

UNIVERZITET CRNE GORE  
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET  
STUDIJSKI PROGRAM HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



Ana Marušić

**Biopotencijal industrijskog duvanskog otpada**

MASTER RAD

Podgorica, 2022.

UNIVERZITET CRNE GORE  
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET  
STUDIJSKI PROGRAM HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



**Biopotencijal industrijskog duvanskog otpada**

MASTER RAD

Student:

Ana Marušić

Mentor:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica

Podgorica, 2022.

## PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Ana Marušić

Datum i mjesto rođenja: 15.06.1993. godine; Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Osnovne studije: Hemijska tehnologija, 2015. Godine

Specijalističke studije: Hemijska tehnologija, 2016. Godine

## INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Biopotencijal industrijskog duvanskog otpada

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

## UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

Datum prijave rada: 2022. godine

Datum prihvatanja teme: 2022. godine

Mentor: Dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a

Komisija za ocjenu teme i podobnosti magistranda:

Dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Dr Slađana Krivokapić, vanredni profesor PMF-a, član

Dr Svetlana Perović, redovni profesor PMF-a, član

Komisija za ocjenu rada:

Dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Dr Slađana Krivokapić, vanredni profesor PMF-a, član

Dr Svetlana Perović, redovni profesor PMF-a, član

Komisija za odbranu rada:

Dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Dr Slađana Krivokapić, vanredni profesor PMF-a, član

Dr Svetlana Perović, redovni profesor PMF-a, član

Datum odbrane:

## Izvod

Reciklaža i korišćenje otpada od prerade duvana predstavlja ozbiljan izazov za održivi razvoj proizvodnje duvana i duvanskih proizvoda. Pažnja istraživača do sada bila je uglavnom usmjerena na ispitivanje listova duvana i otpada koji se odnosi na ostatke biljke- stabljiku, oštećene listove ili cvijet. Ovaj rad se bavi ispitivanjem duvanske prašine, kao najopasnijeg dijela duvanskog otpada u preradi duvana, prije svega po životnu sredinu. Posljednjih godina otpadne materije se ne posmatraju kao neupotrebne i štetne, već se teži da se iskoriste kao sirovina za dobijanje visokovrijednih supstanci i za razvoj novih proizvoda. Cilj ovog istraživanja je pružanje doprinosa u otkrivanju novih mogućnosti iskorišćenja duvanske prašine, kao potencijalnog izvora korisnih materija.

Za dobijanje ekstrakta duvanske prašine primijenjene su četiri različite tehnike ekstrakcije: maceracija, digestija, ultrazvučna i Soxhlet ekstrakcija. Ispitano je koja metoda, pri istim uslovima (rastvarač, vrijeme trajanja, temperatura) daje najbogatiji ekstrakt u pogledu sadržaja fenola i flavonoida, pri čemu se kao najpogodnija istakla ultrazvučna.

Folin-Ciocalteu metodom određen je sadržaj fenola u svim uzorcima, dok je za kvantitativno određivanje flavonoida iskorišćena metoda sa aluminijum-hloridom. Količina fenola kreće se od 66,93 do 154,83 mg GAE/ g suve materije, a ukupnih flavonoida od 4,57 do 65,69 mg QE/ g suve materije. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu prisutnost navedenih bioaktivnih supstanci u ekstraktima duvanske prašine.

Antioksidansi zaslužni su za sprječavanje oksidacije drugih supstanci, a u biološkim sistemima neutrališu slobodne radikale, zbog čega su veoma značajni. U ovoj master tezi ispitana je antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih iz duvanskog otpada primjenom DPPH metode, pri čemu su svi uzorci pokazali pozitivnu aktivnost.

Takođe, dokazan je antimikrobni potencijal duvanske prašine prema određenim gram- pozitivnim i gram- negativnim bakterijskim vrstama Broth mikrodilucionom metodom. Uzorci nijesu pokazali selektivnost ka određenom tipu bakterija, već je antimikrobno dejstvo ka skoro svim kulturama bilo isto.

Duvanska prašina, koja predstavlja veliki problem duvanske industrije u svijetu, kao i kod nas, dokazivanjem biološke aktivnosti, postaje potencijalni izvor biološki važnih supstanci za kojima potražnja sve više raste, prije svega u farmaceutskoj industriji. Sa druge strane, iskorišćenjem duvanske prašine u ove svrhe smanjilo bi se prekomjerno nastajanje neupotrebne otpada i umanjila opasnost zagađenja životne sredine njenim uništenjem (spaljivanjem i nepropisnim odlaganjem).

Ključne riječi: duvan, duvanska prašina, ekstrakcija, bioaktivna jedinjenja, antioksidativna aktivnost, antimikrobni potencijal

## Abstract

Recycling tobacco production waste represents a difficult challenge for the sustainable development of tobacco production. Research so far has focused on examining tobacco leaves and waste, mainly relating to the rest of the plant: stem, damaged leaves, and flowers. The proposed work focuses on the examination of tobacco dust, as it is the most toxic part of tobacco waste, especially to the environment. Recently, there has been an incentive to not consider tobacco waste as unusable and harmful, but to attempt to refine into valuable substances or use it for the development of new products. The proposed research aims to develop new capabilities for recycling tobacco dust as a potential source of usable substance.

To obtain tobacco dust extract, four different extraction techniques are used: maceration, digestion, ultrasound, and Soxhlet extraction. Thus, it is investigated which method with equal test conditions (solvent, extraction time, temperature) yields the most concentrated extract, with the highest quantities of phenol and flavonoid. Hence, ultrasound extraction is proven to be the most efficient.

The Folin-Ciocalteu method is used to determine the phenol content in all the samples, while the aluminum-chloride method is used to quantitatively measure flavonoids. Phenol content is 66.93 to 15.83 mg GAE/g of dry matter, while total flavonoid is 4.57 to 65.69 mg QE/g of dry matter. These results point to significant contents of bioactive matter in tobacco dust extract.

These antioxidants prohibit the oxidation of other substances while neutralizing free radicals in biological systems, thus making them valuable. In this master thesis, the antioxidizing activity of extracts obtained from tobacco waste by the DPHH method is investigated, where all the samples exhibited positive activity.

Furthermore, the antimicrobe potential of tobacco dust is shown towards certain gram-positive and gram-negative bacterium types using the Broth microdilution method. The samples did not show preference towards specific types of bacteria, but the effect of the antimicrobe property on all cultures was similar.

As such, tobacco dust, which traditionally represents a problem of the tobacco industry, by exploiting its biological properties could potentially become a source of valuable substances for the pharmaceutical industry. The impact of this potential source is made larger by the growing demand for such substances. Additionally, by recycling the tobacco dust tobacco industry pollution could be reduced, and thus its impact on the environment (mainly relating to burning and improper disposal).

Keywords: tobacco, tobacco dust, extraction, bioactive compounds, antioxidizing activity, antimicrobe potential

## ***Zahvalnica***

*Neizmjernu zahvalnost dugujem mentorki Biljani na izdvojenom vremenu, svakom stručnom savjetu, strpljenju i povjerenju koje mi je ukazala, kako tokom izrade ovog rada, tako i tokom studiranja.*

*Zahvaljujem se ostalim članovima komisije na sugestijama i smjernicama pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Takođe, hvala mojoj porodici, prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene, motivisali me i pružali bezrezervnu podršku u svemu.*

***Ana Marušić***

# SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	BILJKA DUVAN.....	3
2.1.1.	Korijen i stablo biljke duvan.....	4
2.1.2.	List biljke duvan.....	4
2.1.3.	Cvijet i plod biljke duvan.....	6
2.2.	DUVANSKI OTPAD.....	8
2.2.1.	Duvanska prašina.....	9
2.2.2.	Rebro duvanskog lista.....	11
2.2.3.	Refabrikat.....	11
2.3.	BIOAKTIVNA JEDINJENJA.....	11
2.3.1.	Istorija, definicija i podjela bioaktivnih jedinjenja.....	11
2.3.2.	Klasifikacija i sinteza bioaktivnih jedinjenja.....	12
2.4.	BIOAKTIVNA JEDINJENJA U DUVANSKOM OTPADU.....	15
2.4.1.	Alkaloidi.....	15
2.4.2.	Terpeni.....	17
2.4.3.	Fenoli.....	18
2.4.4.	Polisaharidi.....	20
2.5.	PROCES IZOLOVANJA BIOAKTIVNIH SUPSTANCI.....	21
2.5.1.	Soxhlet ekstrakcija.....	23
2.5.2.	Maceracija.....	24
2.5.3.	Digestija.....	25
2.5.4.	Ultrazvučna ekstrakcija.....	25
2.6.	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST.....	27
2.6.1.	Slobodni radikali.....	27
2.6.2.	Antioksidativni process.....	30
2.7.	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST.....	31
2.7.1.	Mehanizmi delovanja antibakterijskih sredstava.....	32
2.7.1.1.	Biosinteza bakterijskih proteina.....	32

2.7.1.2.	Biosinteza ćelijskog zida.....	33
2.7.1.3.	Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina .....	33
2.7.1.4.	Uništavanje bakterijske membrane .....	33
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	35
3.1.	MATERIJAL I METODE .....	36
3.1.1.	Materijal.....	36
3.1.2.	Metode.....	37
3.1.2.1.	Ekstrakcija bioaktivnih materijala .....	37
3.1.2.2.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	38
3.1.2.3.	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	40
3.1.2.4.	Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom.....	42
3.1.2.5.	Određivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom .....	44
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	46
4.1.	Sadržaj ukupnih fenola u duvanskoj prašini.....	46
4.2.	Sadržaj ukupnih flavonoida u duvanskoj prašini.....	47
4.3.	Antioksidativna aktivnost duvanske prašine.....	49
4.4.	Antimikrobna aktivnost duvanske prašine .....	50
5.	ZAKLJUČAK .....	55
6.	LITERATURA .....	57



# 1. UVOD

Približno šest triliona cigareta se potroši širom svijeta svake godine, a prema izvještaju objavljenom 2019. godine, ukupna proizvodnja duvana iznosila je približno 6,68 miliona metričkih tona (*Tobacco production worldwide from 1990 to 2019*, bez dat.). Otpad od prerade duvana se obično definiše kao čvrsti otpad, koji se sastoji od duvanskog praha i duvana niskog kvaliteta (Chen i sar., 2007a), dok su neke studije pokazale da se duvanski otpad odnosi na korijenje, žilu lista, stabljiku (Hu i sar., 2015), listove duvana nižeg od standardnog kvaliteta (Wang i Gu, 2018) i mješavinu ostatka duvana i duvanske prašine (Rincón i sar., 1998). Glavni čvrsti nusproizvodi pri preradi duvana su čestice duvana, dakle, za očekivati je da su vrsta i sadržaj bioaktivnih hemikalija slični originalnom duvanu (Briški i sar., 2003).

Svjetska duvanska industrija je 1995. godine proizvela oko 2262 miliona kilograma proizvodnog otpada i 209 miliona kilograma hemijskog otpada (Novotny i Zhao, 1999). Nikotin je sastojak duvanske prašine koji može da isprava i rastvorljiv je u vodi. Zato može, usljed nepravilnog skladištenja duvanske prašine, da dospije u vazduh ili migrira u životnu sredinu i podzemne vode. Zbog visokog sadržaja nikotina i ukupnog organskog ugljenika otpad duvanske industrije, kategorizovan kao agroindustrijski otpad, ne može se odlagati na deponiju, što predstavlja veliki problem kako u svijetu, tako i kod nas (Gotal, 2020).

Reciklaža i korišćenje otpada od prerade duvana je sve ozbiljniji izazov za održivi razvoj proizvodnje duvana. Svi nusproizvodi lista duvana nalaze primjenu u izradi duvanskih proizvoda, najčešće kao komponente rekonstituisanog duvana/ duvanske folije, ali se tako reciklira samo 40% duvanskog otpada, te su predloženi različiti načini za drugačije iskorišćenje. Prema brojnim studijama duvanski otpad je potencijalno dobar materijal: za aerobno kompostiranje (Briški i sar., 2003), kao organsko đubrivo jer je bogat sa tri hranljive materije koje se nalaze u komercijalnom đubrivu (azot, kalijum i fosfor) (Chaturvedi i sar., 2008) i za proizvodnju energetskih briketa (Purwono i sar., 2006) s obzirom na njegove kalorijske vrijednosti. Međutim, pokazalo se da su takvi načini korišćenja duvanskog otpada manje efikasni i zagađuju životnu sredinu (Zeng i sar., 2012).

Otkrićem mnogih bioaktivnih supstanci, koje su prisutne i u duvanu, duvanski otpad može postati veoma korisna nova industrijska sirovina. Jedinjenja prisutna u duvanu pokazuju važne biološke aktivnosti uključujući otpornost na brojne bolesti, regulisanje zdravlja ljudi, sterilizaciju i kontrolu štetočina. Ovako širok spektar mogućnosti primjene daje visoku potencijalnu vrijednost nusproizvodima industrije prerade duvana (Zou i sar., 2021).

Osnovni ciljevi ove master teze su ispitivanje i kvantitativno određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima duvanske prašine nastale u fabrici sekundarne obrade duvana u Crnoj Gori, dokazivanje njihovog antioksidativnog i antimikrobnog potencijala, kao i pronalaženje optimalne metode ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz duvanskog otpada poređenjem dobijenih rezultata.

## 2. TEORIJSKI DIO



## 2.1. BILJKA DUVAN

Duvan (slika 1) odnosi se na niz biljaka iz roda *Nicotiana*, porodice *Solanaceae*, koje potiču iz Australije, Jugozapadne Afrike, Amerike i regiona Južnog Pacifika. Vrste *Nicotiana* mogu prirodno rasti u različitim dijelovima svijeta i ljudi ih koriste u svrhe liječenja i rekreacije (Zou i sar., 2021). Iako je poznato preko 75 vrsta duvana, samo se vrste *Nicotiana rustical* L. i *Nicotiana tabacum* L. trenutno komercijalno uzgajane da bi zadovoljile ljudsku potrebu i potrošnju (Mehmood i sar., 2020; Tezuka i sar., 2010).



**Slika 1.** Biljka duvan (autor: Marušić A.)

*N. tabacum* je svrstana u najznačajnije vrste biljnog carstva sa hemijskim i biološkim značajem, koja sadrži oko 2500 do sada okarakterisanih sekundarnih metabolita, i zato se ekstenzivno uzgaja širom svijeta (Jassbi i sar., 2017; Sierro i sar., 2018). Za *N. rustica*, takođe poznat kao astečki ili indijski duvan, se sumnja da je originalna vrsta duvana porijeklom iz Amerike. Iako se *N. tabacum* široko koristi, astečki duvan se još uvijek uzgaja u Južnoj Americi, Turskoj, Rusiji i Vijetnamu (Sierro i sar., 2018). Druge vrste duvana, kao što su npr. *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana attenuate*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana alata* se, uglavnom zbog prisutnih fitohemikalija, koriste se u različite svrhe (Popova i sar., 2020).

Biljke duvana nisu samo vitalne kulture u tradicionalnim poljoprivrednim sistemima, već se mogu primijeniti i kao idealne modelne biljke u studijama ispitivanja bioloških mehanizama (Xiao, 2015). Duvan je biljna vrsta sa karakteristikama lake genetske transformacije, kratkog vremena generacije i visoke osjetljivosti na bolesti (Komori i sar., 2007). Vrste *Nicotiana* sadrže biološki aktivna jedinjenja, što utiče na njihov značaj i upotrebu. Primjer je *N. benthamiana*, koja se intenzivno koristi kao model-biljka za proučavanje interakcija između biljaka i patogena (Poon i sar., 2014).

Iako je duvan jednogodišnja biljka, vegetacioni period u tropskim predjelima može da traje više godina (Dražić, 1995).

### 2.1.1. Korijen i stablo biljke duvan

Duvan ima korijen koji je vretenast i sadrži veliki broj žilica koje se najvećim dijelom nalaze u obradivom sloju zemljišta (slika 2). Dubina na kojoj se nalazi glavna korijenska masa je 30-40 cm. Biljka preko korijenovog sistema intenzivno apsorbira hranjive materije iz tla. Korijen sintetizira nikotin, koji se zatim akumulira u listu. Stablo je ispunjeno parenhimom, okruglo, uspravno i člankovito (slika 3). Visina stabla varira u zavisnosti od, prije svega sorte, a zatim i primijenjene agrotehnike, ekoloških uslova i kreće se od 0,5 do 3m. Članci (internodije) su u donjem duži i deblji, a u gornjem dijelu stabla kraći i tanji. Broj internodija i njihova dužina se razlikuju u zavisnosti od sorte. (Dražić, 1995).



**Slika 2.** Korijen biljke duvan (izvor: <https://bg.imadeself.com/wp-content/uploads/suhaya-kornevaya-gnil.jpg>)



**Slika 3.** Stablo biljke duvan (autor: Marušić A.)

### 2.1.2. List biljke duvan

Dužina i širina određuju veličinu lista duvana. Duž glavnog nerva lista mjeri se dužina, a na najširem dijelu lista širina. Prema ovim karakteristikama sve poznate sorte duvana podijeljene su u tri grupe: sitnolisne, srednjelisne i krupnolisne. Postoji zavisnost između kvaliteta duvana i njegovih dimenzija, zbog čega je dimenzija lista važan pokazatelj prilikom klasifikacije duvana. Kod orijentalnih duvana dužina lista se kreće od 10 do 20 cm (srednji list), a do 80 cm i više kod krupnolisnih sorti. Uslovi gajenja u velikoj mjeri utiču na ovaj parameter. Širina lista sama po sebi nema značajan uticaj na sam kvalitet duvana. Veličina lista određuje se postavljajući list pod staklo kako bi bilo što preciznije, a mjerenje se vrši po dužini glavnog nerva pri vlažnosti od 14 - 16% (Arsić, 2019).

Višeceljske žljezdaste dlačice prekrivaju površinu lista. Iz njih se luče smolaste materije i etarska ulja koja su nosioci aromatičnosti i mirišljivosti duvana. Donji listovi imaju manji broj žlijezda po jedinici površine lista od listova na vrhu stabla (Dražić, 1995).

Debljina lista duvana se obično kreće od 0,05 - 0,15 mm. Kada prosječna debljina lisnog tkiva iznosi 0,7 mm smatra se da se radi o tankom listu, ako ima debljinu 0,7 - 1,0 mm radi se o listu srednje debljine, a sve preko 1 mm spada u debelo lisno tkivo. Debljina duvanskog lista, jedan od glavnih pokazatelja kvaliteta duvana, javlja se usljed povećanja međucelijskog prostora ćelija ili zadebljanja ćelijskih opni kutikule i epidermisa. Parametar za ocjenu kvaliteta duvana je sadržaj nikotina i šećera, koji je obrnuto proporcijalan debljini duvana. Sa povećanjem debljine lista, sadržaj ovih supstanci se smanjuje, te kvalitet duvana opada. Izuzetak su oni duvani kod kojih je premala debljina lista rezultat nedovoljne zrelosti ili pak prezrelosti (Arsić, 2019).

U toku vegetacionog perioda lišće je svijetlo ili tamno zelene boje. Nakon primarne obrade duvana, boja lišća se mijenja u svijetlo žutu, žutu, zlatno žutu, žutonarandžastu, braon sa raznim nijansama ostalih boja, kao što se vidi na slici 4 (Dražić, 1995).



**Slika 4.** Različite faze zrelosti lista duvana

(izvor: <https://www.seeds-gallery.shop/sr/pocetak/duvan-seme-samsoun-orient.html>)

Formiranje i sazrijevanje duvana kreće od donjih ka gornjim listovima. Donje lišće kao najstarije, prvo se formira i zri, dok se listovi pri vrhu, koji su najmlađi formiraju poslednji na stabljici i poslednji sazrijevaju. Grupa od nekoliko susjednih listova, koji sazrijevaju istovremeno i beru se istovremeno, čine inserciju koja se još zove "ruka" ili "berba". Njihov broj varira od 3 do 7 listova u zavisnosti od sorte i uslova gajenja. Uslovi porasta i razvitka u toku vegetacije pojedinih grupa listova nisu jednaki te se zbog toga morfološka, fizička, hemijska i degustativna svojstva pojedinih grupa listova razlikuju (Arsić, 2019). Idući od osnove prema vrhu razlikuju se sljedeće insercije: podbir, nadpodbir, srednje lišće (donji, prvi srednji i gornji srednji) podovršak i ovršak (Dražić, 1995).

Lišće se razlikuje po svom hemijskom sastavu, ne samo između sorti, već i u okviru jedne iste sorte. U kojoj mjeri se razlikuje lišće, koje pripada istoj biljci, određuje ujedno i njegovu upotrebnu vrijednost. Iz pazuha lišća razvijaju se zaperci koji nijesu poželjni jer smanjuju količinu hranljivih materije lišću, što utiče na njegov prinos i kvalitet (Dražić, 1995).

Čvrstina i elastičnost su pozitivni indikatori kvaliteta duvana. Smatra se da elastičnost pojačavaju ugljeni hidrati, dok je čvrstina vezana za pektinske materije. Celuloza i mineralne materije slabe čvrstinu (Tayoub i sar., 2015).

### 2.1.3. Cvijet i plod biljke duvan

Cvjetovi, grupisani u manje ili više rastresitu cvast koja je štitasta, razvijaju se na vrhu stable (slika 5). Čašični listići su uglavnom u različitoj mjeri srasli i zeleni. Krunični listići mogu biti različite boje u zavisnosti od same sorte duvana: bijeli, roze, ružičasti ili crveni. Oni su srasli i imaju zvonast oblik, a završavaju se obodom oblika petougla koji može biti manje ili više usiječen, takođe u zavisnosti od sorte. U svakom cvijetu nalazi se tučak sa stubićem i žigom, koji su u nivou sa pet prašnika. Duvan je samoplodna (autogamna), ali može biti i stranoplodna (ksenogamna) vrsta-pomoću insekata jer se u dnu plodnika nalaze nektarske žlijezde (Dražić, 1995).

Plod je čaura koja se sastoji od dva dijela, jajastog oblika i mrko-braon boje. Kada je zrela, čaura najčešće puca. Jedna čaura sadrži od 1000 do 2000 sjemenki, a jedan gram čaura od 10000-15000 sjemenki (slika 6). Masa 1000 sjemenki je najčešće 0,06-0,08 g. Sjeme je vrlo sitno, hrapavo, bubrežastog oblika, mrežaste površine, mrko. Sastoji se od omotača, endosperma i klice. Ako se sjeme čuva na temperaturama od 0 °C do 4 i ako se sadržaj vlage u njemu kreće od 5 do 8%, njegova klijavost se može održati više godina (Dražić, 1995).



**Slika 5.** Cvijet biljke duvan (izvor: <https://www.plantea.com.hr/pravi-duhan/>)



**Slika 6.** Plod biljke duvan (izvor: <https://i2.wp.com/dachnaya-zhizn.ru/images/dacha/m4.jpg>)

Duvan sadrži oko 4000 supstanci, uključujući čestice i gasove, od kojih se 1000 oslobađa tokom pušenja (Tayoub i sar., 2015). Hemijski sastav listova duvana mijenja se tokom sazrijevanja, sušenja, fermentacije, prerade i skladištenja, a na njega utiču vrsta sorte, uzgoj, klimatsko područje i mnogi drugi faktori (Banožić i sar., 2018). Tokom procesa sušenja, sadržaj skroba se smanjuje dok se sadržaj redukujućih šećera povećava. Pored toga, tokom procesa fermentacije smanjuje se i udio polifenola i ugljenih hidrata (Bhisey, 2012).

Brojni istraživači su identifikovali različite grupe supstanci prisutnih u duvanu, kao što su alkaloidi (uključujući nikotin) (Shen i Shao, 2006), polifenoli, terpenoidi i eterična ulja (Cvetanovska i sar., 2017), limonen, indol, piridin (Popova i sar., 2015), razni alkoholi, fitosteroli (Liu i sar., 2010).

