

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Marija D. Pavlović

**IZOLOVANJE BIOAKTIVNIH JEDINJENJA
IZ OTPADNE KAFE I NJENO POTPUNO
ISKORIŠĆENJE KAO ADSORBENTA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Marija D. Pavlović

**THE ISOLATION OF BIOACTIVE
COMPOUNDS FROM SPENT COFFEE
GROUNDS AND ITS COMPLETE
UTILIZATION AS AN ADSORBENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Suzana Dimitrijević –Branković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Dušan Antonović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Jovan Nedeljković, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, profesorki dr Slavici Šiler-Marinković, na strpljivom i pažljivom usmeravanju u radu i velikoj pomoći i podršci tokom izrade ove disertacije, što je za mene od neprocenjivog značaja.

Podjednako se zahvaljujem profesorki dr Suzani Dimitrijević-Branković koja je nesebično uložila svoje znanje, iskustvo i vreme i angažovala se u svim fazama rada. Bez njenih dragocenih stručnih i životnih saveta rad na ovoj tezi ne bi bio tako prijatno iskustvo.

Veliko hvala profesorima dr Dušanu Antonoviću i dr Jovanu Nedeljkoviću na diskusijama i korisnim sugestijama koji su doprineli kvalitetnijem istraživanju i oblikovanju ovog rada. Bilo je zadovoljstvo sarađivati sa njima.

Svim prijateljima i kolegama sa katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologije, a posebno Aneti Buntić, želim da se zahvalim na bezuslovnoj pomoći u radu.

Zahvaljujem se Ministarstvu nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koji su finansirali moj rad na doktorskoj tezi.

Od sveg srca zahvaljujem se mom Vladi i njegovoj porodici na neizrecivoj ljubavi i razumevanju.

Posebno se zahvaljujem svojoj porodici, bratu Marku na konkretnom doprinosu u prevazilaženju tehničkih nedostataka, a mami Svetlani i tati Draganu na beskrajnoj veri, ljubavi i podršci na putu ka ostvarenju ovog cilja. Njima u čast je od srca posvećena ova doktorska disertacija.

Najlepše vam hvala!

Izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz otpadne kafe i njeno potpuno iskorišćenje kao adsorbenta

Rezime

Predmet ove disertacije je valorizacija otpadne kafe zaostale nakon pripreme napitaka i razmatranje mogućnosti njene praktične primene.

Kafa i njeni produkti, već godinama unazad, se smatraju nutritivno bogatim, usled prisustva bioaktivnih jedinjenja sa izrazitim antioksidativnim potencijalom. Antioksidativni kapacitet kafe pripisuje se, u najvećoj meri, visokom sadržaju jedinjenja koja pripadaju grupi polifenola. Njihova koncentracija u sirovim zrnima varira u zavisnosti od vrste, porekla i uslova gajenja, a u pečenoj kafi od načina obrade i termičkog tretmana. Glavna polifenolna komponenta u kafi je hlorogenska kiselina, koja putem ove sirovine predstavlja i najznačajniji hranljivi izvor za čoveka. Izolovanjem ovih jedinjenja, otvara se mogućnost zamene sintetičkih aditiva u hrani sastojcima prirodnog porekla. Dobijeni ekstrakti se mogu inkorporirati u hranu i/ili farmaceutske proizvode sa ciljem povećanja njihove nutritivne vrednosti i stabilnosti. Mogu, takođe, biti i sastojci nove funkcionalne hrane.

Kafa zaostala nakon ekstrakcije bioaktivnih sastojaka se može, dalje, koristiti kao adsorbent. U literaturi je zabeležen širok spektar mogućnosti adsorbovanja raznih vrsta adsorbata na materijal poreklom od otpadnih sirovina iz procesa prerade kafe. Mogu se koristiti u nativnom stanju, što je ekonomski isplativije, ali je ostvareni kapacitet adsorbenta relativno mali. Da bi se povećala adsorptivnost, kafa se aktivira termički ili korišćenjem oksidacionih sredstava. Kafa kao adsorbent može naći svoju primenu u brojnim procesima, pre svega u prečišćavanju otpadnih voda.

U skladu sa prethodno zabeleženim, cilj ove disertacije je da se iz otpadne kafe izoluju bioaktivne komponente i iskoriste kao aditivi hrani, a ostatak upotrebi kao adsorbent za toksične komponente iz otpadnih voda. S tim u vezi, istraživanja u ovom radu su podeljena na dva dela.

U prvom delu rada ispitan je sastav otpadne kafe i proces proizvodnje ekstrakta otpadne kafe sa definisanim sadržajem i antioksidativnim svojstvima. U te svrhe korišćena je

metoda klasične ekstrakcije polarnim rastvaračem i ekstrakcija potpomognuta delovanjem mikrotalasa. Sastav dobijenih ekstrakata praćen je određivanjem sadržaja ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline i merenjem antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom.

U drugom delu je talog od kafe, zaostao nakon ekstrakcije polifenola, aktiviran mikrotalasima i korišćen kao adsorbent. Određene su površinske karakteristike aktivirane kafe i razmatran je predlog njene primene za potrebe adsorpcije boje, i/ili pesticida i/ili polifenola iz kontaminiranih otpadnih voda. S tim u vezi, definisan je kapacitet vezivanja ovih vrsta adsorbata, tok reakcija i postizanje ravnoteže, a zatim i adsorpciona kinetika i izoterme. Za određivanje odgovarajućih kinetičkih i ravnotežnih parametara ispitivano je slaganje eksperimentalnih rezultata sa najpoznatijim teorijskim modelima.

Za optimizaciju uslova za potpuno iskorišćenje otpadne kafe korišćena je statistička metoda odzivne površine, primenom *Design Expert* softvera.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, pronađeno je da se razvijena metoda mikrotalasne ekstrakcije može smatrati pogodnim izborom za potrebe izolovanja ekonomski isplativih količina bioaktivnih komponenata iz otpadne kafe. Mikrotalasnom ekstrakcijom antioksidanasa iz otpadne kafe postignut je viši prinos ekstrakata, za kraće vreme i upotrebu manje količine rastvarača, u odnosu na metodu klasične ekstrakcije. Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe bili su: snaga mikrotalasne peći 80 W, koncentracija rastvarača 20 % etanol, odnos čvrsta faza/rastvarač 1:9, vreme trajanja ekstrakcije 40 s. Dobijeni ekstrakt poseduje antioksidativna svojstva dovoljna da se može koristiti kao aditiv hrani i/ili farmaceutskim proizvodima.

Sledeći predlog je da se talog kafe, zaostao nakon ekstrakcije polifenola, aktiviran po predloženom postupku, može najefikasnije primeniti za adsorpciju katjonskih boja iz otpadnih voda. Uspostavljanje ravnotežnog stanja prilikom adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu odigralo se u toku prvih 5 minuta trajanja reakcije, dok se adsorpcija pesticida parakvata ili polifenola epigalokatehin galata odigravala nešto sporije. Pored toga,

vrednosti adsorpcionog kapaciteta i procenta uklonjene boje iz rastvora, bile su veće u odnosu na ostale dve vrste model supstanci. Pod optimizovanim uslovima, maksimalni adsorpcioni kapacitet boje kristal violet na aktiviranu kafu iznosio je 36.11 mg/g, a maksimalna količina uklonjene boje iz rastvora 96.90 %.

Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u mogućnosti praktične primene otpadne kafe, kao polaznog prekursora u okviru dve aktuelne oblasti: za proizvodnju ekstrakata sa antioksidativnim potencijalom, sa jedne strane, i adsorbenata za potrebe adsorpcije zagađivača iz otpadnih voda, sa druge strane.

Ključne reči: otpadna kafa, antioksidansi, ekstrakcija, adsorpcija, kristal violet, parakvat, epigalokatehin galat, kinetika, izoterme.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK: 678.048:628.477:641.87:661.183

The isolation of bioactive compounds from spent coffee grounds and its complete utilization as an adsorbent

Abstract

This thesis explores the valorization of spent coffee grounds, the solid waste remained after coffee beverage preparation, thus considering the possibility of its practical application.

Coffee and its products are considered to be nutritionally rich, due to the presence of bioactive compounds with distinctive antioxidant potential. The antioxidant capacity of coffee is mainly attributed to the high content of compounds belonging to the group of polyphenols. Their concentration in the raw grains varies depending on the type, origin and growing conditions, whereas in roasted coffee by means of processing and heat treatment. The main polyphenol component in coffee is chlorogenic acid; wherein, coffee represents a major source of chlorogenic acid in the human diet. By isolating of these compounds, there is the great possibility of replacing synthetic additives in food ingredients with ones of natural origin. The obtained extracts may be incorporated into food and/or pharmaceutical products in order to increase their nutritional value and stability, or may also be the ingredients of new functional foods.

After polyphenols extraction the coffee residues still may have practical value and can be used as an adsorbent. The literature reports have shown a wide range of possibilities for the adsorption of various types of adsorbates onto material derived from coffee processing solid waste. The material may be used in a native state, providing an economically profitable application, but, on the other hand, the actual capacity of the adsorbent may be relatively small. With this regard, the coffee material may be activated thermally or by treatment with oxidizing agents. Coffee as an adsorbent may be employed in a variety of processes, primarily based on wastewater treatments.

In accordance with previously noted, the aim of this thesis was the isolation of bioactive components from spent coffee grounds, these may be used as food additives, and

the remained solid residues may be further used as an adsorbent for toxic compounds from waste water. Thus, the research in this work had been divided into two distinctive parts.

In the first part the composition of the spent coffee grounds as well as extraction process for obtaining of extracts with defined content and antioxidant properties have been examined. For this purpose, the method of conventional polar solvent extraction and microwave-assisted extraction have been employed. The composition of obtained extracts has been analyzed by determination of total polyphenols and chlorogenic acid content and by measuring the antioxidant activity using DPPH and FRAP assay.

Further, in the second part, the coffee residues, left after polyphenols extraction, have been activated with the assistance of microwaves and have been examined as an adsorbent. The surface properties of activated coffee have been determined and the suggestion of its application for the purpose of adsorption of dye, and/or pesticides and/or polyphenols from contaminated wastewater has been considered. Therefore, the adsorption capacity of these types of adsorbates has been evaluated, as well as reaction rate and equilibrium attainment, followed by kinetic and isotherm analysis. Determination of the appropriate kinetic and equilibrium parameters has been explored through the agreement between the experimental results with the most commonly used theoretical models.

The statistical response surface method has been employed to optimize the conditions for spent coffee grounds utilization, using Design Expert software.

Based on experimental data and a detailed literature review, it was found that the developed microwave-assisted extraction method may be considered as a suitable application for isolating of economically recoverable quantities of bioactive compounds from spent coffee grounds. The microwave-assisted extraction of antioxidants from the spent coffee grounds provided a higher dry extract yield, for the shorter period of time and by using less quantity of solvent in comparison to conventional methods of extraction. The optimum conditions of microwave-assisted extraction of antioxidants from spent coffee grounds were the following: microwave power of 80 W, 20% ethanol of solvent concentration, the solid/liquid ratio 1: 9 and duration period of 40 s. The resulting extract

expressed antioxidant properties high enough to be used as a food additive and/or pharmaceutical products.

The next proposal is the activation of coffee residues, left after polyphenols extraction, (by properly proposed procedure), and its exploitation for the adsorption of cationic dyes from wastewater. The equilibrium establishment of crystal violet onto activated coffee has been completed during the first 5 minutes of reaction, while the adsorption of pesticides paraquat or polyphenol epigallocatechingallate occurred more slowly. In addition, the adsorption capacity values as well as the percentage of dye removal from the solution, were much higher compared to the other two types of model substances. Under the optimized conditions, the maximum adsorption capacity of crystal violet dye onto activated coffee was 36.11 mg/g, and the maximum percent of dye removed from the solution was 96.90 %.

The scientific contribution of this thesis lies in the possibility of the spent coffee grounds practical application, as potential starting precursors within two core areas: the production of extracts with antioxidant potential, and on the other hand, the preparation of adsorbents for the purpose of contaminant reduction from wastewater systems.

Keywords: spent coffee grounds, antioxidants, extraction, adsorption, crystal violet, paraquat, epigallocatechingallate, kinetics, isotherms

Scientific area: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDC: 678.048:628.477:641.87:661.183

SADRŽAJ

UVOD	1
TEORIJSKI DEO	3
1. KAFA	3
1.1.Poreklo kafe	3
1.2.Uzgoj kafe	3
1.3.Sistematika kafe	7
1.4.Svetska proizvodnja kafe i izvoz	7
1.5.Obrada ploda kafe	9
1.5.1. Primarna obrada kafe	9
1.5.1.1.Vlažna metoda prerade zrna	10
1.5.1.2.Suva metoda prerade zrna	10
1.5.2. Sekundarna obrada kafe	11
1.5.3. Tercijarna obrada kafe	12
1.6.Sastav zrna kafe	12
1.6.1. Uticaj pečenja na fizičko-hemijske promene u zrnu kafe	15
1.7.Kafa kao napitak (priprema kafe za konzumiranje)	16
1.8.Nus-proizvodi od prerade kafe	17
1.8.1. Kožica i pulpa	18
1.8.2. Gumarabika	19
1.8.3. Pergament	19
1.8.4. Srebrna opna	19
1.8.5. Oštećena zrna zelene kafe	19
1.8.6. Otpadna kafa	19
1.9.Primena i iskorišćenje nus-proizvoda od kafe	20
1.9.1. Ljuspice (kožica, pulpa, gumarabika i pergament)	21
1.9.2. Srebrna opna	21
1.9.3. Otpadna kafa	21
1.9.4. Niskorazredna (oštećena) zrna kafe	22

1.10. Fiziološko delovanje kafe	22
2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	25
2.1.Slobodni radikali	25
2.1.1. Vrste slobodnih radikala	26
2.1.2. Delovanje slobodnih radikala	27
2.2.Antioksidansi	29
2.2.1. Vrste antioksidanasa	29
2.2.2. Antioksidansi u hrani	32
3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST KAFE	34
3.1.Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti kafe	35
3.2.Primeri istraživanja antioksidativne aktivnosti različitih vrsta i produkata kafe	37
4. EKSTRAKCIJA POLIFENOLA I DRUGIH ANTIOKSIDANASA	40
4.1.Mikrotlasna ekstrakcija	41
5. ADSORPCIJA	43
5.1.Osnovni principi	44
5.1.1. Izbor materijala – adsorbenta	45
5.1.1.1.Komercijalni adsorbenti	45
5.1.1.1.1. Aktivni ugalj	45
5.1.1.1.2. Zeolit	46
5.1.1.1.3. Silika gelovi	47
5.1.1.1.4. Sintetske smole	47
5.1.1.2.Alternativni adsorbenti	48
5.1.1.2.1. Adsorbenti od otpadnih materijala agroindustrije	48
5.1.1.2.2. Industrijski i gradski otpad kao adsorbenti	50
5.1.1.2.3. Biomasa (živa i neživa) kao adsorbent	52
5.1.2. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenata	53
5.1.2.1.Raspodela čestica	53
5.1.2.2.Unutrašnja površina	53
5.1.2.3.Gustina	53

5.1.2.4. Poroznost	54
5.1.2.5. Raspodela prečnika pora	54
5.1.3. Tehnike određivanja fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenata	54
5.1.3.1. Određivanje specifične površine i zapremine pora	55
5.1.3.2. Analize elemenata i udela u strukturi	56
5.1.3.3. Karakterizacija površine adsorbenta	56
5.1.3.3.1. Oksidovane površinske grupe	56
5.1.3.3.2. Kisela i bazna mesta na površini	56
5.1.3.3.3. Tačka nultog naelektrisanja (pH_{pzc})	56
5.1.3.3.4. Infracrvena spektroskopija	57
5.1.3.3.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija – SEM	57
5.1.3.4. Merenje gustine	57
5.1.3.5. Određivanje nivoa aktivacije adsorbenta	58
5.2. Izražavanje efikasnosti procesa adsorpcije	58
5.2.1. Adsorpcioni kapacitet	58
5.2.2. Količina adsorbovane materije	58
5.3. Adsorpcione tehnike	58
5.3.1. Adsorpcija u reaktoru sa mešanjem	59
5.3.2. Adsorpcija u koloni sa nepokretnom čvrstom fazom	60
5.3.3. Adsorpcija u koloni sa pokretnom čvrstom fazom	60
5.4. Uvećanje razmera adsorpcionih sistema	61
5.5. Mehanizam i kinetika adsorpcije	61
5.5.1. Kinetika u šaržnom sistemu	63
5.5.1.1. Adsorpcioni model pseudo-prvog reda	63
5.5.1.2. Adsorpcioni model pseudo-drugog reda	64
5.5.2. Kinetika u koloni	66
5.6. Termodinamika procesa adsorpcije	67
5.7. Adsorpciona ravnoteža i izoterme	67
5.7.1. Izoterme koje opisuju jednokomponentne sisteme	68
5.7.1.1. Izoterme sa jednim parametrom	68

5.7.1.2. Izoterme sa dva parametra	68
5.7.2. <i>Izoterme koje opisuju adsorpciju iz smeša</i>	71
5.8. Primena procesa adsorpcije	71
5.8.1. <i>Prečišćavanje pijaćih i otpadnih voda</i>	72
5.8.1.1. Zagađenje životne sredine bojama	72
5.8.1.2. Zagađenje životne sredine pesticidima	74
5.8.2. <i>Proizvodnja hrane i pića</i>	75
5.8.3. <i>Izdvajanje bio- i tehno-funkcionalnih jedinjenja iz nus-proizvoda prehrambene industrije</i>	75
5.8.3.1. Izdvajanje polifenola	76
6. KAFA KAO ADSORBENT	78
6.1. Aktivacija kafe	78
6.2. Primeri istraživanja svojstava adsorbenata poreklom od kafe	80
7. PLANIRANJE I OPTIMIZACIJA PROCESA	82
7.1. Metodologija odzivne površine	82
7.2. Dizajni za fitovanje modela polinoma prvog reda	85
7.3. Dizajni za fitovanje modela polinoma drugog reda	85
7.4. Razvojna operacija	86
CILJ RADA	88
EKSPERIMENTALNI DEO	89
8. MATERIJAL I OPREMA	89
9. METODE	91
9.1. Metode za pripremu uzoraka	91
9.1.1. <i>Priprema kafe za ekstrakciju polifenola sa antioksidativnom aktivnošću</i>	91
9.1.2. <i>Priprema adsorbenta – otpadne kafe iz koje su ekstrahovani antioksidansi</i>	91
9.1.3. <i>Priprema nosača – aktivirane kafe za adsorpciju polifenola u kontinualnom režimu</i>	91
9.1.4. <i>Priprema adsorbata</i>	92

9.1.4.1.Priprema vodenog rastvora boje	92
9.1.4.2.Priprema vodenog rastvora pesticida	92
9.1.4.3.Priprema vodenog rastvora polifenola	93
9.2.Analitičke metode	93
9.2.1. Određivanje hemijskog sastava otpadne kafe	93
9.2.1.1.Suva materija	93
9.2.1.2.Masti	94
9.2.1.3.Kofein	95
9.2.1.4.Ukupni polifenoli	96
9.2.1.5.Hlorogenska kiselina	97
9.2.2. Ekstrakcija antioksidanasa iz otpadne kafe	98
9.2.2.1.Klasična ekstrakcija polarnim rastvaračem	98
9.2.2.2.Mikrotalasna ekstrakcija	99
9.2.3. Karakterizacija ekstrakata sa antioksidansima	99
9.2.3.1.Prinos ekstrakcije	99
9.2.3.2.Određivanje antioksidativne aktivnosti	100
9.2.3.2.1. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	100
9.2.3.2.2. FRAP metoda	101
9.2.4. Adsorpcija zagađivača vode na otpadnu kafu iz koje su ekstrahovani antioksidansi	102
9.2.4.1.Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenta	102
9.2.4.1.1. Određivanje površinskih funkcionalnih grupa korišćenjem FTIR tehnike	102
9.2.4.1.2. Određivanje površinskog naelektrisanja pomoću tačke pH_{pzc}	103
9.2.4.1.3. Vizualizacija površinske strukture korišćenjem tehnike SEM	103
9.2.4.2.Postupak procesa adsorpcije	104
9.2.4.2.1. Adsorpcija u šaržnom režimu	104
9.2.4.2.2. Adsorpcija u kontinualnom režimu	104
9.2.4.3.Kinetika i mehanizam procesa adsorpcije	105
9.2.4.4.Adsorpciona ravnoteža i izoterme	106

10. REZULTATI I DISKUSIJA	109
10.1. Hemijski sastav otpadne kafe	109
10.2. Ekstrakcija antioksidanasa iz otpadne kafe	112
<i>10.2.1. Prinos ekstrakcije</i>	<i>112</i>
<i>10.2.2. Sadržaj ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline u ekstraktima</i>	<i>114</i>
<i>10.2.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata</i>	<i>116</i>
<i>10.2.3.1. Metoda neutralizacije DPPH radikala</i>	<i>116</i>
<i>10.2.3.2. FRAP metoda</i>	<i>119</i>
10.3. Optimizacija postupka mikrotalasne ekstrakcije	121
<i>10.3.1. Eksperimentalni dizajn modela I</i>	<i>121</i>
<i>10.3.1.1. Ocena značajnosti modela I</i>	<i>122</i>
<i>10.3.1.2. Uticaj procesnih promenljivih na prinos ekstrakcije</i>	<i>126</i>
<i>10.3.1.3. Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola</i>	<i>127</i>
<i>10.3.1.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata otpadne kafe</i>	<i>129</i>
<i>10.3.2. Eksperimentalni dizajn modela II</i>	<i>131</i>
<i>10.3.2.1. Ocena značajnosti modela II</i>	<i>131</i>
<i>10.3.2.2. Uticaj procesnih promenljivih na prinos ekstrakcije</i>	<i>135</i>
<i>10.3.2.3. Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola</i>	<i>136</i>
<i>10.3.2.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata otpadne kafe</i>	<i>139</i>
10.4. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenta-otpadne kafe iz koje su ekstrahovani antioksidansi	142
<i>10.4.1. Analiza površinskih funkcionalnih grupa</i>	<i>143</i>
<i>10.4.2. Naelektrisanje površine</i>	<i>144</i>
<i>10.4.3. Prikaz izgleda i strukture aktivne površine</i>	<i>145</i>
10.5. Adsorpcija katjonske boje kristal violet na aktiviranu kafu	146
<i>10.5.1. FTIR analiza</i>	<i>146</i>
<i>10.5.2. Tok reakcije i ravnotežni uslovi</i>	<i>148</i>
<i>10.5.3. Adsorpciona kinetika</i>	<i>149</i>
<i>10.5.4. Adsorpcione izoteme</i>	<i>153</i>
<i>10.5.5. Optimizacija postupka adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu</i>	

kafu	155
10.5.5.1. Eksperimentalni dizajn	155
10.5.5.2. Ocena značajnosti modela	156
10.5.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet	160
10.5.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjene boje iz rastvora	163
10.6. Adsorpcija pesticida parakvata na aktiviranu kafu	165
10.6.1. FTIR analiza	166
10.6.2. Tok reakcije i ravnotežni uslovi	167
10.6.3. Adsorpciona kinetika	168
10.6.4. Adsorpcione izoteme	171
10.6.5. Optimizacija postupka adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu	173
10.6.5.1. Eksperimentalni dizajn	173
10.6.5.2. Ocena značajnosti modela	174
10.6.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet	178
10.6.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjenog pesticida iz rastvora	180
10.7. Adsorpcija polifenola epigalokatehin galata na aktiviranu kafu .	182
10.7.1. FTIR analiza	182
10.7.2. Tok reakcije i ravnotežni uslovi	183
10.7.3. Adsorpciona kinetika	184
10.7.4. Adsorpcione izoteme	187
10.7.5. Optimizacija postupka adsorpcije polifenola epigalokatehin galata na aktiviranu kafu	188
10.7.5.1. Eksperimentalni dizajn	189
10.7.5.2. Ocena značajnosti modela	189
10.7.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na uklanjanje polifenola iz rastvora ..	192
10.7.6. Desorpcija polifenola sa nosača i ispitivanje promene bioaktivnosti	195
10.7.7. Ispitivanje svojstva selektivnosti	197

11. ZAKLJUČAK	199
LITERATURA	202
PRILOG 1: Standardne krive	228
PRILOG 2: Optimizacija: vrednosti procesnih promenljivih i odziva	235
PRILOG 3: Spisak termina i definicije pojmova korišćenih u disertaciji	240
PRILOG 4: Spisak skraćenica korišćenih u disertaciji	241
Biografija	243

UVOD

Kafa je napitak prijatnog ukusa i specifične arome koji je deo naše svakodnevnice. Potiče od višegodišnje zimzelene biljke koja se gaji u više desetina zemalja sa, pretežno, tropskom i subtropskom klimom. Ekonomski značaj kafe na svetskom tržištu ne može biti precenjen. Gajenje, prerada, trgovina, transport i marketing kafe obezbeđuju zaposlenje milionima ljudi širom planete. Kafa je od ključnog značaja za ekonomiju i prosperitet mnogih zemalja u razvoju, s obzirom da za njih predstavlja najvažniji izvozni proizvod [1]. Uprkos finansijskoj krizi, istraživanja su pokazala da se potrošači retko odriču kafe, već se umesto one visokog kvaliteta, lakše opredeljuju za kafu srednjeg kvaliteta [1]. S tim u vezi, nivo svetske proizvodnje i izvoza kafe na naše prostore beleži stalan rast [1,2].

Sa povećanim nivoom proizvodnje i industrijske prerade kafe nastaju proporcionalno veće količine nus-proizvoda, nastale, kako u zemljama proizvođačima, tako i u zemljama potrošačima [3,4]. Nus-proizvodi od kafe su veoma zagađujuće, eko-toksične materije usled prisustva teško razgradivih organskih jedinjenja [1,3,5]. Poslednjih godina javlja se veliki društveni i politički pritisak za postizanjem što većeg procenta recikliranog otpada. Gotovo sve razvijene i nerazvijene zemlje usvajaju sistem vrednosti koji preferira štednju resursa i zaštitu prirodnog okruženja. U tom smislu, veliki broj istraživača i institucija pristupa pronalaženju potencijalnih i profitabilnih načina iskorišćenja različitih vrsta otpadaka od kafe.

Već godinama unazad, kafa i njeni produkti smatraju se nutritivno bogatim, usled prisustva bioaktivnih jedinjenja sa izrazitim antioksidativnim potencijalom [6,7,8,9,10,11]. Antioksidansi se ubrajaju u red odbrambenih mehanizama, koji u biološkim sistemima imaju sposobnost da stabilizuju ravnotežu nesparenih elektrona i neutrališu potencijalno štetno delovanje slobodnih radikala. Time podstiču očuvanje homeostaze u organizmu, sprečavajući oksidativni stres i njime uzrokovano oštećenje ćelija i tkiva - podlogu za razvoj mnoštva bolesti [12]. Antioksidativni potencijal kafe pripisuje se, u najvećoj meri, visokom sadržaju jedinjenja koja pripadaju grupi polifenola. Njihova koncentracija u sirovim zrnima varira u zavisnosti od vrste, porekla i uslova gajenja, a u pečenoj kafi od načina obrade i termičkog tretmana. Glavna polifenolna komponenta u kafi je hlorogenska kiselina, koja putem ove sirovine predstavlja i najznačajniji hranljivi izvor za čoveka. Izolovanjem ovih jedinjenja, otvara se mogućnost zamene sintetičkih aditiva u hrani sastojcima prirodnog porekla. Dobijeni ekstrakti se mogu

inkorporirati u hranu i/ili farmaceutske proizvode sa ciljem povećanja njihove nutritivne vrednosti i stabilnosti. Mogu, takođe, biti i sastojci nove funkcionalne hrane.

Kafa zaostala nakon ekstrakcije bioaktivnih sastojaka se može koristiti kao adsorbent. Proteklih decenija intenzivno je ispitivan spektar mogućnosti adsorbovanja raznih vrsta komponenata na materijal pripremljen od kafe [13,14,15,16,17,18,19,20,21]. Otpaci od kafe se mogu koristiti u nativnom stanju, što je ekonomski isplativije, ali je ostvareni kapacitet adsorbenta relativno mali. Da bi se povećala adsorptivnost, kafa se aktivira termički ili korišćenjem oksidacionih sredstava. Novija tehnika aktiviranja zasniva se na korišćenju mikrotalasa. Kafa kao adsorbent može naći svoju primenu u brojnim procesima, pre svega u prečišćavanju otpadnih voda. Brz razvoj industrijalizacije, širenje populacije i neplanska urbanizacija su doprineli ekspanziji štetnih zagađenja voda i okolnih zemljišta. Glavni izvori zagađenja potiču od odlaganja netretiranog sanitarnog i toksičnog industrijskog otpada, odlivanja industrijskih otpadnih voda i voda koja otiču sa poljoprivrednih površina [22].

Predmet ove doktorske disertacije je valorizacija otpadne kafe, čvrstih neekstrahovanih sastojaka zaostalih nakon pripreme napitaka. Cilj je da se iz nje izoluju bioaktivne komponente i iskoriste kao aditivi hrani, a ostatak upotrebi kao adsorbent za toksične materije iz otpadnih voda. S tim u vezi, istraživanja u ovom radu su podeljena na dva dela. U prvom delu su optimizovani uslovi za ekstrakciju polifenola iz otpadne kafe, metodom klasične ekstrakcije, u sistemu sa polarnim rastvaračem. U cilju poboljšanja prinosa, korišćena je i ekstrakcija potpomognuta delovanjem mikrotalasa. Sastav dobijenih ekstrakata praćen je određivanjem sadržaja ukupnih polifenola i merenjem antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom. Nakon toga, na kafu iz koje su ekstrahovani antioksidansi, ispitivana je mogućnost adsorpcije nekoliko grupa model supstanci, uključujući katjonske boje, pesticide i polifenole. Na osnovu toga, definisan je kapacitet vezivanja ovih adsorbata, kao i odgovarajući kinetički i ravnotežni parametri. Za optimizaciju procesa primenjena je statistička metoda odzivne površine.

TEORIJSKI DEO

1. KAFA

Kafa je čuveni napitak koji se konzumira širom sveta. Gaji se u više desetina zemalja sa, pretežno, tropskom i subtropskom klimom, pri čemu za njih predstavlja i najvažniji izvozni proizvod. Kafa je druga po redu najprometnija roba na svetskom tržištu (odmah posle nafte) [3], a smatra se i da 75 % od ukupnog broja svih vrsta bezalkoholnih pića, koja se svakodnevno konzumiraju, čini, upravo, ova vrsta napitka [23]. Ono što je čini specifičnom, jesu načini pripremanja, koji su svojstveni društvenim navikama i kulturama pojedinačnih zemalja.

1.1. Poreklo kafe

Pradomovina kafe je jugozapadna etiopijska provincija Kafa (*Kaffa*), po kojoj je napitak i dobio ime [1]. Najstariji zapisi u kojima se pominje gajenje kafe datiraju još od 575 godine, ali tek u XVI veku u Persiji, prva zrna kafe bila su pripremljena u funkciji napitka, kakav mi danas poznajemo. Kafu su po Bliskom i Srednjem istoku i Magrebu proširili putnici koji su se vraćali iz Arabije. Arapi su čuvali tajnu uzgajanja i pripremanja kafe, ali su je Indijci ipak uspešno prošvercovali i počeli gajiti u Indiji. Godine 1554./55., prvi put, kafu su u Carigrad donela dvojica Sirijaca. Iz Carigrada je kafa u XVII veku dospela u Mletačku republiku, odakle se proširila Evropom. Nemci, Francuzi i Italijani su tražili način da uzgajaju kafu u svojim kolonijama, a zapravo su Holandani prvi uspeli da je održe u botaničkoj bašti u Amsterdamu, na osnovu čega ona postaje najkonzumiranije piće starog kontinenta i nezabilazna navika svakodnevnice Evropljana. Gradonačelnik Amsterdama je, navodno, dao drvo kafe Francuzima, koji počinju da je uzgajaju na svojim kolonijama. Gajenje kafe je potom otpočelo i u ostalim evropskim kolonijama (Haiti, Jamajka, Kuba, Portoriko). Kafa dospeva i na sever Brazila. Na taj način, tajna Arabljana proširila se širom sveta [1].

1.2. Uzgoj kafe

Drvo kafe zahteva specifičnu, umerenu klimu, bez niskih temperatura i sa obiljem sunčanih dana. Može rasti na nadmorskim visinama i do 2000 m, na različitim vrstama zemljišta i mikroklimatskim uslovima [24]. Regioni u kojima raste kafa nisu koncentrisani u jednom delu sveta, već se nalaze u širokom ekvatorijalnom pojasu sa najpovoljnijom, blagom klimom koja ne

pada ispod 0 °C, u Americi, Africi, Arabiji i Indoneziji. U svetu se gaji na površini od oko 1.070.000 hektara [24].

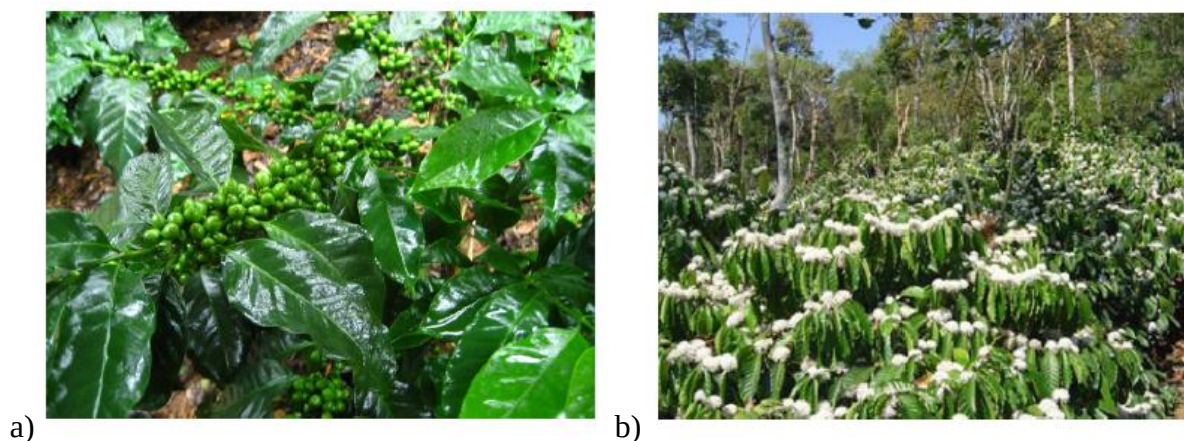
Toplota i vlaga su glavni faktori u uzgoju stabla kafe na dobroj humusnoj zemlji. Kafa raste na plodnom tlu, poželjno vulkanskom. Zahteva debeo sloj zemlje, jer joj se korenje pruža i do dva metra u dubinu [24]. Kafa se razmnožava putem sadnica, reznica ili kalemljenjem. Gustina stabla varira od 1300 do 7000 po hektaru, u zavisnosti od vrste i oblika. Posebno dobri uslovi za uzgajanje kafe su na iskrčenom zemljištu, kao sto je slučaj u Brazilu. Kafa uzgajana u planinskim krajevima se smatra kvalitetnijom od one uzgajane u nizinama. Veće visine povoljno utiču na kvalitet plodova arabike, jer niže temperature i duži period zrenja podstiču postepen razvoj aroma i kiselosti. Drveće kafe ne voli jake vetrove i ne podnosi ekstremne vremenske uslove koji haraju u mnogim zemljama proizvođačima kafe (suša, tornado) [24].

Kafa pripada rodu niskih, višegodišnjih biljaka, koje rastu u grozdovima, s nasuprotnim granama [5,24]. Divlje stabljike kafe mogu dostići visinu od 10 do 12 m, dok stabljike na plantažama dostižu visinu od 3 do 5 m. Ova, relativno, mala visina plantažnih stabljika čini berbu lakšom, a proizvodnju ekonomičnijom.

Grane drveta su raširene i uvek pune duguljastih, jajastih listova, sa talasastim ivicama, naspramno raspoređenim u tročlane pršljenove, na kratkim peteljka (slika 1.1a), koji su u zavisnosti od faze zrelosti, tamnozeleni, svetlozeleni i bronzanožuti. Na drvetu kafe se prvo pojavljuju veoma aromatični, beli cvetovi, nalik ljiljanima, veličinom mali, smešteni u pazuhu lista i rastu u skupinama duž grane (slika 1.1b). Oni se veoma kratko zadržavaju na stablu, oslobađajući miris koji podseća na kombinaciju mirisa jasmína i narandžinog cveta [24]. Iz cvetova nastaju plodovi, koji su svojevrsne crvene bobice, manje ili više tamne, slične trešnjama i po boji i po veličini. U početku procesa sazrevanja ploda, plod je zelene boje, menjajući je zatim u žutu, a na kraju u tamno crvenu. U toj fazi se plod bere. Plod drveta kafe sazreva posle šest do dvanaest meseci i tada u prečniku meri do 15 mm i bude težak oko 0.15 g [24].

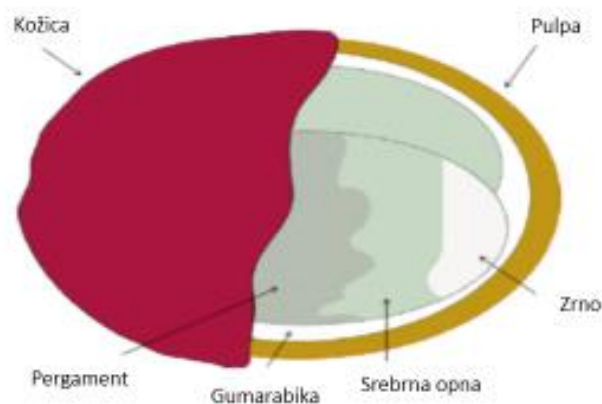
Plod kafe je obavijen spoljašnjom kožicom (egzokarp), sjajnom i debelom, ispod koje se nalazi slatka, mesnata pulpa (mezokarp). U pulpi se nalaze još tri sloja koja pokrivaju zrno zbog zaštite. Prvi je providni, bezbojni, tanki, viskozni i veoma hidrantni sloj gumarabike, koji se naziva i pektinski sloj. Zatim je tanki žućkasti endokarp, nazvan pergament i na kraju se nalazi

srebrna opna koja pokriva obe hemisfere zrna (endosperm). Izgled slojeva koji obavijaju zrna u plodu kafe prikazan je na **slici 1.2**.



Slika 1.1. Izgled biljke kafe: listovi (a) i cvetovi (b) [5]

Svaki plod sadrži dva semena ili zrna. Ravne strane ova dva zrna okrenute su jedna prema drugoj, duboki žleb ide po sredini svakog, dok su suprotne strane ispupčene. To su, u stvari, zrna kafe koju mi poznajemo.



Slika 1.2. Prikaz slojeva koji obavijaju zrna u plodu kafe [3]

Drvetu kafe treba od tri do pet godina da dâ prvu berbu. Prosečno drvo kafe u sezoni rađa od 1 do 3 kg kafe [24]. Berba kafe je veoma delikatan proces, a tajna dobre kafe uglavnom zavisi od toga koliko se zrna pažljivo beru. Plodovi kafe sazrevaju u različitom periodu, i to je često slučaj ne samo na dva susedna drveta, već i na istom drvetu, čak istom grozdu. Najbolji način da se obezbedi vrhunski kvalitet berbe je ručno branje. Mehaničko branje, u kome se grane

grabuljaju sa fleksibilnim, široko nazubljenim češljem, finansijski je prihvatljivije, ali kvalitet nije tako dobar. U zemljama koje imaju samo jednu kišnu sezonu, kao što je Brazil, kafa se bere samo jednom godišnje, dok se u zemljama sa dve kišne sezone, poput Kostarike, kafa bere dva puta godišnje [24]. Jednom beraču potrebno je oko pet dana da bi nabrao količinu plodova iz koje se može dobiti 45 kg kafe [24].

Iako u svetu postoji mnoštvo divljih vrsta kafe, samo su dve vrste, sa ekonomskog stanovišta, važne: arabika (*Coffea arabica*, varijante: *Typica*, *Maragogype*, *Mocha*, *Catura*, i itd.) i kanefora (*Coffea canephora*, varijante: *Robust*, *Kouilou*, *Conillon*, *Niaoli*, i itd.). Smatra se da je provincija Kafa u Etiopiji mesto odakle potiče arabika, a Centralna Afrika poreklo kanefore, odnosno, robuste. Genetske karakteristike vrsta određuju njihovu specifičnost [5,24].

Arabika (*Coffea Arabica lineaus*) čini 70 % svetske proizvodnje, jer je boljeg kvaliteta. Raste na sva četiri kontinenta, na terenima od 600 do 2000 m nadmorske visine. Ima naglašeniji miris, izbalansiranu aromu i njen ukus čini, svojevrsna, kombinacija slatкости i kiselosti. Maksimalna količina kofeina ne prelazi 1.5 %. Ona je i dosta skuplja, s obzirom na troškove proizvodnje. Poznate arabike su : minas, santos, sigri, maragogip, kostarika, moka harar [24].

Robusta (*Coffea Canehora Pirex Francher*) učestvuje sa 25 % u svetskoj proizvodnji kafe, a uzgaja se u tropskim predelima Afrike, Indije, Indonezije i Vijetnama i to na nižim terenima (do 600 m nadmorske visine). Smatra se da su kod robuste koreni za hranjenje koncentrisani relativno blizu površine, dok arabika za ishranu prodire dublje u zemljište. Sadrži dvostruko više (do 2.8 %) kofeina u odnosu na arabiku, a i stabljika joj je dosta otpornija. U njoj je više otpadnih materija i crnih zrna [5,24].

Nijedna vrsta kafe, kada bi se konzumirala "čista", sama po sebi nema prijatan ukus. Tek mešanjem dve ili više vrsta dobija se ukus koji je prijatan za konzumiranje.

1.3. Sistematika kafe

Biljka kafa je svrstana u sledeće taksonomske kategorije [5]:

- Carstvo: *Plantae*
- Razdeo: *Magnoliophyta*
- Klasa: *Magnoliopsida*
- Red: *Gentianales*
- Porodica: *Rubiaceae*
- Rod: *Coffea*
- Vrste: *Coffea arabica* – arabika, *Coffea benghalensis* - bengalska kafa, *Coffea canephora* – robusta, *Coffea congensis* - kongoanska kafa, *Coffea excelsa* - liberijska kafa, *Coffea gallienii* - kafa sa kofeinom, *Coffea bonnierii* - kafa bez kofeina, *Coffea mogenetii* - kafa bez kofeina, *Coffea liberica* - liberijska kafa, *Coffea stenophylla* - kafa iz Sjeverne Leonea

1.4. Svetska proizvodnja kafe i izvoz

Svetska proizvodnja kafe je porasla više od 100 % u periodu od 1950-1960. godine i nastavila je sa rastom od 0.5 - 1.9 % do 2010 godine [1]. Danas se proizvodi u velikom broju zemalja širom sveta. 10 najvećih zemalja proizvođača su zaslužne za 80 % svetske proizvodnje. Južna Amerika učestvuje sa oko 43 %, Azija 24 %, Centralna Amerika 18 %, Afrika 16 %. Brazil, Vijetnam, Kolumbija i Indonezija su, redom, najveći proizvođači kafe [1]. Prema Internacionalnoj Organizaciji kafe (*International Coffee Organisation*, ICO 2010), Brazil je 2009. godine proizveo oko 40 miliona vreća od 60 kg kafe (**Tabela 1.1**) [1,2]. Takođe, širom sveta, 25 miliona malih proizvođača profitira za životne potrebe od proizvodnje ili gajenja kafe [5]. Izvoz kafe u sezoni 2011-2012. godine bio je procenjen na 130 miliona vreća [2].

Tabela 1.1. Godišnja svetska proizvodnja kafe (milioni vreća od 60 kg) [2]

Zemlja	Proizvodnja					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Brazil	39.272	32.944	42.512	36.070	45.992	39.470
Vijetnam	14.370	13.842	19.340	16.467	18.500	18.000
Kolumbija	11.573	12.564	12.541	12.504	8.664	9.500
Indonezija	7.536	9.159	7.483	7.777	9.350	9.500
Etiopija	4.568	4.003	4.636	4.906	4.350	4.850
Indija	4.592	4.396	5.159	4.460	4.372	4.827
Meksiko	3.867	4.225	4.200	4.150	4.651	4.500
Gvatemala	3.703	3.676	3.950	4.100	3.785	4.100
Peru	3.425	2.489	4.319	3.063	3.872	4.000
Honduras	2.575	3.204	3.461	3.842	3.450	3.750
Nikaragva	1.130	1.718	1.300	1.700	1.615	1.700
El Salvador	1.437	1.502	1.371	1.621	1.547	1.500
Ostale zemlje	15.713	15.779	16.019	16.138	15.680	15.455
Ukupno	116.062	111.463	129.138	119.396	128.181	123.002

Svetska potrošnja kafe procenjena od strane ICO, za 2007. godinu, je bila oko 124.636 milliona vreća od 60 kg, pri čemu je porasla za 2.88 % u odnosu na 121.150 milliona vreća iz 2006. godine [2]. Uprkos finansijskoj krizi, potrošnja kafe 2008. godine bila je 128 miliona vreća.

Tabela 1.2. Izvoz kafe na svetskom nivou (milioni vreća od 60 kg) [1]

Zemlja	Izvoz					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Brazil	25.670	26.653	25.956	27.642	28.010	29.486
Vijetnam	11.631	14.859	13.432	14.001	17.936	18.417
Kolumbija	10.244	10.194	10.871	10.945	11.115	12.300
Indonezija	4.795	5.460	6.744	5.280	4.149	4.000
Etiopija	2.229	2.491	2.435	2.935	2.604	2.500
Indija	3.707	3.647	2.823	3.699	3.259	3.300
Meksiko	2.595	2.361	1.985	2.570	2.912	3.000
Gvatemala	3.821	3.310	3.466	3.312	3.726	3.800
Peru	2.503	3.184	2.369	3.881	2.879	3.730
Honduras	2.425	2.779	2.392	2.898	3.312	3.000
Nikaragva	1.304	1.328	1.280	1.293	1.210	1.200
El Salvador	1.013	1.311	1.003	1.445	1.259	1.200
Ostale zemlje	11.398	10.522	10.613	9.806	1.191	1.191
Ukupno	85.982	90.672	87.188	92.109	96.367	96.622

Antropolozi tvrde da se potrošači ne odriču kafe, već se umesto one visokog kvaliteta, lakše opredeljuju za kafu srednjeg kvaliteta [1]. Preko 2.25 biliona šolja kafe širom sveta se konzumira dnevno [5]. Količina izvezeno kafe je oko 90.0 miliona vreća od 60 kg godišnje, gde je Brazil vodeća zemlja, sa udelom od 28 % ovog tržišta (**tabela 1.2**) [1].

1.5. Obrada ploda kafe

Prerada ploda kafe vrši se, generalno, u tri osnovna koraka: primarni, sekundarni i tercijarni. Primarni se odnosi na početnu obradu ploda kafe do dobijanja zrna (zelenih zrna), sekundarni na ljuštenje, pečenje i mlevenje, a tercijarni na pripremanje instant kafe i može uključivati i druge dodatne operacije [25].

1.5.1. Primarna obrada kafe

Primarna obrada počinje na plantažama. Zrna kafe se odvajaju od obojenog egzokarpa (kožice, opne), mesnatog žućkasto-belog mezokarpa (pulpa), slojeva gumarabike i poslednja dva sloja: fibroznog pergamenta i glatke membrane - srebrne opne. Primarni korak se može izvesti na

dva načina: vlažni i suvi [25]. Suva metoda, koja se obično primenjuje za obradu robuste, je tehnološki jednostavnija u odnosu na vlažnu, koja se pretežno koristi kod arabike [1].

1.5.1.1. Vlažna metoda prerade zrna

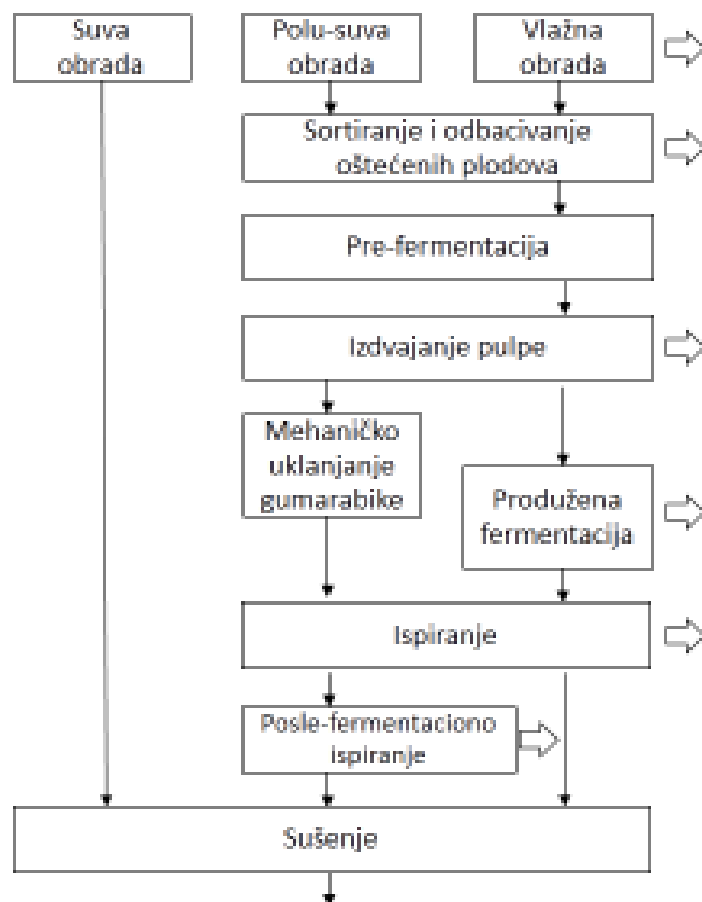
U vlažnom procesu, oštećeni i nezreli plodovi se uklanjanju procesom flotacije u vodi, pri čemu se oni zreli odvajaju tako što potonu na dno [3]. Dešava se, neretko, da se plodovi koji su bili u procesu flotacije kontaminiraju mikotoksinom ohratoksinom A (čija se toksičnost povezuje sa tumorima urinarnog trakta). U tim slučajevima se kožica i većina pulpe potopljenih plodova mehanički uklanjaju presovanjem u vodi preko sita (**slika 1.4a**). Ostaci pulpe i sloja gumarabike se, uglavnom, uklanjaju u sledećem koraku, koji se sprovodi preko „kontrolisane“ fermentacije (12-48 h) i potom vrši ispiranje u betonskim bazenima ili mehaničkim putem. Fermentacijom je gumarabika hidrolizovana kako samim enzimima iz kafe, tako i pomoću mikroorganizama pronađenih na kožici ploda [3]. Mikroorganizmi direktno utiču na krajnji kvalitet zrna kafe.

1.5.1.2. Suva metoda prerade zrna

Mehaničko uklanjanje pulpe smanjuje količinu utrošene vode, a time i otpadne vode i omogućava izolovanje frakcija gumarabike [3]. Nakon ovog postupka, zrna i dalje bivaju pokrivena pergamentom koji se može ukloniti sušenjem i ljuštenjem. Srebrna opna se može opcionalno ukloniti pomoću mašine za poliranje i na taj način proizvesti skupocenija zrna kafe [3].

Postupak obrade zelenih zrna uveliko utiče na senzorna svojstva napitka od kafe koji se proizvodi nakon toga. Mnoge od tih razlika mogu uticati na hemijski sastav zelenih zrna, uključujući neproteinsku aminokiselinu γ -aminobuternu kiselinu i heksoze. Smatra se da vlažno procesovanje utiče na bolju aromu i s tim je i bolje prihvaćeno od strane potrošača. Nedavno je utvrđeno da se ovim postupkom dobijaju i veće količine hlorogenske kiseline i trigonelina, a manje saharoze, u poređenju sa drugim metodama [3].

Princip primarne obrade kafe prikazan je šematski na **slici 1.3**.



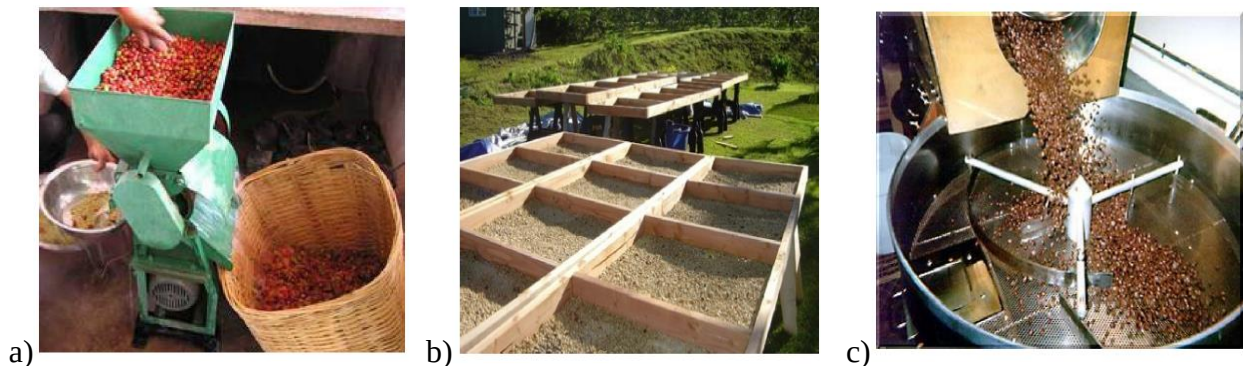
Slika 1.3. Šematski prikaz primarne obrade kafe (strelice sa strane upućuju na korake u kojima dolazi do generisanja otpadnih voda) [25]

Može se primetiti da u toku proizvodnje zelenih zrna kafe spremnih za tržište dolazi do stvaranja nekoliko vrsta nus-proizvoda, u zavisnosti od metoda procesovanja. Glavni nus-proizvod suvog načina obrade čine kožica, pulpa, gumarabika i pergament, svi u jednoj frakciji (tzv. ljuspice). Vlažnom obradom, može se omogućiti izolovanje kožice i pulpe u jednoj frakciji (43.2 % iz celog ploda), gumarabike i rastvornih šećera u drugoj frakciji, kada fermentacija nije uključena (11.8 %) i na kraju pergamenta (6.1 %) [3].

1.5.2. Sekundarna obrada kafe

Suva zelena zrna (**slika 1.4b**) se odvođe na mehaničko uklanjanje sloja pergamenta, a zatim se raspoređuju po veličini, obliku, težini, boji i uniformnosti. Zrna se peku do tamno braon boje (**slika 1.4c**), obrazujući jaku aromu i specifičan ukus [25]. Pored odigravanja brojnih

hemijskih reakcija tokom pečenja, dolazi i do gubitka vlage, promene boje, zapremine, mase, oblika, pH, gustine. Pečena zrna se potom melju, obično u višestepenim mlinovima [1]. Nekada se direktno pakuju i cela zrna kafe. Na kraju se pakovanja vakumiraju i zapećaju.



Slika 1.4. Prerada ploda kafe: izdvajanje pulpe (a), sušenje nakon vlažne obrade (b) i pečenje kafe (c) [5]

1.5.3. Tercijarna obrada kafe

Tercijarna obrada podrazumeva proizvodnju instant kafe [25]. U tom slučaju, neophodna je dodatna ekstrakcija nakon procesa pečenja i mlevenja zrna kafe. Rastvorljive čvrste i isparljive materije, koje obezbeđuju aromu i ukus, ekstrahuju se iz zrna pomoću vode. Voda se zagreva na oko 175 °C pod pritiskom [1]. Proizvođači koriste i šaržne i kontinualne ekstraktore. Nakon ekstrakcije, primenjuje se evaporacija radi koncentrovanja ekstrakta, a zatim sledi sušenje (sušenje zamrzavanjem ili sušenje raspršivanjem) [1,25]. Ovom prilikom nastaju velike količine otpada i otpadne vode. Senzorna svojstva različitih vrsta komercijalnih instant kafa ukazuju da je kvalitet povezan sa vrstom zrna kafe, vremenom skladištenja, procesom fermentacije, pečenjem, ekstrakcijom rastvornih materija, kao i sa materijalom za pakovanje proizvoda.

1.6. Sastav zrna kafe

Sastav zrna kafe varira u zavisnosti od vrste, načina gajenja, berbe, čuvanja i na kraju prerade. Sirova, nepečena kafa ima drugačiji sastav od pečene. U **tabeli 1.3** prikazan je hemijski sastav dve najpoznatije vrste kafe (arabike i robuste).

Tabela 1.3. Hemijski sastav zrna zelene kafe [1]

Komponenta	Arabika ^a	Robusta ^a	Sastav
Rastvorni ugljenohidrati	9–12.5	6–11.5	
Monosaharidi	0.2–0.5	0.2–0.5	Fruktoza, glukoza, galaktoza (u tragovima)
Oligosaharidi	6–9	3–7	Saharoza (>90%), rafinoza (0.09%), stahioza (0-0.13%)
Polisaharidi	3–4	3–4	Polimeri galaktoze (55-65%), manoze (10-20%), arabinoze (20-35%), glukoze (0-2%)
Nerastvorni polisaharidi	46–53	34–44	
Hemiceluloze	5–10	3–4	Polimeri galaktoze (65-75%), arabinoze (25-30%), manoze (0-10%)
Celuloza, β (1,4) manan	41–43	32–40	
Isparljive kiseline	0.1	0.1	
Neisparljive alifatične kiseline	2–2.9	1.3–2.2	Limunska, jabučna, hinska kiselina
Hlorogenske kiseline	6.7–9.2	7.1–12.1	Mono-, dikafeoil- i feruoilhinska kiselina
Lignin	1–3	1–3	
Lipidi	15–18	8–12	
Voskovi	0.2–0.3	0.2–0.3	
Ulja	7.7–17.7	7.7–17.7	Glavne masne kiseline: 16:0 i 18:2 (9,12)
Azotna jedinjenja	11–15	11–15	
Slobodne amino kiseline	0.2–0.8	0.2–0.8	Glavne amino kiseline: Glu, Asp, Asp-NH ₂
Proteini	8.5–12	8.5–12	
Kofein	0.8–1.4	1.7–4.0	Tragovi teobromina i teofilina
Trigonelin	0.6–1.2	0.3–0.9	
Minerali	3–5.4	3–5.4	

^a vrednosti su u % s.m.

Kao i većina biljaka, zelena zrna kafe su sastavljena uglavnom od nerastvornih polisaharida, kao što su celuloza i hemiceluloze (50 %) [3]. Sadrže i rastvorne ugljene hidrate,

poput monosaharida fruktoze, glukoze, galaktoze i arabinoze, oligosaharida saharoze (koja čini više od 90 % oligosaharida), rafinoze i stahioze i polimera galaktoze, manoze, arabinoze i glukoze. Rastvorni ugljeni hidrati utiču na vezivanje arome, stabilizovanje pene, sedimentaciju i povećanje viskoznosti ekstrakta kafe. Uz to, prisutne su neisparljive alifatične kiseline (poput limunske i jabučne), a takođe, u određenoj meri, i isparljive kiseline (sirćetna, propionska, butanolna, izovalerijanska, heksanoinska i dekanoininska kiselina) [3].

Ulja i voskovi čine 8–18 % s.m., zajedno sa proteinima i slobodnim aminokiselinama (9–12 %) i mineralima (3-5 %) [3]. U proteinski sastav spadaju slobodne amino kiseline, uglavnom asparagin, glutaminska kiselina, alanin, aspartanska kiselina i lizin, dok mineralni čine kalijum, magnezijum, kalcijum, fosfor, sumpor, gvožđe, hrom, cink, bakar, nikal i olovo [23].

Kofein je glavni alkaloid koji čini 1-4 % s.m., pri čemu njegov sadržaj veoma varira unutar sorti. Sadržaj kofeina je u velikoj zavisnosti sa kvalitetom napitka, zato što doprinosi gorčini [3]. U izolovanom obliku, kofein je beli kristalni prah rastvorljiv u vodi, gorak i bez mirisa [24]. Jedino je ovaj sastojak termostabilan i ne razgrađuje se sa prekomernim pečenjem kafe [1]. Pored kofeina, kafa sadrži još nekoliko vrsta ksantina, poput teobromina i teofilina [23].

Najvažnija fenolna jedinjenja koja su pronađena u zrnu kafe pripadaju grupi hlorogenskih kiselina (HK), čak 12 % s.m. To su estri trans-cimetnih kiselina i hinskih kiselina [3]. Tu spadaju kafeoilhinska kiselina (CQA – *caffeoyiquinic acid*), feruoilhinska, p-kumaroilhinska, dimetoksicimeoilhinska, dikafeoilhinska, diferuoilhinska, di-p-kumaroilhinska, feruoilkafeoilhinska, dimetoksicinamoilkafeoilhinska, p-kumaroilkafeoilhinska, p-kumaroilferuoilhinska i p-kumaroildimetoksicimeoilhinska kiselina. Esterifikacijom u položajima 3, 4 i 5, ali ne i 1, dobijaju se nekoliko izomera, takođe pronađenih u kafi, zajedno sa slobodnim fenolnim kiselinama poput kafeinske, ferulinske i dimetoksicinaminske kiseline. Konjugacija hidrocimetnih kiselina sa aminokiselinama (cinamoil amidi) ili glikozidima (cinamoil glikozidi) je, takođe, otkrivena u zelenoj kafi. Ostala fenolna jedinjenja, poput tanina, lignina i antocijanidina su pronađena u manjim količinama [3].

Masne frakcije zrelih zrna kafe su uglavnom sastavljene od triglicerola (75 %), sterola (stigmasterol, sitosterol), masnih kiselina (linoleinska, oleinska, palmitinska, stearinska, arahidonska, lignocerinska i beheninska), pentacikličnih diterpena (metilkafestol, kafestol, kafeol), diterpenskih alkohola, diterpenskih i triterpenskih estara i ceramida. Tokoferoli (a, b, c)

su prisutni zajedno sa tokotrienolima [23]. U ostale komponente spadaju i trigonelin (oko 1 %) i nikotinska kiselina [23].

1.6.1. Uticaj pečenja na fizičko-hemijske promene u zrnju kafe

U zrnju kafe se tokom pečenja odvija niz reakcija, u kojima se neka jedinjenja razgrađuju, modifikuju, ili dolazi do nastanka novih. Postoji nekoliko načina pečenja kafe [26], pri čemu najviša temperatura pečenja može dostići 220 °C, i primenjuje se, između ostalih, u proizvodnji espresso kafe.

Fizičke i hemijske promene i sporedni efekti koji nastaju tokom pečenja kafe su: promena boje od zelene do tamno braon, čak crne; smanjenje vlage i gubitak težine od oko 20 %; porast zapremine od 70 do 100 % (kafa oslobađa ugljen-dioksid koji uzrokuje eksploziju ćelija, tzv. kokičavi prasak); sloj vrlo aromatičnog kafenog ulja, koje se pojavljuje u središnjem žlebu, daje zrnju sjaj; kiselost, količina šećera i proteina se smanjuje (s obzirom na to da su šećer i aminokiseline reaktanti u Majlardovim (*Maillard*) reakcijama), a gorčina se naglašava [3,24].

Polisaharidi se razgrađuju na niskomolekularne ugljene hidrate. Zaostala srebrna opna se tokom pečenja uklanja. Dolazi i do stvaranja jedinjenja koja imaju brojne pozitivne biološke efekte, međutim, može doći i do stvaranja kancerogenih jedinjenja, poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Oni su u napitku, ipak, detektovani u neznatnim količinama. Dolazi i do stvaranja akrilamida [3].

Sastav pečene kafe čine ugljeni hidrati (38-42 % s.m.), melanoidini (23 %), lipidi (11-17 %), proteini (10 %), minerali (4.5-4.7 %), HK (2.7-3.1 %), alifatične kiseline (2.4–2.5 %), kofein (1.3–2.4 %) [3].

Visoke temperature pečenja uzrokuju smanjenje ukupnog sadržaja HK, što zavisi od uslova i nivoa pečenja [3].

Melanoidini su visokomolekularna jedinjenja čija struktura nije u potpunosti razjašnjena, usled složenosti molekula, koji su po prirodi antioksidansi. Nastaju kombinovanjem šećera i amino kiselina kroz Majlardovu reakciju ili karamelizaciju ugljenih hidrata, koja je favorizovana pri niskoj aktivnosti vode i visokoj temperaturi. Melanoidini su jedna od osnovnih komponenata pečene kafe, čineći do 25 % s. m. [3,27].

Serotonin, koji deluje kao neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu, i njegovi prekursori, L-triptofan i 5-hidroksitriptofan, pronađeni su i u zelenoj i u pečenoj kafi. Veća količina serotonina, zajedno sa manjim brojem prekursora u krajnjem produktu, ukazuju na to da serotonin može biti formiran termalnom razgradnjom svojih prekursora.

Sa pečenjem dolazi i do povećanja rastvornih dijetetskih vlakana. Ulje, manje-više, ostaje u nepromenjenom sastavu pre i nakon pečenja [3].

FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) spektroskopija je jedna od tehnika koja pruža informacije o uticaju različitih uslova pečenja na aktivna jedinjenja, u uzorcima kafe dobijenim variranjem vremena i temperature pečenja. Pojedini istraživači primetili su da zrna kafe obrađena do iste mere pečenja (utvrđene bojom zrna i pukotinama od pečenja), usled promena vremena trajanja tretmana i temperatura, poseduju različita fizičko-hemijska svojstva [28,29,30].

1.7. Kafa kao napitak (priprema kafe za konzumiranje)

Ekonomska važnost kafe je najbitnija u pogledu napitka, rastvora pripremljenog od pečenih i mlevenih zrna kafe.

Usled sveopšte prisutnosti u svakodnevnom životu, gotovo, svakog odraslog pojedinca, sprevedena su mnogobrojna istraživanja zelenog i pečenog zrna, kao i napitka od kafe, u cilju ispitivanja hemijskog sastava i potencijalnih povoljnih i štetnih fizioloških uticaja. Bitna je činjenica da sastav i mnoge karakteristike zrna, koja kasnije određuju hemijski sastav i kvalitet kuvane kafe, ne zavise samo od vrste (npr. arabika ili robusta), uslova gajenja biljke (hlad, orezivanje, đubrenje, vrsta zemljišta, nadmorska visina, izlaganje suncu, padavine i temperature), stepena sazrevanja prilikom berbe i načina berbe, već takođe i od načina obrade (suvi ili vlažni) opisanog prethodno i posebno, u postupku vlažne obrade, fermentacije [3].

Postoje brojne razlike u načinu pripremanja napitka, pri čemu je razvijeno više tehnika, od kuvane ili turske kafe, preko filter, cedene, moke, espresso kafe. Napitak se, u osnovi, priprema ekstrakcijom, u ključaloj vodi. Tradicionalni način spremanja kafe poznat je kao „turska kafa“, što je uobičajeni naziv na našim prostorima. Označava u stvari pečenu, pravu „crnu kafu“. Sam naziv „turska kafa“ nije, pretežno, u vezi sa načinom pripremanja kafe u toj

zemlji. Ono što razlikuje crnu kafu od ostalih načina spremanja kafe jeste crni talog (soc) koji se pojavi na dnu suda prilikom spremanja.

Espresso kafa je posebna vrsta kafe koja je obeležje savremenog doba i savremenog čoveka. Italija je zemlja porekla za ovu vrstu napitka od kafe. Italijani su njeno spremanje dugo usavršavali. O tom istraživanju svedoče brojni naučni radovi, a posebno i činjenica da imaju svoj Univerzitet za kafu. Ipak, prvi prototip espresso uređaja za kafu nastao je 1822. godine u Francuskoj. Espresso se sprema od posebnih vrsta kafe (robuste i arabike), a pomoću aparata kojim se vrela voda pod jakim pritiskom, i do 9 bara, propušta kroz čvrsto upakovani sloj krupnije mlevene kafe. Postupak pripremanja u proseku traje oko 30 ± 5 sekundi [26]. Maksimalna dozvoljena količina espresso kafe je pet šoljica dnevno. Stručnjaci kažu da se espresso pije „na brzinu“, i da se samo tako u potpunosti može osetiti punoća njenog ukusa [26].

Podjednako popularna je i filter kafa. Slična je espresso kafi, sa tom razlikom što se voda ne propušta pod pritiskom. U južnoevropskim zemljama, poput Italije i Španije, izražena je i potrošnja moka kafe [1].

U svakom slučaju, različiti tehnički uslovi, poput odnosa voda/kafa, temperatura vode i pritisak, količina pripremljene kafe, mlevenje, dodatno doprinose različitosti hemijskog sastava svakog napitka pojedinačno.

1.8. Nus-proizvodi od prerade kafe

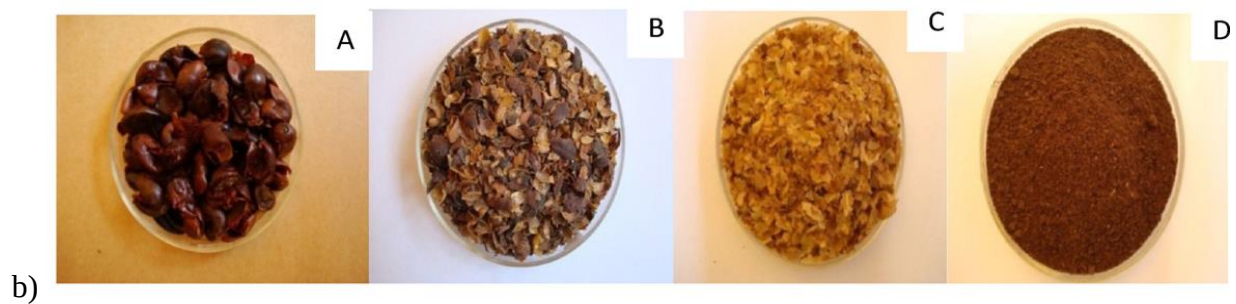
U pogledu velike proizvodnje i potrošnje kafe širom sveta, valorizacija njenih otpadaka i modifikacija u vredne materijale je veliki izazov i preporuka održivog industrijskog razvoja, a isto tako i očuvanja životne sredine.

Više od 50 % zrna kafe se ne koristi u komercijalne svrhe i time je odbačeno kao otpad tokom prerade [3]. S toga je bilo interesantno i potrebno naći praktičnu primenu za ove nus-proizvode. Njihovo odlaganje, sa druge strane, predstavlja gomilanje zagađujućih materija, veoma štetnih za živi svet.

Tokom celokupnog procesa obrade kafe nastaje nekoliko vrsta otpada. Ovi ostaci se mogu podeliti u dve kategorije: oni koji su nastali u zemljama proizvođačima i koji predstavljaju više od 50 % mase plodova kafe i oni nastali u zemljama potrošačima, nakon pripreme napitka,

nazvani „otpadna kafa“ [4]. Što se tiče otpadne kafe, mogu se razlikovati dva tipa. Prvi nastaju u industriji rastvorne kafe, a drugi se generišu prilikom direktne pripreme napitaka u kafićima, restoranima ili domovima [4].

Šematski prikaz izdvajanja nus-proizvoda tokom prerađe kafe dat je na **slici 1.5**, a njihov hemijski sastav je predstavljen u **Tabeli 1.4**.



Slika 1.5. Šematski prikaz procesnih koraka obrade kafe u kojima nastaju nus-proizvodi (a), izgled osnovnih nus-proizvoda od kafe (b): pulpa (A), ljuspice (B), srebrna opna (C) i otpadna kafa (D) [5]

1.8.1. Kožica i pulpa

Pulpa predstavlja 29 % suve materije u plodu [5]. Otpad od pulpe nastaje prilikom vlažne obrade; na svake 2 tone obrađene kafe nastane 1 tona pulpe. Ljuske, u okviru kojih se ubrajaju

kožica, pulpa, gumarabika i pergament, skupa, dobijaju se nakon suve obrade. Čine oko 12 % s.m. ploda. Nakon 1 tone obrađenog ploda nastane 0.18 tona ljuski [5].

1.8.2. Gumarabika

Gumarabika zaostaje na zrnju tokom vlažne obrade nakon odvajanja pulpe i ukoliko nije došlo do enzimske degradacije. U daljem postupku dolazi do odvajanja i koncentrovanja njene frakcije. Sastoji se od vode (84.2 %), proteina (8.9 %), šećera (4.1 %), pektina (0.91 %) i pepela (0.7 %) [3].

1.8.3. Pergament

Pergament je sastavljen od (α -) celuloze (40–49 %), hemiceluloze (25–32 %), lignina (33–35 %) i pepela (0.5–1 %) [3].

1.8.4. Srebrna opna

Srebrna opna se može smatrati funkcionalnom hranom usled niskog sadržaja masti i šećera, veće količine rastvornih vlakana (60 %) i izražene antioksidativne aktivnosti [3]. Srebrna opna, kao jedan od slojeva zrna, dobija se nakon pečenja kafe.

1.8.5. Oštećena zrna zelene kafe

Niskorazredna zelena kafa predstavlja udeo od oko 15-20 % tokom prerade [3]. Kafa se bira i rangira po veličini, boji i procentu nesavršenosti. Oštećena zrna koja su prilikom odabira odbačena, nazvana su zrna nižeg ranga kvaliteta i sadrže nesavršenosti, a to su crna i tamno braon zrna, zrna oštećena od strane insekata, sa flekama, kao i ona nezrela [31]. Nastaju nepravilnom formacijom ploda kafe ili greškom u procesovanju. Ona mogu uticati na neželjen ukus napitka.

1.8.6. Otpadna kafa

Industrija rastvorne kafe predstavlja gotovo 50 % svetske proizvodnje kafe sa proporcionalnom količinom ostataka otpadne kafe, godišnje čak oko 6 miliona tona [1,4]. Iz jedne tone zelene kafe nastaje oko 650 kg taloga, a oko 2 kg vlažnog taloga je dobijeno na svakom kilogramu proizvedene rastvorne kafe [1]. Iako se, uglavnom, odlaže na deponijama, direktno odlaganje treba izbegavati s obzirom da otpadna kafa sadrži velike količine organskih

materija, a neke od njih su sa utvrđenom ekotoksičnošću, poput kafeina, tanina i polifenola. Ostalih 50 % svetske proizvodnje kafe je iskorišćeno za direktnu pripremu napitaka u kafićima, restoranima ili domovima [4]. U zavisnosti od procedure kuvanja, mogu se dobiti različiti napici i kao posledica, ostaci koji zaostaju biće u funkciji kvantitativno različitih količina neekstrahovanih sastojaka kafe.

Tabela 1.4. Hemijski sastav nus-proizvoda od kafe [1,5]

Komponenta (%)	Pulpa	Ljuspice	Srebrna opna	Otpadna kafa
Celuloza	63.0 ± 2.5	43.0 ± 8.0	17.8 ± 6.0	8.6 ± 1.8
Hemiceluloza	2.3 ± 1.0	7.0 ± 3.0	13.1 ± 9.0	36.7 ± 5.0
Protein	11.5 ± 2.0	8.0 ± 5.0	18.6 ± 4.0	13.6 ± 3.8
Masti	2.0 ± 2.6	0.5 ± 5.0	2.2 ± 1.9	ND*
Ukupna vlakna	60.5 ± 2.9	24 ± 5.9	62.4 ± 2.5	ND*
Ukupni polifenoli	1.5 ± 1.5	0.8 ± 5.0	1.0 ± 2.0	1.5 ± 1.0
Ukupni šećeri	14.4 ± 0.9	58.0 ± 20.0	6.65 ± 10	8.5 ± 1.2
Pektini	6.5 ± 1.0	1.6 ± 1.2	0.02 ± 1.0	0.01 ± 0.005
Lignin	17.5 ± 2.2	9.0 ± 1.6	1.0 ± 2.0	0.05 ± 0.05
Tanini	3.0 ± 5.0	5.0 ± 2.0	0.02 ± 0.1	0.02 ± 0.1
Hlorogenske kiseline	2.4 ± 1.0	2.5 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.3 ± 1.0
Kofein	1.5 ± 1.0	1.0 ± 0.5	0.03 ± 0.6	0.02 ± 0.1

* nije detektovano

1.9. Primena i iskorišćenje nus-proizvoda od kafe

Poslednjih godina javlja se veliki društveni i politički pritisak za smanjenjem otpada, nastalim u raznim industrijama. Gotovo sve razvijene i nerazvijene zemlje pokušavaju da usvoje ovakav koncept, modifikujući svoje procese, tako da se dobijeni ostaci mogu reciklirati. Usled toga, većina velikih kompanija ne smatra više ostatke kao otpad, već kao polazni materijal za druge procese.

