracts. The most abundant compounds in the extracts were quantified and subjected to optimization using response surface methodology.

**CONCLUSION:** Regression analysis showed that 83–98% of the variation was explained by the models obtained. The experimentally obtained values agreed with those predicted, thus indicating the suitability of the model employed and the success of response surface methodology in optimizing the extraction conditions.

© 2020 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

**Keywords:** tobacco; tobacco waste; volatile organic compounds; extraction; optimization

## INTRODUCTION

During the past decades the investigation of volatile organic compounds (VOCs) of foods, food ingredients, and plant products has attracted considerable research interest. Generally, VOCs are present at very low concentration but exhibit an important influence on flavor and aroma.<sup>1</sup> They are usually produced in the plants as the response to biotic and abiotic stresses, such as nutrient deficiency, drought, and extreme temperatures.<sup>2</sup> VOCs effect tobacco aroma and influence its quality and economic value. In tobacco leaves, aroma compounds can be found in two forms: in a free state and as glycosidically bound aroma compounds.<sup>3</sup> Tobacco aroma compounds consist of degraded carotenoids, isoprenoids, monoterpenes, sesquiterpenes, fatty acid metabolites, phenylalanine derivatives, and alkaloids, but mainly nicotine.<sup>2</sup> In the structure of glycosides, aroma compounds are bonded with carbohydrates, and glycosides are able to release aroma (through breakdown of the glycosidic bond) during tobacco growing and processing, especially during the curing and fermentation process.

The extraction of volatile compounds from tobacco leaves has already been performed with the solvent extraction, applying methyl *tert*-butyl ether,<sup>4</sup> petroleum ether, 1,1,1,2-tetrafluoroethane, and ethanol as the solvents in static

batch mode.<sup>5</sup> Zhang *et al.*<sup>6</sup> performed solvent extraction combined with steam distillation of tobacco leaves (after the extraction with petroleum ether, *n*-hexane, ethyl ether, and ethyl acetate in batch mode, the extract obtained was subjected to hydrodistillation). Moreover, supercritical fluid extraction,<sup>7</sup> solid-phase microextraction,<sup>8</sup> hydrodistillation,<sup>5</sup> and ultrasound–microwave synergistic extraction coupled with headspace solid-phase microextraction<sup>9</sup> were applied on tobacco leaves. The quality and quantity of the extracts obtained were directly related to the extraction technique applied. To the best of our knowledge, individual ultrasound-assisted extraction (UAE) of VOCs from tobacco leaves, and especially tobacco waste (which is the core of current study), has not been investigated yet.

\* Correspondence to: M Banožić, Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek 31000, Croatia. E-mail: marijabanozic@ptfos.hr; or I Jerković, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, 21000 Split, Croatia. E-mail: igor@ktf-split.hr

<sup>a</sup> Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

<sup>b</sup> Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Split, Croatia



Article

# Optimization of MAE for the Separation of Nicotine and Phenolics from Tobacco Waste by Using the Response Surface Methodology Approach

 Marija Banožić <sup>1</sup>, Ines Banjari <sup>1</sup>, Ivana Flanjak <sup>1</sup> , Mate Paštar <sup>2</sup>, Jelena Vladić <sup>3,\*</sup>  and Stela Jokić <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia; marija.banozic@ptfos.hr (M.B.); ines.banjari@ptfos.hr (I.B.); ivana.flanjak@ptfos.hr (I.F.)  
<sup>2</sup> Public Institution KERA S.D. for Coordination and Development of Split-Dalmatia County, Domovinskog rata 2, 21000 Split, Croatia; mate.pastar@kera.hr  
<sup>3</sup> Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia  
 \* Correspondence: vladicj@uns.ac.rs (J.V.); stela.jokic@ptfos.hr (S.J.); Tel.: +381-21-485-3728 (J.V.); +385-31-224-333 (S.J.)