Hemija i farmakologija metabolita duvana potkrepljuju razumno interesovanje za inovativniju ili širu upotrebu biljke kroz ekstrakciju i koncentraciju frakcija sa potencijalnim korisnim efektima. S druge strane, duvan se od davnina koristio u industriji za dobijanje aromatičnih proizvoda zbog bogatog sadržaja eteričnih ulja. Paralelno sa komercijalnom upotrebom duvana kao materijala za proizvodnju različitih duvanskih proizvoda, ova biljka se neosporno ističe svojim potencijalom da sintetiše mnoštvo sekundarnih (ili specijalizovanih) metabolita sa različitim biološkim ili farmakološkim aktivnostima. Kultivisani duvan (*N. tabacum*) spada u hemijski i biološki dobro proučene vrste biljnog carstva, sa više od 2500 okarakterisanih sekundarnih metabolita, koji se ažuriraju kontinuiranim istraživanjem (Jassbi i sar., 2017).

Zbog ekonomskog značaja razvijeni su se brojni komercijalni tipovi duvana, od kojih svaki ima karakteristična svojstva, sastav i upotrebu. Danas se uglavnom proizvode i u cigaretama koriste tri vrste duvana: orijentalni (poznatiji kao aromatični ili turski duvan, koji se smatra najbogatijim među svim vrstama po ukusu), Berlejšvijetli duvan sušen na vazduhu i Virdžinija duvan (Popova i sar., 2019).

## 2.2. DUVANSKI OTPAD

Prema literaturnim podacima više od 20% duvanskog materijala odbacuje se kao duvanski otpad (Popova i sar., 2019). Ne postoji opšta definicija duvanskog otpada. Obično se definiše kao čvrsti otpad, koji nastaje tokom proizvodnje duvana, i opisuje se kao duvan niskog kvaliteta i duvanska prašina. Može se klasifikovati u tri vrste: poljoprivredni, industrijski i potrošački otpad (Gotal, 2020; Novotny i sar., 2015).

Poljoprivredni otpad obuhvata stabljiku duvana koja ima veliki potencijal kao sirovina za proizvodnju celuloze i papira. Nadalje, uključuje sjeme duvana koje može biti korisno u proizvodnji biodizela zbog značajne količine ulja, a sjeme kao takvo ne sadrži nikotin (Gotal, 2020).

Tokom procesa prerade lišća nastaje nekoliko vrsta otpada koji se razlikuju po lokaciji, procesu granulacije i separacije, kao i sadržaju vlage (Gotal, 2020).

Najveća količina duvanskog otpada nastaje u procesu pripreme duvanske mješavine za cigarete, a zatim pri transportu i rukovanju gotovom duvanskom mješavinom. Takođe, pri izradi same cigarete nastaje velika količina duvanske prašine (Chen i sar., 2007b).

Prilikom industrijske prerade izdvojaju su tri vrste otpada od duvana: rebro, prašina i sitni ostaci lista-refabrikat (slika 7) (Banožić i sar., 2021).



**Slika 7.** Industrijski duvanski otpad a) duvanska prašina b) rebro c) refabrikat (Banožić i sar., 2020)



### 2.2.1. Duvanska prašina

Prašina je gasoviti disperzni sistem sastavljen od čvrstih čestica koje mogu određeno vrijeme da lebde u gasnoj sredini. Nastale su kao rezultat dispergovanja pri mehaničkim operacijama sa čvrstim materijalima ili usled djelovanja aerodinamičkih sila na usitnjene materijale (sitnjenje čvrstog materijala, brušenje i poliranje, klasifikacija i sortiranje, miješanje usitnjenog materijala kao i transport i doziranje usitnjenog materijala) (Tasić, 2006).

Tehnološki put prerade duvana obiluje procesima pri kojima nastaje duvanska prašina (slika 8).



**Slika 8.** Duvanska prašina (autor: Marušić A.)

Duvansku prašinu sačinjavaju čestice u čvrstom agregatnom stanju, različitog oblika i veličina, koje lebde u vazduhu. Odstranjivanje duvanske prašine sa tehnološke linije vrši se uređajima za otprašivanje, filterima i ciklonima. Industrijski usisivači su neophodna sredstva kojima se održavaju svi uređaji koji dolaze u dodir sa duvanskom prašinom. Ipak, najveća količina prašine se stvara pri samom odvijanju tehnološkog procesa, na linijama i mašinama. Sve mašine za izradu cigareta povezane su sistemom za otprašivanje (slika 9), koji ima zadatak da prašinu odvoji od pravih duvanskih vlakana i ne dozvoli da uđe u cigaretu. Rad mašina za izradu cigareta najčešće je diskontinualan, jer čim se komora mašine napuni duvanom prestaje njeno napajanje. Ovakav rad mašina izaziva stalne promjene pritiska u sistemu, što izaziva fizičko lomljenje duvanskih niti i u tom procesu dolazi do stvaranja velike količine duvanske prašine. Ispred koša u koji se usipa rezani duvan za punjenje cigareta, nalazi se sito kroz koje prolaze najsitnije čestice duvana, da bi se onda pneumatski transportovale do filtera na kraju cjevovoda. Na ovaj sistem vežu se i cijevi koje vode prašinu s kaskada, mjesta gdje se slažu gotove cigarete u slagajne, koje se kasnije dopremaju na mašine za pakovanje cigareta. U fabrikama duvana otprašivanje se najčešće vrši filterima i ciklonima. Oni moraju u potpunosti zadovoljavati svjetske standarde u dijelu očuvanja radne i životne sredine (Tasić, 2006).



**Slika 9.** Sistem za otprašivanje (autor: Marušić A.)

Duvanska prašina je organska prašina biljnog porijekla. U radnoj prostoriji veća koncentracija smanjuje vidljivost, izaziva kvarove na uređajima. Ona može biti nosilac raznih patogenih mikroorganizama, gljivica, spora i dr. Spada u jako zapaljive materijale. Ima veliku sposobnost oksidacije, koja u određenim uslovima može dovesti do samozapaljenja. Duvanska prašina je ljepljiva i lako upija vodu (Tasić, 2006).

## 2.2.2. Rebro duvanskog lista

Rebro ili korjenčić je onaj dio lista duvana koji se pruža od stabljike i uklanja se tokom obrade. Ono može uzrokovati probleme kao što su rupe i promjene u karakteristikama cigareta, ukoliko se ne ukloni iz mješavine koja se koristi za njihovu izradu. Stabljike duvana i njeni djelovi se teško razlažu za kratko vrijeme u uslovima deponije. Dakle, ostaci duvana se često direktno spaljuju nakon berbe i prerade lišća, izazivajući ozbiljno zagađenje vazduha i trošenje velike količine potencijalno korisne biomase (Cai i sar., 2016). Prašina i ostaci lista su delovi lamele lista duvana, usitnjavaju se tokom obrade i premali su za proizvodnju cigareta. Prašina sadrži veoma male, fine čestice, dok otpad lišća sadrži veće čestice (Banožić i sar., 2021).

## 2.2.3. Refabrikat

Refabrikat su djelovi lista duvana koji nastaju tokom njegove obrade, čija veličina nije odgovarajuća i zato nisu prikladni za dalju upotrebu u industriji duvanskih proizvoda. Čestice refabrikata su veće od čestica prašine, ali manje od stripsa (korisnog dijela lista duvana koji se koristi pri izradi duvanske mješavine) (Gotal, 2020).

# 2.3. BIOAKTIVNA JEDINJENJA

## 2.3.1. Istorija, definicija i podjela bioaktivnih jedinjenja

Istorija korišćenja biljaka stara je koliko i samo čovječanstva. U početku su ljudi koristili biljke u nutritivne svrhe, ali nakon otkrića ljekovitih svojstava, ova prirodna flora je postala koristan izvor liječenja i poboljšanja zdravlja u različitim ljudskim zajednicama. Papirusi iz Starog Egipta su kroz hiljade recepata pokazali da su korijander i ricinusovo ulje korisni za medicinsku primjenu, kozmetiku i konzervanse (Vinatoru, 2001). Tokom Grčkog i Rimskog perioda, mnogi naučnici i filozofi, kao što su Hipokrat, Teofrast, Celzus i Dioskorid, opisali su stotine terapijskih upotreba biljnih materijala (Paulsen, 2010). Rumuni su od davnina poznati po upotrebi ljekovitog bilja u različite svrhe. U 19. veku u rumunskoj Farmakopeji su uvedene biljne droge i biljni proizvodi a 1904. godine osnovan je i prvi Institut za ljekovito bilje u gradu Klužu (Vinatoru, 2001).

Upotreba biljaka u antičko doba zapravo ilustruje historiju bioaktivnih molekula. U prošlosti, ljudi nisu znali ništa o bioaktivnim molekulima, ali je upotreba ovih jedinjenja bila dovoljno raznolika u različitim perspektivama. Svaki živi organizam proizvodi i obrađuje različita hemijska jedinjenja za svoj rast, razvoj i opstanak. Obično se bioaktivna jedinjenja u biljkama proizvode kao sekundarni metaboliti (Bernhoft, 2008).

Sva jedinjenja biološkog sistema mogu se podijeliti u dvije velike grupe. Prvu grupu čine primarni metaboliti, odnosno hemikalije koje imaju ulogu u rastu i razvoju organizma, kao što su ugljeni hidrati, aminokiseline, proteini i lipidi. Druga grupa su sekundarni metaboliti, odnosno grupa jedinjenja za koje se vjeruje da pomažu biljkama da povećaju svoju ukupnu sposobnost da prežive, da se prilagode okolini kao i da komuniciraju sa svojom okolinom (Harborne, 1983).

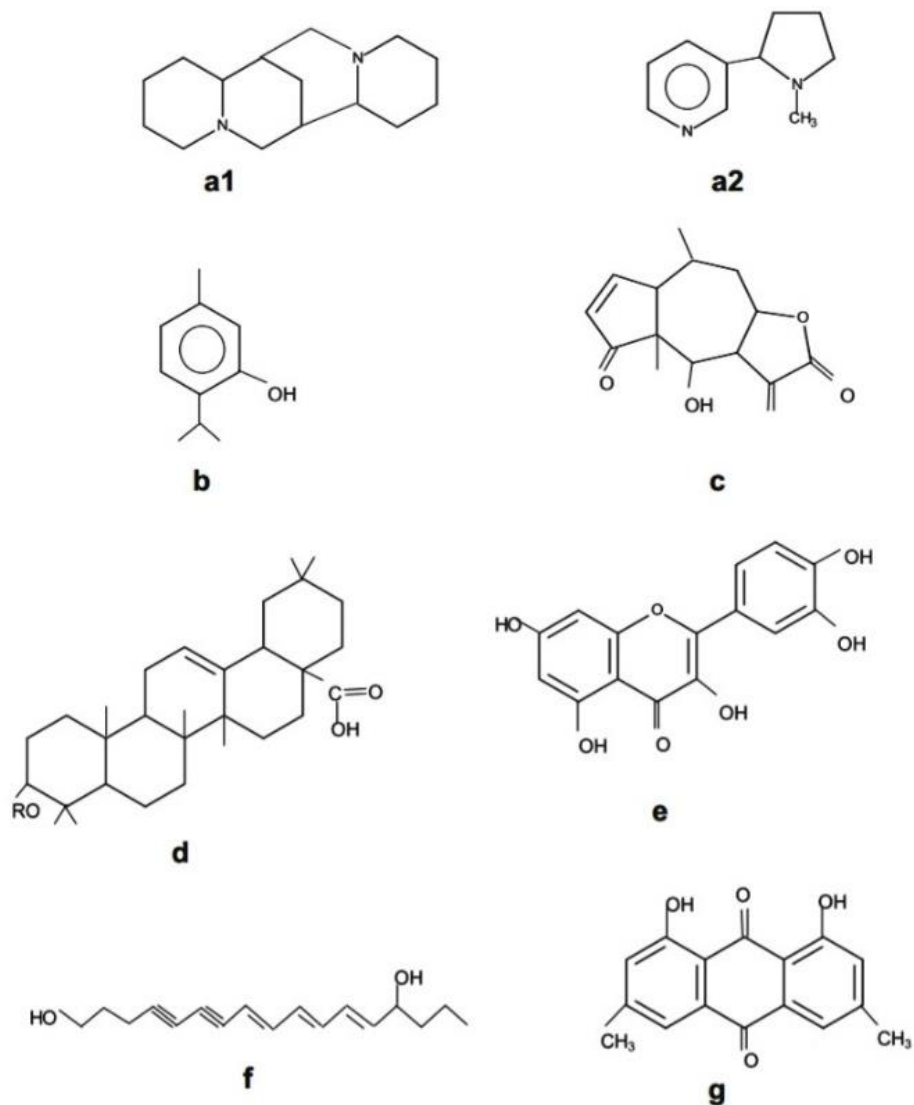
Drugim riječima, sekundarni metaboliti su oni metaboliti koji se često proizvode u fazi nakon rasta, nemaju funkciju u rastu (iako mogu imati funkciju u preživljavanju), proizvode ih određene ograničene taksonomske grupe organizama, imaju neuobičajenu hemijsku strukturu i često se formiraju kao mješavine blisko povezanih članova hemijske porodice (Rowland, 2010).

Proizvodnja sekundarnih metabolita razlikuje se među vrstama, u zavisnosti od toka evaluacije i posebnih potreba te vrste. Na primjer, sinteza aroma kod cvjetnih vrsta kako bi privukle insekte neophodne za njihovo oprašivanje, a sinteza toksičnih hemikalija kod patogena i biljojeda za suzbijanje rasta susjednih biljaka (Dudareva i Pichersky, 2000). Mnoge od supstanci koje pripadaju sekundarnim metabolitima utiču na biološke sisteme i smatraju se bioaktivnim. Tako je jednostavna definicija bioaktivnih jedinjenja u biljkama: sekundarni biljni metaboliti koji izazivaju farmakološke ili toksikološke efekte kod ljudi i životinja (Bernhoft, 2008).

### 2.3.2. Klasifikacija i sinteza bioaktivnih jedinjenja

Klasifikacija bioaktivnih jedinjenja u različite kategorije je još uvijek nedosljedna i zavisi od namjere određene klasifikacije. Podijeljeni su na osnovu hemijske strukture (na primer: imaju prstenove, sadrže šećer), prema sastavu (sadrže azot ili ne), njihovoj rastvorljivosti u različitim rastvaračima, kao i putu kojim se sintetišu (npr. fenil propanoid, koji proizvodi tanine). U osnovi, oni su klasifikovani u četiri velike grupe kao što su: jedinjenja koja sadrže azot, glikozidi, fenoli i terpeni (Das i Gezici, 2019).

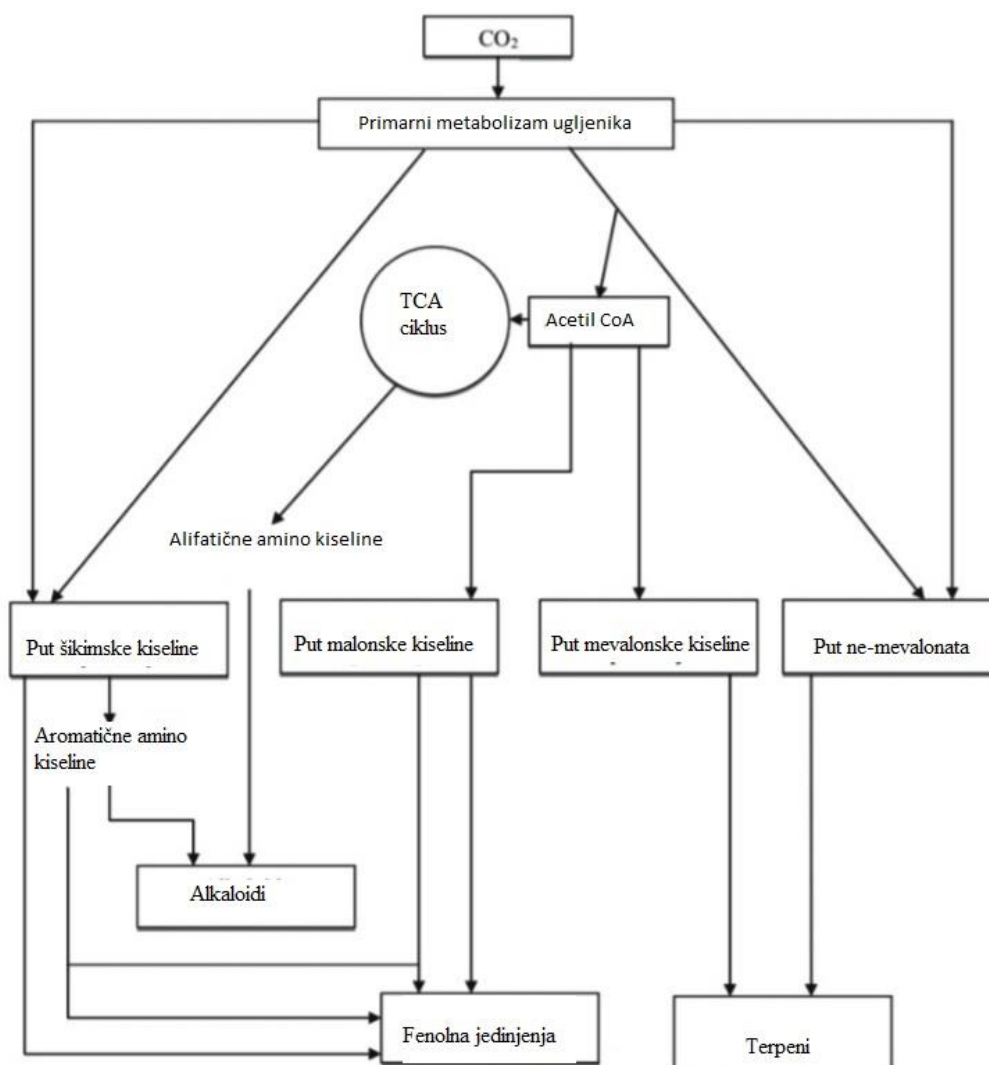
Na slici 10 date su opšte strukture različitih kategorija bioaktivnih jedinjenja.



**Slika 10.** Opšte strukture različitih kategorija biljnih bioaktivnih jedinjenja: alkaloidi (a1 i a2), monoterpeni (b), sesketerpeni (c), triterpeni, saponini, steroidi (d), flavonoidi (e), poliacetileni (f), poliketidi (g) (Croteau i sar., 2015)

Većina bioaktivnih jedinjenja pripada jednoj od nekoliko porodica, od kojih svaka ima posebne strukturne karakteristike koje proizilaze iz načina na koji su izgrađeni u prirodi (biosinteza). Postoje četiri glavna puta za sintezu sekundarnih metabolita ili bioaktivnih jedinjenja (slika 11):

- (1) put šikimske kiseline
- (2) put malonske kiseline
- (3) put mevalonske kiseline
- (4) put ne-mevalonata (MEP) (Taiz i Zeiger, 2006)



**Slika 11.** Pojednostavljen pogled na puteve za proizvodnju tri glavne grupe biljnih bioaktivnih jedinjenja (Taiz i Zeiger, 2006)

## 2.4. BIOAKTIVNA JEDINJENJA U DUVANSKOM OTPADU

Hemijski sastav duvanskog otpada zavisi od procesa prerade duvana. Duvanski otpad je heterogen materijal i njegov sastav utiče na njegov kvalitet. Otpad koji nastaje pri preradi duvana je materijal sa značajnim sadržajem vlage (50–80%), pH vrijednost je 5,1–6,7, odnos C:N od 17:1 do 21:1 a sadrži i značajne količine nikotina. Osim nikotina, duvanski otpad je relativno dobar izvor alkaloida, fenola, flavonoida, aromatičnih supstanci i proteinskih frakcija (Vuković i sar., 2012).

### 2.4.1. Alkaloidi

Alkaloidi su prirodna hemijska jedinjenja koja sadrže atome azota. Oni pripadaju grupi sekundarnih metabolia i proizvodi ih veliki broj organizama, uključujući bakterije, gljive, biljke i životinje. Mnogi alkaloidi se mogu prečistiti iz sirovih ekstrakata kiselo-baznom ekstrakcijom, a neki su toksični za druge organizme. Često imaju farmakološke efekte i koriste se kao lijekovi. Primjeri su lokalni anestetik i stimulans kokain, stimulans kofein, nikotin, analgetik morfijum ili antimalarijski lijek kinin. Neki alkaloidi imaju gorak ukus (Kakhia, 2016).

Klasifikacija alkaloida je složena i može se rukovoditi skupom pravila koja uzimaju u obzir strukturu i druge hemijske karakteristike molekula alkaloida, njegovo biološko, kao i biogenetsko porijeklo, gdje je poznato. Na primjer, kada je put biosinteze alkaloida nepoznat, on se može grupisati na osnovu strukturnih sličnosti sa poznatim jedinjenjima, uključujući jedinjenja koja nisu azotna, ili prema organizmima iz kojih je alkaloid izolovan (Kakhia, 2016).

**Grupa piridina:** nikotin, piperin, koniin, trigonelin, arekolin, arekaidin, guvacin, citizin, lobelin, anabazin, spartein, peletierin.

**Pirolidinska grupa:** higrin, kuskohigrin, nikotin.

**Grupa tropana:** atropin, kokain, ekgonin, skopolamin, katuabin.

**Grupa indolizidina:** senecionin, svainsonin.

**Grupa kinolina:** kinin, kinidin, dihidrokinin, dihidrokinidin, strihnin, brucin, veratrin, cevadin.

**Grupa izohinolina:** alkaloidi opijuma (papaverin, narkotin, narcein), pankratitistatin, sangvinarin, hidrastin, berberin, emetin, berbamin, oksiakantin.

**Fenantren alkaloidi:** alkaloidi opijuma (morfijum, kodein, tebain, oripavin)

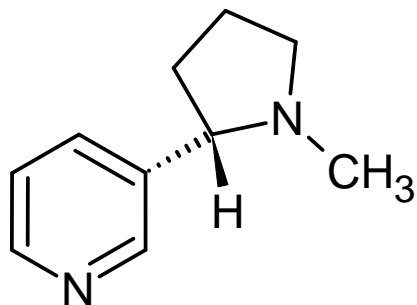
**Fenetilaminska grupa:** meskalin, efedrin, dopamin.

**Indol grupa:** serotonin, lizerginska kiselina, harmin, rezerpin, vinblastin, mitraginin, ibogain, strihnin, brucin i dr.

**Purinska grupa:** ksantini, kofein, teobromin, teofilin.

**Terpenoidna grupa:** akonitin, solanidin, solanin, veratramin, ciklopamin, ciklopozin, jervin, muldamin, samandarin, muskarin, holin, neurin, cinarin i dr. (Kakhia, 2016).

**Nikotin,** 3-(1-metil-2-pirolidinil) piridin (slika 12), glavni je i tipičan alkaloid u ekstraktima duvana.



**Slika 12.** Struktura nikotina

Nikotin se u biljkama duvana akumulira u listovima (Civilini i sar., 1997). Činjenica da nema nikotina u sjemenu duvana to dokazuje (Stanisavljević i sar., 2007). Dakle, nivo nikotina sadržan u listovima duvana u potpunosti zavisi od akumulacije nikotina tokom rasta biljaka. Nikotin, kao azotna baza, sa kiselinama formira soli koje su obično čvrste i rastvorljive u vodi. Nikotin lako prodire u kožu. Kao što pokazuju fizički podaci, nikotin slobodne baze će sagorjeti na temperaturi ispod tačke ključanja. Količina nikotina koja se udiše sa duvanskim dimom je samo mali dio količine ovog alkaloida u listovima duvana (Kakhia, 2016).

Nikotin se ne dobija samo iz biljaka duvana i supstanci srodnih duvanu, već se može naći i u ekstraktima drugih biljaka iz familije *Solanaceae*. Postoje brojne studije koje se odnose na sadržaj nikotina u biljnim uzorcima i eksperimentima *in vivo*. Većina prijavljenih podataka o sadržaju nikotina u listovima uzoraka duvana kretala se od 0,3 do 3 masenih % (Tayoub i sar., 2015).