Visoka stopa proizvodnje kafe u svetu stvara potrebu da uspostavljanjem balansa između proizvodnje i iskorišćenja nus proizvoda. S tim u vezi, postoji nekoliko studija koje se bave istraživanjem potencijalnih i profitabilnih aplikacija ovih ostataka.

Generalno, zabeleženo je njihovo iskorišćenje u industrijske svrhe kao što je proizvodnja energije, adsorpcija različitih vrsta adsorbata, ekstrakcija i izolovanje bio- i tehno-funkcionalnih jedinjenja, kao i konverzija u industrijski važna jedinjenja, poput etanola, giberelinske kiseline i α -aminoamilaze [3].

1.9.1. Ljuspice (kožica, pulpa, gumarabika i pergament)

Direktno iskorišćenje ljuspica kao hrane za životinje nije moguća, usled prisustva antifizioloških i antinutritivnih komponenata (tanini i kofein). Međutim, mogu se iskoristiti kao izvor fitohemikalija za prehrambenu i farmaceutsku industriju [3]. Postoji mogućnost i biološke detoksifikacije ljuski [5]. Uklanjanjem toksičnih konstituenata ili njihovom razgradnjom, otvaraju se veće mogućnosti iskorišćenja ovog otpada kao supstrata za bioprocese. U ovu svrhu sprovedena su istraživanja sa vrstama *Rhizopus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Streptomyces* sp. [5].

1.9.2. Srebrna opna

Srebrna opna se smatra izuzetnim zagađivačem prirodne sredine, ukoliko bi došlo do njenog odbacivanja i odlaganja, usled prisustva organskih materija. Iz oblasti biotehnologije, istraživana je mogućnost rasta sedam različitih vrsta gljiva rodova *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* i *Neurospora* i oslobađanja polifenola, ističući aspekt biološke detoksifikacije ovog otpada [1]. Neki autori upućuju na njen veliki antioksidativni kapacitet, te se može razmatrati kao novi potencijalni funkcionalni sastojak [1]. Fenoli i flavonoidi iz kafe su nedavno privukli dosta pažnje zato što su potencijalni antioksidansi i ispoljavaju različite fiziološke aktivnosti poput antizapaljenske, antimikrobne, antialergijske, antikancerogene i antihipertenzivne [5]. Istraživana je i proizvodnja α -amilaze od strane *Neurospora crassa* CFR 308 gajene na ovom supstratu [1]. Takođe, srebrna opna pomaže rast bifidobakterije u *in vitro* uslovima [3].

1.9.3. Otpadna kafa

Otpadna kafa, kao i srebrna opna, sadrži velike količine organskih jedinjenja. Ispitivani su biološki tretmani sa gljivama rodova *Penicillium*, *Neurospora*, i *Mucor* u cilju oslobađanja fenolnih jedinjenja i smanjenja nivoa toksičnosti [1]. U nekim istraživanjima, može se koristiti kao gorivo u industrijskim kotlovima, usled njene visoke kalorijske vrednosti, od oko 5000 kcal/kg [1]. Već je ispitana kao hrana za preživare, svinje, živinu i zečeve, mada visok sadržaj

lignina (oko 25 %) u velikoj meri ograničava ovu primenu. Otpadna kafa je iskorišćena i za proizvodnju biodizela i peleta, kao i vodonika i etanola [1]. Ispitivana je i bioaktivnost u pogledu sadržaja amino kiselina, šećera, i masti. Pogodna je i kao supstrat za gajenje jestivih gljiva, za proizvodnju ksilanaza iz *Penicillium* sp. [1]. Otpadna kafa prikupljena nakon uobičajenog načina pripreme napitka (filter, espresso, moka) smatra se dobrim potencijalnim izvorom hidrofilnih bioaktivnih jedinjenja. Ova jedinjenja sa antioksidativnim aktivnostima se lako ekstrahuju vodom, i mogu se kasnije inkorporirati u hrani, lekovima, radi povećanja nutritivne vrednosti ili njihove stabilizacije, čak i radi proizvodnje novih funkcionalnih proizvoda [4,6,7,8,9,10,11,29,32]. U industriji deterdženata, iscedena ulja iz otpadne kafe se mogu iskoristiti kao antipenušavci ili mogu biti u sastavu krema za cipele [33]. Visok sadržaj organskih materija u odbačenim zrnima kafe omogućava njihovo iskorišćenje u zemljištima sa smanjenom količinom organskih materija radi poboljšanja njihove plodnosti, bez povećanja nivoa teških metala [33]. Može se dodati direktno u zemlju.

1.9.4. Niskorazredna (oštećena) zrna kafe

Zrna kafe nižeg ranga kvaliteta su bogata, gotovo svim, materijama prisutnim i u zrnima kafe znatno boljeg kvaliteta. Njihovo iskorišćenje, s toga, ogleda se u svim navedenim aspektima primene karakterističnim za sve nus-proizvode [31].

1.10. Fiziološko delovanje kafe

Prvi fiziološki efekti kafe, prema predanjima, primećeni su još oko 850 godine, negde u Etiopiji, kada je pastir jednom prilikom primetio da su njegove koze živahnije nego inače. Primetivši da jedu crvene bobice nekog žbuna i okusivši ih, iskusio je isti osećaj živahnosti [34]. Takvo delovanje je kasnije pripisano delovanju najpoznatijeg sastojka kafe - kofeina. Kofein stimulise nervni sistem, naročito u pogledu pažnje i pamćenja, podstiče dobro raspoloženje, otklanja sanjivost, smanjuje zamor i agresivno stanje [23,35].

Iako su se prva fiziološka svojstva kafe odnosila, gotovo, isključivo na delovanje kofeina, novija istaživanja upućuju na izuzetno snažan antioksidativni potencijal, kako zelenih zrna kafe, tako i svih produkata nastalih njenom obradom [7,8,11,23,35,36,37,38,39,40,41,42]. Brojni literaturni podaci o metodama ispitivanja i merenja antioksidativne aktivnosti napitaka i ostataka od kafe biće detaljnije razmatrani u daljem tekstu. U principu, antioksidativna aktivnost pripisuje

se, u najvećoj meri, sadržaju polifenola. Hlorogenska kiselina, kao glavni polifenol u kafi, preko antioksidativnog potencijala, utiče blagotvorno na zdravlje organizma, usporava starenje i deluje preventivno na mnoge vrste oboljenja. Među njima su smanjenje rizika od pojave dijabetesa, arterioskleroze, neurodigestivnih oboljenja, čak i nekih oblika kancera [34,37]. Kafa, navodno, stimulatивно deluje na srce, mozak i tonus mišića, ne utičući na pojavu rizika od infarkta, aritmije ili hipertenzije [43]. Iako je pokazano da kafa podiže pritisak, reč je o momentalnom efektu koji nestaje posle 30 minuta, i zatim ga snižava, toliko da ta vrednost pritiska opada više nego što je bila pre povišenja [44]. Kafa reguliše probavu, pospešuje varenje, podstiče želudačne sokove i na taj način štiti od raka debelog creva [23]. Pomaže da se bolje utroši energija akumulirana u toku dana, utiče na razgradnju masnoća i gubitak viška kilograma [43,45], zbog čega se, neretko, dodaje i u razne formulacije preparata za mršavljenje. Deluje i kao diuretik [23]. Prema navodima pojedinih istraživača smanjuje rizik od oboljevanja od Parkinsonove bolesti [34]. Zabeležene su i antiinflamatorne, antialergijske i antitrombocitne aktivnosti [23,41,43].

Pored, polifenola, smatra se da i kofein (preko svojih razgradnih proizvoda metilksantina i metilurginske kiseline), zajedno sa melanoidima, proizvodima Majlardovih reakcija, takođe, u određenoj meri doprinose antioksidativnoj aktivnosti pečene kafe i njenih ostataka [7,23,27,35,36].

Zabeležena su, međutim, i neželjena dejstva kafe, koja se najvećim delom pripisuju uticaju kofeina, tačnije, uticaju malih i velikih doza kofeina. Kofein u prekomernim dozama utiče na anksioznost i uznemirenost, hipertenziju i bol u želucu [34]. Smatra se da je to posledica njegovog jakog psihoaktivnog dejstva. Jedna šoljica kafe, u zavisnosti od vrste i načina pripreme, sadrži 50-150 mg kofeina [46], tako da je preporučljiva doza kafe najviše 3-4 šoljice u toku dana. Za 4 do 6 sati delovanje kofeina u organizmu se gubi, međutim, kod određene grupe ljudi (trudnica, mladih osoba i onih sa obolelom jetrom) može se zadržati čak do 30 sati, pri čemu oni bivaju duže izloženi njegovim toksičnim efektima [34]. Iz tih razloga, u poslednje vreme sve se više koristi kafa bez kofeina, koji se odstranjuje ekstrakcijom. Mada, pojedina istraživanja ukazuju da kofein nije sam po sebi najškodljiviji sastojak kafe. Kafa bez kofeina izaziva porast kiselina u organizmu u većoj meri od bilo koje obične kafe, zato što se ona pravi isključivo od zrna robusta, koja su mnogo bogatija masnoćama [47]. Kada je reč o mastima iz kafe, pojedini

istraživači naveli su da u nekim slučajevima nefiltrirana kafa, koja je značajan izvor diterpena kafestola i kahveola, može uticati na povećanje nivoa ukupnog holesterola za, čak, 10 % [35].

Iako je izučavanje fiziološkog delovanja kafe u ekspanziji, moderna medicina je rešila, tek, deo dilema o njenom uticaju na organizam. Ne treba zaboraviti i da su mnoge *in vitro* ispoljene aktivnosti samo indikatori potencijalnih bioloških delovanja, koji reflektuju teorijsku bioraspoloživost u organizmima ljudi i životinja. S tim u vezi, neophodno je sprovesti dalja istraživanja i razjasniti brojne kontroverze o potencijalnoj blagodeti, odnosno, štetnosti napitaka od kafe.

2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

U čovekovom organizmu se stalno, tokom najrazličitijih reakcija, čak i normalnih fizioloških procesa, stvaraju izuzetno reaktivni oblici molekula – slobodnih radikala, koji svojim delovanjem mogu dovesti do oštećenja, ali i smrti ćelije. U slučajevima kada produkcija slobodnih radikala nadvlada sposobnost tela da ih prirodnim mehanizmom neutrališe dolazi do promene oksidativnog statusa organizma i pojave tzv. oksidativnog stresa [12,48]. U borbi protiv slobodnih radikala, ljudski organizam ima mogućnost vrlo snažne prirodne odbrane. Neki od prirodnih mehanizama nalaze se neposredno u ćelijama, a neke unosimo putem hrane. S tim u vezi, savremena medicina dosta pažnje posvećuje pronalaženju novih antioksidanasa, “ hvatača” slobodnih radikala, koji pozitivno utiču na metaboličke procese i održavanje homeostaze u organizmu.

2.1. Slobodni radikali

Najzastupljenije metaboličke reakcije u organizmu su reakcije oksidacije. Tokom ovih reakcija dolazi do prelaska elektrona sa donora na akceptor, što predstavlja proces oksidacije za donor i redukcije za akceptor. Tom prilikom dolazi do oslobađanja elektrona koji sa biomolekulima grade slobodne radikale [49]. Osim ovog načina, slobodni radikali mogu nastati i simetričnom podelom elektronskog para jedinjenja sa kovalentnom vezom prilikom cepanja ovih veza.

Drugim rečima, slobodni radikali su molekuli koji imaju nespareni elektronski par i stoga su izuzetno nestabilni i vrlo reaktivni (tako npr. vreme polu-života hidroksil radikala iznosi čak manje od 1 ns, tako da, nakon što se proizvede, gotovo, momentalno reaguje u okolini svog mesta nastanka) [49]. Prisustvo slobodnih radikala u biološkim sistemima je otkriveno pre nešto više od 50 godina [50]. Pronađeno je da u živom svetu imaju vrlo važnu ulogu, jer se proizvode u normalnim fiziološkim procesima, kao što su disanje i imune reakcije, takođe i pri fizičkim aktivnostima i jelu [48,49,50,51]. Manji deo slobodnih radikala dolazi iz okoline, pod dejstvom ultraljubičastog zračenja, zatim pod uticajem duvanskog dima, zagađene okoline (pesticidima, teškim metalima – živom, kadmijumom, arsenom), usled prekomernog konzumiranja životinjskih masti i prerađene hrane, aditiva i boja u hrani, alkohola, pod dejstvom stresa i nekih medicinskih tretmana (koji uključuju određene vrste lekova) [52].

Slobodni radikali su opasni su zbog toga što, da bi postigli ravnotežu, narušavaju stabilnost drugih molekula u okolini, a ponekad pokreću lančane reakcije koje se mogu oteći kontroli [52]. Mnogi su agresivni i štetni, jer napadaju ćelije, cepaju im membrane, kvare njihov genetski materijal. Taj proces traje godinama i skoro da je neprimetan sve do pojave simptoma brojnih bolesti [49,50]. Sa druge strane, slobodni radikali su i nužni za opstanak ćelija i tkiva u organizmu. Koriste se u međućelijskoj komunikaciji, zatim za odbranu od bakterija i drugih štetnih agenasa [50,52].

2.1.1. Vrste slobodnih radikala

Normalni ćelijski metabolizam dovodi do proizvodnje slobodnih radikala u velikim količinama. Najprisutniji i najreaktivniji su kiseonični i azotni slobodni radikali. Među kiseonične najvažniji su superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($\cdot OH$), hidroperoksil radikal ($HO_2^{\cdot}$), peroksil radikal ($RO_2^{\cdot}$), alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$), karbonatni radikal ($CO_3^{\cdot-}$), ugljendioksidni radikal ($CO_2^{\cdot-}$), a iz grupe azotovih: azotmonoksidni radikal ($NO^{\cdot}$) i azotdioksidni radikal ($NO_2^{\cdot}$) [48,51,52].

Superoksid radikal je najzastupljenija vrsta kiseoničnih slobodnih radikala u biološkim sistemima. Nastaje, u najvećoj meri, u reakcijama prenosa elektrona, poput procesa prenošenja elektrona sa supstrata na kiseonik, u lancu disanja, koji se odigrava u mitohondrijama [49]. Tom prilikom dolazi do „curenja“ elektrona iz sistema prenosnika, koji reaguju sa kiseonikom i proizvode superoksidne radikale. Procenjeno je da, u fiziološkim uslovima, oko 1-3 % molekula kiseonika u mitohondrijama bude prevedeno u superokside [49]. Na taj način se u telu u toku godine može proizvesti preko 2 kg suproksida, a kod ljudi sa hroničnim oboljenjima, ili povećanom fizičkom aktivnošću, čak i više [48].

Drugi veoma važni, hidroksil radikal, u biološkim sistemima može nastati posredstvom nekoliko mehanizama. Npr. jonsko zračenje uzrokuje raspadanje molekula H_2O , uz stvaranje $\cdot OH$ i vodonikovih atoma, a takođe $\cdot OH$ može nastati fotolitičkim razlaganjem alkilhidroperoksida [49]. Pronađeno je da je jedna ljudska ćelija izložena uticaju od približno 10^5 oksidativnih napada dnevno od strane hidroksil radikala i sličnih vrsta [49].

2.1.2. Delovanje slobodnih radikala

Slobodni radikali deluju preko dva mehanizma. U prvom slučaju dolazi do interakcije dva slobodna radikala, koji tom prilikom udružuju po jedan svoj nespareni elektron [48]. Jedan takav primer je reakcija superoksid radikala i azotmonoksidnog radikala (**j-na 2.1**), uz nastajanje peroksinitrita. U fiziološkim uslovima peroksinitrit može interagovati i dovesti do oštećenja proteina i nastanka toksičnih rezidua (poput azotdioksidnog jona NO_2^+) [48].



U drugom slučaju, slobodni radikal može reagovati sa nekom drugom neradikalskom vrstom [48]. Tom prilikom, lanac reakcija slobodnih radikala završava se nastajanjem novog slobodnog radikala. Najčešći primer su slobodni radikali nastali blizu lipoproteina koji mogu započeti lipidnu peroksidaciju [48].

Toksični efekti delovanja slobodnih radikala ogledaju se, u najvećoj meri, u oksidativnoj modifikaciji lipida, proteina i DNK [49,50,51,52,53,54,55]. Oksidativna modifikacija proteina manifestuje se promenama njihove primarne, sekundarne i tercijarne strukture. Proteini imaju specifičnu biološku funkciju, stoga, modifikacija njihove strukture nosi sa sobom jedinstvene funkcionalne posledice. Hidroksilni radikal može dovesti do kidanja lanca DNK, stvaranja abazičnih mesta i modifikacije šećernih komponenti. Takođe, krajnji proizvodi lipidne peroksidacije (tzv. MDA) mogu se kovalentno vezivati za DNK, stvarajući "DNK radikale" koji su odgovorni za nastanak mutacija [49,52,56]. Lipidi su posebno osetljivi na delovanje slobodnih radikala, pretežno, usled prisustva nezasićenih masnih kiselina [57]. Lipidna peroksidacija zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule i dovodi do stvaranja primarnih visokoreaktivnih intermedijera (alkil radikala, konjugovanih diena, peroksi i alkoksi radikala i lipidnih hidroperoksida), koji daljom razgradnjom daju sekundarne produkte lipidne peroksidacije: kratkolančane isparljive ugljovodonike, aldehide, i krajnje proizvode lipidne peroksidacije: izoprostane, MDA (malondialdehid), 4-hidroksi- 2,3-transnonenal i 4,5-dihidroksidecenal. Nastali proizvodi su značajni uzročnici mnogih vrsta oboljenja, poput ateroskleroze, koronarne bolesti, akutnog infarkta miokarda, reumatoidnog artritisa, sistemske skleroze [55].

Mehanizam složenog niza reakcija lipidne peroksidacije odigrava se u tri faze, tzv. inicijacija, propagacija i terminacija [52,57].

Proces je iniciran slobodnim radikalom ($X\bullet$) koji uklanja atom vodonika sa jednog od C atoma masne kiseline bočnog lanca lipida (**j-na 2.2**), ostavljajući C atom sa jednim nesparenim elektronom.



Ovaj C atom može da reaguje sa molekulom kiseonika formirajući peroksilni radikal (**j-na 2.3**), koji sada može da „ukrade“ jedan H atom iz obližnjeg lanca, stvarajući tako jedan novi radikal (**j-na 2.4**).



Na ovaj način započinje lančana reakcija koja se propagira sve dok se ne sretnu dva radikala, koja, dajući po jedan electron, oforme kovalentnu vezu kojom se povezuju. Najčešće se dešava da peroksilni radikal reaguje sa drugim peroksilnim radikalom na obližnjem bočnom lancu masnih kiselina lipida (**j-na 2.5**), ili da peroksilni radikal reaguje sa drugim obližnjim ugljeničnim radikalom (**j-na 2.6**).



U oba slučaja se završava formiranje radikala, međutim rezultat je takav da masne kiseline bočnog lanca membranskih lipida postaju toliko izmenjene da dolazi do oštećenja membrane.

Broj oksidovanih lipida se može smanjiti u prisustvu liposolubilnog α -tokoferola [57]. Može doći do oslobađanja vodonika iz α -tokoferola, pri čemu bi nastao tokoferoksil radikal (**j-na 2.7**), koji je relativno stabilan i ne utiče na dalju lipidnu peroksidaciju.



Smatra se da je mozak organ koji je krajnje osetljiv na delovanje slobodnih radikala. S obzirom da je to veoma aktivan organ koji troši preko 20% ukupnog kiseonika u organizmu,

verovatno je najslabije zaštićen od reaktivnih oblika kiseonika. Mozak ima visoku koncentraciju nazasićenih masnih kiselina, ima veliki sadržaj gvožđa (koji je potencijalni donor slobodnih elektrona), malu mogućnost antioksidacije i nije sposoban da regeneriše neurone.

Iz prethodno navedenih razloga, merenje adekvatnog biomarkera oksidativnog stresa može ukazati ne samo na ranu pojavu bolesti, njenu progresiju i procenu efikasnosti terapije, već i pomoći u rasvetljavanju patofizioloških mehanizama oštećenja tkiva dejstvom oksidativnog stresa [55]. Oksidativni stres može nastati usled obilja slobodnih radikala (iako je pokazano da čak samo jedan slobodan radikal može da pokrene brojne, veoma štetne reakcije) ili smanjene efikasnosti odbrambenog mehanizma ćelija i tkiva. Postoji nekoliko tipova odbrambenih mehanizama za smanjenje štetnih delovanja oksidanasa u ćeliji. Uglavnom se zasnivaju na sintezi veće količine endogenih antioksidansa, ili kompenzaciji preko unošenja antioksidanasa u organizam putem hrane.

2.2. Antioksidansi

Antioksidansi sprečavaju oksidaciju drugih materija, a u biološkim sistemima služe za neutralizaciju slobodnih radikala [12]. Iako različite materije mogu delovati kao antioksidansi, jedno im je zajedničko - sposobnost da stabilizuju ravnotežu nesparenih elektrona i neutrališu potencijalno štetno delovanje slobodnih radikala, a da istovremeno sami ne postanu nestabilni. Time podstiču očuvanje prirodne ravnoteže, sprečavajući oksidativni stres i njime uzrokovano oštećenje ćelija i tkiva - podlogu za razvoj mnoštva bolesti. Antioksidansi deluju na tri različita načina: oni mogu da snize energiju slobodnih radikala, spreče njihovo nastajanje ili prekinu lančanu reakciju oksidacije [12,52].

2.2.1. Vrste antioksidanasa

Antioksidansi se, primarno, dele na enzimске i neenzimске. Najznačajniji iz prve grupe su superoksid-dismutaza, glutacion-peroksidaza i katalaza [54]. Ova grupa enzima, između ostalih, katalizuje reakcije prevođenja, možda najagresivnijeg, superoksidnog radikala preko vodonik-peroksida do vode. U neenzimске antioksidanse ubrajaju se vitamin C, vitamin E, glutacion, karotenoidi, polifenoli i drugi [12,54]. U okviru ove grupe antioksidanasa, po poreklu se mogu izdvojiti još dve grupacije – prirodni i sintetski. U grupu sintetskih antioksidansa ubrajaju se BHT-E321 (butilhidroksi toluen), BHA-E320 (butilhidroksi anizol), PG-E 310

(propil galat) i zatim TBHQ (tercijarni butilhidrohinon) [24]. Nakon pojave sintetskih antioksidanasa u prehrambenoj industriji često se nametalo pitanje njihove sigurnosti po zdravlje čoveka, što je dalo povoda za sve veću potrebu njihove zamene prirodnim antioksidansima. Najkorisniji su oni antioksidansi koji su rastvorljivi u mastima i uljima, bez boje, ukusa i mirisa, netoksični i delotvorni u malim koncentracijama.

Osobine najznačajnijih neenzimskih vrsta antioksidanasa razmatrane su u daljem tekstu.

Vitamin C (askorbinska kiselina) je veoma važan i snažan antioksidans koji je aktivan u vodenim sredinama u telu, u organima poput pluća ili očnog sočiva [49]. Deluje sinergistički sa vitaminom E i karotenima (β -karotenom), kao i sa enzimskim antioksidansima [52,58]. Početni proizvod oksidacije askorbata je polu-dehidroaskorbat radikal ($\text{Asc}\bullet-$), slabo reaktivni radikal, koji može biti preveden nazad do askorbata od strane NADH-zavisnih enzima, a isto tako, i podleći razlaganju do dehidroksiaskorbata (DHA) [49]. Vitamin C poseduje sposobnost da se u sredini sa slobodnim radikalima prvi oksidiše i na taj način zaštiti druge antioksidanse, kao što su vitamin A i vitamin E. Preporučene doze kod odraslih su 40 mg dnevno u Evropi, a 60 mg dnevno u Americi [49].

Vitamin E je liposolubilni vitamin koji egzistira u osam različitih oblika [49]. Svaka forma ima sopstvenu biološku aktivnost i funkcionalnost u organizmu. α -tokoferol (alfa-tokoferol) je najaktivniji oblik vitamina E kod ljudi, i snažan antioksidans [49,52,58]. Deluje uglavnom u sprečavanju lipidne peroksidacije. Tokom sinergističkog delovanja sa askorbinskom kiselinom, α -tokoferol je preveden u radikal doniranjem labilnog vodonika lipidnom ili peroksilnom radikalu [49]. Oksidovani α -tokoferol radikal je energetski stabilan i slabo je reaktivan sa okolnim molekulima u okviru membrane. Ovaj oblik može biti re-redukovan do svoje originalne forme pomoću askorbinske kiseline. Regeneracija redukovanog α -tokoferola se verovatno odigrava na površini membrane, gde askorbinska kiselina i α -tokoferol mogu interagovati [49]. Preporučena doza vitamina E je 7-10 mg/dnevno [59].

Karotenoidi su najrasprostranjenija grupa pigmenata u biljnom svetu. Oni voću i povrću daju crvenu, žutu i narandžastu boju [49]. Postoji više od 600 vrsta i formi karotenoida, koji mogu biti grupisani u karotene, ksantofile (karoteni koji sadrže kiseonik) i likopene [49,52]. β -karoten (beta karoten) je najvažniji predstavnik ove grupe. To je antioksidans koji, pre svega, deluje preventivno na degenerativne procese u očima. Njihova antioksidativna aktivnost potiče

od konjugovanih dvostrukih veza u strukturi i svojstva delokalizacije nesparenih elektrona [49,58]. U principu, što je duži polienski lanac, veća je mogućnost stabilizacije peroksilnih radikala. Karotenoidi pretežno sprečavaju lipidnu peroksidaciju. Spekulišu se tri mehanizma reakcije karotenoida i slobodnih radikala ($\text{ROO}\bullet$, $\text{R}\bullet$): a) dodavanje radikala, b) izvlačenje vodonika iz karotenoida, c) reakcija prenosa elektrona [49].

Glutation (GSH) je tripeptid i glavni tiolni, multifunkcionalni, antioksidans. Prisutan je u citosolu, nukleusu i mitohondrijama [52]. Antioksidativni kapacitet tiolnih jedinjenja je, generalno, posledica atoma sumpora koji mogu lako nadoknaditi gubitak pojedinačnog elektrona. Sumporni radikali ($\text{GS}\bullet$) imaju duži polu-život od mnogih drugih radikalskih vrsta stvorenih u toku oksidativnog stresa [52]. Glutation deluje kao kofaktor nekoliko detoks-enzima u borbi protiv slobodnih radikala (npr. glutathion peroksidaza, glutathiontransferaza i dr.); učestvuje u prenosu amino kiselina kroz membransku plazmu; neutrališe hidroksil radikale, vodonik perokside i lipidne perokside katalizom pomoću glutathionperoksidaze; regeneriše neke od veoma važnih antioksidanasa (vitamine C i E) [52].

Polifenoli su najveća grupa sekundarnih metabolita biljaka sa različitim strukturama i funkcijama. Obuhvataju različite podgrupe fenola i fenolnih kiselina, gde se ubrajaju: hidroksibenzoeve kiseline, hidroksicimetine kiseline, flavonoidi, antocijanidini, proantocijanidini, izoflavoni [24]. Ono što je zajedničko za sve je jedan aromatičan prsten sa jednim ili više hidroksilnih supstituenata. Upravo je postojanje fenolne grupe ono što olakšava fenolima da posle doniranja elektrona ne postanu nestabilni slobodni radikali. Naime, atom kiseonika iz fenolne grupe zbog velike elektronegativnosti privlači delokalizovane π -elektrone iz benzenovog prstena, pri čemu se stvara centar negativnog naelektrisanja, što olakšava ovim jedinjenjima da otpuste jedan elektron, a da se njihova stabilnost pri tome ne naruši. Iako je kapacitet njihovog antioksidacionog potencijala uslovljen, pre svega, molekularnom strukturom, polifenoli kao grupa imaju najveću sposobnost inhibicije oksidativnih procesa u organizmu [58]. Smatra se da, pretežno, deluju kao terminatori lanaca reakcija slobodnih radikala i helatori redoks-aktivnih jona metala [52]. Oni brzo doniraju atome vodonika slobodnim radikalima (**j-na 2.8**).



Nastai fenoksi-radikali su relativno stabilni i ne iniciraju (odnosno, propagiraju) dalje radikalske reakcije [52]. Smatra se da je unos ukupnih polifenola oko 1 g/dnevno, kod osoba čija

je ishrana bogata voćem i povrćem (tu spadaju i voćni sokovi, vino, čaj, kafa, čokolada i pivo, a zatim i suve mahunarke i žitarice) [59].

Postoje i jedinjenja koja imaju relativno nisku specifičnu antioksidativnu aktivnost, na molarnoj bazi, međutim u visokim koncentracijama mogu značajno doprineti neutralisanju ukupnih slobodnih radikala. U tu grupu ubrajaju se slobodne amino kiseline, peptidi i proteini [50].

2.2.2. Antioksidansi u hrani

Razna epidemiološka istraživanja ukazuju da konzumiranje voća i povrća doprinosi održavanju homeostaze u organizmu i smanjenju smrtnosti od degenerativnih oboljenja [60]. Razlog tome je što se najveći broj antioksidanasa nalazi, upravo, u svežem voću i povrću. Lako ih je prepoznati, jer su antioksidansi najčešće pigmenti u hrani, koji joj daju boju [49].

Kako su u biljkama prisutne raznovrsne klase i vrste antioksidanasa, koristi se više testova određivanja njihove antioksidativne aktivnosti, uglavnom, u *in vitro* sistemima. Za procenu relevantnog doprinosa i predviđanje uticaja pojedinih antioksidanasa na oksidativni status bioloških sistema, neophodno je, dodatno, poznavanje bioraspoloživosti i metabolizma određenih antioksidansa iz hrane. Razlog tome je što se brojna jedinjenja iz hrane nakon apsorpcije mogu značajno modifikovati u organizmu, pri čemu njihova funkcionalnost može biti bitno promenjena [59].

U jednom sveobuhvatnom istraživanju, sprovedenom u Italiji, ispitivan je antioksidativni potencijal 34 najkonzumiranije vrste povrća, isto tako 30 vrste voća, 34 vrste napitaka i 6 vrste biljnih ulja [60]. Za merenje su korišćeni TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), TRAP (*total radicaltrapping antioxidant parameter*) i FRAP (*ferric reducing-antioxidant power*) standardni testovi, koji se zasnivaju na različitim hemijskim mehanizmima, a koji uključuju u razmatranje raznovrsnost i opseg delovanja antioksidanasa u određenim namirnicama. Pronađeno je da je iz grupe povrća, spanać ispoljio najveću antioksidativnu aktivnost (merenu preko TEAC i FRAP testova), a za njim paprika, dok je špargla bila najsnažniji antioksidans na osnovu rezultata TRAP testa. Iz grupe voća, najveće aktivnosti izmerene su u bobičastom voću (poput kupine, maline, crvene ribizle), bez obzira na test kojim je određivana. Kafa, iz grupe napitaka, pokazala se kao najsnažniji antioksidans, bez obzira na način pripreme ili tehnike merenja, a za

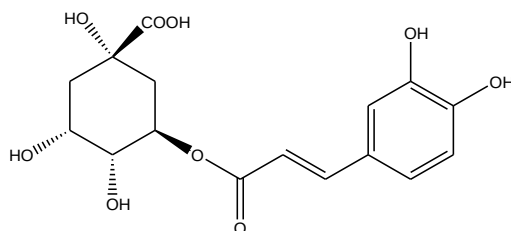
njom i voćni sokovi. Od ulja, sojino ulje je imalo najviši antioksidativni kapacitet, za njim ekstra devičansko maslinovo ulje, dok je ulje od kikirikija bilo manje efektivno [60].

Svilaas i sar. (2003) [45] su prilikom ispitivanja doprinosa različitih hranljivih namirnica na unos antioksidanasa, kod 61 odraslog ispitanika u Norveškoj, na osnovu 7-dnevnih *in vivo* testiranja, pronašli da je kafa imala dominantan doprinos, od 64% od ukupnog unosa antioksidanasa (razmatrano na dnevnom nivou konzumacije od ~ 480 mL). Za njom su redom bili rangirani voće (posebno bobičasto), čaj, vino, cerealije i povrće. U manjoj meri doprineli su konzumiranje ribe, mleka, mesa, čokolade i piva.

3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST KAFE

Antioksidativni potencijal kafe pripisuje se, u najvećoj meri, visokom sadržaju jedinjenja koja pripadaju grupi polifenola. Njihova koncentracija u sirovim zrnima varira u zavisnosti od vrste, porekla i uslova gajenja, a u pečenoj kafi od načina obrade i termičkog tretmana. Glavna polifenolna komponenta u kafi je hlorogenska kiselina, koja putem ove sirovine predstavlja i najznačajniji hranljivi izvor za čoveka [36].

Generalno, pod nazivom *hlorogenska kiselina* podrazumeva se klasa estara formirana od hinske kiseline i određenih *trans*-cimetnih kiselina [61], naročito kafeinske, ferulinske i p-kumarinske kiseline, od kojih svaka formira tri izomerna estera, prilikom povezivanja sa hidroksilnom grupom hinske kiseline u položajima 3, 4 i 5 [62]. Na osnovu toga su formirane kafeoilhinske kiseline, feruoilhinske kiseline i dikafeoilhinske kiseline [63]. Najdominantnija iz ove grupe, i ona koja je, gotovo, jedina komercijalno dostupna, primila je naziv hlorogenska kiselina (**slika 3.1**), odnosno 5-O-kafeoilhinska kiselina [61,62].



Slika 3.1. Strukturna formula hlorogenske kiseline

Empirijska formula hlorogenske kiseline je $C_{16}H_{18}O_9$, a njena molekulska masa iznosi 354.31 g/mol [24]. Hlorogenska kiselina egzistira u obliku finih praškastih kristalića, bele boje [47]. Tačka topljenja je 207-209 °C (~ 405°F) [64]. Hlorogenska kiselina se dobro rastvara u toploj vodi, alkoholu i acetonu, a pomalo u vodi na 25 °C i etil-acetatu. Hidroliza ove kiseline sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom daje kafeinsku i hinsku kiselinu [24]. U malim koncentracijama hlorogenska kiselina ima gorak ukus, dok u većim koncentracijama (1 g/L) ispoljava kiseo ukus. Smatra se važnim biosintetskim intermedijerom, posebno u sintezi lignina [65]. Hlorogenska kiselina u kafi povećava rastvorljivost kofeina i utiče na modulaciju ukusa [47].

Stvaranje hlorogenske kiseline u biljci (kafi) podstaknuto je sa nekoliko faktora, uključujući promene u spoljašnjim uslovima, stanje biljke, kao i infekcije patogenima [64]. Prisutna je, kako u sirovim, tako i u pečenim zrnima kafe. Međutim, pečenje kafe uzrokuje progresivnu destrukciju i transformaciju hlorogenske kiseline, koja iznosi 8 ± 10 % gubitaka na svakih 1% gubitka suve materije. U prvim fazama, izomerizacija hlorogenske kiseline je praćena parcijalnom hidrolizom, oslobađajući hinsku kiselinu i razne tipove cimetnih kiselina [61]. Visoka temperatura pečenja može transformisati hlorogensku kiselinu u hinolaktone, ali i melanoidine [47,66], složena jedinjenja-proizvode Majlardovih (*Maillard*) reakcija [42]. Tačnije, pretpostavlja se da se hlorogenska kiselina može i inkorporirati u pojedine fragmente u strukturi melanoidina [23].

Iako hlorogenska kiselina iz kafe važi za dragocen, jeftin izvor antioksidanasa, literaturni podaci o njoj i bioraspoloživosti hidroksicimetnih kiselina u organizmu čoveka, nakon konzumiranja kafe, uglavnom su oskudni, a često i kontradiktorni. Ipak, spekuliše se, u najvećoj meri, o antioksidativnom potencijalu, a zatim i antidijabetskom, antibakterijskom, antiinflamatornom, antikancerogenom i redukciji telesne težine, o čemu je prethodno bilo reči, u odeljku o fiziološkom delovanju kafe (odeljak **1.10**). Tom prilikom, napomenuto je da, pored hlorogenske kiseline, značajan udeo u antioksidativnoj aktivnosti mogu ispoljiti i druge komponente iz kafe, poput kofeina i melanoidina. Ispitivanja u cilju razjašnjenja mehanizama njihovog delovanja poslednjih godina posebno privlače pažnju mnogih istraživača [27].

3.1. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti kafe

Najčešće korišćene metode za određivanje antioksidativne aktivnosti kafe zasnivaju se, pretežno, na kolorimetrijskim merenjima, a po pitanju mehanizma delovanja, baziraju se na kapacitetima neutralisanja različitih vrsta slobodnih radikala, ili sposobnosti redukcije jona metala. S tim u vezi, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)*), ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) i TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) su najpoznatije metode kojima se ispituje mogućnost netralisanja azotovih, vodikanih i kiseoničnih vrsta slobodnih radikala, dok se FRAP (*ferric reducing/antioxidant power*) metodom određuje sposobnost redukcije metala gvožđa [67]. U reakcijama koje se odvijaju kod FRAP i ABTS metoda dolazi do transfera pojedinačnih elektrona; u ORAC metodi dolazi do prenosa vodonikovih atoma, dok se DPPH metoda zasniva

na kombinaciji oba tipa reakcija. FRAP, ABTS i DPPH za merenje koriste UV-VIS spektrofotometar, a za ORAC je potreban fluorimetar. Vreme odigravanja reakcije i trajanja razlikuje se od metode do metode, pri čemu se, po potrebi, uvode modifikacije u zavisnosti od tipa i kompleksnosti uzorka za analizu antioksidativnog potencijala. Prilikom odabira odgovarajuće metode uzimaju se u obzir mane i prednosti svake od njih. Pregled osnovnih nedostataka metoda za određivanje antioksidativnih aktivnosti dat je u **Tabeli 3.1.**

Tabela 3.1. Mane metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti [67]

Metoda	Glavni nedostaci
FRAP	- druga jedinjenja se mogu absorbovati na 595 nm - bilo koje jedinjenje sa redoks potencijalom nižim od 0.77 V može redukovati gvožđe
ABTS	- za uobičajenih 7 min trajanja metode, reakcija se ponekad ne završi - antioksidansi koji se određuju, pored toga što reaguju sa slobodnim radikalima, mogu reagovati i sa drugim jedinjenjima
DPPH	- druga jedinjenja se mogu absorbovati na 515 nm - mogu se javiti sterne smetnje kod većih molekula - korišćeni slobodni radikali su dosta stabilni, i nisu slični sa slobodnim radikalima prisutnim u živim organizmima
ORAC	- kinetika reakcije može varirati u zavisnosti od koncentracije antioksidanasa - prisutni proteini mogu uticati na tačnost merenja

Postoji nekoliko faktora koji mogu uticati na tačnost određivanja antioksidativnog kapaciteta uzorka. Jedan od njih je ekstrakciono sredstvo, odnosno rastvarač, s obzirom na to da polarnost rastvarača direktno utiče na mehanizam reakcije. Kao ekstrakciona sredstva se najčešće koriste: metanol, etanol, aceton, hloroform, voda i njihove smeše različitih molaliteta, a često se primenjuju i dvofazne ekstrakcije. Praksa je pokazala da je pronalazak rastvarača, koji bi u potpunosti zadovoljio potrebe ekstrakcije, naročito kod uzoraka kompleksnog sastava, veoma težak zadatak [67]. Kao drugi faktor, koji utiče na tačnost metoda, navodi se prisustvo određenih jedinjenja (npr. nekih aminokiselina) koja nisu antioksidansi, ali mogu uzeti učešće u reakciji i

time uticati na rezultat. Zbog toga je poželjno uzeti u razmatranje i sadržaj proteina i pojedinih aminokiselina u uzorku [67]. Ne treba zaboraviti i činjenicu da korišćenje samo jedne metode, ne može dati relevantne rezultate. Tako na primer, karotenoidi slabo neutrališu peroksil- radikale, dok pojedinačne kiseonične vrste mnogo uspešnije [43]. S tim u vezi, prilikom analize antioksidativnog potencijala nekog uzorka treba uzeti u obzir najmanje dve ili više metoda.

Kako je sadržaj polifenola u kafi merilo njene antioksidativne aktivnosti, vredni napomenuti osnovne metode kvantifikacije ove grupe jedinjenja u ispitivanim uzorcima. HPLC tehnika je jedna od najčešće primenjivanih metoda i odlikuje se velikom preciznošću [37]. Međutim, kako su polifenoli veoma široka grupa raznovrsnih oblika jedinjenja, usled korišćenja ograničenog broja standarda, često je teško odrediti njihov tačan sastav na ovaj način. Suprotno tome, kolorimetrijska merenja, poput Folin-Ciocalteu metode, mogu se jednostavno izvesti i odrediti približan broj ukupnih polifenola. Mana je što je u ovom slučaju teško otkloniti uticaj i drugih nefenolnih jedinjenja, poput redukovanih šećera ili vitamina C, koji se mogu naći u kompleksnom uzorku i, takođe, uzeti učešće u reakciji [37]. Izbor odgovarajuće metode, uglavnom, se bazira na investicionim troškovima i broju ispitivanih uzoraka.

3.2. Primeri istraživanja antioksidativne aktivnosti različitih vrsta i produkata kafe

Mnogi faktori utiču na antioksidativnu aktivnost različitih vrsta i produkata kafe. Tu se ubrajaju, pre svega, sastav i poreklo sirovog zrna, uslovi obrade, pečenja i usitnjavanja, a zatim i načini ekstrakcije prilikom pripreme napitaka. Madhava i sar. (2008) [42] pronašli su da je antioksidativna aktivnost sirove kafe vrste arabike bila nešto veća u odnosu na robustu, izražena preko inhibicije DPPH radikala. Dobijeni rezultati su bili u korelaciji sa sadržajem polifenola i hlorogenske kiseline u uzorcima. U istom istraživanju, smeša rastvarača izopropanola i vode u zapreminskom odnosu 60:40 dala je najviše prinose ekstrakata. U radu Upadhyay i sar. (2012) [68] ispitivana je mikrotalasna ekstrakcija hlorogenske kiseline, kofeina i ukupnih polifenola iz zelenih zrna robuste, pri čemu je antioksidativna aktivnost merena DPPH metodom. Mikrotalasna ekstrakcija se pokazala kao brza i pouzdana metoda, efikasnija u poređenju sa metodom klasične ekstrakcije zagrevanja refluksom [68]. Pri tom, voda je bila optimalan izbor rastvarača, verovatno usled najpovoljnije absorpcije mikrotalasne energije. Na taj način, došlo je do povećanja temperature u biljnoj matrici, razaranja ćelijskih zidova i oslobađanja unutarćelijskih komponenti u okolnu tečnu fazu, odnosno, rastvarač. Mullen i sar. (2011) [43]

sproveli su istraživanje o uticaju različitih ekstrakcionih tehnika sirove kafe za dobijanje ekstrakata sa antioksidativnom aktivnošću. Tom prilikom antioksidativni kapacitet ekstrakata meren je korišćenjem više standardizovanih testova (ORAC, HORAC, NORAC, SORAC, SOAC), u zavisnosti od vrste slobodnih radikala koje je trebalo neutralisati.

Način i uslovi pečenja kafe direktno su uticali na promene hemijskog sastava. Polifenoli su se delom razgrađivali, a u manjoj meri i inkorporirali u polimerne strukture. Sa druge strane, došlo je do stvaranja drugih vrsta jedinjenja, kao rezultat Majlardove reakcije, karamelizacije šećera i pirolize organskih jedinjenja. Neki istraživači smatraju da i ova jedinjenja doprinose povećanju antioksidativnog potencijala kafe [23,27,35]. Prema podacima Sánchez-González i sar. (2005) [35] antioksidativna aktivnost kafe značajno raste (oko 34 %) nakon 4 sata pečenja, pri čemu tamno-pečena kafa ima bolja antioksidativna svojstva od srednje pečene.

Neretko je ispitivan i antioksidativni potencijal različitih vrsta napitaka od kafe. Tom prilikom utvrđeno je da faktori poput odnosa rastvarača i čvrste faze, vreme trajanja, pritisak i temperatura na kojoj se ekstrakcija izvodi, u velikoj meri utiču na nivo antioksidativne aktivnosti [23,35,36,40].

Kako se poslednjih godina u savremenom društvu velika pažnja posvećuje otpadnim materijalima i njihovom ponovnom korišćenju, učinjeni su pokušaji da se i ostaci kafe iskoriste u razne svrhe, između ostalih i kao izvor prirodnih antioksidanasa. Iako je nivo polifenola u otpadnoj kafi niži nego u pečenoj, usled toga što su mnoga rastvorna jedinjenja bila ekstrahovana u napitak, ona i dalje ispoljava značajan antioksidativni potencijal. Pored polifenola, u otpadnoj kafi zaostaju i druga nefenolna jedinjenja, uključujući i melanoidine [7]. Cruz i sar. (2012) [39] ispitivali su antioksidativnu aktivnost otpadne espresso kafe, dok je druga grupa istraživača, na sličan način, izučavala otpadnu kafu nakon pripreme više vrsta napitaka (espresso, filter, moke i presovane) [11]. Murthy i Naidu (2012) [6] ispitivali su antioksidativna aktivnost nusproizvoda iz industrije prerade kafe – pulpa, ljuske, srebrna opna i otpadna kafa. Kao rastvarač je korišćena smeša izopropanola i vode, pri čemu su u ekstraktima pronađene značajne količine hlorogenske kiseline, kao nosioci antioksidativne aktivnosti. Jedna grupa istraživača iz Portugalijske koristila je sedam različitih vrsta gljiva roda *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* i *Neurospora* za rast na srebrnoj opni u cilju oslobađanja polifenola, što je sa druge strane uticalo na detoksifikaciju ovog materijala za potrebe pripreme stočne hrane ili njegovo bezbedno

odlaganje u okolinu [5]. Antioksidativni potencijal srebrne opne je ispitivan i od strane Borrelli i sar. (2004) [69].

4. EKSTRAKCIJA POLIFENOLA I DRUGIH ANTIOKSIDANASA

Za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz biljnih sirovina koriste se klasične tehnike koje se mogu razvrstati u tri osnovne grupe: destilacija, ekstrakcija rastvaračima i presovanje ili hladno ceđenje [70].

Ekstrakcija rastvaračima je najčešće primenjivana tehnika za izolaciju polifenola iz raznih biljnih sirovina [71]. To je tehnološka operacija pomoću koje se rastvorljivi sastojak čvrste ili tečne faze izoluje odgovarajućim rastvaračem. Ukoliko se rastvorljiva supstanca ekstrahuje iz čvrstog materijala, govori se o ekstrakciji čvrsto-tečno ili luženju, a ako se ekstrahuje iz tečnosti, onda se govori o ekstrakciji tečno-tečno [70].

Najčešće korišćeni rastvarači u ove svrhe su: etanol, glicerol, etilacetat, propilenglikol i petrol etar, dok se drugi organski rastvarači ređe koriste, uglavnom, zbog svoje toksičnosti [70]. Pri izboru rastvarača za ekstrakciju koristi se poznato pravilo – slično se rastvara u sličnom. Polarne supstance, sa visokim vrednostima dielektrične konstante, dobro se rastvaraju u polarnim rastvaračima i obrnuto. Prilikom izbora, takođe, treba posebno obratiti pažnju na hidrofилnost, dielektričnu konstantu, viskoznost i površinski napon rastvarača [70]. Vrsta odabranog rastvarača je od presudnog značaja na stepen i prinos ekstrakcije, ali i na ekonomičnost procesa.

Na tok ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz biljnih sirovina utiče veliki broj faktora, u okviru kojih se mogu izdvojiti dve grupe. To su, sa jedne strane, faktori koji su određeni tehnološkim karakteristikama biljne sirovine i, sa druge strane, faktori koji utiču na prenos mase unutar čestice biljne sirovine i u rastvoru [72]. U prvu grupu spadaju: stepen usitnjenosti sirovine, sadržaj vlage, površina čestice, sadržaj aktivnih i ekstraktivnih supstanci, brzina i stepen bubrenja biljne sirovine, kao i količina rastvarača koja je apsorbirana u biljnoj sirovini. Drugu grupu, karakterišu, pretežno, hidrodinamički uslovi (koji utiču na prenos mase kroz difuzioni podsloj i u masu rastvora), tip rastvarača (uslovljava stepen hidrofobnosti), način dovodenja rastvarača (utiče na perkolaciju), zatim i temperatura (može uslovljavati difuziju u sistemu) [72].

Na osnovu literaturnih podataka zabeleženo je da je najčešće primenjivani tip klasične čvrsto-tečne ekstrakcije, takozvana, ekstrakcija po Soksletu (*Soxhlet*). To je cirkulaciona metoda ekstrakcije, koja se izvodi u Soksletovoj aparaturi [70,73]. Izvodi se tako što najpre rastvarač

natapa biljni materijal i nakon dostizanja nivoa sifona, tečni ekstrakt biva presifoniran u posudu, gde se zagreva na temperaturu ključanja. Pare rastvarača, kroz za to namenjenu cevčicu, dospevaju u kondenzator, gde se hlade, kondenzuju i kap-po-kap ponovo natapaju biljni materijal. Ceo proces se ponavlja više puta, odnosno do potpunog iscrpljivanja biljne sirovine. Nakon završene ekstrakcije, dobijeni ekstrakt se podvrgava nekom od postupaka za odvajanje ekstraktivnih supstanci od rastvarača, kao što su: uparavanje do suva, destilacija ili reekstrakcija [70,73].

Za razliku od klasičnog tipa ekstrakcije, u poslednje vreme sve se više koriste nekonvencionalne ekstrakcione tehnike, poput super- i sub-kritične ekstrakcije, vrtložne ili turbo ekstrakcije i ekstrakcije pod dejstvom električne energije, mikrotalasa ili ultrazvuka. U principu, odlučujući uticaj na donošenje odluke o izboru i primeni tipa ekstrakcije imaju: količina prinosa, hemijski sastav i biološka aktivnost ekstrakata, kao i kinetika odigravanja određenog procesa.

4.1. Mikrotlasna ekstrakcija

Mikrotlasna ekstrakcija je proces koji koristi energiju mikrotalasa za zagrevanje rastvarača koji je u kontaktu sa čvrstim uzorcima, radi prevođenja željenih jedinjenja u rastvor, odnosno tečnu fazu [68,74]. Ekstrakcije se vrše u zatvorenim ili otvorenim sudovima u kojima rastvarač i uzorak dolaze u kontakt i onda uniformno izlažu mikrotalasnom zračenju [74].

Nedavna istraživanja pokazala su da mikrotlasna ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz kompleksnih prirodnih materijala, u poređenju sa klasičnom ekstrakcijom, nudi niz pogodnosti, koje se uglavnom ogledaju u smanjenju vremena trajanja procesa i utroška hemikalija – rastvarača [8,68]. Osnovna prednost mikrotalasnog zagrevanja bazira se na fokusiranom predavanju energije direktno reakcionoj smeši, što dovodi do drastičnog ubrzavanja procesa čije se vreme trajanja može skratiti i nekoliko stotina puta [68,75]. Takođe su primećeni i efekti selektivnog ubrzavanja procesa što je omogućilo veće reakcione prinose [75]. Na osnovu toga, ispitivanja dejstva mikrotalasa i njihova primena bivali su sve atraktivniji u mnogim oblastima, uključujući razne grane industrije (za potebe sušenja materijala, polimerizaciju, procesiranje hrane), analitičku hemiju (digestija uzoraka, spaljivanje, ekstrakcija), biohemiju (hidroliza proteina, sterilizacija), medicinu [75].

U elektromagnetnom spektru, oblast mikrotalasnog zračenja se nalazi između infracrvenog zračenja i radio talasa. Mikrotalasi imaju frekvenciju između 0.3 GHz i 300 GHz, što odgovara talasnim dužinama između 1 cm i 1 m [74]. Zagrevanje tečnih i čvrstih uzoraka mikrotalasima moguće je, uglavnom, opisati efektima dipolarne polarizacije i kondukcije [75]. Efekat dipolarne polarizacije vezan je za kretanje dipola u električnom polju. Usled dejstva električnog polja na naelektrisanja dipola nastaje Kulonova sila koja dovodi do rotacije dipola, odnosno do stvaranja ugaonog momenta. Dipol u jakom električnom polju može imati veliku energiju. Ukoliko među polarnim molekulima postoje međumolekulske sile, energija dipola usled rotacije može biti dovoljna za kidanje ovih veza. Makroskopski gledano, može se reći da mikrotalasno zagrevanje dipolarnim efektom potiče od molekularnog trenja izazvanog međumolekulskim silama. Pri tom, energija koja se dobija trenjem molekula biva ireverzibilno disipirana u masu uzorka [75]. Sa druge strane, kondukcioni efekat zagrevanja uzoraka mikrotalasima zasniva se na sledećem mehanizmu. Materijali koji sadrže pokretne jone zagrevaju se na osnovu translatornog kretanja jona. Solvatisani joni koji prate oscilacije polja (2.45 GHz) na svom putu će, takođe, uzrokovati kidanje i reformiranje međumolekulskih veza u okolnom rastvaraču i, na sličan način, kao kod dipolarne polarizacije dovoditi do neprestanog prevođenja mikrotalasne energije u toplotu [75].

Nedavno su u literaturi zabeleženi brojni slučajevi primene mikrotalasne ekstrakcije za potrebe izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz različitih vrsta prirodnih materijala i agroindustrijskog otpada [76,77,78,79,80,81,82,83]. U dobijenim ekstraktima izmerena su značajna antioksidativna svojstva, što je bilo od posebnog interesa za eksperimentalni deo ovog istraživanja.

5. ADSORPCIJA

Fenomen adsorpcije poznat je još iz doba Egipćana i Sumerijanaca. Sva rana otkrića adsorpcionog procesa bila su zasnovana isključivo na empirijskom nivou, dok je nešto sistematičniji pristup razvijen tek posle 1773 godine [84]. Definicija nastala u savremenom dobu glasi, da je adsorpcija proces nakupljanja i akumulacije supstance na površini između dve faze, poput čvrste i tečne ili čvrste i gasovite. Supstanca koja se akumulira naziva se adsorbat, a čvrsto telo na kome se adsorpcija odigrava naziva se adsorbent [22]. Tokom odvijanja procesa adsorpcije dolazi do interakcija između atoma i molekula adsorbata sa česticama čvrstog tela (adsorbenta). Na čvrstoj površini se nalaze mesta sa određenim elektronskim i sterim efektima koji su karakteristika osnovne strukture adsorbenta, i koji indukuju energetske heterogene nivoe energije, bazirane na stepenu interakcije sa adsorbatom [85]. Drugim rečima, na površini čvrstih tela postoje neizbalansirane sile privlačenja, koje su odgovorne za odigravanje procesa adsorpcije [22]. S tim u vezi, postoje tri različita tipa sorpcije [85]:

- Fizisorpcija - reverzibilna i brza sorpcija, uglavnom bazirana na relativno slabim Van der Valsovim (*Van der Walls*) silama, dipol-dipol silama, disperzionim silama, kao i indukcionim silama, koje su obično ispod 50 kJ/mol;
- Hemisorpcija – dolazi do stvaranja hemijskih veza između adsorbenta i adsorbata. Interakcione sile hemisorpcije su mnogo snažnije i smatra se da su u opsegu 60-450 kJ/mol;
- Jonosorpcija - tip sorpcije u kome dolazi do razmene jona.

Iako se, u osnovi, adsorpcija može odigrati u sistemu čvrsto-gas, u literaturi su uglavnom zabeleženi i razmatrani čvrsto-tečno sistemi. Malobrojni čvrsto-gas sistemi su, sa druge strane, svoju primenu pronašli u proizvodnji hrane, u procesima poput prečišćavanja otpadnog vazduha, uklanjanja masnoća, prečišćavanja gasova, posebno kiseonika i azota [85].

U analizi procesa adsorpcije, bitno je poznavati uticaj mnogobrojnih važnih procesnih promenljivih, kako bi se ostvario visok stepen efektivnosti i ekonomičnosti. Parametri koji su od posebnog značaja jesu, pre svega, karakteristike materijala – adsorbenta, svojstva reakcione sredine, kao i tip i vrsta adsorbata. Po pitanju adsorbenta, razmatra se njegova površina, funkcionalnost, poroznost, nepravilnosti, čvrsto vezane nečistoće, unutrašnja površina, veličina čestica, jonska jačina i pH. Temperatura, kao karakteristika reakcione sredine, je potencijalno

važan faktor i može uticati na adsorpciju na dva načina: (a) povećati brzinu transporta adsorbata do unutrašnjosti adsorbenta, usled smanjene viskoznosti rastvora i (b) izazvati promenu kapaciteta adsorbenta [86]. Takođe, visoke temperature mogu uticati na ireverzibilne interakcije [87]. U nekim slučajevima i prisustvo molekulskog kiseonika može uticati na proces [88,89,90]. Među bitnim uslovima reakcione sredine, ubrajaju se još i vrsta rastvarača, pH, jonska jačina, koncentracija rastvora i kompeticija među rastvornim supstancama, interakcija na granici površina. Na kraju, adsorbat utiče na celokupan proces preko svojstvenih fizičko-hemijskih karakteristika: strukture, rastvorljivosti u vodi, vrste naelektrisanja jona, tipa funkcionalnih grupa, vrednosti pKa, polarnosti, funkcionalnosti, molekulske mase i oblika [91,92]. Na adsorpciju podjednako utiče i tehnika izvođenja eksperimenta [86].

U poređenju sa ostalim tehnikama koje su sličnih karakteristika i performansi, adsorpcija zasluđuje veliku pažnju usled niza prednosti koje nudi: zahteva relativno male investicione troškove, jednostavnog je dizajna i lakog rukovanja, fleksibilna, rezistentna na prisustvo toksičnih materija, i što je veoma bitno, ne rezultuje stvaranjem štetnih supstanci [84,93,94,95].

Poslednjih godina našeg veka industrijska primena tehnologije adsorpcije je mnogostruka i raznovrsna. Pre svega, koristi se u tretmanima prečišćavanja (obezbojavanja i detoksifikacija) otpadnih i pijaćih voda, za vezivanje i izolovanje bio- i tehno-funkcionalnih komponenata iz različitih medijuma, za uklanjanje zagađujućih materija iz vazduha [85].

5.1. Osnovni principi

Osnovni principi fenomena adsorpcije zasnivaju se, pre svega, na izboru i vrsti materijala - adsorbenta. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenta uslovljavaju adsorpcioni kapacitet, koji je jedan od odličja efikasnosti i reprezentativnosti procesa. Mehanizam na kome se adsorpcija zasniva u velikoj meri zavisi od izbora tehnike i performansa. Za potpunije razumevanje odigravanja procesa, sprovode se analize odabira odgovarajućeg kinetičkog modela, a tako i ravnotežnih adsorpcionih izoterma, pomoću kojih bi se što preciznije aproksimirao aktuelni sistem. Kako je adsorpcija, u suštini, veoma kompleksan proces, pregled osnovnih principa prikazan je u daljem tekstu.

5.1.1. Izbor materijala - adsorbenta

Komercijalni adsorbenti su materijali jasno definisanih fizičko-hemijskih karakteristika, sa visoko izraženim adsorpcionim kapacitetima. Mnogi od njih, koji se, između ostalog, koriste u prehrambene svrhe, odobreni su od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (*Food and Drug Administration*, FDA) i Evropskog Saveta [85].

Sa druge strane, pojava alternativnih adsorbenata postaje sve atraktivniji pristup u izučavanju ovog procesa. Tu se ubrajaju, uglavnom, otpadni materijali agro- i raznih industrija. Njihovom primenom, najpre sa stanovišta zaštite životne sredine, može doći do smanjenja i nagomilavanja veoma štetnih zagađivača, a isto tako, pristupa se konceptu iskorišćenja industrijskog otpada kao polazne sirovine nekih drugih procesa. Ne treba zanemariti i ekonomsku stranu ovog pristupa, s obzirom da je reč o jeftinim ili materijalima bez cene koštanja, koji su opšte i svakodnevno prisutni oko nas.

5.1.1.1. Komercijalni adsorbenti

Najvažniji tipovi komercijalnih adsorbenata jesu aktivni ugalj, zeoliti, silika gelovi i sintetske smole [22].

5.1.1.1.1. Aktivni ugalj

Aktivni ugalj se smatra jednim od najpoznatijih adsorbenata. Sačinjen je od ugljenika životinjskog ili biljnog porekla, kao što su, kosti, ugalj, nafta, koks, ljuske oraha, treset, drvo, lignit [85]. Proces njegove pripreme se može podeliti u dve faze. Prva faza predstavlja proces karbonizacije, gde se uklanjaju neželjeni nus-proizvodi iz sirovog materijala, na temperaturi 400-600 °C, u atmosferi osiromašenoj kiseonikom. U drugoj fazi materijal se aktivira, što se postiže pomoću gasa ili hemijskom aktivacijom. Aktivacija gasom se izvodi na temperaturama od 750-1100 °C, za delimičnu gasifikaciju ugljenika sa vodenom parom, ugljen-dioksidom i kiseonikom, redom. Sa druge strane, hemijska aktivacija se izvodi pomoću dehidrovanih hemijskih agenasa, poput, kalijum-sulfida, sumporne kiseline, cink-hlorida i fosforne kiseline, na temperaturama od 350-600 °C. Pod ovakvim uslovima se karbonizacija, gasifikacija, i aktivacija mogu odigravati simultano [85]. Izborom sirovog materijala i kontrolisanjem uslova aktivacije, moguće je prilagoditi raspodelu i veličinu pora, te se može pripremiti i aktivni ugalj precizno definisanih karakteristika za tačno određene svrhe. Aktivni ugalj može imati površinu od 300 do 3000 m²/g i

zapremine pora od 0.7 do 1.8 cm³/g, a može egzistirati u obliku praha, granula ili peleta [85]. Raznovrsnost tipova aktivnog uglja pruža mogućnosti višestruke primene. Koristi se za adsorbovanje i uklanjanje neželjenih supstanci iz gasova, para i tečnosti u hemijskoj industriji, medicini, u tretmanu pijaće i otpadne vode, u tehnologiji ventilacija i klima uređaja, kao i za adsorpciono uklanjanje komponenti koje mogu uzrokovati kontaminacije i obojenja, ili mogu negativno uticati na miris i ukus hrane [96,97].

5.1.1.1.2. Zeolit

U grupu zeolita ubrajaju se oko 40 prirodnih i više od 150 sintetskih kristalnih alumosilikata alkalnih ili zemnoalkalnih elemenata, poput Na, K i Ca [85]. Njihova osnovna struktura je bazirana na tetraedru silicijuma (SiO₄) i aluminijuma (AlO₄), koji izgrađuju sekundarne poliedarne jedinice kocke, heksagonalnih prizmi, oktaedara ili nepotpunih oktaedara, redom, i koji su povezani preko kiseonikovih atoma. Trodimenzionalna kristalna mreža zeolita se sastoji od sekundarnih jedinica, koje izgrađuju rešetke povezane kanalima koji presecaju trodimenzionalnu strukturu. Veličina kanala je određena brojem Si i Al atoma, koji su međusobno povezani, kao i suprotnim jonima negativno naelektrisanog Al, koji može delom narušiti strukturu kanala i smanjiti njegovu veličinu. Razlike se mogu javiti kada je Ca²⁺ zamenjen sa Na⁺. Na veličinu kanala utiče i odnos Si/Al [85]. U današnje vreme, moguće je napraviti zeolit tačno određenih svojstava, jedinstvene površine i strukture, koji pri tom može biti i materijal visoko selektivnih karakteristika. Najčešće korišćeni zeoliti su tipa A, X i Y. Tip A je napravljen od dva povezana četvoročlana prstena nepotpunog oktaedra, a odnos Si/Al je 1. Tipovi X i Y se baziraju na oktaedru sa šestočlanim prstenovima nepotpunog oktaedra kao osnovnom strukturom, koji se međusobno razlikuju po odnosu Si/Al (za tip X je 1-1.5, a tip Y 1.5-3) [85]. Sinteza zeolita je dvostepeni proces, koji se sastoji od formiranja gela na temperaturi od 25 °C iz vodenog NaOH, NaAl(OH)₄ i Na₂SiO₃, verovatno usled kopolimerizacije silikata i aluminata, praćeno kristalizacijom u zatvorenom hidrotermalnom sistemu. Za ovakav proces je potrebno nekoliko sati do nekoliko dana na temperaturama sve do 175 °C. Dalje se mogu upotrebiti organski aditivi, poput organskih amina, uglavnom kvaternarnih amina, koji utiču na formiranje zeolita tokom kristalizacije [85]. Svojstvenu primenu pronašli su u mnogobrojnim sistemima [98,99].

5.1.1.1.3. Silika gelovi

Postoji više načina za dobijanje silika gelova, široko korišćenih amorfnih desikanata sa velikom sposobnošću vezivanja vode i njihovom lakom regeneracijom. Najčešći način sinteze zasniva se na hemijskoj precipitaciji alkalnog silikata, poput Na-silikata, sa kiselinama, uglavnom sumpornom, tokom mešanja na visokim temperaturama, čime dolazi do taloženja silicijumove kiseline [85]. Tokom dalje neutralizacije dolazi do polikondenzacije niskomolekularnih silicijumovih kiselina, koja vodi ka stvaranju koloidnih SiO_2 čestica, a koje se dalje uvećavaju do određenih razmera. Višak elektrolita povezuje se međusobno Van der Valsovim (*Van der Walls*) silama, što omogućava koagulaciju ovih čestica do aglomerata, a zatim do formiranja agregata, koji se dalje talože. Variranje koncentracije Si, pH i temperature, tokom polimerizacije, može uticati na formiranje silika gelova različitih zapremina pora i površina. Usled visokog adsorpcionog kapaciteta i jednostavne regeneracije, silika gelovi se najčešće primenjuju kao filter materijali, za punjenje kolona, u prehrambenoj industriji za dobijanje aroma u prahu, u kozmetici kao nosači aktivnih komponenata, kao dispergujuća sredstva, i u industriji boja za podešavanje viskoziteta [85].

5.1.1.1.4. Sintetske smole

Sintetske smole su polimerni adsorbenti sa velikom unutrašnjom površinom i mnogo konzistentnijom strukturom u poređenju sa aktivnim ugljem. Nastale su polikondenzacijom ili polimerizacijom, s tim što su proizvodi reakcije polimerizacije stabilniji u pogledu temperature ili uticaja hemijskih agenasa u odnosu na proizvode polikondenzacije [85]. Pod polimerizacijom se, generalno, podrazumeva stvaranje visokomolekularnih jedinjenja iz niskomolekularnih. Proizvodi polikondenzacije su dobijeni preko elektrofilne aromatične supstitucije fenolnih jedinjenja sa formaldehidom, pod kiselom ili baznom katalizom, i formirani su u postepenim reakcijama. Tip fenolnog jedinjenja i odnos prekursora, korišćenih za sintezu, definišu njihova svojstva. Polimeri formirani prema različitim mehanizmima mogu se dobiti u formi gela, makroretikularnoj formi ili u obliku hiperumreženih smola, koja bitno utiču na njihova svojstva i oblast primene [85]. Sintetske smole su pogodne i uobičajeno korišćene za izolovanje i regeneraciju aromatičnih jedinjenja poput polifenola, naftalena, pesticida, alkohola, ketona [100,101,102,103,104,105,106,107].

5.1.1.2. Alternativni adsorbenti

Priprema adsorbenata od otpadnih materijala ima nekoliko prednosti, uglavnom ekonomske prirode i sa aspekta zaštite životne sredine. Osim toga, poslednjih godina pojačana je akumulacija nus-proizvoda usled povećane proizvodnje industrijske hrane, što je dalje u vezi sa dodatnim troškovima po pitanju odlaganja ovakvog otpada. Agroindustrijski materijali, posebno oni koji sadrže celulozu, ispoljavaju značajne sorpcione kapacitete prema raznim tipovima zagađivača [22]. Osnovni sastav agroindustrijskog otpada čine hemiseluloza, lignin, lipidi, proteini, prosti šećeri, voda, skrob, koji karakteriše veliki broj funkcionalnih grupa [22]. Ovi materijali su ekonomični i eko-prihvatljivi usled njihovog jedinstvenog hemijskog sastava, dostupnosti, obnovljivosti i pored svega su jeftini ili bez cene koštanja. Treba imati u vidu i to da je ekonomska izvodljivost adsorpcionog procesa uslovljena, između ostalog, troškovima koji potiču od regeneracije iscrpljenog materijala. U slučajevima gde je ovaj procesni korak opravdan, onda se pristupa obnovi adsorbenta, u cilju njegovog ponovnog iskorišćenja. Uglavnom se regeneracija odnosi na komercijalne adsorbente, a retko na alternativne.

Postoji širok spektar jeftinih adsorbenata od raznih otpadnih materijala kako iz agroindustrije, tako i poreklom od gradskog otpada. Pre početka procesa, ovi materijali su iskorišćavani u svom nativnom obliku, ili nakon određenih fizičkih i hemijskih modifikacija.

5.1.1.2.1. Adsorbenti od otpadnih materijala agroindustrije

Riža (*Oryza sativa*) je jedan od glavnih useva koji se gaje širom sveta i predstavlja osnovnu hranu velikog dela ljudske populacije. Svetska proizvodnja pirinča je u stalnom porastu, a kao posledica, pri preradi, stvara se više vrsta nus-proizvoda, poput ljuski, trupa pirinča, pepela, pirinčanih mekinja [22]. U svojstvu adsorbenta, ispitivano je uklanjanje metala As iz vode, jona Sb, Pb i Hg [108], kao i jona Cd [109]. Utvrđeno je da, čak i najjednostavnije, modifikacije adsorbentata poreklom od riže utiču na povećanje kapaciteta. Nakon tretmana sa fosfornom kiselinom utvrđeno je da uspešno adsorbuje nikal [22]. Relativno lako vezuje boje (kako kisele tako i bazne [110]), a tako i fenole [111,112]. Ispitivana je i mogućnost vezivanja i uklanjanja pesticida, i ostalih zagađivača iz otpadnih voda [22].

Pšenica (*Triticum spp*) je sledeća veoma važna namirnica, koja se uglavnom koristi za dobijanje brašna. I u ovom slučaju tokom prerade nastaju velike količine nus-proizvoda, poput

pšeničnih mekinja, ljuski. Mekinje su iskorišćene za uklanjanje Cd (II) iz otpadnih voda, Pb (II), boja [22].

Čaj potiče od biljke *Camellia sinensis* i predstavlja veoma popularno piće širom sveta. Otpadni listovi čaja su ispitivani kao adsorbenti u različite svrhe: za uklanjanje Pb, Fe, Zn i Ni iz vode [113], a isto tako i jona Cu [114]. Pronađeno je da je adsorpcija teških metala u strogoj zavisnosti od pH, vremena kontakta, koncentracije jona, količine adsorbenta [22]. Pored jona metala, ispitivano je i vezivanje i uklanjanje boja [115,116,117], a i drugih vrsta zagađivača iz voda [118].

Kafa (*Coffea*) se smatra drugim po redu najkonzumiranim pićem na svetu, odmah posle vode. Tokom obrade, stvara se nekoliko vrsta otpadnih materijala, od početnih faza na plantažama u zemljama proizvođačima, do krajnjih, nakon pripreme napitaka. Usled velike važnosti u svakodnevnom životu, svetska proizvodnja kafe je u stalnom porastu, a s tim u vezi i generisanje otpadaka. Zbog toga, posebna pažnja posvećena je pregledu adsorpcionih karakteristika materijala od kafe (u odeljku 6), koji se u poređenju sa ostalim otpadnim adsorbentima, smatraju veoma uspešnim i visokih kapaciteta.

Kokos (*Cocos nucifera*) je veoma nutritivan i bogat vlaknima, vitaminima i mineralima. Kokosove palme rastu u preko 80 zemalja u svetu [22]. Otpad čine ljuske, kokosova srž, muški cvetovi kokosovog drveta, itd. U svojstvu adsorbenata, iskorišćeni su za uklanjanje jona metala Pb (II), Co (II), Cr (III) i Ni (II), boja [119], fenola i ostalih zagađivača.

Kikiriki (*Arachis hypogaea*) je ispitivan za potrebe uklanjanja Cd i Pb iz otpadnih voda [1]. Vršene su i modifikacije površine, u cilju što uspešnijeg uklanjanja Hg (II), kao i Cd (II), Cu (II), Ni (II), Pb (II), i Zn (II) [22].

Kore različitih vrsta voća - pomorandže, banane, lubenice, kasave, manga itd., su, takođe, korišćene za pripremu adsorbenata, radi uklanjanja više vrsta zagađivača iz otpadnih voda. Kore od pomorandže su ispitivane na kapacitet vezivanja Ni (II), Cu [120], a nakon hemijskih modifikacija i za uklanjanje Co (II), Ni (II), Zn (II) i Cd (II) iz vodenih rastvora. Uspešno je sprovedeno i vezivanje boja [121,122]. Kore od banane pokazuju dobra adsorpciona svojstva za uklanjanje Cd (II) iz otpadnih voda, kao i Cr (VI), fenola [123]. U jednom komparativnom istraživanju je utvrđeno da kore od banane uspešnije uklanjaju (imaju veći adsorpcioni kapacitet)

boje u odnosu na kore od pomorandže [22]. Termički tretirane kore od lubenice imaju sposobnost vezivanja pesticida. Fizički i hemijski modifikovane kore od kasave uklanjaju boje i jone metala iz vodenih rastvora. Kore grejpfruta su iskorišćene za uklanjanje Cd (II), a kore manga za Cd (II) i Pb (II) kao i Cu (II), Ni (II) i Zn (II). Adsorpcija boja je izvedena na adsorbentu od marakuje i kore od mandarine [124], a sličnih kapaciteta su i ljuske belog luka. Razne vrste kora su iskorišćene za uklanjanje ostalih vrsta zagađivača [22].

Aktivirane ljuske kestena testirane su na uklanjanje Pb (II), Cu (II) i Zn (II) iz vodenih rastvora, a sirovi brazilski orah za uklanjanje boja. Za adsorbovanje jona metala iskorišćeni su i materijali od ljuski lešnika (*Corylus avellana*), badema (*Prunus dulcis*) i oraha (*Juglans*). Adsorpcija fenolnih jedinjenja iz otpadnih voda prerade maslina izvedena je pomoću aktivnih ugljeva pripremljenih od ljuski maslina [125].

Seme papaje, seme bundeve [126] i otpad od ananasa iskorišćeni su za adsorpciju boje metilen plave iz vodenih rastvora. Seme indijske urme nakon aktivacije testirano je na vezivanje metala Cr (VI), semena guave i manga za boje i fenole [127], peteljke od grožđa iz proizvodnje vina za metale Cu i Ni [128], a suncokretove peteljke na adsorpciju više vrsta boja, kao i jona metala Cu, Cd, Zn i Cr [22].