**Abstract:** This study intends to valorize by-products of the industrial processing of tobacco to obtain nicotine and phenolics as value-added compounds. Three influential parameters of the microwave-assisted extraction-MAE (temperature, treatment time, and solvent/solid ratio) were studied for the optimization of the extraction protocol for tobacco leaves and three types of waste—scrap, dust, and midrib, respectively. Nicotine was the dominant bioactive compound in all extracts, ranging from 1.512 to 5.480% in leaves, 1.886 to 3.709% in scrap, 2.628 to 4.840% dust, and 0.867 to 1.783% in midrib extracts. Five phenolic compounds were identified and quantified, predominated by chlorogenic acid and rutin. Additionally, total phenol content and antioxidant activity were determined using spectrophotometric assays. Optimization was performed in two aspects: to obtain a maximum extraction yield with minimum nicotine content and to obtain a maximum extraction yield with maximum nicotine content. These findings demonstrate that tobacco waste is a valuable source of bioactive compounds and MAE can be a promising alternative technique to obtain extracts rich in targeted bioactive compounds, especially nicotine.

**Keywords:** tobacco waste; microwave-assisted extraction; optimization; bioactive compounds



**Citation:** Banožić, M.; Banjari, I.; Flanjak, I.; Paštar, M.; Vladić, J.; Jokić, S. Optimization of MAE for the Separation of Nicotine and Phenolics from Tobacco Waste by Using the Response Surface Methodology Approach. *Molecules* **2021**, *26*, 4363. <https://doi.org/10.3390/molecules26144363>

Academic Editor: Francisco J. Barba

Received: 3 July 2021  
 Accepted: 17 July 2021  
 Published: 19 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Tobacco is an industrial non-food crop, containing large amounts of high added-value compounds, such as alkaloids (mainly nicotine), phenolic compounds (chlorogenic acids and rutin), carbohydrates, and aroma compounds [1]. At present, large quantities of tobacco parts are discarded as waste products from the cropping, handling, processing and consuming of tobacco and tobacco products. Tobacco industry waste is a processing by-product, available in large amounts across the world, and inappropriate for disposing due to the high content of nicotine [2,3]. Separated and purified nicotine could be used in nicotine replacement therapies such as gums and patches. Moreover, after extraction of nicotine, tobacco waste becomes more appropriate for using as fertilizer, fiberboards, and pulps [4]. Moreover, reducing of nicotine content is important for producing new tobacco non-addictive products. Current industrial strategies for tobacco waste are based on low-economic income solutions, such as production of the reconstituted tobacco [5]. The quantity of waste generated during tobacco production and processing, combined with the beneficial characteristics of bioactive compounds present in these wastes, justifies the great interest of researchers in the extracting of valuable compounds from tobacco waste. Therefore, different approaches and techniques were suggested, including supercritical fluid extraction [3,6], subcritical water extraction [7], and high-voltage electric discharge assisted extraction [8]. Moreover, conventional extraction methods, using common organic



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Research and Design

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cherd](http://www.elsevier.com/locate/cherd)iChemE  
ADVANCING  
CHEMICAL  
ENGINEERING

## Sequence of supercritical CO<sub>2</sub> extraction and subcritical H<sub>2</sub>O extraction for the separation of tobacco waste into lipophilic and hydrophilic fractions

Marija Banožić<sup>a,\*</sup>, Tanja Gagić<sup>b</sup>, Maja Čolnik<sup>b</sup>, Željko Knez<sup>b</sup>,  
Mojca Škerget<sup>b</sup>, Igor Jerković<sup>c</sup>, Stela Jokić<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

<sup>b</sup> Faculty Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor, Smetanova 17, 2000 Maribor, Slovenia