Efekat nikotina na tijelo zasniva se na njegovoj sposobnosti da reaguje sa nizom receptora koji ciljaju na neurotransmiter acetilholin. Ovi receptori, koji su normalno prisutni u nervnom sistemu i neuromuskularnom spoju, igraju ulogu jonskog kanala kroz membranu, a takođe su u stanju da podnesu oslobađanje drugih neurotransmitera. Kada se aktiviraju acetilholinom ili nikotinom, odabrani joni prolaze kroz ćelijsku membranu i mogu blokirati normalnu provodljivost centralnog nervnog sistema. To je razlog zašto nikotinoidni pesticidi mogu paralizovati i ubiti štetočine (Sanchez-Ramos, 2020).

Generalno, karakteristike alkaloida u duvanu nisu značajno povezane sa geografskim porijeklom ili morfologijom (Sisson i Severson, 1990). Međutim, nikotin je dominantan u skoro svim vrstama duvana, iako postoje značajne razlike u sastavu alkaloida između različitih podvrsta. Pored genetskih faktora, na sastav i nivo koncentracije duvanskih alkaloida blago utiču i okruženje i broj hromozoma (Moghbel i sar., 2017).





### 2.4.3. Fenoli

Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti iz biljnog carstva. Hemijski, fenolna jedinjenja posjeduju aromatični prsten koji nosi jedan ili više hidroksilnih supstituenata, uključujući funkcionalne derivate (estre, metil etre, glikozide itd.). Fenolna jedinjenja se u prirodi pojavljuju glikozilovana, acilovana i polimerizovana, što daje visoku strukturnu varijabilnost. Zaista, do danas je identifikovano više od 8000 različitih struktura fenolnih jedinjenja sa različitim bioaktivnostima. Ova strukturna raznolikost fenolnih jedinjenja, udružena sa poteškoćama u vezi sa hemijom koja otkriva njihove bioaktivnosti, predstavlja uzbudljivo polje za istraživanje (De la Rosa i sar., 2019). Prikazana je klasifikacija fenolnih jedinjenja u tabeli 1.

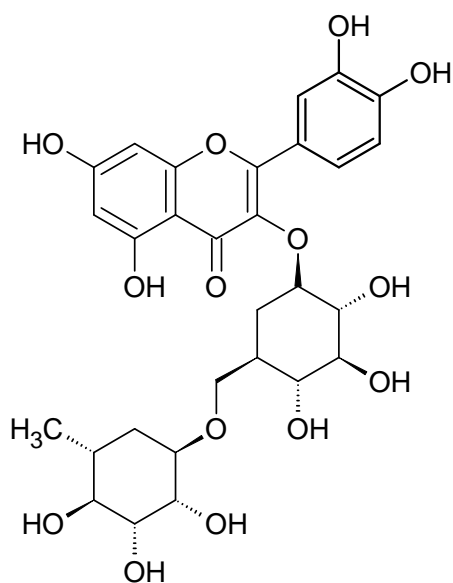
**Tabela 1.** Klasifikacija fenolnih jedinjenja (Robards i sar., 1999)

Osnovni skelet	Klasa	Primjer
C <sub>6</sub>	Jednostavni fenoli Benzohinoni	Katehol, hidrohinon, resorcinol
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina, salicilna Kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Fenilsirćetne Kiseline	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Fenilpropeni	Eugenol, mirsticin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftohinoni	Juglon
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbeni	Razveratrol
	Antrahinoni	Emodin, hrizofanol, rein
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidi Flavoni	Sinensetin, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	Dihidroksikvercetin i dihidroksikempferol glikozidi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi pelargonidina, peonidina, delifinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	(+)-Katehin, (-)-epikatehin, (+)- galokatehin, (-)-epigalokatehin
Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignini	Pinorezinol
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoidi	Agatisflavon

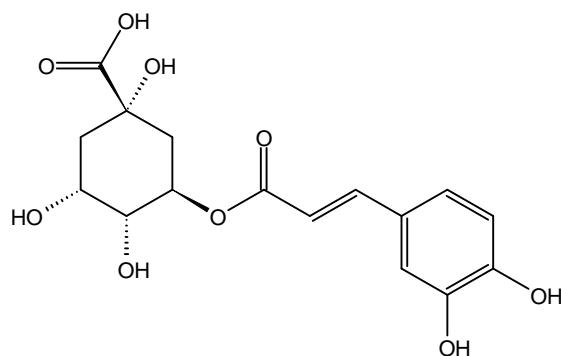
Mehanizam njihovog formiranja sugerira da biljke luče specifične sekundarne metabolite da bi se oduprle abiotičkom stresu (Sharma i sar., 2019). Literatura je pokazala da abiotički stres kao što je suša (Sarker i Oba, 2018a) i salinitet (Sarker i Oba, 2019a) povećava ukupan sadržaj fenola (Sarker i Oba, 2018b) i flavonoida (Sarker i sar., 2019b), kao i pojedinačnih fenolnih kiselina i flavonoidnih jedinjenja (Sarker i Oba, 2018c) u biljkama. Intenzitet njihovih antioksidativnih aktivnosti zasniva se na sposobnosti da se kombinuju sa slobodnim radikalima, a mogli bi da smanje nivo slobodnih radikala *in vivo* regulacijom sadržaja (Sarker i Oba, 2019c). Nivo slobodnih radikala može se smanjiti i djelovanjem antioksidativnih enzima (Zuo i sar., 2014; Sarker i sar., 2018d) kao i helatiranjem jona metala preko Fentonove reakcije (Yiannakopoulou, 2013) da bi se prekinula lančana reakcija lipidne peroksidacije.

Nakon što su otkrivena njihova antioksidativna svojstva, fenolna jedinjenja su postala posebno interesantna u istraživanjima fitokemikalija sa biološkom aktivnošću (Sarker i Oba, 2018d; Sarker i sar., 2018e). Generalno, postoji mnogo oblika fenolnih jedinjenja u biljnom tkivu, kao što su slobodni oblik, derivati (estri ili glikozilovana jedinjenja), polimeri ili oligomeri (u kombinaciji sa polisaharidima) (Wu i sar., 2021). Funkcija biljnih fenola je da štite biljke od ultraljubičastog zračenja, gljivičnih patogena itd. (Andersen i Markham, 2005). Mehanizmi sinteze određeni su kao putevi šikimske i malonske kiseline (Azmir i sar., 2013). Pored zaštite biljaka od patogena i predatora, takođe doprinose biljnoj boji i aromi (Banožić i sar., 2020).

Nekoliko studija je pokazalo razlike u sadržaju i vrsti fenolnih jedinjenja u duvanu. Među fenolnim jedinjenjima u listu duvana dominiraju fenolna kiselina i flavonoidni glikozidi (Docheva i sar., 2014). Štaviše, istraživači su otkrili da su kempferol-3-O-rutinozid (slika 14) i kvercetin-3-O-rutinozid, hlorogenska kiselina (3-O-kafeoilkinska kiselina) čija je struktura prikazana na slici 15 kao i njeni izomeri 4-O-kafeoilkinska kiselina i neohlorogenska kiselina (5-O-kafeoilhinska kiselina) najzastupljenija fenolna jedinjenja u ekstraktima duvana (Rodgman i Perfetti, 2016).



**Slika 14.** Struktura rutina



**Slika 15.** Struktura hlorogenske kiseline

#### 2.4.4. Polisaharidi

Ugljeni hidrati su vitalne komponente u duvanu, koje se mijenjaju tokom fermentacije i sušenja, a zatim doprinose kvalitetu ukusa listova sirovog duvana i atributima arome finalnih proizvoda. Specifičan mehanizam reakcije je kroz Maillardovu reakciju, gde se ovi polisaharidi kondenzuju sa aminokiselinama u listovima duvana da bi listovi duvana postali smeđi. Pored toga, reaguju sa fenolima, alkoholima i sterolima i formiraju glikozide koji utiču na aromu duvana (Pang i sar., 2006). U jednom od radova navedeno je da 30,25% duvanskih polisaharida potiče iz mase listova, od čega su 22,58% redukujući šećeri (Troje i sar., 1997).

Kvalitativna i kvantitativna analiza vrste i sadržaja polisaharida u duvanu postala je veoma interesantna istraživačima u poslednjih nekoliko godina. Pored toga, rafinoza (Pang i sar., 2007), glukoza, saharoza, maltoza, ksiloza i fruktoza (Troje i sar., 1997) su takođe pronađene u listovima duvana. Proizvod Maillardove reakcije između šećera i aminokiselina može da poboljša kvalitet duvana, dok sadržaj skroba i proteina negativno utiče na kvalitet duvana. Zbog toga je biokatalitička sinteza redukujućih šećera i aminokiselina iz gore navedenih jedinjenja korišćena za poboljšanje kvaliteta duvana, iako istraživanja o biološkoj aktivnosti duvanskih polisaharida nisu bila detaljna. Trenutni istraživački trend je povezivanje polisaharida sa zdravljem crijeva i korišćenje molekularne biologije da bi se otkrio regulatorni mehanizam duvanskih polisaharida na druge bolesti (Wu i sar., 2021).

Antioksidativna aktivnost duvanskih polisaharida je ispitivana u jednom od radova (Yang i sar., 2011). Aldehidne, karboksilne i ugljenik-kiseonik jednostruke veze u redukcionim šećerima mogu da obezbijede elektrone koji polisaharidu omogućavaju sposobnost da zaustavi radikalnu lančanu reakciju, reakcijom sa slobodnim radikalima, pretvarajući ih u stabilnije oblike. Ovo ukazuje na to da bi polisaharidi doprinijeli antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta duvana. Iako bioaktivni ugljeni hidrati imaju veoma složene hemijske strukture koje usporavaju razvoj istraživanja, otkrivene su mnoge od njihovih potencijalnih antipatoloških funkcija i fiziološki povezanih aktivnosti (Cipolla i Peri, 2010).

## 2.5. PROCES IZOLOVANJA BIOAKTIVNIH SUPSTANCI

Izolovanje bioaktivnih jedinjenja ima primjenu još od davnina, a i danas se koristi skoro u svim sferama kozmetičke, prehrambene, a naročito farmaceutske industrije. Ekstrakcija biljnih sirovina može da se izvodi konvencionalnim i nekonvencionalnim metodama ekstrakcije. U konvencionalne spadaju metode propisane od strane važeće Farmakopeje: maceracija, perkolacija, digestija i Soxhlet ekstrakcija. Glavni izazovi konvencionalne ekstrakcije su duže vrijeme ekstrakcije, zahtjev za skupim rastvaračem visoke čistoće, isparavanje ogromne količine rastvarača, niska selektivnost ekstrakcije i termičko razlaganje termolabilnih jedinjenja. Da bi se prevazišla ova ograničenja konvencionalnih, uvode se nove i obećavajuće nekonvencionalne tehnike ekstrakcije. Neke od tehnika koje najviše obećavaju su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija uz pomoć enzima, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija sa impulsnim električnim poljem i ekstrakcija tečnostima pod pritiskom. Neke od ovih tehnika se smatraju „zelenim tehnikama“. To uključuje manje opasnu hemijsku sintezu, upotrebu bezbjednijih hemikalija, pomoćnih rastvarača, dizajn za energetske efikasnost, korišćenje obnovljivih sirovina, smanjenje derivata, kataliza, dizajn za sprečavanje degradacije, ekonomičnost i analiza vremena za prevenciju zagađenja (Azmir i sar., 2013).

Ekstrakcija je proces u kome se određene supstance iz čvrste ili tečne smjese rastvaraju, ispiraju ili izlužuju pomoću tečnog rastvarača. Faza primanja ili ekstrakcije sastoji se od rastvarača i ključnih supstanci koje je rastvarač prenio iz faze napajanja. U poređenju sa drugim procesima separacije, potrebna je regeneracija rastvarača i prečišćavanje vrijednih supstanci (Tzia i Liadakis, 2003; Sattler i sar., 1995).

Ekstrakcija čvrsto-tečno ili luženje je proces odvajanja u kome se određene supstance rastvaraju iz čvrstog matriksa pomoću tečnog rastvarača koji formira rastvor. Upotrebljeni rastvarač treba da rastvori postojeće supstance iz nerastvorljive propusne čvrste supstance, stoga je njegov izbor važan za njihovo kvantitativno uklanjanje i procesni prinos. Uklonjena rastvorljiva frakcija se naziva rastvorena materija, a rezultujući rastvor rastvorene supstance naziva se ekstrakt. Obično se vrši reciklaža korišćenog rastvarača koji se ponovo se koristi u procesu ekstrakcije. Ako je rastvor jednoliko dispergovan u čvrstoj matrici, materijal blizu površine će se prvo rastvoriti, ostavljajući poroznu strukturu u čvrstom ostatku. Da bi došao do daljeg rastvora, rastvarač mora da proдре u spoljašnji sloj, operacija postaje progresivno teža, a brzina ekstrakcije opada. Ako rastvorena supstanca čini veliki dio čvrste materije, porozna struktura može biti uništena dajući fini talog nerastvorljivog ostatka, pri čemu se operacija znatno lakše odvija i brzina procesa povećava (McCabe i sar., 2005; Wakeman, 1994; Tzia i Liadakis, 2003; Coulson i sar., 1993).

Generalno, niz fenomenoloških koraka može se desiti u procesu ekstrakcije čvrsto-tečno (Tzia i Liadakis, 2003):

1. Prenos rastvarača iz mase rastvora na površinu uljanog matriksa
2. Penetracija ili difuzija rastvarača u pore čvrstog matriksa
3. Rastvaranje rastvarača u rastvoru

4. Transport rastvorene supstance na površinu čvrste matrice
5. Migracija ekstrahovane rastvorene supstance sa spoljašnje površine čvrstog materijala u rasuti rastvor
6. Kretanje ekstrakta u odnosu na čvrstu materiju (tj. pomjeranje ekstrakta) i čvrstu matricu.

Sljedeće kriterijume treba uzeti u obzir pri izboru rastvarača:

-Rastvorljivost specifičnih supstanci u rastvaraču. Na primjer, biljna ulja koja se sastoje od triglicerida masnih kiselina se normalno ekstrahuju heksanom, dok se za ekstrakciju slobodnih masnih kiselina koriste polarniji alkoholi (Chanioti i sar., 2014).

-Fizička svojstva kao što su niska međufazna napetost i viskoznost. Rastvarač treba da bude sposoban da vlaži čvrste materije i da proдре kroz pore i kapilare u matriksu. Takođe, njegov niski viskozitet pomaže u brzini difuzije u fazi rastvarača (Chanioti i sar., 2014).

-Regeneracija, pošto će se rastvarač ponovo koristiti u narednim ekstrakcijama. Ako se koristi destilacija ili isparavanje, rastvarač ne bi trebalo da formira azeotrope i latentna toplota isparavanja treba da bude mala (Chanioti i sar., 2014).

-Opasnosti i troškovi. U idealnom slučaju, rastvarač treba da bude netoksičan, nereaktivan, nezapaljiv, bezopasan za okolinu i jeftin. Izbjegavanje gubitaka rastvarača može se postići boljim dizajnom procesa (Chanioti i sar., 2014).

Primjeri koji se rastvarači najčešće koriste za ekstrahovanje određenih bioaktivnih jedinjenja dati su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Primjeri ekstrahovanih bioaktivnih jedinjenja različitim rastvaračima (Cowan, 1999)

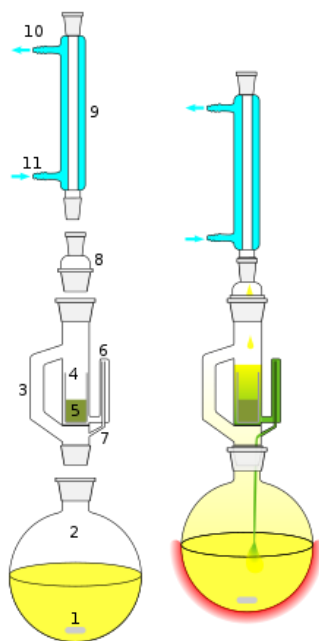
Voda	Etanol	Metanol	Hloroform	Dihlorometanol	Etar	Aceton
Antocijani Tanini Saponini Terpenoidi	Tanini Polifenoli Flavonoli Terpenoidi Alkaloidi	Antocijani Terpenoidi Saponini Tanini Flavoni Polifenoli	Terpenoidi Flavonoidi	Terpenoidi	Alkaloidi Terpenoidi	Flavonoidi

Ćelijska struktura je važan faktor koji treba uzeti u obzir tokom procesa ekstrakcije. Iako rastvorena supstanca može biti na površini ćelije, u većini slučajeva ona se čuva u intracelularnim prostorima, kapilarima ili ćelijskim strukturama. Dakle, uspjeh ekstrakcije rastvaračem u velikoj mjeri zavisi od čvrstog stanja. Jedan od koraka prethodnog tretmana koji se mora uzeti u obzir je usitnjavanje ili mljevenje sirovog materijala. Mljevenje prije ekstrakcije uzrokuje povećanje površine kontakta između rastvarača i čvrste matrice. Što je manja veličina čestica, to je veća brzina prenosa rastvorene supstance. Površina između čvrste materije i tečnosti je veća i otpor difuzije unutar čestica postaje manji zbog kraće dužine difuzionog puta. Dakle, efikasnost ekstrakcije raste sa smanjenjem veličine čestica. Međutim, manje veličine čestica smanjuju brzinu drenaže iz čvrstog ostatka i mogu stvoriti probleme ako je cirkulacija tečnosti otežana (Coulson i sar., 1993; Birch 2000; Kemper 2020; Schweitzer 1997; Angela i Meireles, 2008).

### 2.5.1. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je laboratorijska tehnika koji se dugo koristi za izolaciju i oporavak vrijednih analita iz različitih čvrstih matrica. Danas je to još uvek referentna tehnika za ekstrakciju iz čvrstih uzoraka sa kojom se porede performanse drugih tehnika. Međutim, da bi se postigao odgovarajući oporavak analita, čvrsti uzorci zahtijevaju pravilno rukovanje uzorkom prije ekstrakcije. Vrsta i priroda uzorka određuju broj i vrste koraka koji se moraju uključiti tokom postupka pripreme uzorka. U prvom koraku uzorak se obično homogenizuje, melje i mjeri. Da bi se obezbijedila optimalna efikasnost ekstrakcije nepolarnih, ne(polu)isparljivih organskih jedinjenja, preporučuje se da se čvrste matrice koje sadrže vodu, kao što su zemljište, biljna tkiva, hrana, sedimenti, kanalizacioni mulj itd., osuše sredstvom za sušenje (npr. natrijum sulfat) prije Soxhlet ekstrakcije. Prisustvo vode u uzorku može smanjiti efikasnost ekstrakcije rastvaračem, što dovodi do niskog izolovanja nepolarnih jedinjenja. Dodatno, jedinjenja rastvorljiva u vodi mogu se koekstrahovati. U slučaju uzorka koji sadrže masti ili druge nepolarne analite vezane za proteine, ugljene hidrate i/ili minerale, hidroliza se mora sprovesti da bi se prekinule veze, što čini ciljne analite nedostupnim za solubilizaciju. Štaviše, kada uzorci sadrže mnogo jedinjenja rastvorljivih u vodi, neophodna je prethodna ekstrakcija vodom praćena isušivanjem. Ove manipulacije su relativno dugotrajne kada se mora tretirati serija čvrstih uzoraka, ali one izoluju analite iz test materijala sa najboljim prinosom i najvećom čistoćom (Zygler i sar., 2012; Luque de Castro i Priego-Capote, 2010).

Na slici 16 nalazi se šematski prikaz aparature po Soxhlet-u.. Mnogi parametri moraju biti uzeti u obzir tokom optimizacije procesa ekstrakcije Soxhlet-a. Soxhlet tehnika obično ne zahtijeva specifične uslove za ekstrakciju, zbog čega je najvažniji aspekt izbor odgovarajućeg rastvarača za ekstrakciju ciljnih analita. Pošto izbor rastvarača značajno utiče na efikasnost ekstrakcije, treba da se zasniva na njegovoj sposobnosti da rastvori željene materije bez uticaja na matricu uzorka. Takođe, neophodno je uzeti u obzir tip uzorka i jačinu interakcije analit-matrica. Važan aspekt u ovom pogledu je polaritet rastvarača za ekstrakciju. Polaritet rastvarača treba da bude sličan polaritetu ciljnih analita. Ovaj uslov obezbjeđuje dovoljan kontakt sa analitima, što reguliše oporavak ekstrakcije. Soxhlet tehnika se obično koristi za ekstrakciju vrijednih analita iz biljnog materijala kao što su lišće, korijenje, sjeme i stabljika (Zygler i sar., 2012; Luque de Castro i Priego-Capote, 2010).



**Slika 16.** Šematski dijagram Soxhlet aparature

1: magnet za miješanje 2: stakleni balon (balon ne treba da bude prepunjen, a zapremina rastvarača u treba da bude oko 3 ili 4 puta veća od zapremine Soxhlet komore) 3: destilacioni put 4: cijev 5: uzorak 6: vrh sifona 7: izlaz sifona 8: spojnica 9: kondenzator 10: ulaz rashladne vode 11: izlaz rashladne vode

(izvor: <https://chembam.com/definitions/soxhlet-extractor/>)

Ova metoda je pogodna za biljni materijal koji je djelimično rastvorljiv u izabranom rastvaraču i za biljne materijale sa nerastvorljivim primjesama. Prednost je to što se velika količina željenih supstanci može ekstrahovati sa manjom količinom rastvarača. Takođe se primjenjuje na biljne materijale koji su toplotno stabilni. Nije potrebna filtracija, a može se primijeniti velika količina toplote. Nedostatak je to što nije moguće konstantno miješanje koje bi pospješilo ekstrakciju, a i metoda nije pogodna za termolabilne materijale (Krishnananda i sar., 2017; Azwanida 2015; Pandey i Tripathi, 2014; James 2012; Majekodunmi 2015; Hossain i sar., 2014; Richardson i Harborne, 1990).

## 2.5.2. Maceracija

Maceracija je ekstraktivna tehnika koja se izvodi na sobnoj temperaturi. Sastoji se od potapanja biljke u tečnost (voda, ulje, alkohol) na određeno vrijeme, u zavisnosti od biljnog materijala i tečnosti koja se koristi. Prije obrade, biljka mora biti dobro oprana i odvojena od stranog materijala kao što su gornji sloj zemlje, šljunak ili kamenje, korov i materijali koji nisu pogodni za ekstrakciju. Biljni materijal se može koristiti svjež ili suv u zavisnosti od željenog proizvoda. Da bi se povećao kontakt između biljnog materijala koji se ekstrahuje i tečnosti (rastvarača), biljku je



potrebno isjeći na male komade. Komadi ne bi trebalo da budu preveliki, inače rastvarač neće moći da prodre u unutrašnje ćelije. Takođe, ne treba ih prevesti u prah, jer bi to dovelo do gubitka isparljivih aktivnih sastojaka (esencijalnih ulja) sadržanih u biljci, a i teškog odvajanja biljnog materijala od tečnosti koja se koristi kada se maceracija završi. Rastvarač se mora izabrati na osnovu hemijske prirode jedinjenja sadržanih u biljci. Prilikom izbora rastvarača treba uzeti u obzir rastvorljivost ciljanih supstanci u njemu. Generalno, najčešće se koristi alkohol jer je u stanju da ekstrahuje veći deo molekula (aktivnih sastojaka) sadržanih u biljci, uključujući molekule koji su hidrofilni, rastvorljivi u vodi ili lipofilni i stoga rastvorljivi u ulju ili drugim organskim rastvaračima (Krishnananda i sar., 2017; Azwanida 2015; Pandey i Tripathi, 2014; James, 2012; Majekodunmi 2015; Ujang i sar., 2013).