Zadovoljavajući adsorpcioni kapaciteti za vezivanje metala zabeleženi su za klip kukuruza i plod palme, osušenu pulpu šećerne repe, slamu od ječma, otpatke šećerne trske, koja se pokazala i uspešnim adsorbentom za boje [22]. Za uklanjanje boja iskorišćene su i ljuske prosa za adsorpciju metilen plavo, pamuk za remazol crnu B boju. Termički aktiviran kukuruzni klip iskorišćen je za adsorpciju 2,4-dihlorfenola, a hemijski modifikovan za uklanjanje tri metalna jona. Pri tom je utvrđen sledeći redosled uspešnosti adsorbovanja: $Zn > Ni > Cd$ [1]. Postoji još dosta literaturnih podataka o adsorpcijama više tipova adsorbata na poljoprivrednom otpadu [129,130,131,132,133,134,135].

5.1.1.2.2. Industrijski i gradski otpad kao adsorbenti

Industrijski otpad je dostupan u sve većim količinama i njegovo gomilanje, usled toksičnosti i štetnog delovanja, predstavlja faktor visokog rizika po ljudsko zdravlje. Kako bi se smanjile količine koje se otpuštaju u životnu sredinu, pristupilo se konvertovanju ovog materijala

i pripremi alternativnih adsorbenta. Neki od tipova ovih vrsta otpada su predstavljeni u daljem tekstu.

Glavni čvrsti otpad i nus-proizvod termoelektrana u kojima se spaljuje uglj je pepeo. Uglavnom se koristi za igradnju cigli i cementa. Visok sadržaj silicijuma i aluminijuma čini njegovu primenu širokom. Bez predtretmana se koristi za uklanjanje jona metala Cu (II), Hg (II), Pb (II) [22]. Posebna vrsta pepela obogaćena gvožđem je primenjena za uklanjanje metala As iz otpadnih voda [22]. Pepeo je iskorišćen i za uklanjanje fenola, katjonskih i anjonskih boja [136,137]. Hemijski modifikovan pepeo ispitivan je na uklanjanje fluora iz pijaćih voda, kao i fosfata [22].

Šljaka iz viskoha peći je ispitivana na uklanjanje jona Cu (II), Ni (II), i Zn (II), kao i Pb (II), As (III) iz voda, zatim fosfata i boja, a zabeležene su i druge vrste zagađivača [22]. Takođe, mulj iz viskoke peći je testiran na uklanjanje više toksičnih jona Pb (II), Ni (II), Cd (II), Cu (II), Zn (II) i CN^- . Prašina iz visoke peći je testirana na vezivanje Cr (VI) [22].

Otpad iz industrije aluminijuma nastaje tokom prerade boksita. Ispitivan je za tretman otpadnih voda, na vezivanje Cu (II), Zn (II), Ni (II) i Cd (II), Pb (II), As. Primećeno je da toplotni i kiselinski tretman poboljšavaju njegove adsorpcione kapacitete [22]. Podjednako je efikasan za uklanjanje fluora, fosfata, fenola. Crveni mulj zajedno sa pepelom su iskorišćeni za vezivanje metilen plave boje [138], pri čemu je pepeo ispoljio bolje adsorpcione kapacitete.

Otpad iz industrije đubriva predstavlja ozbiljan problem odlaganja i zagađenja okoline. Fe (III)/Cr (III) hidroksidi, kao otpadni materijali iz ove industrije, su iskorišćeni za adsorpciju Cr (VI), kao i As (V), fosfata, fenola iz vodenih rastvora [22]. Mulj (još jedan otpadni proizvod) je iskorišćen za uklanjanje Cu (II), Cr (VI), Hg (II), i Pb (II), boja, fenola, anjona, pesticida i primećeno je da ispoljava zadovoljavajuće adsorpcione kapacitete [22].

Prašina i čvrsti ostaci iz industrije kože testirani su na uklanjanje boja i metala Cr (VI) i As (V) iz vodenih sredina [22].

Crno obojeni efluenti iz industrije papira upotrebljeni su za vezivanje jona Pb (II) i Zn (II), dok su muljevi testirani na uklanjanje fenola i boja. I otpadne novine su iskorišćene za proizvodnju aktivnog uglja za razne svrhe [22]. Primećeno je da je najveće uklanjanje Cu (II) postignuto sa muljem iz kojeg je prethodno uklonjeno mastilo. Razlog može biti visok sadržaj

oksidovanih površinskih grupa, veliki prosečni prečnik pora, visok nivo CaCO_3 , kao i visok nivo razmene sadržaja jona Ca i Mg [22].

Hromni mulj, otpadni proizvod procesa galvanizacije, ispitivan je za uklanjanje As (V) i boja, a tu spada je metalohidroksidni mulj (testiran na uklanjanje boja) [22]. Kanalizacioni mulj je adsorbovao boje, a on je i hemijski modifikovan sa ciljem vezivanja jona Cu, fenola i boja [139]. Mulj iz destilerija iskorišćen je za uklanjanje Cr (VI) iz vodenih rastvora [22].

Čvrst otpad iz destilerija iskorišćen je za uklanjanje anjonskih boja iz vodenih sredina, a otpad iz industrije baterija za neke jone metala (Pb, Cu, Cr i Zn) iz vodenih rastvora [22]. Boje su se uspešno adsorbovale i na materijal od piljevine [140], a interesantno, testiran je i otpad nastao od prerade zimzelenog bora [22].

5.1.1.2.3. Biomasa (živa i neživa) kao adsorbent

Adsorpcija na živom ili neživom biomasi je relativno novi pristup, koji je kompetitivan u poređenju sa komercijalnim adsorbentima, efektivan i ekonomičan. Nije retkost da je ova vrsta alternativnih adsorbenata često selektivnija i boljih adsorpcionih karakteristika, u odnosu na komercijalne aktivne ugljeve [93].

Među živom i neživom mikrobnom biomasom, mnogi istraživači su u svojstvu adsorbenata ispitivali gljive, alge, razne mikrobne kulture. Na biomasi više vrsta gljiva adsorbovane su boje [141,142,143,144,145], kao i joni metala Cu [146], Cr (VI) [147], Pb (II) [148]. Najvažnije među njima ubrajaju se u vrste *Penicillium* sp., *Asperillus* sp., *Trichoderma* sp., i ostale. Pekarski kvasac je testiran na efikasnost adsorbovanja boje [149], a pronađeno je da se kiselinom tretmanom postiže znatno povećani adsorpcioni kapacitet u odnosu na netretirane uzorke [150]. Najčešće korišćene alge u adsorpcione svrhe bile su *Spirulina platensis* [151,152], *Chlorella* [153], *Nostoc linckia* [154,155], *Enteromorpha prolifera* [156,157] i više vrsta braon makroalgi [158], a kao adsorbati upotrebljene su boje i joni više vrsta metala. Od bakterija, posebna pažnja je posvećena *Bacillus* vrstama, koje su iskorišćavane i kao imobilisane, na vezivanje jona Pb, Cu, Cr, Ni, Zn [159,160,161]. Biosorpcija Pb je ispitivana i na biomasi *Aeromonas hydrophila* [162], a biosorpcija Ni (II) pomoću *Leucobacter* sp. N-4 [163]. Boje su adsorbovane na biomasi *Corynebacterium glutamicum* imobilisanoj na alginatnim i polisulfonskim matricama [164], zatim na živoj i termički tretiranoj biomasi *Pseudomonas* sp.

vrste DY1 [165] i neživoj biomasi *Streptomyces rimosus*. Sprovedena je i analiza kompetitivne biosorpcije orto-krezola, fenola, hlorofenola i hroma (VI) na aktivnom uglju obloženom bakterijskim biofilmom [166].

Svi pokušaji biosorpcija su još uvek u razvojnem stadijumu i zahtevaju još dosta istraživačkog rada.

5.1.2. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenata

Već je napomenuto da je u analizi procesa adsorpcije bitno poznavati, između ostalih parametara, i fizičko-hemijske karakteristike primenjenog adsorbenta. Najvažnije među njima su navedene u daljem tekstu.

5.1.2.1. Raspodela čestica

Raspodela čestica je važna u pogledu uticaja na pad pritiska tokom odigravanja procesa koji se sprovodi u reakcionoj koloni, tačnije, prilikom propuštanja tečne faze kroz adsorpcionu kolonu, a sa druge strane utiče i na nivo prenosa mase [85]. U principu, sa smanjenjem veličine čestica raste pad pritiska, kao i prenos mase usled kraćih difuzionih delova. Za karakterizaciju raspodele veličine čestica uobičajeno se koristi prosečni prečnik čestice [85].

5.1.2.2. Unutrašnja površina

Unutrašnja ili specifična površina je uobičajeno veća od spoljne površine adsorbenta i ona predstavlja mesto na kome se odvija adsorpcija. Usled toga, prilikom donošenja odluke odabira određenog adsorbenta, ovaj parametar je od posebnog značaja. Podrazumeva se da je preporuka odabrati onaj adsorbent sa maksimalnom unutrašnjom površinom. Usled činjenice da je unutrašnja površina obrnuto proporcionalna prečniku pora, molekulska masa adsorbenta predstavlja glavno ograničenje njegove primene, zato što ako je prečnik pore premali, adsorbat neće moći da difunduje [85].

5.1.2.3. Gustina

Gustina materijala se može odnositi na gustinu pojedinačne čestice (čestična) i gustinu rasutih čestica (nasipna).

Čestična gustina može biti: a) stvarna gustina, koja predstavlja količnik mase suve materije adsorbenta i zapremine, ne uzimajući u obzir zapreminu pora, b) očišćena gustina, koja je količnik mase suve materije adsorbenta i ukupne zapremine uključujući i zapreminu pora, ili c) vlažna gustina, koja podrazumeva masu vlažnog adsorbenta podeljenu ukupnom zapreminom, uključujući i zapreminu pora popunjenu tečnošću [85].

Nasipna gustina se može odnositi na: a) ukupnu gustinu, koja predstavlja količinu adsorbenta neophodnu da popuni sud koji je izdelfjen po zapremini, uključujući i unutarčestičnu zapreminu, b) filter obimna gustina, koja se definiše kao obimna gustina merena nakon pojedinačnog propuštanja, ili c) vibrirajuća gustina, koja je, zapravo, obimna gustina merena tokom vibracija prilikom procesa punjenja [85].

5.1.2.4. Poroznost

Može se razmatrati poroznost pojedinačne čestice i ukupna poroznost materijala. Unutrašnja poroznost pojedinačne čestice je veličina zapremine pore u odnosu na ukupnu zapreminu čestice adsorbenta. Grupna poroznost ili spoljna poroznost je mera unutrašnjeg prostora između čestica adsorbenta. Utvrđeno je da poroznost materijala raste sa porastom specifične površine [21,85].

5.1.2.5. Raspodela prečnika pora

Raznovrsnost prečnika pora ima veliki uticaj na difuziju rastvorenih materija u adsorbentu. Prečnik je klasifikovan u skladu sa standardima Internacionalne unije čiste i primenjene hemije (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC). S tim u vezi, pore sa prečnikom < 0.4 nm nazivaju se podmikropore, mikropore su prečnika 0.1-2.0 nm, mezopore 2.0-50 nm, a makropore preko 50 nm [85]. S obzirom na ovoliku raznolikost, smatra se da svaka klasa za sebe ispoljava posebne adsorpcione funkcije. Makro- i mezopore omogućavaju transport rastvorenih molekula, dok se adsorpcija odigrava unutar mikropora.

5.1.3. Tehnike određivanja fizičko-hemijskih karakteristika adsorbenata

Postoji veliki broj karakterizacionih tehnika koje služe za proučavanje aktivnih centara na površini adsorbenata, njihove građe, reaktivnosti i mogućnosti ciljane modifikacije, u zavisnosti od različitih oblasti primene. Uzimajući u obzir složenost strukture adsorbenata, primena jedne

metode se smatra nedovoljnom za njihovu potpunu karakterizaciju. Stoga se u praksi koristi veći broj komplementarnih karakterizacionih metoda koje se zasnivaju na kiselinsko-baznim titracijama, instrumentalnim tehnikama, koje koriste razne vrste zračenja ili jako elektromagnetno polje, sistemima za ispitivanje termodinamičkih parametara itd. [167]. Neke od njih predstavljene su u daljem tekstu.

5.1.3.1. Određivanje specifične površine i zapremine pora

Specifična površina i zapremina pora se, uglavnom, određuju na bazi principa adsorpcije gasa [168]. Iz uzoraka se pre merenja istisne gas na 200 °C pod protokom azota u trajanju od 3 sata, pri čemu se specifična površina izračunava korišćenjem BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) jednačine (**j-na 5.1**):

$$c = c_m \frac{Kp}{(p_0 + (K-1)p) \times (1 - \frac{p}{p_0})} \quad (5.1)$$

gde je c (mol/g) količina koja je adsorbovana pod ravnotežnim uslovima, c_m (mol/g) količina adsorbovana u monosloju, K konstanta (koja se dobija iz monoslojnog kapaciteta azota [167]), p_0 čini pritisak zasićenja pare i p adsorpcioni parcijalni pritisak [85].

Ukupna zapremina pora (V) se procenjuje kao zapremina tečnog azota pri relativnom pritisku (p/p_0) 0.95. Za izračunavanje zapremine mikropora (V_{mic}) koristi se jednačina Dubinin-Raduškevič (*Dubinin-Radushkevich*, D–R, **j-na 5.2**):

$$\log V - \log V_{mic} = D \left(\log \left(\frac{p}{p_0} \right) \right)^2 \quad (5.2)$$

gde je p_0 pritisak zasićenja, D je konstanta, i V_{mic} je ukupna zapremina mikropora [168].

Zapremina mezopora se dobija oduzimanjem zapremine mikropora od ukupne zapremine pora. Prosečni prečnici pora se određuju iz BET površine i ukupne zapremine pora ($Dp - 4V_{tot}/S_{BET}$) pod pretpostavkom modela cilindričnih pora sa otvorenim krajevima bez stvaranja mreže pora [168,169].

Raspodela veličina pora se određuje korišćenjem BJH (*Barrett–Joyner–Halenda*) metode, koja se zasniva na pretpostavljenom modelu cilindričnih pora otvorenih krajeva [170].

5.1.3.2. Analize elemenata i udela u strukturi

Maseni sastav (%) ugljenika, vodonika, azota, kiseonika, sumpora i fosfora se određuje sagorevanjem materijala - adsorbenta na visokim temperaturama (od oko 1000 °C) [171]. Detekcija dobijenih gasova zavisi od samog instrumenta i može biti kulometrijska, hemiluminiscentna ili bazirana na elektrohemijским senzorima [167].

5.1.3.3. Karakterizacija površine adsorbenta

Na površini adsorbenta mogu se detektovati vrste funkcionalnih grupa, kisela i bazna mesta, odrediti ukupno naelektrisanje, kao i vizuelno uočiti raspored i struktura pora.

5.1.3.3.1. Oksidovane površinske grupe

Oksidovane površinske grupe se određuju Boemovom (*Boehm*) titracijom [172]. To je jedna od najčešće korišćenih metoda za merenje kiselih grupa na površini adsorbenta [172]. Zasniva na selektivnoj neutralizaciji kiselih kiseoničnih funkcionalnih grupa serijom baza različitih jačina, uz pretpostavku da se svaka kisela funkcionalna grupa date konstante pKa može neutralizovati bazom koja ima veću vrednost ove konstante [167]. U metodi se koriste natrijum-hidrogenkarbonat (pKa=6,37), natrijum-karbonat (pKa=10,25) i natrijum hidroksid (pKa=15,74). Smatra se da natrijum-hidrogenkarbonat neutralizuje samo karboksilne grupe, natrijum-karbonat karboksilne i fenolne grupe, a natrijum-hidroksid sve prisutne kisele grupe na površini aktivnog uglja [167,168].

5.1.3.3.2. Kisela i bazna mesta na površini

Kisela i bazna mesta na površini se određuju kiselinsko-baznom titracijom [21]. Materijal se tretira rastvorom NaOH ili HCl (0.1 mol/L) i suspenzija meša 48 h. Nakon filtriranja, višak baze i kiseline u filtratima se titriše sa HCl ili NaOH. Broj kiselih i baznih mesta izračunava se iz utrošene količine HCl i NaOH tokom titrisanja, redom [19,173].

5.1.3.3.3. Tačka nultog naelektrisanja (pH_{pzc})

pH_{pzc} je tačka nultog naelektrisanja površine adsorbenta, odnosno, pH vrednost na kojoj je površina čvrste faze nenaelektrisana [174]. Određuje se u smeši adsorbenta i vodenog rastvora 0.01 mol/L NaCl, pri čemu je početni pH podešen sukcesivno na vrednosti redom od 2 do 12, u odgovarajućem broju sudova. Suspenzije se mešaju 48 h, na sobnoj temperaturi. Krajnji pH je

meren i označen na grafiku u odnosu na početni pH, gde je pH_{pzc} tačka preseka dveju krivih na grafiku [171].

5.1.3.3.4. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija se izvodi na FT-IR spektrometru na sobnoj temperaturi, u oblasti talasnih brojeva $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Na frekvencijama na kojima dolazi do apsorpcije zračenja javljaju se apsorpcioni maksimumi, koji odgovaraju pojedinim energijama veza. Različiti pikovi u spektru odgovaraju različitim vibracijama u molekulu, koje mogu biti: a) valencione (γ) simetrične i asimetrične, a koje potiču od promene dužine, i b) deformacione vibracije (δ) poreklom od promena uglova hemijske veze [167,171,175].

Pre snimanja, čvrsti uzorci se, uglavnom, pripremaju presovanjem male količine adsorbenta u odgovarajućem odnosu sa kristalnim kalijum-bromidom u obliku pločice (pilule ili diska) [175].

5.1.3.3.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija – SEM

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM - *scanning electron microscope*) je vrsta mikroskopa koja produkuje mikrografe površine uzorka, pomoću snopa elektrona visoke energije, koji interagujući sa površinom uzorka daje odgovarajući signal [167]. Na skenirajućem elektronskom mikroskopu su moguća uvećanja od 10 do 500.000 puta, pri čemu elektronski zrak, obično, ima energiju od 0.5 do 40 keV [167]. Da bi se uzorak mogao posmatrati, prevlači se tankim slojem elektroprovodnog materijala, najčešće zlatom. Na osnovu izgleda dobijenih mikrografa izučava se topografija površine adsorbenta.

5.1.3.4. Merenje gustine

Čestična gustina se meri piknometrom i odnosi se na gustinu same čvrste faze – adsorbenta, pri čemu se vazduh prisutan između čestica na ovaj način eliminiše, dok nasipna gustina predstavlja odnos na vagi izmerene mase materijala i njegove grubo određene zapremine u graduisanom sudu [167,168].

5.1.3.5. *Određivanje nivoa aktivacije adsorbenta*

Jodov broj je mera koja ukazuje na nivo aktivacije adsorbenta [18], a određuje se po proceduri utvrđenoj Metodom Standardnog Testa (ASTM D4607-86) [18]. Uobičajeno je da adsorbenti sa visokim jodovim brojem imaju veliku dostupnu površinu i pogodni su za adsorbovanje malih jedinjenja.

5.2. *Izražavanje efikasnosti procesa adsorpcije*

Efikasnost procesa adsorpcije, odnosno procena opravdanosti izvođenja, može se odrediti jednostavnim izračunavanjem vrednosti adsorpcionog kapaciteta, kao i količine adsorbovane materije. Ove vrednosti predstavljaju osnovu komparacije rezultata predstavljenih u literaturi i uspešnosti odigravanja odgovarajućih procesa.

5.2.1. *Adsorpcioni kapacitet*

Adsorpcioni kapacitet se u literaturi, uobičajeno, obeležava oznakom q_e i izražava jedinicom mg/g (mg adsorbata po g adsorbenta). Izračunava se na osnovu poznatih vrednosti početne i ravnotežne koncentracije adsorbata u reakcionoj sredini (rastvoru), prema sledećoj jednakosti (**j-na 5.3**):

$$q_e = \frac{V(C_i - C_e)}{W} \quad (5.3)$$

gde je V zapremina rastvora (L), C_i i C_e su početna i ravnotežna koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/L), redom, i W je masa suve materije adsorbenta (g) [142].

5.2.2. *Količina adsorbovane materije*

Količina adsorbovane materije se, takođe, izračunava na osnovu početne i ravnotežne koncentracije adsorbata u rastvoru i izražava u procentima, prema sledećoj jednakosti (**j-na 5.4**) [176]:

$$\text{Količina adsorbovane materije (\%)} = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \times 100 \quad (5.4)$$

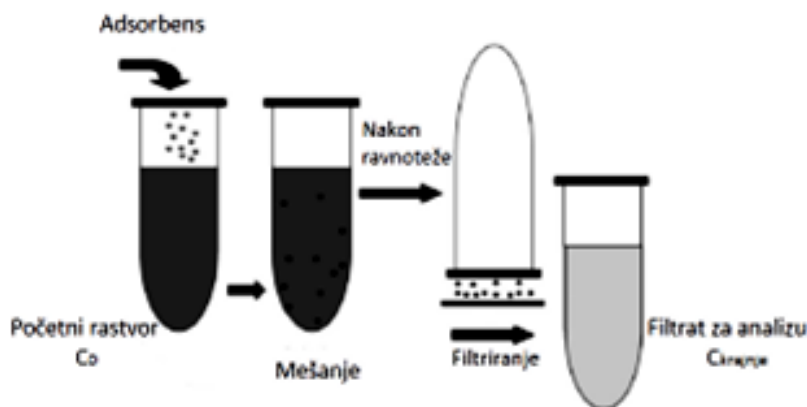
5.3. *Adsorpcione tehnike*

Načini izvođenja procesa adsorpcije mogu biti različiti. U osnovi, podeljeni su na procese koji se izvode u reaktorima sa mešanjem i procese u adsorpcionim kolonama. Izbor tehnike

prilikom osmišljavanja celokupnog procesa adsorpcije zavisi u velikoj meri od izbora i svojstava kako materijala (adsorbenta) tako i vezujuće materije (adsorbata). Dalje, ne manje važno, izbor tehnike se razmatra i sa ekonomskog aspekta, po pitanju investicionih troškova, efektivnosti i isplativosti.

5.3.1. Adsorpcija u reaktoru sa mešanjem

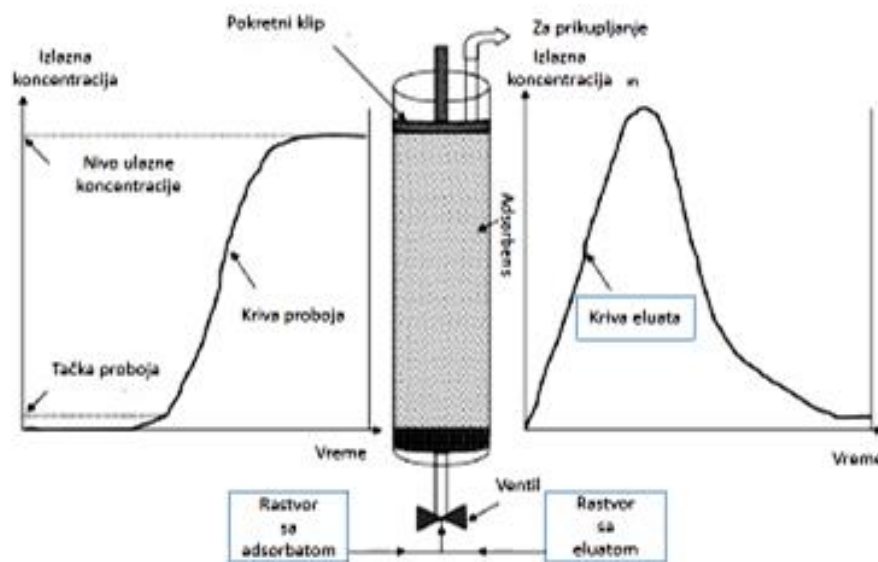
Procesi u sudu sa mešanjem se mogu odvijati u kontinualnom i diskontinualnom režimu. Najjednostavnija primena diskontinualnih procesa je mešanje određene količine adsorbenta u definisanoj zapremini fluida, rastvora adsorbata (**slika 5.1**). Nakon postizanja ravnoteže, adsorbent se mora ukloniti iz fluida, npr. filtriranjem ili sedimentacijom, nakon čega se on može regenerisati ili odbaciti. U industrijskoj primeni obično se ne teži ka postizanju ravnoteže, zato što je izolovanje određene komponente optimizovano u zavisnosti od vremena [85]. Za razliku od toga, kontinualni procesi se baziraju na višestepenom prečišćavanju ili separaciji ciljane komponente - adsorbata, pri čemu se iz ekonomskih razloga određuju optimalni uslovi za svaku primenu [85]. Različito vreme zadržavanja adsorbenta u reaktoru dovodi do njegovog neravnomernog opterećenja adsorbatom. Usled manje iskorišćenosti kapaciteta adsorbenta u ovim procesima, u odnosu na prethodne, diskontinualne, kao i viših operativnih troškova, kontinualni režim se ređe primenjuje. Šaržni proces u reaktorima sa mešanjem je uglavnom našao primenu za proizvodnju biotehnoških i farmaceutskih preparata viskog kvaliteta, poput antibiotika ili proteina. Takođe se primenjuje i u industriji pića, zatim i za preradu pijaće vode [85].



Slika 5.1. Šematski prikaz procesa adsorpcije u šaržnom režimu [177]

5.3.2. Adsorpcija u koloni sa nepokretnom čvrstom fazom

Tip kolone sa nepokretnom čvrstom fazom se najčešće koristi i najjednostavniji je za adsorpciju fluida (**slika 5.2**). Punjenje se izvodi sve dok koncentracija efluenta ne dostigne određenu granicu. Ova faza ukazuje na istrošenost kapaciteta adsorbenta i označava „proboj“. Proboj se uobičajeno predstavlja umesto ravnotežnog stanja [85]. Kao posledica kontinualnog procesa, adsorbent se mora regenerisati ili zameniti. Za što bolje iskorišćenje adsorbenta u ovakvim uslovima, kolone su uobičajeno povezane u serijama, pri čemu se koristi nekoliko kolona koje su različito napunjene ili jedna kolona sa nekoliko adsorpcionih slojeva. Različite kolone mogu biti povezane paralelno kako bi se kao proizvod dobila smeša koncentracija eluata [85]. Pored nekih mana, ovi procesi su bitni po pitanju marginalnih instrumenata i metroloških zahteva opreme.



Slika 5.2. Šematski prikaz procesa adsorpcije u kontinualnom režimu u koloni, sa prikazom krive proboja i krive eluata [177]

5.3.3. Adsorpcija u koloni sa pokretnom čvrstom fazom

Adsorpcija u koloni sa pokretnom čvrstom fazom je pogodna za kontinualne procese sa adsorbentima koji nisu u praškastom obliku. Adsorbent prolazi kroz sistem od vrha ka dnu bez zadržavanja u suspenziji i uklanja se iz sistema s vremena na vreme. Rastvor sa adsorbatom se propušta suprotnostrujno, tako da se uvodi na donjem kraju a uklanja na vrhu reaktora. Postoji

varijanta ovih procesa koja se zasniva na periodičnom protoku rastvarača kroz adsorbent od vrha do dna koji dovodi do pulsativnog pomeranja adsorbenta (ekspanziona kolona, semifluidizovana kolona ili kolona sa suspendovanim česticama) [85]. Protok je kontrolisan preko kontinualne kvantifikacije ciljane komponente u ulaznom toku i preko maksimalnog nivoa tolerancije ovih komponenti u struji fluida nakon adsorpcije. Ovi procesi imaju prednost nad kolonom sa fiksiranom čvrstom fazom u tome što se mogu primeniti iako rastvori koji trebaju biti prečišćeni sadrže čvrste čestice. Takođe, može se izbeći zapušavanje kolone suspendovanim materijama, ograničiti stvaranje mrtvih uglova, gas/para „džepova“ i kanalisanja [85,86]. Sa druge strane, glavni nedostaci su visoki investicioni troškovi, kompleksnost adsorbenta i suspenzije i kontrola transporta čvrste i tečne faze [85]. Ovi procesi su trenutno ograničeni na nivou istraživanja.

5.4. Uvećanje razmera adsorpcionih sistema

Iako je većina adsorpcionih eksperimenata izvedeno na laboratorijskom nivou, postoje i studije izvođenja u pilot i industrijskim postrojenjima. Težnja ka uvećanju razmera sistema upućuje na ozbiljan i sistematičan pristup adsorpciji kao relevantnoj tehnici, koja zaslužuje svu posvećenu pažnju. Do sada je zabeleženo da se komercijalne smole široko upotrebljavaju u pilot postrojenjima za, npr. redukciju gorčine citrusnih sokova, izolovanje antocijanidina iz kljuke od grožđa, elagitanina iz ljuski nara, polifenola iz grožđa i jabuka [86]. U nekim slučajevima, zabeležena je jednaka efikasnost laboratorijskog i pilot postrojenja. Utvrđeni su i temeljni industrijske primene selektivne izolacije fenolnih jedinjenja iz ostataka od prerade povrća [86].

5.5. Mehanizam i kinetika adsorpcije

Adsorpciona kinetika opisuje razvoj adsorpcije u zavisnosti od vremena sve do postizanja ravnoteže. Proces adsorpcione kinetike je podeljen na prenos mase i prenos toplote [85].

Prenos mase odigrava se, generalno, u četiri konsekutivna koraka: (a) prenos adsorbata iz fluida do graničnog sloja koji okružuje čestice adsorbenta, (b) prenos duž graničnog sloja (difuzioni film), (c) međučestična difuzija u pore i (d) povezivanje sa aktivnim mestima na adsorbentu kao i desorpcija adsorbata [85,86]. Ceo proces može biti kontrolisan jednim od navedenih koraka, ili njihovom kombinacijom. Grafički prikaz izgleda spoljašnje i unutrašnje difuzije čestica adsorbata na poroznim adsorbentima dat je na **slici 5.3**.



Slika 5.3. Spoljašnja i unutrašnja difuzija čestica adsorbata na poroznim adsorbentima [178]

Karakteristike adsorbenta, adsorbata i rastvarača utiču na korak koji određuje brzinu odigravanja procesa. Uopšteno, veličina čestica adsorbenta, koncentracija adsorbata, stepen mešanja, afinitet između adsorbata i adsorbenta, i difuzioni koeficijenti adsorbata su važni faktori koji se moraju uzeti u obzir [86]. Tako, na primer, u sistemima sa slabim mešanjem, razmatra se transport mase kroz rastvor kao faktor od velike važnosti. U sistemima sa dobrim mešanjem, velikih čestica adsorbenta, visoke koncentracije adsorbata i niskog afiniteta adsorbent-adsorbat, adsorpcija je, uglavnom, kontrolisana međučestičnim prenosom mase.

Sa druge strane, prenos toplote se može podeliti na prenos energije unutar adsorbenta i prenos energije kroz film koji okružuje čestice adsorbenta, pri čemu prenos toplote kroz tečnu fazu može biti zanemaren usled njenog velikog toplotnog kapaciteta [85].

Najpoznatiji modeli korišćeni za utvrđivanje adsorpcionog mehanizma koji kontroliše brzinu reakcije mogu se grupisati u: (a) one kod kojih se pretpostavlja da je adsorpcija vođena površinskim fenomenom i (b) one kod kojih se pretpostavlja da je kontrolišući korak difuzija filma ili međučestična difuzija [86]. Uprkos širokoj primeni oba tipa modela, nijedan ne može poslužiti za ključno razumevanje prirode datog problema, već se razvoj događaja u sistemu predviđa za određene opsege vremena adsorpcije i pokrivenosti površine adsorbenta. Sa druge strane, ni teorijska osnova određenih popularnih kinetičkih modela još uvek nije u potpunosti razjašnjena.

5.5.1. Kinetika u šaržnom sistemu

Najčešće korišćeni kinetički modeli koji se bave izučavanjem površinskih fenomena jesu Lagergrenovi modeli pseudo-prvog- i pseudo-drugog- reda, iako su u osnovi samo empirijski i smatraju se, u stvari, „slučajno postavljenim“ formama nekih uopštenijih kinetičkih izraza [86].

5.5.1.1. Adsorpcioni model pseudo-prvog reda

Lagergrenova adsorpciona kinetika je ograničeni oblik Lengmirovog (*Langmuir*) modela, ukoliko se sistem bazira na reverzibilnoj ravnotežnoj reakciji, koja se može predstaviti na sledeći način (**j-na 5.5**):

$$\frac{d(q_e - q_t)}{dt} = -k(q_e - q_t) \quad (5.5)$$

gde su q_e (mg/g) i q_t (mg/g) maksimalna količina koja može biti adsorbovana po jedinici mase od strane adsorbenta i količina adsorbovana nakon vremena t , redom, t (s) je vreme i k je konstanta (1/s) [85]. Nakon integracije **j-ne 5.5** i primenom graničnih uslova, $t = 0$ do $t = t$ i $q = 0$ do $q = q$ dobija se:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_{1,ad}}{2.303} t \quad (5.6)$$

Prava $\log(q_e - q_t) - t$ ukazuje na primenljivost i kompatibilnost slaganja eksperimentalnih podataka sa ovim modelom [179]. U tom smislu, mora se znati ravnotežni adsorpcioni kapacitet, q_e . U većini slučajeva je on nepoznat, i kako adsorpcija teži da bude nemerljivo spora, adsorbovana količina je i dalje dosta manja od ravnotežne količine. Zato je neophodno dobiti stvarni ravnotežni adsorpcioni kapacitet, q_e , ekstrapolacijom eksperimentalnih podataka, u $t = \infty$ ili korišćenjem metode probe i greške [179].

Dalje, vreme polu-adsorpcije $t_{1/2}$, potrebno da se veže polovina ravnotežne količine na površinu adsorbenta, može se odrediti u skladu sa **j-nom 5.7** [85]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (5.7)$$

Moguće je izvesti i energiju aktivacije primenom linearizovane Arenijusove (*Arrhenius*) jednačine, ukoliko je konstanta k izračunata za različite vrednosti temperature (**j-na 5.8**):

$$\ln k - \ln A = \frac{E_a}{RT} \quad (5.8)$$

R je gasna konstanta, T apsolutna temperatura (K) i E_a energija aktivacije adsorpcionog procesa, koja se može izračunati zajedno sa predeksponencijalnim faktorom A iz nagiba i odsečka prave $\ln k - 1/T$ [85],[108,109]. Na osnovu ove povezanosti i korišćenjem Ejring (*Eyring*) jednačine (**j-na 5.9**), mogu se izračunati entalpija i entropija aktivacije (ΔH° i ΔS° , redom) iz odsečka i nagiba prave $\ln(k/T) - 1/T$ [85],[108,109]:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_b}{h}\right) + \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (5.9)$$

k_b i h su Bolcmanova (*Boltzmann*) i Plankova (*Plank*) konstanta, redom.

Na osnovu prethodnog, slobodna energija aktivacije ΔG° se može odrediti korišćenjem **j-ne 5.10** [85,108,109]:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5.10)$$

Pomoću modela pseudo-prvog reda se može pristupiti mnogim različitim adsorpcionim situacijama, uključujući: (a) sisteme bliske ravnotežnim, (b) sisteme sa vremenski nezavisnom koncentracijom rastvora ili linearnom ravnotežnom adsorpcionom izotermom i (c) specijalne slučajeve kompleksnijih sistema [86]. U većini slučajeva, model prvog reda ne može dobro aproksimirati sistem na celom opsegu vremena kontakta [179].

5.5.1.2. Adsorpcioni model pseudo-drugog reda

U odnosu na druge modele, model pseudo-drugog reda predviđa ponašanje u sistemu na čitavom opsegu trajanja adsorpcije. Dat je **j-nom 5.11**:

$$\frac{dq}{dt} = k_{2,ad}(q_e - q)^2 \quad (5.11)$$

gde je k_2 konstanta ($\text{g/mg}^3\text{s}$), a q_e i q_t su količine adsorbata adsorbovane po jedinici mase adsorbenta (mg/g) u ravnoteži i nakon vremena t , redom [85,179].

Za granične uslove, $t = 0$ do $t = t$ i $q = 0$ do $q = q$ dobija se (**j-na 5.12**):

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_{2,ad}q_e^2} + \frac{1}{q_e}t \quad (5.12)$$

Ukoliko je ovaj model prikladan, grafik $t/q - t$ će dati linearnu povezanost, odakle se mogu q_{eq} i $k_{2,ad}$ odrediti iz nagiba i odsečka i nije potrebno poznavati nijedan parametar unapred [179].

Empirijski je pokazano da se adsorpciona kinetika najbolje opisuje sa različitim modelima, koji idealno odgovaraju određenim stadijumima adsorpcionog procesa, umesto da se oslanjaju na jednoj kinetičkoj pretpostavci koja bi opisala čitav proces od početka do postizanja ravnoteže [85].

Ukoliko se u procesu razmatra prenos molekula od graničnog filma do spoljne površine adsorbenta (difuzija filma) i prenos molekula od površine do određenih aktivnih mesta (difuzija čestica), treba analizirati odgovarajući model, kako bi se pronašao region koji ograničava reakciju i odredio njegov stepen.

Model međučestične difuzije potiče od Drugog Fikovog (*Fick*) zakona [86]. Osnovna formula može korelisati eksperimentalne podatke kako za kratka, tako i za duga adsorpciona vremena. Najčešće primenjivana tehnika je ispitivanje slaganja eksperimentalnih rezultata sa Veber-Morisovim (*Weber and Morris*) modelom međučestične difuzije, korišćenjem sledećeg linearizovang oblika (**j-na 5.13**):

$$q_t = k_{pi}t^{1/2} + C_i \quad (5.13)$$

gde je k_{pi} (mg/g h^{1/2}) konstanta brzine reakcije na i -tom nivou, dobijena iz nagiba prave $q_t - t^{1/2}$ [180]. C_i je efekat graničnog sloja, koji znači da što je veći odsečak, veći je doprinos površinske adsorpcije u ograničavajućem koraku. Prava $q_t - t^{1/2}$ će biti linearna ukoliko dolazi do međučestične difuzije. Kontrolišući korak je jedino posledica međučestične difuzije ako prava prolazi kroz koordinatni početak [180]. Inače, podrazumevaće se da je i neki drugi mehanizam, zajedno sa međučestičnom difuzijom uključen.

Za razlikovanje difuzije filma od difuzije čestica, kinetički podaci se mogu analizirati i pomoću Bojdovog (*Boyd*) modela [180]. Linearizovani oblik jednačine ovog modela glasi (**j-na 5.14**):

$$B_t = -0.4977 - \ln(1 - \frac{q_t}{q_e}) \quad (5.14)$$

gde je q_e količina adsorbata adsorbovana u ravnotežnim uslovima (mg/g), q_t je količina adsorbata adsorbovana u određenom trenutku t , a B_t je matematička funkcija izraza q_t/q_e [104,180]. Ako je prava $B_t - t$ linearna i prolazi kroz koordinatni početak, onda je difuzija čestica kontrolišući korak i obrnuto, ukoliko prava ne prolazi kroz početak i podaci ne fituju dobro, sugerise se da je reč o difuziji filma [104,180].

5.5.2. Kinetika u koloni

Izgled kontinualnog procesa je opisan kroz koncept krive proboja. Vreme pojave proboja i oblik krive proboja su veoma važne karakteristike za određivanje operativnog toka i dinamičkog odziva kolone za proces sorpcije. Oblik krive, u principu, zavisi od kapaciteta kolone, imajući u vidu koncentraciju početnog rastvora i protok. Ova kriva prikazuje način adsorbovanja i obično se izražava u obliku normalizovane koncentracije, definisane kao odnos koncentracije adsorbata u efluentu i ulazne koncentracije (C/C_0) u funkciji vremena ili zapremine efluenta (V_{eff}) za datu visinu kolone [179].

Uspešan dizajn adsorpcije u koloni zahteva predviđanje profila koncentracija – vreme ili krive proboja efluenta pod datim specifičnim operativnim uslovima [179]. Razvijanje modela kojim bi se precizno opisao proces u koloni je veoma teško. Dok se koncentracija adsorbata kreće kroz kolonu, proces se ne odigrava u stabilnom stanju. Fundamentalne jednačine transporta za modelovanje kolone su po prirodi diferencijalne i obično za rešavanje zahtevaju složene matematičke metode. Takvo numeričko rešenje obično nije teško, ali često ne fituje dobro eksperimentalne rezultate. Neka rešenja za veoma ograničene slučajeve su predložena, ali generalno, kompletna analitička rešenja u zavisnosti od vremena do modela baziranih na diferencijalnim jednačinama, za predložene mehanizme, nisu dostupna. Zato su razvijeni različiti prostiji matematički modeli da predvide ponašanje sistema u koloni [179]. Neki od njih su Adams-Bohartov (*Adams–Bohart*) model [179], Tomasov (*Thomas*) [179], Klarkov (*Clark*) [10], Jun-Nelsonov (*Yoon, Nelson*) [179]. Dalje razmatranje ovih modela nije prikazano, s obzirom da je u eksperimentalnom delu ovog istraživanja kinetika adsorpcije određivana isključivo u šaržnom režimu, odnosno u reaktorima sa mešanjem.

5.6. Termodinamika procesa adsorpcije

Termodinamičkom analizom se, u osnovi, određuje da li je odigravanje odgovarajućeg procesa u sistemu spontano ili ne. U zavisnosti od uticaja temperature na proces adsorpcije, ispituju se promena slobodne Gibsove (*Gibbs*) energije (ΔG), promena entalpije (ΔH), i promena entropije (ΔS). Slobodna Gibsova energija određuje se sledećom jednačinom:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (5.15)$$

gde je ΔG° (J) promena standardne slobodne Gibsove energije, R je univerzalna gasna konstanta (8.314 J/(mol K)), T je apsolutna temperatura (K) i K je prividna ravnotežna konstanta, definisana sledećom zavisnošću (**j-na 5.16**):

$$K = \frac{C_{ad,e}}{C_e} \quad (5.16)$$

gde su C_e i $C_{ad,e}$ ravnotežne koncentracije adsorbata u rastvoru i na adsorbentu, redom [13].

Vrednosti entalpije i entropije se mogu dobiti iz nagiba i odsečka prave $\Delta G^\circ - T$ koja potiče od vant Hofove (*van 't Hoff*) jednačine [13]:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (5.17)$$

Ukoliko je promena entalpije (ΔH°) pozitivna vrednost, onda je proces endoterman i obrnuto (za negativne vrednosti entalpije proces je egzoterman). Pozitivna vrednost promene entropije (ΔS°) upućuje na dobar afinitet adsorbata prema adsorbentu, a važi i obrnuto za negativnu vrednost entropije. Na kraju, negativna vrednost promene energije (ΔG°) ukazuje da je proces spontan na ispitivanom temperaturnom opsegu, i obrnuto [13,113].

5.7. Adsorpciona ravnoteža i izoterme

Vrednosti ravnotežnih parametara, pretežno, zavise od interakcija adsorbenta i adsorbata, kao i od svojstava rastvora (uslova) u kojima adsorbent stupa u kontakt sa adsorbatom, te je njihovo poznavanje neophodno za praktično izvođenje procesa. Adsorpciona ravnoteža se može izučavati kako za jednokomponentne sisteme, tako i za one kompleksnije – višekomponentne. U tim slučajevima dolazi do kompeticije između čestica više vrsta adsorbata prilikom povezivanja na aktivnim adsorpcionim mestima na površini adsorbenta.

Najpoznatije vrste izoterme, koje su bazirane na konceptu teorijskog modela ili do kojih se došlo empirijskim putem, prikazane su u daljem tekstu. Mogu se podeliti, najpre, na izoterme u zavisnosti od broja komponenata koje se razmatraju u određenom adsorpcionom sistemu, a zatim, na izoterme u zavisnosti od broja parametara [85,86].

5.7.1. *Izoterme koje opisuju jednokomponentne sisteme*

Izoterme izvedene za jednokomponentne sisteme uglavnom potiču od gasovitih adsorpcionih procesa, iako se uspešno primenjuju i na tečno-čvrsto sisteme.

5.7.1.1. *Izoterme sa jednim parametrom*

Izoterme sa jednim parametrom, poput Henrijeve (*Henry*) retko služe za aproksimaciju realnih sistema, a mogu se primeniti na procese sa, pretežno, niskim koncentracijama adsorbata u suspenzijama. Umesto toga, sve češće primenjuvane su izoterme sa dva i više parametara.

5.7.1.2. *Izoterme sa dva parametra*

Najpoznatija i najčešće korišćena izoterma za tumačenje adsorpcionih procesa je Lengmirova (*Langmuir*). Pomoću nje se opisuje fizisorpcija neutralnih čestica, molekula ili atoma, na površini adsorbenta, na kojoj egzistiraju energetski homogena sorpciona mesta, pri čemu je afinitet adsorbata na svim adsorpcionim mestima jednak i gde nema interakcija među adsorbovanim molekulima [85,86]. Samim tim, smatra se da je u procesu uključen jedan mehanizam adsorpcije. Prilikom adsorbovanja dolazi samo do formiranja monosloja, i pri tom desorpcija sa određenog adsorpcionog mesta je nezavisna od susednog okupiranog mesta na adsorbentu. Opisuje se sledećom jednačinom:

$$q_e = \frac{Q_{mL}\alpha_L C_e}{1 + \alpha_L C_e} - \frac{K_L C_e}{1 + \alpha_L C_e} \quad (5.18)$$

gde je Q_{mL} (mg/g) monoslojni kapacitet adsorbenta pod ravnotežnim uslovima, koji označava maksimalnu koncentraciju koja je zadržana na površini adsorbenta kada je u potpunosti pokrivena monoslojem adsorbata. Ta vrednost se može izračunati deljenjem Lengmirove konstante K_L (L/g) i α_L (L/mg). q_e (mg/g) je količina adsorbata po gramu adsorbenta u ravnoteži, dok je C_e (mg/L) ravnotežna koncentracija rastvora [85]. Pri niskim koncentracijama rastvora ($\alpha_L C_e \ll 1$), Lengmirova izoterma se može aproksimirati Henrijevom [85]:

$$q_w = Q_{mL}\alpha_L C_e - k_H C_e \quad (5.19)$$

dok se pri visokim koncentracijama ($\alpha_L C_e \gg 1$) dobija vrednost konstante zasićenja (maksimalne pokrivenosti), koja je jednaka ireverzibilnoj izotermi [85]:

$$q_e - Q_{mL} = const. \quad (5.20)$$

Na osnovu linearizovanog oblika Lengmirove izoterme (**j-na 5.21**), K_L i kapacitet Q_{mL} se mogu izračunati iz nagiba i odsečka linearne prave $1/q_e - 1/C_e$:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{k_L C_e} + \frac{1}{Q_{mL}} \quad (5.21)$$

Treba, međutim, napomenuti da je model Lengmirove izoterme prilično idealizovan i da praktično postoji nekoliko tipova adsorpcionih mesta, pri čemu mehanizam nije isti za prvi i poslednji adsorbovani molekul, a, takođe, modeli bazirani na formiranju monomolekulskog površinskog sloja bez interakcija ne mogu biti realni.

Frojdlihova (*Freundlich*) izoterma je zasnovana na empirijskoj jednačini pogodnoj za neidealne sisteme, sa veoma heterogenom površinom adsorbenta. Ne podrazumeva stvaranje monosloja, i često dobro interpretira podatke u ograničenom opsegu koncentracija [85,86]. Opisuje se sledećom jednačinom:

$$q_e = K_F C_e^{b_F} \quad (5.22)$$

pri čemu je q_e (mg/g) količina adsorbata po gramu adsorbenta u ravnoteži, a C_e (mg/L) je koncentracija rastvora pod ravnotežnim uslovima. Frojdlihova konstanta K_F (L/g) opisuje adsorpcioni kapacitet, a bezdimenzioni parametar b_F je mera adsorpcionog intenziteta [85].

Za razliku od Lengmirove izoterme, **j-na 5.22** se ne može aproksimirati Henrijevom pri niskim koncentracijama i, isto tako, ne može se dobiti vrednost zasićenja pri visokim koncentracijama rastvora [85].

Na osnovu linearizovane forme, koja sledi iz **j-ne 5.21**, (**j-na 5.23**), K_F i b_F se mogu dobiti iz nagiba i odsečka sa linearne prave $\log q_e - \log C_e$ [85]:

$$\log q_e = \log K_F + b_F \log C_e \quad (5.23)$$

Tempkinova (*Tempkin*) izoterma se bazira na postojanju indirektnih adsorbat-adsorbat interakcija, koje imaju značajan uticaj na adsorpcionu ravnotežu. Smatra se da ove interakcije uzrokuju opadanje adsorpcione toplote svih molekula sa povećanjem pokrivenosti površine [85]. Izražava se sledećom jednačinom:

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \times (\ln AC_e) \quad (5.24)$$

gde je q_e (mg/g) količina adsorbata po gramu adsorbenta u ravnoteži, a C_e (mg/L) ravnotežna koncentracija tečne faze. A je konstanta izoterme (L/mg) i b_T (J/mol) je Tempkinova energetska konstanta [85]. Na osnovu linearizovanog oblika, eksperimentalni podaci su iskorišćeni za dobijanje konstanti A i B konstruisanjem grafika $q_e - \ln C_e$ (**j-na 5.25**):

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad (5.25)$$

B je konstanta energije, koja je jednaka proizvodu univerzalne gasne konstante R (J/mol 3 K) i apsolutne temperature T (K), podeljenom sa b_T (J/mol), **j-na 5.26** [85]:

$$B = \frac{RT}{b_T} \quad (5.26)$$

BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) izoterma (**j-na 5.1**) proširuje Lengmirovu ideju monosloja u višeslojni model, gde su adsorpciona mesta energetski homogena i gde ne postoje interakcije između individualnih molekula jednog sloja. Za razliku od toga, BET model pretpostavlja interakcije između molekula različitih slojeva. Može se odrediti **j-nom 5.27**:

$$c = c_m \frac{Kp}{(p_0 + (K-1)p) \times (1 - \frac{p}{p_0})} \quad (5.27)$$

gde je c (mol/g) količina adsorbata koja je adsorbovana pod ravnotežnim uslovima, c_m (mol/g) količina adsorbovana u monosloju, a K konstanta. Dalje, p_0 čini pritisak zasićenja pare, dok je p adsorpcioni parcijalni pritisak [85].

Elovič (*Elovich*) izoterma se bazira se na eksponencijalnom rastu adsorpcionih mesta, upućujući da se u sistemu odigrava višeslojna adsorpcija [19]. Izražava se j-nom:

$$\frac{q_e}{q_m} = (K_E C_e) \exp\left(-\frac{q_e}{q_m}\right) \quad (5.28)$$

gde je K_E Elovich ravnotežna konstanta (L/mg) i q_m je Elovich maksimalni adsorpcioni kapacitet (mg/g) [19].

$$\ln\left(\frac{q_e}{C_e}\right) = \ln(K_E q_m) - \left(\frac{q_e}{q_m}\right) \quad (5.29)$$

Fowler-Guggenheim (*Fowler–Guggenheim*) i Hil de Boer (*Hill-de Boer*) jednačine su veoma retko u upotrebi, ali mogu dati informacije o bočnim interakcijama adsorbovanih molekula, dok Dubinin-Radushkevich (*Dubinin–Radushkevich*) izoterma opisuje adsorpcioni mehanizam sa raspodelom Gausove (*Gauss*) energije na heterogenoj površini [86].

Sa porastom broja parametara, povećava se i složenost određivanja ravnotežnih izoterma. Izoterme sa tri parametara su, pretežno, bazirane na proširenim matematičkim oblicima Lengmirove i Frojndlihove adsorpcione izoterme i njihovih kombinacija, dok se one sa više od tri parametara mogu retko naći u literaturi [85].

5.7.2. Izoterme koje opisuju adsorpciju iz smeša

Kada postoji nekoliko komponenata u rastvoru, vrlo često dolazi do kompeticija za adsorpcionim mestima, što vodi ka složenijoj matematičkoj formulaciji ravnoteže. Nekoliko izoterma je predloženo u cilju da opišu ravnotežnu i kompetitivnu adsorpciju u višekomponentnim sistemima. U ovakve izoterme se ubrajaju jednostavni modeli koji se odnose samo na individualne parametre izoterme (poput kompetitivnog *Redlich–Peterson* modela), kao i složeniji modeli koji se odnose na individualne parametre izoterme i korekzione faktore (poput modifikovanog kompetitivnog Lengmirovog i modifikovanog Frojndlihovog modela) [179].

Usled toga što su u eksperimentalnom delu ovog rada razmatrani samo jednokomponentni sistemi, nije bilo praktične potrebe za daljim razmatranjem ravnotežnih izoterma višekomponentnih sistema.

5.8. Primena procesa adsorpcije

Primena adsorpcije raste zajedno sa razvojem sofisticiranih adsorpcionih materijala, a isto tako i tehnika. Poslednjih godina temeljnije se ispituju struktura i svojstva adsorbenata, tipovi veza i interakcija sa adsorbatima, pri čemu prikupljene informacije idu u prilog dubljem razumevanju i optimizaciji procesa.

Može se reći da se osnovna primena adsorpcije zasniva na prečišćavanju pijaćih i otpadnih voda, efluenata iz različitih industrijskih procesa. Adsorpcija se koristi i u industriji prerade i proizvodnje hrane, a podjednako je važna i za izdvajanje bio- i tehnofunkcionalnih jedinjenja, uglavnom iz nus-proizvoda prehrambene industrije. Poslednji aspekt ima dodatnu vrednost, usled toga što izolovane funkcionalne materije dalje mogu biti implementirane u hrani i farmaceuticima.

5.8.1. Prečišćavanje pijaćih i otpadnih voda

Voda je izvor života i energije, iako milioni ljudi širom sveta pate od nedostatka sveže i čiste pijaće vode. Brz razvoj industrijalizacije, širenje populacije i neplanska urbanizacija su doprineli pojavi štetnih zagađenja voda i okolnih zemljišta. Glavni izvori zagađenja potiču od odlaganja netretiranog sanitarnog i toksičnog industrijskog otpada, odlivanja industrijskih otpadnih voda i voda koja otiču sa poljoprivrednih površina [22]. Smatra se da je 70-80 % od ukupnog broja svih bolesti u razvijenim zemljama, upravo, povezano sa zagađenjem voda [22].

Izbor procesa za tretman vode je složen zadatak koji uključuje razmatranje više faktora, a koji se pre svega odnose na dostupni prostor za izgradnju objekata za tretman, pouzdanost procesne opreme, ograničenja pri odlaganju otpada, željeni kvalitet prečišćene vode, kao i kapitalni i operativni troškovi. U tom smislu su razvijene brojne tehnologije (poput koagulacije, filtracije, jonoizmenjivača, aerobnih i anaerobnih tretmana, oksidacionih procesa, ekstrakcije rastvaračima, adsorpcije, elektrolize, mikrobiološke redukcije zagađenja) [22]. Ipak, većina njih zahteva značajna finansijska ulaganja i njihova upotreba je ograničena uglavnom iz razloga, koji prevazilaze važnost smanjenja nivoa zagađenja. Adsorpcija se, s toga, u velikom broju slučajeva smatra prikladnom zato što je praktična, lako se upravlja njome i jednostavnog je dizajna [22]. Ovim procesom se mogu ukloniti, odnosno, svesti na minimum razni tipovi zagađivača, i s tim u vezi, ima široku primenu u kontroli zagađenja voda.

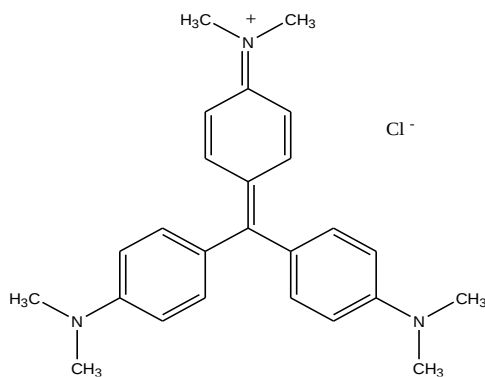
5.8.1.1. Zagađenje životne sredine bojama

Neretko se dešava da se velike količine otpadnih obojenih voda, poreklom iz brojnih industrija koje koriste boje za farbanje svojih proizvoda, izlivaju u prirodne vodotokove. Među njima se ubrajaju industrija papira, tekstila, gume, plastike, čak i hrane [13,93]. Postoji više od 100 000 komercijalno dostupnih vrsta boja, sa preko 7×10^5 tona obojenih proizvoda [93].

Prisustvo, čak i veoma malih koncentracija boje u vodi (u nekim slučajevima i manje od 1 µg) reflektuje, najpre, estetski neželjeni efekat, a zatim i brojne štetne posledice po životnu okolinu i zdravlje ljudi [93]. U vodenom živom svetu utiču na povećanu potrošnju kiseonika i redukciju fotosintetičke aktivnosti zbog smanjene mogućnosti prodiranja svetla. Pored toga, njihova toksičnost se ogleda u prisustvu brojnih aromatičnih jedinjenja, metala, hlorida i drugih komponenti u njima [13]. U slučajevima direktnog kontakta, kod ljudi i životinja mogu izazvati iritaciju očiju, ubrzano ili otežano disanje, mučninu, povraćanje, mentalnu konfuziju [13].

Kristal violet (KV) je tri-fenilmetan boja, koja se uveliko koristi za bojenje bioloških preparata, kao dermatološko sredstvo i za razne potrebe tekstilne industrije [155]. Poznata je i kao heksametil- pararoanilin hlorid, bazna boja, sa molekulskom formulom $C_{25}H_{30}N_3Cl$ (**slika 5.4**) [155].

Pronađeno je da KV u hidrosferi može biti apsorbovana u tkiva riba i metabolizovana do toksičnog leuko oblika - leuko kristal violet, pri čemu je utvrđeno da leuko oblici izazivaju kancerogene i mutagene efekte kod glodara [181]. Pronađeno je i da je ova boja mitotički agens za trovanje, postojana i teško biorazgradiva, zbog čega je proglašena biohazardom [155]. Iz prethodno navedenih razloga, od velike je važnosti njeno uklanjanje iz kontaminiranih voda.



Slika 5.4. Strukturna formula boje kristal violet

Mnoga istraživanja su sprovedena sa ciljem pronalaženja isplativog rešenja za degradaciju, adsorpciju, neutralizaciju ili deaktivaciju ovih hemikalija. Komercijalni tretmani prečišćavanja otpadnih voda se smatraju neefikasnim u uklanjanju većine boja, uključujući i kristal violet [155]. Adsorpcija se smatra jednom od boljih i ekonomski isplativijih metoda za uklanjanje boja, pigmenta iz vodenih rastvora [155]. Postoje izveštaji o adsorpciji KV na gram-

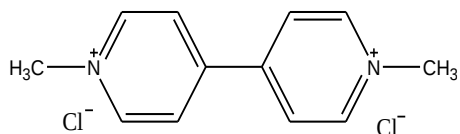
negativnoj bakteriji *Stenotrophomonas* [182] i gram-pozitivnoj bakteriji *Nocardia* [183], gljivi poput vrsta *Phlebia* [184] i *Trameles* [185], algi vrste *Nostoc linckia* [155], biljnoj vrsti *Acacia nilotica* [181].

5.8.1.2. Zagađenje životne sredine pesticidima

Značajan deo savremene agroindustrije zavisi od proizvodnje pesticida [186]. U mnogim vodećim zemljama proizvođačima, herbicidi čine udeo od preko 50 % svih komercijalno dostupnih vrsta pesticida [186,187].

Parakvat (1,10-dimetil-4,4'-dipiridinijum hlorid, **slika 5.5**), poznat i kao metil viologen, je jedan od najznačajnijih amonijačnih herbicida, koji se masovno koristi za kontrolu rasta kako kopnenih, tako i vodenih vrsta korova [186,187,188].

Najpre je bio sintetisan od strane Videla i Rusijana (*Widel, Russian*), 1882 godine [189]. U tom periodu, gotovo, niko nije bio upoznat sa svojstvima herbicida, koje su otkrivene tek 1955 godine [189]. Komercijalizacija parakvata je započela 1962 godine, od strane Divizije za zaštitu bilja Carske Hemijske Industrije (*Imperial Chemical Industries, ICI*), koja i dan danas postoji i nosi naziv „Singenta“ (*Syngenta*) [189]. Parakvat je pogodan zbog svog brzog delovanja pri niskim koncentracijama, relativno niskog kumulativnog efekta na zemljištu i niže cene koštanja u odnosu na konkurentne herbicide [186,189].



Slika 5.5. Strukturna formula pesticida parakvata

Povećana proizvodnja i potrošnja parakvata utiče, sa druge strane, na porast nivoa zagađenja životne sredine, usled nesavesnog rukovanja ili slučajnog, prekomernog izlivanja u okolinu i vodotokove. U literaturi je pronađeno nekoliko autentičnih slučajeva detektovanja ostataka parakvata u izvorima pijaće vode [190]. U jednom uzorku netretirane otpadne vode izmerena je koncentracija parakvata od blizu 40 mg/L [191], iako je maksimalni dozvoljeni nivo u pijaćoj vodi u, pojedinim zemljama, svega 0.01 mg/L [188], a u hrani 0.2 mg/kg [191]. Nedavno je u zabeležna, čak, visoka stopa trovanja i smrtnosti, nakon slučajnog ili namernog gutanja parakvata ili dermalne izloženosti, zbog čega su neke od zemalja zabranile njegovu

upotrebu [189]. Smatra se da je ovaj hemijski agens izuzetno toksičan, kancerogen i da može ispoljiti mutagene efekte na ljude i životinje [187,189]. Od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (*World Health Organisation*, WHO, 1984), parakvat je klasifikovan kao veoma toksično jedinjenje, sa letalnom dozom kod ljudi od 35 mg/kg [188,189]. Trovanje se kod ljudi manifestuje na više načina, preko oštećenja jetre, mozga, bubrega, srca, nadbubrežne žlezde i mišića [189]. Najizloženija bivaju pluća, zato što parakvat poseduje mogućnost redukcije kiseonika do izuzetno reaktivnih vrsta slobodnih radikala, koji mogu dovesti do respiratorne insuficijencije, i u najtežim slučajevima izazvati smrt [189,191].

Iz prethodno navedenih razloga potrebno je razviti nove strategije za efikasno uklanjanje ili smanjenje nivoa parakvata u kontaminiranim sredinama. S tim u vezi, zabeležen je određeni broj istraživanja u kojima je pronađeno da je primenom tehnike adsorpcije moguće vezati i ukloniti parakvat iz vodenih rastvora [187,192,193,194]. Uglavnom su u svojstvu adsorbenata korišćene razne vrste silikata [188,190,191,193], smola [189] i u, ređim slučajevima, aktivni ugljevi poreklom od otpadnih materijala [187,195,196].

5.8.2. Proizvodnja hrane i pića

Adsorpcione smole se često koriste u tehnologiji proizvodnje sokova, za njihovu stabilizaciju i dekolorizaciju, a tako i za smanjenje gorčine, uglavnom, u sokovima od citrusa [85]. Kombinacija adsorpcije i ultrafiltracije ispoljava sinergističke efekte prilikom uklanjanja jedinjenja iz sistema koja su iznad određene molekulske veličine. Adsorpcijom se omogućava dobijanje i proizvodnja svetlih, gotovo, vodeno-čistih sokova, uklanjanjem neželjenih komponenata iz reakcionih smeša.

5.8.3. Izdvajanje bio- i tehno-funkcionalnih jedinjenja iz nus-proizvoda prehrambene industrije

U prehrambenoj industriji, uobičajeno, nastaju velike količine otpadnih, nus-proizvoda. Čvrsti ostaci, zajedno sa efluentima iz industrije prerade biljnih sirovina, u isto vreme, predstavljaju bogat izvor prirodnih bioaktivnih jedinjenja (sekundarnih metabolita) i, sa druge strane, zagađivače životne sredine. Koncentracija organske materije u njima je velika do te mere da se smatra ekotoksičnom [125]. Pored fitotoksičnosti, utiče i na povećanje hemijske i biološke potrošnje kiseonika u vodenim ekosistemima, a može uticati i ograničiti dejstvo pojedinih

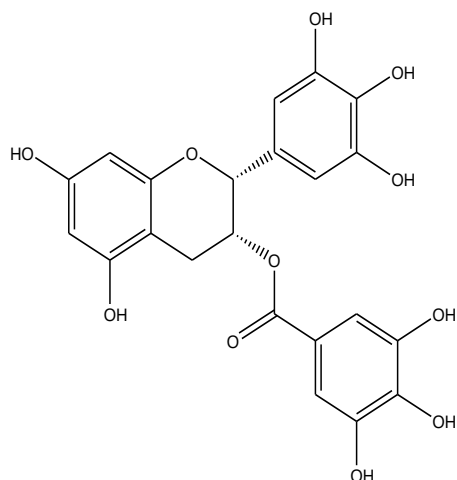
bioloških tretmana nekih efluenata [86,125,197]. S tim u vezi, izolacija bioaktivnih jedinjenja iz takvih sredina otvara dvostruku mogućnost dobijanja vrednih biomolekula i doprineti očuvanju životne sredine. U literaturi je nedavno zabeleženo nekoliko načina izolovanja i prečišćavanja polifenola iz ostataka nastalih u industrijama prerade biljnih sirovina [102,197,198,199,200,201,202]. Među njima, adsorpcija se smatra potencijalno dobrom tehnikom, pomoću koje se može izuzeti korišćenje toksičnih rastvarača i smanjiti nivo degradacije ovih bioaktivnih jedinjenja.

5.8.3.1. Izdvajanje polifenola

Polifenoli su grupa jedinjenja od posebnog interesa za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju, kako zbog svojih biofunktionalnih svojstava (poput antioksidativnih, antimikrobnih, antikancerogenih, antitrombotičnih, antiinflamatornih) ili tehnofunktionalnog potencijala kojim doprinose stabilizaciji i zaštiti arome i boje namirnica [85].

S tim u vezi, zabeležena su brojna istraživanja adsorpcije polifenola iz nus-proizvoda prerade više vrsta biljnih sirovina: citrusnog voća, grožđa, jabuke, spanaća, soje. Proces simultanog izdvajanja polifenola i pektina iz kljuke jabuke, primenjuje se čak i na industrijskom nivou [85].

Nedavno je zeleni čaj privukao dosta pažnje, kako od strane naučnika i istraživača, tako i javnog mnjenja, usled potencijalnih terapijskih primena u tretmanu mnogih poremećaja, od redukcije telesne težine, do smanjenja rizika od oboljevanja od kancera [103]. Bioaktivnost zelenog čaja se, pretežno, ogleda u prisustvu epigalokatehin galata, najzastupljenijem i najsnažnijim među polifenolima iz zelenog čaja [98]. Epigalokatehin galat (EGKG, epigalokatehin-3-galat), molekulske formule $C_{22}H_{18}O_{11}$ (**slika 5.6**), je estar epigalokatehina i galne kiseline. Smatra se da njegova strukturna konfiguracija, koja se, pretežno, sastoji od hidroksilnih i karboksilnih grupa, vezanih za određeni broj fenolnih prstenova, pruža mogućnost neutralizacije izuzetno reaktivnih, endogeno nastalih kiseoničnih radikala [98,103,104,203]. Na taj način, u najvećoj meri, ispoljava svoje blagotvorno fiziološko dejstvo.



Slika 5.6. Strukturna formula polifenola epigalokatehin galata

Povećani interes za biljnim sirovinama od zelenog čaja uticao je i na povećanu proizvodnju i preradu, usled čega je dolazilo do generisanja sve većih količina otpadnih materija. Već su učinjeni naponi istraživanja fenomena adsorpcija EGKG, poreklom iz zelenog čaja, na više vrsta adsorpcionih smola [104], kao i β -glukanu iz ovasa [112].

6. KAFA KAO ADSORBENT

Postoje brojni literaturni podaci koji svedoče o snažnom adsorpcionom kapacitetu materijala poreklom od kafe, koji su u mogućnosti da adsorbuju značajne količine više vrsta adsorbata. U mnogim slučajevima, dobijene vrednosti bile su konkurentne sa komercijalnim materijalima, dobro poznatih fizičko-hemijskih karakteristika. S tim u vezi, otvoren je pristup iskorišćenja ovakvog tipa otpada, kao ekonomski opravdanog, a po svrsi zadovoljavajućeg.

Adsorpciona svojstva nus-proizvoda iz prerade kafe u najvećem broju slučajeva su testirana u tretmanima prečišćavanja otpadnih voda, na sposobnost vezivanja različitih jona metala i boja, a zabeleženi su i drugi tipovi nespecifičnih adsorbata i zagađivača. Pre upotrebe, materijal od kafe je dobro osušen i korišćen u svom nativnom obliku, ili nakon modifikacija, aktiviranjem određenim fizičko-hemijskim metodama.

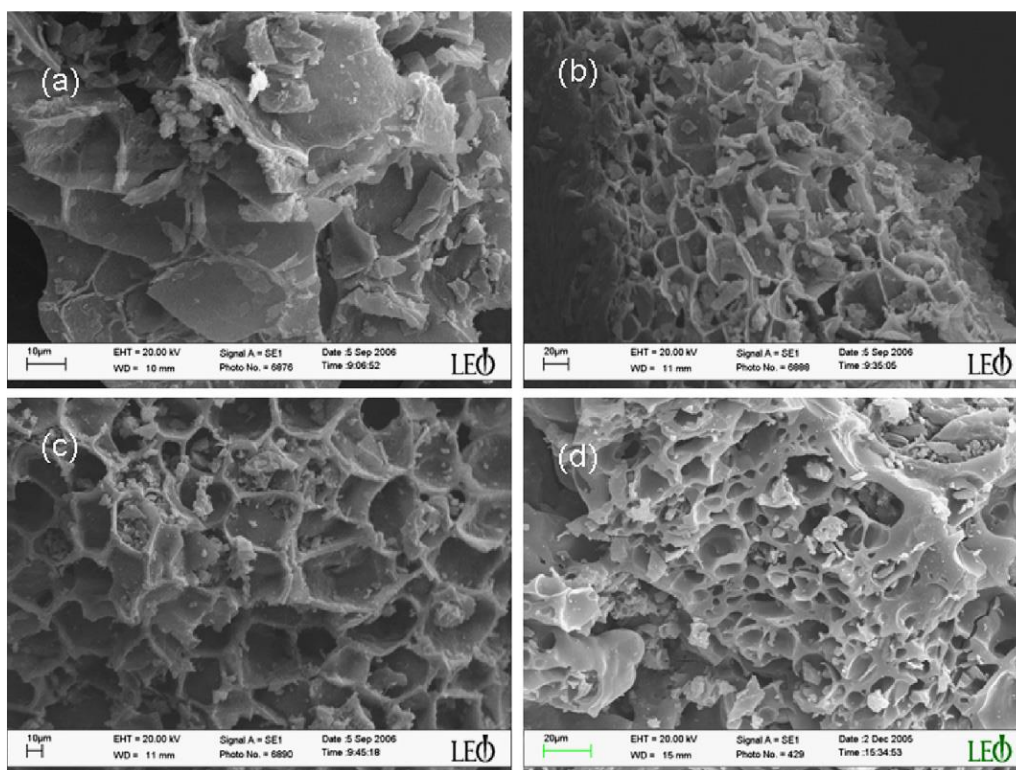
6.1. Aktivacija kafe

Aktivacija materijala od kafe, za potrebe pripreme aktivnog uglja, može biti fizička i hemijska. Odabir tehnike zavisi od svojstvenih prednosti i mana, koje se ocenjuju na osnovu balansa između ekonomske isplativosti i uspešnosti datog performansa. Generalno, postoje dve važne prednosti hemijske aktivacije. Prva je niža temperatura na kojoj se proces odigrava i drugo, prinos aktivacije može biti veći [168]. Sa druge strane, primenom tehnike fizičke aktivacije, izuzima se korišćenje raznih hemijskih agenasa, veoma često toksičnih i agresivnih za ljude i okolinu.

Najčešći oblik aktivacije je termičkim putem, na visokim temperaturama, odnosno karbonizacijom u peći za žarenje [204]. Po najnovijim standardima izvodi se i karbonizacija u mikrotalasnoj peći [20,177]. Materijali različitih tehno-funkcionalnih karakteristika, ovom prilikom, dobijaju se variranjem procesnih uslova, poput vremena i temperature zagrevanja uzorka, kao i snage mikrotalasne peći. Osnovna prednost mikrotalasne nad klasičnom (u peći za žarenje) karbonizacijom materijala odnosi se na vreme trajanja procesa, zato što se pod dejstvom mikrotalasa relativno brzo postiže razvoj poroznosti i modifikacija materijala željenih karakteristika. Pored toga, manji je utrošak energije, ne zahteva veliki prostor i opremu, može biti efektivna i na nižim temperaturama, omogućujući brzu i preciznu kontrolu temperature zagrevanja tretiranog materijala [86]. Hemijska aktivacija kafe se, uglavnom, zasniva na

korišćenju ZnCl_2 [168], FeCl_3 [205], KOH ili NaOH [180], H_3PO_4 [206] ili H_2SO_4 [18] agenasa. Iako je so gvožđe-hlorida sličnih karakteristika kao cink-hlorid, u vodenim rastvorima katjoni gvožđa su manji od katjona cinka i otvaraju mogućnost stvaranja pora manjih prečnika tokom aktivacije. Sa druge strane, katjoni cinka u vodenim rastvorima su dobro poznati zagađivači [205]. Sa druge strane, prednost korišćenja H_3PO_4 ogleda se u tome što se lako ispira vodom, a i postoji mogućnost njenog recikliranja [206]. Nije retkost da su pojedine aktivacije materijala od kafe izvedene i kombinovanjem tehnika, npr. u prvoj fazi tretman odgovarajućim hemijskim agensom, a zatim, u drugoj, i temička karbonizacija uzorka [180,181].

Svaka aktivaciona metoda rezultuje formiranjem površina aktivnih ugljeva koje su specifične i drugačijih karakteristika. Uporedni prikaz izgleda površina aktivnih ugljeva poreklom od kafe, na osnovu mikrografa skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM), predstavljen je na **slici 6.1**. Nakon različitih aktivacionih tretmana, na površini aktivirane kafe mogu se uočiti razlike u raspodeli i veličini oblika pora.



Slika 6.1. Uporedni prikaz SEM mikrografa porozne strukture aktivnog uglja pripremljenog od kafe primenom različitih tehnika aktivacije: netretirani uzorak (a), uzorak tretiran sa FeCl_3 (b), uzorak tretiran sa smešom $\text{FeCl}_3 + \text{ZnCl}_2$ (c) i uzorak tretiran sa ZnCl_2 (d) [205]

6.2. Primeri istraživanja svojstava adsorbenata poreklom od kafe

Najveći broj primera zabeleženih u literaturi svedoče o snažnom adsorpcionom potencijalu aktivnih ugljeva poreklom od kafe da vežu i uklone više vrsta teških metala iz vodenih rastvora. Prilikom adsorpcije jona Cr (VI) na česticama kafene prašine, koje su u eksperimentu upotrebljene bez prethodne aktivacije, odigravanje procesa bilo je veoma brzo, čak 40 puta brže u poređenju sa uklanjanjem Cr (VI) od strane alge vrste *Ulva* sp. i 144 puta brže od alge *Sargassum* sp. [207]. Boudrahem i sar. (2011) [208] pronašli su da je aktivacijom otpadne kafe sa H_3PO_4 dobijena veća specifična površina adsorbenta, u odnosu na tretman sa $ZnCl_2$. Kako fizičko-hemijska svojstva dobijenog adsorbenta zavise od odnosa agens/kafa, variranjem ovog odnosa može se dobiti materijal željenih karakteristika. Pri tom, pokazano je da je adsorpcioni kapacitet vezivanja Pb (II) jona bio nešto veći u odnosu na jone Cd (II) [208]. Adsorpcija jona Cd (II) uspešno je izvedena i na zrnima kafe, koja su prethodno, samo, bila obezmašćena etanolom [15]. Na kafi aktiviranoj sa H_2SO_4 ispitivana je adsorpcija gvožđa i ortofosfata [18], a na termički karbonizovanim ostacima od kafe i mogućnost adsorbovanja urana [209].