<sup>c</sup> Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 November 2020

Received in revised form 18

February 2021

Accepted 6 March 2021

Available online 13 March 2021

#### Keywords:

Tobacco waste

Scrap

Nicotine

Supercritical CO<sub>2</sub> extraction

Subcritical water extraction

### ABSTRACT

A tobacco solid waste was extracted by a sequence of supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) extraction and subcritical water extraction (SWE). The tobacco waste lipophilic compounds (targeted fatty acids, free base nicotine and VOCs) were extracted using the series of the main operation parameters for the SC-CO<sub>2</sub> extraction (pressure: 100–300 bar, temperature: 40–80 °C). The obtained SC-CO<sub>2</sub> extracts were rich in nicotine (0.362–1.585%), neophytadiene (0.082–0.256%) and 4,8,13-duvatriene-1,3-diol (0.144–0.590%). Other VOCs and targeted fatty acids (palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic) were also determined. Optimized condition for the SC-CO<sub>2</sub> extraction of tobacco waste was found at 300 bar and 61.22 °C. The residues (after SC-CO<sub>2</sub> extraction) were re-extracted with SWE under the solvent/solid ratio: 28 mL/g, temperature: 150 °C, time: 23 min. SWE extracts (hydrophilic fractions) were characterized by high concentrations of nicotine (1.61–4.67%), nicotinamide (0.198–0.428%), nicotinic acid (0.118–0.239%), phenolic compounds: chlorogenic acid (0.458–0.740%), 3,4-dihydroxybenzoic acid (0.236–0.403%), neochlorogenic acid (0.240–0.534%), and rutin (0–1.025%). They contained total phenols in the amount 8.03–10.11% and exhibited DPPH antiradical scavenging activity in the range 77.89 to 93.35%. As the results of applied higher temperature 5-HMF (0.076–0.11%), furfural (0.510–0.740%) and 5-MF (0.0292–0.0453%) were also detected in SWE extracts. In some experiments, the obtained values of detected compounds were considerable higher than those obtained from the raw scrap (without SC-CO<sub>2</sub> extraction pretreatment) implying that two-stage extraction process (SC-CO<sub>2</sub> extraction followed by SWE) can enhance the extraction efficiency due to the elimination of fats during SC-CO<sub>2</sub> extraction which enables better dissolution of the other compounds in subcritical H<sub>2</sub>O.

© 2021 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Valorisation of an agricultural and food waste and by-products is a concept that has attracted growing attention in the past

two decades with the recognition that the innovative techniques (such as green extraction methods) could contribute to the exploitation of waste material (Mourtzinou et al., 2018). Tobacco is one of the most commonly cultivated industry crop in the world. Harvesting, handling and processing of tobacco generate a significant amount of waste. Up to 20% of the tobacco plant material by mass can be lost as agricultural waste or industry waste (scrap, dust and midrib) (Wang et al.,

\* Corresponding author.

E-mail address: [mbanozic@ptfos.hr](mailto:mbanozic@ptfos.hr) (M. Banožić).

<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.03.005>

0263-8762/© 2021 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## Duhanski otpad Bosne i Hercegovine – problem ili vrijedna sirovina

### Sažetak

Duhan se na području Bosne i Hercegovine proizvodi još od prve polovice 17. stoljeća, a sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća proizvodnja doživljava svoj vrhunac, nakon čega slijedi stagnacija i naglo opadanje proizvodnje. Ipak duhan se na području Bosne i Hercegovine, još uvijek uzgaja kao važna poljoprivredna kultura. Zbog neorganiziranog otkupa kao i nedostatka nadzora od strane države Bosne i Hercegovine nad proizvodnjom duhana, proizvođači svu svoju proizvodnju duhana plasiraju na sivo tržište u obliku poluproizvoda, rezanog duhana, poznatog na ostalim tržištima kao hercegovačka škija, dok na području Posavine postoji organizirani otkup, no niska otkupna cijena, proizvođače stavlja u izuzetno težak položaj. Je li revitalizacija duhana na području Bosne i Hercegovine moguća? Opće prihvaćeno mišljenje je da je revitalizacija nekadašnjeg načina uzgoja duhana zbog promjena preferencija potrošača, tipova cigareta i promjene tehnologije obrade duhana nemoguća. No potrebno je tražiti alternativne načine plasiranja ovih tipova duhana, kao duhana za motanje, te kao autohtonih proizvoda. Jedna od najvažnijih komponenti je i uloga države, s obzirom da duhan podliježe posebnom sustavu trošarina i poreza. U lancu vrijednosti, od poljoprivrednih proizvođača, do prerađivača, važna komponenta je i zbrinjavanje otpada. S obzirom da je duhanski otpad, bogat izvor visokovrijednih komponenti koje su i prikazane u ovom preglednom radu, njegovo iskorištavanje moglo bi dati dodatnu vrijednost i podići nisku otkupnu cijenu duhana, a ujedno riješiti i problem zbrinjavanja ovog opasnog otpada.