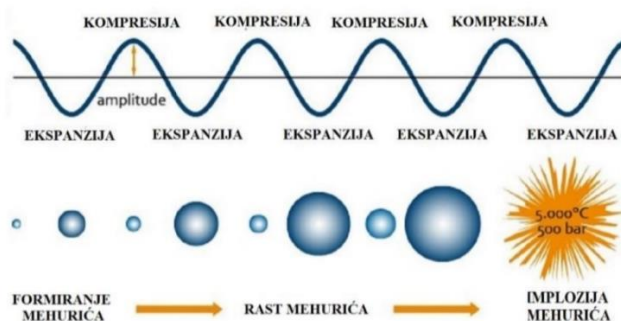
### 2.5.3. Digestija

Ovo je metoda ekstrakcije koja uključuje upotrebu umjerene toplote tokom procesa ekstrakcije. Usitnjena droga se pomiješa sa odgovarajućim rastvaračem, kao i kod maceracije, a zatim se smješa stavlja u vodeno kupatilo. Toplota se primjenjuje tokom procesa ekstrakcije da bi se smanjio viskozitet rastvarača za ekstrakciju i poboljšalo izolovanje sekundarnih metabolita. (Richardson i Harborne, 1990; Pandey i Tripathi, 2014; Majekodunmi, 2015).

### 2.5.4. Ultrazvučna ekstrakcija

Nedavno je potreba za povećanjem biološke aktivnosti biljnih ekstrakata dovela do razvoja nekonvencionalnih metoda ekstrakcije, kao što je ultrazvučna ekstrakcija (UAE). Prema dosadašnjim istraživanjima, može se zaključiti da je ovo tehnika pogodna za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz biljaka. U jednom radu dokazana je velika efikasnost ekstrakcije četiri derivata izoflavona iz soje primjenom UAE metode pri različitim vremenima ekstrakcije i korišćenim rastvaračima. Autori su otkrili da ultrazvuk može poboljšati prinos ekstrakcije u zavisnosti od upotrebe rastvarača (Rostagno i sar., 2003). U drugom radu korišćenjem poluautomatske metode zasnovane na ultrazvuku ekstrahovana su fenolna jedinjenja kao što su rutin, naringin, naringenin, kvercetin, elaginska kiselina i kempferol iz jagoda (Herrera i Luque De Castro, 2004). UAE na bazi jonske tečnosti se smatra veoma efikasnim za ekstrakciju tri alkaloida (vindolin, katarantin i vinblastin) iz *Catharanthus roseus* (Yang i sar., 2011). Antocijanini i fenolna jedinjenja su ekstrahovani iz kore grožđa korišćenjem UAE i proces ekstrakcije je optimizovan u odnosu na rastvarač, temperaturu rastvarača i vrijeme ekstrakcije (Ghafoor i sar., 2011). Fenolkarboksilne kiseline, karnozinska kiselina i rozmarinska kiselina ekstrahovane su iz listova biljke *Rosmarinus officinalis* tehnikom UAE na bazi jonske tečnosti za koju se pokazalo da ima visoku efikasnost i kraće vrijeme ekstrakcije bioaktivnih materija od konvencionalnih metoda ekstrakcije (Zu i sar., 2012).

Princip ultrazvuka se pripisuje fenomenu akustične kavitacije. Tokom procesa sonifikacije, kada se zvučni talas sretne sa tečnim medijumom, stvaraju se uzdužni talasi, čime se formiraju regioni naizmjeničnih talasa kompresije i razređivanja (ekspanzije) indukovanih na molekulima medijuma (slika 17). Proces ekspanzije stvara mjehuriće u tečnosti i proizvodi negativan pritisak koji može da dostigne visoki lokalni pritisak do 50 MPa, intenzivno zagrijavanje do oko 5000 K i traje nekoliko mikrosekundi. Vrijednost negativnog pritiska zavisi od prirode i čistoće tečnosti. Pri konstantnom intenzitetu ultrazvuka uspostavlja se dinamička ravnoteža između formiranja i uništenja mehurića. Kada dođe do implozije kavitacionih mjehurića u blizini zidova ćelije, visoki pritisak i temperatura stvaraju mikromlazeve i udarne talase usmjerene ka čvrstoj površini. Kao rezultat, dolazi do pojačanog prodora rastvarača u ćelije i intenziviranja prenosa mase. Ovi mikromlaznici mogu u industrijskim procesima poboljšati ekstrakciju ciljnih jedinjenja iz biljnih materijala; kavitacioni mjehur koji se stvara u blizini površine materijala biva uništen tokom ciklusa kompresije i stvara se mikromlaz usmjeren ka površini. Zbog toga se ćelijski zidovi biljnog matriksa uništavaju i njegov sadržaj se oslobađa u medijum. Ultrazvuk karakteriše njihova frekvencija i talasna dužina. Amplituda ili intenzitet talasa je takođe važan parametar i koristi se za klasifikaciju industrijske primjene (Angela i Meireles, 2008; Mason i sar., 2005; Rutkowska i sar., 2017).



**Slika 17.** Princip ultrazvučne kavitacije (Drinić, 2020)

Prednosti UAE u poređenju sa konvencionalnom tehnikom uključuju smanjenje vremena ekstrakcije, energije i upotrebe rastvarača. Ultrazvučna energija za ekstrakciju takođe omogućava lako i efikasno miješanje, brži prenos energije, smanjene termičke gradijente i temperaturu ekstrakcije, selektivnu ekstrakciju, manje kapacitete opreme, brži odgovor na kontrolu procesa, brzo pokretanje, povećanu proizvodnju i sl. Parametri koji se mogu optimizovati u UAE, a povezani sa ultrazvučnom opremom, su: frekvencija, talasna dužina i amplituda talasa, ultrazvučna snaga i intenzitet. Takođe, temperatura, pritisak, vrijeme sonikacije, vrsta rastvarača i sadržaj vlage u sirovini, stepen mljevenja i veličina čestica su odlučujući faktori za postizanje efikasne i efektivne ekstrakcije i treba ih uzeti u obzir. Pažljivo proučavanje ovih parametara je od velikog značaja za postizanje najvećeg prinosa ekstrakcije (Angela i Meireles, 2008; Mason i sar., 2005; Rutkowska i sar., 2017; Azmir i sar., 2013).

Povećanje temperature stvara porast pritiska pare i smanjenje viskoziteta i površinskog napona, pošto više para rastvarača ulazi u šupljinu mjehurića, smanjujući razliku pritiska između unutrašnjeg i spoljašnjeg mjehurića. U ekstrakciji, viša temperatura dovodi do veće efikasnosti

zbog povećanja broja kavitacionih mjehurića i veće površine kontakta čvrstog i rastvarača. Međutim, moguće je smanjenje prinosa ekstrakcije kako temperatura raste, posebno u slučaju isparljivih jedinjenja. Dakle, optimizacija temperature se mora izvršiti kako bi se dobio najveći prinos ciljanih jedinjenja bez degradacije (Eskilsson i Bjorklund, 2000; Veggi i sar., 2013).

## 2.6. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

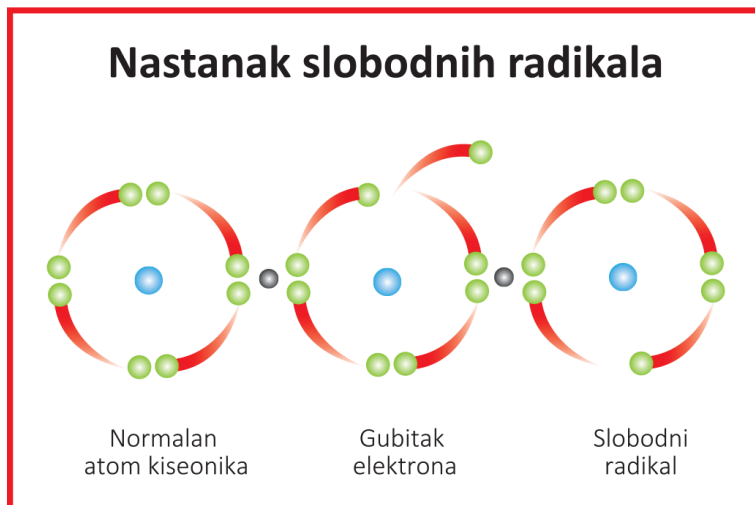
### 2.6.1. Slobodni radikali

Molekul sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj spoljašnjoj ljusci naziva se slobodni radikal. Slobodni radikali se formiraju iz molekula kidanjem hemijske veze tako da svaki fragment zadržava jedan elektron, cijepanjem radikala da bi se dobio drugi radikal i takođe putem redoks reakcija (Bahoran i sar., 2007). U tabeli 3 navedena je podjela slobodnih radikala, a na slici 18 način njihovog nastanka.

**Tabela 3.** Podjela radikala (Stanković, 2019)

Slobodni radikali	Neradikalni oblik
Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	
superoksid anjon $O_2^{\cdot -}$ hidroksi radikal $OH^{\cdot}$ hidroperoksidni radikal $HO_2^{\cdot}$ peroksi radikal $RO_2^{\cdot}$ alkoksi radikal $RO^{\cdot}$ karbonatni radikal $CO_3^{\cdot}$ ugljendioksidni radikal $CO_2^{\cdot}$	vodonik peroksid $H_2O_2$ hipobromna kiselina $HOBr$ hipohlorna kiselina $HOCl$ ozon $O_3$ singletni kiseonik $^1O_2$ organski peroksid $ROOH$ peroksinitrit $ONOO$ peroksinitritna kiselina $ONOOH$
Reaktivne hloridne vrste (RCS)	
atomski hlor $Cl^{\cdot}$	hipohlorna kiselina $HOCl$ nitril (nitronijum) hlorid $NO_2Cl$ hloramini
Reaktivne azotne vrste (RNS)	
azotmonoksidni radikal $NO^{\cdot}$ azotdioksidni radikal $NO_2$ peroksinitrit $ONOO^{\cdot}$	azotasta kiselina $HNO_2$ nitrozo katjon $NO^+$ nitroksidni anjon $NO$ dinitrogen tetroksid $N_2O_4$ dinitrogen trioksid $N_2O_3$ peroksinitrit $ONOO$ peroksinitritna kiselina $ONOOH$ nitronijum (nitril) katjon $NO^{2+}$ alkilperoksinitrit $ROONO$ nitril (nitrijum) hlorid $NO_2Cl$

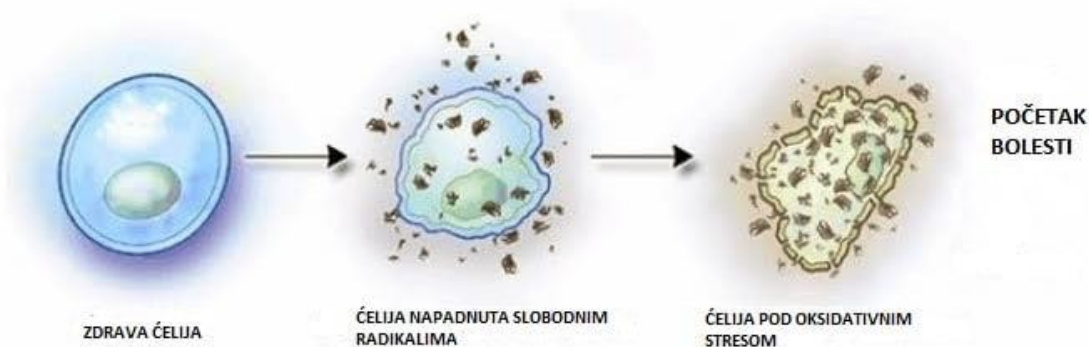
Biološki slobodni radikali su stoga veoma nestabilni molekuli koji imaju dostupne elektrone da reaguju sa različitim organskim supstratima kao što su lipidi, proteini, DNK. Kada ćelije koriste kiseonik za stvaranje energije, slobodni radikali se stvaraju kao posledica proizvodnje ATP (adenozin trifosfata) u mitohondrijama (Genestra, 2007).



**Slika 18.** Nastanak slobodnih radikala

(izvor: <https://www.innventa-pharm.com/wp-content/uploads/2016/12/6.png>)

Slobodni radikali igraju dvostruku ulogu i kao toksična i korisna jedinjenja. Delikatna ravnoteža između njihova dva antagonistička dejstva je očigledno veoma važan aspekt života. Na niskim ili umjerenim nivoima, reaktivne vrste kiseonika (ROS) i reaktivne vrste azota (RNS) imaju blagotvorne efekte na ćelijske odgovore i imunološku funkciju. U visokim koncentracijama, oni stvaraju oksidativni stres (slika 19), tj. proces koji može oštetiti sve ćelijske strukture (Bahoran i sar., 2007; Genestra, 2007; Valko i sar., 2004).



**Slika 19.** Oksidativni stres

(izvor: <http://prirodnilek.com/wp-content/uploads/2015/02/free-radicals.jpg>)

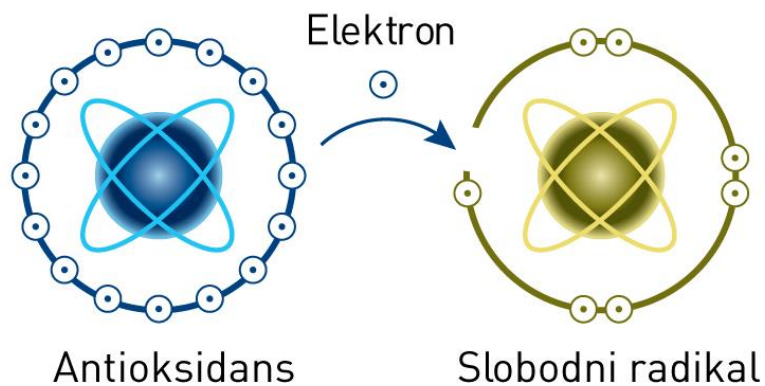
Oksidativni stres igra veliku ulogu u nastanku hroničnih i degenerativnih oboljenja kao što su rak, artritis, starenje, autoimuni poremećaji, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Ljudsko tijelo ima nekoliko mehanizama za suprotstavljanje oksidativnom stresu tako što koristi antioksidanse, koji se ili prirodno proizvode *in situ*, ili se snabdjeva spolja putem hrane i/ili suplemenata. Endogeni i egzogeni antioksidansi deluju kao „hvatači slobodnih radikala“ tako što sprječavaju i popravljaju oštećenja izazvana ROS i RNS, i stoga mogu poboljšati imunološku odbranu i smanjiti rizik od raka i degenerativnih bolesti (Valko i sar., 2006; Valko i sar., 2005; Parthasarathy i sar., 1999; Frei, 1954; Chatterjee i sar., 2007).

Formiranje ROS i RNS može se desiti u ćelijama na dva načina: enzimskim i neenzimskim reakcijama. Enzimске reakcije koje stvaraju slobodne radikale su one koje uključuju respiratorni lanac, fagocitozu, sintezu prostaglandina i sistem citohroma P<sub>450</sub> (Bahoran i sar., 2007; Genestra 2007; Valko i sar., 2004). Na primjer, superoksid anjonski radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) se generiše preko nekoliko sistema ćelijskih oksidaza kao što su NADPH oksidaza, ksantin oksidaza, peroksidaze. Jednom formiran, učestvuje u nekoliko reakcija koje daju različite ROS i RNS kao što su vodonik peroksid, hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), hipohlorna kiselina (HOCl), itd. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (neradikal) nastaje djelovanjem nekoliko enzima oksidaze, uključujući aminokiselinsku oksidazu i ksantin oksidazu. Ksantin oksidaza katalizuje oksidaciju hipoksantina u ksantin, a ksantina u mokraćnu kiselinu. Hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>), najreaktivniji slobodni radikal *in vivo*, nastaje reakcijom O<sub>2</sub><sup>-</sup> sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisustvu Fe<sup>2+</sup> ili Cu<sup>+</sup> (katalizator). Ova reakcija je poznata kao Fentonova reakcija. Hipohlornu kiselinu (HOCl) proizvodi enzim mijeloperoksidazu koji potiče od neutrofila i oksidiše hloridne jone u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Radikal azot-oksida (NO<sup>•</sup>) nastaje u biološkim tkivima oksidacijom L-arginina u citrulin pomoću sinteze azot-oksida (Genestra, 2007; Valko i sar., 2004).

Slobodni radikali se mogu proizvesti iz neenzimskih reakcija kiseonika sa organskim jedinjenjima, kao i onih iniciranih jonizujućim zračenjem. Neenzimski proces se takođe može javiti tokom oksidativne fosforilacije (tj. aerobnog disanja) u mitohondrijama (Genestra 2007; Valko i sar., 2007; Dröge 2002).

ROS i RNS se generišu iz endogenih ili egzogenih izvora (slika 13). Endogeni slobodni radikali nastaju usljed aktivacije imunih ćelija, upale, mentalnog stresa, prekomjernog vježbanja, infekcije, tumora, starenja. Egzogeni ROS/RNS su rezultat zagađenja vazduha i vode, dima cigareta, alkohola, teških ili prelaznih metala (Cd, Hg, Pb, Fe, As), određenih lijekova (ciklosporin, takrolimus, gentamicin, bleomicin), industrijskih rastvarača, kuvanja mesa, korišćeno ulje, mast, zračenje. Nakon prodiranja u tijelo različitim putevima, ova egzogena jedinjenja se razlažu ili metabolišu u slobodne radikale (Valko i sar., 2007; Valko i sar., 2006; Frei, 1954).

## 2.6.2. Antioksidativni process



**Slika 20.** Dejstvo antioksidansa

(izvor: <http://www.activehydrogenproducts.com/wp-content/uploads/2016/09/H2-napada-Slobodni-radikal.jpg>)

Kada antioksidans uništi slobodne radikale, sam ovaj antioksidans postaje oksidovan (slika 20). Zbog toga se antioksidativni resursi moraju stalno obnavljati u tijelu. Dakle, dok je u jednom određenom sistemu antioksidans efikasan protiv slobodnih radikala, u drugim sistemima isti antioksidans može postati neefikasan. Takođe, u određenim okolnostima, antioksidans može djelovati čak i kao prooksidant, npr. može da generiše toksični ROS/RNS (Cheraskin, 1996).

Antioksidansi se mogu podijeliti prema prisutnosti u organizmu na egzogene i endogene antioksidanse. Egzogeni antioksidansi se u organizam unose hranom. Najveći izvor egzogenih antioksidansa su svježe voće i povrće, meso, mliječni proizvodi i dodaci prehrani s vitaminom C i E, flavonoidima i  $\beta$ -karotenima. Endogeni antioksidansi nastaju u organizmu čovjeka kao produkti metabolizma živih organizama. Mogu se unijeti u organizam i hranom, najznačajniji su superoksid-dismutaza, koenzim Q10, glutation peroksidaza, te katalaza (Blažević, 2020).

Antioksidativni proces može da funkcioniše na jedan od dva načina: prekid lanca ili prevencija. Za prekid lanca, kada radikal oslobodi ili ukrade elektron, formira se drugi radikal. Posljednji vrši isto dejstvo na drugi molekul i nastavlja se sve dok se formirani slobodni radikal ne stabilizuje antioksidansom koji prekida lanac (vitamin C, E, karotenoidi, itd.), ili se jednostavno ne raspadne u neškodljiv proizvod. Klasičan primjer takve lančane reakcije je lipidna peroksidacija. Preventivno, antioksidativni enzim poput superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze može spriječiti oksidaciju smanjenjem brzine iniciranja lanca, na primjer, uklanjanjem slobodnih radikala koji iniciraju ili stabilizacijom radikala prelaznih metala kao što su bakar i gvožđe (Cheraskin, 1996).

## 2.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

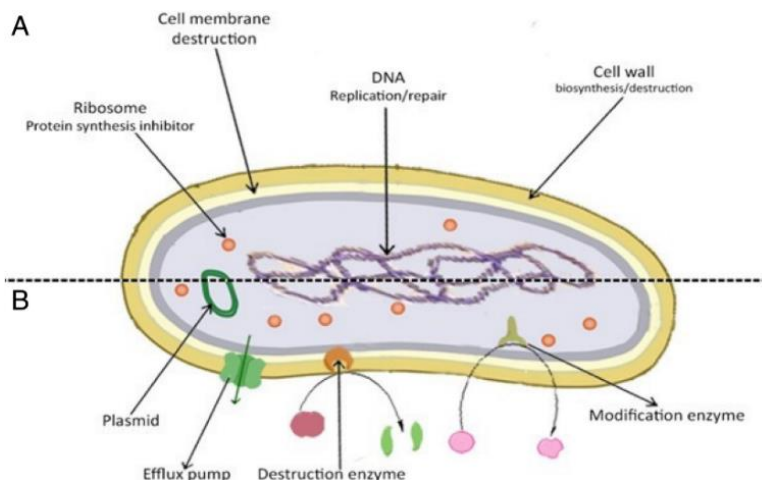
Danas, uprkos naprednim strogim higijenskim propisima i mjerama opreza, infekcije i trovanja hranom mogu predstavljati prijetnju po ljudsko zdravlje. Jedan od razloga za to je taj što patogene bakterije imaju zaštitne mehanizme ili otpornost na stare i nove formulacije antibiotika. Zato mogu izazvati ozbiljne infekcije koje se prenose hranom, koje su u mnogim slučajevima fatalne. Prema statistikama, posljednjih godina se javilo više zaraznih bolesti, a povećan je i broj patogenih bakterija i gljivica. Upotreba različitih prirodnih antimikrobnih komponenti biljnog porijekla i njihovih kombinacija protiv različitih patogena može biti bolje rješenje za ovaj problem u poređenju sa sintetičkim aditivima (Hussein i sar., 2020).

Tradicionalno, sirovi ekstrakti različitih djelova ljekovitog bilja, uključujući korijen, stabljiku, cvijet, voće i grančice, bili su široko korišćeni za liječenje nekih ljudskih bolesti (Khan i sar., 2013). Ljekovite biljke sadrže nekoliko fitokemikalija kao što su flavonoidi, alkaloidi, tanini i terpenoidi, koji posjeduju antimikrobna svojstva (Talib i Mahasneh, 2010). Antimikrobna aktivnost nekih biljnih vrsta je široko istražena. Tako na primjer, i ekstrakti cimeta, bijelog luka, bosiljka, karija, đumbira, žalfije i drugih biljaka pokazuju antimikrobna svojstva protiv širokog spektra gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Alzoreky i Nakahara, 2003; Castro i sar., 2008).

Antimikrobna aktivnost se može definisati kao zbirni naziv za sve aktivne principe (agense) koji inhibiraju rast bakterija, sprečavaju stvaranje kolonija mikroba i mogu uništiti mikroorganizme. U oblasti antimikrobne završne obrade, koriste se mnogi uobičajeni izrazi uključujući antibakterijski, baktericidni, bakteriostatski, fungicidni, fungistatički, biocidni i biostatički. Antimikrobna aktivnost se odnosi na situaciju u kojoj aktivni agens negativno utiče na vitalnost mikroorganizama. Ako aktivni agens utiče samo na bakterije ili gljivice, to se naziva antibakterijsko ili antimikotično delovanje, respektivno. Stepem efekta se označava sa -cidalnim (ili smrtonosnim) gdje postoji značajna germicidna aktivnost ili -statičkim gde aktivna supstanca služi da inhibira rast bakterija. Shodno tome, termin bakteriostatski se odnosi na agens, koji privremeno inhibira rast specifične bakterijske populacije bez uništavanja ove populacije ili bez mogućnosti da se bakterija umnožava u bilo kojoj značajnoj mjeri. Autori dodaju da još uvek ne postoji univerzalno prihvaćena definicija šta predstavlja značajan rast ili smanjenje kolonije bakterija. Idealni zahtev za biostazu je da definisana bakterijska populacija ostane konstantna u smislu svoje veličine. U praksi, međutim, ovo je izuzetno rijetko jer su vitalni biološki sistemi u osjetljivoj dinamičkoj ravnoteži i reaguju na svaku promjenu u svom životnom sistemu bilo rastom ili umiranjem (Elmogahzy, 2020).

Antibakterijskoj aktivnosti agensa se uglavnom pripisuju dva mehanizma, koji uključuju hemijsko ometanje sinteze ili funkcije vitalnih komponenti bakterija, i/ili zaobilaženje konvencionalnih mehanizama antibakterijske rezistencije. Slika 21 prikazuje ove mehanizme i kao što se može primijetiti, postoji više meta za antibakterijske agense koji obuhvataju (I) biosintezu bakterijskog

proteina (II) biosintezu ćelijskog zida bakterija (III) uništavanje membrane bakterijske ćelije (IV) replikaciju i popravku bakterijske DNK, i (V) inhibiciju metaboličkog puta. Pored toga, bakterije mogu pokazati otpornost na antibakterijske agense kroz različite mehanizme. Neke bakterijske vrste su urođeno otporne na jednu ili više klasa antimikrobnih agenasa. U ovim slučajevima, svi sojevi te bakterijske vrste pokazuju otpornost na sve pripadnike tih antibakterijskih klasa. Glavna zabrinutost je da bakterije stiču otpornost, gdje prvobitno osjetljive bakterijske populacije postaju otporne na antibakterijski agens (Tenover, 2006).