Prilikom uporedne analize adsorpcionih kapaciteta vezivanja kisele i bazne i boje, utvrđeno je da su bazne boje bile, pretežno, adsorbovane u mikroporama ili na kiselim mestima na površini aktivirane kafe, dok je kisela boja bila adsorbovana na makroporama adsorbenta. U ovom istraživanju istaknuta je prednost mikrotalasne aktivacije koja se ogledala u uštedi energije i smanjenju otpuštanja CO_2 u atmosferu [21]. Reffas i sar. (2010) [206] pronašli su da je adsorpcioni kapacitet crvene boje vrste *Nylosan Red N-2RBL* na otpadnoj kafi aktiviranoj sa H_3PO_4 bio 1.75 puta viši u odnosu na komercijalni aktivni ugalj (vrste *SBET*), usled odgovarajuće raspodele pora i neutralne aktivne površine [206]. Prilikom adsorpcije boje malahit zelene na odmašćenu kafu pokazano je da je ona bila boljih adsorpcionih karakteristika u odnosu na sirovu, usled prisustva masnih frakcija [16]. U istraživanju Franca i sar. (2010) [20] još jednom je ukazano na prednosti mikrotalasne aktivacije materijala od kafe, pri čemu je ispitivan adsorpcioni afinitet ka boji metilen plavoj [20]. Zabeležene su još i adsorpcione karakteristike vezivanja i drugih vrsta boja [14,17,180]. Od ostalih, nespecifičnih, vrsta adsorbata, pronađeni su izveštaji o ispitivanom procesu adsorpcije fenola i salicilne kiseline na otpadnu kafu, aktiviranu sa $ZnCl_2$ [19].

U cilju pregleda adsorpcionog potencijala različitih nus-proizvoda od kafe, u nativnom ili aktiviranom obliku, u **Tabeli 6.1** dat je prikaz vrednosti kapaciteta ostvarenih prilikom adsorpcije različitih vrsta adsorbata.

Tabela 6.1. Prikaz vrednosti adsorpcionih kapaciteta adsorbenata od kafe za različite vrste adsorbata

Adsorbent	Adsorbat	Kapacitet, mg/g	Referenca
Ostaci od kafe	Pb(II)	63	[22]
Ljuske od kafe	Zn (II)	5.57	[210]
Otpadna kafa	Ni (II)	7.25	[210]
Otpadna kafa	Cu (II)	11.6	[210]
Ljuske od kafe	Cu (II)	7.50	[210]
Ljuske od kafe	Cr (VI)	6.96	[210]
Ljuske od kafe	Cd (II)	6.85	[210]
Ljuske od kafe	Metilen plavo	90.1	[93]
Oštećena zrna kafe	malahit zeleno	55.3	[16]
Otpadna kafa	remazol plava, bazna plava	179, 275	[14]
Otpadna kafa	kisela crvena	27.8	[17]
Ljuske od kafe aktivirane sa Zn/Fe	fenol	167	[205]
Ljuske od kafe aktivirane sa Zn	fenol	117	[205]
Ljuske od kafe aktivirane sa Fe	fenol	65	[205]
Oštećena zrna kafe	metilen plava	68.5	[20]
Otpadna kafa aktivirana sa H ₃ PO ₄	Pb (II), Cd (II)	89.28, 46.95	[208]
Otpadna kafa aktivirana sa ZnCl ₂	Pb (II), Cd (II)	63.29, 37.04	[208]
Otpadna kafa sa H ₃ PO ₄	metilen plava	175	[206]

7. PLANIRANJE I OPTIMIZACIJA PROCESA

Optimizacija nekog procesa se može izvesti empirijskim ili statističkim metodama. Uobičajena, empirijska, metoda sastoji se u menjanju nivoa, odnosno vrednosti, jednog parametra, dok nivoi svih ostalih parametara, koji utiču na posmatrani proces, ostaju konstantni. Ovakvo postavljanje eksperimenta poznato je pod nazivom: metoda jednofaktornog eksperimenta [211]. Ova metoda je u mnogome izgubila na značaju pojavom višefaktorne statističke (regresione i disperzne) analize. Suštinska razlika, u odnosu na koncepciju jednofaktornog eksperimenta, ogleda se u tome što teorija planiranja eksperimenta omogućava variranje uticajnih parametara na različitim nivoima simultano, odnosno omogućava da se odjednom odredi međusobni uticaj parametara i smanji ukupni broj eksperimenata, a samim tim dolazi i do povećanja pouzdanosti rezultata [211]. U tom smislu, pojava višefaktorne statističke analize predstavlja kvalitativno novi pristup u teorijsko-eksperimentalnoj analizi i optimizaciji složenih procesa. Iz tog skupa analiza izdvaja se, između ostalih, i metoda odzivne površine.

7.1. Metodologija odzivne površine

Metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) je efikasno sredstvo eksperimentalnog dizajna, koje je u stanju da predvidi izgled i ponašanje složenih sistema. Predstavlja skup statističkih i matematičkih metoda, koje sekvencijalnom procedurom predvode eksperimente duž puta optimizacije [155]. Svaki istraživač je zainteresovan da pronade odgovarajuću aproksimaciju načina odigravanja procesa u sistemu, sa ciljem predviđanja i određivanja budućeg odgovora, odnosno, odziva. Primarna svrha odzivnih površina nije razumevanje mehanizma odigravanja datog sistema ili procesa, već određivanje optimalnih operativnih uslova [157].

RSM ima važnu primenu kako u dizajniranju i optimizaciji procesa, tako i u poboljšanju postojećeg dizajna [212]. Omogućava logičnu raspodelu podataka kroz interesnu sferu, proveru adekvatnosti modela kroz nedostatke fitovanja, obezbeđuje sekvencijalno stvaranje dizajna višeg reda, kao i internu procenu greške [213]. Takođe, ne zahteva veliki broj proba, čime je smanjeno vreme trajanja eksperimenata, samim tim i celokupni troškovi [214]. Ovakva metodologija je praktičnija u odnosu na konvencionalne pristupe, iz razloga što razmatra interaktivne efekte među promenljivim parametrima, i opisuje njihov ukupan efekat na proces [212]. Poslednjih

godina se intenzivno primenjuje za optimizaciju i ispitivanje interakcija među procesnim promenljivim u širokom spektru hemijskih i biohemijskih procesa [212].

U principu, statistički način optimizacije se sastoji iz tri glavna koraka: izvođenje statistički dizajniranog eksperimenta, ocena koeficijenata u matematičkom modelu sa predviđenim odzivom i ispitivanje adekvatnosti modela [215].

U okviru nekog procesa, nezavisne procesne promenljive mogu biti predstavljene u obliku (**j-na 7.1**):

$$y = f(x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n) \pm \varepsilon \quad (7.1)$$

gde su $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$ nezavisne promenljive (parametri), koje su funkcija f odziva y , a ε je eksperimentalna greška [155].

Ako se očekivani odziv predstavi u obliku sledeće zavisnosti :

$$y = f(x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n) = \eta \quad (7.2)$$

onda je površina predstavljena u obliku (**j-na 7.3**):

$$\eta = f(x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n) \quad (7.3)$$

i naziva se odzivna površina [216].

Jedan od glavnih problema RSM je što je oblik zavisnosti između odziva i nezavisnih promenljivih nepoznat i može biti veoma komplikovan. S toga je prvi korak pronaći odgovarajuću aproksimaciju za funkcionalnu zavisnost između y i niza nezavisnih promenljivih, a uglavnom se u tu svhu koriste polinomi nižeg reda [155,216].

Ukoliko je odziv dobro modelovan linearnom funkcijom nezavisnih promenljivih, onda je model aproksimativne funkcije polinom prvog reda (**j-na 7.4**):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (7.4)$$

Ukoliko je odziv kriva koja nije linearna, onda je model aproksimativne funkcije polinom nekog višeg reda, npr. drugog reda (**j-na 7.5**):

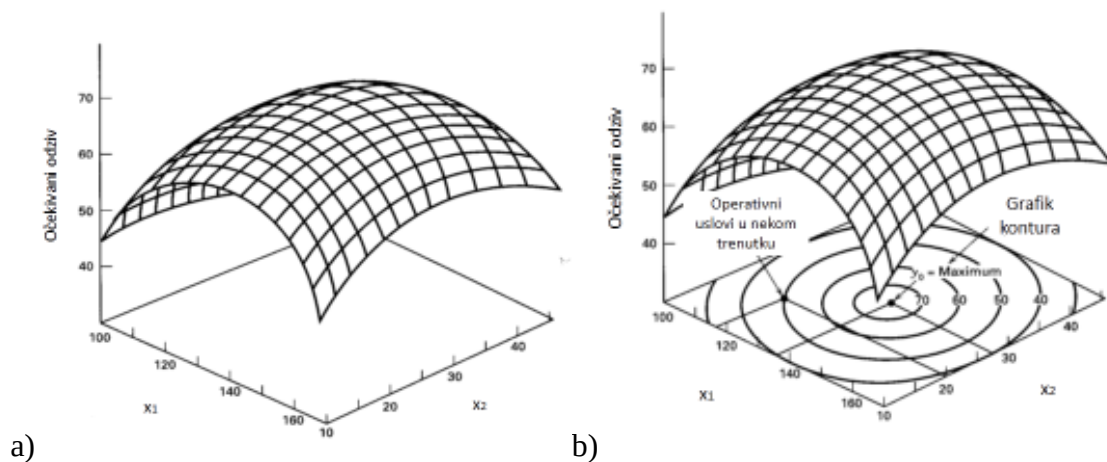
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (7.5)$$

gde je y predviđeni odziv, $x_i, x_j, \dots, x_k$ su ulazne promenljive koje utiču na odziv y , $x_{2i}, x_{2j}, \dots, x_{2k}$ su kvadratni efekti, $x_i x_j, x_i x_k$ i $x_j x_k$ su interakcioni efekti, $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ su regresioni koeficijenti, pri čemu se β_i ($i=1, 2, \dots, k$) odnosi na linearni efekat, β_{ii} ($i=1, 2, \dots, k$) na kvadratni efekat, β_{ij} ($i=1, 2, \dots, k; j=1, 2, \dots, k$) interakcioni efekat i ε je slučajna eksperimentalna greška [212,216].

Ne podrazumeva se uvek da je polinomalna aproksimacija funkcionalne zavisnosti validna na celom prostoru nezavisnih promenljivih, ali za relativno mali deo obično biva odgovarajuća [216].

Za određivanje parametara u polinomalnoj aproksimaciji iskorišćena je metoda najmanjih kvadrata, nakon čega je izvedena analiza fitovane odzivne površine. Ukoliko je fitovana površina adekvatna aproksimacija prave funkcije odziva, onda će analiza fitovane površine biti aproksimativno jednaka analizi stvarnog sistema [216].

Obično se odzivna površina predstavlja grafički. Na **slici 7.1a**, kriva η je u funkciji dve promenljive x_1 i x_2 . Radi jasnijeg razumevanja oblika trodimenzionalne odzivne površine, dodatno se prikazuje i grafik kontura odzivne površine, predstavljen na **slici 7.1b**. Na grafiku kontura, linije konstantnog odziva su nacrtane u x_1, x_2 ravni. Svaka kontura odgovara određenoj veličini odzivne površine.



Slika 7.1. Trodimenzionalni izgled odzivne površine (η) bez grafika kontura (a) i sa grafikom kontura (b) u funkciji parametara x_1 i x_2 [216]

Fitovanje i analiza odzivne površine je dosta olakšana odgovarajućim izborom eksperimentalnog dizajna [216]. Kako u RSM tehnici postoji više vrsta dizajna, prilikom izbora odgovarajućeg razmatraju se neke od željenih karakteristika, poput sledećih mogućnosti:

- predviđanja razumljive raspodele proba kroz oblast eksperimentisanja,
- istraživanja nedostataka fitovanja,
- izvođenja eksperimenata u blokovima,
- interne procene greške,
- preciznog istraživanja koeficijenata modela,
- smanjenog broja proba,
- osiguranja jednostavnog izračunavanja parametara u modelu.

Ove karakteristike su ponekad kontradiktorne, pa često treba pronaći odgovarajući balans između prednosti i nedostataka prilikom odabira dizajna [216].

7.2. Dizajni za fitovanje modela polinoma prvog reda

Jedan od najjednostavnijih tipova dizajna za modele polinoma prvog reda je faktorijalni sa dva nivoa, oznake 2^k , gde je k broj procesnih promenljivih [124]. U punom faktorijalnom dizajnu, odzivi se mere pri svim kombinacijama nivoa (vrednosti) eksperimentalnih faktora. Kombinacije nivoa faktora predstavljaju uslove pri kojima će odzivi biti mereni. Svaki eksperimentalni uslov se naziva proba, pri čemu je redosled njihovog prikazivanja u dizajnu slučajan [124,215]. 2^k dizajn ne pruža mogućnost procene eksperimentalnih grešaka prilikom ponavljanja odgovarajućih proba [216].

7.3. Dizajni za fitovanje modela polinoma drugog reda

Najčešće korišćeni dizajni za fitovanje modela polinoma drugog reda su centralni kompozitni dizajn i Boks-Benken dizajn.

Centralni kompozitni dizajn (CCD) se sastoji od 2^k faktorijala sa n_F proba, $2k$ osnih proba i n_C centralnih proba [216]. Dobija se raspodelom tačaka u eksperimentalni prostor tako da su one simetrično postavljene oko centra plana i predstavljaju tzv. osnu udaljenost α [216]. Osa udaljenost je u vezi sa pojmom rotabilnosti, tako da je eksperiment rotabilan ako je:

$$\alpha = \sqrt[4]{F} \quad (7.6)$$

gde je F broj faktorskih stanja ($F=2^k$ u slučaju punog faktorijalnog eksperimenta) [211]. Na primer, ako postoje tri faktora, dobija se osna udaljenost $\alpha = 2^{3/4} = 1.682$. Nezavisne promenljive se kodiraju u vrednosti -1 (donja granica) i 1 (gornja granica), i pri tom se za svaki faktor dodaju nove ekstremne vrednosti osne udaljenosti (niska $-\alpha$ i visoka $+\alpha$). Dakle, svaki od parametara se kodira na pet nivoa: $-\alpha, -1, 0, +1$ i $+\alpha$ [157,212,214].

Ukupan broj eksperimenatlnih proba se računa u skladu sa sledećom formulom:

$$N = 2^k + 2k + X_0 \quad (7.7)$$

gde je N ukupan broj proba, k je broj promenljivih, a X_0 je broj centralnih proba [214]. Centralne probe se koriste za ispitivanje eksperimentalne greške i reproduktibilnost podataka, pri čemu se u jednom dizajnu preporučuje broj od 3 do 5 centralnih proba [157,216]. U principu, pošto se ta stanja izvode pod identičnim uslovima, odnosno identičnim nivoima faktora, procena greške eksperimenta iz tih podataka je nezavisna od tipa modela, tj. da li je linearan ili nelinearan. Procenjena greška je posledica samo nesigurnosti merenja zavisne promenljive [216]. CCD poseduje prednost koja omogućava korišćenje svega nekoliko kombinacija promenljivih za definisanje složene odzivne funkcije [155].

Boks-Benken (*Box-Behnken*) dizajn za fitovanje odzivnih površina su predložili Boks (*Box*) i Benken (*Behnken*) 1960. godine [216]. Ovaj dizajn podrazumeva samo tri nivoa svakog faktora, -1, 0 i 1 i čini podskup 3^k faktorijalnog dizajna. Rezultujući dizajni su veoma efikasni u smislu broja zahtevanih proba, i pri tom su rotabilni ili skoro rotabilni [216]. Ovaj tip dizajna smanjuje broj kombinacija faktora i održava dobru preciznost predviđenih odziva [161], te je zajedno sa CCD, najčešće korišćeni dizajn za fitovanje modela drugog reda.

U praksi, ne postoji garancija da će optimalni dizajn biti pronađen, ali princip je takav da izabrani dizajn bude bar blizu optimalnog.

7.4. Razvojna operacija

Tehnika RSM je najčešće primenjivana na ekperimente koji su na laboratorijskom ili nivou pilot postrojenja. Vrlo retko je pronašla primenu na uvećane sisteme, tipa industrijskog postrojenja. Uslovi koji su optimalni za manje postrojenje ne moraju biti optimalni i za uvećane

[216]. Upravo u te svrhe, jedna od metoda, koja je potrebna za praćenje i održavanje uvećanog sistema sa ciljem usmeravanja radnih uslova ka optimalnim ili praćenja eventualnih „udaljavanja“ od optimalnosti, naziva se razvojna operacija ili EVOP (*evolutionary operation*), predložena od strane Boksa (*Box*), 1957 godine [216].

S obzirom na samo mali deo prikazanih mogućnosti metode odzivne površine, neophodno je napomenuti da je ovo polje tehnika optimizacija procesa neiscrpno i otvoreno za još mnogo novih istraživanja. Pravilan izbor metode i primena eksperimentalnog dizajna obezbeđuju relevantnije i statistički validnije rezultate, koji u savremenom svetu eksperimentisanja predstavljaju kako potrebu, tako i neophodnost.

CILJ RADA

Cilj ovog rada je optimizacija uslova za potpuno iskorišćenje otpadne kafe.

Istraživanja i metode rada podeljeni su na dva dela.

U prvom delu su iz otpadne kafe ekstrahovani polifenoli sa antioksidativnom aktivnošću primenom metode klasične ekstrakcije, kao i ekstrakcije potpomognute delovanjem mikrotalasa. Sastav dobijenih ekstrakata praćen je određivanjem sadržaja ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline i merenjem antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom.

U drugom delu je kafa zaostala nakon ekstrakcije antioksidanasa korišćena kao adsorbent. Ispitivana je adsorpcija katjonske boje, pesticida i polifenola, pri čemu su određeni kapaciteti vezivanja ovih vrsta adsorbata i definisani odgovarajući kinetički i ravnotežni parametri.

Za optimizaciju procesa korišćena je statistička metoda odzivne površine, uz pomoć *Design Expert* softvera.

EKSPERIMENTALNI DEO

8. MATERIJAL I OPREMA

U eksperimentima je korišćen sledeći materijal i oprema:

Materijal:

- Otpadna kafa, „Doncafe – Filter kafa“, Strauss Adriatic d.o.o, Šimanovci, Srbija

Hemikalije i reagensi:

- 2,2-difenil-1-pikrilhdrazil (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ, $C_{18}H_{12}N_6$), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Cink-acetat ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$), „KEMIKA“, Zagreb, Hrvatska
- Epigalokatehin galat ($C_{22}H_{18}O_{11}$), „TEAVIGO® DSM nutritional product, >90% EGCG“, Kaiseraugst, Švajcarska
- Etanol 96% (C_2H_5OH), „ZORKA FARMA“, Šabac, Srbija
- *Folin-Ciocalteus* reagens, „MERCK“, Darmstadt, Nemačka
- Galna kiselina ($C_7H_6O_5$), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Gvožđe-hlorid heksahidrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), „ANALYTIKA, LTD“, Prag, Češka Republika
- Hlorogenska kiselina ($C_{16}H_{18}O_9$), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Hlorovodonična kiselina (HCl), „ZORKA FARMA“, Šabac, Srbija
- Kalijum-bromid (KBr), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Kalijum-ferocijanid ($K_4[Fe(CN)_6]$), „MERCK“, Darmstadt, Nemačka
- Kofein ($C_8H_{10}N_4O_2$), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Kristal violet boja ($C_{25}N_3H_{30}Cl$), „Acros Organics“, Nju Džerzi, SAD
- Magnezijum-oksidi (MgO), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Metanol (CH_3OH), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- n-heksan ($CH_3(CH_2)_4CH_3$), „MERCK“, Darmstadt, Nemačka
- Natrijum-acetat (CH_3COONa), „Zdravlje“, Leskovac, Srbija
- Natrijum-hlorid (NaCl), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- Natrijum-hidroksid (NaOH), „Lachema“, Brno, Češka Republika

- Natrijum-karbonat (Na_2CO_3), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- Parakvat pesticid ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$), „SIGMA-Aldrich“, Štajnhajm, Nemačka
- Petrol etar ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$), „MERCK“, Darmstadt, Nemačka
- Sumporna kiselina (H_2SO_4), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika
- Sirćetna kiselina ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), „Lachema“, Brno, Češka Republika
- Vodonik peroksid (H_2O_2), „Lach-Ner“, Neratovice, Češka Republika

Oprema:

- Analitička vaga (AJ100), „Mettler Toledo“, Švajcarska
- Automatska mikropipeta (20 - 200 μl), „BRAND“, Nemačka
- Automatska mikropipeta (100 - 1000 μl), „HUAWEI“, Kina
- Centrifuga, „SIGMA-Aldrich“, Nemačka
- Aparat za filter kafu (BOSCH TKA 6024 V), „BOSCH“, Nemačka
- FTIR spektroskop (MB100), „ABB Bomem Inc“, Kanada
- Kolorimetar (MA 9507), „Iskra“, Slovenija
- Magnetna mešalica (Heidolph MR 3001), „SIGMA-Aldrich“, Nemačka
- Mikrotalasna peć (MC7849HS), „LG“, Južna Koreja
- pH metar, „InoLab pH 720“, Nemačka
- Skenirajući elektronski mikroskop (MIRA3 XMU), „TESCAN“, Češka Republika
- Sušnica, Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata „Sutjeska“, Srbija
- Tehnička vaga, „Mettler AJ100“, Švajcarska
- UV/Vis Spektrofotometar ultrospec 3300 pro, „Amersham Bioscience“, Australija
- Vakuum pumpa (V-700), „BÜCHI“, Švajcarska
- Vakuum uparivač, „BÜCHI“, Švajcarska
- Vazдушna tresilica (KS 4000i control), „IKA“, Nemačka
- Vorteks, „IKA“, Nemačka

9. METODE

U okviru metoda rada nalaze se metode za pripremu uzoraka i analitičke metode.

9.1. Metode za pripremu uzoraka

U sastav metoda za pripremu uzoraka ubrajaju se: način pripreme kafe za ekstrakciju polifenola sa antioksidativnom aktivnošću, priprema adsorbenta, poreklom od otpadne kafe iz koje su ekstrahovani antioksidansi, i priprema tri vrste vodenih rastvora adsorbata.

9.1.1. *Priprema kafe za ekstrakciju polifenola sa antioksidativnom aktivnošću*

Ostaci kafe, prikupljeni nakon pripreme napitka, su, u cilju stabilizacije, osušeni u sušnici na 37 °C, do konstantne mase. Ovako stabilizovana kafa je korišćena kao uzorak pod nazivom „otpadna kafa“ za ekstrakciju polifenola sa antioksidativnom aktivnošću (u daljem tekstu „antioksidanasa“).

9.1.2. *Priprema adsorbenta – otpadne kafe iz koje su ekstrahovani antioksidansi*

Otpadna kafa je nakon ekstrakcije antioksidanasa, u daljem tekstu „otpadna kafa bez antioksidanasa“, osušena u sušnici na 110 °C preko noći i iskorišćena za pripremu adsorbenta. Aktivacija otpadne kafe bez antioksidanasa vršena je u rastvoru 20 % etanola (odnos čvrste (g) i tečne (mL) faze bio je 1:6) u mikrotalasnoj peći, pri snazi od 400 W, u toku 2 minuta [20,21]. Smeša je profiltrirana pomoću vakuum pumpe, nakon čega je tečni ostatak odbačen, a čvrsti deo kafe osušen u sušnici na 110 °C preko noći. Ovako pripremljena kafa korišćena je kao adsorbent pod nazivom „aktivirana kafa“, za ispitivanje adsorpcionog kapaciteta boje, pesticida i polifenola u šaržnom režimu.

9.1.3. *Priprema nosača – aktivirane kafe za adsorpciju polifenola u kontinualnom režimu*

U cilju potpunog neutralisanja zaostalih polifenola, aktivirana kafa je tretirana oksidacionim sredstvom, u ovom slučaju, 15 %-nim vodenim rastvorom vodonik-peroksida. Odnos čvrste (g) i tečne (mL) faze bio je 1:12. Smeša je postavljena na magnetnu mešalicu, na sobnoj temperaturi (27 °C), u toku 30 minuta. Nakon toga je profiltrirana, pomoću vakuum pumpe, pri čemu je tečni ostatak odbačen, a čvrsti deo kafe osušen u sušnici na 110 °C preko

noći. Ovako pripremljena kafa korišćena je kao nosač, u kontinualnom režimu adsorpcije polifenola epigalokatehin galata, pod nazivom „oksidovana kafa“.

9.1.4. Priprema adsorbata

Aktivirana kafa korišćena je kao adsorbent za ispitivanje adsorpcionog kapaciteta tri vrste adsorbata: katjonske boje kristal violet, pesticida parakvata i polifenola epigalokatehin galata.

pH vrednosti vodenih rastvora svih vrsta adsorbata su za potrebe eksperimenta podešavani korišćenjem rastvora 0.1 M HCl ili 0.1 M NaOH.

9.1.4.1. Priprema vodenog rastvora boje

Odmereno je 0.5000 g boje kristal violet i u normalnom sudu od 1 L dopunjeno destilovanom vodom do crte (pri čemu je dobijena koncentracija 500 mg/L). Odatle su redom pripremljeni rastvori boja koncentracija od 5 mg/L do 250 mg/L razblaživanjem početnog rastvora destilovanom vodom i u njima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 540 nm (maksimum absorpcije kristal violet), prema slepoj probi (u ovom slučaju destilovanoj vodi).

Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet u vodenim rastvorima konstruisana je na osnovu prethodno izmerenih ekstinkcionih vrednosti i data u **Prilogu 1 (slika P-1.1)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.1.4.2. Priprema vodenog rastvora pesticida

Pripremljen je početni rastvor pesticida parakvata koncentracije 1000 mg/L (rastvaranjem 0.889 mL pesticida, gustine 1.1245 g/L, u destilovanoj vodi u normalnom sudu od 1 L). Odatle su redom pripremljeni radni rastvori pesticida koncentracija od 200 - 800 mg/L razblaživanjem početnog rastvora destilovanom vodom i u njima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 297 nm (maksimum absorpcije parakvata), prema slepoj probi (u ovom slučaju destilovanoj vodi).

Standardna kriva za određivanje koncentracije pesticida parakvata u vodenim rastvorima konstruisana je na osnovu prethodno izmerenih ekstinkcionih vrednosti i data u **Prilogu 1 (slika P-1.2)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.1.4.3. Priprema vodenog rastvora polifenola

Pripremljen je početni rastvor polifenola epigalokatehin galata koncentracije 500 mg/L, rastvaranjem 0.5000 g u destilovanoj vodi u normalnom sudu od 1 L. Odatle su redom pripremljeni rastvori epigalokatehin galata koncentracija od 100 - 300 mg/L, razblaživanjem početnog rastvora destilovanom vodom i u njima je spektrofotometrijski očitana ekstinkcija na 273 nm (maksimum absorpcije epigalokatehingalata), prema slepoj probi (u ovom slučaju destilovanoj vodi).

Standardna kriva za određivanje koncentracije polifenola epigalokatehin galata u vodenim rastvorima konstruisana je na osnovu prethodno izmerenih ekstinkcionih vrednosti i data u **Prilogu 1 (slika P-1.3)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2. Analitičke metode

U otpadnoj kafi je, najpre, određen hemijski sastav, a zatim su iz nje ekstrahovani antioksidansi, metodama klasične ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrotalasima. U dobijenim ekstraktima sa antioksidansima je merena antioksidativna aktivnost DPPH i FRAP metodom.

Otpadna kafa bez antioksidanasa je, nakon aktivacije, korišćena za ispitivanje adsorpcije zagađivača vode. Karakteristike aktivirane kafe određene su odgovarajućim fizičko-hemijskim metodama, a proces adsorpcije izveden je u svojstvu dva režima: šaržnom i kontinualnom, i tom prilikom određeni su odgovarajući kinetički i ravnotežni parametri.

9.2.1. Određivanje hemijskog sastava otpadne kafe

U otpadnoj kafi je određen sadržaj suve materije, masti, kofeina, ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline.

9.2.1.1. Suva materija

Suva materija je određivana metodom sušenja na 105 °C [73].

Postupak:

Odmerena je određena količina uzorka otpadne kafe (2.0000 g) i u, prethodno pripremljenim, vegeglasima (osušenim i izmerenim) je sušena u sušnici na 105 °C, do konstantne mase.

Izračunavanje sadržaja suve materije (%) je vršeno prema sledećoj formuli:

$$\% \text{suve materije} = \frac{M_2 - M_v}{M_1 - M_v} \times 100 \quad (9.1)$$

M_2 - masa vegeglasa sa uzorkom posle sušenja (g),

M_1 - masa vegeglasa sa uzorkom pre sušenja (g),

M_v - masa vegeglasa, (g).

9.2.1.2. Masti

Određivanje ukupnih masti vršeno je metodom po Soksletu (*Soxhlet*) [73].

Postupak:

Odmereno je 50.0 g uzorka otpadne kafe, upakovano u filter papir i smešteno u srednji deo Soksletovog aparata – ekstraktor, koji je zatim spojen sa hladnjakom i balonom. Balon je prethodno osušen u sušnici 1 h, na 105 °C, a zatim izmeren. Sa gornje strane hladnjaka sipan je rastvarač, u ovom slučaju, heksan, tako da nakon presifoniranja jedna trećina ekstraktora bude potopljena u rastvarač. Odnos otpadna kafa (g) : heksan (mL) bio je 1 : 6. Balon, zajedno sa aparaturom, je zagrevan na vodenom kupatilu, pri čemu je jačina zagrevanja podešavana tako da kondenzovane kapljice rastvarača padaju takvom brzinom da se jedva mogu brojati, ali da ne cure u neprekidnom mlazu. Ekstrakcija je trajala između 4 – 6 h, tačnije, završena je u trenutku kada je primećeno da rastvarač iz srednjeg dela ekstraktora ne pokazuje masnu mrlju na filter papiru. Aparat je skinut sa vodenog kupatila, izvađen je iz njega filter papir u kome je uzorak, zatim sklopljen ponovo, a rastvarač predestilisan. Balon sa mašću iz koga je uparen heksan je sušen 1 h, na 105 °C i izmeren.

Izračunavanje sadržaja masti (%) je vršeno prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ masti} = \frac{(a - b) \times 100}{O_k} \quad (9.2)$$

a - masa balona sa mašću (g),

b - masa praznog balona (g),

O_k - odmerena količina uzorka, (g).

9.2.1.3.Kofein

Sadržaj kofeina u otpadnoj kafi određivan je spektrofotometrijskim postupkom na UV/VIS spektrofotometru, na 272 nm [217].

Reagensi:

0.05 M Sumporna kiselina – 2.572 mL koncentrovane sumporne kiseline je u normalnom sudu dopunjeno destilovanom vodom do 1000 mL.

1 M Cink-acetat – 219.0 g cink-acetata je rastvoreno u destilovanoj vodi, dodato 30 mL glacijalne sirćetne kiseline, a zatim u normalnom sudu dopunjeno destilovanom vodom do 1000 mL.

0.25 M Kalijum-fero-cijanid – 105.6 g kalijum-ferocijanida rastvoreno je u 1000 mL destilovane vode.

Postupak:

U izmereni erlenmajer od 1 L dodato je 2.00 g otpadne kafe, 50 mL 0.05 M sumporne kiseline i 450 mL destilovane vode. Smeša je zagrejana i ostavljena na temperaturi ključanja 30 minuta. Posle toga je ohlađena, dopunjena vodom do početne mase i profiltrirana. 50 mL filtrata je sipano u normalni sud od 100 mL i dodato 7 mL 1 M rastvora cink-acetata i 6 mL 0.25 M rastvora kalijum-fero-cijanida, uz intenzivno mešanje, a zatim dopunjeno do crte destilovanom vodom. Rastvor je promućkan i profiltriran kroz filter *No 41*, pri čemu je prvih 10 mL filtrata odbačeno. Izmeren je erlenmajer od 250 mL i u njega dodato 5 g magnezijum-oksida, 50 mL vode i 50 mL filtrata. Smeša je zagrejana do ključanja i ostavljena na toj temperaturi 20 minuta. Nakon hlađenja, dopunjena je destilovanom vodom do početne mase. Rastvor je profiltriran i prvih 10 mL filtrata je odbačeno. Očitana je ekstinkcija filtrata na 272 nm, prema slepoj probi koja je pripremana istovremeno istim postupkom, samo bez dodavanja uzorka. Na osnovu izmerenih vrednosti ekstinkcija očitavana je koncentracija kofeina sa standardne krive.

Standardna kriva je pripremljena na sledeći način:

Napravljeni su vodeni rastvori kofeina koncentracija 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L i 30 mg/L. U rastvorima su spektrofotometrijski izmerene ekstinkcione vrednosti

na 272 nm, na osnovu kojih je konstruisana kriva. Grafik i jednačina standardne krive dati su u **Prilogu 1 (slika P-1.4)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.1.4. Ukupni polifenoli

Polifenoli su, iz otpadne kafe, ekstrahovani po metodi Yen i sar. (2005) [7], sa manjim modifikacijama, a njihov sadržaj u ekstraktima određivan je po Folin-Ciocalteovoj (*Folin-Ciocalteu*) metodi, spektrofotometrijskim postupkom na UV/VIS spektrofotometru, na 750 nm [31].

Reagensi:

70 % etanol – 72.92 mL koncentrovanog etanola (96 %) je dopunjeno destilovanom vodom do 100 mL.

15 % Natrijum-karbonat – 15.00 g natrijum-karbonata je rastvoreno u 100 mL destilovane vode.

Postupak:

Ekstrakcija polifenola iz otpadne kafe

30.0 g otpadne kafe je rastvoreno u 300 mL 70 %-tnog etanola. Ekstrakcija je izvođena na sobnoj temperaturi, tokom 2 h, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon ekstrakcije izvršeno je razdvajanje ekstrakta od taloga (centrifugiranjem u toku 10 minuta, 4500 obrt/min). Dobijeni supernatant je odvojen u normalni sud od 500 mL, a preostali talog je korišćen za reekstrakciju sa 150 mL 70 %-tnog etanola, pod istim uslovima. Nakon reekstrakcije, ponovljen je postupak razdvajanja ekstrakta od taloga i dobijeni supernatant je dodat prethodnom, nakon čega je u normalnom sudu dopunjen rastvaračem (70 %-nim etanolom) do crte. Ovako pripremljen ekstrakt otpadne kafe korišćen je za određivanje sadržaja ukupnih polifenola.

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu otpadne kafe

U epruveti je pomešano 100 µL ekstrakta otpadne kafe (prethodno razblaženog do koncentracije 10 mg s.m./mL) sa 500 µL Folin-Ciocalteovog reagensa i sa 6 mL destilovane vode, pa je smeša dobro promućkana na vorteksu. Nakon toga je dodato 2 mL 15 %-nog rastvora

natrijum-karbonata i rastvor je dopunjen do 10 mL destilovanom vodom, pa je ponovo promućkan na vorteksu. Absorbanca rastvora je merena nakon 2 sata, na 750 nm, prema slepoj probi, koja je pripremljena istovremeno, samo je umesto ekstrakta uzeto 100 μ L čistog rastvarača (u ovom slučaju 70 %-tnog etanola). Rezultati su izračunati iz standardne krive i izraženi u ekvivalentima galne kiseline (*gallic acid equivalents*, GAE).

Standardna kriva je pripremljena na sledeći način:

Napravljena su razblaženja galne kiseline od 1-1500 mg/L, koja su korišćena umesto uzoraka u opisanoj metodi po Folin-Ciocalteu. Iz nađenih ekstinkcionih vrednosti konstruisana je kriva. Grafik i jednačina standardne krive dati su u **Prilogu 1 (slika P-1.5)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.1.5.Hlorogenska kiselina

Sadržaj hlorogenske kiseline određen je spektrofotometrijskim postupkom na UV/VIS spektrofotometru, na 325 nm [63,218].

Reagensi:

Carez (*Carrez*) I – 21.90 g cink-acetata je rastvoreno u destilovanoj vodi, dodato 3 mL glacijalne sirćetne kiseline, a zatim u normalnom sudu dopunjeno destilovanom vodom do 100 mL.

Carez (*Carrez*) II – 10.60 g kalijum-ferocijanida je rastvoreno u 100 mL destilovane vode.

Postupak:

Izmereno je 0.7000 g otpadne kafe i prebačeno u kivetu za centrifugu od 50 mL. Dodato je 25 mL petroletra, promešano i centrifugirano (15 min, 4500 obrtaja/min). Zatim je supernatant odbačen, a postupak ponovljen na isti način. Talog je prosušen na vazduhu (kako bi miris rastvarača ispario) i prebačen u erlenmajer od 1 L sa malo vode. Potom je dodato još 400 mL ključale destilovane vode, smeša je zagrejana do temperature ključanja i tako ostavljena 15 minuta, a zatim naglo ohlađena pod mlazom vode. Smeša je prebačena u normalni sud od 500 mL, dopunjena vodom do crte, a zatim filtrirana, pri čemu je prvih 25-50 mL filtrata odbačeno. U 25 mL filtrata dodato je po 1 mL Carezovog reagensa I i II, da bi se istaložile prateće

supstance, i rastvor je profiltriran. Nakon filtriranja očitana je ekstinkcija filtrata na 325 nm, prema slepoj probi koja je pripremana istovremeno istim postupkom, samo bez dodavanja uzorka. Na osnovu očitanih vrednosti ekstinkcija određivana je koncentracija hlorogenske kiseline sa standardne krive.

Standardna kriva je pripremljena na sledeći način:

Napravljeni su vodeni rastvori hlorogenske kiseline koncentracija 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L i 20 mg/L. U rastvorima su izmerene ekstinkcione vrednosti na 325 nm, na osnovu kojih je konstruisana kriva. Grafič i jednačina standardne krive dati su u **Prilogu 1 (slika P-1.6)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.2. Ekstrakcija antioksidanasa iz otpadne kafe

Ekstrakcija antioksidanasa iz otpadne kafe vršena je metodom klasične ekstrakcije i ekstrakcijom potpomognutom mikrotalasima. U svojstvu polarnog rastvarača korišćen je rastvor 70 %-tnog etanola, koji se najčešće koristi za ekstrakciju polifenola i drugih supstanci sa antioksidativnom aktivnošću.

9.2.2.1. Klasična ekstrakcija polarnim rastvaračem

Antioksidansi iz otpadne kafe ekstrahovani su po metodi Yen i saradnika (2005) [7], sa manjim modifikacijama.

Reagensi:

70 % etanol – 72.92 mL koncentrovanog etanola (96 %) je dopunjeno destilovanom vodom do 100 mL.

Postupak:

Odmereno je 50.0 g otpadne kafe, prebačeno u staklenu čašu od 500 mL i potopljeno u 300 mL 70 %-tnog etanola. Čaša je, zatim, postavljena na magnetnu mešalicu, na sobnoj temperaturi, u trajanju od 2 sata, radi dalje ekstrakcije. Nakon ekstrakcije smeša je centrifugirana (10 minuta, 4500 obrtaja/min). Odvojen je supernatant u normalni sud od 500 mL, a preostali talog je reekstrahovan sa 150 mL 70 % etanola na magnetnoj mešalici u toku 2 sata. Ukupno vreme ekstrakcije iznosilo je 4 sata. Nakon isteka vremena, ponovljeno je centrifugiranje pod

istim uslovima, posle čega su spojeni supernatanti i dopunjeni u normalnom sudu do odgovarajuće zapremine rastvaračem, a zaostali talog je bačen.

9.2.2.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Otpadna kafa je sa rastvaračem (70 %-nim etanolom) zagrevana u klasičnoj mikrotalasnoj peći (namenjenoj domaćinstvima), prema proceduri koju su opisali Spigno i sar. (2009) [219] uz manje modifikacije.

Reagensi:

70 % etanol – 72.92 mL koncentrovanog etanola (96 %) je dopunjeno destilovanom vodom do 100 mL.

Postupak:

5.00 g otpadne kafe prebačeno je u erlenmajer od 500 mL i potopljeno u 45 mL 70%-tnog etanola (tako da je odnos čvrste faze (g) i tečne faze (mL) bio 1:9). Snaga mikrotalasne peći bila je 170 W, a ekstrakcija je trajala 1 minut. Tečna faza je odvojena od čvrste filtriranjem.

9.2.3. Karakterizacija ekstrakata sa antioksidansima

U dobijenim etanolnim ekstraktima antioksidanasa iz otpadne kafe, u daljem tekstu “ekstraktima”, određivana je suva materija (po proceduri opisanoj u odeljku 9.2.1.1), prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih polifenola (odeljak 9.2.1.4) i hlorogenske kiseline (odeljak 9.2.1.5), a zatim je merena antioksidativna aktivnost DPPH i FRAP metodom.

9.2.3.1. Prinos ekstrakcije

Prinos ekstrakcije određivan je iz odnosa sadržaja suve materije u dobijenim ekstraktima i sadržaja suve materije u otpadnoj kafi, prema sledećoj formuli:

$$\text{Prinos ekstrakcije (mg/g}_{s.m. \text{ otpadne kafe}}) = \frac{SM_e}{SM_{ok}} \times 1000 \quad (9.3)$$

SM_e - sadržaj suve materije u ekstraktu (g/g s.m. otpadne kafe),

SM_{ok} - sadržaj suve materije u otpadnoj kafi (g/g s.m. otpadne kafe).

9.2.3.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti

U dobijenim ekstraktima merena je antioksidativna aktivnost korišćenjem dve metode: ispitivanjem sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i FRAP metodom.

9.2.3.2.1. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala je metoda koja se najčešće koristi za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) je stabilni azotni radikal, koji se prilikom reakcije sa donorom protona redukuje do DPPH-H što dovodi do promene boje iz ljubičaste u žutu. Intenzitet promene boje se određuje spektrofotometrijski na 517 nm [220].

Reagensi:

0.2 mmol DPPH - 0.0078 g čistog DPPH (349.32 g/mol) je rastvoreno u 100 mL metanola.

Postupak:

Napravljena su razblaženja ekstrakata sledećih koncentracija: 0.1 mg s.m./mL, 0.2 mg s.m./mL, 0.5 mg s.m./mL, 1.0 mg s.m./mL, 2.0 mg s.m./mL, 5.0 mg s.m./mL, 10.0 mg s.m./mL i 20.0 mg s.m./mL. 50 µL ekstrakta navedenih koncentracija dopunjeno je metanolom do 4 mL (čime su se u radnom rastvoru dobile koncentracije ekstrakata 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL) i tom rastvoru je dodato 1 mL 0.2 mmol rastvora DPPH u metanolu. Sadržaj epruveta je snažno promućkan i ostavljen na sobnoj temperaturi u mraku. Posle 30 minuta izmerena je absorbanca na 517 nm, uz metanol kao slepu probu. Rezultati su izraženi kao procenti inhibicije, odnosno neutralizacije slobodnog DPPH radikala u odnosu na kontrolu. Kontrolu je predstavljala ista zapremina rastvora DPPH i metanola, uz dodatak 50 µL čistog rastvarača (70 %-tnog etanola) umesto ekstrakta, koja je pripremljena i čija je absorbanca merena prilikom svake analize.

Izračunavanje je vršeno prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{A_K - A_U}{A_K} \times 100 \quad (9.4)$$

A_K - absorbanca kontrole (nm),

A_U – absorbanca uzorka (nm).

Konstruisane su krive zavisnosti koncentracije ekstrakata i procenta inhibicije DPPH radikala i izračunate su vrednosti IC_{50} , koje predstavljaju koncentracije antioksidanasa potrebne za inhibiciju 50 % početne količine DPPH radikala. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.3.2.2. FRAP metoda

FRAP metoda se zasniva na redukciji gvožđe(III)-tripiridil triazin kompleksa [Fe(III)-TPTZ] do gvožđe(II)-tripiridil triazina [Fe(II)-TPTZ] pri kiselom pH. [Fe(II)-TPTZ] kompleks je intenzivno plavo obojen sa maksimumom absorbance na 593 nm [221].

Reagensi:

FRAP radni rastvor pripremljen je mešanjem: 25 mL acetatnog pufera (300 mmol/L, pH 3.6), 2.5 mL TPTZ rastvora (10 mmol/L) i 2.5 mL rastvora $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/L). FRAP radni rastvor priprema se neposredno pred upotrebu.

Acetatni puffer, 300 mmol/L, pH 3.6 – 6.4 mL 2M rastvora natrijum-acetata i 93.6 mL 2M rastvora sirćetne kiseline dopunjeno je destilovanom vodom do 1000 mL.

2M natrijum-acetat – 6.8 g natrijum-acetata rastvoreno je u 10 mL destilovane vode.

2M sirćetna kiselina – 1.92 mL glacijalne sirćetne kiseline dopunjeno je destilovanom vodom do 100 mL.

10 mmol/L TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) – 0.031 g TPTZ je rastvoreno u 10 mL 40 mmol/L HCl.

40 mmol/L HCl – 3.31 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline dopunjeno je destilovanom vodom do 1000 mL.

20 mmol/L $FeCl_3 \times 6H_2O$ – 0.054 g gvožđe-hlorid-heksahidrata rastvoreno je u 10 mL destilovane vode.

Postupak:

150 μL ekstrakta (koncentracije 1 mg s.m./mL) je dodato u 4.5 mL FRAP radnog rastvora i sadržaj je snažno promućkan. 5 minuta potom je merena absorbanca rastvora na 593 nm, korišćenjem FRAP radnog rastvora kao slepe probe. Rezultati su izračunati iz standardne krive i izraženi u $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{L}$.

Standardna kriva je dobijena na sledeći način:

150 μL rastvora $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ različitih koncentracija (200 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$, 600 $\mu\text{mol/L}$, 800 $\mu\text{mol/L}$ i 1000 $\mu\text{mol/L}$) je dodato u 4.5 mL radnog rastvora i absorbanca je merena posle 5 minuta na 593 nm. Grafik i jednačina standardne krive dati su u **Prilogu 1 (slika P-1.7)**. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.4. Adsorpcija zagađivača vode na otpadnu kafu iz koje su ekstrahovani antioksidansi

Otpadna kafa nakon ekstrakcije antioksidanasa je aktivirana i iskorišćena kao adsorbent za ispitivanje adsorpcije katjonske boje, pesticida i polifenola. Na aktiviranoj kafi su najpre definisane osnovne fizičko-hemijske karakteristike. Proces adsorpcije je izveden u dva režima: šaržnom i kontinualnom, pri čemu su određeni osnovni kinetički parametri i definisani uslovi postizanja adsorpcione ravnoteže.

9.2.4.1. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika aktivirane kafe

Određivanje fizičko-hemijskih osobina adsorbenta podrazumeva posmatranje i karakterizaciju njegove aktivne površine. S tim u vezi, određene su i definisane osnovne površinske funkcionalne grupe na aktiviranoj kafi korišćenjem FTIR tehnike, kao i tip naelektrisanja, dok je pomoću mikrograma skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) prikazan izgled i struktura površine adsorbenta, odnosno, aktivirane kafe.

9.2.4.1.1. Određivanje površinskih funkcionalnih grupa korišćenjem FTIR tehnike

FTIR spektroskopija je nedestruktivna i lako primenjiva analitička metoda, koja se najčešće koristi za detekciju i analizu sastava i količine pojedinih hemijskih vrsta na površini analiziranog uzorka adsorbenta [19,118,171,180].

Priprema uzorka za snimanje FTIR spektra izvedena je na sledeći način: odmereno je 0.6000 mg aktivirane kafe (osušene do konstantne mase) i pomešano sa 200 mg prethodno izarenim kalijum-bromidom, kako bi se pripremila čestica veličine 2 μm . Smeša je potom presovana u specijalnom kalupu pomoću hidraulične prese pod visokim pritiskom. Dobijena okrugla pločica je potom ubačena u aparat za merenje (FTIR spektroskop) na sobnoj temperaturi, u opsegu talasnih dužina od 400-4000 cm^{-1} sa rezolucijom 4 cm^{-1} .

9.2.4.1.2. Određivanje površinskog naelektrisanja pomoću tačke pH_{pzc}

Naelektrisanje površinskih funkcionalnih grupa aktivirane kafe određivano je merenjem tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc} tačka) [174].

Reagensi:

0.01 M natrijum-hlorid – 0.2923 g natrijum-hlorida rastvoreno je u 500 mL destilovane vode.

Postupak:

Sipano je 50 mL 0.01 M NaCl u šest erlenmajera od 100 mL, u kojima je pH redom podešavan od 2-12 dodavanjem 0.1 M HCl ili 0.1 M NaOH. Zatim je u svaki sud pojedinačno dodato po 0.1500 g aktivirane kafe, nakon čega su erlenmajeri sa smešama dobro zatvoreni čepovima i ostavljeni na tresilici (uz brzinu mešanja od 120 rpm) na sobnoj temperaturi. Krajnji pH u svakom sudu pojedinačno, meren je nakon 48 sati od početka mešanja. Tačka pH_{pzc} očitavana je sa grafika $\text{pH}_{\text{početno}} - \text{pH}_{\text{krajnje}}$, pri čemu je pH_{pzc} tačka preseka dveju krivih. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.4.1.3. Vizualizacija površinske strukture korišćenjem tehnike SEM

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je često korišćena tehnika za dobijanje mikrografa i izučavanje morfologije (topografije) adsorbenta, neposredno ukazujući na nivo poroznosti posmatranog uzorka [19,171,204,222].

Za dobijanje SEM mikrografa, uzorak aktivirane kafe (prethodno osušene do konstantne mase) je pre snimanja prekriven zlatom, a zatim je posmatran skenirajućim elektronskim mikroskopom (uz pogonski napon od 10 kV), pri uvećanju od 5000 puta.

9.2.4.2. Postupak procesa adsorpcije

Proces adsorpcije zagađivača vode na aktiviranu kafu izveden je u dva režima: šaržnom (na tresilici) i kontinualnom (na koloni).

9.2.4.2.1. Adsorpcija u šaržnom režimu

Najjednostavnija primena tehnike diskontinualnih (šaržnih) procesa adsorpcije je mešanje određene količine adsorbenta u sudu sa definisanom zapreminom fluida [85].

100 mL rastvora adsorbata (određene koncentracije) preneto je u erlemajer od 250 mL, gde je dodato 2.00 g aktivirane kafe. Erlenmajer sa smešom je potom postavljen na tresilici (pri brzini mešanja od 200 rpm), na sobnoj temperaturi (27 °C). Nakon 2 sata, smeša je profiltrirana, pri čemu je tečni deo analiziran spektrofotometrijski (na talasnoj dužini koja odgovara svakom adsorbatu pojedinačno), radi određivanja rezidualne koncentracije u radnom rastvoru.

Adsorpcioni kapacitet (q_t) i procenat uklanjanja adsorbata iz rastvora određivani su korišćenjem sledećih jednačina:

$$q_t = \frac{(c_p - c_k)V}{m_{ads}} \quad (9.5)$$

$$\text{Uklanjanje adsorbata iz rastvora (\%)} = \frac{(c_p - c_k)}{c_p} \times 100 \quad (9.6)$$

pri čemu su:

q_t - adsorpcioni kapacitet (mg/g),

c_p i c_k - početna i krajnja koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/L),

V - zapremina rastvora adsorbata (L),

m_{ads} - masa adsorbenta (g).

9.2.4.2.2. Adsorpcija u kontinualnom režimu

Tip kolone sa nepokretnom čvrstom fazom je najčešće korišćena i najjednostavnija tehnika za izvođenje procesa kontinualne adsorpcije fluida [85].

Kolona, visine 15 cm i prečnika 1.6 cm, je u gustom sloju punjena sa 2.00 g oksidovane kafe. 100 mL rastvora adsorbata (određene koncentracije) kontinualno je propuštano kroz

kolonu, uz protok od 1 mL/min. Nakon isteka celokupne zapremine, uzorak (propuštena tečna faza) je prikupljen, filtriran i analiziran spektrofotometrijski (na talasnoj dužini koja odgovara svakom adsorbata pojedinačno), radi određivanja rezidualne koncentracije u radnom rastvoru.

Adsorpcioni kapacitet i procenat uklanjanja adsorbata iz rastvora određivani su korišćenjem jednačina (5) i (6).

Desorpcija adsorbovane supstance

Desorpcija adsorbovane supstance vršena je odmah nakon završenog procesa kontinualne adsorpcije, propuštanjem rastvora 20 % etanola kroz kolonu sa punjenjem. Rastvor dobijen propuštanjem rastvarača je analiziran spektrofotometrijski, i izračunat je procenat desorbovane supstance korišćenjem sledeće jednačine:

$$Desorpcija (\%) = \frac{C_{ads. \text{ supst.}}}{C_{des. \text{ supst.}}} = \frac{(C_p - C_k)}{C_{des. \text{ supst.}}} \times 100 \quad (9.7)$$

pri čemu su:

$C_{ads. \text{ supst.}}$ – koncentracija adsorbovane supstance (mg/L),

$C_{des. \text{ supst.}}$ – koncentracija desorbovane supstance (mg/L).

9.2.4.3. Kinetika i mehanizam procesa adsorpcije

Kinetika procesa adsorpcije zagađivača vode na aktiviranu kafu određivana je u šaržnom režimu.

200 mL rastvora adsorbata (prethodno definisanih koncentracija) pomešano je sa 4.00 g aktivirane kafe, u erlenmajerima od 300 mL. Erlenmajeri sa smešama su postavljeni na tresilicu, pri čemu je brzina mešanja iznosila 150 rpm, na sobnoj temperaturi (27 °C), tokom dva sata. Uzorci (5 mL tečnog dela smeše) su uzimani u određenim vremenskim intervalima, filtrirani i analizirani spektrofotometrijski, radi određivanja rezidualne koncentracije u radnom rastvoru.

Kinetički podaci analizirani su korišćenjem modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog modela međučestiščne difuzije.

Linearizovani oblik modela pseudo-prvog reda prikazan je sledećom jednačinom [180]:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (9.8)$$

pri čemu su:

q_e i q_t - količina adsorbata na adsorbentu (mg/g) u trenutku ravnoteže i u vremenu t ,

k_1 - konstanta ravnoteže pseudo-prvog reda (1/h).

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $t\text{-}\log(q_e - q_t)$ izračunati su redom parametri k_1 i q_e .

Linearizovani oblik modela pseudo-drugog reda prikazan je sledećom jednačinom [180]:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (9.9)$$

pri čemu su:

q_e i q_t - količina adsorbata na adsorbentu (mg/g) u trenutku ravnoteže i u vremenu t ,

k_2 - konstanta ravnoteže pseudo-drugog reda (g/(mg h)).

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $t\text{-}t/q_t$ izračunati su redom parametri q_e i k_2 .

Linearizovani oblik Veber-Morisovog (*Weber-Morris*) modela međučestišne difuzije prikazan je sledećom jednačinom [180]:

$$q_t = k_{ri} t^{1/2} + C_i \quad (9.10)$$

pri čemu su:

q_t - količina adsorbata na adsorbentu u vremenu t (mg/g),

k_{ri} - konstanta ravnoteže i -tog nivoa međučestišne difuzije (mg/(g h^{1/2})),

C_i - efekat graničnog sloja u procesu međučestišne difuzije.

Iz vrednosti nagiba i odsečka prave $t^{1/2} - q_t$ izračunati su redom parametri k_{ri} i C_i .

Za crtanje grafika linearizovanih oblika kinetičkih modela korišćen je softver OriginPro® v8.0.

9.2.4.4. Adsorpciona ravnoteža i izoterme

Adsorpciona ravnoteža procesa adsorpcije zagađivača vode na aktiviranu kafu analizirana je u šaržnom režimu, po identičnom postupku opisanom u odeljku 9.2.4.3 za ispitivanje kinetike procesa.

Ravnotežni podaci analizirani su korišćenjem tri najčešće primenjivana modela izoterma: Lengmirovog (*Langmuir*), Frojndlihovog (*Freundlich*) i Tempkinovog (*Tempkin*).

Linearizovani oblik Lengmirovog modela prikazan je sledećom jednačinom [223]:

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{K_L q_m} \right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (9.11)$$

pri čemu su:

q_e - količina adsorbata na adsorbensu (mg/g),

q_m - adsorpcioni kapacitet formiranja monosloja na adsorbensu (mg/g),

C_e - koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/L),

K_L - Lengmirova konstanta (L/mg).

Iz vrednosti odsečka i nagiba prave $1/C_e - 1/q_e$ izračunati su redom parametri q_m i K_L .

Izračunavanje Lengmirovog separacionog faktora R_L [224] i promene slobodne energije ΔG (kJ/mol) [225] vršeno je prema sledećim jednačinama, redom:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (9.12)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad (9.13)$$

pri čemu su:

C_0 - početna koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/L),

R - ravnotežna gasna konstanta (8.314 J/(mol K)),

T - apsolutna temperatura (°K).

Linearizovani oblik Frojndlihovog modela prikazan je sledećom jednačinom [180]:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (9.14)$$

pri čemu su:

q_e - količina adsorbata na adsorbensu (mg/g),

C_e - koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/L),

K_F - Frojndlihova konstanta (mg/g)(L/g)ⁿ,

n – mera adsorpcionog intenziteta.

Iz vrednosti odsečka i nagiba prave $\log C_e - \log q_e$ izračunati su redom parametri K_F i n .

Linearizovani oblik Tempkinovg modela prikazan je sledećom jednačinom [104]:

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln A + \frac{RT}{b_T} \ln C_e \quad (9.15)$$

pri čemu su:

q_e - količina adsorbata na adsorbensu (mg/g),

C_e - koncentracija adsorbata u rastvoru (mg/L),

R - ravnotežna gasna konstanta (8.314 J/(mol K)),

T - apsolutna temperatura (°K),

A - izotermalna konstanta (L/mg),

b_T - Tempkinova ravnotežna konstanta (J/mol).

Za crtanje grafika linearizovanih oblika modela ravnotežnih izoterma korišćen je softver OriginPro® v8.0.

10. REZULTATI I DISKUSIJA

10.1. Hemijski sastav otpadne kafe

Rezultati određivanja suve materije, masti, kofeina, hlorogenske kiseline i ukupnih polifenola u otpadnoj kafi prikazani su u **tabeli 10.1.**

Tabela 10.1. Sadržaj suve materije, masti, kofeina i polifenola u uzorku otpadne kafe

Suva materija	Masti	Kofein	Ukupni polifenoli	Hlorogenska kiselina
(%)	(% /s.m.)	(% /s.m.)	(% */s.m.)	(% /s.m.)
98.41	11.75	0.79	1.68	1.54

* GAE – ekvivalenti galne kiseline

Sadržaj **masti**, ekstrahovane heksanom iz otpadne kafe, iznosio je 11.75 %. U mnogim istraživanjima pokazano je da je heksan jedan od najefikasnijih rastvarača za izolovanje ovih lipofilnih jedinjenja iz više vrsta otpadnih materijala od kafe [7,226,227], što opravdava njegovo korišćenje u ovom radu. Pojedini istraživači smatraju da se masti velikim delom koncentrišu u otpadnoj kafi nakon pripreme napitka [226], s obzirom da su u napicima ekstrahovane (toplom vodom ili parom), gotovo, neznatne količine ove grupe jedinjenja. Dobijeni rezultati sadržaja masti u otpadnoj kafi bili su u granicama literaturnih vrednosti, koji se kreću od 6.2-16.2 % [4,228,229]. Ramalakshmi i sar. (2008) [227] su iz sirovih zrna kafe nižeg ranga kvaliteta izolovali mast u količini 8.17 %. Imajući u vidu da sadržaj masti ostaje relativno stabilan tokom pečenja [230], može se pretpostaviti da su niže vrednosti sadržaja masti u navedenom radu dobijene kao rezultat uticaja vrste kafe, uz napomenu da je kafa vrste arabika bogatija mastima (14-20%), u odnosu na kafu vrste robusta (11-16%) [4]. Sa, druge strane, metodom superkritične ekstrakcije pod povišenim pritiskom (25 MPa) i temperaturom (50 °C), Couto i sar. (2009) [226] su iz otpadne kafe izolovali nešto veću količinu, od oko 15 % masti.

Procenjeno je da su glavne identifikovane masne komponente u kafi trigliceridi, estri terpena, slobodni steroli, estri sterola, slobodne masne kiseline, acilgliceroli i polarni lipidi [7]. Pri tom su, u sastavu osnovnih masnih kiselina najvećim delom pronađene linoleinska (C18:2) i palmitinska (C16:0), a zatim i oleinska (C18:1) i stearinska (C18:0). U manjem sadržaju bilo je i laurinske (C12:0), miristinske (C14:0), linolenske (C18:3) i arahidonske (C20:4) [226]. Smatra

se da ne postoje značajne razlike u sastavu masnih kiselina izolovanih iz zelenih ili pečenih zrna kafe, a kako ni način pripreme napitka ne doprinosi dodatnim promenama [230], može se reći da i u otpadnoj kafi dominira približno isti odnos sadržaja ovih komponenti.

Sadržaj **kofeina** u otpadnoj kafi iznosio je 0.79 %. U literaturi se mogu naći tvrdnje da sadržaj kofeina u kafi zavisi pre svega od porekla, genetike i uslova sredine, vremena zrenja i načina obrade biljnog materijala [231]. Cruz i sar. (2012) [4] su iz otpadne espresso kafe izolovali 0.45 % kofeina, dok su Ramalakshmi i sar. (2009) [31] u analizi otpadne kafe vrste arabika i vrste robusta pronašli da one sadrže 0.5 % i 0.2 % kofeina, redom. Bravo i sar. (2012) [11] su, na sličan način, ispitivali sadržaj kofeina u otpadnoj kafi vrste arabika i robusta, dobijenim različitim tehnikama pripreme napitka (filter, espresso, francuski presovana i moka). U svim vrstama otpadne kafe, izuzev moke, pronađeno je 0.36 - 0.52 % kofeina u otpadnoj kafi vrste arabika (najviše u otpadnoj filter kafi) i 0.57 - 0.81 % kofeina u otpadnoj kafi vrste robusta (najviše u otpadnoj espresso kafi). Sadržaj kofeina u otpadnoj kafi bio je 2-3 puta manji nego u odgovarajućim napicima. Smatra se da se, skoro, celokupan sadržaj kofeina iz kafe ekstrahovao nakon dve ekstrakcije vodom, najpre velikim delom u napitak, a zatim i ekstrakcijom čvrstog ostatka (otpadne kafe), s obzirom da je drugom sukcesivnom ekstrakcijom otpadne kafe izolovano manje od 3% kofeina dobijeno prvom ekstrakcijom [11]. Moka kafa bila je napitak za koji je pokazano da je najbogatija kofeinom, s obzirom da u čvrstom ostatku, nakon pripreme napitka, nije bilo tragova ovog alkaloida, ili je nivo sadržaja bio ispod granica detekcije uobičajenim metodama. To znači da otpadna kafa, čak i nakon ekstrakcije vodom, može, gotovo, u potpunosti biti oslobođena kofeina.

Sa druge strane, iz sirove kafe mogu se izolovati znatno veće količine ove grupe jedinjenja. Isto važi i za pečenu kafu, u skladu sa tvrdnjom da sadržaj kofeina, kao i masti, pretežno ostaje nepromenjen nakon pečenja kafe [26]. Pronađeno je da sirova kafa vrste arabika sadrži 0.8 - 1.4 % kofeina [4,232,233], a robusta 1.7 - 4.0 % [4,232,233], dok svojevrsna mešavina ove dve vrste, tzv. arabusta, sadrži oko 1.72 % kofeina [233]. Slično je zabeleženo i u istraživanju sirove kafe nižeg ranga kvaliteta (1.7 % kofeina) [31,227].

Sadržaj **polifenola** u otpadnoj kafi izražen je u ekvivalentima galne kiseline (*gallic acid equivalents*, GAE). Pronađeno je da otpadna kafa sadrži 16.79 mg GAE/g s.m., odnosno 1.68 % /s.m. Time je izolovana veća količina polifenola, u poređenju sa istraživanjem Páscoa i sar.

(2013) [29] koji su u otpadnoj kafi pronašli 12.1 mg GAE/g s.m. Bravo i sar. (2012) [11] su zabeležili da je otpadna espresso kafa vrste arabika sadržala 15.79 mg GAE/g s.m., a robusta 19.12 mg GAE/g s.m. Sa druge strane, Ramalakshmi i sar. (2009) su izolovali nešto manje količine polifenola iz otpadne kafe, i pri tom je u arabici pronađen veći sadržaj u odnosu na robustu [31]. Sadržaj polifenola uslovljen je pre svega vrstom kafe, a zatim i uslovima obrade, pri čemu do najvećih promena dolazi tokom pečenja kafe, zato što visoke temperature mogu izazvati polimerizaciju, auto-oksidaciju ili degradaciju ovih jedinjenja [234]. U otpadnoj kafi je, kao što je očekivano, pronađeno manje polifenola, u odnosu na sirovu ili pečenu kafu, što je logično, jer su se tokom pripreme napitka oslobodili u vodene ekstrakte [7]. U sirovoj kafi nalazi se od 30-54 mg GAE/ g s.m. [31,227]. Kada je reč o napicima od kafe, Pérez-Martínez i sar. (2010) [235] su pronašli da je polifenolima najbogatija šoljica espresso kafe, a za njom filter i moke, redom.

Sadržaj **hlorogenske kiseline** u otpadnoj kafi, u ovom radu, iznosio je 15.41 mg/g otpadne kafe, odnosno, 1.54 % /s.m. Hlorogenska kiselina je najprisutije jedinjenje u kafi iz grupe polifenola. HPLC analizom pronađeno je da su u otpadnoj kafi najprisutnije 5-CQA i 3,4-diCQA, dok su 3,5-diCQA i 3-CQA manje zastupljene [11]. Smatra se da su mono-CQA uglavnom ekstrahovane iz kafe tokom pripreme napitka, dok su za ekstrakciju di-CQA potrebni dodatni uslovi. Esterifikacija dodatnih kafeinskih kiselina u di-CQA znači i povećan broj hidroksilnih grupa koje se mogu vezati za karbonilne grupe amida iz peptidnih veza u melanoidinima (čije je stvaranje favorizovano pri niskoj aktivnosti vode i visokoj temperaturi [3,27]). Na taj način se hlorogenske kiseline inkorporiraju u melanoidine, uglavnom preko neestrarskih veza tokom procesa pečenja kafe. Zato je oslobađanje i ekstrakcija di-CQA, vezane za melanoidine, dosta teže u slučaju mono-CQA [11].

Sadržaj hlorogenske kiseline najviši je u sirovoj kafi, zatim pečenoj (što pretežno zavisi od uslova i nivoa pečenja) i na kraju otpadnoj kafi, imajući u vidu da se ova grupa jedinjenja velikim delom ekstrahuje toplom vodom u napitak [7,234]. S tim u vezi, pokazano je da se drugom uzastopnom ekstrakcijom vodom iz otpadne kafe ekstrahovala samo neznatna količina hlorogenske kiseline (manje od 15 % dobijene prvom ekstrakcijom) [11]. Za razliku od vrednosti rezultata prikazanih u ovom radu, Cruz i sar. (2012) [4] su pronašli da je u otpadnoj espresso kafi bilo svega 4.79 mg/g s.m. hlorogenske kiseline. Bravo i sar. (2012) [11] ispitivali su sadržaj

hlorogenske kiseline u otpadnoj kafi, dobijenoj nakon odgovarajućih tretmana pripreme napitaka (poput filter, espresso, presovane i moka kafe), uključujući i uticaj vrste kafe. U otpadnoj kafi vrste arabika pronađeno je od 11.05 mg/g (espresso) do 13.24 mg/g (filter) hlorogenske kiseline, a u otpadnoj kafi vrste robusta od 6.22 mg/g (filter) do 7.49 mg/g (espresso) hlorogenske kiseline [11]. I u radu Ramalakshmi i sar. (2009) [31] pokazano je da je otpadna kafa vrste arabika bogatija hlorogenskom kiselinom u odnosu na robustu.

Cheong i sar. (2013) [234] sprovedli su istraživanje o vrsti kafe, najbogatije ovom grupom jedinjenja, slobodno rečeno, antioksidansima. Pronađeno je da sirova kafa vrste *Chang* (poreklom sa Tajlanda) i *Kopi Luwak* (Indonezija) sadrže najviše hlorogenske kiseline, 18.70 mg/g i 18.60 mg/g, redom, dok pečena kafa vrste *Yunnan* (Kina) ima 6.05 mg/g [234]. Interesantno je da je u nekim slučajevima pronađeno da sirova kafa nižeg ranga kvaliteta, u zrnima koja su oštećena, sadrži veće količine hlorogenske kiseline (približno 8.5 %), u odnosu na zdrava, odabrana, zrna kafe [31,227]. Razlog tome može biti tvrdnja da se nivo sadržaja hlorogenske kiseline u biljci povećava u zavisnosti od više faktora, koji, između ostalih, uključuju i ekstremnije promene u uslovima spoljašnje sredine, kao i moguće infekcije biljke patogenima [64]. Hlorogenska kiselina u tim slučajevima igra ulogu prirodnog odbrambenog mehanizma biljke.

10.2. Ekstrakcija antioksidanasa iz otpadne kafe

Nakon što je definisan hemijski sastav, iz otpadne kafe su polarnim rastvaračem, u ovom istraživanju 70 %-nim etanolom, ekstrahovani antioksidansi, metodama klasične i mikrotalasne ekstrakcije. Na osnovu količine i sadržaja suve materije dobijenih ekstrakata određen je prinos ekstrakcije, dok je sastav odgovarajućih ekstrakata praćen određivanjem sadržaja ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline i merenjem antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom.

10.2.1. Prinos ekstrakcije

Prinosi ekstrakata antioksidanasa dobijenih klasičnom i mikrotalasnom ekstrakcijom prikazani su u **tabeli 10.2**.

Tabela 10.2. Prinos ekstrakata antioksidanasa u zavisnosti od vrste ekstrakcije

Tip ekstrakcije	Suva materija (%)	Prinos ekstrakcije (% / s.m.)
Klasična	0.31	1.89
Mikrotalasna	0.34	3.11

Uočeno je da je mikrotalasnom ekstrakcijom antioksidanasa postignut viši prinos u odnosu na tehniku klasične ekstrakcije. Vrednosti prinosa, generalno, nisu visoke, što je opravdano, jer je otpadna kafa već prethodno ekstrahovana vodom. Slično je i u radu Yen i sar. (2005) [7] prinos ekstrakcije otpadne kafe primenom etanola kao rastvarača bio je 1.38 %. U literaturi je zabeleženo da su drugi rastvarači, poput n-heksana [7] ili metanola [227], dali viši prinos ekstrakcije, iz pečene, odnosno sirove kafe nižeg ranga kvaliteta, međutim, upotreba ovih rastvarača u ovom istraživanju nije razmatrana kao najpogodniji izbor usled mogućih toksičnih rezidua.

Mikrotalasna ekstrakcija je, relativno, nova tehnika koja se koristi za potrebe izolovanja bioaktivnih materija iz različitih vrsta prirodnih materijala i agroindustrijskog otpada, a nedavna istraživanja ukazuju na njenu sve veću primenu [76,77,78,79,80,81,82,236,237,238]. Istraživači su pokazali da su prinosi ekstrakata sa polifenolima dobijeni mikrotalasnom ekstrakcijom veći, ne samo, u odnosu na ekstrakte iz klasične [236,238], već i ultrazvučne, odnosno, rotacione ekstrakcije [83]. Uz to, mikrotalasnom ekstrakcijom je postignut viši prinos za kraće vreme, pri istoj temperaturi, uz upotrebu manje količine rastvarača [239], što se energetske i ekonomske pokazalo kao veoma isplativo. Prednost mikrotalasne ekstrakcije nad ostalim tehnikama bila je posledica principa na kome je ona zasnovana. Celokupan uzorak je pod dejstvom elektromagnetne prirode mikrotalasa zagrevan postepeno i homogeno, na bazi mehanizma dipolarne rotacije molekula [83]. Dipoli su molekuli sa električnim dipolnim momentom, kod kojih se centri mase naelektrisanja ne poklapaju. Oni su veoma osetljivi na dejstvo spoljašnjeg električnog polja i pokušavaju se uskladiti sa njegovim oscilovanjem [239]. Usled oscilacija dolazi do kretanja i sudara sa okolnim molekulima, čime dipoli, zbog trenja, gube energiju i oslobađaju je u vidu toplote u sredinu, rezultujući veoma brzim zagrevanjem ekstrakcionog medijuma [83]. Mnogi polarni molekuli imaju električni dipolni moment zbog različite elektronegativnosti hemijskih elemenata koji ulaze u njihov sastav (u tim slučajevima

centar elektronskog naelektrisanja ne poklapa sa centrom nukleinskog naelektrisanja). Rastvarači, kao što su metanol, etanol i voda, dovoljno su polarna jedinjenja da bi se mogli zagrejati mikrotalasnom energijom. Uobičajeno je i da odabrani rastvarač treba da poseduje i visoku dielektričnu konstantu, kao mogućnost dobrog apsorbovanja energije mikrotalasa. Što je veća dielektrična konstanta rastvarača, veći je i efekat zagrevanja [239]. Rodríguez-Rojo i sar. (2012) [239] napominju da prilikom odabira rastvarača, između ostalog, treba imati u vidu i hidrofobnost grupe jedinjenja koja se ekstrahuju. Treba dodati da i voda, koja je zadržana u biljnoj matrici, može dodatno apsorbovati mikrotalasnu energiju, i time potpomoći razaranje ćelija, tzv. unutrašnjim superzagrevanjem, koje je olakšalo oslobađanje željenih hemijskih jedinjenja iz matrice u ekstrakt [83].

10.2.2. Sadržaj ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline u ekstraktima

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih polifenola i hlorogenske kiseline u ekstraktima otpadne kafe u zavisnosti od vrste ekstrakcije prikazani su u **tabeli 10.3**.

Tabela 10.3. Sadržaj polifenola i hlorogenske kiseline u ekstraktima otpadne kafe u zavisnosti od vrste ekstrakcije

Tip ekstrakcije	Ukupni polifenoli (mg GAE*/g s.m. ekstrakta)	Hlorogenska kiselina (mg/g s.m. ekstrakta)
Klasična	279.83	8.12
Mikrotalasna	288.10	10.43

* GAE – ekvivalenti galne kiseline

Prilikom ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe, klasičnom i mikrotalasnom metodom, kao rastvarač, korišćen je 70 % etanol. Najčešće primenjivani rastvarači za ekstrakciju polifenolnih komponenti iz biljnih materijala su metanol, etanol, aceton, etilacetat [32]. Pri tom je pokazano da su najveći prinosi obično dobijeni korišćenjem rastvora etanola, što jednim delom opravdava njegovu upotrebu i u ovom radu. Šta više, vodeni rastvor etanola bio je posebno pogodan zbog svoje niske toksičnosti, kao i ekonomičnosti [240]. Korisno je napomenuti i da je etanol biorastvarač koji se može dobiti fermentacijom biomase bogate šećerima, uz mogućnost recikliranja otpadnih sirovina agroindustrije [241]. S tim u vezi, njegova upotreba može, dodatno, biti osnova za stvaranje i razvoj održivih procesa.