**Ključne riječi:** duhan, duhanski otpad, bioaktivne komponente

### Uvod

Duhan je jedna od najraširenijih i najviše uzgajanih biljki na svijetu. Iako se stoljećima koristi kao duhan za pušenje i žvakanje, on također ima i ljekovita svojstva, te je bogat izvor bioaktivnih komponenti. Duhan je biljka koja pripada carstvu *Plantae*, diviziji *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Solanales*, porodici *Solanaceae*, rodu *Nicotiana* i vrsti *tabacum*. U svijetu su poznate 64 vrste duhana dok ljudi koriste samo dvije vrste *Nicotiana rustica* i *Nicotiana tabacum* iz porodice *Solanaceae*, a obje su autohtone američke vrste. Međusobno se razlikuju po koncentraciji nikotina (*rustica* ima znatno veću koncentraciju i manje listove) te se koristila u različitim šamanskim ritualima. Za razliku od toga, *Nicotiana tabacum* (Slika 1) se koristi u obliku pušenja, i danas je njen uzgoj raširen na pet kontinenata. Duhan se konzumira zbog specifičnog i kompleksnog fiziološkog djelovanja sastojaka listova na središnji živčani sustav (Čagalj i sur., 2017).

<sup>1</sup> Marija Banožić, mag. ing. Prof. dr. sc. Drago Šubarić, izv. prof. dr. sc. Stela Jokić  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska  
Autor za korespondenciju: mbanozic@ptfos.hr



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops &amp; Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste-a review



Marija Banožić, Jurislav Babić, Stela Jokić\*

Faculty of Food Technology Osijek, J. J. Strossmayer University of Osijek, Pranje Kubača 20, Osijek 31 000, Croatia

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Tobacco waste  
Extraction  
Bioactive compounds

### ABSTRACT

Acting as the one of the main non-food crops, tobacco plays an important role in agriculture all over the world. Tobacco processing industries generate a huge volume of tobacco waste as by-product which is usually discarded due to its nicotine content, and only small part of it is recycled. Recycled waste is used for producing low value tobacco paper, named reconstituted tobacco, which causes waste of abundant bioactive compounds with anti-oxidant, anti-inflammatory, antifungal properties. This review summarizes the last knowledge about extraction of bioactive compounds from tobacco waste and introduces principles of new, most applied extraction techniques, such as ultrasound-assisted extraction, supercritical CO<sub>2</sub> extraction and microwave-assisted extraction. Based on comparison of these techniques, this review points out that extraction of bioactive compounds from tobacco waste is new opportunity for this type of waste and its contribution to sustainable waste and resource management. What is more, extraction of bioactive compounds can be effective at two levels. Firstly, extracted compounds can be implemented into new products. Secondly, after extraction of certain bioactive compounds, tobacco waste becomes more suitable for some other application or disposal.

### 1. Introduction

Bioactive compounds mostly represent secondary metabolites widely founded in the plants, but in recent time some primary metabolites are considered as bioactive compounds, as well. They have been used for preventive illness risk and in the treatment of wide range of diseases. In plants they have protecting role from biotic and abiotic stress. Since bioactive compounds are present in different amounts, it is important to develop their production in order to get the highest possible amount and find new alternative cheaper sources (Azmir et al., 2013; Cvjetko Bubalo et al., 2018). In the past decade, there is a growing interest for re-using and upgrading byproducts from plant processing industry. Those industries, especially food industry, produces a huge amount of solid and liquid wastes (Jayeola et al., 2018). In the other hand, waste-considered materials can be valuable source of bioactive compounds which can be extracted and implemented in new processes and products and replace costly raw materials.

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is one of the most commonly planted crops in the world. Despite of this, it has a huge economical, agricultural and social value. It has been widely used for smoking, as well as for chewing and sniffing. There are more than 600 known tobacco species, but only 2 of them are used in human consumption (Tayoub et al., 2015). Tobacco is native for South America, but it is growing all

over the world, including Republic of Croatia (Briški et al., 2003; Banožić et al., 2018), and the larger world producer is China (Hu et al., 2015). In biotechnology, tobacco plant is often used as model plant for producing cell culture and genetic engineering, because the tobacco life cycle from seed to seeding last only 3 months. Moreover, even the first transgenic plants is tobacco (Ganapathi et al., 2004).