**Slika 21.** Mehanizmi antibakterijske aktivnosti (Khameneh i sar., 2019)

Jedan od ključnih faktora u pronalaženju rješenja za usporavanje razvoja rezistentnosti na antibiotike je poznavanje mehanizama antibakterijske rezistencije (Walch, 2000), koji uglavnom uključuju aktivaciju efluks pumpe, uništavanje antibakterijskih agenasa putem enzima razaranja, modifikacija antibiotika pomoću modifikovanih enzima i promjena ciljnih struktura u bakteriji koje imaju manji afinitet za antibakterijsko prepoznavanje (Khameneh i sar., 2016).

## 2.7.1. Mehanizmi delovanja antibakterijskih sredstava

### 2.7.1.1. Biosinteza bakterijskih proteina

Postoji veliki broj koraka, na molekularnom nivou, koji su uključeni u inicijaciju, elongaciju i završetak sastavljanja proteina od strane bakterijskog ribozoma. Stoga je inhibicija sinteze proteina ciljanjem na ribozomske podjedinice efikasan pristup u borbi protiv bakterijskih infekcija (Walsh, 2003).



#### 2.7.1.2. Biosinteza ćelijskog zida

Sloj ćelijskog zida bakterije je dokazana meta za antibakterijske agense, koji se sastoji od mreže peptidnih i glikanskih lanaca koji su međusobno kovalentno umreženi i mogu obezbijediti veću mehaničku čvrstoću. Postoje dva tipa enzima koji imaju kritičnu ulogu u formiranju ovog sloja, koji uključuju transglikozilaze i transpeptidaze. Ovi bifunkcionalni enzimi su pogodni mete za baktericidne antibiotike uključujući peniciline i cefalosporine. Takođe je primijećeno da porodica glikopeptidnih antibiotika, kao što je vankomicin, cilja na sloj peptidoglikana unutar sklopa ćelijskog zida na drugi način. Ovi antibiotici su u stanju da vežu peptidni supstrat sloja peptidoglikana i na taj način spriječe nastanak reakcije sa enzimima. Međutim, ukupan efekat je prilično sličan, što smanjuje unakrsno povezivanje peptidoglikana i posljedično slabi ćelijski zid (Schneider i Sahl, 2010).

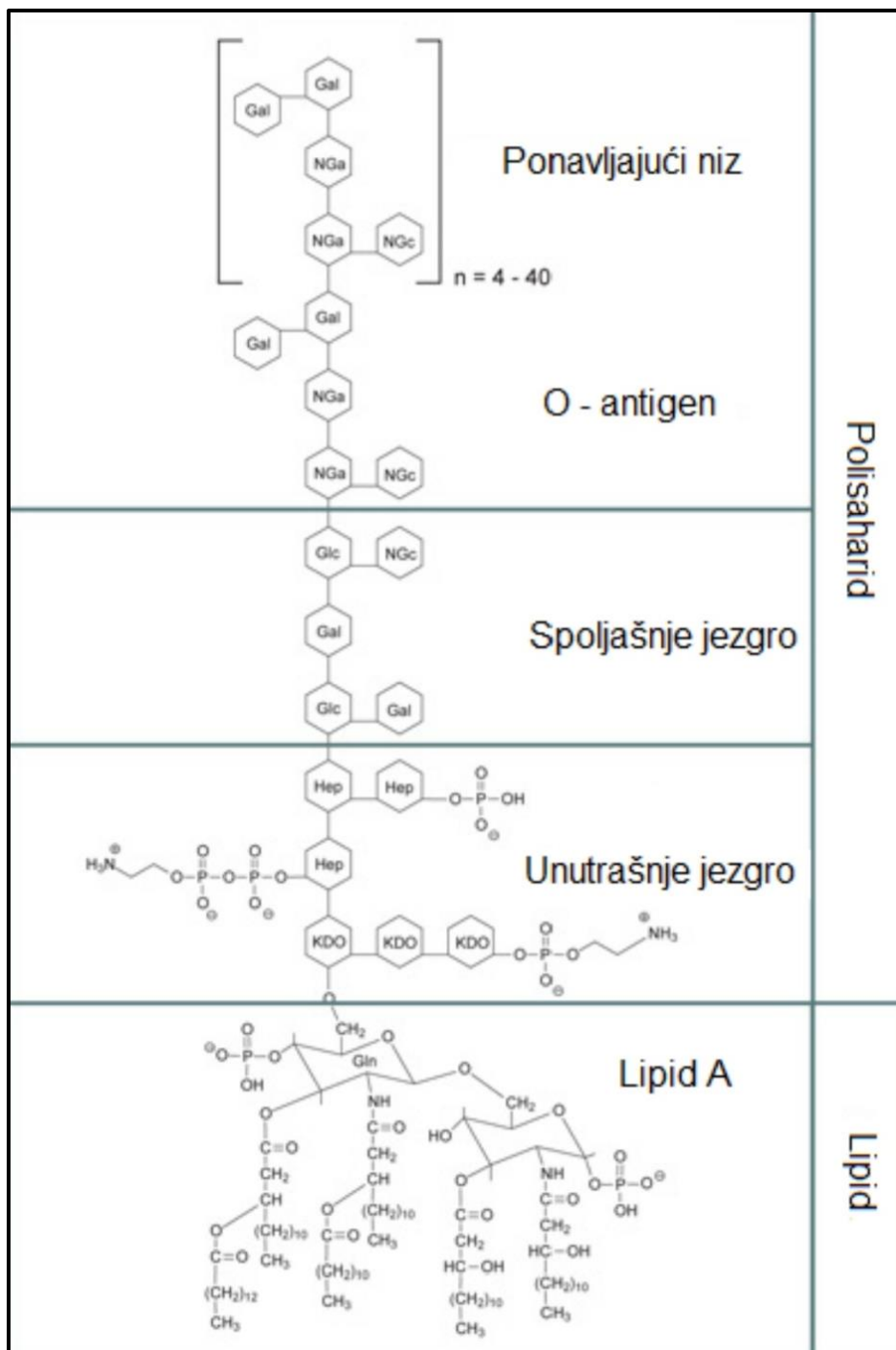
Filamentni temperaturno osjetljiv mutant Z (FtsZ) je prvi protein koji se kreće ka mjestu diobe tokom procesa deobe ćelije. Ovaj protein je neophodan za aktiviranje drugih proteina koji na kraju proizvode novi ćelijski zid između bakterijskih ćelija koje se dijele. Do sada je jedan od obećavajućih pristupa u cilju suzbijanja bakterijskih infekcija bio postupak ciljanja na inhibiciju diobe bakterijskih ćelija, koji se sprovodi kontrolom FtsZ funkcionalnosti (Cho i sar., 2014).

#### 2.7.1.3. Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina

DNK giraza je poznata kao enzim koji je odgovoran za izvođenje uvijanja i odmotavanja bakterijske DNK i replikacije DNK. Ovaj enzim je neophodan za postupke sinteze, replikacije, popravke i transkripcije i stoga se giraza može smatrati finom metom za antibakterijske agense i antibiotike (Maxwell, 1999).

#### 2.7.1.4. Uništavanje bakterijske membrane

Različiti antibiotici, kao što su polimiksini, mogu da se vežu za lipidnu komponentu A lipopolisaharida (slika 22) i stoga mogu izazvati strukturne promjene putem razmjene fosfolipida koje bi rezultirale osmotskom neravnotežom i konačno brзом smrću bakterija (Tenover, 2006).



**Slika 22.** Sastavni delovi strukture lipopolisaharida (Batinić, 2017)

Destrukcija membrane bakterijske ćelije je ispitana od davnina, što je uključivalo čak i druga hemijska jedinjenja kao što su lokalni anestetici ili dezinfekciona sredstva. Uništavanje spoljašnje membrane, citoplazmatske membrane i energetski metabolizam ćelija može izazvati gubitak permeabilnosti, curenje intracelularnih sastojaka, pa čak i koagulaciju citoplazme (Fazly Bazaz i sar., 1983; McBain i sar., 2003).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO



## 3.1. MATERIJAL I METODE

### 3.1.1. Materijal

Materijal korišćen u eksperimentalnom dijelu ovog rada je duvanska prašina. Ovaj duvanski otpad sakupljen je uređajima za otprašivanje pri izradi cigareta u fabrici Novi Duvanski Kombinat, Podgorica, 2021. godine. Nakon sakupljanja materijal je čuvan u neprovidnim kesama i kartonskim kutijama, kako bi se spriječio uticaj spoljašnje sredine. Određen je stepen usitnjenosti, pri čemu je za prosijavanje biljnog materijala korišćen set sita ERWEKA (3mm, 2mm, 1mm, 0,2mm i 0,1mm). Stepen usitnjenosti utvrđen je pomoću veličine srednjeg prečnika čestica ( $d$ ), koji se dobija primjenom sljedećeg izraza:

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i}$$

Gdje je:  $m_i$  – maseni procenat  $i$ -te frakcije,  $d_i$  – prečnik otvora sita.

Takođe, određen je sadržaj vlage biljnog materijala pomoću Borgwaldt F21 peći (slika 23). Ovaj uređaj primjenjuje metodu direktnog mjerenja zasnovanu na razlici u težini između vlažnog i osušenog uzorka. Uzorak se suši strujom toplog vazduha u zatvorenom sistemu. Postoje temperaturni senzori iznad i ispod posude za duvan koji se koriste za određivanje stvarne temperature u okviru uzorka. 100 g duvanske prašine je izmjereno na integrisanoj vagi i sušeno 9 minuta na temperaturi od 116°C.



**Slika 23.** Borgwaldt F21 peć za određivanje sadržaja vlage (autor: Marušić A.)

## 3.1.2. Metode

### 3.1.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih materijala

#### Reagensi

- Etanol 96%
- Etanol 70%

Primijenjene su različite metode ekstrakcije (maceracija, digestija, ultrazvučna i Soxhlet ekstrakcija) kako bi se ustanovilo koja metoda je najefikasnija za izolovanje bioaktivnih materija iz duvanskog otpada, tj. kojom metodom se dobija ekstrakt sa najvišim sadržajem fenola i flavonoida.

Za Soxhlet ekstrakciju 50g usitnjene droge rastvoreno je u 250 ml 96% etanola. Korišćena aparatura prikazana je na slici 24. Soxhlet ekstraktor napravljen je od stakla. Sastoji se od balona sa okruglim dnom, komore za ekstrakciju, sifonske cijevi i kondenzatora na vrhu. Osušeni, samljeveni i fino usitnjeni biljni materijal stavlja se u poroznu vreću (čauru) sačinjenu od čiste tkanine ili čvrstog filter papira i dobro se zatvara. Rastvarač za ekstrakciju se sipa u donji balon, a zatim čaura u komoru za ekstrakciju. Rastvarač se zatim zagrijeva iz donje boce, isparava i prolazi kroz kondenzator gdje se kondenzuje i otiče do komore za ekstrakciju i ekstrahuje drogu dolaskom u kontakt sa njom. Shodno tome, kada nivo rastvarača u komori za ekstrakciju dostigne vrh sifona, rastvarač i ekstrahovani biljni materijal se vraćaju u balon. Cijeli proces se nastavlja više puta dok se droga potpuno ne ekstrahuje- tačka kada rastvarač koji teče iz ekstrakcione komore ne ostavlja nikakav ostatak za sobom. Postupak je ponovljen četiri puta, a ekstrakt je dobijen nakon 53 minuta.



**Slika 24.** Soxhlet aparatura korišćena pri radu (autor: Marušić A.)

Za ostala tri načina ekstrakcije po 5 grama uzorka rastvoreno je u 100 ml 70% etanola.

Maceracija je izvođena na sobnoj temperaturi, digestija na temperaturi od 50°C, uz miješanje, a ultrazvučna ekstrakcija na 50°C sa frekvencijom od 50 KHz u ultrazvučnom vodenom kupatilu (ViMS elektrik Srbija) prikazanom na slici 25.



**Slika 25.** Ultrazvučno kupatilo korišćeno pri radu (autor: Marušić A.)

Dobijeni ekstrakti su zatim pofiltrirani kroz Whatman filter papire i sačuvani u frižideru do analize.

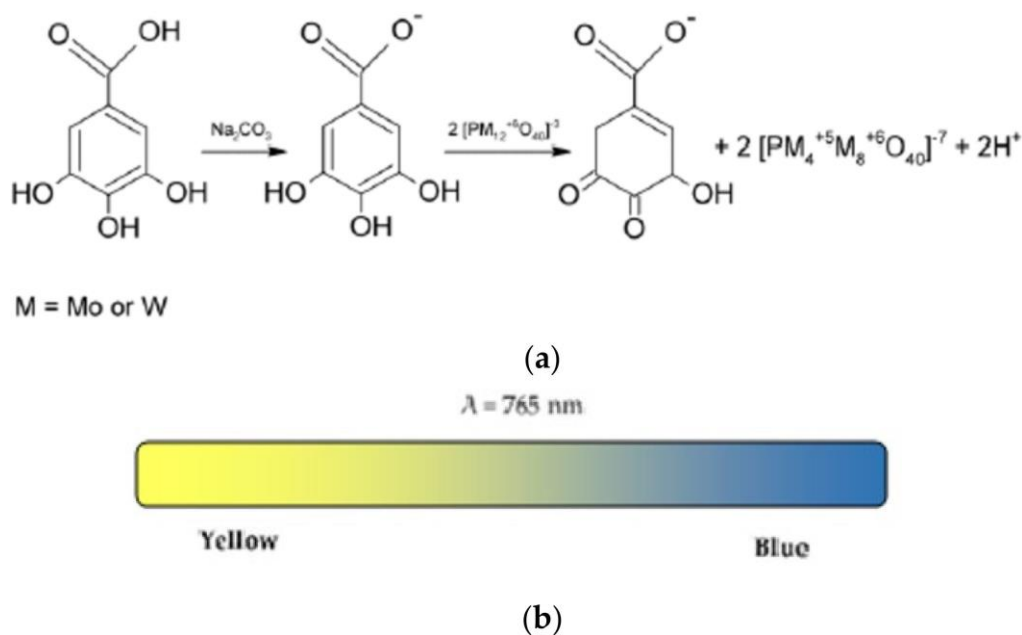
### 3.1.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

#### Reagensi

- Destilovana voda
- Etanol 96%
- Folin-Ciocalteu reagens
- 20% rastvor natrijum karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
  - o U 800 ml vrele destilovane vode rastvori se 200 g natrijum karbonata i nakon hlađenja dopuni do 1000 ml hladnom destilovanom vodom. Posle 24h na sobnoj temperaturi rastvor se profiltrira.
- Galna kiselina ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ )
  - o U 10 ml 96% etanola rastvori se 0,5 g galne kiseline, kvantitativno prenese u normalni sud i dopuni destilovanom vodom do 100 ml.

## Postupak

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalte (Singleton i sar., 1965) sa određenim modifikacijama, koja se zasniva na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalte reagensa i formiranju obojenih proizvoda. Dodavanjem smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih anjona fenolne grupe se oksiduju u hinon, a ovi anjoni se redukuju. Redukovan Folin-Ciocalteu reagens ima stabilnu plavu boju, a neredukovan žutu (slika 26). Mjeri se intenzitet boje u odnosu na slijepu probu koja ne sadrži uzorak (Gotal, 2020).



**Slika 26.** Reakcija između fenolnih jedinjenja i derivata fosfovolframne i fosfomolibdinske kiseline u alkalnoj sredini, koja rezultira stvaranjem plave boje metodom Folin–Ciocalteu (a); Varijacija boje primijećena u testu (b). (Munteanu i Apetrei, 2021)

U staklenu epruvetu redom dodaje se 20  $\mu\text{L}$  razblaženog uzorka, 100  $\mu\text{l}$  Folinovog reagensa, 300  $\mu\text{l}$  20 %-tnog natrijum karbonata, zatim 1580  $\mu\text{L}$  destilovane vode.

Slijepa proba napravljena je miješanjem 100  $\mu\text{L}$  Folinovog reagensa, 300  $\mu\text{l}$  natrijum karbonata i 1600  $\mu\text{l}$  destilovane vode.

Uzorci se uethodno zagrijanom vodenom kupatilu inkubiraju 30 min na 40°C , nakon čega se mjeri apsorbancija spektrofotometrom na 765 nm. Rezultati se izračunavaju prema kalibracionoj krivoj galne kiseline i izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline po g suve materije.

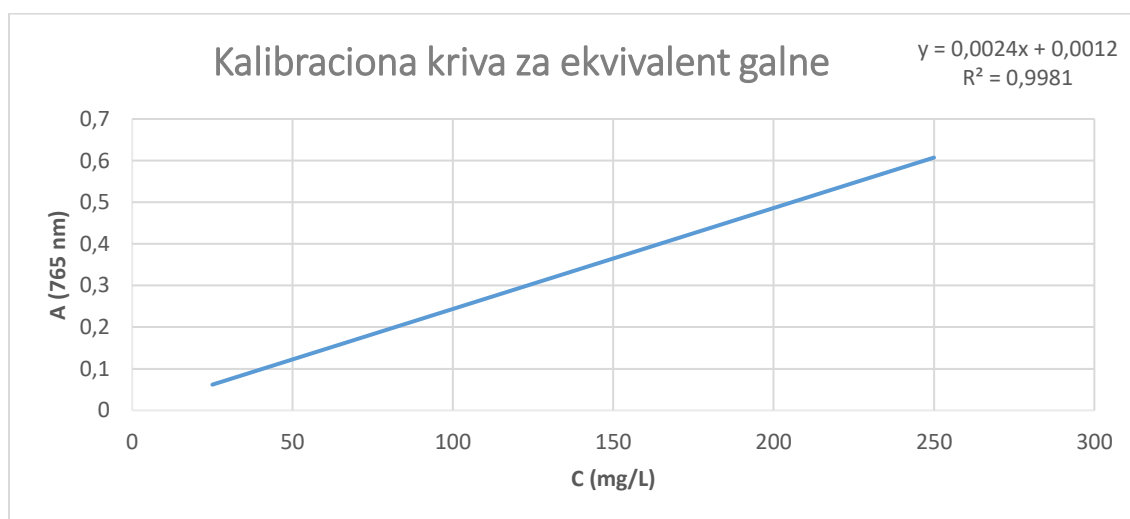
### Kalibraciona kriva galne kiseline

Razblaživanjem standardnog rastvora prave se rastvori galne kiseline koncentracije od 50 do 500 mg/l. U reakcionu smjeu umjesto uzorka sipaju se dobijeni rastvori različitih koncentracija, a zatim se određuju apsorbance spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 765 nm uz slijepu probu koja umjesto galne kiseline sadrži destilovanu vodu. U tabeli 4 prikazane su dobijene vrijednosti apsorbanci.

**Tabela 4.** Vrijednosti apsorbanci galne kiseline različitih koncentracija

C	A
25	0.057
50	0.124
100	0.246
150	0.361
200	0.502
250	0.596

Prema dobijenim vrijednostima crta se kalibraciona kriva i pomoću Microsoft Office Excel-a dobija se jednačina kalibracione krive na osnovu koje se izračunavaju rezultati.



**Grafik 1.** Kalibraciona kriva za ekvivalent galne kiseline

$$y = 0.0024x + 0.0012$$
$$R^2 = 0.9981$$

Gdje je: Y- apsorbanca uzorka (765nm), x- koncentracija galne kiseline (mg/l),  $R^2$ - koeficijent determinacije

### 3.1.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

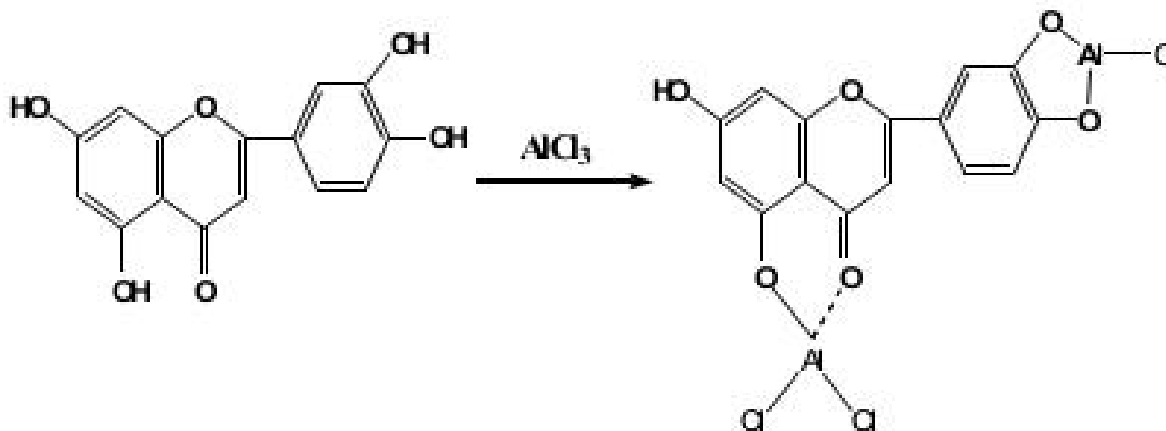
#### Reagensi

- 2% rastvor aluminijum hlorida ( $AlCl_3$ )
- Kvercetin
  - o U 1ml metanola rastvori se 0,005g kvercetina



## Postupak

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima određen je modifikovanom spektrofotometrijskom metodom (Marinova i sar., 2005) sa aluminijum(III)-hloridom. Metoda se zasniva na sposobnosti flavonoida da kompleksiraju jone metala (slika 27), pri čemu boja rastvora prelazi iz žute u žuto-zelenu. Određen je udio flavonoida u uzorcima u odnosu na slijepu probu mjerenjem na talasnoj dužini od 420 nm (Marinova i sar., 2005).



**Slika 27.** Reakcija formiranja kompleksa između flavonoida i aluminijuma (Guntarti i sar., 2017)

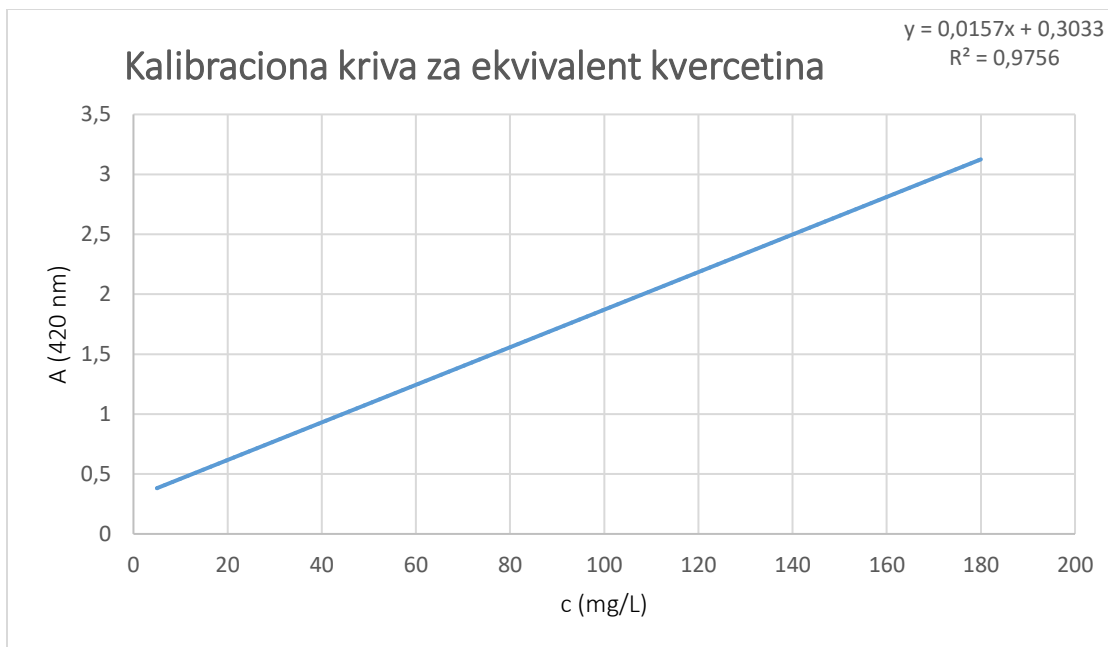
U staklenu epruvetu dodaje se 1.2 mL razblaženog uzorka i 1.2 ml 2% rastvora aluminijum hlorida. Kao slijepa proba koristi se rastvarač upotrijebljen pri ekstrakciji.