Prethodno je, u radu Milutinović i sar. (2003) [32] najveći sadržaj ukupnih polifenola dobijen korišćenjem 70 % rastvora etanola, zatim 70 % rastvora metanola, dok se voda pokazala kao najmanje efikasna za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz otpadne espresso kafe. Slične rezultate su dobili Franco i sar. (2008) [242]. Prema njihovim rezultatima, najveći sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima otpadne kafe je ostvaren korišćenjem 60 % i 20 % rastvora etanola, dok je povećanje udela metanola u vodenom rastvoru dovelo do smanjenja sadržaja polifenola u ekstraktu. U radu Upadhyay i sar. (2012) [68], vodeni ekstrakt sirove kafe dobijen primenom mikrotalasnog tretmana sadržao je najveći procenat ukupne suve materije kao i najveći udeo hlorogenske kiseline, u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom čistog metanola i etanola kao rastvarača.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu, u ekstraktu iz klasične ekstrakcije bilo je 279.8 mg GAE/g s.m. ekstrakta, a u onom iz mikrotalasne ekstrakcije 288.1 mg GAE/g s.m. ekstrakta. Na sličan način, i sadržaj hlorogenske kiseline bio je veći u ekstraktu iz mikrotalasne ekstrakcije (10.43 mg/g s.m. ekstrakta), u odnosu na ekstrakt iz klasične (8.12 mg/g s.m. ekstrakta). Veći sadržaj polifenola, odnosno, hlorogenske kiseline u ekstraktu znači bolju efikasnost procesa ekstrakcije [243]. Osnovna prednost mikrotalasne ekstrakcije, pored većeg sadržaja ekstrahovanih antioksidanasa, bila je vreme trajanja procesa, svega jedan minut, u poređenju sa četiri sata, koliko je trajala u slučaju klasične ekstrakcije. Međutim, treba napomenuti da je proces klasične ekstrakcije vođen na sobnoj temperaturi, za razliku od energije mikrotalasa koja je uticala na blago zagrevanje reakcione sredine (s obzirom na relativno slabu primenjenu snagu od 170 W i relativno kratko vreme trajanja ekstrakcije).

U literaturi je, takođe, pronađeno da je metoda mikrotalasne ekstrakcije bila pogodniji izbor za potrebe izolovanja polifenola iz više vrsta biljnih materijala. Prilikom mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz semenski grožđa [76] izolovano je, gotovo, dvostruko više polifenola u poređenju sa ultrazvučnom ekstrakcijom. Potrebno vreme za mikrotalasnu ekstrakciju bilo je 4.6 minuta, a ultrazvučnu 29.0 minuta [76,244]. U istom istraživanju je pokazano da je klasičnom ekstrakcijom dobijeno nešto više polifenola, ali za dosta duže vreme trajanja procesa (200 min) [71,76]. Na sličan način, pronađeno je da se mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz tropa jabuka pokazala povoljnijom u poređenju sa ultrazvučnom i rotacionom, posebno u pogledu potrošnje rastvarača i vremena trajanja ekstrakcije [81]. Isto je važno i za ekstrakte paradajza [77], ekstrakte ljuski krompira [78] ili kora mandarina [83].

Na osnovu literaturnih pregleda, na temu ekstrakcije polifenola iz otpadne kafe, zabeleženo je da su se istraživači uglavnom služili tehnikom klasične ekstrakcije, primenom smeša više vrsta rastvarača, manje ili veće polarnosti. Ramalakshmi i sar. (2009) [31] su u ekstraktu otpadne kafe vrste arabika (prethodno odmašćene heksanom), nakon 8 sati klasične ekstrakcije metanolom, pronašli svega 6.32 % ukupnih polifenola, a u robusti 4.81 %. U istom istraživanju pokazano je da je je sadržaj hlorogenske kiseline bio veći u ekstraktu otpadne kafe vrste robusta u odnosu na arabiku. Madhava Naidu i sar. (2008) [42] su za ekstrakciju polifenola iz sirove kafe koristili smešu rastvarača izopropanol:voda, u različitim proporcijama, pri čemu je proces trajao pet sati. Sánchez-González i sar. (2005) [35] su pokazali da je dodatak HCl u smešu rastvarača metanol:voda (50:50) uticao na značajno povećanje količine ekstrahovanih polifenola iz pečene kafe.

10.2.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata

U kompleksnim sistemima, kao što su prirodni ekstrakti sa različitim polifenolnim komponentama, nužno je izvršiti uporedno ispitivanje antioksidativne aktivnosti primenom najmanje dva standardizovana testa, imajući u vidu i različite mehanizme delovanja antioksidanasa prisutnih u namirnicama. S tim u vezi, antioksidativna aktivnost ekstrakata otpadne kafe merena je DPPH i FRAP metodom.

10.2.3.1. Metoda neutralizacije DPPH radikala

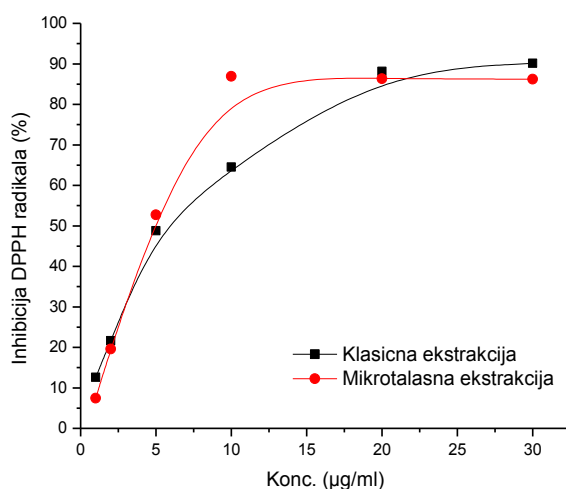
Jačina antioksidativne aktivnosti ekstrakata otpadne kafe merena je na osnovu količine redukovanog DPPH radikala, nastalog u reakcijama sa donorima protona, prisutnih u ekstraktima.

Rezultati merenja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom u ekstraktima otpadne kafe u zavisnosti od vrste ekstrakcije i koncentracije ekstrakata prikazani su u **tabeli 10.4** i predstavljeni grafički na **slici 10.1**.

Ekstrakt otpadne kafe dobijen metodom klasične ekstrakcije ispoljio je maksimum inhibicije DPPH radikala (~ 90 %) pri koncentraciji 30 µg s.m. ekstrakta/mL, dok je vrednost maksimuma inhibicije DPPH radikala koji je manifestovao ekstrakt otpadne kafe dobijen metodom mikrotalasne ekstrakcije bila nešto manja (~ 87 %), ali je postignuta pri nižoj koncentraciji, 10 µg s.m. ekstrakta/mL.

Tabela 10.4. Inhibicija DPPH radikala (%) ekstrakata otpadne kafe dobijenih metodama klasične i mikrotalasne ekstrakcije u zavisnosti od koncentracije ekstrakata

Koncentracija ($\mu\text{g s.m. ekstrakta/mL}$)	Inhibicija DPPH radikala (%)	
	Klasična ekstrakcija	Mikrotalasna ekstrakcija
1	12.58	7.48
2	21.62	19.57
5	48.81	52.75
10	64.49	86.94
20	88.12	86.32
30	90.14	86.19



Slika 10.1. Inhibicija DPPH radikala (%) u zavisnosti od koncentracije ekstrakata otpadne kafe

Može se primetiti da je postojala eksponencijalna zavisnost inhibicije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta, što je zabeleženo i u radovima drugih istraživača [7,245].

Za inhibiciju 50% DPPH radikala potrebna koncentracija ekstrakta otpadne kafe (IC_{50}) dobijenog metodom klasične ekstrakcije iznosila je $5.92 \mu\text{g/mL}$, a ekstrakta dobijenog metodom mikrotalasne ekstrakcije $4.98 \mu\text{g/mL}$. Vrednosti IC_{50} dobijene za komercijalne antioksidanse vitamin C i BHT, iznosile su redom 5.97 ± 0.08 i $3.03 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ [32]. Dakle, koncentracija ekstrakta otpadne kafe iz mikrotalasne ekstrakcije, potrebna za neutralizaciju 50% DPPH

radikala nešto je viša od potrebne koncentracije BHT, ali je niža od koncentracije askorbinske kiseline. Sa druge strane, ekstrakt iz klasične ekstrakcije ima IC_{50} vrednost koja je, gotovo, bila identična vrednosti za vitamin C.

U radu Yen i sar. (2005) [7] pokazano je da otpadna kafa ispoljava maksimum inhibicije DPPH radikala čak 95.4 %, ali pri dosta višim koncentracijama ekstrakta od 200 $\mu\text{g/mL}$. Pri istoj koncentraciji, Ramalakshmi i sar. (2009) [31] su pokazali da ekstrakti otpadne kafe vrste arabika pokazuju maksimum inhibicije DPPH radikala 89.2 %, a robuste 84.3 %. Vrednost maksimuma inhibicije DPPH radikala metanolnog ekstrakta sirove kafe nižeg ranga kvaliteta iznosi 92.5% pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ [227]. U istom radu ekstrakti dobijeni pomoću acetona kao rastvarača pokazali su 81 % inhibicije DPPH radikala, a najniže vrednosti postignute su sa heksanom kao rastvaračem [227]. Kasnije, ista grupa istraživača pronašla je da metanolni ekstrakt sirove kafe nižeg ranga kvaliteta dostiže vrednost inhibicije od 95.2 % pri koncentraciji 200 $\mu\text{g/mL}$ [31]. Ekstrakti sirove arabike i robuste, sa rastvaračem izopropanol:voda (60:40) pokazuju 92 % i 88% inhibicije DPPH radikala, redom, pri koncentraciji ekstrakata 200 $\mu\text{g/mL}$ [42]. U svakom slučaju, ne treba izgubiti iz vida i tvrdnju da, sastav ekstrakta kafe zavisi od kvaliteta i porekla biljke, njenog sastava, uslova skladištenja, obrade i predtretmana [6]. Bilo koja vrsta kafe proizvedena širom sveta je svojevrsna mešavina više vrsta kafe, što na kraju dobrinosi jačini antioksidativne aktivnosti.

Neki istraživači smatraju da, pored polifenola, i proizvodi Majlardove reakcije takođe doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Zato i ekstrakti otpadne kafe pokazuju relativno visoke vrednosti aktivnosti, iako je sadržaj hlorogenske kiseline u njima značajno niži u odnosu na pečenu ili sirovu kafu [31,40]. Postoji i mišljenje da i kofein delom doprinosi antioksidativnoj aktivnosti, posebno zbog njegovog značajnog udela u robusti [11,40]. Tome u prilog ide i činjenica da je kofein relativno stabilan na uticaj pečenja, dok se polifenolna jedinjenja delom degradiraju [4]. U radu Alves i sar. (2010) [246] ispitivana je antioksidativna aktivnost kofeina, pri čemu je pokazano da ekstrakti kofeina ispoljavaju antioksidativnu aktivnost u testovima inhibicije lipidne peroksidacije indukovane reaktivnim kiseoničnim vrstama ($\bullet\text{OH}$, $\text{ROO}\bullet$), ali ne pokazuju aktivnost u inhibiciji DPPH radikala, zato što u svojoj strukturi kofein ne sadrži grupe donore vodonika. S tim u vezi, smatra se da inhibicija DPPH radikala pretežno zavisi od koncentracije polifenola [246].

Ekstrakti sa antioksidansima iz drugih biljnih materijala, dobijeni metodom mikrotalasne ekstrakcije, pokazuju veću efikasnost u neutralizaciji DPPH radikala, u odnosu na ekstrakte dobijene drugim metodama. Tako, ekstrakt kore mandarine, dobijen mikrotalasnim delovanjem, pokazuje najvišu vrednost inhibicije DPPH radikala, u odnosu na ekstrakte dobijene ultrazvučnom ili rotacionom ekstrakcijom [83]. Slabija antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih alternativnim metodama može biti posledica produženog vremena trajanja ekstrakcije, te izlaganja nepovoljnim uslovima sredine, poput svetlosnog zračenja, kiseonika ili povišene temperature. Takođe, poznato je da ultrasonikacija može izazvati stvaranje slobodnih radikala u tečnom medijumu, čime može uticati na oksidaciju ili degradaciju antioksidanasa [83].

10.2.3.2. FRAP metoda

Za razliku od metode inhibicije DPPH radikala, koja je pogodna za antioksidanse rastvorne u organskim rastvaračima (etanolu, metanolu), FRAP metoda određuje antioksidativna svojstva antioksidanasa rastvornih u vodi [32].

Rezultati FRAP analize su izraženi u mmol Fe^{2+} jona koji nastaju aktivnošću redukcionih (antioksidantnih) materija iz 1 g suve materije ekstrakta, na Fe^{3+} jone iz FRAP reagensa. Metoda je bazirana na redukciji feri-tripiridiltriazin kompleksa (Fe(III)-TPTZ) do fero-tripiridiltriazin oblika (Fe(II)-TPTZ) pri niskim pH vrednostima u prisustvu redukcionog sredstva (ekstrakta). Fe(II)-TPTZ se odlikuje intenzivnom plavom bojom, koja je merena spektrofotometrijskim postupkom. Intenzitet boje bio je u direktnoj zavisnosti od koncentracije redukovanog jona gvožđa, a ona od antioksidativnog (redukcionog) potencijala ispitivanog ekstrakta ili njegovog sastojka.

Rezultati merenja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom u ekstraktima otpadne kafe (koncentracije 1 mg s.m./mL) u zavisnosti od vrste ekstrakcije prikazani su u **tabeli 10.5**.

Tabela 10.5. FRAP vrednosti (mmol Fe^{2+} /L) ekstrakata otpadne kafe dobijenih metodama klasične i mikrotalasne ekstrakcije

Tip ekstrakcije	FRAP (mmol Fe^{2+} /L)
Klasična	0.5701
Mikrotalasna	0.5953

Kako je jačina antioksidativne aktivnosti u direktnoj korelaciji sa količinom prisutnih Fe^{2+} jona u ekstraktu, može se primetiti da je ekstrakt otpadne kafe dobijen metodom mikrotalasne ekstrakcije nešto snažnije redukciono sredstvo u poređenju sa ekstraktom iz klasične ekstrakcije. Redukciona moć je u vezi sa prisustvom tzv. reduktanata. Većina istraživača smatra da polifenoli deluju slično kao reduktanti doniranjem elektrona i reagovanjem sa slobodnim radikalima u cilju stvaranja stabilnijih jedinjenja, što kao rezultat okončava lanac reakcija slobodnih radikala [35,77,227,234,247]. Sánchez-González i sar. (2005) [35] ističu mogućnost da i melanoidini (polimeri formirani u poslednjoj fazi Majlardove reakcije) mogu doprineti redukcionoj moći ekstrakata iz kafe. Do saznanja se došlo nakon rezultata ispitivanja da ekstrakti tamnije pečene kafe pokazuju jača antioksidativna svojstva od ekstrakata srednje pečene kafe, što je dovedeno u vezu sa stvaranjem veće količine proizvoda Majlardovih reakcija tokom produženog procesa pečenja. Komes i sar. (2008) [231] su, sa druge strane, pronašli da kofein ne doprinosi redukcionoj moći, te da se u daljim istraživanjima efekat njegovog delovanja može zanemariti.

Postoje izvesne teškoće u poređenju dobijenih rezultata redukcionne moći ekstrakata antioksidanasa sa dostupnim literaturnim podacima. Razlog tome je što se često koriste različite metode, a i pri korišćenju iste metode, dobijeni rezultati se izražavaju u različitim jedinicama. Stoga, kada je reč o kafi, moglo se svega izdvojiti istraživanje Sánchez-González i sar. (2005) [35], koji su ispitivali redukcionni kapacitet napitaka od kafe, dobijenih različitim tehnikama pripreme. S tim u vezi, pronađeno je da FRAP vrednosti opadaju u sledećem nizu napitaka: filter > espresso > moka kafa. Interesantno je zapažanje da dodatak mleka u espresso napitak umanjuje redukcionu moć, pri čemu je smanjenje bilo proporcionalno dodatoj količini mleka [35]. Pretpostavlja se da su pojedine komponente iz mleka, poput proteina, reagovale sa reduktantima iz kafe ekstrahovanih u napitak, na način koji je još uvek u fazi ispitivanja.

Na osnovu do sada pokazanog, metoda mikrotalasne ekstrakcije se može smatrati pogodnim izborom za potrebe izolovanja polifenola i drugih antioksidanasa iz otpadne kafe. Uz višestruko smanjenje vremena trajanja procesa, postignuti su viši prinosi, sa nešto izraženijim antioksidativnim kapacitetom ekstrakata, u odnosu na izolate dobijene klasičnom metodom.

Kako je ekstrakcija najvažnija faza u izolaciji polifenola i drugih antioksidanasa, pristupilo se daljem razvoju, poboljšanju i optimizaciji postojećeg procesa.

10.3. Optimizacija postupka mikrotalasne ekstrakcije

Poznato je da mnogi faktori utiču na sastav i količinu ekstrahovanih antioksidanasa iz kompleksnog biljnog materijala [77]. Najvažniji, u procesu mikrotalasne ekstrakcije, su koncentracija rastvarača, vreme trajanja procesa, odnos razmera čvrste i tečne faze, pH, temperatura i snaga mikrotalasnog zagrevanja [76,77,78,81,83]. Pri tom, smatra se da je izbor odgovarajućeg sistema rastvarača od posebnog značaja [241].

Kako je u teoriji planiranja višefaktornog statističkog eksperimenta moguće variranje više parametara na različitim nivoima simultano, za optimizaciju postupka mikrotalasne ekstrakcije polifenola i drugih antioksidanasa iz otpadne kafe i statističku analizu primenjena je metoda odzivnih površina, uz korišćenje programskog paketa *Design Expert 8* (Stat-Ease, Inc.).

S obzirom na, prethodno pomenuti, veliki broj parametara koji mogu uticati na odigravanje procesa, izvedena su dva sukcesivna eksperimentalna dizajna, u cilju odabira najrelevantnijih, optimalnih, uslova mikrotalasne ekstrakcije polifenola i drugih antioksidanasa iz otpadne kafe. U prvom dizajnu ispitivan je efekat vremena ekstrakcije, odnosa rastvarač/čvrsta faza i snage mikrotalasnog zagrevanja, a način njihovog uticaja na proces ekstrakcije utvđen je postavljanjem i analizom odgovarajućeg modela. Efekat statistički najuticajnijeg procesnog parametra u kombinaciji sa efektom koncentracije rastvarača su dalje ispitivani u drugom dizajnu, na promene ponašanja odziva postavljenog sistema. Vrednosti nivoa procesnih promenljivih odabrani su na osnovu prethodnih ispitivanja i literaturnih izveštaja o ekstrakciji antioksidanasa iz različitih biljnih materijala [76,77,81,83].

Izlazni parametri, tj. odzivi, koji su u modelima određivani, bili su: prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih polifenola i antoksidativna aktivnost merena DPPH i FRAP metodom.

10.3.1. Eksperimentalni dizajn modela I

Za ispitivanje uticaja vremena ekstrakcije, odnosa rastvarač/čvrsta faza i snage mikrotalasnog zagrevanja na efikasnost procesa ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe odabran je centralni kompozitni dizajn. Granične vrednosti nivoa procesnih promenljivih prikazane su u **tabeli 10.6**. Preko variranja procesnih parametara na različitim nivoima simultano, opisani su njihovi interaktivni efekti, kao i ukupan efekat na proces.

Tabela 10.6. Vrednosti ispitivanih nivoa procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Procesna promenljiva	Jedinica mere	Oznaka	Granične vrednosti				
			$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Vreme ekstrakcije	s	A	11.0	40.0	110	180.0	209.0
Odnos rastvarač/čvrsta faza	mL/g	B	4.76	6.00	9	12.0	13.24
Snaga mikrotalasnog zagrevanja	W	C		240	400	560	

10.3.1.1. Ocena značajnosti modela I

U oceni značajnosti modela mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe najpre se pristupilo analizi varijanse (ANOVA) eksperimentalnih rezultata, prikazanih u **tabeli 10.7.**

Tabela 10.7. Analiza varijanse (ANOVA) odziva u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Odziv	R ²	P- vrednost modela	F- vrednost modela	Koeficijent varijacije (%)	p- vrednosti nedostatka fitovanja	Aдекватna preciznost
Y ₁	0.9879	< 0.0001	245.0	6.617	0.0767	53.34
Y ₂	0.9870	<0.0001	228.3	4.067	0.0840	49.67
Y ₃	0.9934	< 0.0001	448.6	1.846	0.0656	76.71
Y ₄	0.8700	< 0.0001	36.13	11.54	0.0646	21.23

Y₁: prinos ekstrakcije (mg/g s.m.)

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g s.m. ekstrakta)

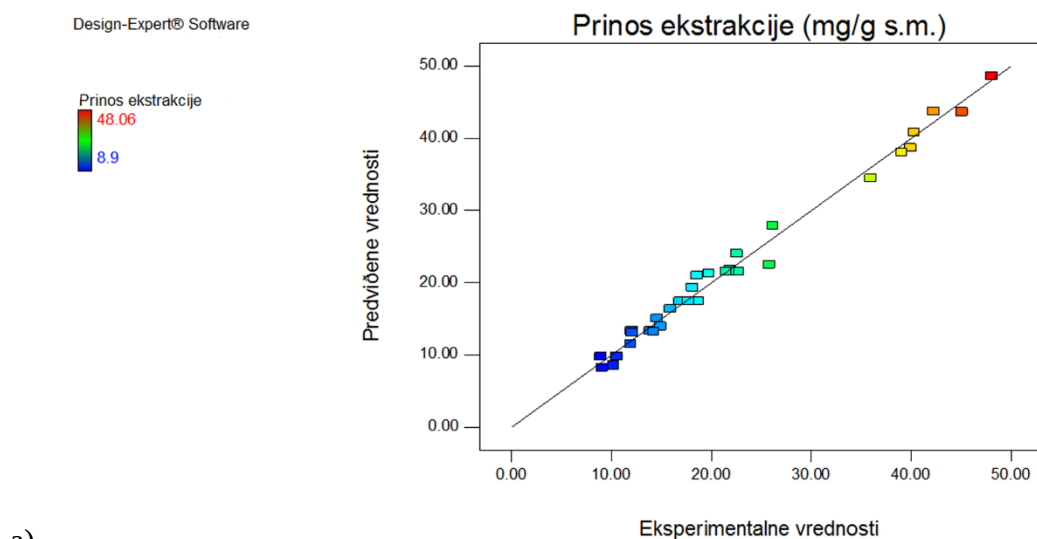
Y₃: DPPH (%)

Y₄: FRAP (mmol Fe²⁺/L)

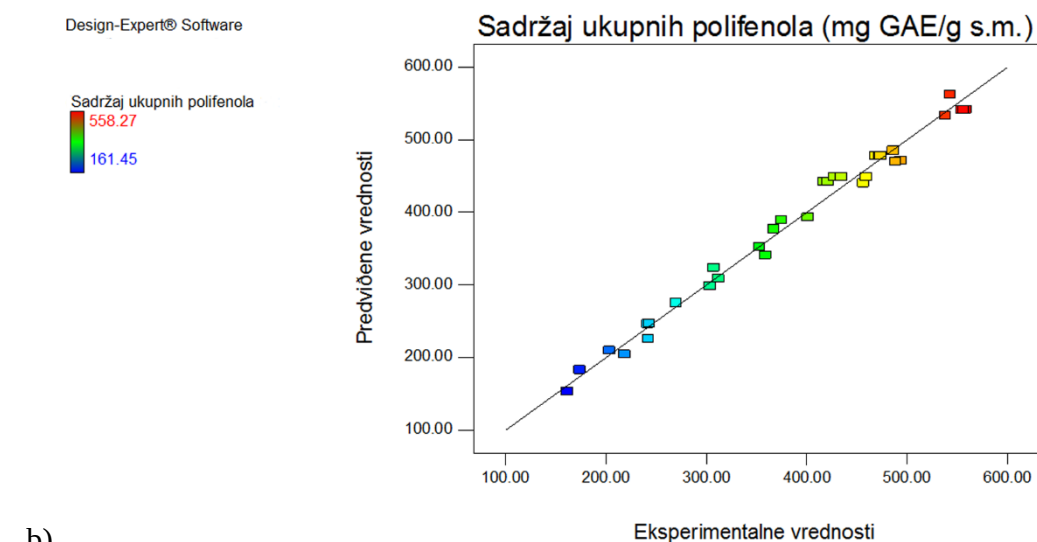
Visoka vrednost koeficijenta R² ukazuje da se većina podataka uklapa u regresioni model. Što je vrednost R² bliža broju 1 to znači da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti. Vrednosti P < 0.0001 znače da je model u celini značajan. Vrednost nedostatka fitovanja nije značajna (p > 0.05), što znači da se model može dobro opisati

predviđenim jednačinama. Ova vrednost, inače, daje procenu značajnosti odstupanja kontrolnih eksperimentalnih vrednosti od srednje vrednosti, odnosno, procenu da li su kontrolne eksperimentalne vrednosti pravilno raspoređene oko srednje vrednosti. Koeficijenti varijacije upućuju da je model pouzdan i reproduktivan i da se može upotrebiti u cilju predviđanja odziva.

Na **slici 10.2** grafički su prikazana slaganja eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu.



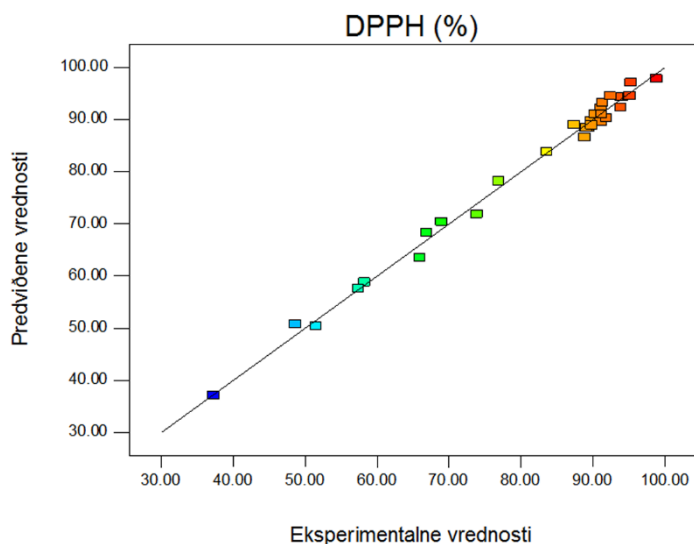
a)



b)

Design-Expert® Software

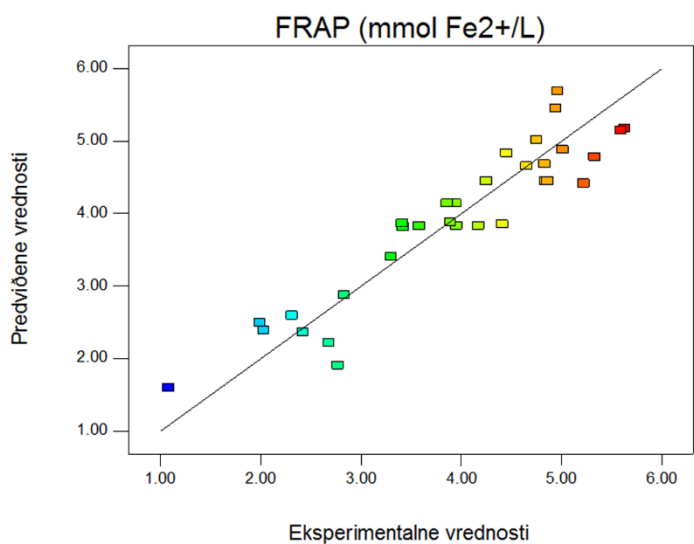
DPPH
98.86
37.23



c)

Design-Expert® Software

FRAP
5.63
1.08



d)

Slika 10.2. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe: prinos ekstrakcije (a), sadržaj ukupnih polifenola (b), DPPH (c), FRAP (d)

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (vremena trajanja procesa, odnosa rastvarača/čvrsta faza i snage mikrotalasnog zagrevanja) na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u **tabeli 10.8**, a efekat odgovarajućih faktora prikazan je u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom (odjeljak **10.3.1.2 – 10.3.1.4**).

Tabela 10.8. Analiza varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Faktor	Prob > F*			
	Prinos ekstrakcije (mg/g s.m.)	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g s. m. ekstrakta)	DPPH (%)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /L)
A	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
B	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0446
C	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0034
AB	< 0.0001	0.0007		
AC	0.0212		< 0.0001	
BC	< 0.0001	0.0022	0.0002	
A ²	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0069
B ²	0.0037	< 0.0001	< 0.0001	
C ²		0.0075	< 0.0001	

A: vreme ekstrakcije (s)

B: odnos rastvarač/čvrsta faza (mL/g)

C: snaga mikrotalasnog zagrevanja (W)

***Napomena:** Vrednosti „Prob > F“ manje od 0.0500 znače da je faktor statistički značajan.

Veza između nezavisnih promenljivih i proučavanih odziva bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Primenom višestruke regresione analize eksperimentalnih podataka, pronađeno je da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog reda. Empirijske jednačine odnosa procesnih promenljivih i odziva prikazane su u daljem tekstu (**j-na: 10.1-10.4**):

$$Y_1 = 17.44 + 9.519A + 5.783B + 4.132C + 4.793AB - 0.893AC + 1.730 BC + 4.984A^2 + 1.132B^2 \quad (10.1)$$

$$Y_2 = 478.09 - 101.40A - 28.52B - 46.39C + 17.62AB + 13.49BC - 75.93A^2 - 64.57B^2 + 16.97C^2 \quad (10.2)$$

$$Y_3 = 94.447 - 14.384A - 2.380B + 3.060C + 5.127AC + 1.653BC - 11.888A^2 - 2.248B^2 - 2.983C^2 \quad (10.3)$$

$$Y_4 = 4.140 - 1.145A - 0.194B + 0.309C - 0.209BC - 0.307A^2 \quad (10.4)$$

pri čemu su Y₁-Y₄ predviđeni odzivi, a A, B i C su procesne promenljive.

Da bi se osigurala reproduktivnost predstavljenog dizajna, urađena je validacija rezultata za dve tačke odabrane iz numeričke optimizacije (**tabela 10.9**), čije su vrednosti očitane direktno iz softverskog paketa. Kao rezultat, primećene su bliske vrednosti predviđenih i validiranih rezultata, što se ogleda u pogodnosti primene prethodno predloženog oblika dizajna.

Tabela 10.9. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Procesne promenljive			Odzivi					
A	B	C	Y ₁		Y ₂		Y ₃	
			Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano
52.0	6.00	400	488.5	487.7	98.3	98.0	5.07	5.14
50.0	9.00	400	509.2	507.1	98.0	97.6	4.90	4.90

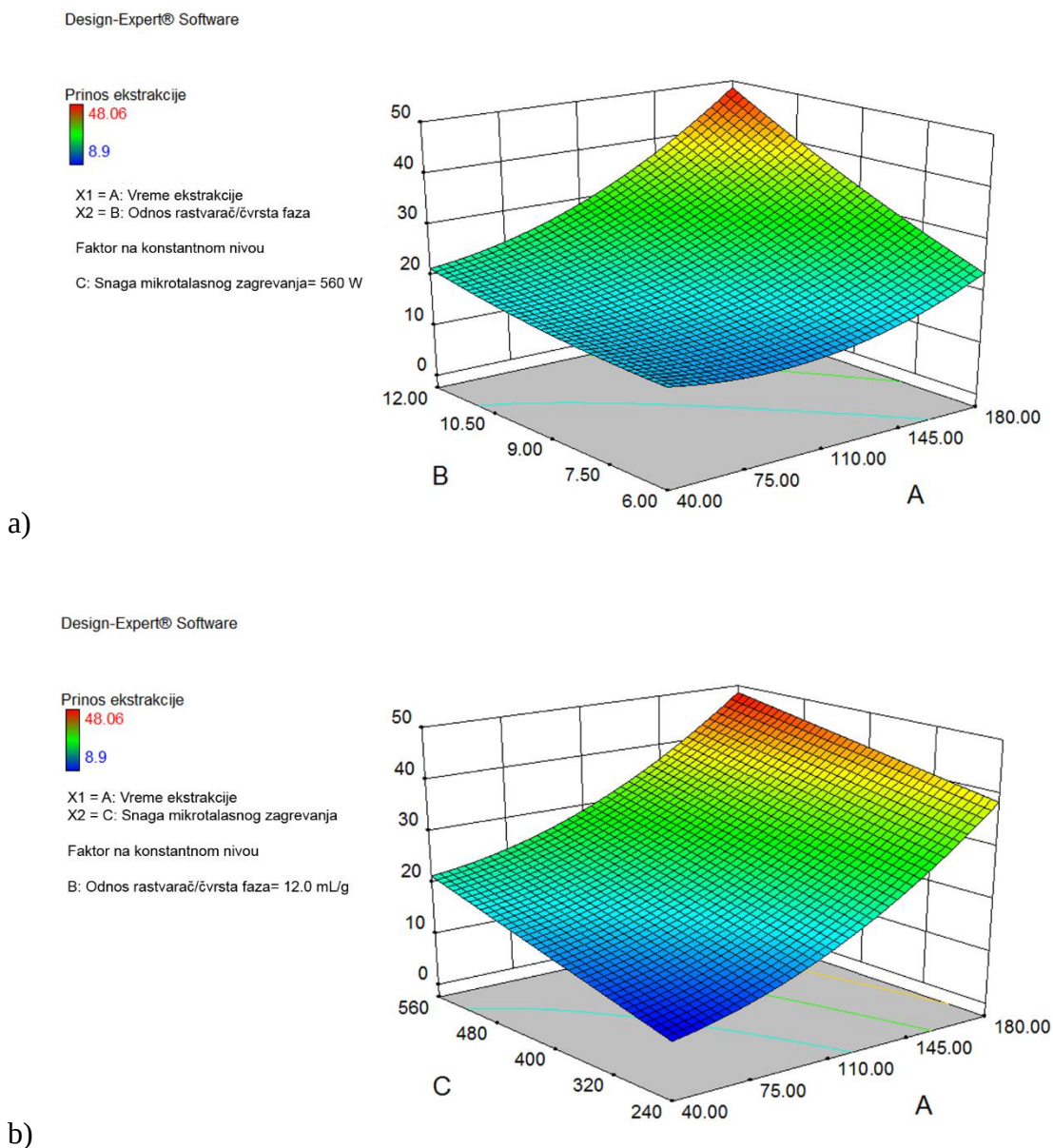
A: vreme ekstrakcije (s);
 B: odnos rastvarač/čvrsta faza (mL/g);
 C: snaga mikrotalasnog zagrevanja (W);
 Y1: sadržaj ukupnih polifenola (mgGAE/g);
 Y2: DPPH (%);
 Y3: FRAP (mmol Fe²⁺/L).

Eksperimentalni dizajn mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe, uslovljene promenama vremena trajanja procesa, odnosa rastvarača i otpadne kafe, i snage mikrotalasnog zagrevanja, i vrednosti odgovarajućih odziva prikazani su u **Prilogu 2 (tabela P-2.1)**. Uticaj procesnih promenljivih na izgled i promenu vrednosti odziva analiziran je u daljem tekstu.

10.3.1.2. Uticaj procesnih promenljivih na prinos ekstrakcije

Vreme, odnos rastvarač/čvrsta faza i snaga mikrotalasnog zagrevanja ocenjeni su kao procesni parametri (**tabela 10.8**) koji statistički značajno utiču na prinos ekstrakcije. Vrednosti ukupnog prinosa ekstrakcije iz otpadne kafe u navedenim eksperimentalnim uslovima bili su u opsegu 8.90 – 48.1 mg/g s.m. ekstrakta (**Prilog 2: tabela P-2.1**). Primećeno je da se prinos ekstrakcije povećavao sa dužim vremenom trajanja procesa, većom vrednošću odnosa

tečno/čvrsto i pri većoj snazi mikrotalasnog zagrevanja. Na **slici 10.3** su prikazani trodimenzioni grafikoni zavisnosti ukupnog prinosa ekstrakcije od odnosa procesnih promenljivih.



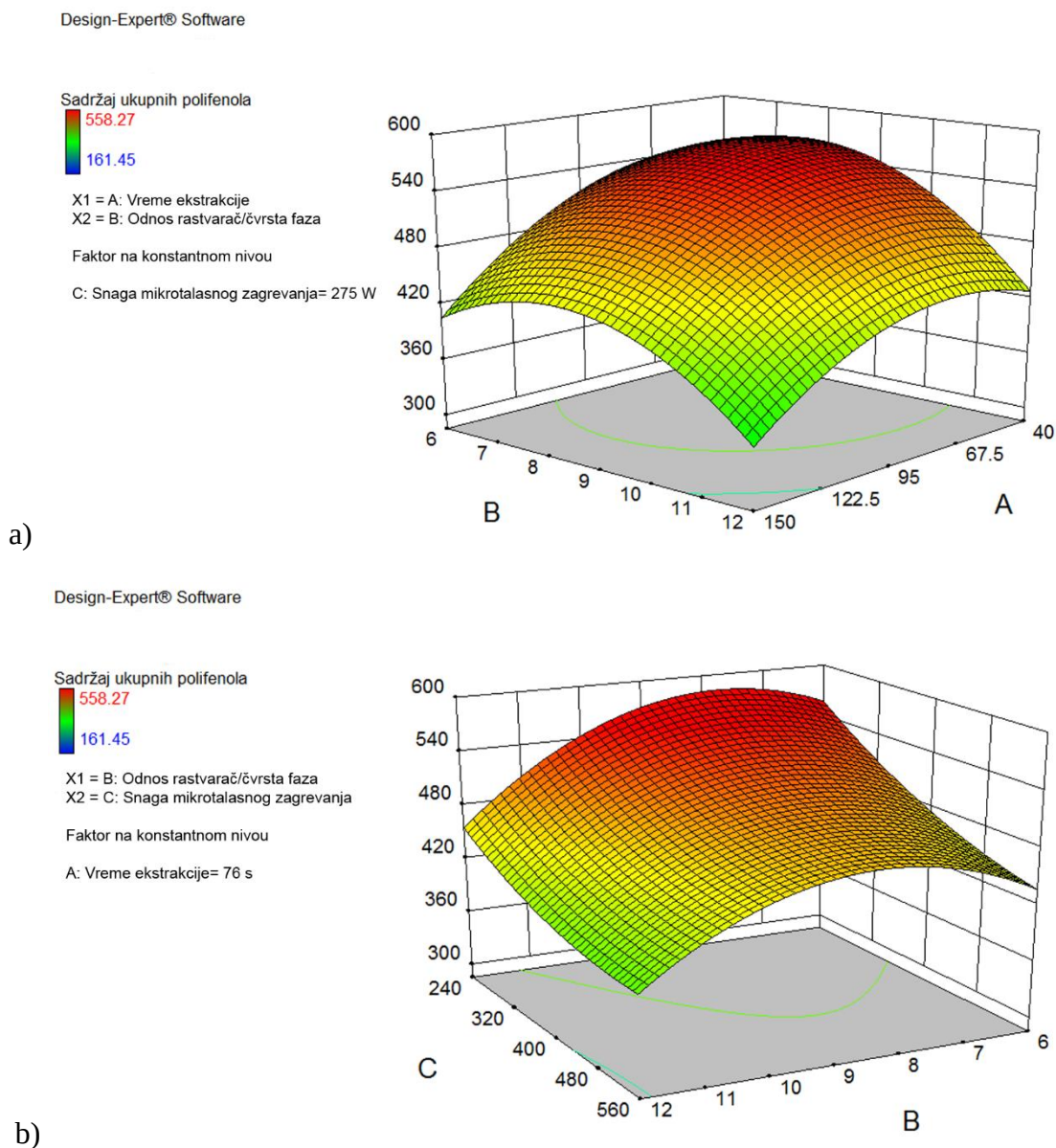
Slika 10.3. 3D grafik interaktivnih efekata vremena ekstrakcije i odnosa tečno/čvrsto (a) i vremena ekstrakcije i snage mikrotalasnog zagrevanja (b) na prinos ekstrakcije

10.3.1.3. Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola

Efekti individualnih procesnih parametara na sadržaj ukupnih polifenola (SUP) ocenjeni su kao statistički značajni (**tabela 10.8**).

Eksperimentalno dobijene vrednosti SUP bile su u opsegu od 161.5 - 558.3 mg/g.s.m.ekstrakta (**Prilog 2: tabela P-2.1**). Maksimalan odziv bilo je moguće postići primenom mikrotalasnog zračenja manje snage za kraće vreme trajanja ekstrakcije, uz 9 puta veći sadržaj rastvarača u odnosu na masu otpadne kafe.

Na **slici 10.4** su prikazani trodimenzioni grafikoni zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola od odnosa procesnih promenljivih.



Slika 10.4. 3D grafik interaktivnih efekata vremena ekstrakcije i odnosa tečno/čvrsto (a) i odnosa tečno/čvrsto i snage mikrotalasnog zagrevanja (b) na sadržaj ukupnih polifenola

Sa **slike 10.4a** može se primetiti da kraće vreme ekstrakcije, uz niže vrednosti odnosa tečno/čvrsto favorizuje dobijanje većeg sadržaja ukupnih polifenola. Isto se postiže i uz primenu manje snage mikrotalasnog zračenja (**slika 10.4b**).

Poredeći ove rezultate sa rezultatima određivanja sadržaja suve materije u ekstraktima, primećeno je da je SUP u obrnutoj srazmeri sa prinosom ekstrakcije. To znači da uslovi koji su bili optimalni za prinos ekstrakcije, nisu bili optimalni za dobijanje ekstrakata sa maksimalnim sadržajem polifenola.

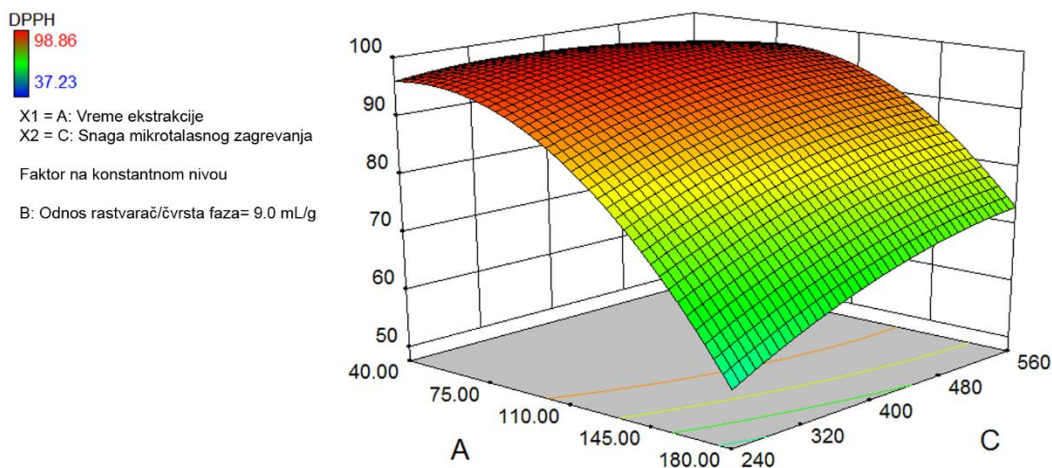
10.3.1.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata otpadne kafe

Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom bila je u opsegu vrednosti od 37.23 - 98.86 %. Najveći procenat inhibicije DPPH radikala postignut je primenom mikrotalasnog zračenja manje snage za kraće vreme trajanja ekstrakcije.

Sa druge strane, primećeno je da se antioksidativna aktivnost primenom FRAP metode kreće u opsegu od 1.08 - 5.63 mmol Fe²⁺/L (**Prilog 2: tabela P-2.1**). Pri tom, uslovi koji su favorizovali maksimalnu inhibiciju slobodnih radikala, pokazali su se pogodnim i za dobijanje maksimalnih vrednosti odziva FRAP.

Interaktivni efekti vremena ekstrakcije i snage mikrotalasnog zagrevanja, kao i odnosa rastvarač/čvrsta faza i snage mikrotalasnog zagrevanja ocenjeni su statistički značajnim na uticaj jačine antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata, izraženim preko inhibicije DPPH radikala (**tabela 10.8**). Suprotno tome, interaktivni efekti procesnih parametara nisu ukazali na statistički značajan uticaj na promene redukujuće moći ekstrakata otpadne kafe, izražene preko FRAP vrednosti. Sa druge strane, efekti svih pojedinačnih parametara imali su značajan uticaj na celokupni antioksidativni potencijal, kako u pogledu DPPH, tako i FRAP metode.

Na **slici 10.5** prikazan je trodimenzioni grafikon zavisnosti inhibicije DPPH radikala od odnosa procesnih parametara.



Slika 10.5. 3D grafik interaktivnih efekata vremena ekstrakcije i snage mikrotalasnog zagrevanja na antioksidativnu aktivnost merenu DPPH metodom

Rezultati merenja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom bili su u korelaciji sa SUP i obrnuto srazmerni prinosu ekstrakcije. To znači da je antioksidativna aktivnost ekstrakata otpadne kafe bila veća u uzorcima u kojima je određen veći sadržaj polifenola i manji sadržaj suve materije. Takođe, postojala je dobra korelacija između FRAP vrednosti i SUP, kao i FRAP i procenta inhibicije DPPH radikala. Uzorci ekstrakata otpadne kafe koji su ispoljili visok procenat inhibicije DPPH radikla takođe su imali i visoku FRAP vrednost. Manja odstupanja, koja se mogu uočiti, mogu biti posledica različite rastvorljivosti polifenola u različitim rastvaračima (metanolu za DPPH ili vodi za FRAP).

Na osnovu prethodno prikazanih uticaja procesnih parametara (vreme ekstrakcije, odnos rastvarač/čvrsta faza i snaga mikrotalasnog zagrevanja) na ekstrakciju polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata otpadne kafe, vreme trajanja procesa pokazalo se kao promenljiva koja, pojedinačno i u interakcijama sa ostalim parametrima, statistički najznačajnije utiče na proces.

Na sličan način, odabrane su optimalne vrednosti ostala dva faktora, koje su u daljoj optimizaciji održavane na konstantnom nivou. S tim u vezi, snaga mikrotalasnog zagrevanja iznosila je 80 W, a optimalna pronađena vrednost odnosa rastvarača i otpadne kafe bila je 1:9.

10.3.2. Eksperimentalni dizajn modela II

Za ispitivanje uticaja pojedinačnih i interaktivnih efekata koncentracije rastvarača i vremena trajanja procesa na efikasnost ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe odabran je jednofaktorijski dizajn. Postavljenim modelom predviđeno je 24 eksperimenta, u okviru kojih je bilo šest ponavljanja u centralnim tačkama. Granične vrednosti nivoa procesnih promenljivih prikazane su u **tabeli 10.10**.

Tabela 10.10. Vrednosti ispitivanih nivoa procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Faktori	Jedinica mere	Oznaka	Granične vrednosti	
			Minimum	Maksimum
Koncentracija etanola	%	A	20	80
Vreme ekstrakcije	s	B	40	360

10.3.2.1. Ocena značajnosti modela II

Analiza varijanse (ANOVA) eksperimentalnih rezultata, u dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe, pod uticajem promene koncentracije rastvarača i vremena trajanja procesa, prikazana je u **tabeli 10.11**.

Tabela 10.11. Analiza varijanse (ANOVA) odziva u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Odziv	R ²	P-vrednost	F-vrednost	K.V. ^a	F- vrednosti	Aдекватna
		modela	modela		nedstatka fitovanja	preciznost
Y ₁	0.9311	<0.0001	48.65	9.38	0.27	21.499
Y ₂	0.8582	<0.0001	21.78	9.86	0.69	15.434
Y ₃	0.9096	<0.0001	36.24	0.69	2.75	18.272
Y ₄	0.8149	<0.0001	15.85	7.03	0.89	13.331

Y₁: prinos ekstrakcije (mg/g s.m.);

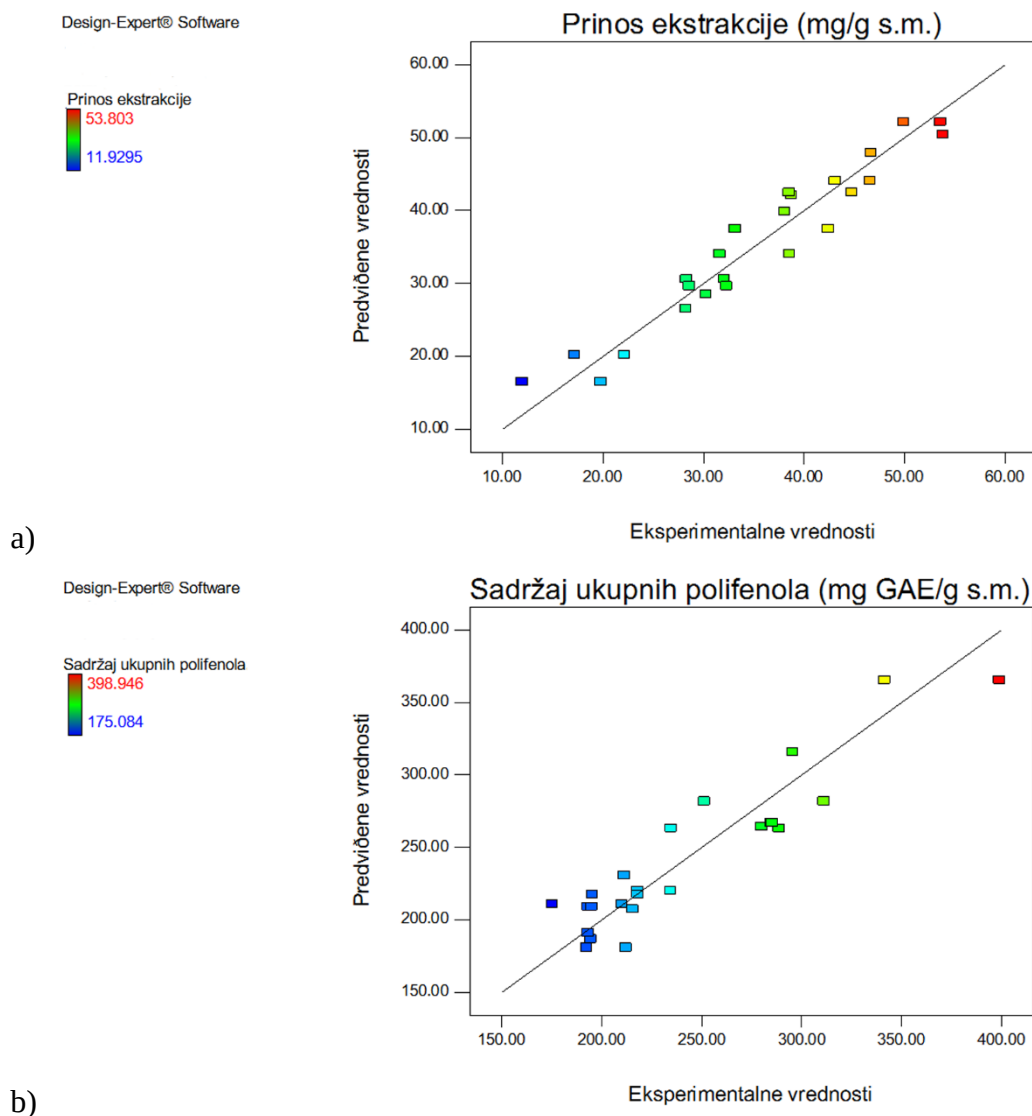
Y₂: sadržaj ukupnih polifenola (mgGAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: DPPH (%);

Y₄: FRAP (Fe²⁺/L);

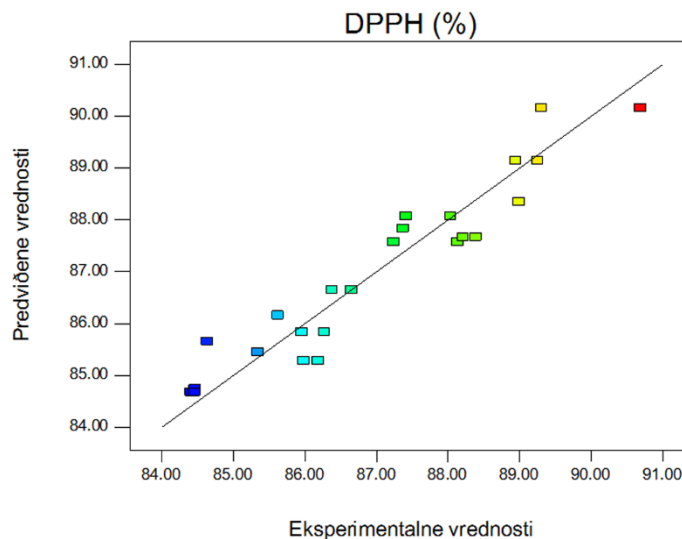
^a Koeficijent varijacije (%).

Vrednosti koeficijenta R^2 ukazuju na postojanje dobre korelacije između predviđenih i eksperimentalno dobijenih rezultata. $P < 0.0001$ u slučaju svih odziva upućuje da je model u celini značajan, a na osnovu vrednosti koeficijenta varijacije, isto tako pouzdan i reproduktivan. F vrednosti nedostatka fitovanja (veće od 0.05) pokazuju da nije bilo značajnih odstupanja kontrolnih eksperimentalnih vrednosti od srednje vrednosti, te da se model može dobro opisati predviđenom jednačinom. Generalno, analizom varijanse eksperimentalnih rezultata, sugerisano je da se predloženi model može uspešno upotrebiti u cilju predviđanja odziva. Na **slici 10.6** su grafički prikazana slaganja eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe, uslovljene promenama koncentracije rastvarača i vremena trajanja procesa.



Design-Expert® Software

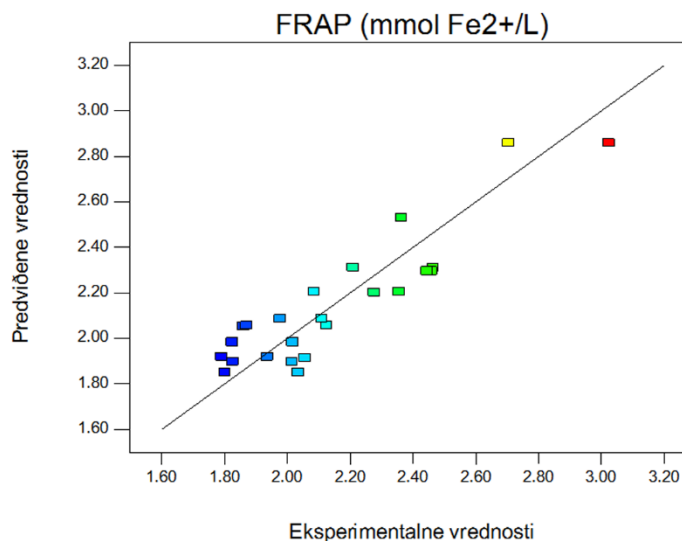
DPPH
90.6887
84.4037



c)

Design-Expert® Software

FRAP
3.02396
1.7907



d)

Slika 10.6. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe: prinos ekstrakcije (a), sadržaj ukupnih polifenola (b), DPPH (c), FRAP (d)

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih (koncentracije etanola i vremena trajanja ekstrakcije) na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u **tabeli 10.12**, dok su efekti odgovarajućih faktora prikazani u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom (odjeljak **10.3.2.2 – 10.3.2.4**).

Tabela 10.12. Analiza varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Faktor	Prob > F*			
	Prinos ekstrakcije (mg/g s.m.)	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/g s. m. ekstrakta)	DPPH (%)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /L)
A	0.0266	0.0021	0.0004	0.0013
B	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
AB	0.7890	0.0027	0.3181	0.0032
A ²	< 0.0001	0.0080	< 0.0001	0.0051
B ²	0.0832	0.0647	0.0045	0.0236

A: vreme ekstrakcije (s);

B: odnos rastvarač/čvrsta faza (mL/g);

C: snaga mikrotalasnog zagrevanja (W).

***Napomena:** Vrednosti „Prob > F“ manje od 0.0500 znače da je faktor statistički značajan.

Veza između dve nezavisne promenljive i proučavanih odziva bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Utvrđeno je i da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog reda. Empirijske jednačine odnosa procesnih promenljivih i odziva prikazane su u daljem tekstu (**j-na: 10.5-10.8**):

$$Y_1 = 44.03 - 2.18A + 10.81B - 0.30AB - 12.21A^2 - 2.64B^2 \quad (10.5)$$

$$Y_2 = 210.92 - 23.41A - 50.51B + 27.73AB + 32.63A^2 + 20.41B^2 \quad (10.6)$$

$$Y_3 = 85.28 - 0.71A - 1.45B - 0.21AB + 2.08A^2 + 0.84B^2 \quad (10.7)$$

$$Y_4 = 1.92 - 0.16A - 0.23B + 0.17AB + 0.22A^2 + 0.16B^2 \quad (10.8)$$

pri čemu su Y₁-Y₄ predviđeni odzivi, a A i B su procesne promenljive.

Validacija modela izvedena je za tri tačke odabrane iz numeričke optimizacije modela. Uzorci u ovom delu eksperimenta bili su identični sa prethodno ispitivanim, sa jedinom razlikom koja se odnosila na dužinu njihovog skladištenja. Testirani ekstrakti otpadne kafe, dobijeni pod odgovarajućim uslovima, bili su odloženi dva meseca u frižideru (na temperaturi od 4 °C). S tim u vezi, važno je opravdati činjenicu da su rezultati validiranih uzoraka niži u odnosu na prethodno dobijene, ali trend dobijenih vrednosti ostao je nepromenjen (**tabela 10.13**), čime je osigurana reproduktivnost predstavljenog dizajna.

Tabela 10.13. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe

Faktori		Odzivi					
A	B	Y ₁		Y ₂		Y ₃	
		Predviđeni	Validirani	Predviđeni	Validirani	Predviđeni	Validirani
80	40	263.3	238.5±3.2	89.14	80.44±1.60	2.20	1.99±0.02
50	200	210.9	194.9±3.8	85.28	74.50±4.16	1.92	1.40±0.10
20	40	365.6	343.8±6.8	90.15	87.20±0.95	2.86	2.61±0.09

A: koncentracija etanola (%);
 B: vreme ekstrakcije (s);
 Y₁: sadržaj ukupnih polifenola (mgGAE/g);
 Y₂: DPPH (%);
 Y₃: FRAP (mmol/L).

Eksperimentalni dizajn mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe, uslovljene promenama koncentracije rastvarača i vremena trajanja procesa, i odgovarajući odzivi prikazani su u **Prilogu 2 (tabela P-2.2)**. Uticaj navedenih procesnih promenljivih na izgled i promenu vrednosti odziva analiziran je u daljem tekstu.

10.3.2.2. Uticaj procesnih promenljivih na prinos ekstrakcije

Maksimalni prinos ekstrakcije iznosio je 53.80 mg/g (**Prilog 2: tabela P-2.2**), koji je po vrednosti bio veoma blizak sa vrednošću predviđenom modelom od 52.20 mg/g. Rezultati regresione analize ukazuju da ispitivani procesni parametri pojedinačno značajno utiču na prinos ekstrakcije, dok njihov interaktivni efekat nije okarakterisan statistički značajnim (**tabela 10.12**). U svakom slučaju, može se primetiti da je prinos povećan sa produženim vremenom ekstrakcije, kada je koncentracija etanola bila u opsegu vrednosti od 35 - 65 %. Grafički prikaz zavisnosti prinosa ekstrakcije od koncentracije etanola i vremena dat je na **slici 10.7**.

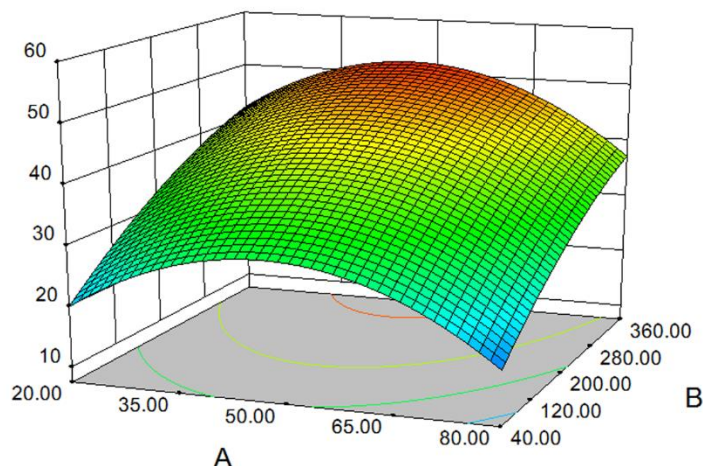
Prinos ekstrakcije

53.803

11.9295

X1 = A: Koncentracija etanola

X2 = B: Vreme ekstrakcije



Slika 10.7. 3D grafik interaktivnih efekata procesnih promenljivih na prinos ekstrakcije

10.3.2.3. Uticaj procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola

Svi ekstrakti koji su dobijeni pod predviđenim uslovima, standardizovani su do koncentracija 1 mg s.m./mL, kako bi u daljoj analizi bili međusobno uporedivi.

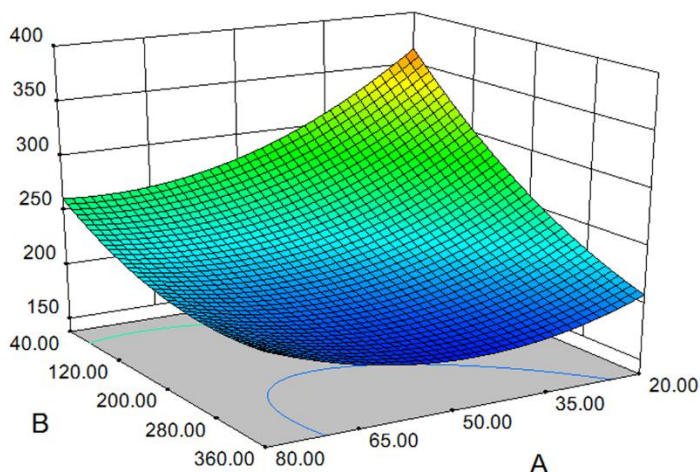
Eksperimentalno dobijene vrednosti SUP bile se u opsegu 175.08 - 398.95 mg GAE/g suve materije (**Prilog 2: tabela P-2.2**). Pri tom, maksimalna vrednost, dobijena pod optimalnim uslovima, bila je veoma bliska sa modelom predviđenom vrednošću od 365.6 mg GAE/g. Variranjem uslova ekstrakcije, primećeno je da SUP dostiže vrednosti, gotovo, dvostruko veće u odnosu na minimalne, upućujući, da ispitivane procesne promenljive imaju veliki uticaj na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz otpadne kafe. Koncentracija etanola i vreme ekstrakcije su i statistički značajno uticali na promene vrednosti SUP (**tabela 10.12**). Na **slici 10.8** grafički su prikazani interaktivni efekti ispitivanih procesnih parametara na SUP u ekstraktima otpadne kafe. Može se uočiti da se SUP povećavao u rastvorima manje koncentrovanog etanola, uz kraće vreme trajanja ekstrakcije. Tako je maksimalna vrednost dobijena uz korišćenje 20 % etanola, za svega 40 s trajanja ekstrakcije.

Design-Expert® Software

Sadržaj ukupnih polifenola



X1 = A: Koncentracija etanola
X2 = B: Vreme ekstrakcije



Slika 10.8. 3D grafik interaktivnih efekata procesnih promenljivih na sadržaj ukupnih polifenola

Prinos ekstrakcije bio je obrnuto proporcionalan SUP, dok je, suprotno tome, SUP bio direktno proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti, izraženoj preko inhibicije DPPH radikala i redukcionog kapaciteta. Takođe, postojala je proporcionalna zavisnost između rezultata dobijenih FRAP i DPPH metodom.

Viši prinosi ekstrakcije upućuju da se, pod određenim uslovima ekstrakcije, mnoga druga jedinjenja, poput proteina, minerala i ugljenih hidrata, takođe mogu ekstrahovati iz otpadne kafe [248], i na taj način smanjiti udeo ukupnih polifenola. U tom slučaju, viši prinos ekstrakcije ne znači nužno i viši SUP, pa je, u skladu s tim, očekivana i smanjena antioksidativna aktivnost. Suprotno tome, procesni uslovi koji su favorizovali dobijanje ekstrakata polifenola visoke čistoće, sa što manje balastnih materija, smatrali su se optimalnim za efektivnu, selektivnu, izolaciju ciljanih komponenti iz otpadne kafe.

Drugi istraživači su, kao i u ovom radu, pokazali da niže koncentracije alkohola utiču na bolju ekstrakciju polifenola iz kafe. Pretežno vodeni rastvori selektivno ekstrahuju polifenole i niskomolekularne melanoidine iz biljnih matrica, dok etanol većim delom precipituje visikomolekularne melanoidine [8,242,249]. Smatra se da niskomolekularni melanoidini imaju više polifenola vezanih na omotaču, u odnosu na visikomolekularne. Takođe, vrednost

dielektrične konstante i polariteta vode viša je nego etanola, što je značilo i veći kapacitet apsorpcije mikrotalasa u reakcionom sistemu. Krishnaswamy i sar. (2013) [82] su, na sličan način, uz pomoć mikrotalasa, izolovali maksimalne količine polifenola iz semenki grožđa (13.5 ± 0.48 mg GAE/g s.m.) korišćenjem 30 % etanola. Sa druge strane, pojedini istraživači smatraju da upotreba čiste vode kao rastvarača nije u potpunosti efikasna, zato što su neki polifenoli često rastvorljiviji u organskim rastvaračima manje polarnim od vode [249]. Tako su Pérez-Serradilla i sar. (2011) [236] pronašli da je rastvor 75 % etanola bio optimalni izbor rastvarača za mikrotalasnu ekstrakciju polifenola iz tropa vina. Tom prilikom je, za 17 minuta trajanja ekstrakcije, izolovano čak 532 mg GAE / g s.m. ekstrakta. Konvencionalnom metodom ova količina polifenola ekstrahovana je za 24 h [236].

U kombinaciji sa uticajem rastvarača i vremena trajanja ekstrakcije, snaga mikrotalasnog zagrevanja je u velikoj meri uticala na promene sadržaja ukupnih polifenola u prirodnim ekstraktima. Zagrevanjem reakcionog sistema podstiče se rastvorljivost polifenola, smanjuje viskoznost rastvarača i površinskog napona, olakšava difuzija i prenos mase [250]. Dodatno, povišena temperatura može uticati i na omekšavanje tkiva i slabljenje veza polifenol-protein ili polifenol-polisaharid u matrici, čime biva olakšano njihovo odvajanje iz biljne matrice i prenos u ekstrakt [250]. Međutim, treba imati u vidu da suviše visoke temperature mogu uticati na evaporisanje rastvarača i slabljenje efikasnosti ekstrakcije polifenola, čak njihove degradacije i gubitka aktivnosti [250]. Iako je u ovom radu ekstrakcija polifenola uspešno izvedena primenom, svega, 80 W ulazne snage mikrotalasa, u nekim istraživanjima je pronađeno da je za potrebe izvođenja ovakvih procesa neophodna, čak, desetostruko veća snaga. Jedan od tih slučajeva zabeležen je prilikom mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz ljuski kikirikija [79]. Optimalna snaga mikrotalasnog zračenja bila je 950 W, pri čemu je izolovano 143.6 mg GAE / g polaznog uzorka. Međutim, pronađeno je da su u istom istraživanju utrošene i, gotovo tri puta, veće količine rastvarača, s obzirom da je odnos faza čvrsto:tečno bio 1:25. Ekstrakcija polifenola bila je okončana za 30 sekundi, ipak, mogućnost buduće primene predloženog procesa može biti ograničena used viših investicionih troškova.

Optimizacija uslova mikrotalasne ekstrakcije polifenola bila je izvedena i za druge vrste biljnih materijala i agroindustrijskog otpada, bogatog antioksidansima, poput paradajza [77], kore krompira [78], tropa jabuka [81]. Koliko je poznato, samo su Upadhyay i sar. (2012) [68]

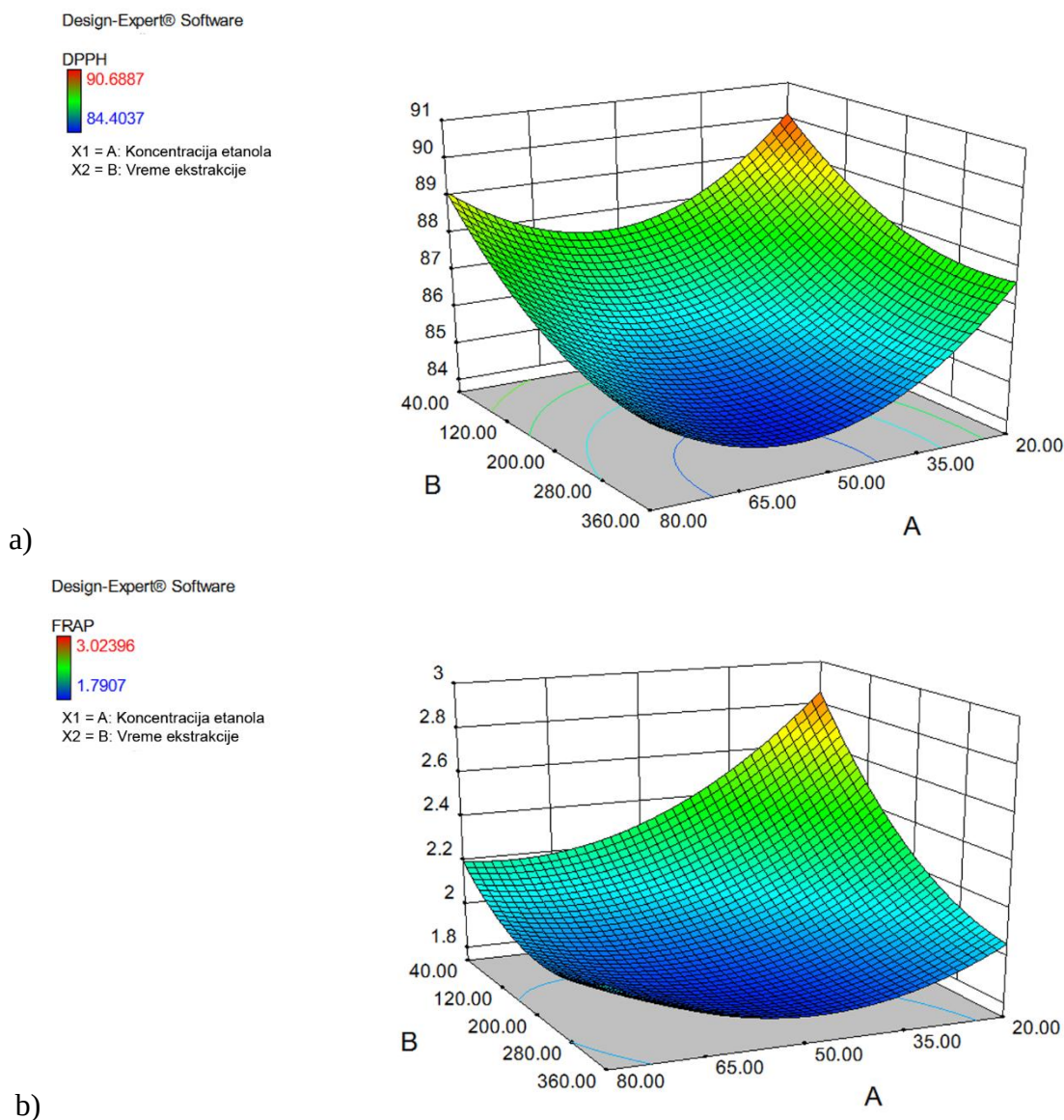
ispitivali mikrotalasnu ekstrakciju polifenola iz sirove kafe, dok daljih pokušaja istraživanja, naročito sa otpadnom kafom, nije bilo. U literaturi su, uglavnom, opisane dosta složenije ekstrakcione tehnike za dobijanje polifenola iz kafe, koje uz to zahtevaju više vremena za izvođenje procesa, pa je te rezultate teško porediti sa dobijenim u ovom istraživanju, usled drugačijih eksperimentalnih uslova. Tako su, Mussatto i sar. (2011) [10], tokom ekstrakcije polifenola iz otpadne kafe, za 90 minuta, u 60 % metanolu, izolovali 16 mg GAE/g polaznog uzorka, pri čemu je odnos otpadne kafe i rastvarača bio 1:40. Zuorro i Lavecchia (2012) [9] su nakon 6 sati ekstrakcije u 50 % etanolu dobili nešto više, 17.75-21.56 mg GAE/g otpadne kafe. Bravo i sar. (2013) [8] su ispitivali više tipova ekstrakcije za dobijanje polifenola iz otpadne kafe pod različitim uslovima, uključujući kontinualnu metodu ekstrakcije (u aparaturi po Soksletu 1h i 3h), zatim i diskontinualni način (poput klasične tečno/čvrste ekstrakcije), sukcesivne ekstrakcije, upotrebu nekoliko vrsta rastvarača (voda, etanol, metanol i njihove smeše) različitih vrednosti pH (4.5 7.0 i 9.5). U odnosu na prikazano, može se primetiti da je mikrotalasnom ekstrakcijom antioksidanasa iz otpadne kafe, u najvećoj meri, smanjeno višečasovno trajanje procesa, kao i utrošak rastvarača i energije, što u krajnjoj liniji može doprineti i smanjenju emisija zagađenja i očuvanju životne sredine.

U pojedinim slučajevima pokazano je da je ekstrakcija antioksidanasa iz nekih biljnih materijala bila favorizovana u uslovima veoma niskih vrednosti pH rastvora [241,247], a tako i veoma visokih reakcionih temperatura [251]. Imajući u vidu blage reakcione uslove pod kojima su u ovom istraživanju ekstrahovani antioksidansi iz otpadne kafe, predložena procedura bi sa ekonomskog i ekološkog stanovišta mogla biti prihvatljiva za potrebe izolovanja velikih količina ovih prirodnih, bioaktivnih jedinjenja.

10.3.2.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata otpadne kafe

Na **slici 10.9a** su prikazani međusobni uticaji procesnih promenljivih na efikasnost inhibicije DPPH radikala, od strane ekstrakata otpadne kafe, dobijenih pod odgovarajućim uslovima. Procesni uslovi koji su favorizovali ekstrakciju maksimalnih vrednosti sadržaja ukupnih polifenola, takođe su uticali i na ispoljavanje maksimalnog antioksidativnog kapaciteta, izraženog kako preko inhibicije DPPH radikala, tako i u svojstvu redukcionog potencijala (FRAP). S tim u vezi, smanjenjem vremena trajanja ekstrakcije sve do 40 sekundi i simultanim

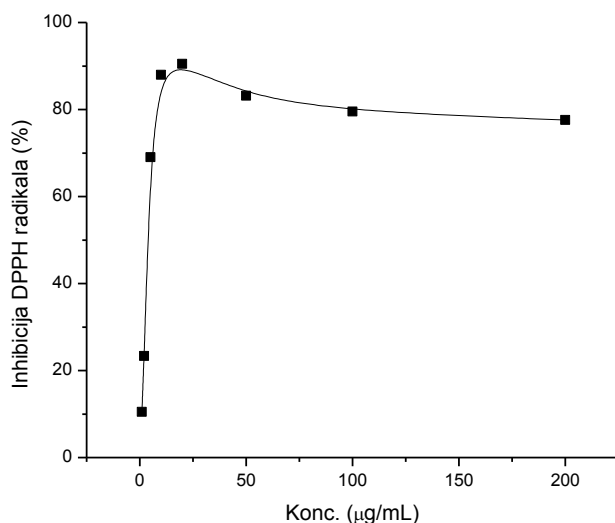
opadanjem koncentracije etanola do 20 %, vrednosti inhibicije DPPH radikala su rasle od 84.46 % sve do 90.69 %. I u mnogim drugim radovima istraživača je pronađeno da je inhibicija DPPH radikala rasla u skladu sa porastom sadržaja polifenola (odnosno hlorogenske kiseline) u ekstraktima kafe i drugih biljnih sirovina [233,234,249,252].