Tobacco contains around 4000 substances including particles and gases where 1000 of them are delivered during smoking (Tayoub et al., 2015). The chemical composition of the tobacco leaves is changed during maturing, drying, fermenting, processing and storage, and is affected by the method of variety, cultivation, climatic area and many others (Banožić et al., 2018). During the drying process, the starch content decreases while the content of reducing sugars increase. In addition, during the fermentation process, the proportion of polyphenols and carbohydrates decreased, as well (Bhisey, 2012). A number of researchers have reported different groups of substances in tobacco, such as alkaloids (including nicotine) (Shen and Shao, 2006), polyphenols, terpenoids and essential oils (Cvetanovska et al., 2017), aroma compounds (Popova et al., 2015) limonene, indole, pyridine (Gozan et al., 2014), fatty alcohols, phytosterols (Liu et al., 2010). It is difficult to find the selective methods for extraction of targeted compounds from tobacco and tobacco related materials because tobacco contains a huge amount of different organic compounds, which can be co-extracted

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mbanozic@ptfos.hr](mailto:mbanozic@ptfos.hr) (M. Banožić), [sjokic@ptfos.hr](mailto:sjokic@ptfos.hr) (S. Jokić).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.11.2009>

Received 22 July 2019; Received in revised form 25 November 2019; Accepted 28 November 2019  
0926-6690/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Review

## Carbohydrates—Key Players in Tobacco Aroma Formation and Quality Determination

Marija Banožić <sup>1</sup>, Stela Jokić <sup>1,\*</sup>, Đurđica Ačkar <sup>1</sup>, Marijana Blažić <sup>2</sup> and Drago Šubarić <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia; marija.banozic@ptfos.hr (M.B.); dackar@ptfos.hr (Đ.A.); dsubaric@ptfos.hr (D.Š.)

<sup>2</sup> Karlovac University of Applied Sciences, Josip Juraj Strossmayer Square 9, 47000 Karlovac, Croatia; marijana.blazic@vuka.hr

\* Correspondence: stela.jokic@ptfos.hr; Tel.: +385-31-224-333

Received: 11 March 2020; Accepted: 9 April 2020; Published: 9 April 2020



**Abstract:** Carbohydrates are important compounds in natural products where they primarily serve as a source of energy, but they have important secondary roles as precursors of aroma or bioactive compounds. They are present in fresh and dried (cured) tobacco leaves as well. The sugar content of tobacco depends on the tobacco variety, harvesting, and primarily on the curing conditions (temperature, time and moisture). If the process of curing employs high temperatures (flue-curing and sun-curing), final sugar content is high. In contrast, when air curing has a lower temperature, at the end of the process, sugar level is low. Beside simple sugars, other carbohydrates reported in tobacco are oligosaccharides, cellulose, starch, and pectin. Degradation of polysaccharides results in a higher yield of simple sugars, but at the same time reduces sugars oxidation and transfer into carbon dioxide and water. Loss of sugar producers will compensate with added sugars, to cover undesirable aroma properties and achieve a better, pleasant taste during smoking. However, tobacco carbohydrates can be precursors for many harmful compounds, including formaldehyde and 5-hydroxymethylfurfural. Keeping in mind that added sugars in tobacco production are unavoidable, it is important to understand all changes in carbohydrates from harvesting to consuming in order to achieve better product properties and avoid the formation of harmful compounds. This review summarizes current knowledge about tobacco carbohydrates, including changes during processing with special focus on carbohydrates as precursors of harmful compounds during smoking.

**Keywords:** tobacco; carbohydrates; aroma profile; processing condition

### 1. Introduction

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is the most widely cultivated non-food crop in the world. Although not consumed as a food, it is partially consumed by digestive system (mouth) and its sensory properties such as aroma, flavor and odor are the most important attribute to define consumer acceptance of tobacco and tobacco products. Besides consuming by smoking, a small part of total tobacco production (less than 10%) is for consumption by chewing and sniffing [1,2]. Sensory properties of products may help to determine whether a product will be preferred over another. To control sensory qualities of these types of products, it also appears necessary to understand the mechanisms involved in the retention and releasing of aroma compounds [3]. Different complex chemical reactions are involved in tobacco aroma formation, including degradation of carbohydrates, degradation of chlorogenic acid, degradation of proteins, Maillard reaction, Strecker degradation and caramelization reactions, and many others. For centuries, carbohydrates were considered as primary compounds with high nutritional value. Today it is well known that carbohydrates have both digestive and psychological role. The term carbohydrates is generally considered as neutral compounds of carbon,

U: Neke mogućnosti iskorištenjanusproizvoda  
prehrambene industrije – Knjiga 2.