Uzorci se inkubiraju 60 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija spektrofotometrom na 420 nm. Rezultati se izračunavaju prema kalibracionoj krivoj kvercetina i izražavaju kao mg ekvivalenata kvercetina po g suve materije.

**Tabela 5.** Vrijednosti apsorbanci kvercetina različitih koncentracija

C	A
5	0.323
50	1.168
100	1.768
150	2.92
180	2.94

Prema dobijenim vrijednostima (tabela 5) crta se kalibraciona kriva kao u slučaju polifenola i pomoću Microsoft Office Excel-a programa dobija se jednačina kalibracione krive na osnovu koje se izračunavaju rezultati.



**Grafik 2.** Kalibraciona kriva za ekvivalent kvercetina

$$y = 0.0157x + 0.3033$$

$$R^2 = 0.9756$$

Gdje je: Y- apsorbance uzorka (420nm), x- koncentracija kvercetina (mg/l),  $R^2$ - koeficijent determinacije

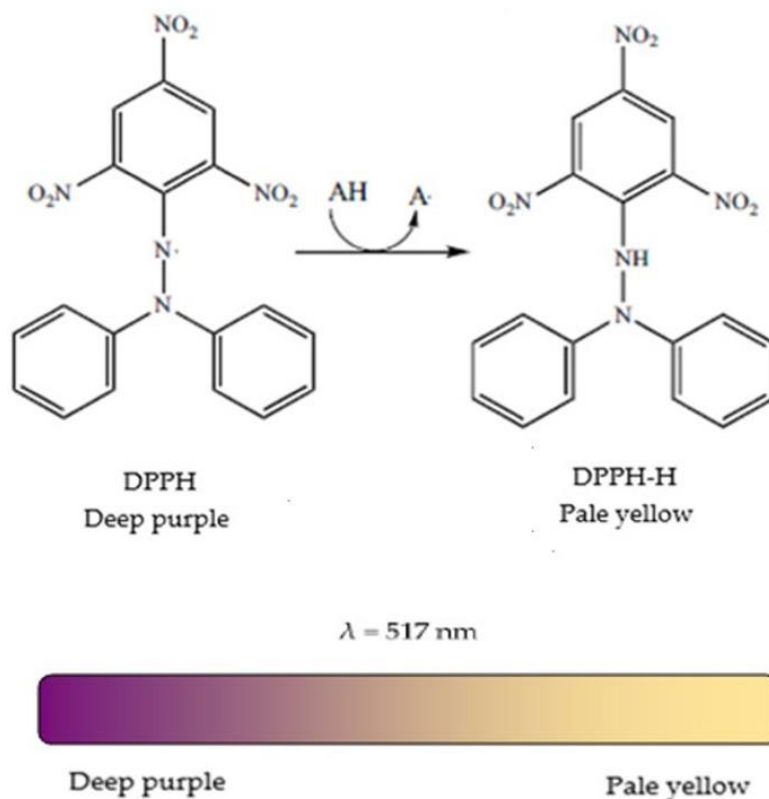
#### 3.1.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

##### Reagensi

- 70% etanol
- 0.2 mM rastvor DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
  - o 0.008g DPPH praha rastvori se u 100 ml etanola

##### Postupak

DPPH test je najrasprostranjenija metoda za ispitivanje antioksidativne aktivnosti mnogih prirodnih antioksidanasa. DPPH<sup>•</sup> je stabilan slobodni radikal zbog delokalizacije nesparenog elektrona u cijelom molekulu, tako da molekuli ne dimerizuju, kao što bi to bio slučaj sa ostalim vrstama slobodnih radikala. Ovaj molekul ima tamnoljubičastu boju, koja se karakteriše apsorbancijom u etanolnom rastvoru na 515-517 nm. Kada antioksidans reaguje sa DPPH<sup>•</sup>, u prisustvu vodonika kao donora elektrona, ovaj radikal se redukuje u DPPH i posljedica toga je apsorpcija na manjim talasnim dužinama nego DPPH<sup>•</sup>. Pritom dolazi do nestanka ljubičaste boje, što je proporcionalno prisutnim elektronima- veći stepen obezbojavanja označava veću redukcionu sposobnost (slika 28) (Vitković, 2017).



**Slika 28.** Mehanizmi uklanjanja DPPH antioksidansom (AH). (Munteanu i Apetrei, 2021)

Određivanje procenta aktivnosti uklanjanja radikala DPPH izvršeno je tako što je 0,5 ml svežeg rastvora DPPH pomešano sa 1,2 mL uzorka. Posle 30 minuta u mraku, apsorbanca je određena na 517 nm. Određivanje se izražava kao % aktivnosti vezivanja (% DPPH). Moć uklanjanja slobodnih radikala (RSA) izračunava se prema jednačini:

$$\% \text{ DPPH aktivnost} = \frac{(A_{\text{DPPH}} + A_{\text{B}}) - A_{\text{S}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

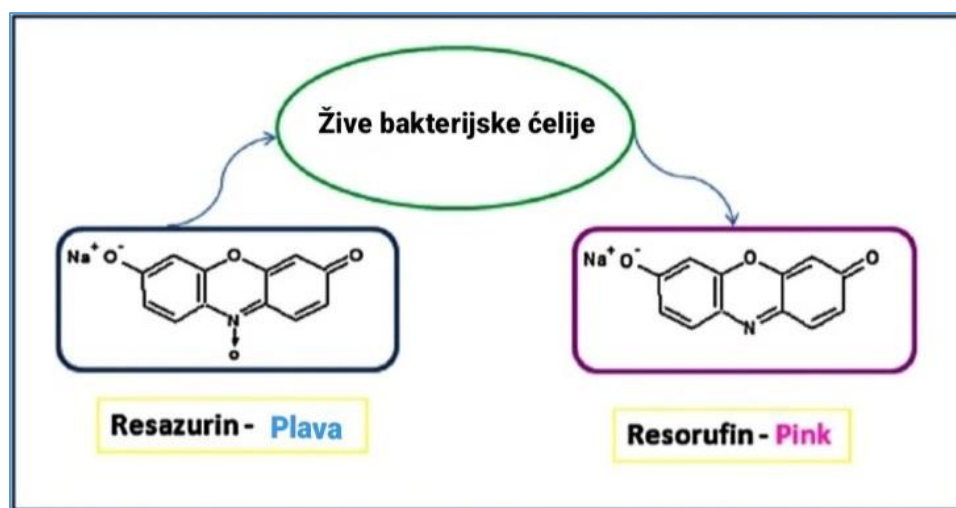
Gdje:  $A_{\text{DPPH}}$ - apsorbanca kontrole (umesto uzorka dodat je etanol),  $A_{\text{B}}$ - apsorbanca uzorka, gde je umjesto DPPH dodat etanol,  $A_{\text{S}}$ - apsorbanca uzorka pomešanog sa DPPH rastvorom.

Za interpretaciju podataka korišćena je polovina maksimalne inhibitorne koncentracije  $IC_{50}$  (mg/ml), definisana kao koncentracija ekstrakta koja postiže uklanjanje 50% DPPH• . Odgovarajuća vrednost  $IC_{50}$  je izračunata interpolacijom grafika zasnovanog na modelu linearne regresije. Koncentracije uzoraka su iscrtane na apscisi, a srednje vrijednosti aktivnosti uklanjanja radikala DPPH (%) izračunate jednačinom na ordinati.

Veće vrijednosti  $IC_{50}$  ukazuju na to da uzorak ima manji antioksidativni potencijal, i obrnuto (Munteanu i Apetrei, 2021).

### 3.1.2.5. Određivanje antimikrobne aktivosti mikrodilucionom metodom

Shodno literaturnim podacimam, a i dobijenim rezultatima koji ukazuju na veću efikasnost ultrazvučne u odnosu na ostale primijenjene metode ekstrakcije, koje spadaju u grupu konvencionalnih, za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćen je ekstrakt dobijen ovom tehnikom izolovanja. Primijenjena je mikrodiluciona metoda na mikrotitracionim pločama sa 96 kanalića pri čemu je kao indikator korišćen resazurin. Aktivne bakterijske ćelije redukuju nefluorescentni resazurin (plavi) u fluorescentni resorufin (ružičasti) kao što je prikazano na slici 29, dajući direktnu kvantifikativnu mjeru metaboličke aktivnosti bakterija. (O'Brien i sar., 2000).



Slika 29. Dejstvo bakterije na resazurin (Elshikh i sar., 2016)

Ispitano je dejstvo ekstrakata duvanske prašine dobijenih ultrazvučnom metodom ekstrakcije na bakterijske kulture koje su navedene u tabeli 6. Korišćene su gram-pozitivne i gram-negativne bakterije kako bi se ispitala potencijalna selektivost. Upotrijebljeni sojevi pripadaju American Type Culture Collection Maryland (ATSS).

Tabela 6. Ispitivane bakterijske kulture

Bakterijska kultura			
Gram- pozitivne		Gram-negativne	
Oznaka	Mikroorganizam	Oznaka	Mikroorganizam
ATCC 6057	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ATCC 6633	<i>Bacillus spizizenii</i>	ATCC 13076	<i>Salmonella enteritidis</i>
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 25933	<i>Proteus mirabilis</i>
		ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
		ATCC 13048	<i>Klebsiella aerogenes</i>

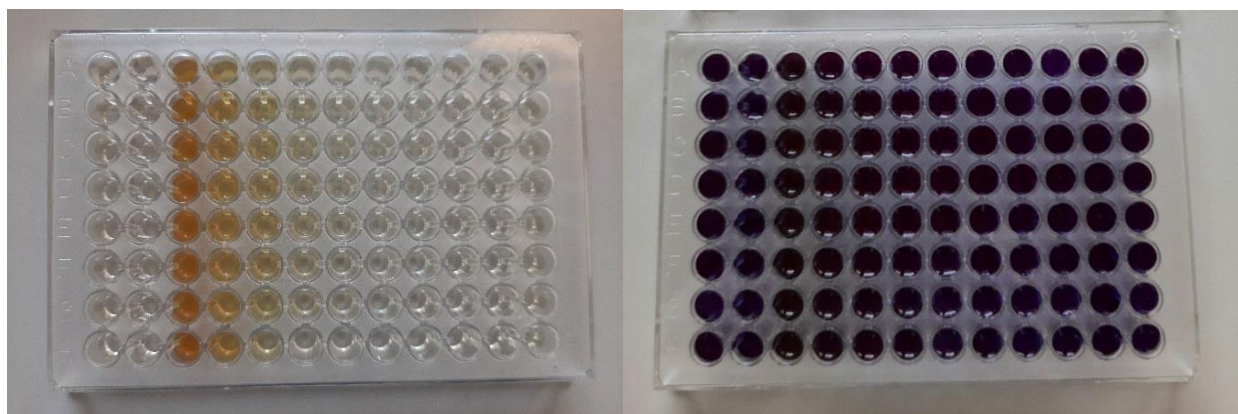
## Postupak

U svih 96 kanalića pomoću višekanalne mikropipete sipano je po 200  $\mu\text{l}$  Nutrient broth hranljivog medijuma (pripremljenog rastvaranjem 8g supstance u 1000 ml destilovane vode i sterilisanog 15 minuta u autoklavu na 121  $^{\circ}\text{C}$ ).

Prvi red služi za provjeru bakterijske aktivnosti, tj. predstavlja pozitivnu kontrolu koja će sadržati samo hranljivi medijum i kulturu.

U drugi red dodato je po 100  $\mu\text{l}$  96% etanola i on predstavlja negativnu kontrolu koja služi za provjeru rezistentnosti bakterija na primijenjeni rastvarač prilikom ekstrakcije.

U treći red sipano je po 100  $\mu\text{l}$  uzorka pretdno inkubirnog 24h na 37  $^{\circ}\text{C}$ . Pomoću višekanalne mikropipete sadržaj je promiješan nekoliko puta i izvršena je dilucija tako što je po 100  $\mu\text{l}$  prenijeto u naredni red i postupak ponavljen sve do kraja mikrotitarske ploče (Slika 30 (a)).



(a)

(b)

**Slika 30.** Mikrotitarska ploča (a) prije dodatka (b) nakon dodatka resazurina (autor: Marušić A.)

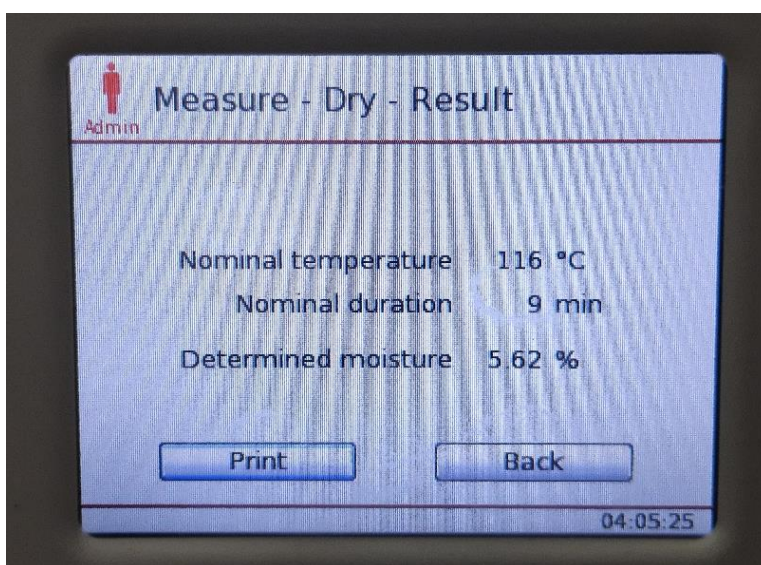
Nakon izvršenog razblaženja, u svaki kanalić dodato je po 30  $\mu\text{l}$  prethodno zasijane bakterijske vrste. Mikrotitarske ploče su inkubirane 24h na 37  $^{\circ}\text{C}$ , zatim je sipano po 20  $\mu\text{l}$  indikatora (resazurina) kao što je prikazano na slici 30 (b) i ploče su vraćene na inkubaciju još 12h, nakon čega su očitavani rezultati.

Promjena boje praćena je vizuelno i na ovaj način određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), koja je ključni indikator sposobnosti antimikrobnog agensa, definisana kao minimalna koncentracija ( $\text{mg l}^{-1}$ ) pri kojoj je onemogućen vidljiv rast bakterija.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Predmet ovog rada je ispitivanje i kvantitativno određivanje ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima duvanske prašine nastale u fabrici sekundarne obrade duvana u Crnoj Gori, pronalaženje optimalne metode ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz duvanskog otpada poređenjem dobijenih rezultata o sadržaju ukupnih fenola, flavonoida ekstraktata dobijenih primjenom različitih tehnika i dokazivanje njihovog antioksidativnog i antimikrobnog dejstva.

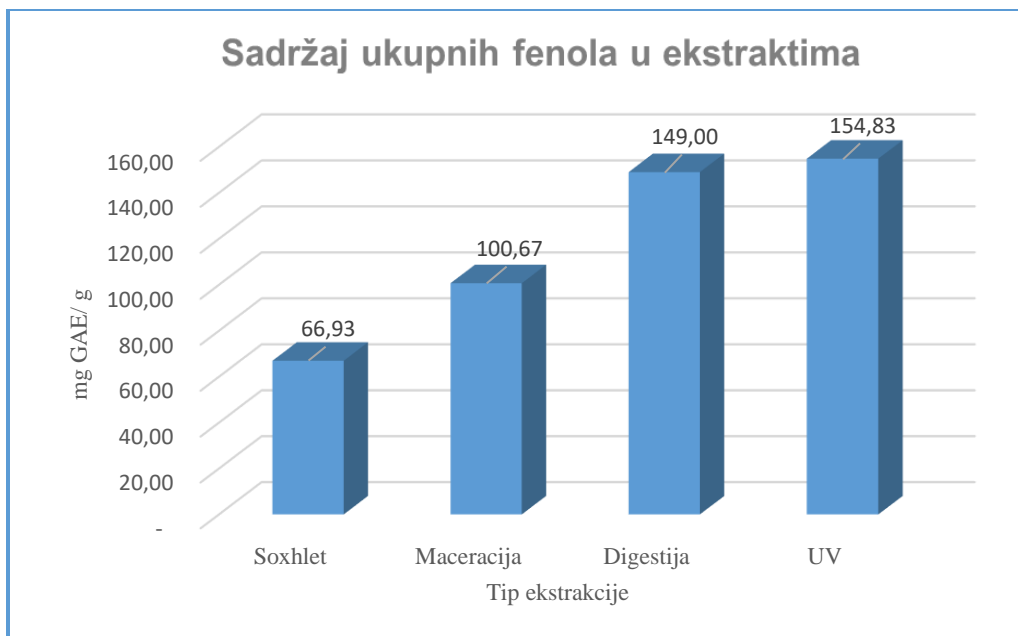
Dobijeni srednji prečnik čestica duvanske pršine korišćene u radu iznosi 0,12 mm, a vlaga ovog biljnog materijala 5,62% (slika 31).



**Slika 31.** Vlaga korišćenog duvanskog otpada (autor: Marušić A.)

### 4.1. Sadržaj ukupnih fenola u duvanskoj prašini

Fenoli predstavljaju biljne komponente sa polihidroksilnim grupama, koje su široko rasprostranjene u biljnom tkivu i koje se obično koriste kao antioksidansi u ljudskoj ishrani zbog sposobnosti uklanjanja reaktivnih radikala kiseonika (ROS). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima duvanske prašine dobijenim primjenom četiri različita načina ekstrakcije određivan je u tri ponavljanja, rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i predstavljeni na slici 32.

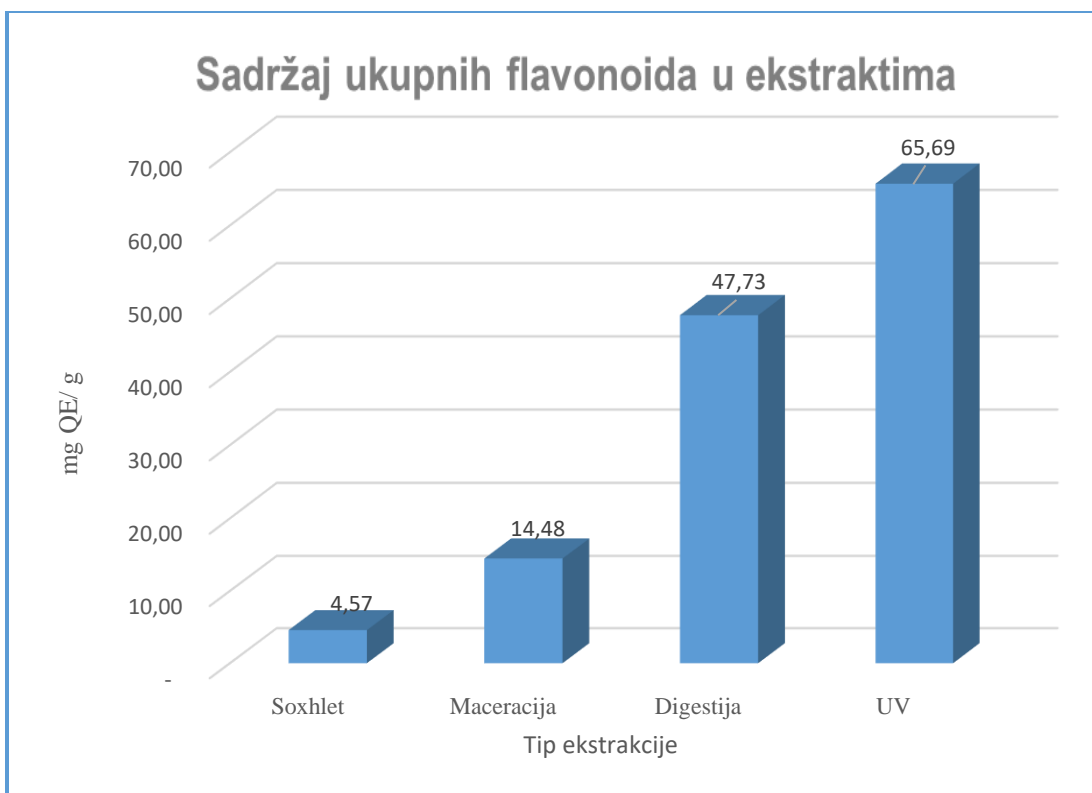


**Slika 32.** Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima dobijenim primjenom različitih metoda ekstrakcije (autor: Marušić A.)

Najveća količina ukupnih fenola pronađena je u uzorku dobijenom postupkom ultrazvučne ekstrakcije (154,83 mg GAE/ g suve materije), dok je najmanja količina zabilježena u onom dobijenom ekstrakcijom u Soxhlet aparaturi (66,93 mg GAE/ g suve materije). Rezultati dobijeni u ovom radu veći su od literaturnih podataka brojnih istraživanja o sadržaju ukupnih fenola u različitim djelovima duvana. Npr. prema rezultatima jednog od njih (Zou i sar., 2021) u kome je sušeni biljni materijal ekstrahovan takođe ultrazvučnom sonikacijom pomoću 70% etil-alkohola listovi su uglavnom imali količine fenola od 14,46 do 23,05 mg GAE/g, dok je korijenje imalo količine fenola od 1,56 do 4,63 mg GAE/g. U drugom radu (Gotal, 2020) u kome je ispitivan uticaj različitih parametara procesa ekstrakcije (broj impulsa, jačina polja, vrijeme tretmana i odnos čvrsto- tečno) na svojstva i sastav ekstrakata biljke duvana sadržaj ukupnih fenola kretao se od 14,06 mg GAE/g do najviše vrijednosti 74,83 mg GAE/g suve materije.

## 4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u duvanskoj prašini

Flavonoidi su pigmenti rastvorljivi u vodi koji se nalaze u vakuolama biljnih ćelija. Imaju C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> osnovnu strukturnu jedinicu, sadrže dva fenil prstena zajedno sa spojenim jednim heterocikličnim prstenom. Široko su rasprostranjeni u biljkama kao važni sekundarni metaboliti I uključeni su u mnoge važne terapijske aktivnosti kao što su antialergijske, antiinflamatorne, antioksidativne, antimikrobne, antivirusne, itd. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima dobijenim primjenom četiri različita načina ekstrakcije određivan je u tri ponavljanja, rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i predstavljeni na slici 33.



**Slika 33.** Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima dobijenim primjenom različitih metoda ekstrakcije (autor: Marušić A.)