Slika 10.9. 3D grafik interaktivnih efekata procesnih promenljivih na: inhibiciju DPPH radikala (a) i FRAP (b)

Slično ovom radu, Franco i sar. (2008) [242] su ispitivali uticaj rastvarača na sadržaj ekstrahovanih polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata iz semenki više vrsta biljaka, pri čemu su pronašli da etanolni ekstrakti pokazuju najviši procenat inhibicije DPPH radikala, u odnosu na rastvarače metanol i vodu. Ovakav rezultat, međutim, nije zabeležen na globalnom nivou, s obzirom da su Singh i sar. (2011) [78], u optimizovanim uslovima, utvrdili da maksimum inhibicije DPPH radikala (74%) pokazuju ekstrakti antioksidanasa iz kora krompira ekstrahovani u 100 % metanolu. Maksimalna vrednost inhibicije DPPH radikala, koju je metanolni ekstrakt kore krompira ispoljio, bila je 74 %, što je, između ostalog, primetno manje u odnosu na ekstrakte otpadne kafe iz ovog rada.

Nakon što su optimalni uslovi za maksimalnu inhibiciju DPPH radikala bili određeni, odabrana je jedna proba iz modela (proba br. 15, **Prilog 2: tabela P-2.2**) za ispitivanje inhibicije DPPH radikala u širem opsegu koncentracija ekstrakta otpadne kafe, od 0.1-200 µg s.m./mL (**slika 10.10**).



Slika 10.10. Inhibicija DPPH radikala (%) u zavisnosti od koncentracije ekstrakta otpadne kafe

Ekstrakt otpadne kafe sa antioksidansima, dobijen pod definisanim uslovima, je pre merenja bio osušen u sprej-sušaču, sa ciljem što dužeg očuvanja njegove stabilnosti. Pronađeno je da su vrednosti inhibicije (%) rasle kako je koncentracija ekstrakta rasla sve do 20 µg s.m./mL, gde je ispoljeno 90.47 % inhibicije DPPH radikala. Dalji porast koncentracije uticao je na slabiju inhibiciju. Sličan fenomen zabeležen je i u radu Milutinović i sar. (2013) [32], uz indicije da je

reč o prooksidativnom efektu ekstrakata. Neka od fenolnih jedinjenja niže molekulske mase, poput kafeinske kiseline, taninske ili galne kiseline [240,253], pod određenim uslovima, umesto zaustavljanja lanca delovanja slobodnih radikala, mogu reagovati sa kiseonikom i stvoriti hinone ($P = O$) i anjone superoksida ($O_2^{\cdot-}$). Uslovi koji inciraju njihovu autooksidaciju su visoke vrednosti pH, prenos metalnih jona, kao i prisustvo molekula kiseonika [32].

IC_{50} vrednost ekstrakta, dobijenog pod uslovima definisanim probom br. 15 (**Prilog 2: tabela P-2.2**), iznosila je 3.75 μg s.m./mL. Dakle, koncentracija ekstrakta otpadne kafe neophodna za inhibiciju 50% DPPH radikala bila je manja u odnosu na vitamin C za inhibiciju iste količine DPPH radikala, a nešto veća u odnosu na BHT [32]. Podsećanja radi, vrednost IC_{50} za ekstrakt iz mikrotalasne ekstrakcije pod neoptimizovanim uslovima, određene prethodno u ovom radu, bila je 4.98 μg s.m./mL, što je veće u odnosu na ekstrakt dobijen nakon optimizacije procesa mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe.

Vrednosti dobijene FRAP metodom (**slika 10.9b**) pokazale su da ispitivani ekstrakti ispoljavaju sposobnost redukcije jona gvožđa, izmerene u opsegu vrednosti od 1.79 – 3.02 mmol/L (**Prilog 2: tabela P-2.2**). Procesni uslovi koji su uticali na maksimalnu inhibiciju DPPH radikala, identično su uslovljavali i redukcionu moć ekstrahovanih antioksidanasa iz otpadne kafe. Još jednom se moglo primetiti da je antioksidativni potencijal, izražen preko FRAP vrednosti, bio višestruko veći u ekstraktima koji su dobijeni pod optimizovanim procesnim uslovima (**tabela 10.5 i Prilog 2: tabela P-2.2**).

10.4. Fizičko-hemijske karakteristike adsorbenta – otpadne kafe iz koje su ekstrahovani antioksidansi

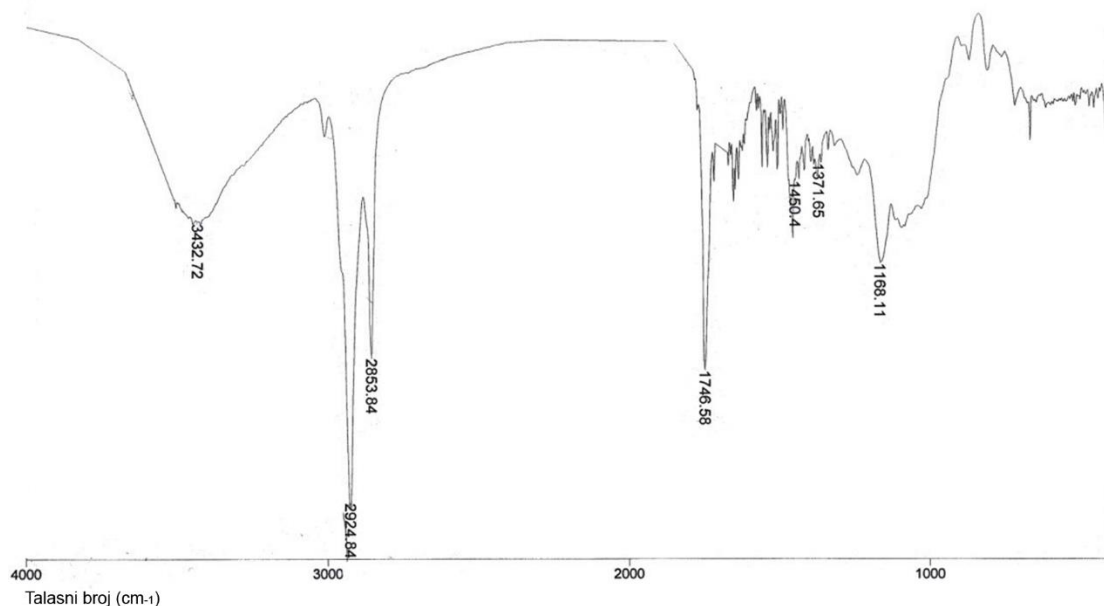
Nakon mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe, pod optimalnim uslovima (80 W, u rastvoru 20 %-nog etanola, odnos čvrsta faza/rastvarač 1:9, u trajanju od 40 s), materijal od zaostalih čvrstih ostataka iskorišćen je za pripremu adsorbenta, u skladu sa postupkom opisanom u odeljku **9.1.2**.

Fizičko-hemijske karakteristike adekvatno pripremljenog adsorbenta - aktivirane kafe, u koje se ubrajaju: analiza površinskih funkcionalnih grupa, naelektrisanje i prikaz izgleda i strukture aktivne površine, opisane su u daljem tekstu.

10.4.1. Analiza površinskih funkcionalnih grupa

Za identifikaciju i analizu sastava funkcionalnih grupa na površini aktivirane kafe korišćena je tehnika FTIR spektroskopije. FTIR spektar aktivirane kafe prikazan je na **slici 10.11**.

Široka apsorpciona traka, koja je uočena u opsegu talasnih brojeva od $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, sa maksimumom na 3430.96 cm^{-1} , je karakteristika valencionih vibracija hidroksilnih grupa [206]. Veoma izraženi, oštri pikovi na 2924.84 cm^{-1} i 2853.84 cm^{-1} mogu biti posledica postojanja asimetričnih vibracija CH_2 grupa, odnosno, alifatičnih valencionih vibracija aromatičnih metoksil-, metil- i metilen-grupa bočnih lanaca, redom [155,206]. Signal na 1744.26 cm^{-1} je, uobičajeno, u vezi sa C=O grupom, najverovatnije u estrima, dok, manje izraženi, na 1558.71 cm^{-1} , najverovatnije, odgovara valencionim vibracijama C=C veze aromatičnog prstena. Pikovi u opsegu $1550\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ mogu ukazivati na prisustvo u tragovima derivata ksantina, poput kofeina [16]. Pojava pika na 1454.43 cm^{-1} verifikuje pretpostavku postojanja C-H vibracija iz CH_3 i CH_2 grupa. Manje izraženi signali u rasponu od 1200 cm^{-1} do 1450 cm^{-1} mogu poticati od deformacionih vibracija O-H , a mogu se pronaći tvrdnje da ovi pikovi potiču i od nitro jedinjenja, pri čemu $-\text{NO}_2$ grupa može biti vezana bilo za alifatične, bilo aromatične ostatke [180]. Traka u opsegu $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ upućuje na postojanje C-O-C , najverovatnije, u alifatičnim estrima. Takođe, pikovi slabijeg intenziteta, u osegu $1100\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ mogu biti u vezi sa uljem iz kafe, u skladu sa tvrdnjama Baek i sar. (2010) [16]. Na desnom kraju spektra, uočeni pikovi u opsegu $700\text{--}880\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju C-H deformacionim vibracijama van ravni u derivatima benzena [180]. Ovaj tip deformacionih vibracija je, inače, uobičajeno nađen na površini raznih aktivnih ugljeva [180]. Prema navodima nekih istraživača smatra se da, generalno, tretmani sa mikrotalasima povećavaju aromatski karakter aktiviranog materijala [20].



Slika 10.11. FTIR spektar aktivirane kafe

Na osnovu prikaza vibracionog spektra, stečena saznanja biće iskorišćena u analizi soprcionih svojstava aktivirane kafe, kiselinско-baznim osobinama, reaktivnosti i afiniteta ka više vrsta ispitivanih adsorbata (boje kristal violet, pesticida parakvata i polifenola epigalokatehin galata).

10.4.2. Naelektrisanje površine

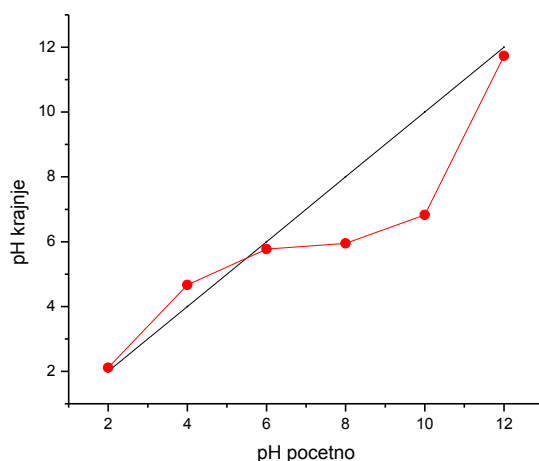
Površinsko naelektrisanje aktiviranog materijala u velikoj meri utiče na tok reakcije procesa adsorpcije. S tim u vezi, pH rastvora ima značajnu ulogu uslovljavajući, kako stepen jonizacije materija u rastvoru i disocijaciju funkcionalnih grupa na aktivnim mestima na adsorbentu, tako i hemijski sastav čestica adsorbata [254].

Naelektrisanje funkcionalnih grupa na površini aktivirane kafe određivano je merenjem tačke nultog naelektrisanja, pH_{pzc} tačke. Drugim rečima, pH vrednost na kojoj je površina čvrste faze nenaelektrisana, naziva se pH_{pzc} .

Praktični značaj tačke pH_{pzc} ogleda se u sledećem: ukoliko je pH vrednost suspenzije manja od vrednosti tačke pH_{pzc} onda je površina čvrste faze pozitivno naelektrisana i obrnuto, za sve pH vrednosti suspenzija većih od pH_{pzc} površina čvrste faze biće negativno naelektrisana [158]. Na taj način, poznavanje vrednosti pH_{pzc} doprinosi predviđanju privlačnih, odnosno,

odbojnih efekata aktivne površine prema određenoj jonskoj vrsti u rastvoru na datoj pH vrednosti [167].

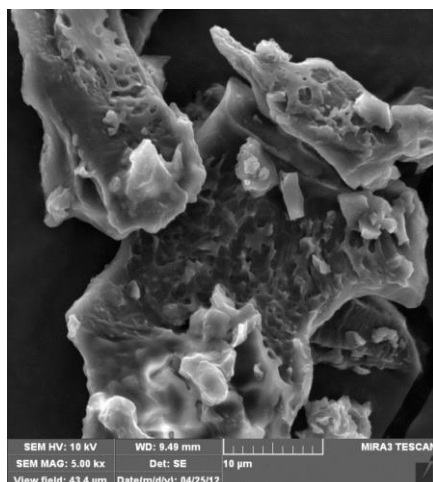
Na **slici 10.12** prikazano je određivanje tačke pH_{pzc} aktivirane kafe, čija je izmerena vrednost iznosila 5.6. S tim u vezi, u kiseljoj sredini površina aktivirane kafe biće pozitivno naelektrisana, i obratno, za neutralne vrednosti pH suspenzija i u baznoj sredini površina aktivirane kafe biće elektronegativna.



Slika 10.12. Određivanje tačke pH_{pzc}

10.4.3. Prikaz izgleda i strukture aktivne površine

Morfologija aktivirane kafe izučavana je na osnovu mikrografa skenirajućeg elektronskog mikroskopa (**slika 10.13**). Na površini posmatranog materijala, pri uvećanju od 5000 puta, mogu se uočiti nepravilni oblici udubljenja i pora, sa, pretežno, oštrim, otvorenim krajevima, koji su nasumično raspoređeni. Ovakav raspored može, u dobroj meri, obezbediti dostupnost i unutrašnjih delova pora česticama adsorbata, što doprinosi da specifična površina aktivirane kafe bude veća. U mnogim naučnim radovima nastoji se da se upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije uoči, upravo, razvoj i stepen poroznosti aktiviranih matrica. S tim u vezi, smatra se da ovako pripremljeni materijal može zadovoljiti potrebe adsorpcionih procesa.



Slika 10.13. Izgled površine aktivirane kafe posmatrane na SEM aparatu (uz uvećanje od 5000x)

10.5. Adsorpcija katjonske boje kristal violet na aktiviranu kafu

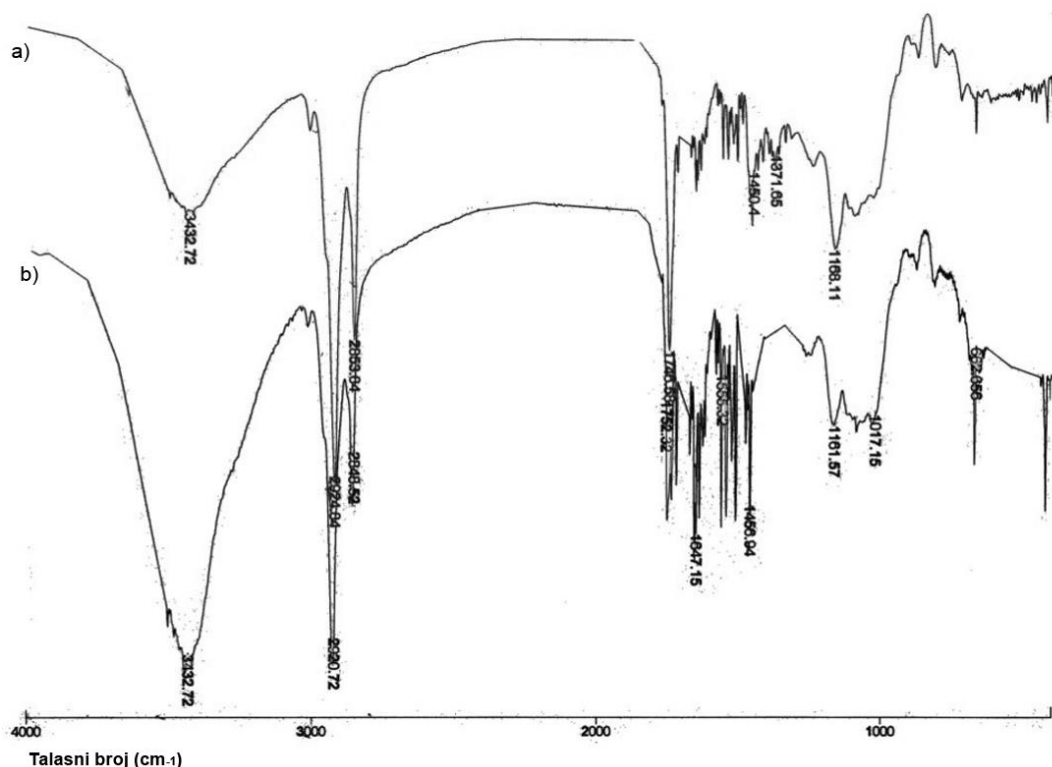
Proces adsorpcije boje kristal violet (KV) na aktiviranu kafu posmatran je u zavisnosti od vremena trajanja reakcije. Analizom FTIR vibracionih spektara aktivirane kafe pre i nakon adsorpcije KV razmatran je stepen promene strukture aktivne površine i stečen uvid o kvalitativnom sastavu funkcionalnih grupa koje su učestvovalе u procesu. Ispitivanjem kinetike procesa određen je model i definisani parametri pomoću kojih je aproksimiran mehanizam odigravanja reakcije. Uz to, izbor odgovarajuće adsorpcione izoterme doprineo je dodatnom razumevanju uspostavljanja ravnoteže u aktuelnom sistemu. Nakon toga, pristupilo se optimizaciji postupka adsorpcije boje KV na aktiviranu kafu, primenom metodologije odzivne površine.

10.5.1. FTIR analiza

Uporedni prikaz FTIR spektara aktivirane kafe pre i nakon adsorpcije boje kristal violet prikazan je na **slici 10.14**.

Pojačan intenzitet pomerenog pika sa 2924.84 cm^{-1} na 2920.72 cm^{-1} upućuje na postojanje C-H asimetričnih valencionih vibracija u metilenskoj grupi ($-\text{CH}_2$) i deformacionoj vibraciji metil grupa ($-\text{CH}_3$) [155]. Specifičan pik na 1647.15 cm^{-1} na uzorku kafe sa adsorbovanom bojom može biti posledica C=O valencionih vibracija u karboksilatima ($-\text{COO}-$) [155]. Snažna traka na približno 1450 cm^{-1} na spektru kafe nakon adsorpcije boje može biti u

vezi sa valencionim vibracijama u CH_2 i/ili O-H , verovatno prisutnih u fenolima [206]. Batohromna pomeranja sa 1168.11 cm^{-1} na 1161.57 cm^{-1} su posledica C-O valencionih vibracija. Pik na 626.66 cm^{-1} bi, prema literaturnim navodima, odgovarao deformaciji C-H van ravni, za različite substituentne benzenovih prstenova [206].



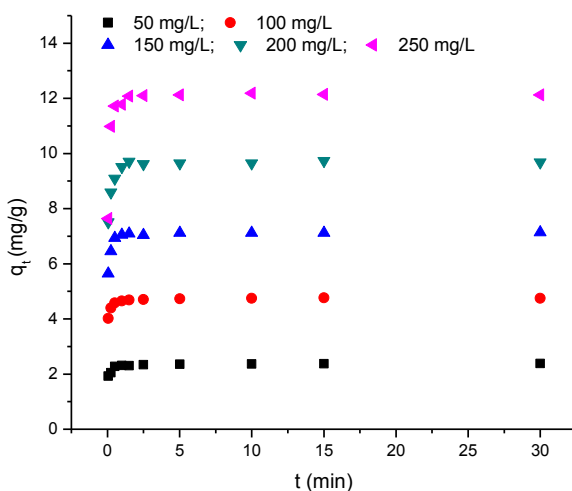
Slika 10.14. FTIR spektar površine aktivirane kafe pre (a) i posle (b) adsorpcije boje kristal violet

Može se primetiti da se većina pikova, koji potiču od istih funkcionalnih grupa u poređenim spektrima, javljaju na sličnim talasnim brojevima, uz manja ili veća pomeranja. S obzirom da nije uočeno nastajanje i razvoj novih hemijskih struktura ili nestajanje postojećih, smatra se da prilikom adsorpcije, uglavnom, nije dolazilo do stvaranja hemijskih veza. Nasuprot tome, pretpostavlja se da se adsorpcija pozitivno naelektrisane čestice boje pretežno odvijala elektrostatičkim privlačenjem sa negativnom šaržom na reaktivnoj površini aktivirane kafe. Tome u prilog ide i postojanje veoma elektronegativnih atoma azota u molekulskoj strukturi boje KV. Dostupni vodonikovi atomi iz $-\text{OH}$ grupa fenola i karboksilnih grupa sa površine aktivirane kafe, doprinosili su uspostavljanju vodonične veze sa elektronegativnim azotovim atomima boje. Momčilović i sar. (2012) [167] uočili su slično ponašanje prilikom ispitivanja adsorpcije

katjonske boje metilen plave na aktivnom uglju poreklom iz šišarke crnog bora, odnosno, srži ploda divljeg kestena. Ova grupa istraživača smatra da se vrste adsorbata koje sadrže tri aromatična jezgra, kakav je slučaj i sa molekulom boje KV, pretežno adsorbuju na aktivnim mestima u dubini ugljenične matrice i da je, pri tom, povezivanje bazirano na uspostavljanju slabih van der Valsovih (*van der Walls*) veza.

10.5.2. Tok reakcije i ravnotežni uslovi

Količina boje adsorbovane po jedinici mase aktivirane kafe, q_e (mg/g), u zavisnosti od vremena kontakta tečne i čvrste faze, grafički je prikazana je na **slici 10.15**.



Slika 10.15. Adsorpcioni kapacitet boje kristal violet na aktiviranu kafu u zavisnosti od vremena reakcije

Na početku procesa, rastvorene čestice boje iz tečne faze počinju da difunduju kroz rastvor ka površini čvrste faze, na kojoj se nalazi veliki broj dostupnih aktivnih mesta. Deo njih biva odmah adsorbovan, što rezultuje porastom koncentracije boje na površini aktivirane kafe [167]. Početna faza adsorpcije, u kojoj je dominiralo spontano povezivanje molekula boje sa mnoštvom funkcionalnih grupa na aktivnoj površini, odigrala se u toku prvih 5 minuta. Nakon toga, preostala mesta za adsorpciju na površini čvrste faze bilo je teže okupirati, što je rezultovalo usporavanjem toka reakcije. Razlog tome može biti teška dostupnost, odnosno, nepristupačnost vezivnih mesta, verovatno lociranih u unutrašnjoj strukturi pora. Sa druge strane,

ne treba zanemariti i uticaj sila odbijanja i mehaničkih opstrukcija između molekula boje adsorbovanih na čvrstom nosaču i rasutih u rastvoru, a isto tako i samih molekula boje adsorbovanih u površinskom sloju [158,180]. Paralelno sa procesom adsorpcije, odvija se i proces desorpcije, koji podrazumeva da se primarno adsorbovane čestice odvajaju od površine i vraćaju natrag u tečnu fazu. Ova pojava dobija na intenzitetu u fazi kada je vezivanje adsorbata već dostiglo značajne razmere. U određenom trenutku postiže se termodinamička ravnoteža, pri čemu se brzine adsorpcije i desorpcije izjednačavaju [167]. U aktuelnom sistemu, do uspostavljanja ravnoteže došlo je relativno brzo, već nakon prvih 5 minuta odigravanja reakcije.

Uočava se još i da je u visokokoncentrovanim rastvorima boje adsorpcioni kapacitet bio viši, u odnosu na manje koncentrovane. Razlog tome, verovatno, leži u jednostavnoj činjenici, usled povećanog broja molekula boje koji se „takmiče“ za dostupna mesta na aktivnoj površini. S tim u vezi, adsorpcioni kapacitet zavisio je od koncentracije boje u rastvoru, dok sa druge strane, vreme potrebno za postizanje ravnoteže, nije zavisilo od količine molekula boje u sistemu.

10.5.3. Adsorpciona kinetika

Adsorpcionom kinetikom određuje se model kojim bi se najrelevantnije opisali eksperimentalni rezultati u funkciji operativnih parametara [155].

Kinetički podaci adsorpcije boje KV na aktiviranu kafu analizirani su korišćenjem modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog (*Weber and Morris*) modela međučestične difuzije.

Izračunavanje kinetičkih parametara izvedeno je iz vrednosti nagiba i odsečaka linearizovanih oblika odgovarajućih modela, a rezultati su prikazani u **tabeli 10.14**. Analiza vrednosti rezultata vršena je na osnovu koeficijenta korelacije, R^2 , kao i slaganja između eksperimentalno dobijenih i teorijski predviđenih vrednosti ravnotežnih kapaciteta, q_e . S tim u vezi, pronađeno je da bi se kinetika adsorpcije boje KV na aktiviranoj kafi mogla najbolje aproksimirati modelom pseudo-drugog reda.

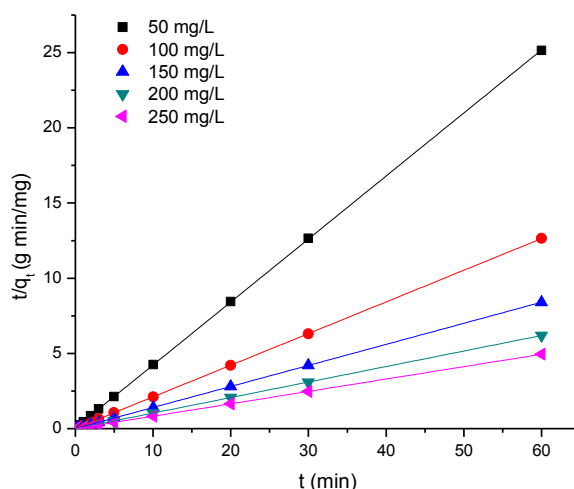
Tabela 10.14. Kinetički parametri adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Konc. boje mg/L	q_{e,exp}* mg/g	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		k₁ (1/min)	q_{e,mod}** (mg/g)	R²	k₂ (g/mg min)	q_{e,mod} (mg/g)	R²
50	2.386	0.1209	0.1744	0.9034	4.4765	2.3872	0.9999
100	4.762	0.0758	0.1146	0.2604	7.2640	4.7506	0.9999
150	7.144	0.1239	0.2610	0.8327	3.2085	7.1480	0.9999
200	9.683	0.0647	0.2407	0.1800	2.7255	9.6993	0.9999
250	12.143	0.0583	0.2346	0.0541	3.5651	12.151	0.9999

*q_e, eksperimentalno;**q_e, modelovano

Koeficijenti korelacije (R^2) upućuju na dobro slaganje eksperimentalnih vrednosti sa modelom pseudo-drugog reda, na celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija. Pored toga, vrednosti adsorpcionih kapaciteta dobijene eksperimentalnim putem bile su veoma bliske sa predviđenim, uz neznatna odstupanja, za razliku od vrednosti dobijenih iz modelovanja sa jednačinom pseudo-prvog reda. U skladu sa postulatom na kojem se model pseudo-drugog reda zasniva, moglo bi se pretpostaviti da se adsorpcija verovatno odigrala preko površinskih reakcija na konačnom broju adsorpcionih mesta [255]. Kada slobodna mesta budu u potpunosti okupirana, molekuli boje bi difundovali u pore adsorbenta i dalje se povezivali uspostavljanjem određenih veza [158].

Na **slici 10.16** grafički je prikazano slaganje eksperimentalnih rezultata sa kinetičkim modelom pseudo-drugog reda.



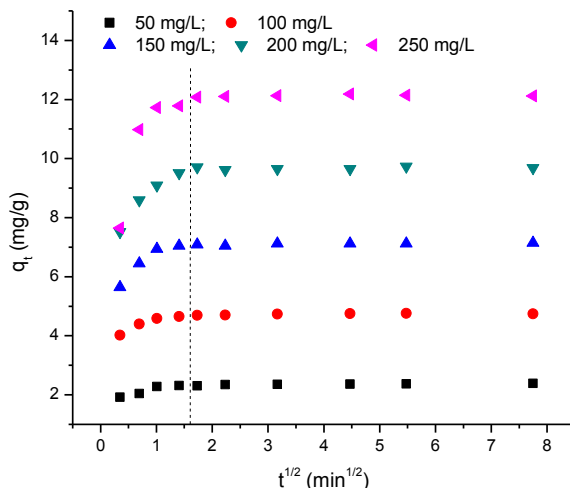
Slika 10.16. Kinetika adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu po modelu pseudo-drugog reda

Kinetika adsorpcije boje KV na drugim vrstama aktivnih ugljeva bazirala se, takođe, na modelu pseudo-drugog reda [155,181]. Do istog zaključka došli su i Roh i sar. (2011) [17] prilikom ispitivanja kinetike adsorpcije kisele boje 44 na adsorbentu od otpadne kafe.

Sa mehanističke tačke gledišta, adsorpcija je proces koji se odigrava u nekoliko konsektivnih koraka: prenos adsorbata iz vodenih rastvora do površine adsorbenta, difuzija filma (odnosno, difuzija molekula adsorbata kroz granični sloj oko čestica adsorbenta), prolazak adsorbata do porozne strukture adsorbenta, gde dolazi do povezivanja sa aktivnom površinom [189,255]. Celokupan proces može biti kontrolisan jednim od navedenih koraka, ili njihovom kombinacijom.

Najčešće primenjivana tehnika za određivanje adsorpcionog mehanizma je ispitivanje slaganja eksperimentalnih rezultata sa Veber-Morisovim (*Weber and Morris*) modelom međučestične difuzije [118,164]. Ukoliko u procesu dolazi do međučestične difuzije, onda će grafik zavisnosti $q_t - t^{1/2}$ biti linearan. Dalje, ukoliko kriva na grafiku prolazi kroz koordinatni početak onda je međučestična difuzija jedini kontrolišući korak u procesu. U suprotnom, smatra se da i neki drugi mehanizam ima udela u ograničavanju toka reakcije [180].

Na **slici 10.17** prikazan je grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu.



Slika 10.17. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Sa grafika se može uočiti da je adsorpcija KV na aktiviranu kafu multilinearan proces i da se, tačnije, odigrava u dve faze. Početna, strma faza, znači da je adsorpcija najpre bila spontana i verovatno je posledica elektrostatičkih interakcija između molekula boje i spoljne površine adsorbenta [164,180]. Druga faza je spora i traje sve do kraja reakcije. Pretpostavlja se da u ovoj fazi dominiraju niske koncentracije adsorbata u rastvoru, a takođe je posledica i difuzije čestica adsorbata iz većih pora u mikropore, koji utiču na smanjenje brzine odigravanja adsorpcije [164,256,257]. Nagibi krivih na grafiku $q_t - t^{1/2}$ nisu prolazili kroz koordinatni početak, što je značilo da međučestična difuzija nije bila jedini operativni mehanizam koji u potpunosti opisuje razvoj procesa u sistemu. Može se, međutim, reći da međučestična difuzija teži da bude kontrolišući korak za niže koncentracije boje, dok kod viših koncentracija mogu biti uključeni i drugi mehanizmi, poput difuzije filma. Smatra se da udaljšavanje krivih od koordinatnog početka može biti posledica različite brzine prenosa mase u početnoj i krajnjoj fazi adsorpcije [258]. Slično rezultatima u ovom istraživanju, Vadivelan i Kumar (2005) [180] su primetili da se adsorpcija boje metien plavo na pirinčanim ljuskama odigravala, gotovo,

identično, u dva nivoa, kao i adsorpcija boje kisele ljubičaste na adsorbentu poreklom od pomorandžinih kora [259].

U **tabeli 10.15** su prikazane vrednosti parametara međučestične difuzije procesa adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu. Vrednosti konstanti R_{id} (izračunate iz nagiba krivih) označavaju meru debljine graničnog sloja [254,257], dok vrednosti C (izračunate iz odsečaka) ukazuju na doprinos površinske adsorpcije u procesu [180]. Vrednosti svih odsečaka bile su pozitivne, što je značilo da se adsorpcija odigrala u, relativno, kratkom vremenskom periodu.

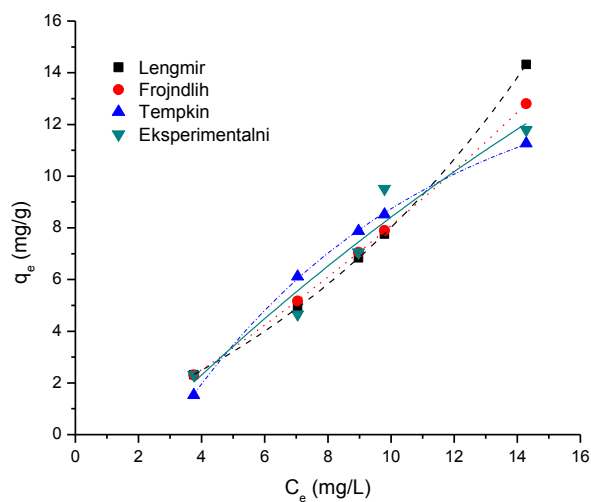
Tabela 10.15. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije kristal violet na aktiviranu kafu

Koncentracija	R_{id1}	C_1	$(R_1)^2$	R_{id2}	C_2	$(R_2)^2$
mg/L	mg /g/ min ^{1/2}	mg/g		mg /g/ min ^{1/2}	mg/g	
50	0.3950	1.7988	0.8685	0.0112	2.3078	0.7423
100	0.5867	3.9038	0.8172	0.0097	4.6893	0.5276
150	1.3290	5.3728	0.8200	0.0120	7.0584	0.5070
200	1.8421	7.0848	0.9011	0.0059	9.6480	-0.1286
250	3.7048	7.3327	0.5946	0.0079	12.094	0.0186

10.5.4. Adsorpcione izoteme

Odabirom odgovarajućeg modela adsorpcionih izoterma stiče se uvid u površinska svojstva adsorbenta i afiniteta ka adsorbatima [254].

Ravnotežne adsorpcione izoterme boje kristal violet na aktiviranoj kafi analizirane su korišćenjem tri najpoznatija modela: Lengmirovog, Frojndlihovog i Tempkinovog, koji su grafički predstavljeni na **slici 10.18**, a dobijene vrednosti odgovarajućih konstanti prikazane su u **tabeli 10.16**.



Slika 10.18. Adsorpcione izoterme procesa adsorpcije kristal violet na aktiviranu kafu na 27 °C

Parametri Lengmirove adsorpcione izoterme bili su izostavljeni u **tabeli 10.16** usled neslaganja eksperimentalnih rezultata sa modelom izoterme. To se najpre može vizuelno uočiti na uporednom grafičkom prikazu izoterme (**slika 10.18**), tako što Lengmirova odstupa primanjem oblika konkavne krive, za razliku od ostalih, pretežno ravnih ili konveksnih. Kao posledica toga, izračunate vrednosti ravnotežnih konstanti bile su negativnog predznaka. To je prvi nagoveštaj koji ukazuje na nekompatibilnost modela sa aktuelnim sistemom. Takođe, može se isključiti pretpostavka da su na površini adsorbenta raspoređena energetski homogena aktivna mesta, na kojima dolazi do formiranja monosloja čestica adsorbata.

Tabela 10.16. Ravnotežni parametri adsorpcionih izoterme boje kristal violet na aktiviranu kafu

Lengmir		Frojndlih			Tempkin	
R_L^2	R_F^2	n	K_f	R_T^2	b_T	A
			(mg/g)(L/g) ⁿ		(J/mol)	(mL/mg)
0.7838	0.9577	0.7798	0.42296	0.8892	342.68	0.3290

Imajući u vidu koeficijente korelacije, R^2 , Frojndlihova izoterma je pokazala najbolje slaganje sa eksperimentalnim rezultatima. S tim u vezi, može se pretpostaviti da je višeslojna adsorpcija čestica KV bila bazirana na pretežno energetski heterogenoj površini adsorbenta,

odnosno, na aktivnim mestima različitih sorpcionih afiniteta [180]. Za vrednosti parametra $n < 1$ postoji verovatnoća da je u procesu bilo i hemisorpcije [180,223].

Prethodno je u literaturi zabeleženo da je adsorpcija više vrsta boja na aktivnim ugljevima poreklom od kafe bila, najčešće, u skladu sa Lengmirovom adsorpcionom izotermom [17,180,206]. Slično tome, i adsorpcija boje kristal violet na biomasi *Acacia nilotica* bila je aproksimirana Lengmirovim ravnotežnim modelom [181].

10.5.5. Optimizacija postupka adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Za optimizaciju postupka adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu korišćena je metodologija odzivne površine. Ispitivan je efekat parametara, koji na osnovu literaturnih navoda i preliminarne eksperimenata, imaju značajan uticaj na promene u datom sistemu. Način njihovog delovanja na proces adsorpcije utvđen je postavljanjem i analizom odgovarajućeg modela.

10.5.5.1. Eksperimentalni dizajn

Za postavljanje modela optimizacije postupka adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu odabran je Boks-Benken (*Box-Behnken*) dizajn. Ispitivani ulazni procesni parametri bili su: masa adsorbenta (g/L), koncentracija boje (mg/L), vreme mešanja (s) i pH rastvora boje, a način njihovog delovanja posmatran je u zavisnosti od promene dva izlazna parametra, odnosno, adsorpcionog kapaciteta (mg/g) i količine uklonjene boje iz rastvora (%). Vrednosti nivoa procesnih promenljivih (**tabela 10.17**) odabrane su na osnovu prethodnih ispitivanja i literaturnih izveštaja o adsorpciji boja na aktivnim ugljevima koji su pripremljeni od sličnih bio-sirovina [154,155,215]. Variranjem procesnih parametara na različitim nivoima simultano, opisani su njihovi interaktivni efekti, kao i ukupan efekat na proces.

Tabela 10.17. Vrednosti ispitivanih nivoa procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Procesna promenljiva	Jedinica mere	Oznaka	Granične vrednosti		
			-1	0	1
Masa adsorbenta	g/L	A	5.0	15.0	25.0
Koncentracija boje	mg/L	B	50	150	250
Vreme mešanja	s	C	30	315	600
pH		D	3	6	9

10.5.5.2. Ocena značajnosti modela

U oceni značajnosti modela adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu najpre se pristupilo analizi varijanse (ANOVA) eksperimentalnih rezultata, prikazanih u **tabeli 10.18**.

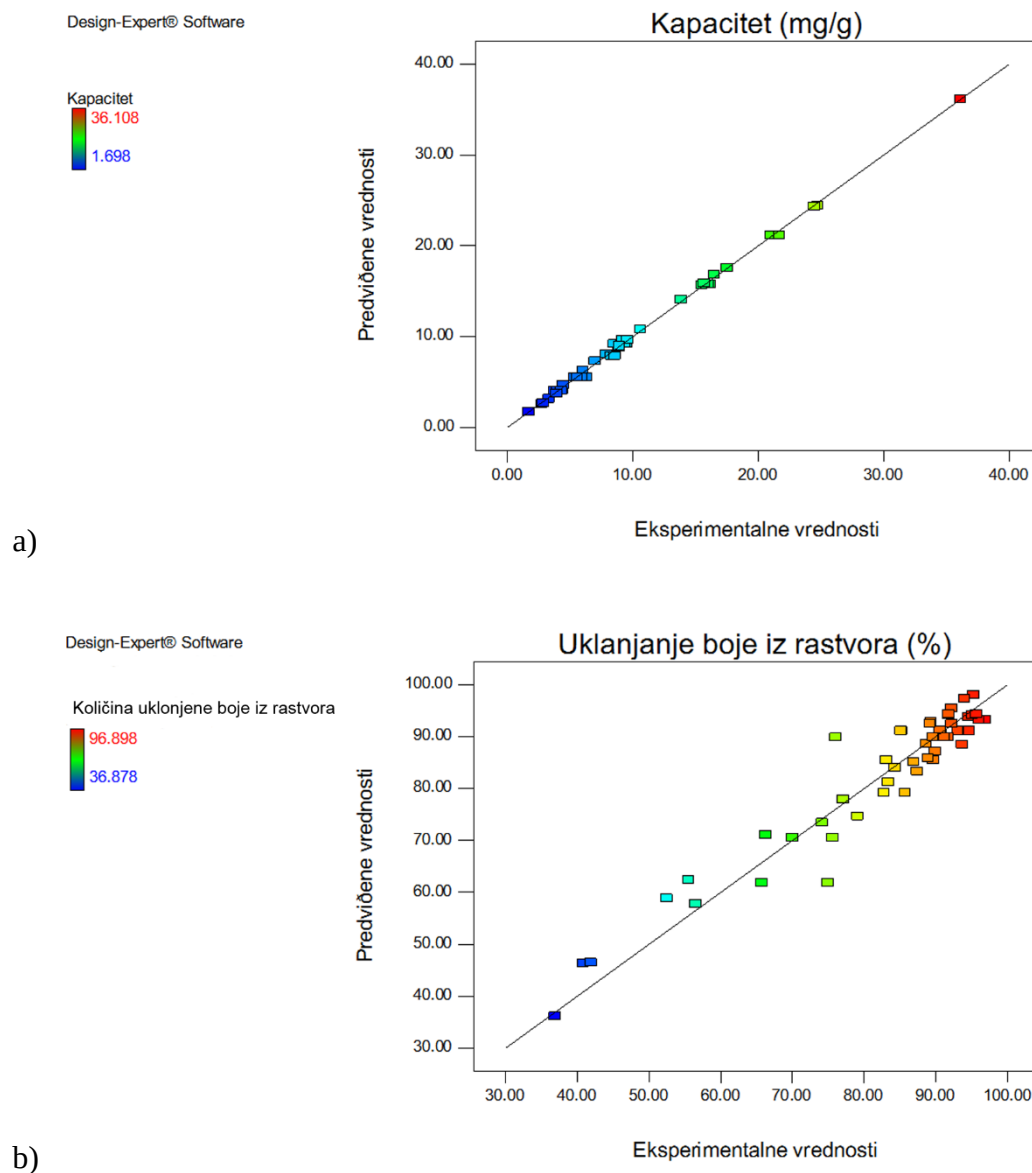
Tabela 10.18. Analiza varijanse (ANOVA) odziva u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Odziv	R ²	P-vrednost modela	F-vrednost modela	Koeficijent varijacije (%)	p- vrednosti nedostatka fitovanja	Aдекватna preciznost
Y ₁	0.9981	< 0.0001	1307.9	3.44	0.0958	175.9
Y ₂	0.9192	<0.0001	27.63	6.33	0.2576	21.08

Y₁: adsorpcioni kapacitet (mg/g);
Y₂: količina uklonjene boje iz rastvora (%).

Vrednosti koeficijenta R² (koje su veoma bliske broju 1) ukazuju da se većina podataka uklapa u regresioni model. Drugim rečima, postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti rezultata. Vrednosti P < 0.0001 znače da je model u celini značajan, dok vrednost nedostatka fitovanja nije bila statistički značajna (p > 0.05), što znači da se model može dobro opisati predviđenim jednačinama. Ova vrednost, inače, daje procenu da li su kontrolne eksperimentalne vrednosti pravilno raspoređene oko odgovarajuće srednje vrednosti. Koeficijenti varijacije upućuju da je model pouzdan i reproduktivan i da se može upotrebiti u cilju predviđanja odziva.

Na **slici 10.19 (a-b)** su grafički prikazana slaganja eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u posmatranom eksperimentalnom dizajnu.



Slika 10.19. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu: adsorpcioni kapacitet (a), količina uklonjene boje iz rastvora (b)

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u **tabeli 10.19**, a efekat odgovarajućih faktora prikazan je u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom (odjeljak **10.5.5.3.-10.5.5.4.**).

Tabela 10.19. Analiza varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Faktor	Prob > F*	
	Adsorpcioni kapacitet (mg/g)	Količina uklonjene boje iz rastvora (%)
A	< 0.0001	< 0.0001
B	< 0.0001	0.0053
C	< 0.0001	< 0.0001
D	< 0.0001	< 0.0001
AB	< 0.0001	0.0078
AC	< 0.0001	0.0056
AD	< 0.0001	< 0.0001
BC	< 0.0001	0.5441
BD	0.2798	0.3891
CD	0.0226	0.0688
A ²	< 0.0001	< 0.0001
B ²	< 0.0001	0.2810
C ²	< 0.0001	< 0.0001
D ²	< 0.0001	0.0102

A: masa adsorbenta (g/100 mL);

B: koncentracija boje (mg/L);

C: vreme mešanja (s);

D: pH.

***Napomena:** Vrednosti „Prob > F“ manje od 0.0500 znače da je faktor statistički značajan.

Veza između nezavisnih promenljivih i proučavanih odziva bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Primenom višestruke regresione analize eksperimentalnih podataka, pronađeno je da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog reda. Empirijske jednačine odnosa procesnih promenljivih i odziva prikazane su u daljem tekstu (j-na: 10.9-10.10):

$$Y_1 = 9.07 - 7.83A + 5.88 B + 2.04 C + 0.71 D - 8.17 AB - 2.35 AC - 3.05 AD + 1.33 BC + \\ +0.19BD - 0.41 CD + 4.40 A^2 + 0.73 B^2 - 1.38 C^2 - 0.59 D^2 \quad (10.9)$$

$$Y_2 = 90.51 + 10.97 A + 3.87 B + 16.26 C + 7.47 D - 7.35 AB - 7.70 AC - 12.23 AD + 1.59 BC + \\ +2.27 BD - 4.89 CD - 8.38 A^2 - 1.76 B^2 - 11.76 C^2 - 4.38 D^2 \quad (10.10)$$

pri čemu su Y_1 - Y_2 predviđeni odzivi, a A, B, C i D su procesne promenljive. Uz to, pozitivan predznak znači da faktor ispoljava sinergistički efekat na odziv, dok se negativni predznak odnosi na antagonističke efekte.

U cilju reproduktivnosti predstavljenog dizajna, urađena je validacija rezultata za dve tačke odabrane iz numeričke optimizacije (**tabela 10.20**), čije su vrednosti očitane direktno iz softverskog paketa. Kao rezultat, primećene su bliske vrednosti predviđenih i validiranih rezultata, što se ogleda u pogodnosti primene prethodno predloženog oblika dizajna.

Tabela 10.20. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Procesne promenljive				Odzivi			
A	B	C	D	Y ₁		Y ₂	
				Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano
5.8	243.5	419.5	7.59	36.669	36.571	98.129	98.102
6.6	249.9	587.8	6.20	36.319	36.312	97.161	97.184

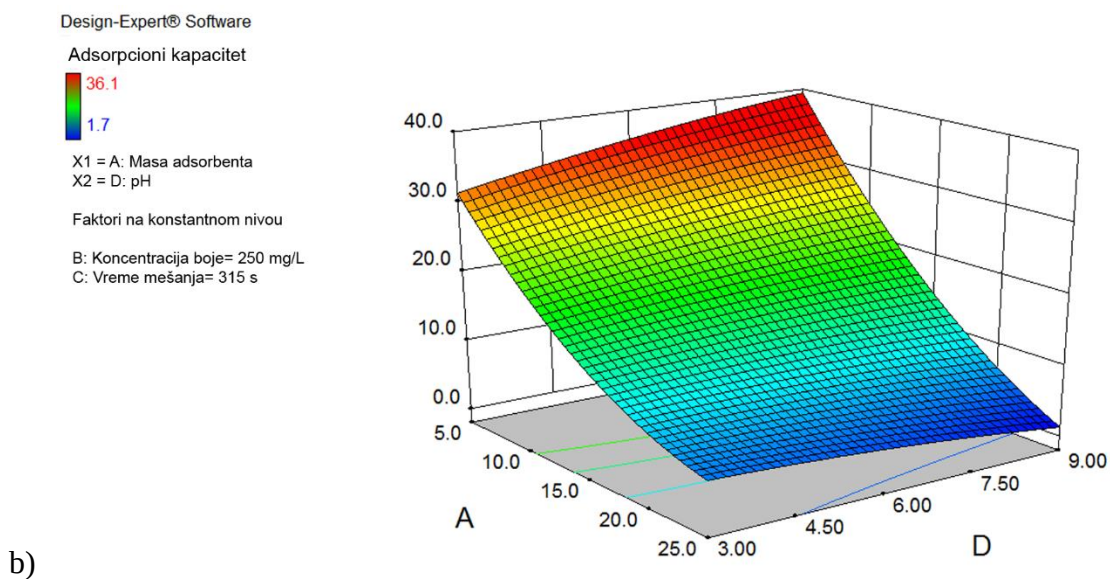
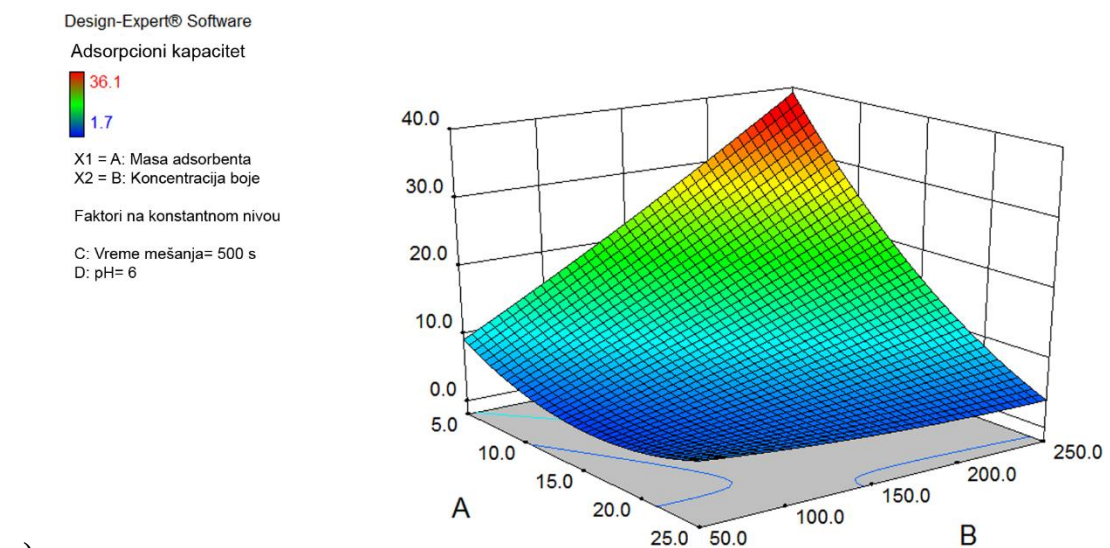
A: masa adsorbenta (g/L);
 B: koncentracija boje (mg/L);
 C: vreme mešanja (s);
 D: pH;
 Y₁: adsorpcioni kapacitet (mg/g);
 Y₂: količina uklonjene boje iz rastvora (%).

Eksperimentalni dizajn adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu, uslovljene promenama procesnih parametara (mase adsorbenta, koncentracije boje, vremena mešanja i pH rastvora boje), i vrednosti odgovarajućih odziva prikazani su u **Prilogu 2 (tabela P-2.3)**. Uticaj procesnih promenljivih na izgled i promenu vrednosti odziva analiziran je u daljem tekstu.

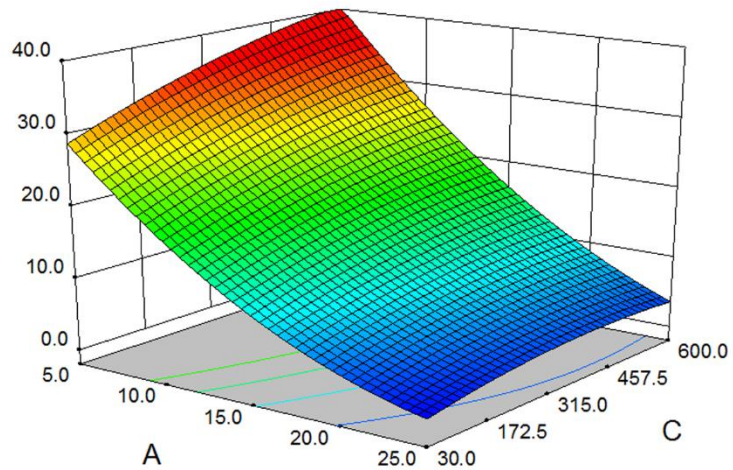
10.5.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet

Na osnovu ANOVA statistike (**tabela 10.19**) pokazano je da su pojedinačni i interaktivni efekti gotovo svih procesnih parametara (izuzev interaktivnih efekata faktora B/D) statistički značajno uticali na ponašanje odziva u posmatranom sistemu. Pod optimalnim uslovima, maksimalni adsorpcioni kapacitet boje kristal violet na aktiviranu kafu iznosio je 36.108 mg/g.

Uticaji interaktivnih efekata ispitivanih procesnih parametara na promene adsorpcionog kapaciteta boje kristal violet na aktiviranu kafu prikazani su grafički na **slici 10.20 (a-c)**.



Design-Expert® Software
 Adsorpcioni kapacitet
 36.1
 1.7
 X1 = A: Masa adsorbenta
 X2 = C: Vreme mešanja
 Faktori na konstantnom nivou
 B: Koncentracija boje= 250 mg/L
 D: pH= 6



c)

Slika 10.20. 3D grafik interaktivnih efekata mase adsorbenta i koncentracije boje (a), mase adsorbenta i pH rastvora i (b) mase adsorbenta i vremena mešanja (c) na adsorpcioni kapacitet

Smanjenjem količine (mase) adsorbenta i simultanim porastom koncentracije rastvora adsorbata dolazi do povećanja adsorpcionog kapaciteta boje KV na aktiviranu kafu (**slika 10.20a**). Količina adsorbenta u reakcionom sistemu je jedan od najbitnijih faktora koji utiču na tok adsorpcionih procesa. Njime se određuje potencijal adsorbenta da veže i ukloni čestice adsorbata iz rastvora [158]. U prilog tome stoji činjenica da su pojedinačni, a tako i interaktivni, efekti mase adsorbenta sa ostalim procesnim faktorima bili statistički značajni (**tabela 10.19**). Interesantna je činjenica da je porast mase adsorbenta u sistemu bio obrnuto srazmeran porastu adsorpcinog kapaciteta. Smatra se da, iako broj adsorpcionih mesta raste sa porastom mase adsorbenta, ta mesta tokom adsorpcije ostaju nezasićena [212]. Takođe, dolazi do pojave fenomena agregacije čestica adsorbenta, odnosno njihovog međusobnog privlačenja i nagomilavanja jedne na drugu. To izaziva stvaranje gustog sloja čestica i prikrivanja površinskih aktivnih mesta, dostupnih za adsorpciju molekula adsorbata. Još jedna od pretpostavki je da je pri velikim dozama adsorbenta nedovoljno dostupnih čestica adsorbata da prekriju sva aktivna mesta za vezivanje, ili su, sa druge strane, potencijalne interakcije između vezivnih mesta uticale na smanjenje kapaciteta.

Pokazano je da porast koncentracije boje u sistemu uslovljava porast adsorpcionog kapaciteta. Koncentracija boje u rastvoru predstavlja pokretačku snagu kojom se prevazilazi i savladava otpor pri prenosu mase molekula boje između tečne i čvrste faze [155]. Na osnovu toga, povećava se mogućnost uspostavljanja kontakta sa aktivnom površinom, a tako i olakšava difuzija u mikropore [155]. Kada su adsorpciona mesta okružena sa više molekula boje, olakšano je odigravanje procesa adsorpcije. Slična zapažanja o uticaju doze adsorbenta i koncentracije adsorbata bila su i prethodno zabeležena u literaturi [147,181,212].

Kako pH u otpadnim vodama može varirati, ispitan je uticaj pH rastvora na efikasnost adsorpcije boje KV na aktiviranu kafu. S tim u vezi, adsorpcioni kapacitet bio je u porastu u uslovima povećanog pH rastvora uz istovremeno smanjenje mase adsorbenta (**slika 10.20b**). Imajući u vidu da kiselo/bazni karakter funkcionalnih grupa na površini adsorbenta igra veoma važnu ulogu u interakcijama u toku procesa adsorpcije, uticaj pH detaljnije je analiziran na bazi tačke nultog naelektrisanja (pH_{pzc}). Kako je KV katjonska boja, njena adsorpcija je favorizovana u baznim sredinama. Nasuprot tome, u kiseljoj sredini, verovatno, dolazi do kompetitivne adsorpcije katjona boje sa H^+ jonima na slobodnim mestima na površini adsorbenta [13]. Sa porastom pH rastvora iznad vrednosti pH_{pzc} površina adsorbenta postaje pretežno negativno naelektrisana, olakšavajući elektrostatičko privlačenje između površinskih grupa i katjona boje. Drugim rečima, neto pozitivno naelektrisanje opada sa povećanjem pH vrednosti koje vodi ka smanjenju repulzija između površine adsorbenta i boje, što utiče na poboljšanje adsorpcionog kapaciteta [260]. Na sličan način, promene pH rastvora uticale su i na reakcije adsorpcije drugih katjonskih boja, prethodno zabeleženih u literaturi [13,16,110,176,206,260].

Mešanje u sistemu, u principu, omogućava lakše ostvarivanje kontakta između čvrste i tečne faze, odnosno, čestica adsorbata i adsorbenta. Tako i u aktuelnom sistemu, sa dužim vremenom mešanja dolazilo je do povećanja adsorpcionog kapaciteta (**slika 10.20c**). Maksimalni adsorpcioni kapacitet boje KV ostvaren je u toku 315 s mešanja suspenzije u sistemu sa aktiviranom kafom. U poređenju sa ovim rezultatom, Beak i sar. (2010) [16] su zabeležili da je za maksimum adsorpcije boje malahit zelene na adsorbentu od zelene kafe nižeg ranga kvaliteta bilo potrebno 30 minuta. Pri tom, pronađeno je da su vrednosti adsorpcionog kapaciteta bile u opsegu 3-16 mg/g (masa adsorbenta 6 g/L, pH 4). Oliviera i sar. (2008) [13] su, na sličan način, ispitivali adsorpcioni kapacitet ljuski od kafe za boju metilen plavu iz kontaminiranih voda. Tom

prilikom je utvrđeno da je bilo neophodno 12 sati kako bi se osiguralo postizanje ravnoteže, za rastvore koncentracija boje sve do 400 mg/L. Roh i sar. (2011) [17] su pronašli da je maksimalni adsorpcioni kapacitet boje kisele crvene 44 na otpadnoj kafi bio 27.8 mg/g. Što se tiče ispitivanja adsorpcije boje KV na biomasi *Acacia nilotica*, od strane Prasad i sar. (2011) [181], pronađeno je da su vrednosti kapaciteta bile u opsegu 6.83 – 22.56 mg/g, kako je koncentracija boje u rastvoru rasla od 50-200 mg/L. U zavisnosti od tehnike aktivacije biomase, ravnoteža u sistemu je uspostavljena za 90 minuta, odnosno 110 minuta. U poređenju sa ovim materijalom, može se uočiti da je aktivirana kafa bila boljih performansi za potrebe adsorpcije boje KV.

10.5.5.4. *Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklonjene boje iz rastvora*

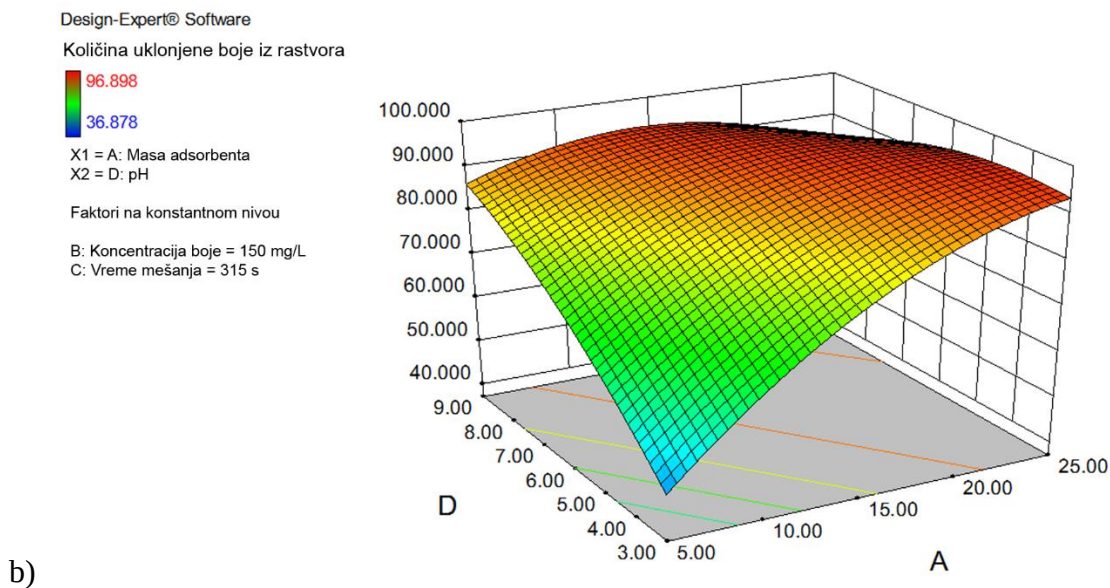
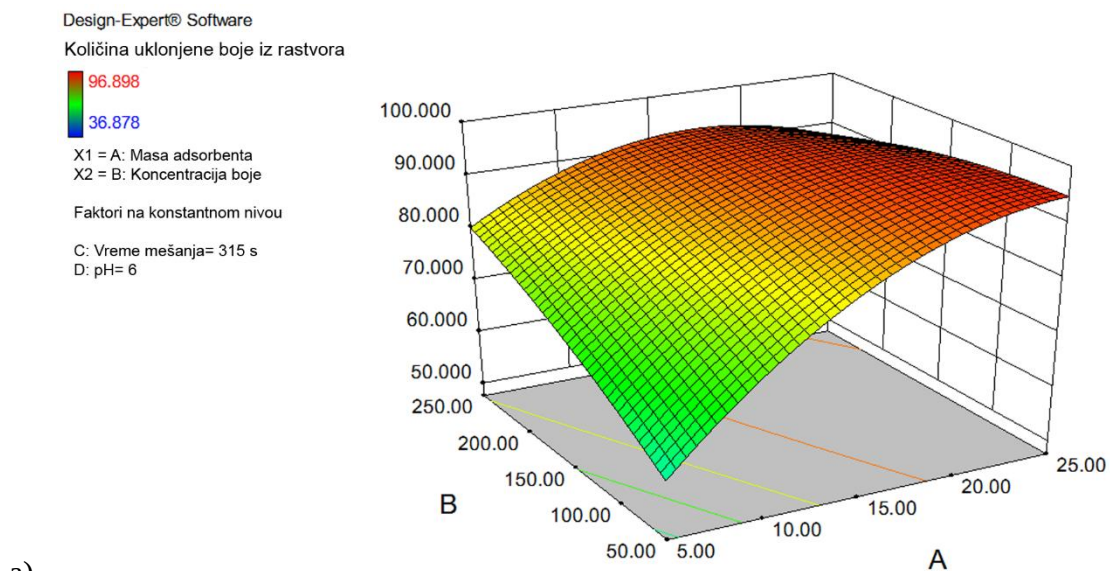
Uticaji interaktivnih efekata ispitivanih procesnih parametara na efikasnost uklanjanja boje kristal violet iz rastvora, prikazani su grafički na **slici 10.21 (a-c)**.

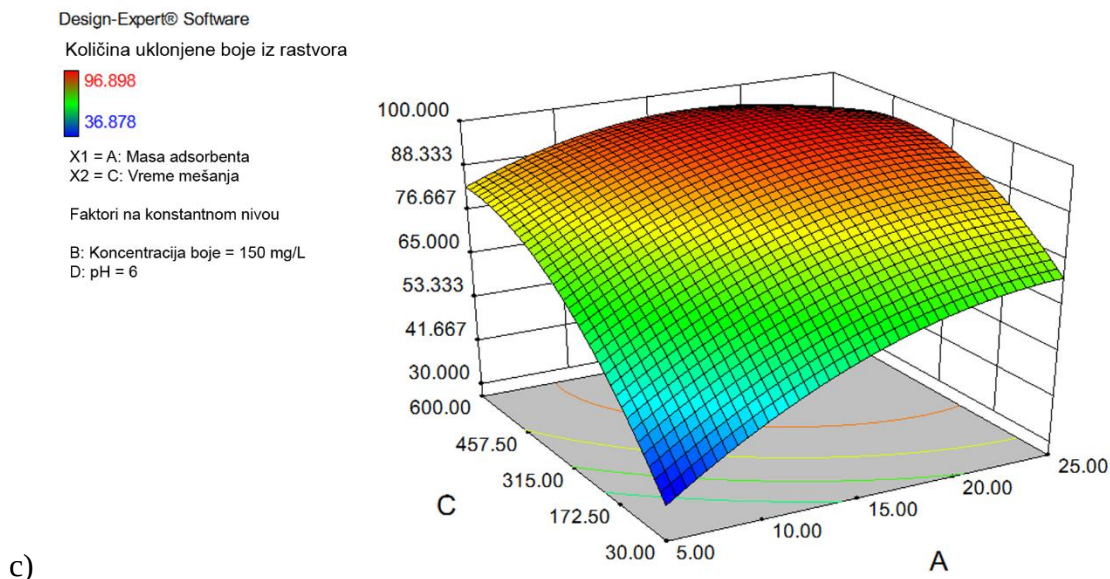
Pokazano je da su pojedinačni i interaktivni efekti mase adsorbenta sa ostalim procesnim faktorima bili statistički značajni, dok efekti B/C, B/D, C/D i B² nisu statistički značajno uticali na procenat uklanjanja boje iz sistema (**tabela 10.19**).

Maksimalna količina uklonjene boje kristal violet iz vodenog rastvora u sistemu sa aktiviranom kafom, pod optimalnim uslovima, iznosila je 96.90 %. Pri tom, pokazano je da uslovi koji su favorizovali porast adsorpcionog kapaciteta nisu bili optimalni i za postizanje maksimalnog stepena dekolorizacije, odnosno, uklanjanja boje iz rastvora.

Porast mase adsorbenta u sistemu, uz simultano povećanje koncentracije boje, uticalo je na njeno povećano uklanjanje (%) iz rastvora (**slika 10.21a**). Sa povećanjem broja čestica adsorbenta raste i aktivna površina i broj adsorpcionih mesta, tako da efektivnost procesa raste, čak i kada je koncentracija boje bila na konstantnom nivou. Sa druge strane, sa porastom koncentracije boje, povećava se verovatnoća za uspostavljanje kontakta između čestica adsorbata i adsorbenta. Nije retkost i u analizama drugih istraživača da je sa većom koncentracijom boje u rastvorima i efikasnost uklanjanja bila veća [13,158]. Može se primetiti da u sistemu dolazi do neznatnog smanjenja efiksnosti u uslovima kada vrednosti koncentracije boje i mase adsorbenta pređu određeni nivo. Razlog tome je što sa porastom koncentracije adsorbata na površini adsorbenta, pokretačka snaga adsorpcije opada, što, dalje, vodi do vrednosti konačnog zasićenja iznad koje adsorpcija više nije moguća [260]. Na 3D grafiku taj fenomen poprima oblik sedla.

Već je prethodno zabeleženo u analizi sorpcionih svojstava materijala od kafe da sa porastom broja čestica adsorbenta u rastvorima dolazi do porasta procenta uklanjanja adsorbata, ali da sa druge strane, vrednost adsorpcionog kapaciteta opada [18,207].





Slika 10.21. 3D grafik interaktivnih efekata mase adsorbenta i koncentracije boje (a), mase adsorbenta i pH rastvora (b) i mase adsorbenta i vremena mešanja (c) na količinu uklanjanja boje (%) iz vodenog rastvora

Uklanjanje boje KV iz rastvora (%) bilo je efikasnije sa porastom pH, uz istovremeno povećanje mase adsorbenta (**slika 10.21b**). U baznoj sredini povećava se broj slobodnih mesta na površini adsorbenta, odnosno, vezivna mesta za katjone boje bivaju pristupačnija. Duže vreme mešanja i ostvarivanje kontakta između čestica adsorbenta i adsorbata, takođe je uticalo na povećanje stepena dekolorizacije (**slika 10.21c**). Pronađeno je da interaktivne efekte A/D i A/C, takođe, nakon određenog nivoa vrednosti procesnih parametara, prati fenomen „sedla“. Iz tih razloga, bitno je pažljivo analizirati i definisati optimalne vrednosti ispitivanih faktora, u cilju ostvarivanja maksimalnih odziva.

10.6. Adsorpcija pesticida parakvata na aktiviranu kafu

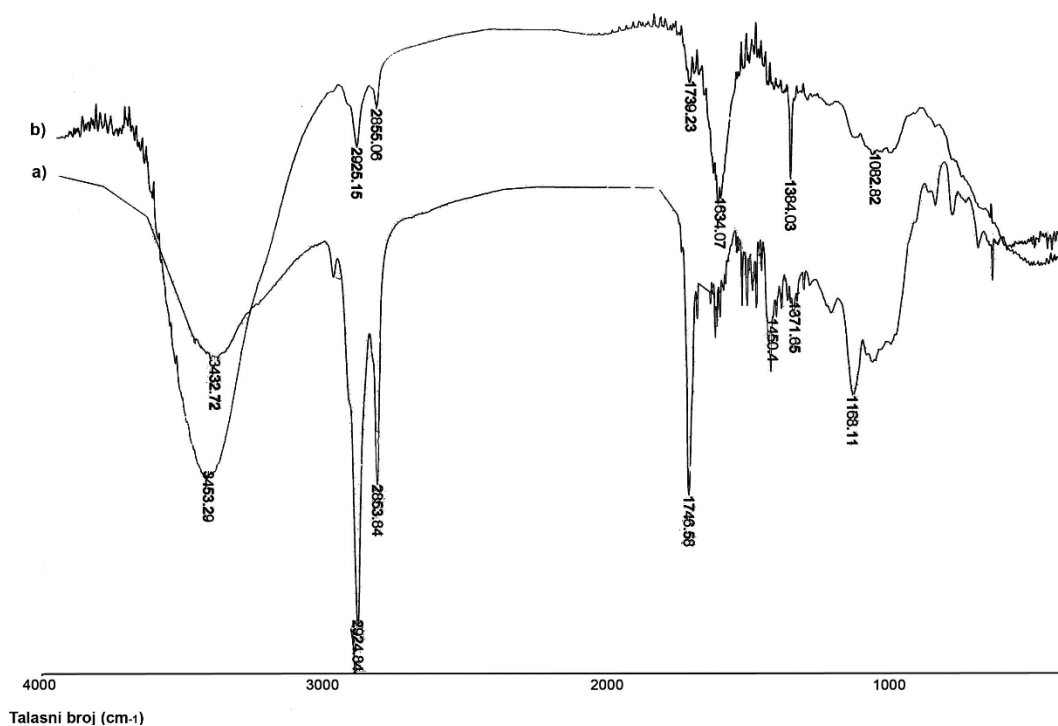
Proces adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu posmatran je u zavisnosti od vremena trajanja reakcije, pod identičnim uslovima kao u slučaju ispitivanja adsorpcije boje kristal violet, kako bi efikasnost ova dva sistema bila međusobno uporediva. S tim u vezi, analizom FTIR vibracionih spektara aktivirane kafe pre i nakon adsorpcije parakvata razmatran je stepen promene strukture aktivne površine, dok se ispitivanjem kinetičkih modela i adsorpcionih izoterma doprinelo razumevanju mehanizma i uspostavljanja ravnoteže u aktuelnom

sistemu. Na kraju, izvedena je optimizacija postupka adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu, primenom metodologije odzivne površine.

10.6.1. FTIR analiza

Analiza FTIR vibracionih spektara aktivirane kafe pre i nakon adsorpcije parakvata (**slika 10.22**) iskorišćena je za kvalitativnu identifikaciju funkcionalnih grupa koje su bile uključene u tok odigravanja procesa.

Hipsohromno pomeranje i povećan intenzitet pika sa 3432.72 cm^{-1} na 3459.27 cm^{-1} može se pripisati valencionim vibracijama vezanog vodonika u hidroksilnim grupama (koje mogu biti poreklom od karboksila, fenola ili alkohola) i adsorbovane vode na površini aktivirane kafe [194,261,262]. Smatra se da bi hipsohromno pomeranje ovog tipa moglo značiti jačanje O-H veze od koje pik potiče [167]. Intenziteti pikova na 2924 cm^{-1} i 2854 cm^{-1} , koji odgovaraju C-H asimetričnim i simetričnim vibracijama u metilen i metil grupama, bili su umanjeni [261,263]. Specifičan pik na 1640.38 cm^{-1} na uzorku kafe sa adsorbovanim parakvatom može biti posledica C=O valencionih vibracija u karboksilatima ($-\text{COO}-$) [263], a isto tako i OH deformacionih usled prisustva vode zadržane u interlameralnim slojevima [262]. Pojava pika na 1384 cm^{-1} može biti u vezi sa aksijalnom deformacijom karboksilnih grupa [196]. Karakterističan niz pikova u opsegu 1200 cm^{-1} i 1600 cm^{-1} može biti povezan sa C-C valencionim vibracijama i C-H deformacionim u ravni aromatičnog prstena [262]. Pik na 1164.59 cm^{-1} , koji je u vezi sa C-O valencionom vibracijom, bio je pomeren ka manjim talasnim brojevima, uz formiranje novog pika slabijeg intenziteta na 1089.36 cm^{-1} . Do vidljivih razlika na spektru aktivirane kafe sa adsorbovanim parakvatom, došlo je i u regiji „otiska prsta“. Generalno, pikovi na 890 cm^{-1} i 795 cm^{-1} mogu biti posledica O-H savijanja [261], dok pik na 626 cm^{-1} može biti posledica deformacije C-H van ravni, za različite substituentne benzenovih prstenova [263].



Slika 10.22. FTIR spektar površine aktivirane kafe pre (a) i posle (b) adsorpcije parakvata

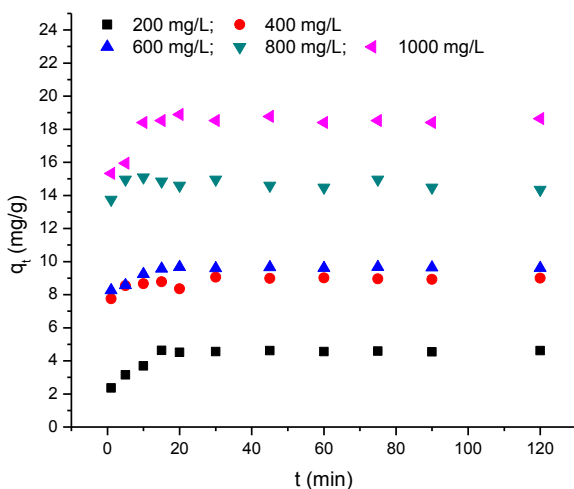
Na osnovu saznanja sa FTIR vibracionih spektara, primećeno je da su mnogi pikovi zadržani na svojim mestima uz promene intenziteta, ali i da su adsorpcijom parakvata indukovane određene promene u hemijskoj strukturi površine polaznog materijala. Pored toga, dominantan doprinos bi se, ipak, mogao pripisati stvaranju vodoničnih veza, pomoću kojih je omogućeno fiksiranje molekula parakvata za aktivne centre aktivirane kafe.

10.6.2. Tok reakcije i ravnotežni uslovi

Promena kapaciteta adsorpcije parakvata na aktiviranu kafu bila je u zavisnosti od koncentracije pesticida u vodenom rastvoru (**slika 10.23**). Sa druge strane, vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže nije zavisilo od iste.

U procesu su dominirale dve faze. Početna, eksponencijalna faza, koja je karakteristika pasivnog povezivanja molekula adsorbata sa velikim brojem dostupnih adsorpcionih mesta na površini aktivirane kafe, trajala je gotovo 30 minuta. Već je napomenuto da su dešavanja u procesu na ovom nivou, verovatno, posledica površinskih reakcija, preko razmene katjona,

uključujući elektrostatičke interakcije između negativno naelektrisanе površine adsorbenta i jona parakvata [262].