ISBN: 978-953-7005-64-1

Urednici: Drago Šubarić  
Jurislaw Babić

©2019 Prehrambeno-tehnološki  
fakultet Osijek

### Poglavlje 13

## NEKE MOGUĆNOSTI ISKORIŠTENJA NUSPROIZVODA DUHANSKE INDUSTRIJE

Marija Banožić<sup>1</sup>, Elma Nukić-Hrastovina<sup>2</sup>, Stela Jokić<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska, \*sjokic@ptfos.hr*

<sup>2</sup>*Fabrika duhana Sarajevo, Pofalička 5, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina*

### SAŽETAK

Duhan je važna poljoprivredna, ali i ekonomska kultura koja se, za razliku od ostalih, ne koristi kao hrana, već se uživa zbog svojih fizioloških učinaka na središnji živčani sustav i to prvenstveno udisanjem dima koji se oslobađa izgaranjem listova ili, rjeđe, žvakanjem listova. Kao biljka, duhan se uzgaja širom svijeta, a vodeći proizvođač je Kina. S obzirom na velike kapacitete proizvodnje, duhanska industrija generira i velike količine otpada. Promatrajući biljku duhana, jedino se list smatra komercijalno vrijednim te se koristi za daljnju preradu. Korijen, stabljika, neodgovarajući listovi (oštećeni ili bolesni), cvijet i sjeme se odvajaju na polju i smatraju se poljoprivrednim otpadom, dok se tijekom prerade lista izdvaja rebro lista, frakcije manjih granulacija i duhanska prašina koje se smatraju industrijskim otpadom. Dio duhanskog otpada je moguće iskoristiti u izradi duhanske folije, koja se kasnije koristi kao surogat pri proizvodnji cigareta, no to je zahtjevan i skup proces. List duhana sadrži oko tri tisuće različitih kemijskih spojeva uključujući aldehide, organske kiseline, alkohole, estere, ketone i ugljikohidrate, a još oko tisuću njih nastaje izgaranjem duhana pri pušenju. Polifenoli, tanini, kumarini i flavonoidi nastaju kao sekundarni metaboliti u biljci i njihova se koncentracija mijenja tijekom prerade duhana te oni direktno utječu na organoleptička svojstva duhana. Svi oni nalaze se, u manjim ili većim koncentracijama, i u duhanskom otpadu. U ovom poglavlju obrađene su različite vrste duhanskog otpada, metode njegovog izdvajanja te mogućnosti njegovog iskorištenja s naglaskom na ekstrakciju i izolaciju bioaktivnih komponenti, čime bi se postigli pozitivni učinci na više razina. Primarno je to smanjenje velikih količina otpada koji nastaje u duhanskoj industriji, minimaliziranje sadržaja nikotina u otpadu čime bi se taj otpad mogao

In: Supercritical Carbon Dioxide  
Editor: Evie P. Hayden

ISBN: 978-1-53617-404-5  
© 2020 Nova Science Publishers, Inc.

*Chapter 5*

**OVERVIEW ON THE APPLICATION  
OF SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> EXTRACTION  
OF ACTIVE COMPOUNDS FROM TOBACCO  
AND TOBACCO WASTE**

*Marija Banožić<sup>1</sup>, Senka Vidović<sup>2</sup>,  
Jelena Vladić<sup>2</sup> and Stela Jokić<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup>University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek,  
Faculty of Food Technology Osijek, Osijek, Croatia

<sup>2</sup>University of Novi Sad, Faculty of Technology,  
Novi Sad, Serbia

**ABSTRACT**

In the past few decades, Supercritical Fluid Extraction (SFE) using CO<sub>2</sub> as a solvent has gained wide acceptance as an alternative technique to conventional solvent extractions for separation of active compounds from different plant materials including tobacco, as a most produced non-food crop in the world. Tobacco contains more than 4000 compounds, together with particles and gases where a large part of them are delivered

---

\* Corresponding Author's Email: stela.jokic@ptfos.hr.