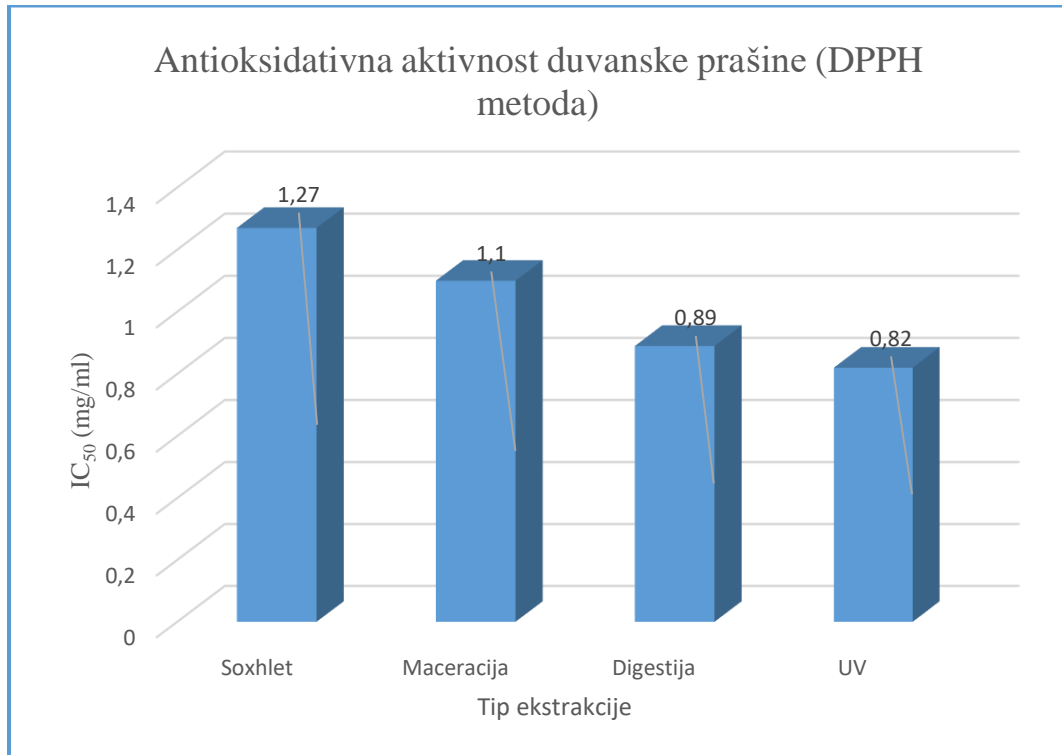
Kao i kod sadržaja ukupnih fenola, najveća količina flavonoida pronađena je u ekstraktu duvanske prašine dobijenom postupkom ultrazvučne ekstrakcije (65,69 mg QE/ g suve materije), dok se najmanja količina nalazila u uzorku dobijenom pomoću Soxhlet aparature (4,57 mg QE/ g suve materije).

U gore pomenutom radu (Gotal, 2020) u kome je ispitivan uticaj različitih parametara procesa ekstrakcije najviša vrijednost sadržaja ukupnih flavonoida bila je 7,36 mg/g. Takođe, u jednom od israživanja (Docheva i sar., 2014) čiji je cilj bio da se okarakteriše sadržaj bioaktivih jedinjenja u listovima različitih vrsta duvana (*N. alata*, *N. rustica*, *N. tabacum*) sadržaj flavonoida bio je u rasponu od 0,66 mg QE/g (*N. alata*) do 11,51 mg QE/g (*N. rustica*). Prema rezultatima dobijenim u ovom eksperimentalnom radu najmanju vrijednost ukupnih flavonoda imao je, kao što je navedeno, ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom- 4,57 mg QE/ g suve materije, što je uglavnom manje od literaturnih podataka, a najveću onaj dobijen primjenom ultrazvuka-65,69 mg QE/ g suve materije, što je znatno veće od većine do sada prijavljenih vrijednosti za različite sorte duvana.



### 4.3. Antioksidativna aktivnost duvanske prašine

Antioksidansi su prirodne ili sintetičke supstance koje mogu spriječiti ili odložiti oksidativno oštećenje ćelija izazvano fiziološkim „oksidansima” koji imaju izrazito pozitivne redukcijske potencijale, pokrivajući ROS/RNS i slobodne radikale (tj. nestabilne molekule ili jone koji imaju nesparene elektrone). Rezultati antioksidativnog kapaciteta ekstrakata duvanske prašine dobijeni primjenom DPPH metode predstavljeni su na slici 34 kao polovina maksimalne inhibitorne koncentracije  $IC_{50}$  (mg/ml) dobijena nakon tri ponavljanja.



**Slika 34.** Antioksidativna aktivnost uzoraka dobijenih primjenom različitih metoda ekstrakcije (autor: Marušić A.)

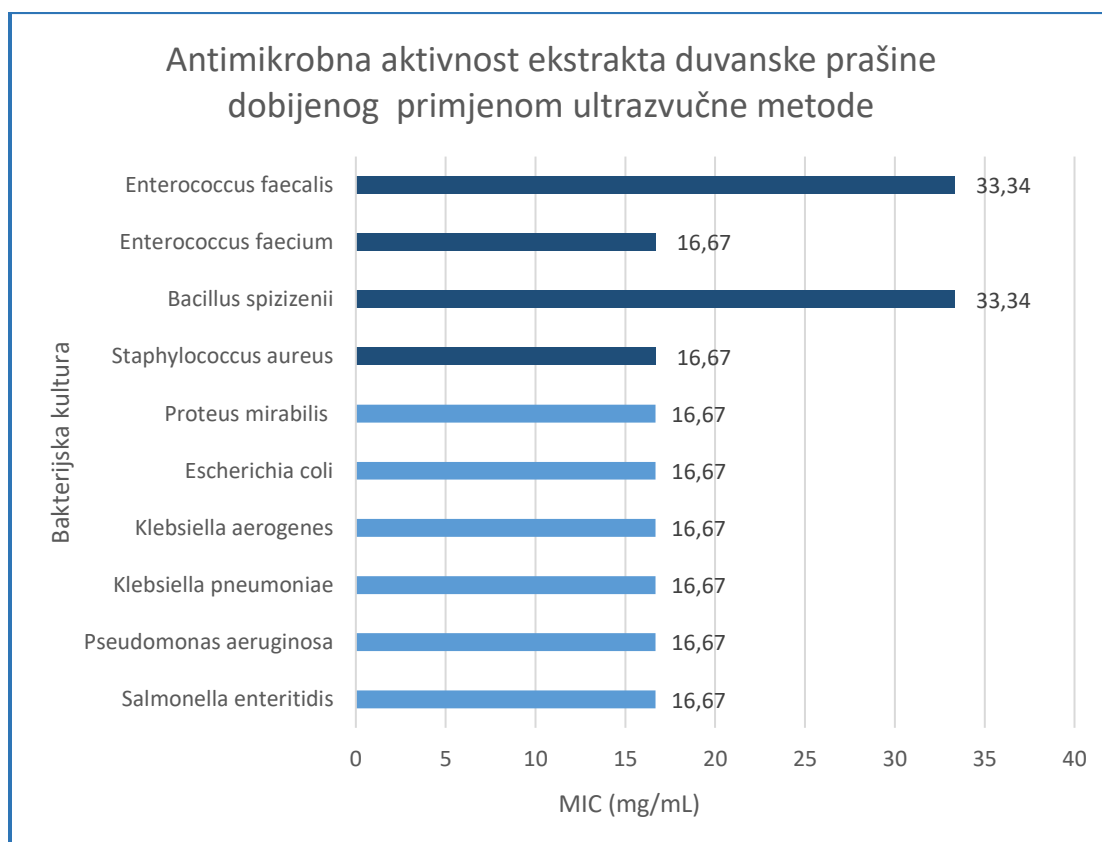
Najmanju vrijednost  $IC_{50}$  imao je ekstrakt duvanske prašine dobijen primjenom ultrazvučne metode, a najveću onaj dobijen Soxhlet ekstrakcijom. Dobijena antioksidativna vrijednost uzoraka veća je od nekih literaturnih podataka za listove duvana, dok je u korelaciji sa antioksidativnim aktivnostima drugih dijelova biljke. Npr. u jednom od radova (Al-Lahham i sar., 2020) antioksidativna aktivnost ekstrakta korijena *N. tabacum* određivana je takođe korišćenjem DPPH testa i rezultati su pokazali da ekstrakt ima antioksidativnu aktivnost sa  $IC_{50}$  od 2 mg/mL.

Ovi podaci ukazuju na to da je ultrazvučna tehnika bolja od klasičnih metoda ekstrakcije, jer se dobijaju ekstrakti sa većim sadržajem fenolnih i flavonoidnih jedinjenja, shodno tome i bolje antioksidativne aktivnosti, za znatno kraće vrijeme u odnosu na Soxhlet ekstrakciju, što je veoma bitno i sa ekonomske strane.

#### 4.4. Antimikrobna aktivnost duvanske prašine

Sposobnost nekih biljnih sekundarnih metabolita da djeluju kao agensi za modifikaciju rezistencije je obećavajuće polje u ublažavanju širenja otpornosti bakterija. Antimikrobna aktivnost predstavlja sprječavanje stvaranja novih kolonija, inhibiciju rasta ili uništavanje mikroorganizama. S obzirom na to da je najveći sadržaj bioaktivnih jedinjenja, a ujedno i najveću antioksidativnu vrijednost pokazao uzorak dobijen ekstrakcijom duvanske prašine pomoću ultrazvuka, vršeno je ispitivanje antimikrobnog potencijala ovog uzorka. Aktivnost je određivana na različitim gram-pozitivnim (4) i gram-negativnim (6) bakterijskim kulturama kako bi se ispitala eventualna selektivnost ekstrakta ka određenoj vrsti.

Dobijeni rezultati prikazani su na slici 35.



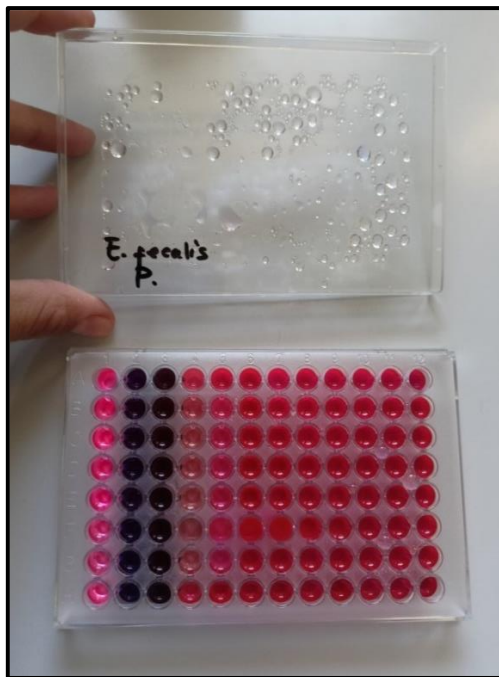
**Slika 35.** Antimikrobna aktivnost uzorka dobijenog primjenom ultrazvučne ekstrakcije

(autor: Marušić A.)

Na slikama 36-45 prikazane su mikrotitarske ploče sa kojih su vizuelno određivane navedene minimalne inhibitorne koncentracije uzorka.

**Vrste bakterija:**

*Gram (+):*



**Slika 36.** *Enterococcus faecalis*  
(autor: Marušić A.)



**Slika 37.** *Enterococcus faecium*  
(autor: Marušić A.)



**Slika 38.** *Bacillus spizizenii*  
(autor: Marušić A.)

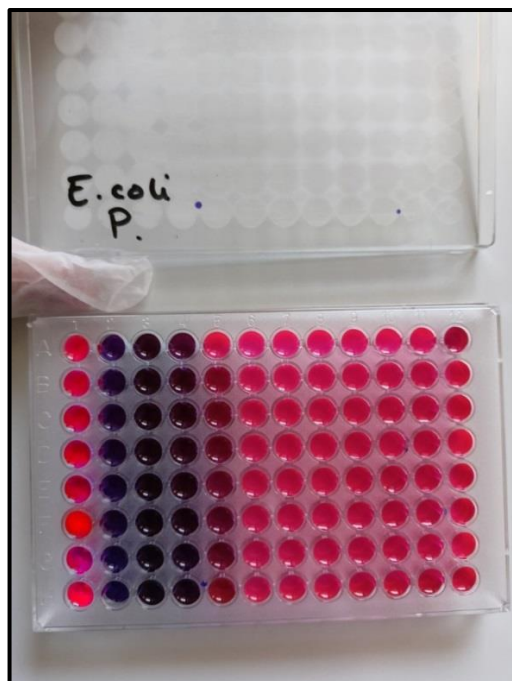


**Slika 39.** *Staphylococcus aureus*  
(autor: Marušić A.)

Gram (-):



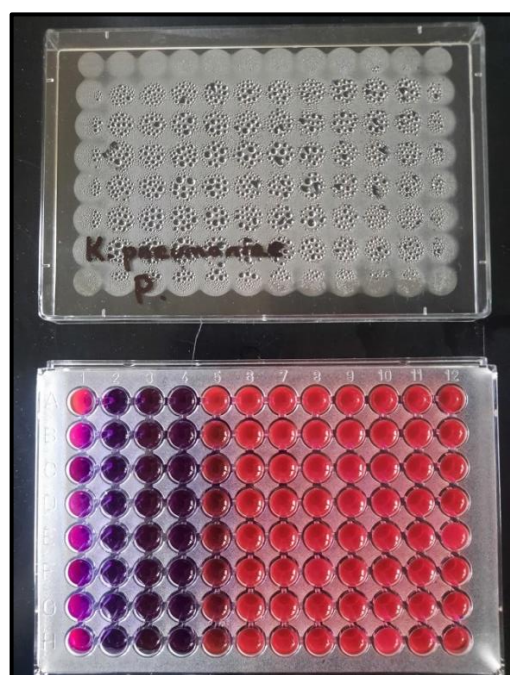
Slika 40. *Proteus mirabilis*  
(autor: Marušić A.)



Slika 41. *Escherichia coli*  
(autor: Marušić A.)



Slika 42. *Klebsiella aerogenes*  
(autor: Marušić A.)



Slika 43. *Klebsiella pneumoniae*  
(autor: Marušić A.)



**Slika 44.** *Pseudomonas aeruginosa*  
(autor: Marušić A.)



**Slika 45.** *Salmonella enteritidis*  
(autor: Marušić A.)

Više studija je potvrdilo činjenicu da se duvan može koristiti kao snažno antimikrobno sredstvo. Prema jednom istraživanju (Akinpelu i Obuotor, 2000) 25 mg/mL ekstrakta lista *N. tabacum* inhibira rast i gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, uključujući *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae* i *Staphylococcus aureus*. Nekoliko godina kasnije, pronađeni su takođe pozitivni rezultati protiv *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* (Wang i Gu, 2008). Štaviše, ovi istraživači su otkrili da je ekstrakt lista duvana jednako moćan kao antibakterijski agens gentamicin, korišćen kao pozitivna kontrola. Slično, jedna nezavisna studija sprovedena u Pakistanu je pokazale da ekstrakti *N. tabacum* ispoljavaju značajnu antibakterijsku aktivnost protiv gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (Malik i sar., 2015).

Šarma i kolege su pokazali da acetonski ekstrakt duvana ima antagonistički efekat na rast *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dok su metanolni, vodeni i etanolni ekstrakti tkiva duvana takođe bili efikasni protiv bakterije *Escherichia coli* (Sharma i sar., 2016).

Dokazano je da svi delovi duvana imaju antibakterijski potencijal, što nudi teorijsku izvodljivost razvoja antibakterijskih lijekova iz otpada duvanske industrije. Studija sprovedena u Etiopiji pokazala je da 100 i 200 mg/mL biljnog ekstrakta *N. tabacum* pokazuje antagonistički efekat protiv brojnih bakterija (Kalayou i sar., 2012).

Grupa istraživača pokazala da sirovi ekstrakti *N. tabacum* ispoljavaju antimikrobno dejstvo na uropatogene koji formiraju biofilm, dok su klinički izolati bili najotpornija grupa (Ameya i sar., 2018). Oni su takođe procijenili antimikrobnu aktivnost polifenola u listovima duvana protiv

*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Njihovi rezultati su pokazali da polifenoli iz lista duvana posjeduju veliki potencijal kao antimikrobni agensi.

Dobijeni rezultati u ovom radu su u skladu sa podacima pronađenim u dostupnim literaturnim podacima. Etanolni ekstrakt duvanske prašine pokazao je uniformnu aktivnost prema ispitivanim bakterijskim vrstama, sa izuzetkom *Enterococcus faecalis* i *Bacillus spizizenii*, na koje je ekstrakt duvanske prašine imao slabije dejstvo.

Poređenjem literaturnih podataka i dobijenih rezultata uzoraka ispitivanih u ovoj tezi potvrđuje se potencijal duvanske prašine kao izvora biološki važnih jedinjenja čija potražnja konstantno raste. Takođe, pregledom rezultata sadržaja bioktivnih jedinjenja- fenola i flavonoida, kao i antioksidativne aktivnosti ekstrakata duvanskog otpada dobijenih primjenom različitih tehnika primjećuje se da najveću količinu pomenutih jedinjenja daje ultrazvučna ekstrakcija, a ekstrakt dobijen ovom metodom ne pokazuje selektivnost ka određenom tipu bakterija.

## 5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobijenih ispitivanjem ukupnog sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, procenta aktivnosti uklanjanja radikala DPPH, antimikrobnog potencijala uzoraka dobijenim različitim ekstrakcionim sistemima i ekstrakcionim tehnikama primijenjenim na duvanskoj prašini mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Vrsta bioaktivnih komponenti u etanolnim ekstraktima duvanskog otpada slična je samom listu duvana. Njihov sadržaj u velikoj mjeri zavisi od samog tipa ekstrakcione tehnike, kao i od uslova pod kojim se odvija ekstrakcija.
- Najveća količina ukupnih fenola pronađena je u uzorku dobijenom postupkom ultrazvučne ekstrakcije-154,83 mg GAE/ g suve materije. U ekstraktu dobijenom primjenom digestije sadržaj ukupnih fenola bio je 149 mg GAE/ g suve materije, a u onom dobijenom maceracijom 100,67 mg GAE/ g suve materije. Najmanja količina zabilježena je u onom dobijenom ekstrakcijom u Soxhlet aparaturi- 66,93 mg GAE/ g suve materije.
- Najveća količina ukupnih flavonoida pronađena je takođe u uzorku dobijenom postupkom ultrazvučne ekstrakcije- 65,69 mg QE/ g suve materije. U ekstraktu dobijenom primjenom digestije bilo je 47,73 mg QE/ g suve materije, a u onom dobijenom maceracijom 14,48 mg QE/ g suve materije, a najmanja količina nađena je u onom dobijenom ekstrakcijom u Soxhlet aparaturi- 66,93 mg QE/ g suve materije.
- Na osnovu uporednih analiza četiri ekstrakcione tehnike: Soxhlet, maceracije, digestije i ultrazvučne ekstrakcije, može se zaključiti da poslednja dovodi do većeg prinosa bioaktivnih jedinjenja u kraćem vremenskom periodu, čime se smanjuje degradacija komponenti i unos energije. Nešto manji prinos daje digestija, zatim maceracija i na kraju, kao najmanje pogodna metoda za izolovanja bioaktivnih komponenti iz duvanske prašine- sa najnižim prinosom, pokazala se Soxhlet ekstrakcija.
- Dakle, optimalna metoda za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz duvanske prašine je ultrazvučna tehnika kod koje visoki pritisak i temperatura stvaraju mikromlazeve i udarne talase usmjerene ka čvrstoj površini supstance zbog čega dolazi do pojačanog prodora rastvarača u ćelije i intenziviranja prenosa mase čime se poboljšava ekstrakcija ciljnih jedinjenja iz biljnih materijala
- Duvanska prašina pokazuje antioksidativnu aktivnost pri čemu najveću ima ekstrakt duvanske prašine dobijen primjenom ultrazvučne metode, a najmanju onaj dobijen Soxhlet ekstrakcijom

- Ekstrakt duvanske prašine dobijen ultrazvučnom metodom ekstrakcije ima jednaku aktivnost prema ispitivanim bakterijskim vrstama (MIC 16,67 mg/ml), sa izuzetkom *Enterococcus faecalis* i *Bacillus spizizenii*, na koje je ekstrakt duvanske prašine imao nešto slabije dejstvo (MIC 33,34 mg/ml)
- Zbog navedenih dokazanih aktivnosti, duvanska prašina umjesto otpada postaje vrijedna supstanca- izvor bioaktivnih jedinjenja za kojima potražnja sve više raste.
- Primjena duvanske prašine u ove srhe ima višestruke pozitivne uticaje, kako na ukupnu cijenu proizvodnje duvana, tako i na životnu sredinu i smanjenje količine duvanskog otpada.

Postoje određena ograničenja u pogledu čistoće dobijenih ekstrakata i selektivnosti svake tehnike ekstrakcije. Međutim, razvoj novih tehnika, unapređenje i optimizacija postojećih, treba da bude imperativ za naučnika kako bi se obezbijedila sigurnija i čistija proizvodnja, očuvanje prirodnih resursa i održivi razvoj.



## 6. LITERATURA

1. **Akinpelu D. A. & Obuotor E. M. (2000).** Antibacterial activity of *Nicotiana tabacum* leaves. *Fitoterapia*, 71(2), 199–200.
2. **Al-Lahham S., Sbieh R., Jaradat N., Almasri M., Mosa A., Hamayel A. & Hammad F. (2020).** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of *Nicotiana tabacum* L. *European journal of integrative medicine*, 33: 101039
3. **Alzoreky N. S. & Nakahara K. (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food microbiology*, 80(3), 223–230.
4. **Ameya G., Manilal A. & Merdekios B. (2017).** In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of *Nicotiana tabacum* L. extracted in different organic solvents. *The open microbiology journal*, 11(1), 352–359.
5. **Andersen Ø. M. & Markham K. R. (2005).** *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (1st ed.). CRC Press, Boca Raton, 1-1239.
6. **Angela A. & Meireles M. (2008).** *Low-pressure solvent extraction (solid- liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants, Extracting bioactive compounds for food products*, CRC Press, 137–218.
7. **Arsić M. (2019).** Teški metali u zemljištu potencijalnih lokaliteta za proizvodnju duvana u vranjskoj kotlini, Magistarski rad, Fakultet zaštite na radu, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.
8. **Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N. & Omar A. K. M. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426–436.
9. **Azwanida NN. (2015).** A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & aromatic plants*, 4(3).
10. **Bahoran T., Soobrattee M. A., Luximon-Ramma V. & Aruoma O. I. (2007).** Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet journal of medical update*, 1(2).
11. **Batinić B. (2017)** Uticaj modulacije GABA<sub>a</sub> receptora koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu na promene ponašanja pacova prenatalno izloženih dejstvu lipopolisaharida. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

12. **Banožić M., Aladić K., Jerković I. & Jokić S. (2021).** Volatile organic compounds of tobacco leaves versus waste (scrap, dust, and midrib): extraction and optimization. *Journal of the science of food and agriculture*, 101(5), 1822–1832.
13. **Banožić M., Babić J. & Jokić S. (2020).** Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste-a review. *Industrial crops and products*, 144: 112009.
14. **Banožić M., Šubarić D. & Jokić S. (2018).** Tobacco waste in Bosnia and Herzegovina – problem or high-value material? *Glasnik Zaštite Bilja*, 41(4), 73–73.
15. **Bernhoft A. (2008).** A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals*, 11–17, The Norwegian academy of science and letters, Oslo.
16. **Bhisey R. A. (2012).** Chemistry and toxicology of smokeless tobacco. *Indian journal of cancer*, 49(4), 364–372.
17. **Birch E. J. (2000).** FATS, Extraction by solvent based methods. Ian D.W., *Encyclopedia of separation science*, Academic Press, London, UK, 2794–2801.
18. **Blažević J. (2020).** Elektrokemijska detekcija vitamina C u realnim uzorcima, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska
19. **Briški F., Horgas N., Vuković Domanovac M. & Gomzi Z. (2003).** Aerobic composting of tobacco industry solid waste- simulation of the process. *Clean technologies and environmental policy*, 5(3–4), 295–301.
20. **Cai J., Li B., Chen C. & Wang J. (2016).** Hydrothermal carbonization of tobacco stalk for fuel application. *Bioresource technology*, 220, 305–311.
21. **Castro S. B. R., Leal C. A. G., Freire F. R., Carvalho D. A., Oliveira D. F. & Figueiredo H. C. P. (2008).** Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 39(4), 756–760.
22. **Chanioti S., Liadakis G., Tiaz C. (2014).** Solid–liquid extraction. *Food engineering handbook*, CRC Press, (6) 254-283.
23. **Chatterjee M., Saluja R., Kanneganti S., Chinta S. & Dikshit M. (2007).** Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cellular and molecular biology*, 53(1), 84–93.
24. **Chaturvedi S., Upreti D. K., Tandon D. K., Sharma A. & Dixit A. (2008).** Bio-waste from tobacco industry as tailored organic fertilizer for improving yields and nutritional values of tomato crop. *Journal of environmental biology*, 29(5), 759–763.
25. **Chen J., Liu X., Xu X., Lee F. S. C. & Wang X. (2007a).** 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(3), 879–885.