Slika 10.23. Adsorpcioni kapacitet pesticida parakvata na aktiviranu kafu u zavisnosti od vremena reakcije

U analizi sorpcionog fenomena, treba imati u vidu i nivo poroznosti aktiviranog materijala, kao i hidrofilnu prirodu aktivne površine. Oba navedena faktora u određenoj meri olakšavaju pristup aktivnim centrima molekulima adsorbata u reaktoru sa potpunim mešanjem fluida. Drugi stadijum u procesu je stanje postepenog uspostavljenja ravnoteže i stabilizovanja sistema, u kome se brzine adsorpcije i desorpcije izjednačavaju. U tom maniru, dolazi do zasićenja aktivne površine, pri čemu se smatra da je adsorpcioni kapacitet već dostigao značajne razmere.

10.6.3. Adsorpciona kinetika

Kinetika adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu analizirana je u skladu sa modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog modela međučestične difuzije.

Na osnovu koeficijenata korelacije (R^2) slaganja eksperimentalnih rezultata sa modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, pronađeno je da bi se aktuelni sistem mogao preciznije aproksimirati modelom pseudo-drugog reda. Vrednosti R^2 bile su veće od 0.99 na čitavom

opsegu ispitivanih koncentracija (**tabela 10.21**). Takođe, uočeno je prilično dobro slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti adsorpcionih kapaciteta.

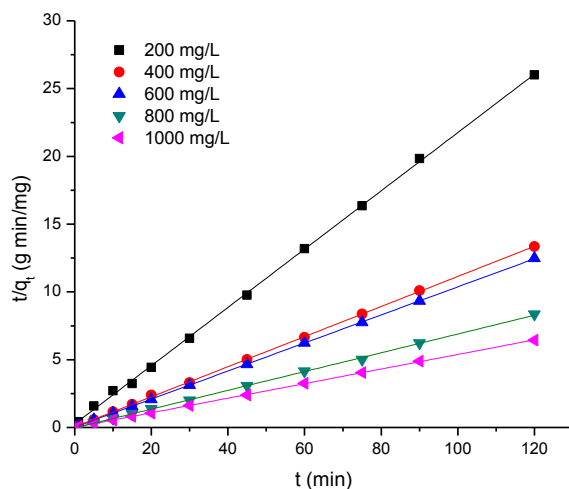
Tabela 10.21. Kinetički parametri adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

Konc. pesticida mg/L	$q_{e,exp}^*$ mg/g	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		k_1 (1/min)	$q_{e,mod}^{**}$ (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg·min)	$q_{e,mod}$ (mg/g)	R^2
200	4.6125	0.0227	0.1860	0.0216	0.1795	4.6512	0.9995
400	8.9796	$5.61 \cdot 10^{-4}$	8.7910	0.4020	0.2894	9.0074	0.9998
600	9.6666	0.0271	0.2063	0.1762	0.4295	9.6618	0.9999
800	14.475	$1.08 \cdot 10^{-4}$	13.261	0.0873	0.1472	14.434	0.9995
1000	18.644	$7.16 \cdot 10^{-3}$	0.5076	0.0766	0.2730	18.598	0.9999

* q_e , eksperimentalno;

** q_e , modelovano

Na **slici 10.24** grafički je prikazano slaganje eksperimentalnih rezultata sa kinetičkim modelom pseudo-drugog reda.

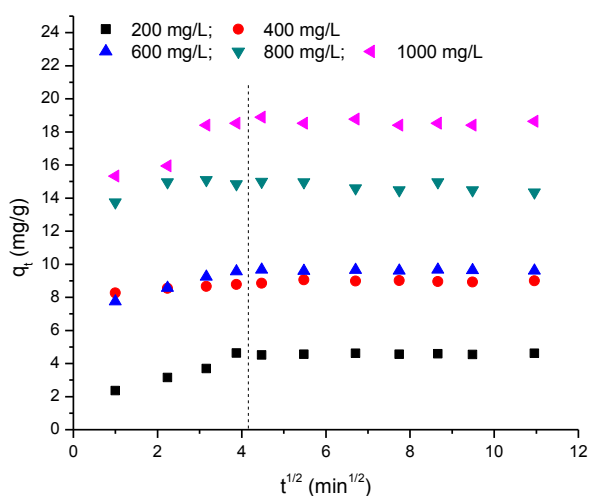


Slika 10.24. Kinetika adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu po modelu pseudo-drugog reda

Prethodno ispitivana adsorpcija boje KV na aktiviranu kafu, takođe se mogla opisati kinetičkim modelom pseudo-drugog reda. Pored toga, u mnogim drugim istraživanjima

adsorpcije parakvata na raznim tipovima adsorbenata, pronađeno je da slede kinetiku upravo ovog modela [187,190,191,194,195,255,264,265,266]. U retkim slučajevima, adsorpcija se odvijala u skladu sa modelom pseudo-prvog reda, kao što je zabeleženo u istraživanju Leite i sar. (2013) [189] prilikom adsorpcije parakvata na smolama tipa Amberlit XAD-2 i XAD-4.

Mehanizam procesa adsorpcije je dalje analiziran ispitivanjem slaganja eksperimentalnih rezultata sa modelom međučestične difuzije. Grafik zavisnosti $t^{1/2} - q_t$ prikazan je na **slici 10.25**, a odgovarajuće mehaničke konstante u **tabeli 10.22**.



Slika 10.25. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije parakvata na aktiviranu kafu

Na grafiku se mogu uočiti dva linearna dela. Prvi, koji dominira na početku procesa, ukazuje da je bilo, relativno, olakšane difuzije čestica parakvata kroz rastvor do makropora na površini aktivirane kafe. Doprinos tome može biti i povoljno mešanje koje je u sistemu obezbeđeno [189,195]. U drugom delu migracija molekula parakvata slabi, usled toga što su makropore bile okupirane molekulima adsorbata, ili verovatnoće da do difuzije dolazi u teže dostupnim porama manjih prečnika [195].

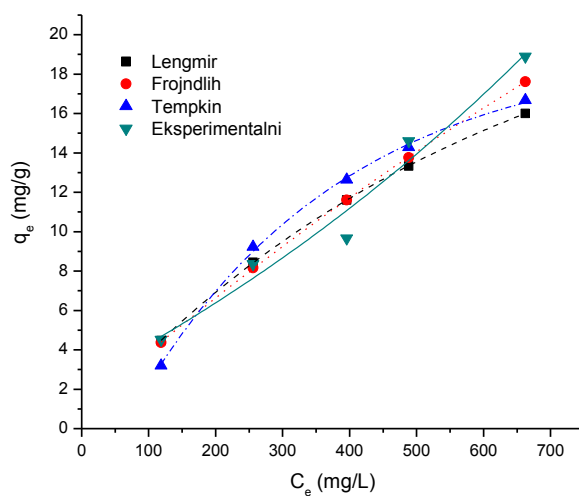
Tabela 10.22. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije parakvata na aktiviranu kafu

Konc. pesticida	R_{id1}	C₁	(R₁)²	R_{id2}	C₂	(R₂)²
mg/L	mg /g/ min ^{1/2}	mg/g		mg /g/ min ^{1/2}	mg/g	
200	0.6782	1.6681	0.9413	0.0026	4.5567	-0.2177
400	0.1660	8.1290	0.9841	-0.0141	9.1012	0.1850
600	0.5750	7.2669	0.9633	0.0018	9.6189	-0.2221
800	0.3125	13.806	0.4504	-0.0831	15.318	0.2245
1000	1.1408	14.056	0.8686	-0.0066	18.598	-0.2399

Postoji verovatnoća i da je došlo do reverzne difuzije, iz pravca površine aktivirane kafe u rastvor, u momentima kada su vezivna mesta u porama bila u potpunosti okupirana [195]. Ipak ova desorpcija se ne može smatrati značajnom (s obzirom da R_{id2} imaju relativno male vrednosti). Vrednosti nagiba u drugom delu naglo opadaju, toliko da krive postaju gotovo paralelne sa t^{1/2} osom. To znači da je u sistemu postignuta ravnoteža i može biti posledica malih koncentracija adsorbata zaostalih u rastvoru [189]. Krive u modelu međučestične difuzije ne prolaze kroz koordinatni početak, što znači da difuzija parakvata nije bila jedini mehanizam koji kontroliše adsorpciju.

10.6.4. Adsorpcione izoterme

Ravnotežni uslovi adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu, analizirani su korišćenjem Lengmirovog, Frojndlihovog i Tempkinovog modela izoterme, koji su grafički prikazani na **slici 10.26**, a odgovarajuće vrednosti konstanti date u **tabeli 10.23**.



Slika 10.26. Adsorpcione izoterme procesa adsorpcije parakvata na aktiviranu kafu na 27 °C

Na osnovu rezultata, primarno baziranih na vrednostima korelacionih koeficijenata (R^2), ispitivani proces bi se mogao najbolje opisati modelom Lengmirove adsorpcione izoterme.

Tabela 10.23. Vrednosti konstanti adsorpcionih izotermi procesa adsorpcije parakvata na aktiviranu kafu na 27 °C

Lengmir				Frojndlih			Tempkin		
R_L^2	q_m	K_a	R_L	R_F^2	n	K_f	R_T^2	b_T	A
	mg/g	L/mg				(mg/g)(L/g) ⁿ		J/mol	L/mg
0.9665	36.63	1.1717	0.46-0.81	0.9522	1.2353	24.59	0.8268	318.5	12.69

U skladu sa pretpostavkom na kojoj je model baziran, smatra se da je do postizanja ravnoteže u procesu došlo formiranjem monosloja čestica adsorbata, na homogenoj površini adsorbenta, na kojoj postoji tačno definisan broj lokalizovanih adsorpcionih centara. Pri tom, energetska stanje svih adsorbovanih čestica bilo je identično, bez obzira na položaj u prostoru ili stanje susednog adsorpcionog centra [167]. Takođe, zanemarena je verovatnoća postojanja interakcija među adsorbovanim molekulima parakvata.

Vrednosti R_L , koje su jedna od osnovnih karakteristika modela, su bile u opsegu 0-1, što je značilo da su uslovi u sistemu bili povoljni za spontano odigravanje procesa [224]. To je dalje

verifikovano vrednošću izračunate promene slobodne energije (ΔG), koja je iznosila -0.3952 kJ/mol [225].

Ako se, ipak, u manjoj meri razmotre Frojndlihoivi ravnotežni parametri, gde je uočeno dosta blisko slaganje sa eksperimentalnim vrednostima, može se potvrditi pretpostavka da aktivirana kafa poseduje afinitet ka česticama parakvata. Na osnovu vrednosti n spekuliše se o homogenosti površine [224]. Takođe, ove vrednosti ukazuju da se adsorpcija odigravala u zavisnosti od koncentracije adsorbata [224].

Iako Lengmirova teorija zagovara postojanje uniformnih adsorpcionih mesta na aktivnoj površini, pronađeno je da je adsorpcija parakvata na mnogim tipovima adsorbenata bila u skladu upravo sa ovim modelom [187,193,195,196,225,261,262,264]. Isto je nađeno i za adsorpciju pesticida 4-hloro-2-metil-fenoksi-sirćetne kiseline na otpadnoj kafi [194]. Nasuprot tome, drugi istraživači su pokazali dobra slaganja i sa Frojndlihovim modelom [187,193,195,196,225,261,262,264], a nije bilo neobično zapaziti i aproksimiranje nekog procesa pomoću oba modela istovremeno [225].

10.6.5. Optimizacija postupka adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

Optimizacija postupka adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu izvedena je primenom metodologije odzivne površine. Kao i u prethodnom slučaju optimizacije postupka adsorpcije boje (odjeljak **10.5.5.**), u ovom delu istraživanja ispitivan je efekat procesnih parametara koji značajno utiču na promene u datom sistemu. Način njihovog delovanja na odzive utvrđen je postavljanjem i analizom odgovarajućeg modela.

10.6.5.1. Eksperimentalni dizajn

Za postavljanje modela optimizacije postupka adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu odabran je Boks-Benken (*Box-Behnken*) dizajn. Ispitivani ulazni procesni parametri bili su: masa adsorbenta (g/L), koncentracija pesticida (mg/L), vreme mešanja (min) i pH rastvora pesticida, a način njihovog delovanja posmatran je u zavisnosti od promene dva izlazna parametra, odnosno, adsorpcionog kapaciteta (mg/g) i količine uklonjenog pesticida iz rastvora (%). Vrednosti nivoa procesnih promenljivih (**tabela 10.24**) odabrane su na osnovu prethodnih ispitivanja i literaturnih izveštaja o adsorpciji pesticida na raznim tipovima aktivnih

ugljeva [191,195,266]. Variranjem procesnih parametara na različitim nivoima simultano, opisani su njihovi interaktivni efekti, kao i ukupan efekat na proces.

Tabela 10.24. Vrednosti ispitivanih nivoa procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

Procesna promenljiva	Jedinica mere	Oznaka	Granične vrednosti		
			-1	0	1
Masa adsorbenta	g/L	A	5.0	12.5	20.0
Koncentracija pesticida	mg/L	B	200	600	1000
Vreme mešanja	min	C	15.0	37.5	60.0
pH		D	3	5	7

10.6.5.2. Ocena značajnosti modela

U oceni značajnosti modela adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu najpre se pristupilo analizi varijanse (ANOVA) eksperimentalnih rezultata, prikazanih u **tabeli 10.25**.

Tabela 10.25. Analiza varijanse (ANOVA) odziva u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

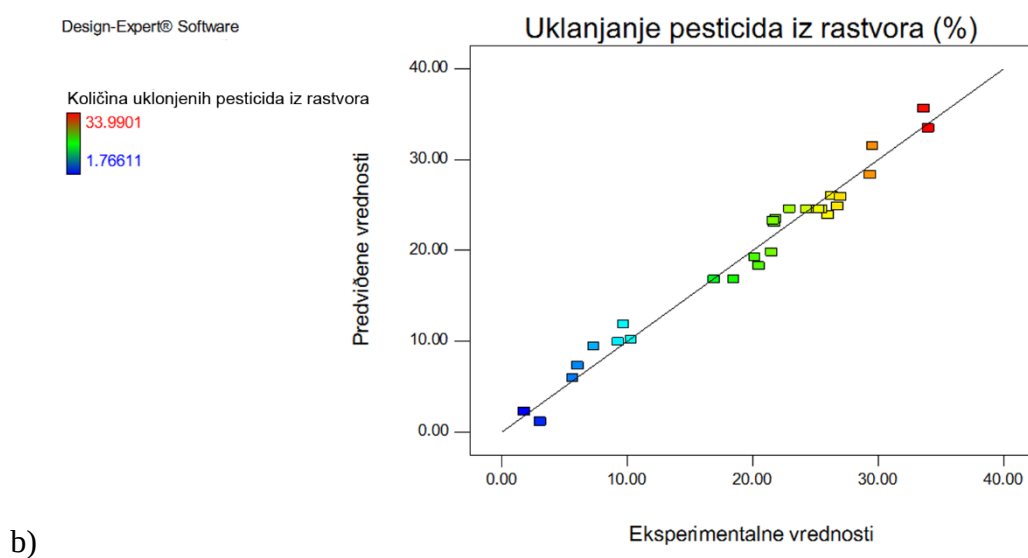
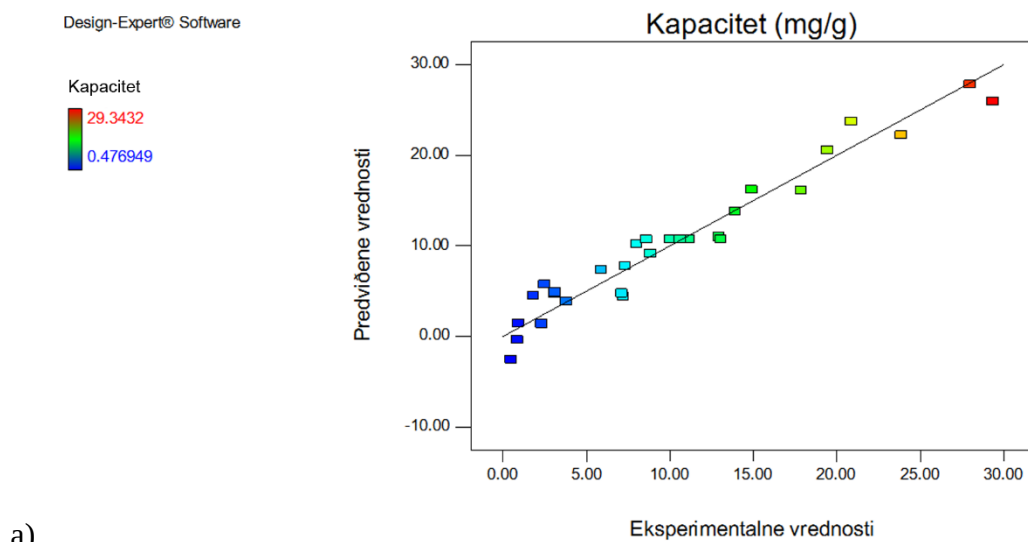
Odziv	R ²	P-vrednost modela	F-vrednost modela	Koeficijent varijacije (%)	p- vrednosti nedostatka fitovanja	Aдекватna preciznost
Y ₁	0.9465	< 0.0001	17.70	25.78	0.1313	15.94
Y ₂	0.9761	<0.0001	40.92	10.18	0.0691	23.92

Y₁: adsorpcioni kapacitet (mg/g);

Y₂: količina uklonjenog pesticida iz rastvora (%).

Vrednosti koeficijenta R² (koje su veoma bliske broju 1) ukazuju da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti rezultata. Vrednosti P < 0.0001 znače da je model u celini značajan, dok vrednost nedostatka fitovanja nije statistički značajna (p > 0.05). Na osnovu toga smatra se da se model može dobro opisati predviđenim jednačinama. Koeficijenti varijacije upućuju da je model pouzdan i reproduktivan i da se može upotrebiti u cilju predviđanja odziva.

Na **slici 10.27** su grafički prikazana slaganja eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u posmatranom eksperimentalnom dizajnu.



Slika 10.27. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu: adsorpcioni kapacitet (a), količina uklonjenog pesticida iz rastvora (b)

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih na odzive, na osnovu ANOVA statistike, data je u **tabeli 10.26**, a efekat odgovarajućih faktora prikazan je u daljem tekstu prilikom analize ponašanja svakog od odziva redom (odjeljak **10.6.5.3.-10.6.5.4.**).

Tabela 10.26. Analiza varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

Faktor	Prob > F*	
	Adsorpcioni kapacitet (mg/g)	Količina uklonjene boje iz rastvora (%)
A	< 0.0001	0.0004
B	< 0.0001	< 0.0001
C	0.0078	< 0.0001
D	< 0.0001	< 0.0001
AB	0.1701	< 0.0001
AC	0.0153	0.0258
AD	0.0007	0.0544
BC	0.9010	0.0051
BD	0.3324	0.0837
CD	0.4017	0.0231
A ²	0.1843	0.0013
B ²	0.5901	0.1500
C ²	0.3383	0.0128
D ²	0.0734	< 0.0001

A: masa adsorbenta (g/L);

B: koncentracija pesticida (mg/L);

C: vreme mešanja (min);

D: pH.

***Napomena:** Vrednosti „Prob > F“ manje od 0.0500 znače da je faktor statistički značajan.

Veza između nezavisnih promenljivih i proučavanih odziva bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Primenom višestruke regresione analize eksperimentalnih podataka, pronađeno je da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog

reda. Empirijske jednačine odnosa procesnih promenljivih i odziva prikazane su u daljem tekstu (**j-na: 10.11-10.12**):

$$Y_1 = 10.69 - 5.07 A + 8.10 B - 2.37 C + 5.04 D - 1.91 AB + 3.66 AC - 5.70 AD + 0.17 BC + 1.33 BD - 1.14 CD + 1.45 A^2 + 0.57 B^2 - 1.03 C^2 - 2.01 D^2 \quad (10.11)$$

$$Y_2 = 24.57 + 2.69 A + 5.98 B - 4.54 C + 9.21 D + 6.73 AB + 2.50 AC - 2.10 AD + 3.32 BC - 1.87 BD - 2.56 CD - 3.16 A^2 - 1.20 B^2 - 2.24 C^2 - 5.18 D^2 \quad (10.12)$$

pri čemu su Y_1 - Y_2 predviđeni odzivi, a A, B, C i D su procesne promenljive.

U **tabeli 10.27** su prikazani uslovi pod kojima je izvedena validacija eksperimentalnih rezultata, odabrani na osnovu dve tačke iz numeričke optimizacije, čije su vrednosti očitane direktno iz softverskog paketa. Mogu se uočiti bliske vrednosti predviđenih i validiranih rezultata. S tim u vezi, prethodno predloženi oblik dizajna može se smatrati pogodnim i koristiti za dalju optimizaciju uslova adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu.

Tabela 14. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

Procesne promenljive				Odzivi			
A	B	C	D	Y ₁		Y ₂	
				Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano
5.00	425.09	15.00	6.76	26.4177	26.2744	33.9894	33.8822
8.51	791.92	15.00	7.00	29.3431	28.9921	31.9602	31.9457

A: masa adsorbenta (g/L);
 B: koncentracija pesticida (mg/L);
 C: vreme mešanja (min);
 D: pH;
 Y₁: adsorpcioni kapacitet (mg/g);
 Y₂: količina uklonjenog pesticida iz rastvora (%).

Eksperimentalni dizajn adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu, uslovljene promenama procesnih parametara (mase adsorbenta, koncentracije pesticida, vremena mešanja i pH rastvora pesticida) i vrednosti odgovarajućih odziva prikazani su u **Prilogu 2 (tabela P-2.4)**. Uticaj procesnih promenljivih na izgled i promenu vrednosti odziva analiziran je u daljem tekstu.

10.6.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na adsorpcioni kapacitet

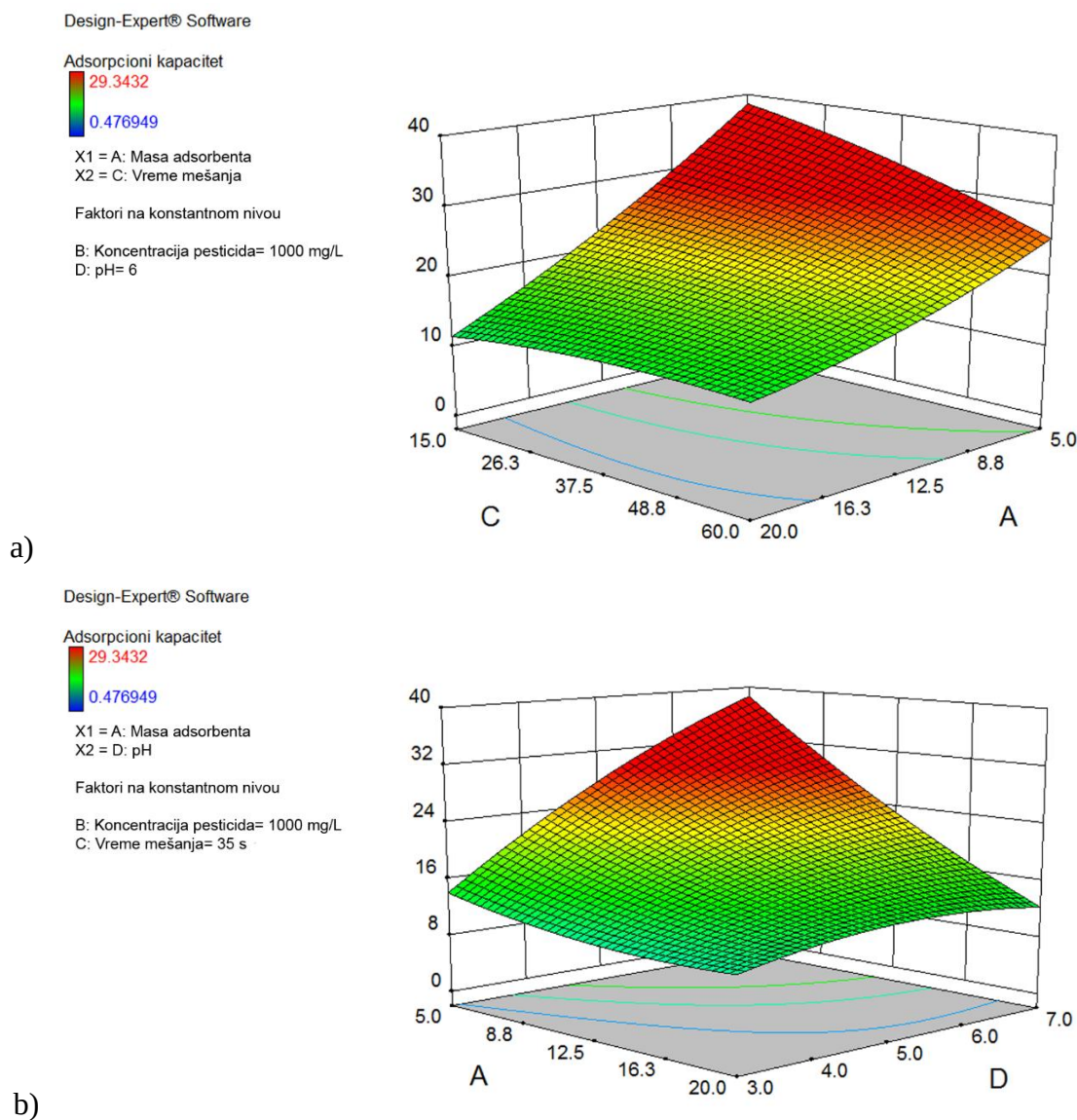
Pojedinačni efekti svih ispitivanih procesnih parametara i interaktivni efekti A/C, kao i A/D, statistički su značajno uticali na promene adsorpcionog kapaciteta pesticida parakvata na aktiviranu kafu (**tabela 10.26**). Na **slici 10.28 (a-b)** je i grafički predstavljeno ponašanje odziva u skladu sa promenama procesnih parametara.

Porast količine aktivirane kafe u sistemu uticao je na smanjenje adsorpcionog kapaciteta. Princip na kome se zasniva uticaj ovog parametra mogao bi se poistovetiti sa prethodno opisanim, u slučaju adsorpcije boje KV (odjeljak **10.5.5.3.**). Generalno, sa porastom mase adsorbenta, broj aktivnih mesta na površini takođe raste, međutim, istovremeno dolazi i do njihove redukcije [263,267]. Formiranjem gustog sloja nagomilanih čestica adsorbata dolazi do preklapanja aktivnih centara, čime se smanjuje broj molekula parakvata adsorbovanih po jedinici mase adsorbenta. Slično je bilo zabeleženo i od strane Tsai i sar. (2004) [188] prilikom ispitivanja adsorpcije parakvata na aktiviranu blanširanu zemlju. Sa druge strane, verovatnoća uspostavljanja kontakta između molekula pesticida i čestica aktivirane kafe bila je veća kada je koncentracija pesticida u rastvoru bila veća.

Interesantan rezultat zabeležen je prilikom analize parametra vremena mešanja. Pronađeno je da je za kraće vreme kontakta i uz simultano smanjenje mase adsorbenta povećan adsorpcioni kapacitet (**slika 10.28a**). Sa dužim vremenom mešanja, verovatno dolazi do desorpcije i migracije čestica adsorbata sa čvrste nazad u tečnu fazu, što utiče na smanjenje kapaciteta. U principu, kraće vreme trajanja procesa je poželjna karakteristika sistema sa ekonomske tačke gledišta, zato što se izvesne količine zagađivača mogu relativno brzo ukloniti iz efluenata.

Dalje, primećeno je da je porast pH rastvora ka neutralnim vrednostima uticao na povećanje adsorpcionog kapaciteta (**slika 10.28b**). Ovakvo ponašanje u sistemu bilo je u skladu sa teorijom da je adsorpcija katjonske vrste u vodenom rastvoru, kao što je parakvat, bila povoljnija u slučajevima kada je vrednost pH rastvora veća od izoelektrične tačke adsorbenta [195,268]. Sa porastom pH rastvora iznad pH_{pzc} ($pH > 5.6$) povećava se broj hidroksilnih grupa na površini adsorbenta i negativnog naelektrisanja, što olakšava adsorpciju elektropozitivnih jedinjenja. Na taj način biće omogućeno lakše povezivanje katjona parakvata sa negativno naelektrisanom površinom aktivirane kafe. U ovom slučaju, optimalni rezultati bili su postignuti

kada je pH rastvora bila oko vrednosti 7. Slično je pronađeno i u prethodnim studijama analize adsorpcije parakvata na različitim tipovima adsorbenata [188,190,195].



Slika 10.28. 3D grafik interaktivnih efekata mase adsorbenta i vremena mešanja (a) i mase adsorbenta i pH rastvora (b) na adsorpcioni kapacitet

Pod optimalnim procesnim uslovima maksimalni adsorpcioni kapacitet pesticida parakvata na aktiviranu kafu iznosio je 29.343 mg/g. Adsorpcioni kapacitet u procesu adsorpcije parakvata na piljevini bio je nekoliko puta niži nego u ovom slučaju (9.47 mg/g) [195]. Slično

tome i adsorpcija na adsorbentima baziranim na hidrogelovima bila je manje efikasna, jer je maksimalni adsorpcioni kapacitet iznosio 14.3 mg/g [269]. Hamadi i sar. (2004) [187] su primetili da sa porastom mase aktivnog uglja, poreklom od otpadnih guma, raste adsorpcioni kapacitet parakvata, sve do granice zasićenja. Međutim, i u tom istraživanju zabeležene su niže vrednosti adsorpcionih kapaciteta (7.28 mg/g). Čak je, u istoj studiji, pronađeno da je kapacitet adsorpcije parakvata na komercijalnom aktivnom uglju tipa F300 iznosio svega 7.64 mg/g. Tsai i sar. (2003, 2004, 2005) [188,190,255,266] takođe, pripadaju grupi istraživača koja se bavi ispitivanjem adsorpcije parakvata na više vrsta adsorbenata, pretežno iz grupe silikata. Pronađeno je da je adsorpcija na tretiranoj dijatomejskoj zemlji [266] bila manje efektivna u odnosu na aktiviranu kafu iz ovog rada, ali su zabeleženi i slični ili bolji rezultati, kada je kao adsorbent korišćena aktivirana blanširana zemlja [188] ili aktivirana glina [190].

10.6.5.4. Uticaj procesnih promenljivih na količinu uklanjanja pesticida

Pojedinačni i interaktivni efekti gotovo svih ispitivanih procesnih parametara, izuzev A/D , B/D i B^2 , su statistički značajno uticali na stepen uklanjanja pesticida parakvata iz vodenog rastvora (%) u sistemu sa aktiviranom kafom (**tabela 10.26**).

Sa **slike 10.29 (a-b)**, na kojoj je prikazan uticaj procesnih promenljivih na procenat uklanjanja pesticida parakvata iz vodenog rastvora, može se primetiti da parametri interaktivno deluju na odziv na sličan način kao u prethodno opisanom slučaju adsorpcije boje KV (**odjeljak 10.5.5.4.**). Takođe, uslovi koji su favorizovali porast adsorpcionog kapaciteta nisu bili optimalni i za postizanje maksimalnog stepena, odnosno, procenta uklanjanja pesticida iz rastvora.

Design-Expert® Software

Količina uklonjenih pesticida iz rastvora

33.9901

1.76611

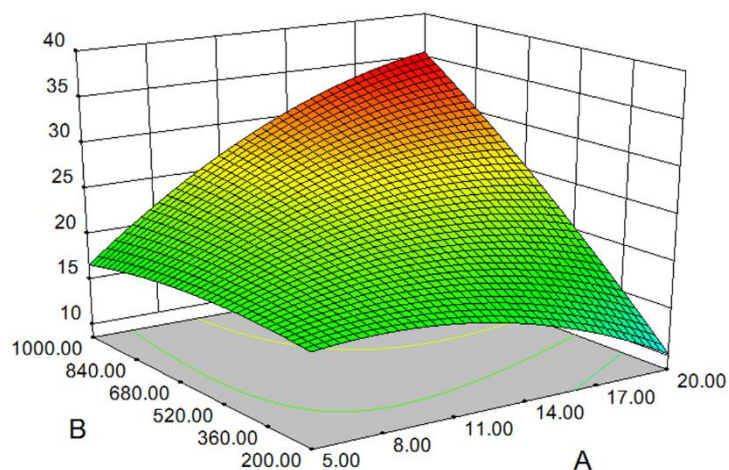
X1 = A: Masa adsorbenta

X2 = B: Koncentracija pesticida

Faktori na konstantnom nivou

C: Vreme mešanja = 37.5 s

D: pH = 5



a)

Design-Expert® Software

Količina uklonjenih pesticida iz rastvora

33.9901

1.76611

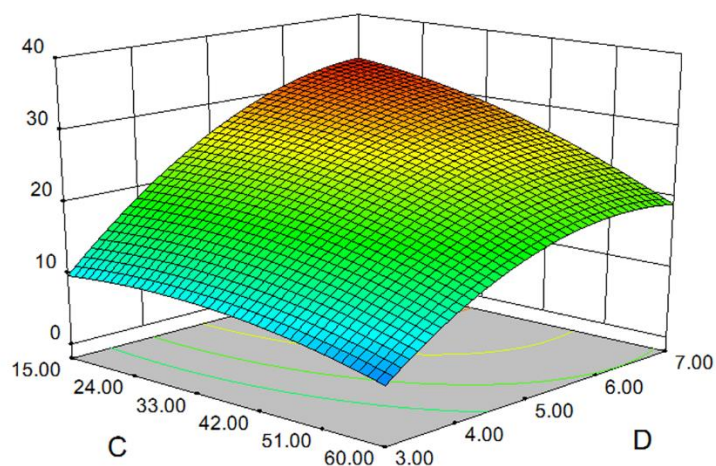
X1 = C: Vreme mešanja

X2 = D: pH

Faktori na konstantnom nivou

A: Masa adsorbenta = 12.5 g/L

B: Koncentracija pesticida = 600 mg/L



b)

Slika 10.29. 3D grafik interaktivnih efekata mase adsorbenta i koncentracije pesticida (a) i vremena mešanja i pH rastvora (b) na količinu uklanjanja pesticida (%) iz vodenog rastvora

Sa simultanim porastom količine adsorbenta i koncentracije adsorbata dolazi do povećanog uklanjanja pesticida iz rastvora, izraženog u procentima (**slika 10.29a**). Isti uticaj ispoljava se u uslovima povećanog pH rastvora, uz smanjeno vreme mešanja u sistemu (**slika 10.29b**).

Ipak, u poređenju sa rezultatima dobijenim u slučaju adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu, zabeležene su nešto niže vrednosti adsorpcionih kapaciteta (29.34 mg/g) i primetno manji stepen uklanjanja pesticida iz vodenih rastvora (33.99 %).

10.7. Adsorpcija polifenola epigalokatehin galata na aktiviranu kafu

Proces adsorpcije polifenola epigalokatehin galata (EGKG), na aktiviranu kafu posmatran je u zavisnosti od vremena trajanja reakcije, pod identičnim uslovima koji su važili za adsorpciju boje kristal violet i pesticida parakvata. Analizirane su površinske promene (FTIR tehnikom), definisana adsorpciona kinetika, mehanizam i ravnotežni uslovi, a zatim je izvedena i optimizacija postupka odigravanja procesa.

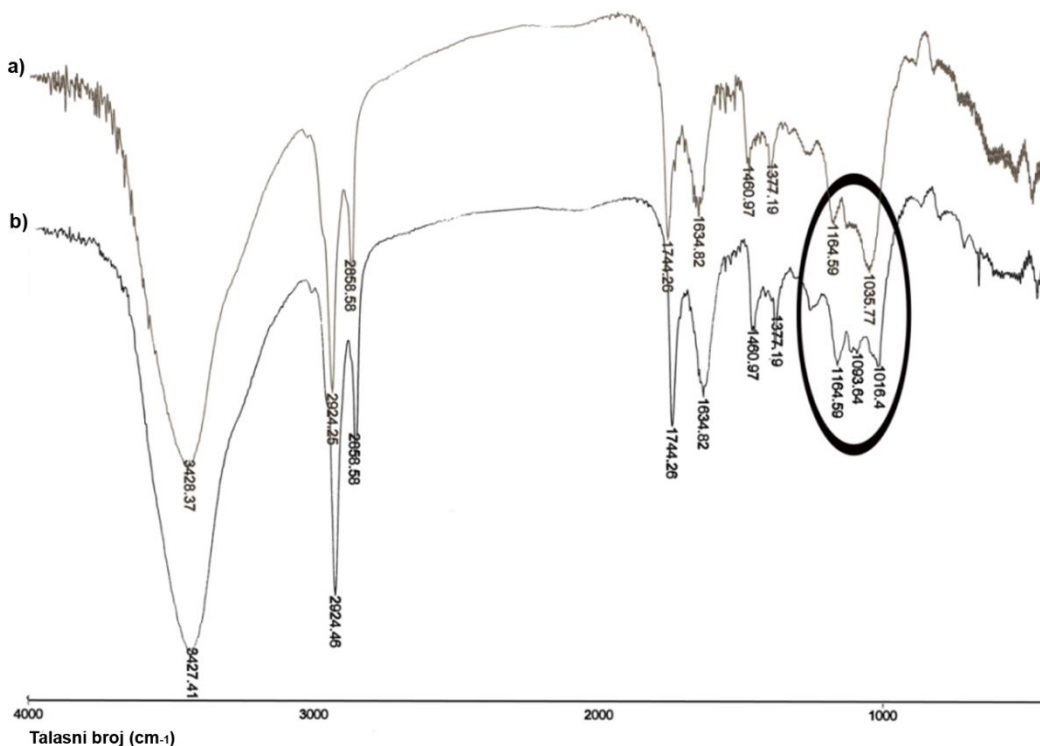
Imajući u vidu da je učinjen pokušaj adsorpcije bioaktivnih jedinjenja – polifenola, sa izrazitom antioksidativnom aktivnošću, u radu je dalje ispitivana mogućnost desorpcije vezanih komponenti polarnim rastvaračem (u ovom slučaju 20 %-nim etanolom), a zatim i test bioaktivnosti desorbovanih frakcija, u cilju određivanja u kojoj meri je navedena procedura uticala na opadanje antioksidativne moći. Na kraju, pristupilo se ispitivanju još jednog važnog adsorpcionog fenomena, svojstva selektivnosti ispitivanog nosača, poreklom od aktivirane kafe.

10.7.1. FTIR analiza

FTIR spektri površine aktivirane kafe pre i nakon adsorpcije polifenola EGKG prikazani su na **slici 10.30**.

FTIR spektar površine aktivirane kafe nakon adsorpcije EGKG nije se bitno razlikovao od spektra snimljenog pre odigravanja procesa. Većina pikova na spektrima pre i nakon adsorpcije je ostala na istim talasnim brojevima, uz promene intenziteta. Pored neznatnih razlika u regionu talasnih dužina od 3500-3900 cm^{-1} , gde je došlo do redukcije broja gustih i mnogobrojnih pikova, uočene su promene i u delu 1630-1470 cm^{-1} . Glavne zabeležene, ipak, bile su u blizini pika na 1035.77 cm^{-1} , koji se pomerio ka nižim talasnim brojevima, uz formiranje novog, malog, pika na 1093.64 cm^{-1} . Ova pojava može biti posledica C-H i C-O deformacionih vibracija [270]. Vidljive razlike mogu se uočiti i u regionu „otiska prsta“. U delu spektra nižih talasnih brojeva, traka oko 900 cm^{-1} može biti u vezi sa deformacionim C-O ili C-H van ravni [271]. U blizini 670 cm^{-1} je tipična O-H deformaciona vibracija van ravni [271]. Blizu 630 cm^{-1}

je, takođe, deformaciona C-H za različite substituentne benzenovih prstena [171]. Ostali pikovi na spektru definisani su prethodno ili se mogu naći u mnogim literaturnim navodima [28,171,180,272].



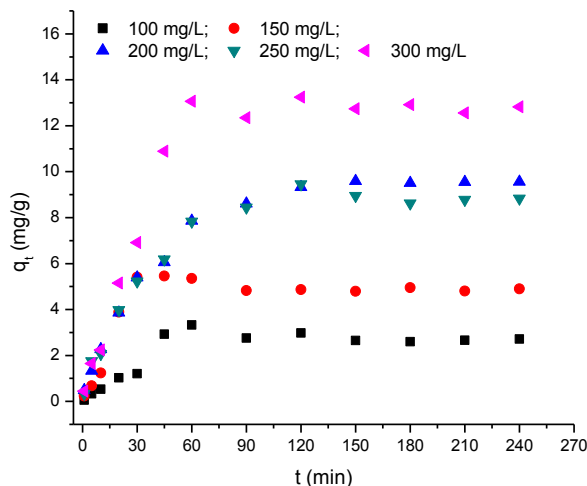
Slika 10.30. FTIR spektar površine aktivirane kafe pre (a) i posle (b) adsorpcije polifenola EGKG

Adsorpcija EGKG je, u određenoj meri, indukovala kvalitativne promene na površini aktivirane kafe. EGKG je polifenol koji u svojoj strukturi sadrži fenil-, hidroksilne i estrarske grupe, koje manje ili više doprinose povezivanjima sa aktivnim centrima posredstvom van der Valsovih, vodoničnih, hidrofobnih i/ili elektrostatičkih interakcija.

10.7.2. Tok reakcije i postizanje ravnoteže

Na **slici 10.31** je grafički prikazana promena adsorpcionog kapaciteta u zavisnosti od vremena i koncentracije polifenola EGKG u vodenom rastvoru. Bilo je evidentno uočiti dva stadijuma u toku kojih se posmatrani proces odigravao. U prvom se porast količine EGKG adsorbovanog po jedinici mase aktivirane kafe eksponencijalno povećavao, sve do granice zasićenja aktivne površine. Nakon toga, usledila je faza postepenog uspostavljanja

termodinamičke ravnoteže između čestica EGKG adsorbovanih na čvrstu fazu i rasutih u rastvoru.



Slika 10.31. Adsorpcioni kapacitet polifenola EGKG na aktiviranu kafu u zavisnosti od vremena

Kao što je i bilo očekivano, adsorpcioni kapacitet se povećavao sa porastom koncentracije polifenola u početnom rastvoru. Primećeno je, međutim, da je za niže koncentracije adsorbata, vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže bilo kraće u odnosu na koncentrovanije rastvore. Za koncentracije rastvora EGKG vrednosti 100-150 mg/L bilo je potrebno, približno, 90 minuta do uspostavljanja ravnotežnog stanja na površini aktivirane kafe, dok je za koncentracije od 200-300 mg/L trebalo, gotovo, 120 min. U poređenju sa brzinom toka adsorpcije boje kristal violet, a zatim i pesticida parakvata, može se primetiti da su se molekuli EGKG znatno sporije povezivali sa aktivnim centrima na površini aktivirane kafe.

10.7.3. Adsorpciona kinetika

Kinetika adsorpcije polifenola EGKG na aktiviranu kafu analizirana je u skladu sa modelima pseudo-prvog i pseudo-drugog reda, kao i Veber-Morisovog modela međučestične difuzije.

Odgovarajući kinetički parametri linearizovanih oblika modela pseudo-prvog i pseudo-drugog reda prikazani su u **tabeli 10.28**.

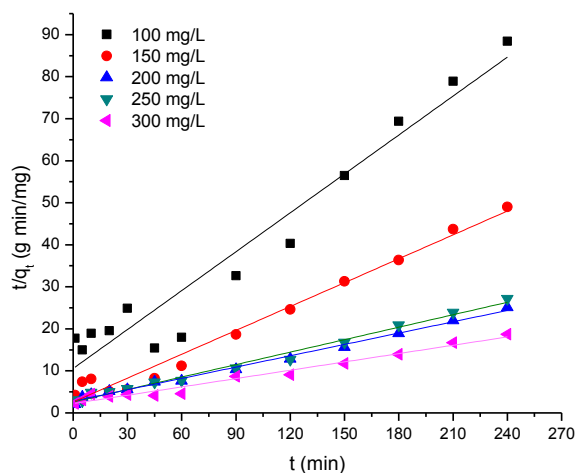
Tabela 10.28. Kinetički parametri adsorpcije EGKG na aktiviranu kafu

Konc. polifenola mg/L	$q_{e,exp}^*$ mg/g	Model pseudo-prvog reda			Model pseudo-drugog reda		
		$k_1 \cdot 10^3$ (1/min)	$q_{e,mod}^{**}$ (mg/g)	R^2	$k_2 \cdot 10^3$ (g/mg·min)	$q_{e,mod}$ (mg/g)	R^2
100	2.7560	5.64	1.2759	0.0159	9.01	3.2404	0.9414
150	4.8278	3.66	0.8235	0.0521	13.8	5.2826	0.9787
200	6.6080	27.4	8.7781	0.8318	2.87	11.127	0.9931
250	8.4435	14.1	4.6837	0.3173	3.77	10.113	0.9888
300	10.351	15.0	4.7391	0.2508	1.96	15.136	0.9734

* q_e , eksperimentalno;

** q_e , modelovano

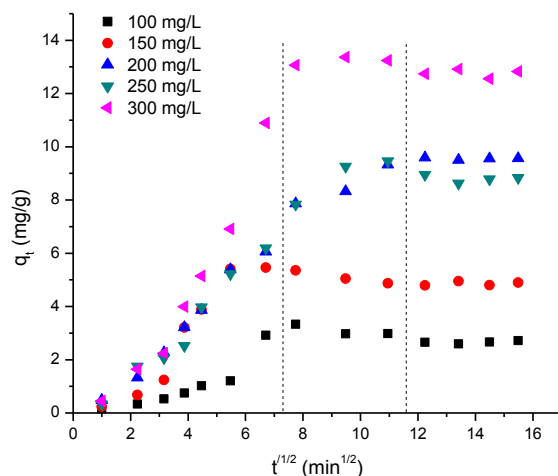
Kao i u slučaju kinetike boje KV i pesticida parakvata, adsorpcija polifenola EGKG na aktiviranu kafu bila je u skladu sa modelom pseudo-drugog reda, na celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija. Kriterijum merila zasnivao se na vrednostima R^2 (bliskim broju 1), kao i slaganju eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti adsorpcionih kapaciteta. Grafički prikaz slaganja eksperimentalnih rezultata sa modelom pseudo-drugog reda predstavljen je na slici 10.32.



Slika 10.32. Kinetika adsorpcije polifenola EGKG na aktiviranu kafu po modelu pseudo-drugog reda

U literaturi je, na sličan način, uobičajeno nađeno da se kinetika adsorpcije polifenola na adsorpcionim smolama odigravala u skladu sa principom pseudo-drugog reda [104].

Prilikom dalje analize mehanizma odigravanja procesa adsorpcije EGKG na aktiviranu kafu, ispitano je slaganje eksperimentalnih rezultata sa modelom međučestične difuzije. Grafik zavisnosti $t^{1/2} - q_t$ prikazan je na **slici 10.33**, a odgovarajuće mehaničke konstante u **tabeli 10.29**.



Slika 10.33. Grafik međučestične difuzije procesa adsorpcije polifenola EGKG na aktiviranu kafu

Adsorpciona dinamika polifenola EGKG na aktiviranu kafu bi se mogla opisati u tri konsektivna koraka. Na početku je dominirala spoljna adsorpcija, odnosno pasivno povezivanje čestica adsorbata sa aktivnim centrima na površini adsorbenta (nivo 1). Na drugom nivou usledila je difuzija molekula EGKG u teže dostupne mikropore na površini aktivirane kafe. Na kraju, došlo je do postepenog uspostavljanja termodinamičke ravnoteže u sistemu (nivo 3).

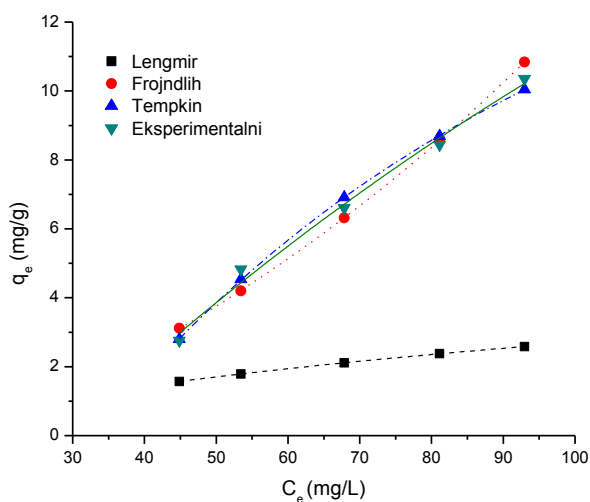
Negativne vrednosti odsečaka u prvom linearnom delu, ukazuju da se reakcija povezivanja molekula EGKG na aktivnu površinu odigravala, relativno, sporo. Kao ni u slučajevima adsorpcije boje KV (odjeljak 10.5.3.) ili pesticida parakvata (odjeljak 10.6.3.), krive u modelu međučestične difuzije ne prolaze kroz koordinatni početak, što znači da difuzija polifenola nije bila jedini korak koji kontroliše adsorpciju na aktiviranu kafu.

Tabela 10.29. Parametri međučestične difuzije procesa adsorpcije polifenola EGKG na aktiviranu kafu

Konc.	R_{id1}	C_1	$(R_1)^2$	R_{id2}	C_2	$(R_2)^2$	R_{id3}	C_3	$(R_3)^2$
mg/L	mg/g/ $\text{min}^{1/2}$	mg/g		mg /g/ $\text{min}^{1/2}$	mg/g		mg /g/ $\text{min}^{1/2}$	mg/g	
100	0.4426	-0.7300	0.7854	-0.1130	4.1563	0.5732	0.0216	2.3565	0.0633
150	1.0846	-1.3055	0.9054	-0.1512	6.5112	0.9768	0.0169	4.6246	-0.3553
200	1.0504	-0.8113	0.9811	0.4498	4.2804	0.8672	-0.0043	9.6151	-0.4590
250	1.0532	-0.9012	0.9613	0.5180	3.9823	0.7536	-0.0218	9.1031	-0.4235
300	1.7989	-2.4534	0.9290	0.0601	12.658	-0.1942	-0.0101	12.900	-0.4875

10.7.4. Adsorpcione izoterme

Na **slici 10.34** je grafički prikazano slaganje eksperimentalnih rezultata adsorpcije EGKG na aktiviranu kafu sa Lengmirovim, Frojndlihovim i Tempkinovim modelom adsorpcionih izotermi, a odgovarajuće ravnotežne konstante predstavljene su u **tabeli 10.30**.



Slika 10.34. Adsorpcione izoterme procesa adsorpcije polifenola EGKG na aktiviranu kafu na 27°C

Na osnovu korelacionih koeficijenata, R^2 , primećuje se odstupanje Lengmirove izoterme kao modela kojim bi se mogao aproksimirati aktuelni sistem, a to se i vizuelno može uočiti sa grafika. U ovom slučaju, adsorpcije EGKG na aktiviranu kafu, smatra se da se Tempkinovim modelom može relevantno opisati ravnotežno stanje sistema. S tim u vezi, smatra se da je na aktivnoj površini dominirala uniformna raspodela energije vezivnih mesta [104]. Takođe, sa porastom debljine sloja adsorbovanih molekula EGKG na površini aktivirane kafe dolazi do linearnog opadanja i smanjenja energije adsorpcije, usled indirektnih adsorbat/adsorbat interakcija [104]. Vrednost konstante b_T ukazuje da je, sa energetskog stanovišta, odigravanje procesa bilo, relativno, olakšano.

Tabela 10.30. Vrednosti konstanti adsorpcionih izotermi procesa adsorpcije polifenola EGKG na aktiviranu kafu na 27 °C

Lengmir				Frojdlih			Tempkin		
R_L^2	q_m	K_a	R_L	R_F^2	n	K_f	R_T^2	b_T	A
	mg/g	L/mg				(mg/g)(L/g) ⁿ		J/mol	L/mg
0.8928	6.4893	0.0071	0.29-0.55	0.9520	0.5842	0.0046	0.9875	250.7	0.030

Literaturni podaci o ravnotežnom stanju drugih sistema u kojima se odigravala adsorpcija polifenola na nešto drugačijim tipovima adsorbenata bili su raznoliki [273,274].

10.7.5. Optimizacija postupka adsorpcije polifenola epigalokatehin galata na aktiviranu kafu

U literaturi se može naći veliki broj navoda u kojima se efikasno izolovanje i koncentrisanje bioaktivnih jedinjenja iz kompleksnih bijnih matrica, u procesu adsorpcije, sprovodi u sistemu sa kontinualnim propuštanjem rastvora adsorbata kroz fiksirani sloj nosača [133]. S tim u vezi, optimizacija procesa adsorpcije polifenola epigalokatehin galata na aktiviranu kafu izvedena je u režimu kontinualnog tipa na koloni sa nepokretnom čvrstom fazom.

Pre početka procesa, aktivirana kafa bila je dodatno modifikovana. Naime, na kafi su, prilikom prethodne analize adsorpcije EGKG u rezidualnim frakcijama detektovane zaostale (neekstrahovane) količine polifenola iz kafe. Iako su merene količine bile neznatne, u cilju potpunog neutralisanja zaostalih polifenola, aktivirana kafa je dalje tretirana oksidacionim

sredstvom. U te svrhe je iskorišćen 15 % vodeni rastvor vodonik-peroksida. Izbor i način upotrebe ovog reagensa definisan je na osnovu prethodnih, preliminarnih eksperimenata. Adekvatno tretirana aktivirana kafa – oksidovana kafa (u skladu sa postupkom opisanom u odeljku 2.1.3.) korišćena je kao nosač za kontinualnu adsorpciju EGKG.

Optimizacija postupka adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu izvedena je primenom metodologije odzivne površine. Ispitivani su uticaji parametara, koji su u skladu sa literaturnim podacima karakteristični za sisteme procesa adsorpcije u kontinualnom režimu. Način njihovog delovanja na ponašanje odziva utvrđen je postavljanjem i analizom odgovarajućeg modela.

10.7.5.1. Eksperimentalni dizajn

Za postavljanje modela optimizacije postupka adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu odabran je Boks-Benken (*Box-Behnken*) dizajn. Ispitivani ulazni procesni parametri bili su: visina stuba nosača – oksidovane kafe (cm), zapremina rastvora adsorbata - EGKG (L) i koncentracija rastvora EGKG (mg/L). Način njihovog delovanja posmatran je u zavisnosti od promene relevantnog parametra, u ovom slučaju, količine adsorbovanih polifenola EGKG na nosaču (%). Vrednosti nivoa procesnih promenljivih (**tabela 10.31**) odabrane su na osnovu preliminarnih ispitivanja. Variranjem procesnih parametara na različitim nivoima simultano, opisani su njihovi interaktivni efekti, kao i ukupan efekat na proces.

Tabela 10.31. Vrednosti ispitivanih nivoa procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu

Procesna promenljiva	Jedinica mere	Oznaka	Granične vrednosti		
			-1	0	1
Visina stuba nosača	cm	A	3.0	6.0	9.0
Zapremina rastvora EGKG	L	B	0.1	0.2	0.3
Koncentracija rastvora EGKG	mg/L	C	100	200	300

10.7.5.2. Ocena značajnosti modela

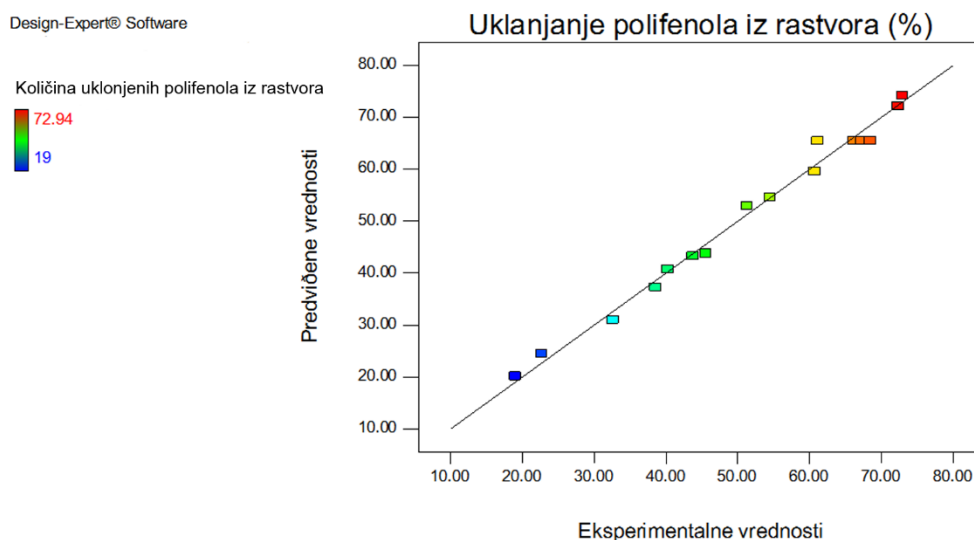
U oceni značajnosti modela adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu najpre se pristupilo analizi varijanse (ANOVA) eksperimentalnih rezultata, prikazanih u **tabeli 10.32**.

Tabela 10.32. Analiza varijanse (ANOVA) odziva u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu

Odziv	R ²	P-vrednost modela	F-vrednost modela	Koeficijent varijacije (%)	p- vrednosti nedostatka fitovanja	Adekvatna preciznost
Y	0.9839	< 0.0001	54.32	5.93	0.7049	23.28
Y: količina adsorbovanih polifenola EGKG na nosaču (%).						

Vrednost koeficijenta R² bila je bliska broju 1, što je ukazivalo da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti rezultata. Vrednost P < 0.0001 znači da je model u celini značajan, dok vrednost nedostatka fitovanja nije bila statistički značajna (p > 0.05); dakle, predloženi model se može dobro opisati predviđenom jednačinom. Koeficijent varijacije upućuje da je model pouzdan i reproduktivan i da se može upotrebiti u cilju predviđanja odziva.

Na **slici 10.35** je grafički prikazano slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u posmatranom eksperimentalnom dizajnu.



Slika 10.35. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva - količine adsorbovanih polifenola EGKG na nosaču (%) u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu

Ocena značajnosti uticaja procesnih promenljivih na odziv, na osnovu ANOVA statistike, data je u **tabeli 10.33**, a efekat odgovarajućih faktora prikazan je u daljem tekstu prilikom analize ponašanja odziva (odeljak **10.7.5.3.**).

Veza između nezavisnih promenljivih i proučavanog odziva bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Primenom višestruke regresione analize eksperimentalnih podataka, pronađeno je da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog reda. Empirijska jednačina odnosa procesnih promenljivih i odziva prikazana je u obliku sledeće zavisnosti (**j-na: 10.13**):

$$Y = 65.44 + 14.71 A - 5.02 B + 3.76 C - 2.88 AB + 6.90 AC - 10.71 BC - 16.17 A^2 - 12.30 B^2 - 0.43 C^2 \quad (10.13)$$

pri čemu je Y predviđeni odziv, a A, B i C su procesne promenljive.

Tabela 10.33. Analiza varijanse (ANOVA) procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu

Faktor	Prob > F*
Količina adsorbovanih polifenola EGCG na nosaču (%)	
A	< 0.0001
B	0.0019
C	0.0092
AB	0.1016
AC	0.0022
BC	0.0001
A ²	< 0.0001
B ²	< 0.0001
C ²	0.7793

A: visina stuba nosača (cm);

B: zapremina rastvora EGCG (L);

C: koncentracija rastvora EGCG (mg/L).

***Napomena:** Vrednosti „Prob > F“ manje od 0.0500 znače da je faktor statistički značajan.

Validacija eksperimentalnih rezultata izvedena je za dve tačke odabrane iz numeričke optimizacije, čije su vrednosti očitane direktno iz softverskog paketa. Mogu se uočiti bliske vrednosti predviđenih i validiranih rezultata (**tabela 10.34**). S tim u vezi, prethodno predloženi oblik dizajna može se smatrati pogodnim i koristiti za dalju optimizaciju uslova adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu.

Tabela 10.34. Rezultati validacije eksperimentalnog dizajna adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu

Procesne promenljive			Odziv	
A	B	C	Y	
			Predviđeno	Validirano
8.86	0.18	269.9	73.896	72.915 ± 2.017
6.20	0.14	298.8	75.034	74.660 ± 1.991

A: visina stuba nosača (cm);
 B: zapremina rastvora EGKG (L);
 C: koncentracija rastvora EGKG (mg/L);
 Y: količina adsorbovanih polifenola EGKG na nosaču (%).

Eksperimentalni dizajn kontinualne adsorpcije polifenola EGKG na oksidovanu kafu, uslovljen promenama procesnih parametara (visine stuba nosača, zapremine rastvora adsorbata - EGKG i koncentracije rastvora EGKG), i vrednosti odziva - količine adsorbovanih polifenola EGKG na nosaču (%), prikazani su u **Prilogu 2 (tabela P-2.5)**. Uticaj procesnih promenljivih na izgled i promenu vrednosti odziva analiziran je u daljem tekstu.

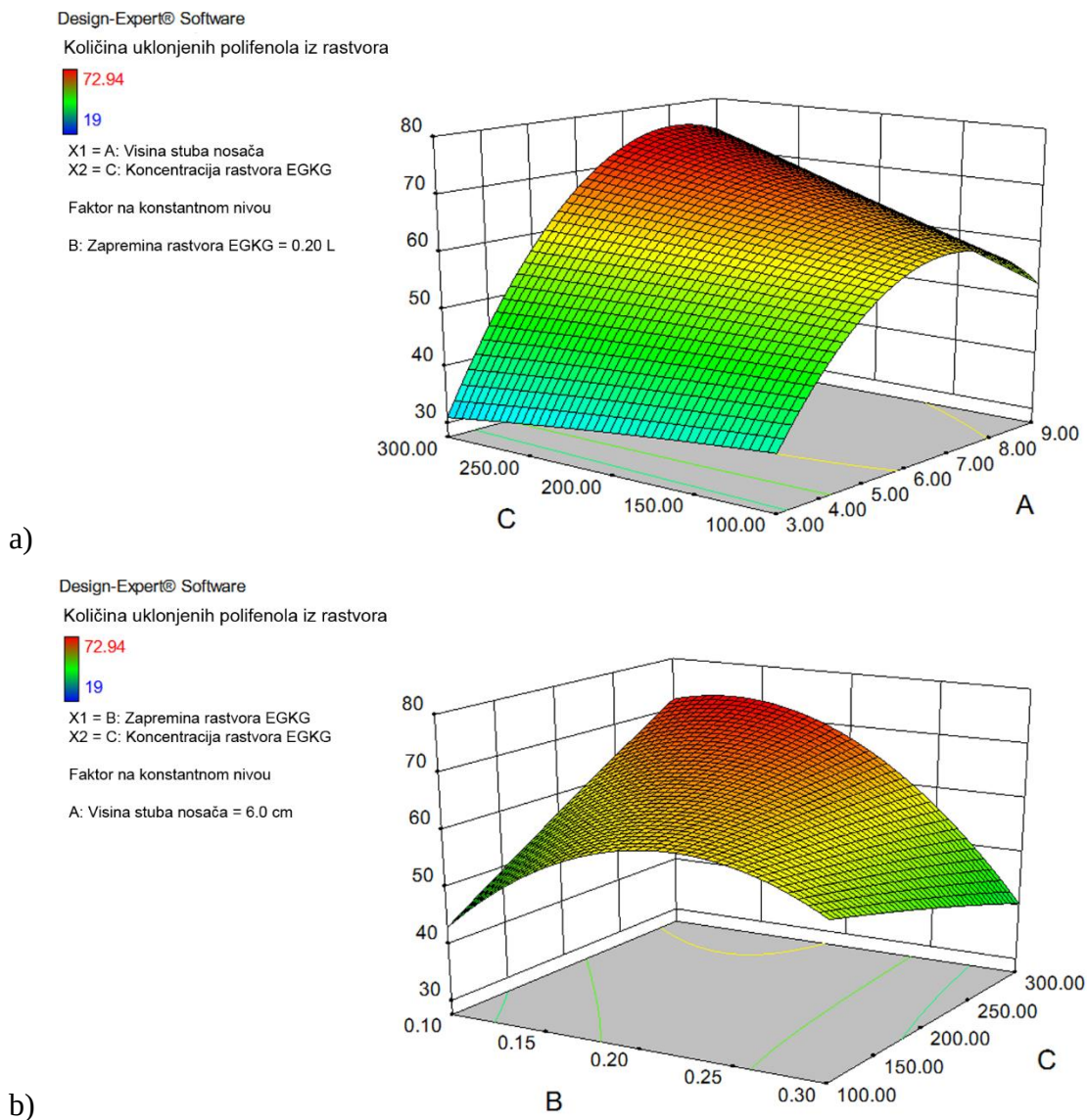
10.7.5.3. Uticaj procesnih promenljivih na uklanjanje polifenola iz rastvora

Pojedinačni i interaktivni efekti gotovo svih ispitivanih procesnih parametara, izuzev A/B i C², su statistički značajno uticali na stepen uklanjanja polifenola EGKG iz vodenog rastvora u kontinualnom sistemu na nosaču od oksidovane kafe (**tabela 10.33**).

U daljoj analizi, umesto izraza - uklanjanje polifenola iz vodenog rastvora, koristiće se termin izolacija, koji se, u skladu sa bioaktivnom prirodom adsorbata, smatra prikladnijim. S tim

u vezi, u nastavku eksperimenta vršena je desorpcija adsorbovanih polifenola i njihovo koncentrisanje u, relativno, malim zapreminama rastvarača.

Interaktivni uticaji statistički značajnih procesnih parametara na izolaciju polifenola EGKG iz vodenih rastvora su grafički prikazani na **slici 10.36 (a-b)**.



Slika 10.36. 3D grafik interaktivnih efekata visine stuba nosača i koncentracije polifenola EGKG (a) i zapremine i koncentracije rastvora EGKG (b) na količinu uklanjanja polifenola (%) iz vodenog rastvora

Porast visine stuba nosača, do određene granice, od približno 7.5 cm, utiče na povećanu adsorpciju polifenola (%), dok sa daljim porastom dolazi do smanjene efikasnosti u sistemu. Izmerena granica predstavlja meru zasićenja površine oksidovane kafe česticama EGKG. U koncentrovanijim sistemima, takođe, povećava se stepen adsorpcije (**slika 10.36a**). Isti rezultati postižu se i u uslovima u kojima se manje zapremine adsorbata kontinualno propuštaju kroz gusto napakovani sloj nosača (**slika 10.36b**).

Važno je napomenuti da je u preliminarnim ispitivanjima adsorpcije EGKG na oksidovanu kafu, analiziran uticaj pH na efiksnost sistema, kako bi u predstojećoj optimizaciji postupka bio smanjen broj procesnih parametara u eksperimentalnom dizajnu. pH vrednosti rastvora EGKG pre izvođenja procesa bili su podešeni redom na 3, 6 i 9, korišćenjem NaOH ili HCl rastvora. Zabeleženo je da su krajnje izmerene vrednosti pH, nakon završene adsorpcije, bile bliske neutralnim. Takođe, pokazano je da variranje vrednosti pH nije značajno uticalo na efektivnost adsorpcije i stepen izolovanja EGKG iz rastvora. Ovakav rezultat bio je posebno povoljan, s obzirom da pruža mogućnost adsorbovanja polifenola na oksidovanu kafu u prirodnim uslovima bilo kojih vrednosti pH.

Slična zapažanja, u istraživanjima gde kiseli i bazni rastvori nakon adsorpcije određene vrste adsorbata teže ka neutralnim vrednostima, zabeležena su od strane Altiok (2011) [275]. Taj fenomen se može objasniti disocijacijom površinskih grupa na adsorbentu u kiseloj sredini i tendencijom privlačenja protona iz rastvora. Povećana disocijacija slabo kiselih funkcionalnih grupa na površini adsorbenta može uticati na povećanu intramolekularnu repulziju između disociranih grupa u matrici. To bi dalje uslovalo tzv. „otvaranje“ strukture adsorbenta i povećalo broj vezivnih aktivnih mesta [276]. Kao rezultat ove reakcije, pH rastvora raste do neutralnih vrednosti. U baznoj sredini, sa druge strane, površina adsorbenta utiče na smanjenje pH rastvora usled deprotonizacije [275].

Nemodifikovana, prirodna, pH vrednost rastvora EGKG iznosila je 6.5, tako da pre početka eksperimenta nije bilo daljih promena ove vrednosti. Sa druge strane, izmerena vrednost pH_{pzc} oksidovane kafe bila je 5.13. Uglavnom, u ovim uslovima, gde je pH rastvora $> pH_{pzc}$, smatra se da je površina adsorbenta pretežno negativno naelektrisana. U baznim sredinama može doći do slabljenja vodoničnih veza, usled disocijacija fenolnih hidroksilnih grupa u molekulu EGKG. Usled heterogene prirode površine adsorbenta očigledno je da će se na površini

adsorbenta naći i pozitivne i negativne grupe, i s tim u vezi, adsorpcija EGKG može biti delom posledica elektrostatičkih interakcija sa ovim grupama [125].

Literaturni izveštaji o uticaju pH na adsorpciju polifenola bili su različiti. U nekim je zabeleženo da pH može značajno uticati na promene u sistemu [106,125,275,276], dok su drugi pronašli da se uticaj ovog faktora na stepen adsorbovanja polifenola može zanemariti [105,277].

Pod optimalnim uslovima, pronađeno je da je maksimalna vrednost adsorbovanih polifenola iznosila 73 %, dok je maksimalna vrednost adsorpcionog kapaciteta bila 10.52 mg/g.

Usled usko ograničenog broja izveštaja iz literature, zabeležene rezultate je bilo teško porediti sa dobijenim u ovom istraživanju. U literaturi je, uglavnom, analizirana adsorpcija polifenola poreklom iz drugačijih prirodnih izvora, ili su se materijali, korišćeni u svojstvu nosača, razlikovali od oksidovane kafe. U principu, najčešće ispitivane bile su adsorpcione smole. Datta i sar. (2011) [278] su ispitivali adsorpciju polifenola iz đumbira na jonoizmenjivačkoj smoli vrste Amberlit IR-400. Pri tom, postignut je stepen adsorpcije od 66.49 %, pri pH 6.5. Ferri i sar. (2011) [279] su ispitivali pet vrsta adsorpcionih smola, različitih fizičko-hemijskih karakteristika, za adsorpciju polifenola poreklom iz otpadnih voda iz industrije prerade maslina. Najbolji rezultat od 89 ± 2.6 % postigli su korišćenjem nosača sa oznakom IRA96. Sa druge strane na smoli ENV+ bilo je 64.6 ± 2.5 % adsorbovanih polifenola, a najniže vrednosti postignute su korišćenjem smola vrste XAD, u opsegu 45.4 – 49.8 % [279]. Može se primetiti da, iako su smole materijali precizno definisanih površinskih svojstava, u poređenom istraživanju, jedino jedna od pet ispitivanih smola je pokazala bolje rezultate u odnosu na oksidovanu kafu.

10.7.6. Desorpcija polifenola sa nosača i ispitivanje promene bioaktivnosti

Desorpcija adsorbovanih čestica je važna u smislu ponovnog izolovanja i koncentrovanja jedinjenja u određenim zapreminama rastvarača, posebno, ukoliko su ona tehnofunkcionalna i biološki vredna.

Desorpcija EGKG sa oksidovane kafe je bila izvedena u sistemima u kojima je prethodno EGKG bio adsorbovan, u uslovima definisanim u **tabeli 10.34**, koji su bili odabrani i prilikom validacije rezultata.

Za desorpciju polifenola iskorišćen je 20 % vodeni rastvor etanola. Efektivnost smeša vodenih rastvora etanola prethodno je bila evidentirana prilikom desorpcije polifenola iz zelenog čaja sa makroporoznih smola [280], a tako i više vrsta polifenola iz voća i povrća [86].

Najpre je kroz kolonu propuštena manja zapremina rastvarača (25 mL). Frakcija je sakupljena na dnu kolone, a odmah nakon toga propuštena je još jedna doza iste zapremine rastvarača, pri čemu je sakupljena i druga frakcija. U **tabeli 10.35** prikazani su rezultati količine desorbovanih polifenola u dvema frakcijama propuštenih zapremina rastvarača.

Tabela 10.35. Desorpcija polifenola EGKG sa oksidovane kafe

Proba	Desorbovana količina EGKG (%)	
	25 mL rastvarača	50 mL rastvarača
1	50.02	47.05
2	83.09	79.37

Uočava se da je desorpcija polifenola sa oksidovane kafe izvodljiva korišćenjem 20 % etanola, uz, relativno, visok prinos desorbovanih jedinjenja i u, relativno, maloj zapremini rastvarača.

Da bi se utvrdila efikasnost navedenog procesa adsorpcije i desorpcije bioaktivnih polifenola, EGKG, sa oksidovane kafe, važno je bilo ispitati nivo gubitka antioksidativne aktivnosti u navedenim frakcijama, u odnosu na početne rastvore. Antioksidativna aktivnost je merena ispitivanjem inhibicije DPPH radikala, u dvema frakcijama desorbovanih polifenola, određenih koncentracija, koje su bile upoređene sa aktivnostima u odgovarajućim početnim rastvorima polifenola. Rezultati merenja prikazani su u **tabeli 10.36**.

Tabela 10.36. Komparativni prikaz inhibicije DPPH radikala početnog rastvora EGKG i frakcije sa desorbovanim EGKG

Koncentracija (mg/L)	Inhibicija DPPH radikala (%)	
	Početni EGKG	Desorbovani EGKG
65	27.10	22.83
100	42.50	35.70

Može se primetiti da je nakon procesa adsorpcije i desorpcije polifenola sa oksidovane kafe došlo do neznatnog smanjenja antioksidativne aktivnosti, odnosno, zadržano je oko 84 % početne aktivnosti. Rezultat se smatra veoma zadovoljavajućim, imajući u vidu, relativno, slabu stabilnost molekula EGKG.

10.7.7. Ispitivanje svojstva selektivnosti

Tokom analize adsorpcije bioaktivnih jedinjenja na adsorbentu poreklom od otpadne kafe, pristupilo se ispitivanju još jednog fenomena, adsorpcione selektivnosti. Svojstvo selektivnosti nosača posebno je važno u industrijskim primenama, naročito u farmaceutskoj, za potrebe izolovanja ciljanih bioaktivnih jedinjenja iz smeša. S tim u vezi, ispitivana je mogućnost adsorpcije galne kiseline na oksidovanu kafu. Galna kiselina (GK) pripada drugoj grupi polifenola (različitoj od EGKG), grupi trihidroksibenzoevih kiselina, takođe prisutnim u zelenom čaju.

Za potrebe eksperimenta, odabrane su dve tačke kojima su definisani procesni uslovi (**tabela 10.34**). Dakle, adsorpcija GK izvedena je na identičan način kao i u slučaju EGKG. Rezultati merenja, odnosno rezidualnih koncentracija GK nakon adsorpcije na oksidovanu kafu, prikazani su u **tabeli 10.37**.

Tabela 10.37. Adsorpcija galne kiseline na oksidovanu kafu

Proba	Početna koncentracija GK* (mg/L)	Rezidualna koncentracija GK (mg/L)
1	300	294
2	300	286

*galna kiselina

Primećeno je da se na oksidovanoj kafi adsorbovalo, svega, oko 2 % GK (proba 1), odnosno, oko 4.5 % (proba 2). Rezultati upućuju da ispitivani nosač – oksidovana kafa poseduje svojstvo selektivnosti, odnosno, mogućnost da pojedine bioaktivne komponente vezuje efikasnije u odnosu na druge. Razlog ovakvog ponašanja može biti usled strukturnih razlika između dve ispitivane grupe polifenola (GK i EGKG), a osnovna je [(2R,3R)-5,7-dihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-hroman-3-il]- grupa koju sadrži molekul EGKG. Pretpostavlja se da je, upravo,

prisustvo ove grupe imalo presudnu ulogu u adsorpciji većih količina EGKG. Uz to, povećan je broj hidroksilnih grupa, koje se vodoničnim vezama mogu potencijalno povezivati sa aktivnom površinom oksidovane kafe. U literaturi je pronađeno da su i Gao i sar. (2012) [112] nedavno izveštavali o značaju selektivne adsorpcije različitih grupa polifenola na β -glukanu poreklom iz ovasa. EGKG je, i u tom istraživanju, bio adsorbovan sa najvećim udelom, što su istraživači objasnili prisustvom galoil- grupe.