26. **Chen Y., Yu Q. J., Li X., Luo Y. & Liu H. (2007b).** Extraction and HPLC characterization of chlorogenic acid from tobacco residuals. *Separation science and technology*, 42(15), 3481–3492.
27. **Cheraskin E. (1996).** Antioxidants in health and disease. *Journal of the american optometric association*, 67(1), 50–57.
28. **Cho H., Uehara T. & Bernhardt T. G. (2014).** Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, 159(6), 1300–1311.
29. **Cipolla L. & Peri F. (2010).** Carbohydrate-based bioactive compounds for medicinal chemistry applications. *Mini-reviews in medicinal chemistry*, 11(1), 39–54.
30. **Civilini M., Domenis C., Sebastianutto N. & De Bertoldi M. (1997).** Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms. *Waste management & research: The journal for a sustainable circular economy*, 15(4), 349–358.
31. **Coulson J.M., Richardson J.F., Backhurst J.R., Harker J. H. (1993).** Leaching. *Chemical engineering*. Pergamon Press, 391–407.
32. **Cowan M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
33. **Croteau R., Kutchan T.M. & Lewis N.G. (2015).** Natural Products (secondary metabolites). Buchanan B., Gruissem W., Jones R. L., *Biochemistry and molecular biology of plants*, American society of plant physiologists, USA, (24) 1250–1318.
34. **Das K. & Gezici S. (2019).** Secondary plant metabolites , their separation and identification, and role in human disease prevention. *Annals of phytomedicine: an international journal*, 7(2): 13-24.
35. **De la Rosa L. A., Moreno-Escamilla J.O., Rodrigo-García J., Alvarez-Parrilla E. (2019).** Phenolic compounds. Yahia E.M.: *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, Woodhead publishing, Sawston, UK, 253–271.
36. **Docheva M., Dagnon S. & Statkova-Abeghe S. (2014).** Flavonoid content and radical scavenging potential of extracts prepared from tobacco cultivars and waste. *Natural product research*, 28(17), 1328–1334.
37. **Dražić S. (1995).** *Proizvodnja duvana*. Đorđević T.S., Poljo knjiga, Beograd, 8-25.
38. **Drinić Z. (2020).** *Ekstrakcija industrijske konoplje (Cannabis sativa L.)*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Farmaceutsko inženjerstvo, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad
39. **Dröge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47–95.

40. **Dudareva N. & Pichersky E. (2000).** Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant physiology*, 122(3), 627–633.
41. **Elmogahzy Y. E. (2020).** Finished fibrous assemblies. *Engineering textiles*, Woodhead Publishing, USA, 275–298.
42. **Elshikh M., Ahmed S., Funston S., Dunlop P., McGaw M., Marchant R. & Banat I. M. (2016).** Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters*, 38(6), 1015–1019.
43. **Esilsson C.S. & Bjorklund E. (2000).** Analytical-scale microwave-assisted extraction (review). *Journal of chromatography A.*, 902, 227–250.
44. **Fazly Bazaz B. S. & Salt W. G. (1983).** Local anaesthetics as antibacterial agents: Effects on cellular respiration and the leakage of cytoplasmic constituents. *Microbios*, 37, 139–149.
45. **Frei B. (1954).** Reactive oxygen species and antioxidant vitamins. *Am J Med*, 97(3):5-13.
46. **Fukusaki E., Takeno S., Bamba T., Okumoto H., Katto H., Kajiyama S. & Kobayashi A. (2004).** Biosynthetic pathway for the C45 polyprenol, solanesol, in tobacco. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 68(9), 1988–1990.
47. **Genestra M. (2007).** Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807–1819.
48. **Ghafoor K., Hui T. & Choi Y. (2011).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel. *Journal of food biochemistry*, 35, 735–746.
49. **Guntarti A., Annisa J., Mughniy M. & Rizqi F. (2017).** Effect of regional variation on the total flavonoid level of ethanol extract of Mangosteen (*Garcinia mangostana*) peels. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 8(2), 136–143.
50. **Herrera M. C. & Luque De Castro M. D. (2004).** Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 379(7–8), 1106–1112.
51. **Hossain M. A., Al-Hdhrami S. S., Weli A. M., Al-Riyami Q. & Al-Sabahi J. N. (2014).** Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L. grown in Sultanate of Oman. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, 368–372.
52. **Hu R. S., Wang J., Li H., Ni H., Chen Y. F., Zhang Y. W., Xiang S. P. & Li H. H. (2015).** Simultaneous extraction of nicotine and solanesol from waste tobacco materials by the column chromatographic extraction method and their separation and purification. *Separation and purification technology*, 146, 1–7.

53. **Huang W., Li Z., Niu H., Wang J. & Qin Y. (2008).** Bioactivity of solanesol extracted from tobacco leaves with carbon dioxide-ethanol fluids. *Biochemical engineering journal*, 42(1), 92–96.
54. **Hussein K. N., Molnar T., Pinter R., Toth A., Ayari E., Friedrich L., Dalmadi I. & Kisko G. (2020).** In vitro antimicrobial activity of plant active components against *Pseudomonas lundensis* and *Listeria monocytogenes*. *Progress in agricultural engineering sciences*, 16, 163–172.
55. **James H. D. (2012).** Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. Rao V., *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*, IntechOpen, London, 1–32.
56. **Jassbi A. R., Zare S., Asadollahi M. & Schuman M. C. (2017).** Ecological roles and biological activities of specialized metabolites from the genus *Nicotiana*. *Chemical reviews*, 117(19), 12227–12280.
57. **Gotal A.M. (2020).** Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom pulsirajućeg električnog polja, Master rad, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska.
58. **Sattler K. & Feindt H.J. (1995).** Extraction. Thermal separation processes, John Wiley & Sons, Germany, 393–465.
59. **Kakhia T. I. (2016).** Alkaloids & alkaloids plants. Adana University- Industry joint research center.
60. **Kalayou S., Haileselassie M., Gebre-egziabher G., Tiku'e T., Sahle S., Taddele H. & Ghezu M. (2012).** In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray region, Ethiopia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(7), 516–522.
61. **Kemper T. G. (2020).** Oil Extraction. *Bailey's industrial oil and fat products*, John Wiley & Sons, 1–38.
62. **Khameneh B., Diab R., Ghazvini K. & Fazly Bazzaz B. S. (2016).** Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial pathogenesis*, 95, 32–42.
63. **Khameneh B., Iranshahy, M., Soheili, V. & Fazly Bazzaz B.S. (2019).** Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob resist infect control* 8, 118.
64. **Khan U. A., Rahman H., Niaz Z., Qasim M., Khan J., Tayyaba & Rehman B. (2013).** Antibacterial activity of some medicinal plants against selected human pathogenic bacteria. *European journal of microbiology and immunology*, 3(4), 272–274.
65. **Komori T., Imayama T., Kato N., Ishida Y., Ueki J. & Komari T. (2007).** Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant physiology*, 145(4), 1155–1160.

66. **Krishnananda P. I. ., Deshmukh A. G., Padole D. A. ., Dudhare M. S., Moharil M. P., & Khelurkar V. C. (2017).** Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 6(1), 32–36.
67. **Liu Y., Yong G., Xu Y., Zhu D., Tong H. & Liu S. (2010).** Simultaneous determination of free and esterified fatty alcohols, phytosterols and solanesol in tobacco leaves by GC. *Chromatographia*, 71(7–8), 727–732.
68. **Luque de Castro M. D. & Priego-Capote F. (2010).** Soxhlet extraction: past and present panacea, *Journal of chromatography A*, 1217 (16) 2388-2389.
69. **Majekodunmi S. O. (2015).** Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. *Merit research journal of medicine and medical sciences*, 3(11), 521–527.
70. **Malik R., Bokhari T. Z., Siddiqui M. F., Younis U., Hussain M. I. & Khan, I. A. (2015).** Antimicrobial activity of *Nerium oleander* L. and *Nicotiana tabacum* L. *Pak. J. Bot.*, 47(4), 1587–1592.
71. **Marinova D., Ribarova F. & Atanassova M. (2005).** Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical technology and Metallurgy*, 40, 255-260.
72. **Mason T. J., Riera E., Vercet A. & Lopez-Buesa P. (2005).** Application of ultrasound. *Emerging technologies for food processing*, Academic press, 323–351.
73. **Maxwell A. (1999).** DNA gyrase as a drug target. *Biochemical society transactions*, 27(2), 48–53.
74. **McBain A. J., Bartolo R. G., Catrenich C. E., Charbonneau D., Ledder R. G. & Gilbert P. (2003).** Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4770–4776.
75. **McCabe W., Smith J., Harriott P. (2005).** Leaching and extraction. *Unit operations of chemical engineering*, McGraw-Hill, 614–623.
76. **Mehmood F., Abdullah Ubaid Z., Shahzadi I., Ahmed I., Waheed M. T., Poczai P. & Mirza B. (2020).** Plastid genomics of *Nicotiana (Solanaceae)*: Insights into molecular evolution, positive selection and the origin of the maternal genome of Aztec tobacco (*Nicotiana rustica*). *PeerJ*, 8.
77. **Moghbel N., Ryu B. M., Ratsch A. & Steadman K. J. (2017).** Nicotine alkaloid levels, and nicotine to nornicotine conversion, in Australian *Nicotiana* species used as chewing tobacco. *Heliyon*, 3(11): e00469.
78. **Munteanu I. G. & Apetrei C. (2021).** Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *International journal of molecular sciences*, 22(7).

79. **Harborne J. B. (1983).** Introduction to ecological biochemistry. *The Journal of applied ecology*, 20(2), 697.
80. **Novotny T. E., Bialous S. A., Burt L., Curtis C., Luiza da Costa V., Iqtidar S. U., Liu Y., Pujari S. & Tursan d'Espaignet E. (2015).** The environmental and health impacts of tobacco agriculture, cigarette manufacture and consumption. *Bulletin of the World Health Organization*, 93(12), 877–880.
81. **Novotny T. E. & Zhao F. (1999).** Consumption and production waste: Another externality of tobacco use. *Tobacco Control*, 8(1), 75–80.
82. **O'Brien J., Wilson I., Orton T. & Pognan F. (2000).** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*, 267(17), 5421–5426.
83. **Cvetanovska A., Krstic M. & Cvetanovska L. (2017).** Content of total phenolic compounds and antioxidant potential of oriental tobacco varieties (*Nicotiana tabacum* L.). *European journal of pharmaceutical and medical research*, 4(4), 223–228.
84. **Pandey A. & Tripathi S. (2014).** Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry JPP*, 115(25), 115–119.
85. **Pang T., Bai C., Xu Y., Xu G., Yuan Z., Su Y. & Peng L. (2006).** Determination of sugars in tobacco leaf by HPLC with evaporative light scattering detection. *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 29(9), 1281–1289.
86. **Pang T., Yuan Z., Dai Y., Wang C., Yang J., Peng L. & Xu G. (2007).** Identification and determination of glycosides in tobacco leaves by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, 30(3), 289–296.
87. **Parthasarathy S., Santanam N., Ramachandran S. & Meilhac O. (1999).** Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *Journal of lipid research*, 40(12), 2143–2157.
88. **Paulsen B. S. (2010).** Highlights through the history of plant medicine. *Aksel Bernhoft: Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals*, 50, 18–29, The Norwegian academy of science and letters, Oslo.
89. **Poon I. K. H., Baxter A. A., Lay F. T., Mills G. D., Adda C. G., Payne J. A. E., Phan T. K., Ryan G. F., White J. A., Veneer P. K., Van Der Weerden N. L., Anderson M. A., Kvensakul M. & Hulett M. D. (2014).** Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *eLife*, 3: e01808.
90. **Popova V., Gochev V., Girova T., Iliev I., Ivanova T. & Stoyanova A. (2015).** Extraction products from tobacco – aroma and bioactive compounds and activities. *Current bioactive compounds*, 11(1), 31–37.

91. **Popova V., Ivanova T., Stoyanova A., Nikolova V., Hristeva T. & Zheljzakov V. D. (2020).** GC-MS composition and olfactory profile of concretes from the flowers of four *Nicotiana species*. *Molecules*, 25(11), 2617.
92. **Popova V., Tumbarski Y., Ivanova T., Hadjikinova R. & Stoyanova A. (2019).** Tobacco resinoid (*Nicotiana tabacum* L.) as an active ingredient of cosmetic gels. *Journal of applied pharmaceutical science*, 9(9), 111–118.
93. **Purwono S., Murachman B., Wintoko J., Simanjuntak B. A., Sejati P. P., Permatasari N. E. & Lidyawati D. (2006).** The effect of solvent for extraction for removing nicotine on the development of charcoal briquette from waste of tobacco stem. *Journal of sustainable energy & environment*, 2, 11–13.
94. **Richardson P. M. & Harborne J. B. (1990).** *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Springer, Brittonia, 42(2), 115.
95. **Rincón J., De Lucas, A., García M. A., García A., Alvarez A. & Carnicer A. (1998).** Preliminary study on the supercritical carbon dioxide extraction of nicotine from tobacco wastes. *Separation science and technology*, 33(3), 411–423.
96. **Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P. & Glover W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401–436.
97. **Rodgman A. & Perfetti T. A. (2016).** *The chemical components of tobacco and tobacco smoke*, (2nd ed.), CRC Press, Boca Raton, 561-673.
98. **Rostagno M. A., Palma M. & Barroso C. G. (2003).** Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of chromatography A*, 1012(2), 119–128.
99. **Rowland D. H. (2010).** *The Filamentous fungi. The microbial models of molecular biology: from genes to genomes*, Oxford Academic, New York, (16) 216–228.
100. **Ruiz-Rodriguez A., Bronze M. R. & Ponte M. N. (2008).** Supercritical fluid extraction of tobacco leaves: A preliminary study on the extraction of solanesol. *Journal of supercritical fluids*, 45(2), 171–176.
101. **Rutkowska M., Namiesnik J. & Konieczka P. (2017).** Ultrasound-assisted extraction. Pena-Pereira F., Tobiszewski M., *The application of green solvents in separation processes*, Elsevier, 301–324.
102. **Sanchez-Ramos J. R. (2020).** The rise and fall of tobacco as a botanical medicine. *Journal of herbal medicine*, 22: 100374.
103. **Sarker U. & Oba S. (2018a).** Drought stress effects on growth, ROS markers, compatible solutes, phenolics, flavonoids, and antioxidant activity in *amaranthus tricolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186(4), 999–1016.



104. **Sarker U. & Oba S. (2018b).** Response of nutrients, minerals, antioxidant leaf pigments, vitamins, polyphenol, flavonoid and antioxidant activity in selected vegetable *Amaranth* under four soil water content. *Food chemistry*, 252, 72–83.
105. **Sarker U. & Oba S. (2018c).** Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus* leafy vegetable. *BMC plant biology*, 18(1), 258.
106. **Sarker U. & Oba S. (2018d).** Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports*, 8(1).
107. **Sarker U., Islam M. T., Rabbani M. G. & Oba S. (2018e).** Phenotypic divergence in vegetable *Amaranth* for total antioxidant capacity, antioxidant profile, dietary fiber, nutritional and agronomic traits. *Acta agriculturae Scandinavica section B: soil and plant science*, 68(1), 67–76.
108. **Sarker U. & Oba S. (2019a).** Salinity stress enhances color parameters, bioactive leaf pigments, vitamins, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus* leafy vegetables. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(5), 2275–2284.
109. **Sarker U., Islam M. T. & Oba S. (2019b).** Salinity stress accelerates nutrients, dietary fiber, minerals, phytochemicals and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor* leaves. *PLoS ONE*, 13(11): e0206388.
110. **Sarker U. & Oba S. (2019c).** Nutraceuticals, antioxidant pigments, and phytochemicals in the leaves of *Amaranthus spinosus* and *Amaranthus viridis* weedy species. *Scientific reports*, 9(1): 20413.
111. **Schneider T. & Sahl H. G. (2010).** An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International journal of medical microbiology*, 300(2–3), 161–169.
112. **Schweitzer P. A. (1997).** Leaching. *Handbook of separation techniques for chemical engineers*, McGraw-Hill, New York, 535-643.
113. **Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M. & Zheng B. (2019).** Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13): 2452.
114. **Sharma Y., Dua D., Anshita N. & Srivastava N. S. (2016).** Antibacterial activity, phytochemical screening and antioxidant activity of stem of *Nicotiana Tabacum*. *Int J Pharm sci res*, 7(3), 1156–1167.
115. **Shen J. & Shao X. (2006).** Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography-mass spectrometry using cloud point extraction as a preconcentration step. *Analytica chimica acta*, 561(1–2), 83–87.

116. **Sierro N., Battey J. N. D., Bovet L., Liedschulte V., Ouadi S., Thomas J., Broye H., Laparra H., Vuarnoz A., Lang G., Goepfert S., Peitsch M. C. & Ivanov N. V. (2018).** The impact of genome evolution on the allotetraploid *Nicotiana rustica*- an intriguing story of enhanced alkaloid production. *BMC Genomics*, 19(1).
117. **Singleton V. L. & Rossi J. A. Jr. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture*, 16(3), 144–158.
118. **Sisson V. & Severson R. (1990).** Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. *Beiträge zur Tabakforschung International, Contributions to tobacco research*, 14(6), 327–339.
119. **Slika 2.** <https://bg.imadeself.com/wp-content/uploads/suhaya-kornevaya-gnil.jpg>
120. **Slika 4.** <https://www.seeds-gallery.shop/sr/pocetak/duvan-seme-samsoun-orient.html>
121. **Slika 5.** <https://www.plantea.com.hr/pravi-duhan/>
122. **Slika 6.** <https://i2.wp.com/dachnaya-zhizn.ru/images/dacha/m4.jpg>
123. **Slika 16.** <https://chembam.com/definitions/soxhlet-extractor/>
124. **Slika 18.** <https://www.innventa-pharm.com/wp-content/uploads/2016/12/6.png>
125. **Slika 19.** <http://prirodnilek.com/wp-content/uploads/2015/02/free-radicals.jpg>
126. **Slika 20.** <http://www.activehydrogenproducts.com/wp-content/uploads/2016/09/H2-napada-Slobodni-radikal.jpg>
127. **Stanisavljević I. T., Lazić M. L. & Veljković V. B. (2007).** Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry*, 14(5), 646–652.
128. **Stanković J. (2019).** Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih vrsta lubenica i dinja, Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš
129. **Taiz L. & Zeiger E. (2006).** Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology*, Sinauer associates, Inc., Sunderland, 283–308.
130. **Talib W. H. & Mahasneh A. M. (2010).** Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*, 15(3), 1811–1824.
131. **Tang D. S., Zhang L., Chen H. L., Liang Y. R., Lu J. L., Liang H. L. & Zheng X. Q. (2007).** Extraction and purification of solanesol from tobacco (I). Extraction and silica gel column chromatography separation of solanesol. *Separation and purification technology*, 56(3), 291–295.

132. **Tasić S. (2006).** Korišćenje duvanske prašine za dobijanje ekološki podobnih proizvoda, Master rad, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.
133. **Tayoub G., Sulaiman H. & Alorfi M. (2015).** Determination of nicotine levels in the leaves of some *Nicotiana tabacum* varieties cultivated in Syria . *Herba Polonica*, 61(4), 23–30.
134. **Tenover F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of medicine*, 119(6), 3-10.
135. **Tezuka T., Kuboyama T., Matsuda T. & Marubashi W. (2010).** Seven of eight species in *Nicotiana* section *Suaveolentes* have common factors leading to hybrid lethality in crosses with *Nicotiana tabacum*. *Annals of botany*, 106(2), 267–276.
136. **Tobacco production worldwide from 1990 to 2019.** (bez dat.). <https://www.statista.com/statistics/261189/global-tobacco-production-since-1980/>
137. **Troje Z. Š., Frobe Z. & Perović D. (1997).** Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco extract. *Journal of chromatography A*, 775(1–2), 101–107.
138. **Tzia C. & Liadakis G. (2003).** Extraction optimization in food engineering, (1st ed.). CRC Press, Boca Raton, 35–55.
139. **Ujang Z. B., Subramaniam T., Diah M. M., Wahid H. B., Abdullah B. B., Rashid A. H. B. A. & Appleton D. (2013).** Bioguided fractionation and purification of natural bioactives obtained from *Alpinia conchigera* water extract with melanin inhibition activity. *Journal of biomaterials and nanobiotechnology*, 4(3), 265–272.
140. **Ullah H. & Khan H. (2020).** Epigenetic drug development for autoimmune and inflammatory diseases. *Histone modifications in therapy*, 395–413
141. **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1–40.
142. **Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J. & Telser J. (2004).** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1–2), 37–56.
143. **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M. & Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International journal of biochemistry and cell biology*, 39(1), 44–84.
144. **Valko M., Morris H. & Cronin M.T. (2005).** Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161–1208.
145. **Veggi P. C., Martinez J. & Meireles M. A. A. (2013).** Fundamentals of microwave extraction. *Food engineering series*, Springer Nature, Switzerland AG 15–52.

146. **Vinatoru M. (2001).** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303–313.
147. **Vitković A. (2017).** Odredjivanje antioksidativnih karakteristika odabranih gljiva roda *Lactarius*, Master rad, Prorodno matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš
148. **Vuković M., Čosić I., Kolačko K. & Briški F. (2012).** Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 61(9–10), 417–425.
149. **Wakeman R. (1994).** Extraction (liquid–solid). Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, John Wiley & Sons, 181–195.
150. **Walch C. (2000).** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406, 775–781.
151. **Wang Y. & Gu W. (2018).** Study on supercritical fluid extraction of solanesol from industrial tobacco waste. *Journal of supercritical fluids*, 138, 228–237.
152. **Wu M., Luo Q., Nie R., Yang X., Tang Z. & Chen H. (2021).** Potential implications of polyphenols on aging considering oxidative stress, inflammation, autophagy, and gut microbiota. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(13), 2175–2193.
153. **Xiao L. (2015).** Anti-jamming transmissions in cognitive radio networks. Springer international publishing, 1, 1-86
154. **Yan N., Liu Y., Gong D., Du Y., Zhang H. & Zhang Z. (2015).** Solanesol: a review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. *Phytochemistry reviews*, 14(3), 403–417.
155. **Yang L., Wang H., Zu Y., Zhao C., Zhang L., Chen X. & Zhang Z. (2011).** Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions. *Chemical engineering journal*, 172(2–3), 705–712.
156. **Yiannakopoulou E. C. (2013).** Targeting oxidative stress response by green tea polyphenols: clinical implications. *Free Radical Research*, 47(9), 667–671.
157. **Zeng J., Chen K., Xie J., Xu G., Li J., Rao G., Yang F. & Gao W. (2012).** Study on tobacco stem and tobacco dust making reconstituted tobacco paper- base. *Advanced materials research*, 550–553, 3316–3322.
158. **Zou X., Bk A., Rauf A., Saeed M., Al-Awthyan Y. S., Al-Duais M. A., Bahattab O., Hamayoon Khan M. & Suleria H. A. R. (2021).** Screening of polyphenols in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and determination of their antioxidant activity in different tobacco varieties. *ACS Omega*, 6(39), 25361–25371.

159. **Zu G., Zhang R., Yang L., Ma C., Zu Y., Wang W. & Zhao C. (2012).** Ultrasound-assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. International journal of molecular sciences, 13(9), 11027-11043.
160. **Zuo X., Tian C., Zhao N., Ren W., Meng Y., Jin X., Zhang Y., Ding S., Ying C. & Ye X. (2014).** Tea polyphenols alleviate high fat and high glucose-induced endothelial hyperpermeability by attenuating ROS production via NADPH oxidase pathway. BMC Research Notes, 7(1): 120.
161. **Zygler A., Słominska M. & Namiesnik J. (2012).** Soxhlet extraction and new developments such as Soxtec. Pawliszyn J., Comprehensive sampling and sample preparation, Analytical techniques for scientists, 2, Theory of extraction techniques, 65–82.