11. ZAKLJUČAK

Predmet ove disertacije je valorizacija otpadne kafe zaostale nakon pripreme napitaka. U prvom delu rada ispitan je sastav otpadne kafe i optimizovan proces proizvodnje ekstrakta otpadne kafe sa definisanim sadržajem i antioksidativnim svojstvima. U drugom delu, određene su karakteristike aktiviranog taloga od kafe, zaostalog nakon ekstrakcije polifenola, kao adsorbenta i razmatran je predlog njegove primene za potrebe adsorpcije boje, i/ili pesticida i/ili polifenola iz kontaminiranih otpadnih voda.

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Hemijski sastav otpadne kafe bio je u skladu sa teorijskim vrednostima.
- Mikrotalasnom ekstrakcijom antioksidanasa iz otpadne kafe postignut je viši prinos ekstrakata, za kraće vreme i upotrebu manje količine rastvarača, u odnosu na metodu klasične ekstrakcije.
- U ekstraktu iz klasične ekstrakcije izolovana je količina polifenola u vrednosti 279.8 mg GAE/g s.m. ekstrakta, dok je u onom iz mikrotalasne ekstrakcije bilo 288.1 mg GAE/g s.m. ekstrakta.
- Sadržaj hlorogenske kiseline bio je veći u ekstraktu iz mikrotalasne ekstrakcije (10.43 mg/g s.m. ekstrakta), u odnosu na ekstrakt iz klasične (8.12 mg/g s.m. ekstrakta).
- Ekstrakt otpadne kafe dobijen metodom klasične ekstrakcije ispoljio je maksimum inhibicije DPPH radikala (~ 90 %) pri koncentraciji 30 µg s.m. ekstrakta/mL, dok je vrednost maksimuma inhibicije DPPH radikala koji je manifestovao ekstrakt otpadne kafe dobijen metodom mikrotalasne ekstrakcije bila nešto manja (~ 87 %), ali je postignuta pri nižoj koncentraciji, 10 µg s.m. ekstrakta/mL.
- Za inhibiciju 50 % DPPH radikala potrebna koncentracija ekstrakta otpadne kafe (IC₅₀) dobijenog metodom klasične ekstrakcije iznosila je 5.92 µg/mL, a ekstrakta dobijenog metodom mikrotalasne ekstrakcije 4.98 µg/mL.
- Ekstrakt otpadne kafe dobijen metodom mikrotalasne ekstrakcije bio je snažnije redukciono sredstvo u poređenju sa ekstraktom iz klasične ekstrakcije, izraženo FRAP vrednostima.

- Optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne kafe bili su: snaga mikrotalasne peći 80 W, koncentracija rastvarača 20 % etanol, odnos čvrsta faza/rastvarač 1:9, vreme trajanja ekstrakcije 40 s.
- Pod optimizovanim uslovima, metodom mikrotalasne ekstrakcije polifenola, izolovano je 398.95 mg GAE/g s.m.
- Vrednost inhibicije DPPH radikala u ekstraktu otpadne kafe, dobijenom pod optimizovanim uslovima, bila je 90.69 %.
- Koncentracija ekstrakta otpadne kafe, dobijenog pod optimizovanim uslovima, neophodna za inhibiciju 50% DPPH (IC_{50}) iznosila je 3.75 μ g s.m./mL.
- FRAP vrednost ekstrakta otpadne kafe, dobijenog pod optimizovanim uslovima, bila je 3.02 mmol/L.
- FTIR analizom aktivirane kafe dokazano je prisustvo funkcionalnih grupa koje su tipične za aktivne ugljeve. Poređenjem spektara snimljenih pre i posle adsorpcije boje kristal violet, pesticida parakvata i polifenola EGKG, primećeno je da se većina pikova, koji potiču od istih funkcionalnih grupa u poređenim spektrima, javljaju na sličnim talasnim brojevima, uz manja ili veća pomeranja ili promene intenziteta. Adsorpcija sve tri vrste čestica adsorbata pretežno se odvijala posredstvom van der Valsovih, vodoničnih, hidrofobnih i/ili elektrostatičkih interakcija.
- Na osnovu SEM mikrografa uočena je tipična porozna tekstura površine aktivirane kafe, koja je jedna od osnovnih odlika aktivnih ugljeva.
- Vrednost tačke pH_{pzc} aktivirane kafe iznosila je 5.6. S tim u vezi, u kiseloj sredini površina aktivirane kafe bila je pozitivno naelektrisana, i obrnuto, za neutralne vrednosti pH suspenzija i u baznoj sredini površina aktivirane kafe bila je elektronegativna.
- Uspostavljanje ravnotežnog stanja prilikom adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu odigralo se u toku prvih 5 minuta trajanja reakcije, a prilikom adsorpcije pesticida parakvata trebalo je 30 minuta, na celom opsegu ispitivanih koncentracija rastvora adsorbata. Proces adsorpcije polifenola EGKG odigravao se sporije, i to za niže koncentracije rastvora (100-150 mg/L) vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže u sistemu bilo je 90 minuta, dok je za koncentrovanije rastvore (200-300 mg/L) trebalo skoro 120 min.

- Kinetika adsorpcije svih vrsta adsorbata najbolje je opisana modelom pseudo-drugog reda, na celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija.
- Analizom adsorpcione ravnoteže svih vrsta adsorbata na aktiviranu kafu pronađeno je da je adsorpcija boje kristal violet aproksimirana teorijskim modelom Frojndlihove izoterme, pesticida parakvata Lengmirove izoterme i polifenola EGKG Tempkinove izoterme.
- Pod optimizovanim uslovima, maksimalni adsorpcioni kapacitet boje kristal violet na aktiviranu kafu iznosio je 36.108 mg/g, pesticida parakvata 29.343 mg/g, a polifenola EGKG 10.52 mg/g.
- Maksimalna količina uklonjene boje kristal violet iz vodenog rastvora u sistemu sa aktiviranom kafom, pod optimizovanim uslovima, iznosila je 96.90 %, pesticida parakvata 33.99 %, a polifenola EGKG 73 %.
- Razvijen je originalni postupak desorpcije polifenola EGKG sa oksidovane kafe korišćenjem 20 % etanola kao rastvarača.
- Nakon procesa adsorpcije i desorpcije polifenola EGKG sa oksidovane kafe došlo je do neznatnog smanjenja antioksidativne aktivnosti, odnosno, zadržano je oko 84 % početne aktivnosti.
- Na oksidovanoj kafi uočeno je jedinstveno svojstvo selektivnosti, odnosno, mogućnost da pojedine bioaktivne komponente adsorbuje efikasnije u odnosu na druge.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, naučni doprinos ove disertacije ogleda se u eventualnoj praktičnoj primeni otpadne kafe, baziranoj na spoju dveju aktuelnih oblasti. Razvijena metoda mikrotalasne ekstrakcije se može smatrati pogodnim izborom za potrebe izolovanja ekonomski isplativih količina bioaktivnih komponenata iz otpadne kafe. Dobijeni ekstrakt poseduje antioksidativna svojstva dovoljna da se može koristiti kao aditiv hrani i/ili farmaceutskim proizvodima. Sledeći predlog je da se talog kafe, zaostao nakon ekstrakcije polifenola, aktiviran po predloženom postupku, može najefikasnije primeniti za adsorpciju katjonskih boja iz otpadnih voda.

LITERATURA

- [1] S. Mussatto, E.S. Machado, S. Martins, J. Teixeira, Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues, *Food and Bioprocess Technology*. **2011**, 4, 661-672.
- [2] ICO, International Coffee Organization 2013.
- [3] P. Esquivel, V.M. Jiménez, Functional properties of coffee and coffee by-products, *Food Research International*. **2012**, 46, 488-495.
- [4] R. Cruz, M.M. Cardoso, L. Fernandes, M. Oliveira, E. Mendes, P. Baptista, S. Morais, S. Casal, Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 7777-7784.
- [5] P.S. Murthy, M. Madhava Naidu, Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review, *Resources, Conservation and Recycling*. **2012**, 66, 45-58.
- [6] P.S. Murthy, M.M. Naidu, Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products, *Food and Bioprocess Technology*. **2012**, 5, 897-903.
- [7] W.-J. Yen, B.-S. Wang, L.-W. Chang, P.-D. Duh, Antioxidant properties of roasted coffee residues, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 2658-2663.
- [8] J. Bravo, C. Monente, I. Juárez, M.P. De Peña, C. Cid, Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee, *Food Research International*. **2013**, 50, 610-616.
- [9] A. Zuorro, R. Lavecchia, Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy, *Journal of Cleaner Production*. **2012**, 34, 49-56.
- [10] S.I. Mussatto, L.F. Ballesteros, S. Martins, J.A. Teixeira, Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds, *Separation and Purification Technology*. **2011**, 83, 173-179.
- [11] J. Bravo, I. Juárez, C. Monente, B. Caemmerer, L.W. Kroh, M.P. De Peña, C.n. Cid, Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 12565-12573.
- [12] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Experimental physiology*. **1997**, 82, 291-295.

- [13] L.S. Oliveira, A.S. Franca, T.M. Alves, S.D. Rocha, Evaluation of untreated coffee husks as potential biosorbents for treatment of dye contaminated waters, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 155, 507-512.
- [14] G.Z. Kyzas, N.K. Lazaridis, A.C. Mitropoulos, Removal of dyes from aqueous solutions with untreated coffee residues as potential low-cost adsorbents: Equilibrium, reuse and thermodynamic approach, *Chemical Engineering Journal*. **2012**, 189–190, 148-159.
- [15] K. Kaikake, K. Hoaki, H. Sunada, R.P. Dhakal, Y. Baba, Removal characteristics of metal ions using degreased coffee beans: Adsorption equilibrium of cadmium (II), *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 2787-2791.
- [16] M.-H. Baek, C.O. Ijagbemi, S.-J. O, D.-S. Kim, Removal of Malachite Green from aqueous solution using degreased coffee bean, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 176, 820-828.
- [17] J. Roh, H. Umh, C. Yoo, S. Rengaraj, B. Lee, Y. Kim, Waste coffee-grounds as potential biosorbents for removal of acid dye 44 from aqueous solution, *Korean Journal of Chemical Engineering*. **2012**, 29, 903-907.
- [18] S.L. Ching, M.S. Yusoff, H.A. Aziz, M. Umar, Influence of impregnation ratio on coffee ground activated carbon as landfill leachate adsorbent for removal of total iron and orthophosphate, *Desalination*. **2011**, 279, 225-234.
- [19] L. Khenniche, F. Benissad-Aissani, Adsorptive removal of phenol by coffee residue activated carbon and commercial activated carbon: Equilibrium, kinetics, and thermodynamics, *Journal of Chemical & Engineering Data*. **2010**, 55, 4677-4686.
- [20] A.S. Franca, L.S. Oliveira, A.A. Nunes, C.C. Alves, Microwave assisted thermal treatment of defective coffee beans press cake for the production of adsorbents, *Bioresource Technology*. **2010**, 101, 1068-1074.
- [21] M. Hirata, N. Kawasaki, T. Nakamura, K. Matsumoto, M. Kabayama, T. Tamura, S. Tanada, Adsorption of Dyes onto Carbonaceous Materials Produced from Coffee Grounds by Microwave Treatment, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2002**, 254, 17-22.
- [22] A. Bhatnagar, M. Sillanpää, Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment—a review, *Chemical Engineering Journal*. **2010**, 157, 277-296.

- [23] P. Parras, M. Martínez-Tomé, A. Jiménez, M. Murcia, Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures, *Food Chemistry*. **2007**, 102, 582-592.
- [24] Wikipedia, en.wikipedia.org
- [25] H. Chanakya, A. De Alwis, Environmental issues and management in primary coffee processing, *Process safety and environmental protection*. **2004**, 82, 291-300.
- [26] M. Petracco, Our Everyday Cup of Coffee: The Chemistry behind Its Magic, *Journal of Chemical Education*. **2005**, 82, 1161.
- [27] R.C. Borrelli, A. Visconti, C. Mennella, M. Anese, V. Fogliano, Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, 6527-6533.
- [28] N. Wang, L.-T. Lim, Fourier transform infrared and physicochemical analyses of roasted coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 5446-5453.
- [29] R.N. Páscoa, L.M. Magalhães, J.A. Lopes, FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties, *Food Research International*. **2013**, 51, 579-586.
- [30] Z. Fábián, V. Izvekov, A. Salgó, F. Örsi, Near-infrared reflectance and Fourier transform infrared analysis of instant coffee mixtures, *Analytical Proceedings including Analytical Communications, Royal Society of Chemistry*. **1994**, 261-263.
- [31] K. Ramalakshmi, L.J.M. Rao, Y. Takano-Ishikawa, M. Goto, Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems, *Food Chemistry*. **2009**, 115, 79-85.
- [32] M.D. Milutinović, S.S. Šiler-Marinković, D.G. Antonović, K.R. Mihajlovska, M.D. Pavlović, S.I. Dimitrijević-Branković, The antioxidant properties of dried extracts from the spent espresso coffee, *Hemijska industrija*. **2013**, 67, 261-267.
- [33] S. Orecchio, Recovery and Reutilization of Waste Matter from Coffee Preparation. An Experiment for Environmental Science Courses, *Journal of Chemical Education*. **2001**, 78, 1669.
- [34] T.W. Crozier, A. Stalmach, M.E. Lean, A. Crozier, Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications, *Food & function*. **2012**, 3, 30-33.

- [35] I. Sánchez-González, A. Jiménez-Escrig, F. Saura-Calixto, In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter), *Food Chemistry*. **2005**, 90, 133-139.
- [36] B. Cämmerer, L.W. Kroh, Antioxidant activity of coffee brews, *European Food Research and Technology*. **2006**, 223, 469-474.
- [37] Y. Fukushima, T. Ohie, Y. Yonekawa, K. Yonemoto, H. Aizawa, Y. Mori, M. Watanabe, M. Takeuchi, M. Hasegawa, C. Taguchi, Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, 1253-1259.
- [38] S.I. Mussatto, E.M. Machado, S. Martins, J.A. Teixeira, Production, composition, and application of coffee and its industrial residues, *Food and Bioprocess Technology*. **2011**, 4, 661-672.
- [39] R. Cruz, M.M. Cardoso, L. Fernandes, M. Oliveira, E.I. Mendes, P. Baptista, S. Morais, S. Casal, Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 7777-7784.
- [40] I.A. Ludwig, L. Sanchez, B. Caemmerer, L.W. Kroh, M.P. De Peña, C. Cid, Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method, *Food Research International*. **2012**, 48, 57-64.
- [41] K. Ramalakshmi, L. Rao, Y. Takano-Ishikawa, M. Goto, Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different *in vitro* model systems, *Food Chemistry*. **2009**, 115, 79-85.
- [42] M. Madhava Naidu, G. Sulochanamma, S. Sampathu, P. Srinivas, Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee, *Food Chemistry*. **2008**, 107, 377-384.
- [43] W. Mullen, B. Nemzer, B. Ou, A. Stalmach, J. Hunter, M. Clifford, E. Combet, The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59, 3754-3762.
- [44] V. Rakic, V. Burke, L.J. Beilin, Effects of Coffee on Ambulatory Blood Pressure in Older Men and Women A Randomized Controlled Trial, *Hypertension*. **1999**, 33, 869-873.

- [45] A. Svilaas, A.K. Sakhi, L.F. Andersen, T. Svilaas, E.C. Ström, D.R. Jacobs, L. Ose, R. Blomhoff, Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans, *The Journal of nutrition*. **2004**, 134, 562-567.
- [46] J.J. Barone, H.R. Roberts, Caffeine consumption, *Food and Chemical Toxicology*. **1996**, 34, 119-129.
- [47] A. Farah, T. de Paulis, D.P. Moreira, L.C. Trugo, P.R. Martin, Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 374-381.
- [48] B. Halliwell, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?, *The lancet*. **1994**, 344, 721-724.
- [49] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and cellular biochemistry*. **2004**, 266, 37-56.
- [50] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological reviews*. **2002**, 82, 47-95.
- [51] K.B. Beckman, B.N. Ames, The free radical theory of aging matures, *Physiological reviews*. **1998**, 78, 547-581.
- [52] M. Valko, C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-biological interactions*. **2006**, 160, 1-40.
- [53] B.S. Berlett, E.R. Stadtman, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *Journal of Biological Chemistry*. **1997**, 272, 20313-20316.
- [54] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry & cell biology*. **2007**, 39, 44-84.
- [55] E. Čolak, Novi markeri oksidativnog oštećenja makromolekula, *Journal of Medical Biochemistry*. **2008**, 27, 1-16.
- [56] J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, Hydroxyl radicals and DNA base damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **1999**, 424, 9-21.

- [57] D. Allan Butterfield, A. Castegna, C.M. Lauderback, J. Drake, Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death, *Neurobiology of aging*. **2002**, 23, 655-664.
- [58] R.A. Larson, The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*. **1988**, 27, 969-978.
- [59] M.-L. Hu, Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers, *Chang Gung Med J*. **2011**, 34, 449-457.
- [60] N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *The Journal of nutrition*. **2003**, 133, 2812-2819.
- [61] M.N. Clifford, Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80, 1033-1043.
- [62] T. Watanabe, Y. Arai, Y. Mitsui, T. Kusaura, W. Okawa, Y. Kajihara, I. Saito, The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension, *Clinical and experimental hypertension*. **2006**, 28, 439-449.
- [63] C.-L. Ky, M. Noirot, S. Hamon, Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**, 45, 786-790.
- [64] Coffee chemistry, www.coffeechemistry.com
- [65] W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher, Lignin biosynthesis, *Annual review of plant biology*. **2003**, 54, 519-546.
- [66] F. Natella, M. Nardini, F. Belevi, C. Scaccini, Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans, *The American journal of clinical nutrition*. **2007**, 86, 604-609.
- [67] J. Pérez-Jiménez, S. Arranz, M. Tabernero, M.E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Goñi, F. Saura-Calixto, Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results, *Food Research International*. **2008**, 41, 274-285.
- [68] R. Upadhyay, K. Ramalakshmi, L. Jagan Mohan Rao, Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans, *Food Chemistry*. **2012**, 130, 184-188.

- [69] R.C. Borrelli, F. Esposito, A. Napolitano, A. Ritieni, V. Fogliano, Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 1338-1343.
- [70] I. Stanisavljević, Ultrazvučna ekstrakcija ulja iz semena duvana (*Nicotiana tabacum* l.) tipa otlja, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac, **2006**.
- [71] A. Bucić-Kojić, M. Planinić, S. Tomas, M. Bilić, D. Velić, Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds, *Journal of Food Engineering*. **2007**, 81, 236-242.
- [72] Ekstrakcija čvrsto-tečno, www.scribd.com
- [73] M.M. Trajković J., Baras J., Šiler S., Analize životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, **1983**.
- [74] D.Ž. Mijin, S.D. Petrović, Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji, *Hemijska Industrija*. **2005**, 59, 224–229.
- [75] D. Stanisavljev, Fizičko-hemijski procesi u mikrotalasnom polju, *Hemijska Industrija*. **2009**, 63, 489-497.
- [76] Y. Li, G.K. Skouroumounis, G.M. Elsey, D.K. Taylor, Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols, *Food Chemistry*. **2011**, 129, 570-576.
- [77] H. Li, Z. Deng, T. Wu, R. Liu, S. Loewen, R. Tsao, Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes, *Food Chemistry*. **2012**, 130, 928-936.
- [78] A. Singh, K. Sabally, S. Kubow, D.J. Donnelly, Y. Gariepy, V. Orsat, G. Raghavan, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from potato peels, *Molecules*. **2011**, 16, 2218-2232.
- [79] T.S. Ballard, P. Mallikarjunan, K. Zhou, S. O’Keefe, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins, *Food Chemistry*. **2010**, 120, 1185-1192.
- [80] S. Tsubaki, M. Sakamoto, J.-i. Azuma, Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from tea residues under autohydrolytic conditions, *Food Chemistry*. **2010**, 123, 1255-1258.

- [81] X.L. Bai, T.L. Yue, Y.H. Yuan, H.W. Zhang, Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis, *Journal of separation science*. **2010**, 33, 3751-3758.
- [82] K. Krishnaswamy, V. Orsat, Y. Gariépy, K. Thangavel, Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*), *Food and Bioprocess Technology*. **2013**, 6, 441-455.
- [83] K. Hayat, S. Hussain, S. Abbas, U. Farooq, B. Ding, S. Xia, C. Jia, X. Zhang, W. Xia, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*, *Separation and Purification Technology*. **2009**, 70, 63-70.
- [84] A. Dąbrowski, Adsorption—from theory to practice, *Advances in colloid and interface science*. **2001**, 93, 135-224.
- [85] J. Kammerer, R. Carle, D.R. Kammerer, Adsorption and ion exchange: Basic principles and their application in food processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 59, 22-42.
- [86] M.L. Soto, A. Moure, H. Domínguez, J.C. Parajó, Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review, *Journal of Food Engineering*. **2011**, 105, 1-27.
- [87] N. Qiu, S. Guo, Y. Chang, Study upon kinetic process of apple juice adsorption decoloration by using adsorbent resin, *Journal of Food Engineering*. **2007**, 81, 243-249.
- [88] A. Dąbrowski, P. Podkościelny, Z. Hubicki, M. Barczak, Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review, *Chemosphere*. **2005**, 58, 1049-1070.
- [89] R.D. Vidic, M.T. Suidan, R.C. Brenner, Oxidative coupling of phenols on activated carbon: impact on adsorption equilibrium, *Environmental science & technology*. **1993**, 27, 2079-2085.
- [90] R.J. de Jonge, A.M. Breure, J.G. van Andel, Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC), *Water research*. **1996**, 30, 883-892.
- [91] B. Pan, X. Zhang, W. Zhang, J. Zheng, B. Pan, J. Chen, Q. Zhang, Adsorption of phenolic compounds from aqueous solution onto a macroporous polymer and its aminated derivative: isotherm analysis, *Journal of Hazardous Materials*. **2005**, 121, 233-241.

- [92] A.E. Navarro, R.F. Portales, M.R. Sun-Kou, B.P. Llanos, Effect of pH on phenol biosorption by marine seaweeds, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 156, 405-411.
- [93] M. Rafatullah, O. Sulaiman, R. Hashim, A. Ahmad, Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 177, 70-80.
- [94] A. Ahmad, M. Rafatullah, O. Sulaiman, M.H. Ibrahim, Y.Y. Chii, B.M. Siddique, Removal of Cu (II) and Pb (II) ions from aqueous solutions by adsorption on sawdust of Meranti wood, *Desalination*. **2009**, 247, 636-646.
- [95] M. Rafatullah, O. Sulaiman, R. Hashim, A. Ahmad, Adsorption of copper (II), chromium (III), nickel (II) and lead (II) ions from aqueous solutions by meranti sawdust, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 170, 969-977.
- [96] E. Lorenc-Grabowska, G. Gryglewicz, M. Diez, Kinetics and equilibrium study of phenol adsorption on nitrogen-enriched activated carbons, *Fuel*. **2013**, 114, 235-243.
- [97] D. Mohan, S. Chander, Single component and multi-component adsorption of metal ions by activated carbons, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2000**, 177, 183-196.
- [98] A. Thiel, N. Tippkötter, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, New zeolite adsorbents for downstream processing of polyphenols from renewable resources, *Engineering in Life Sciences*. **2013**, 13, 239-246.
- [99] C. Santi, S. Cortes, L. D'Acqui, E. Sparvoli, B. Pushparaj, Reduction of organic pollutants in olive mill wastewater by using different mineral substrates as adsorbents, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 1945-1951.
- [100] D. Hua, C. Ma, L. Song, S. Lin, Z. Zhang, Z. Deng, P. Xu, Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin, *Applied microbiology and biotechnology*. **2007**, 74, 783-790.
- [101] M. Georgiev, E. Kovacheva, N. Marcheva, M. Ilieva, Purification of rosmarinic acid extracts from *Lavandula vera* MM cell biomass, *Food Chemistry*. **2006**, 94, 111-114.
- [102] J. Kammerer, C. Schweizer, R. Carle, D.R. Kammerer, Recovery and fractionation of major apple and grape polyphenols from model solutions and crude plant extracts using ion exchange and adsorbent resins, *International Journal of Food Science & Technology*. **2011**, 46, 1755-1767.

- [103] P. Gogoi, M.D. Saikia, N.N. Dutta, P.G. Rao, Adsorption affinity of tea catechins onto polymeric resins: Interpretation from molecular orbital theory, *Biochemical Engineering Journal*. **2010**, 52, 144-150.
- [104] Y. Liu, Q. Bai, S. Lou, D. Di, J. Li, M. Guo, Adsorption Characteristics of (–)-Epigallocatechin Gallate and Caffeine in the Extract of Waste Tea on Macroporous Adsorption Resins Functionalized with Chloromethyl, Amino, and Phenylamino Groups, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 1555-1566.
- [105] E. Silva, D. Pompeu, Y. Larondelle, H. Rogez, Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology, *Separation and Purification Technology*. **2007**, 53, 274-280.
- [106] L. Sun, Y. Guo, C. Fu, J. Li, Z. Li, Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples, *Food Chemistry*. **2013**, 136, 1022-1029.
- [107] C. Li, Y. Zheng, X. Wang, S. Feng, D. Di, Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea* L.(olive) leaves using macroporous resin, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2011**, 91, 2826-2834.
- [108] T.K. Naiya, A.K. Bhattacharya, S. Mandal, S.K. Das, The sorption of lead (II) ions on rice husk ash, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 163, 1254-1264.
- [109] Y. Ding, D. Jing, H. Gong, L. Zhou, X. Yang, Biosorption of aquatic cadmium (II) by unmodified rice straw, *Bioresource Technology*. **2012**, 114, 20-25.
- [110] V. Vadivelan, K.V. Kumar, Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2005**, 286, 90-100.
- [111] Z. Wu, H. Li, J. Ming, G. Zhao, Optimization of adsorption of tea polyphenols into oat β -glucan using response surface methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 59, 378-385.
- [112] R. Gao, H. Liu, Z. Peng, Z. Wu, Y. Wang, G. Zhao, Adsorption of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β -glucan, *Food Chemistry*. **2012**, 132, 1936-1943.
- [113] J. Shah, M.R. Jan, M. Zeeshan, Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies for sorption of Ni (II) from aqueous solution using formaldehyde treated waste tea leaves, *Journal of Saudi Chemical Society*. **2012**.

- [114] B. Amarasinghe, R. Williams, Tea waste as a low cost adsorbent for the removal of Cu and Pb from wastewater, *Chemical Engineering Journal*. **2007**, 132, 299-309.
- [115] B. Hameed, Spent tea leaves: a new non-conventional and low-cost adsorbent for removal of basic dye from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 161, 753-759.
- [116] M. Auta, B. Hameed, Preparation of waste tea activated carbon using potassium acetate as an activating agent for adsorption of Acid Blue 25 dye, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 171, 502-509.
- [117] N. Nasuha, B. Hameed, A.T.M. Din, Rejected tea as a potential low-cost adsorbent for the removal of methylene blue, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 175, 126-132.
- [118] A. Gundogdu, C. Duran, H.B. Senturk, M. Soylak, D. Ozdes, H. Serencam, M. Imamoglu, Adsorption of phenol from aqueous solution on a low-cost activated carbon produced from tea industry waste: Equilibrium, kinetic, and thermodynamic study, *Journal of Chemical & Engineering Data*. **2012**, 57, 2733-2743.
- [119] K. Foo, B. Hameed, Coconut husk derived activated carbon via microwave induced activation: effects of activation agents, preparation parameters and adsorption performance, *Chemical Engineering Journal*. **2012**, 184, 57-65.
- [120] M. Khormaei, B. Nasernejad, M. Edrisi, T. Eslamzadeh, Copper biosorption from aqueous solutions by sour orange residue, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 149, 269-274.
- [121] K. Foo, B. Hameed, Preparation, characterization and evaluation of adsorptive properties of orange peel based activated carbon via microwave induced K_2CO_3 activation, *Bioresource Technology*. **2012**, 104, 679-686.
- [122] M. Arami, N.Y. Limaee, N.M. Mahmoodi, N.S. Tabrizi, Removal of dyes from colored textile wastewater by orange peel adsorbent: equilibrium and kinetic studies, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2005**, 288, 371-376.
- [123] M. Achak, A. Hafidi, N. Ouazzani, S. Sayadi, L. Mandi, Low cost biosorbent “banana peel” for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater: Kinetic and equilibrium studies, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 166, 117-125.
- [124] F.A. Pavan, Y. Gushikem, A.C. Mazzonato, S.L. Dias, E.C. Lima, Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to methylene blue biosorption on yellow passion fruit and mandarin peels, *Dyes and Pigments*. **2007**, 72, 256-266.

- [125] C. Michailof, G.G. Stavropoulos, C. Panayiotou, Enhanced adsorption of phenolic compounds, commonly encountered in olive mill wastewaters, on olive husk derived activated carbons, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 6400-6408.
- [126] B. Hameed, M. El-Khaiary, Removal of basic dye from aqueous medium using a novel agricultural waste material: Pumpkin seed hull, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 155, 601-609.
- [127] M.P. Elizalde-González, V. Hernández-Montoya, Removal of acid orange 7 by guava seed carbon: a four parameter optimization study, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 168, 515-522.
- [128] C. Valderrama, J.A. Arévalo, I. Casas, M. Martínez, N. Miralles, A. Florido, Modelling of the Ni (II) removal from aqueous solutions onto grape stalk wastes in fixed-bed column, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 174, 144-150.
- [129] S.T. Akar, A.S. Özcan, T. Akar, A. Özcan, Z. Kaynak, Biosorption of a reactive textile dye from aqueous solutions utilizing an agro-waste, *Desalination*. **2009**, 249, 757-761.
- [130] B. Singha, S.K. Das, Removal of Pb (II) ions from aqueous solution and industrial effluent using natural biosorbents, *Environmental Science and Pollution Research*. **2012**, 19, 2212-2226.
- [131] G. Annadurai, R.-S. Juang, D.-J. Lee, Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*. **2002**, 92, 263-274.
- [132] P.S. Vankar, R. Sarswat, A.K. Dwivedi, R.S. Sahu, An assessment and characterization for biosorption efficiency of natural dye waste, *Journal of Cleaner Production*. **2013**, 60, 65-70.
- [133] E. Altıok, D. Bayçın, O. Bayraktar, S. Ülkü, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin, *Separation and Purification Technology*. **2008**, 62, 342-348.
- [134] P. Francesca, M. Sara, T. Luigi, New biosorbent materials for heavy metal removal: product development guided by active site characterization, *Water research*. **2008**, 42, 2953-2962.
- [135] D. Reddy, K. Seshiah, A. Reddy, S. Lee, Optimization of Cd (II), Cu (II) and Ni (II) biosorption by chemically modified *Moringa oleifera* leaves powder, *Carbohydrate Polymers*. **2012**, 88, 1077-1086.

- [136] Y. Ho, G. McKay, Comparative sorption kinetic studies of dye and aromatic compounds onto fly ash, *Journal of Environmental Science & Health Part A*. **1999**, 34, 1179-1204.
- [137] K. Ravikumar, K. Pakshirajan, T. Swaminathan, K. Balu, Optimization of batch process parameters using response surface methodology for dye removal by a novel adsorbent, *Chemical Engineering Journal*. **2005**, 105, 131-138.
- [138] S. Wang, Y. Boyjoo, A. Choueib, Z. Zhu, Removal of dyes from aqueous solution using fly ash and red mud, *Water research*. **2005**, 39, 129-138.
- [139] Z. Aksu, F. Gönen, Binary biosorption of phenol and chromium (VI) onto immobilized activated sludge in a packed bed: prediction of kinetic parameters and breakthrough curves, *Separation and Purification Technology*. **2006**, 49, 205-216.
- [140] K. Vijayaraghavan, S.W. Won, Y.-S. Yun, Treatment of complex Remazol dye effluent using sawdust-and coal-based activated carbons, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 167, 790-796.
- [141] O. Anjaneya, M. Santoshkumar, S.N. Anand, T. Karegoudar, Biosorption of acid violet dye from aqueous solutions using native biomass of a new isolate of *Penicillium* sp, *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2009**, 63, 782-787.
- [142] Y. Khambhaty, K. Mody, S. Basha, Efficient removal of Brilliant Blue G (BBG) from aqueous solutions by marine *Aspergillus wentii*: Kinetics, equilibrium and process design, *Ecological Engineering*. **2012**, 41, 74-83.
- [143] P. Kaushik, A. Malik, Process optimization for efficient dye removal by *Aspergillus lentulus* FJ172995, *Journal of Hazardous Materials*. **2011**, 185, 837-843.
- [144] M.Y. Arica, G. Bayramoğlu, Biosorption of Reactive Red-120 dye from aqueous solution by native and modified fungus biomass preparations of *Lentinus sajor-caju*, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 149, 499-507.
- [145] A. Saeed, M. Iqbal, S.I. Zafar, Immobilization of *Trichoderma viride* for enhanced methylene blue biosorption: Batch and column studies, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 168, 406-415.
- [146] F.d.J. Cerino-Córdova, A. García-León, E. Soto-Regalado, M. Sánchez-González, T. Lozano-Ramírez, B. García-Avalos, J. Loredó-Medrano, Experimental design for the optimization of copper biosorption from aqueous solution by *Aspergillus terreus*, *Journal of environmental management*. **2012**, 95, S77-S82.

- [147] Y. Sağ, T. Kutsal, The selective biosorption of chromium (VI) and copper (II) ions from binary metal mixtures by *R. arrhizus*, *Process Biochemistry*. **1996**, 31, 561-572.
- [148] Y. Yus Azila, M. Mashitah, S. Bhatia, Process optimization studies of lead (Pb (II)) biosorption onto immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* using response surface methodology, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 8549-8552.
- [149] J.Y. Farah, N.S. El-Gendy, L.A. Farahat, Biosorption of Astrazone Blue basic dye from an aqueous solution using dried biomass of Baker's yeast, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 148, 402-408.
- [150] R. Pratibha, P. Malar, T. Rajapriya, S. Balapoornima, V. Ponnusami, Statistical and equilibrium studies on enhancing biosorption capacity of *Saccharomyces cerevisiae* through acid treatment, *Desalination*. **2010**, 264, 102-107.
- [151] G. Dotto, E. Lima, L. Pinto, Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: Equilibrium isotherm and thermodynamic analysis, *Bioresource Technology*. **2012**, 103, 123-130.
- [152] S. Gokhale, K. Jyoti, S. Lele, Modeling of chromium (VI) biosorption by immobilized *Spirulina platensis* in packed column, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 170, 735-743.
- [153] W.-T. Tsai, H.-R. Chen, Removal of malachite green from aqueous solution using low-cost chlorella-based biomass, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 175, 844-849.
- [154] S. Mona, A. Kaushik, C. Kaushik, Biosorption of reactive dye by waste biomass of *Nostoc linckia*, *Ecological Engineering*. **2011**, 37, 1589-1594.
- [155] S. Mona, A. Kaushik, C.P. Kaushik, Waste biomass of *Nostoc linckia* as adsorbent of crystal violet dye: Optimization based on statistical model, *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2011**, 65, 513-521.
- [156] I. Michalak, K. Chojnacka, The new application of biosorption properties of *Enteromorpha prolifera*, *Applied biochemistry and biotechnology*. **2010**, 160, 1540-1556.
- [157] A. Özer, G. Gürbüz, A. Çalimli, B.K. Körbahti, Investigation of nickel (II) biosorption on *Enteromorpha prolifera*: Optimization using response surface analysis, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 152, 778-788.

- [158] M. Kousha, E. Daneshvar, H. Dopeikar, D. Taghavi, A. Bhatnagar, Box–Behnken design optimization of Acid Black 1 dye biosorption by different brown macroalgae, *Chemical Engineering Journal*. **2012**, 179, 158-168.
- [159] J.-h. PAN, R.-x. LIU, H.-x. TANG, Surface reaction of *Bacillus cereus* biomass and its biosorption for lead and copper ions, *Journal of Environmental Sciences*. **2007**, 19, 403-408.
- [160] F. Çolak, N. Atar, D. Yazıcıoğlu, A. Olgun, Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 173, 422-428.
- [161] R. Kumar, R. Singh, N. Kumar, K. Bishnoi, N.R. Bishnoi, Response surface methodology approach for optimization of biosorption process for removal of Cr (VI), Ni (II) and Zn (II) ions by immobilized bacterial biomass sp. *Bacillus brevis*, *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 146, 401-407.
- [162] S. Hasan, P. Srivastava, M. Talat, Biosorption of Pb (II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: Central composite design for optimization of process variables, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 168, 1155-1162.
- [163] Y. Qu, H. Li, A. Li, F. Ma, J. Zhou, Identification and characterization of *Leucobacter* sp. N-4 for Ni (II) biosorption by response surface methodology, *Journal of Hazardous Materials*. **2011**, 190, 869-875.
- [164] K. Vijayaraghavan, M.H. Han, S.B. Choi, Y.-S. Yun, Biosorption of Reactive black 5 by *Corynebacterium glutamicum* biomass immobilized in alginate and polysulfone matrices, *Chemosphere*. **2007**, 68, 1838-1845.
- [165] L.-N. Du, B. Wang, G. Li, S. Wang, D.E. Crowley, Y.-H. Zhao, Biosorption of the metal-complex dye Acid Black 172 by live and heat-treated biomass of *Pseudomonas* sp. strain DY1: Kinetics and sorption mechanisms, *Journal of Hazardous Materials*. **2012**, 205, 47-54.
- [166] C. Quintelas, E. Sousa, F. Silva, S. Neto, T. Tavares, Competitive biosorption of ortho-cresol, phenol, chlorophenol and chromium (VI) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon, *Process Biochemistry*. **2006**, 41, 2087-2091.

- [167] M.Z. Momčilović, Kinetički i ravnotežni parametri adsorpcionih procesa pri uklanjanju pojedinih štetnih katjonskih sastojaka iz vodenih rastvora aktivnim ugljevima dobijenih hemijsko-termičkom obradom srži ploda divljeg kestena i šišarke crnog bora, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Univerzitet u Nišu, Niš, **2012**.
- [168] F. Boudrahem, F. Aissani-Benissad, H. Aït-Amar, Batch sorption dynamics and equilibrium for the removal of lead ions from aqueous phase using activated carbon developed from coffee residue activated with zinc chloride, *Journal of environmental management*. **2009**, 90, 3031-3039.
- [169] J. Ganan-Gomez, A. Macias-Garcia, M. Diaz-Diez, C. Gonzalez-Garcia, E. Sabio-Rey, Preparation and characterization of activated carbons from impregnation pitch by ZnCl₂, *Applied surface science*. **2006**, 252, 5976-5979.
- [170] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, *Journal of the American Chemical society*. **1951**, 73, 373-380.
- [171] A. Reffas, V. Bernardet, B. David, L. Reinert, M.B. Lehocine, M. Dubois, N. Batisse, L. Duclaux, Carbons prepared from coffee grounds by H₃PO₄ activation: Characterization and adsorption of methylene blue and Nylosan Red N-2RBL, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 175, 779-788.
- [172] Y. Guo, D.A. Rockstraw, Physicochemical properties of carbons prepared from pecan shell by phosphoric acid activation, *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 1513-1521.
- [173] M. Donohue, G. Aranovich, Adsorption hysteresis in porous solids, *Journal of Colloid and Interface Science*. **1998**, 205, 121-130.
- [174] J. Rivera-Utrilla, I. Bautista-Toledo, M.A. Ferro-García, C. Moreno-Castilla, Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **2001**, 76, 1209-1215.
- [175] S.M. Milosavljević, Strukturne instrumentalne metode, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, **1994**.
- [176] M.C. Ncibi, B. Mahjoub, M. Seffen, Kinetic and equilibrium studies of methylene blue biosorption by *Posidonia oceanica* (L.) fibres, *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 139, 280-285.

- [177] K. Vijayaraghavan, Y.-S. Yun, Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnology advances*. **2008**, 26, 266-291.
- [178] K.D. Belaid, S. Kacha, M. Kameche, Z. Derriche, Adsorption kinetics of some textile dyes onto granular activated carbon, *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **2013**, 1, 496-503.
- [179] Z. Aksu, Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review, *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 997-1026.
- [180] M.A. Ahmad, N.K. Rahman, Equilibrium, kinetics and thermodynamic of Remazol Brilliant Orange 3R dye adsorption on coffee husk-based activated carbon, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 170, 154-161.
- [181] A.L. Prasad, T. Santhi, S. Manonmani, Recent developments in preparation of activated carbons by microwave: Study of residual errors, *Arabian Journal of Chemistry*. **2011**, doi:10.1016/j.arabjc.2011.01.020
- [182] J.-D. Kim, J.-H. Yoon, Y.-H. Park, F. Kawai, H.-T. Kim, D.-W. Lee, K.-H. Kang, Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* LK-24 and its degradability of crystal violet, *Journal of microbiology and biotechnology*. **2002**, 12, 437-443.
- [183] W. Azmi, R.K. Sani, U.C. Banerjee, Biodegradation of triphenylmethane dyes, *Enzyme and Microbial Technology*. **1998**, 22, 185-191.
- [184] P. Gill, D. Arora, M. Chander, Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2002**, 28, 201-203.
- [185] M. Tekere, A. Mswaka, R. Zvauya, J. Read, Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi, *Enzyme and Microbial Technology*. **2001**, 28, 420-426.
- [186] S. Kreisig, A. Tarazona, E. Koglin, The adsorption of paraquat on silver electrode surfaces: a SERS microprobe study, *Electrochimica Acta*. **1997**, 42, 3335-3344.
- [187] N.K. Hamadi, S. Sri, X.D. Chen, Adsorption of Paraquat dichloride from aqueous solution by activated carbon derived from used tires, *Journal of Hazardous Materials*. **2004**, 112, 133-141.
- [188] W.T. Tsai, C.W. Lai, K.J. Hsien, Adsorption kinetics of herbicide paraquat from aqueous solution onto activated bleaching earth, *Chemosphere*. **2004**, 55, 829-837.

- [189] M.P. Leite, L.G.T. dos Reis, N.F. Robaina, W.F. Pacheco, R.J. Cassella, Adsorption of paraquat from aqueous medium by Amberlite XAD-2 and XAD-4 resins using dodecylsulfate as counter ion, *Chemical Engineering Journal*. **2013**, 215–216, 691-698.
- [190] W.T. Tsai, C.W. Lai, K.J. Hsien, Effect of particle size of activated clay on the adsorption of paraquat from aqueous solution, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2003**, 263, 29-34.
- [191] W.-T. Tsai, C.-W. Lai, Adsorption of herbicide paraquat by clay mineral regenerated from spent bleaching earth, *Journal of Hazardous Materials*. **2006**, 134, 144-148.
- [192] T.R. Roberts, J.S. Dyson, M.C.G. Lane, Deactivation of the Biological Activity of Paraquat in the Soil Environment: a Review of Long-Term Environmental Fate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, 3623-3631.
- [193] Y. Seki, K. Yurdakoç, Paraquat adsorption onto clays and organoclays from aqueous solution, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2005**, 287, 1-5.
- [194] M.I. Al-Zaben, W.K. Mekhamer, Removal of 4-chloro-2-methyl phenoxy acetic acid pesticide using coffee wastes from aqueous solution, *Arabian Journal of Chemistry*. **2013**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.05.003>
- [195] C.P. Nanseu-Njiki, G.K. Dedzo, E. Ngameni, Study of the removal of paraquat from aqueous solution by biosorption onto Ayous (*Triplochiton schleroxylon*) sawdust, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 179, 63-71.
- [196] S.-T. Hsu, T.-C. Pan, Adsorption of paraquat using methacrylic acid-modified rice husk, *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 3617-3621.
- [197] A. El-Abbassi, A. Hafidi, M.C. García-Payo, M. Khayet, Concentration of olive mill wastewater by membrane distillation for polyphenols recovery, *Desalination*. **2009**, 245, 670-674.
- [198] C. Conidi, A. Cassano, E. Drioli, A membrane-based study for the recovery of polyphenols from bergamot juice, *Journal of Membrane Science*. **2011**, 375, 182-190.
- [199] N. Boussetta, J.-L. Lanoisellé, C. Bedel-Cloutour, E. Vorobiev, Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments, *Journal of Food Engineering*. **2009**, 95, 192-198.

- [200] E. Garcia-Castello, A. Cassano, A. Criscuoli, C. Conidi, E. Drioli, Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system, *Water Research*. **2010**, 44, 3883-3892.
- [201] L. Bertin, F. Ferri, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava, Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mill wastewater through solid phase extraction, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 171, 1287-1293.
- [202] M. Loginov, N. Boussetta, N. Lebovka, E. Vorobiev, Separation of polyphenols and proteins from flaxseed hull extracts by coagulation and ultrafiltration, *Journal of Membrane Science*. **2013**, 442, 177-186.
- [203] J. Xu, T. Tan, J.-C. Janson, One-step purification of epigallocatechin gallate from crude green tea extracts by mixed-mode adsorption chromatography on highly cross-linked agarose media, *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1169, 235-238.
- [204] Y. Kawahara, K. Yamamoto, H. Wakisaka, K. Izutsu, M. Shioya, T. Sakai, Y. Takahara, N. Ishibashi, Carbonaceous adsorbents produced from coffee lees, *Journal of materials science*. **2009**, 44, 1137-1139.
- [205] L.C. Oliveira, E. Pereira, I.R. Guimaraes, A. Vallone, M. Pereira, J.P. Mesquita, K. Sapag, Preparation of activated carbons from coffee husks utilizing FeCl_3 and ZnCl_2 as activating agents, *Journal of Hazardous Materials*. **2009**, 165, 87-94.
- [206] A. Reffas, V. Bernardet, B. David, L. Reinert, M.B. Lehocine, M. Dubois, N. Batisse, L. Duclaux, Carbons prepared from coffee grounds by H_3PO_4 activation: Characterization and adsorption of methylene blue and Nylosan Red N-2RBL, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 175, 779-788.
- [207] S.K. Prabhakaran, K. Vijayaraghavan, R. Balasubramanian, Removal of Cr(VI) Ions by Spent Tea and Coffee Dusts: Reduction to Cr(III) and Biosorption, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2009**, 48, 2113-2117.
- [208] F. Boudrahem, A. Soualah, F. Aissani-Benissad, Pb (II) and Cd (II) removal from aqueous solutions using activated carbon developed from coffee residue activated with phosphoric acid and zinc chloride, *Journal of Chemical & Engineering Data*. **2011**, 56, 1946-1955.
- [209] M. Mahramanlioglu, I. Bicer, T. Misirli, A. Kilislioglu, Removal of uranium by the adsorbents produced from coffee residues, *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*. **2007**, 273, 621-624.

- [210] M. Ahmaruzzaman, Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals, *Advances in colloid and interface science*. **2011**, 166, 36-59.
- [211] L.S. Rožić, S.P. Petrović, Z.M. Vuković, T.B. Novaković, D.R. Stanisavljev, Optimalno faktorno planiranje procesa kiselinske aktivacije bentonita u mikrotalasnom polju, *Hem. Ind.* **2011**, 65 (5), 489–495.
- [212] M. Amini, H. Younesi, N. Bahramifar, A.A.Z. Lorestani, F. Ghorbani, A. Daneshi, M. Sharifzadeh, Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 154, 694-702.
- [213] A. Özer, G. Gürbüz, A. Çalimli, B.K. Körbahti, Biosorption of copper (II) ions on *Enteromorpha prolifera*: Application of response surface methodology (RSM), *Chemical Engineering Journal*. **2009**, 146, 377-387.
- [214] S. Hasan, P. Srivastava, M. Talat, Biosorption of lead using immobilized *Aeromonas hydrophila* biomass in up flow column system: Factorial design for process optimization, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 177, 312-322.
- [215] S. Dutta, A. Bhattacharyya, A. Ganguly, S. Gupta, S. Basu, Application of response surface methodology for preparation of low-cost adsorbent from citrus fruit peel and for removal of methylene blue, *Desalination*. **2011**, 275, 26-36.
- [216] D.C. Montgomery, Design and analysis of experiments, John Wiley & Sons, **2008**.
- [217] N.H. Ishler, T.P. Finucane, E. Borker, Rapid Spectrophotometric Determination of Caffeine, *Analytical Chemistry*. **1948**, 20, 1162-1166.
- [218] AOAC, Official method 957.04, Chlorogenic Acid in Green Coffee, *JAOAC*. **1957**, 40.
- [219] G. Spigno, D. De Faveri, Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study, *Journal of Food Engineering*. **2009**, 93, 210-217.
- [220] R. Amarowicz, R. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J. Weil, Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, *Food Chemistry*. **2004**, 84, 551-562.
- [221] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*. **1996**, 239, 70-76.

- [222] L. Khenniche, F. Aissani, Preparation and characterization of carbons from coffee residue: adsorption of salicylic acid on the prepared carbons, *Journal of Chemical & Engineering Data*. **2009**, 55, 728-734.
- [223] K.V. Kumar, S. Sivanesan, Prediction of optimum sorption isotherm: Comparison of linear and non-linear method, *Journal of Hazardous Materials*. **2005**, 126, 198-201.
- [224] P.T. Thuy, N.V. Anh, B. van der Bruggen, Evaluation of Two Low-Cost-High-Performance Adsorbent Materials in the Waste-to-Product Approach for the Removal of Pesticides from Drinking Water, *CLEAN – Soil, Air, Water*. **2012**, 40, 246-253.
- [225] S.-T. Hsu, W.-C. Lin, W.-F. Hsiao, C.-C. Lee, T.-C. Pan, T.-T. Wang, Y.-M. Huang, Preparation of methacrylic acid-grafted chitin using cerium (IV) ion and its application in adsorbing paraquat, *Journal of Applied Polymer Science*. **2013**, 127, 760-764.
- [226] R.M. Couto, J. Fernandes, M.D.R.G. da Silva, P.C. Simões, Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds, *The Journal of Supercritical Fluids*. **2009**, 51, 159-166.
- [227] K. Ramalakshmi, I. Rahath Kubra, L. Jagan Mohan Rao, Antioxidant potential of low-grade coffee beans, *Food Research International*. **2008**, 41, 96-103.
- [228] T. Tokimoto, N. Kawasaki, T. Nakamura, J. Akutagawa, S. Tanada, Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2005**, 281, 56-61.
- [229] N. Kondamudi, S.K. Mohapatra, M. Misra, Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56, 11757-11760.
- [230] W.M.N. Ratnayake, R. Hollywood, E. O'Grady, B. Stavric, Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods, *Food and Chemical Toxicology*. **1993**, 31, 263-269.
- [231] D. Komes, D. Horzic, A. Belscak, G. Kovacevic, A. Boljak, Determination of caffeine content in tea and maté tea by using different methods, *Czech J. Food Sci*. **2009**, 27, S213-S216.
- [232] C.L. Ky, J. Louarn, S. Dussert, B. Guyot, S. Hamon, M. Noirot, Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions, *Food Chemistry*. **2001**, 75, 223-230.

- [233] K. Ramalakshmi, G. Hithamani, K.R. Asha, L. Jagan Mohan Rao, Separation and characterisation of chlorogenic acid-rich conserves from green coffee beans and their radical scavenging potential, *International Journal of Food Science & Technology*. **2011**, 46, 109-115.
- [234] M.W. Cheong, K.H. Tong, J.J.M. Ong, S.Q. Liu, P. Curran, B. Yu, Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee, *Food Research International*. **2013**, 51, 388-396.
- [235] M. Pérez-Martínez, B. Caemmerer, M.P. De Peña, C. Cid, L.W. Kroh, Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 2958-2965.
- [236] J. Pérez-Serradilla, M. Luque de Castro, Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract, *Food Chemistry*. **2011**, 124, 1652-1659.
- [237] M. Omwamba, Q. Hu, Antioxidant activity in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains roasted in a microwave oven under conditions optimized using response surface methodology, *Journal of food science*. **2010**, 75, C66-C73.
- [238] M.M. Moreira, S. Morais, A.A. Barros, C. Delerue-Matos, L.F. Guido, A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis, *Analytical and bioanalytical chemistry*. **2012**, 403, 1019-1029.
- [239] S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M. Cocero, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, *Journal of Food Engineering*. **2012**, 109, 98-103.
- [240] J. Dai, R.J. Mumper, Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*. **2010**, 15, 7313-7352.
- [241] E. Kiassos, S. Mylonaki, D.P. Makris, P. Kefalas, Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **2009**, 10, 246-252.
- [242] D. Franco, J. Sineiro, M. Rubilar, M. Sánchez, M. Jerez, M. Pinelo, N. Costoya, M.J. Núñez, Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*. **2008**, 7, 3210-3216.

- [243] D. Liu, E. Vorobiev, R. Savoie, J.-L. Lanoisellé, Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration, *Separation and Purification Technology*. **2011**, 81, 134-140.
- [244] K. Ghafoor, Y.H. Choi, J.Y. Jeon, I.H. Jo, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, 4988-4994.
- [245] G. Zhang, M. Hu, L. He, P. Fu, L. Wang, J. Zhou, Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities *in vitro*, *Food and Bioprocess Processing*. **2013**, 91, 158-168.
- [246] R.C. Alves, A.S. Costa, M.a. Jerez, S. Casal, J. Sineiro, M.a.J. Núñez, B. Oliveira, Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 12221-12229.
- [247] C.F. Zhao, S. Li, S.J. Li, G.H. Song, L.J. Yu, H. Zhang, Extraction optimization approach to improve accessibility of functional fraction based on combination of total polyphenol, chromatographic profiling and antioxidant activity evaluation: *Pyracantha fortuneana* fruit as an example, *Journal of Functional Foods*. **2013**, 5, 715-728.
- [248] M.V. Mujica, M. Granito, N. Soto, Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L, *Interciencia*. **2009**, 34, 650-654.
- [249] N.G. Meneses, S. Martins, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains, *Separation and Purification Technology*. **2013**, 108, 152-158.
- [250] J. Saha, A. Biswas, A. Chhetri, P.K. Sarkar, Response surface optimisation of antioxidant extraction from kinema, a *Bacillus*-fermented soybean food, *Food Chemistry*. **2011**, 129, 507-513.
- [251] M. Plaza, V. Abrahamsson, C. Turner, Extraction and neoformation of antioxidant compounds by pressurized hot water extraction from apple byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61, 5500-5510.

- [252] L. Galvan d'Alessandro, K. Kriaa, I. Nikov, K. Dimitrov, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology*. **2012**, 93, 42-47.
- [253] O. Zitka, J. Sochor, O. Rop, S. Skalickova, P. Sobrova, J. Zehnalek, M. Beklova, B. Krska, V. Adam, R. Kizek, Comparison of various easy-to-use procedures for extraction of phenols from apricot fruits, *Molecules*. **2011**, 16, 2914-2936.
- [254] E. Bulut, M. Özacar, İ.A. Şengil, Adsorption of malachite green onto bentonite: equilibrium and kinetic studies and process design, *Microporous and Mesoporous Materials*. **2008**, 115, 234-246.
- [255] W.T. Tsai, C.W. Lai, K.J. Hsien, The effects of pH and salinity on kinetics of paraquat sorption onto activated clay, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2003**, 224, 99-105.
- [256] F.-C. Wu, R.-L. Tseng, High adsorption capacity NaOH-activated carbon for dye removal from aqueous solution, *Journal of Hazardous Materials*. **2008**, 152, 1256-1267.
- [257] S. Nethaji, A. Sivasamy, G. Thennarasu, S. Saravanan, Adsorption of Malachite Green dye onto activated carbon derived from *Borassus aethiopum* flower biomass, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 181, 271-280.
- [258] D. Reddy, K. Sessaiah, A. Reddy, M.M. Rao, M. Wang, Biosorption of Pb^{2+} from aqueous solutions by *Moringa oleifera* bark: Equilibrium and kinetic studies, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 174, 831-838.
- [259] R. Sivaraj, C. Namasivayam, K. Kadirvelu, Orange peel as an adsorbent in the removal of acid violet 17 (acid dye) from aqueous solutions, *Waste management*. **2001**, 21, 105-110.
- [260] E.N. El Qada, S.J. Allen, G.M. Walker, Adsorption of methylene blue onto activated carbon produced from steam activated bituminous coal: a study of equilibrium adsorption isotherm, *Chemical Engineering Journal*. **2006**, 124, 103-110.
- [261] M. Brigante, G. Zanini, M. Avena, Effect of humic acids on the adsorption of paraquat by goethite, *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 184, 241-247.
- [262] D. Ait Sidhoum, M.M. Socías-Vicianá, M.D. Ureña-Amate, A. Derdour, E. González-Pradas, N. Debbagh-Boutarbouch, Removal of paraquat from water by an Algerian bentonite, *Applied Clay Science*. **2013**, 83–84, 441-448.

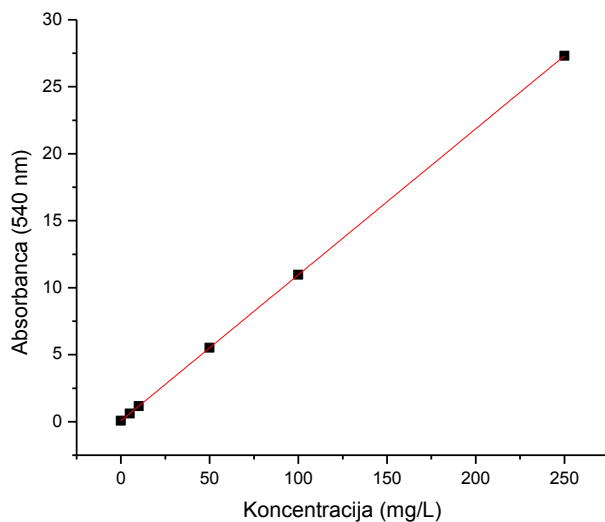
- [263] M.D. Pavlović, A.V. Buntić, K.R. Mihajlovski, S.S. Šiler-Marinković, D.G. Antonović, Ž. Radovanović, S.I. Dimitrijević-Branković, Rapid cationic dye adsorption on polyphenol-extracted coffee grounds—A response surface methodology approach, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **2014**, 45, 1691-1699.
- [264] M.S.F. Santos, G. Schaule, A. Alves, L.M. Madeira, Adsorption of paraquat herbicide on deposits from drinking water networks, *Chemical Engineering Journal*. **2013**, 229, 324-333.
- [265] M. Brigante, P.C. Schulz, Adsorption of paraquat on mesoporous silica modified with titania: Effects of pH, ionic strength and temperature, *Journal of Colloid and Interface Science*. **2011**, 363, 355-361.
- [266] W.T. Tsai, K.J. Hsien, Y.M. Chang, C.C. Lo, Removal of herbicide paraquat from an aqueous solution by adsorption onto spent and treated diatomaceous earth, *Bioresource Technology*. **2005**, 96, 657-663.
- [267] G.V. Kumar, P. Ramalingam, M.J. Kim, C.K. Yoo, M.D. Kumar, Removal of acid dye (violet 54) and adsorption kinetics model of using musa spp. waste: A low-cost natural sorbent material, *Korean Journal of Chemical Engineering*. **2010**, 27, 1469-1475.
- [268] A.E. Ofomaja, Y.-S. Ho, Effect of temperatures and pH on methyl violet biosorption by *Mansonia* wood sawdust, *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 5411-5417.
- [269] F.A. Aouada, Z. Pan, W.J. Orts, L.H.C. Mattoso, Removal of paraquat pesticide from aqueous solutions using a novel adsorbent material based on polyacrylamide and methylcellulose hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*. **2009**, 114, 2139-2148.
- [270] K. Khitrin, S. Khitrin, S. Fuks, D. Meteleva, E. Vtyurina, Effect of physical and chemical modification on the sorption capacity of hydrolyzed lignin, *Russian Journal of Applied Chemistry*. **2012**, 85, 1197-1200.
- [271] I. Cansado, P. Mourão, A. Falcão, M. Carrott, P. Carrott, The influence of the activated carbon post-treatment on the phenolic compounds removal, *Fuel Processing Technology*. **2012**, 103, 64-70.
- [272] I. Cansado, P. Mourão, A. Falcão, M. Carrott, P. Carrott, The influence of the activated carbon post-treatment on the phenolic compounds removal, *Fuel Processing Technology*. **2012**, 103, 64-70.

- [273] A. Ena, C. Pintucci, P. Carlozzi, The recovery of polyphenols from olive mill waste using two adsorbing vegetable matrices, *Journal of Biotechnology*. **2012**, 157, 573-577.
- [274] Z.P. Gao, Z.F. Yu, T.L. Yue, S.Y. Quek, Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols separation from kiwifruit juice using adsorbent resin, *Journal of Food Engineering*. **2013**, 116, 195-201.
- [275] Z.P. Gao, Z.F. Yu, T.L. Yue, S.Y. Quek, Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols separation from kiwifruit juice using adsorbent resin, *Journal of Food Engineering*. **2013**, 116, 195-201.
- [276] S.Y. Yoon, W.J. Choi, J.M. Park, J.-W. Yang, Selective adsorption of flavonoid compounds from the leaf extract of Ginkgo bilobaL, *Biotechnology techniques*. **1997**, 11, 553-556.
- [277] M. Scordino, A. Di Mauro, A. Passerini, E. Maccarone, Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 1965-1972.
- [278] C. Datta, A. Dutta, D. Dutta, S. Chaudhuri, Adsorption of polyphenols from ginger rhizomes on an anion exchange resin Amberlite IR-400 – Study on effect of pH and temperature, *Procedia Food Science*. **2011**, 1, 893-899.
- [279] F. Ferri, L. Bertin, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava, Recovery of low molecular weight phenols through solid-phase extraction, *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 166, 994-1001.
- [280] P. Li, Y. Wang, R. Ma, X. Zhang, Separation of tea polyphenol from *Green Tea Leaves* by a combined CATUFM-adsorption resin process, *Journal of Food Engineering*. **2005**, 67, 253-260.

PRILOG 1

STANDARDNE KRIVE

1.1. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet



Slika P-1.1. Standardna kriva za određivanje koncentracije boje kristal violet

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

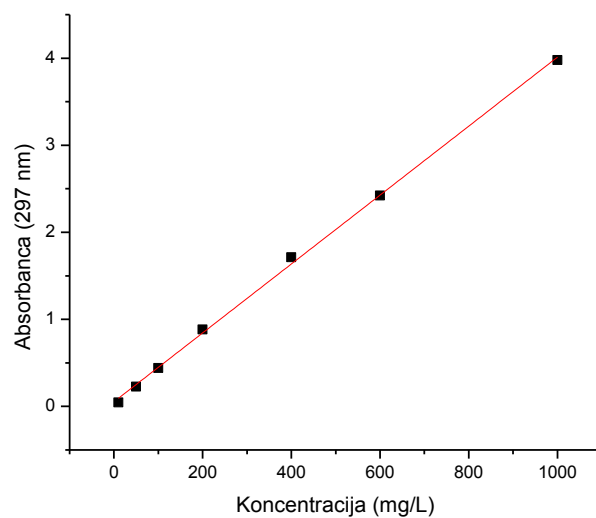
$$Y = 0.10897 X + 0.06924$$

$$R^2 = 0.9998$$

Y - absorbanca uzorka (540 nm),

X - koncentracija boje (mg/L).

1.2. Standardna kriva za određivanje koncentracije pesticida parakvata



Slika P-1.2. Standardna kriva za određivanje koncentracije pesticida parakvata

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

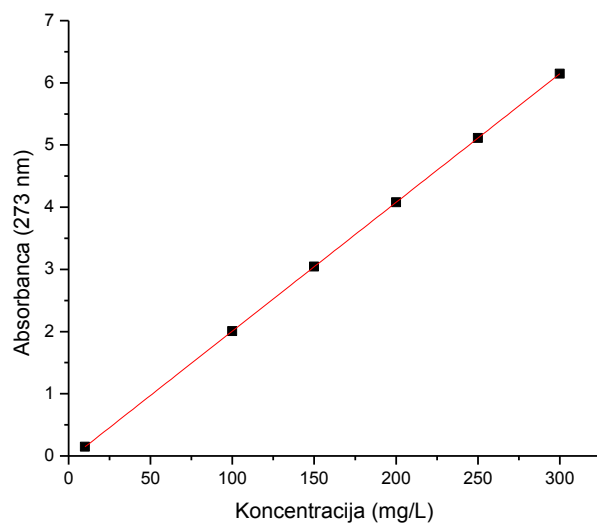
$$Y = 0.00396 X + 0.05273$$

$$R^2 = 0.9980$$

Y - absorbanca uzorka (297 nm),

X - koncentracija pesticida (mg/L).

1.3. Standardna kriva za određivanje koncentracije polifenola epigalokatehin galata



Slika P-1.3. Standardna kriva za određivanje koncentracije polifenola EGKG

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

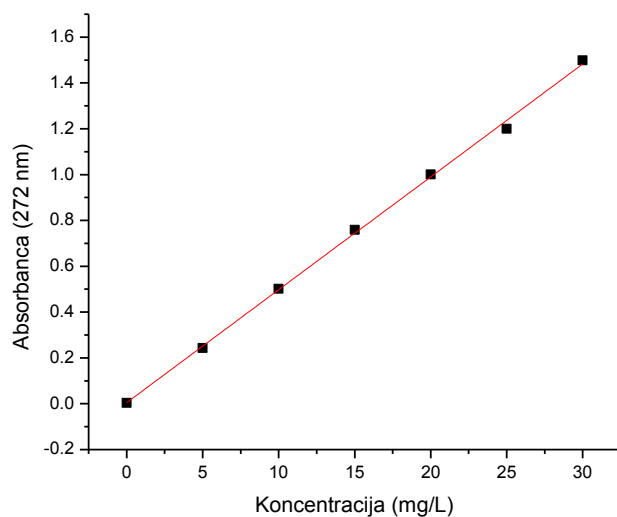
$$Y = 0.02069 X - 0.06086$$

$$R^2 = 0.9997$$

Y - absorbanca uzorka (273 nm),

X - koncentracija polifenola (mg/L).

1.4. Standardna kriva za određivanje koncentracije kofeina



Slika P-1.4. Standardna kriva za određivanje sadržaja kofeina

Dobijena jednačina standardne krive je :

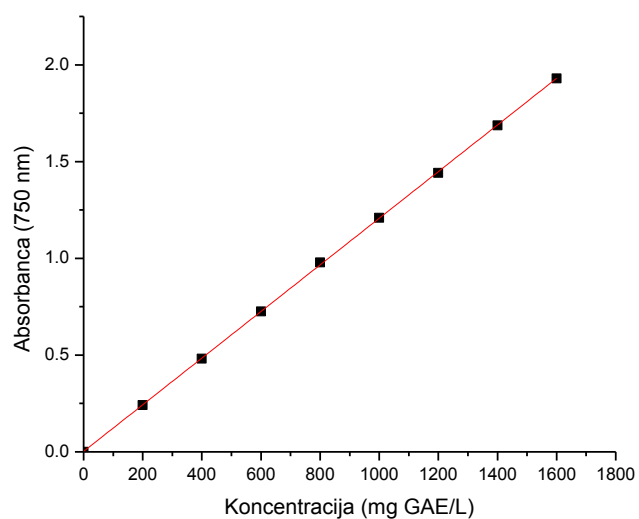
$$Y = 0.04925 X + 0.00504$$

$$R^2 = 0.9986$$

Y – absorbanca uzorka (272 nm),

X – koncentracija kofeina (mg/L).

1.5. Standardna kriva za određivanje sadržaja ukupnih polifenola



Slika P-1.5. Standardna kriva za određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Dobijena jednačina standardne krive je:

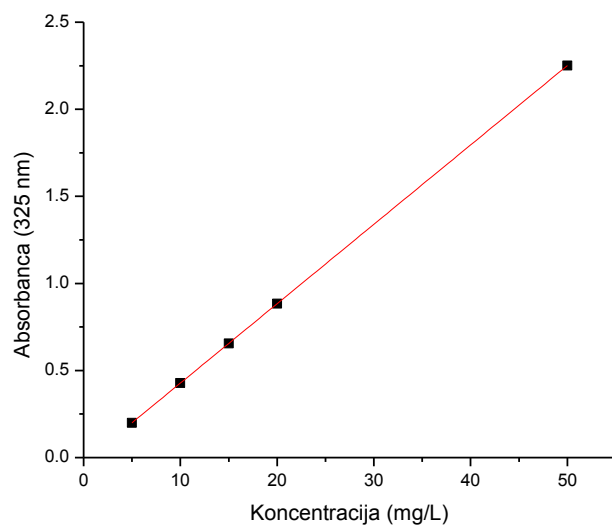
$$Y = 0.0012 X + 0.0024$$

$$R = 0.9999$$

Y – absorbanca uzorka (750 nm),

X – koncentracija ukupnih polifenola (mg GAE/L).

1.6. Standardna kriva za određivanje sadržaja hlorogenske kiseline



Slika P-1.6. Standardna kriva za određivanje sadržaja hlorogenske kiseline

Dobijena jednačina standardne krive je:

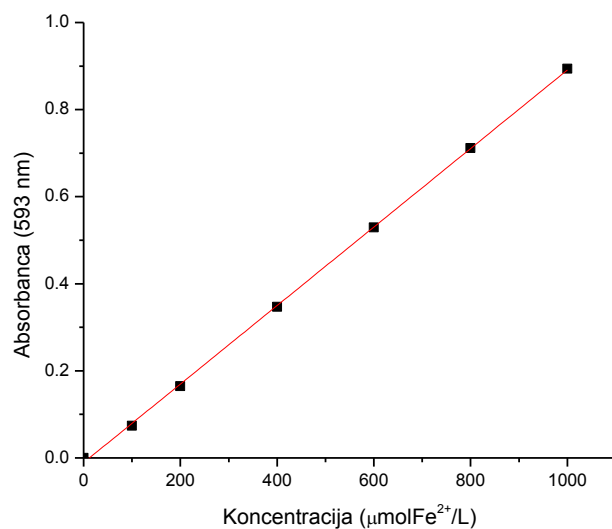
$$Y = 0.04556 X - 0.02772$$

$$R = 0.9999$$

Y – absorbanca uzorka (325 nm),

X – koncentracija hlorogenske kiseline (mg/L).

1.7. Standardna kriva za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata korišćenjem FRAP metode



Slika P-1.7. Standardna kriva za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata korišćenjem FRAP metode

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

$$Y = 0.000911 X - 0.01733$$

$$R^2 = 0.9997$$

Y - absorbanca uzorka,

X – koncentracija Fe^{2+} ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$).

PRILOG 2

OPTIMIZACIJA: VREDNOSTI PROCESNIH PROMENLJIVIH I ODZIVA

Tabela P-2.1. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela I optimizacije mikrotalasne ekstrakcije polifenola i drugih antioksidanasa

Proba	Faktori			Odzivi			
	A	B	C	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	40.00	6.00	400	12.1	486.3	95.3	5.63
2	180.0	6.00	240	18.6	307.4	58.2	2.42
3	40.00	12.0	400	14.5	401.2	93.9	5.33
4	110.0	9.00	400	17.7	473.7	93.9	3.86
5	180.0	12.0	240	39.9	269.8	48.6	2.03
6	110.0	9.00	240	13.9	554.6	89.0	3.95
7	209.0	9.00	400	40.3	173.6	51.5	2.77
8	180.0	12.0	400	45.1	241.9	65.9	1.99
9	11.00	9.00	400	14.9	488.3	90.3	5.59
10	11.00	9.00	240	10.2	538.2	91.1	4.45
11	110.0	9.00	560	22.7	459.2	95.0	4.84
12	110.0	9.00	400	16.9	468.3	94.2	3.91
13	180.0	12.0	560	48.1	203.3	68.9	2.31
14	110.0	9.00	560	21.5	434.6	95.2	4.86
15	110.0	4.76	560	14.2	358.7	91.2	4.75
16	40.00	6.00	240	8.90	542.8	98.9	4.65
17	110.0	13.2	400	26.2	311.9	88.9	3.41
18	110.0	9.00	240	12.1	558.3	89.4	3.58
19	11.00	9.00	560	18.1	546.5	83.6	4.94
20	110.0	4.76	240	10.5	493.7	91.1	3.42
21	209.0	9.00	560	42.2	161.5	57.4	2.68
22	180.0	6.00	400	25.8	242.8	66.8	2.83
23	110.0	9.00	240	12.0	556.3	89.2	4.17
24	110.0	4.76	400	11.9	374.6	91.3	5.22
25	110.0	9.00	560	21.8	427.4	92.4	4.25
26	40.00	6.00	560	15.9	421.1	91.1	4.96
27	40.00	12.0	240	9.08	416.8	89.8	4.83
28	180.0	6.00	560	22.5	218.5	73.9	3.30
29	110.0	9.00	400	18.6	472.4	93.9	3.94
30	40.00	12.0	560	21.9	367.1	89.8	5.01
31	209.0	9.00	240	39.0	241.3	37.2	1.08
32	110.0	13.2	560	36.0	303.7	87.4	3.89
33	110.0	13.2	240	19.8	352.8	76.9	4.41

A: vreme ekstrakcije (s);

B: odnos rastvarač/čvrsta faza (mL/g);

C: snaga mikrotalasnog zagrevanja (W);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg/g s.m.);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola (mgGAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: DPPH (%);

Y₄: FRAP (mmol Fe²⁺/L).

Tabela P-2.2. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela II optimizacije mikrotalasne ekstrakcije polifenola i drugih antioksidanasa

Proba	Faktori		Odzivi			
	A	B	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	50	360	53.55	192.32	84.40	1.80
2	65	40	28.23	279.96	87.37	2.28
3	80	360	42.41	217.97	85.95	2.11
4	35	360	53.80	194.42	84.63	1.83
5	20	200	38.52	285.24	88.04	2.44
6	80	360	33.12	195.27	86.27	1.98
7	20	200	31.58	284.82	87.41	2.46
8	20	360	38.49	193.16	88.39	2.12
9	50	360	49.88	212.08	84.46	2.03
10	65	360	46.65	193.16	84.46	2.06
11	80	40	19.75	288.61	88.94	2.36
12	20	40	22.10	341.49	89.30	2.70
13	50	200	46.55	209.98	86.18	1.94
14	35	200	38.72	211.24	85.62	1.86
15	20	40	17.15	398.95	90.69	3.02
16	65	200	38.03	215.45	85.34	2.01
17	35	40	30.24	295.54	88.99	2.36
18	80	40	11.93	234.61	89.25	2.08
19	80	200	32.25	217.97	86.38	2.02
20	20	360	44.74	194.90	88.21	1.87
21	50	40	32.03	251.24	87.24	2.21
22	80	200	28.57	234.37	86.65	1.82
23	50	200	43.08	175.08	85.98	1.79
24	50	40	28.28	311.14	88.13	2.46

A: koncentracija etanola (%);

B: vreme ekstrakcije (s);

Y₁: prinos ekstrakcije (mg/g s.m.);

Y₂: sadržaj ukupnih polifenola (mgGAE/g s.m. ekstrakta);

Y₃: DPPH (%);

Y₄: FRAP (mmol/L).

Tabela P-2.3. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije procesa adsorpcije boje kristal violet na aktiviranu kafu

Proba	Faktori				Odzivi	
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂
1	5	150	30	6	15.493	36.878
2	15	50	315	6	3.7708	83.125
3	15	150	315	9	9.1806	91.806
4	25	150	600	6	4.2981	90.802
5	15	150	600	9	9.4544	94.544
6	15	150	30	9	6.0248	66.248
7	15	150	600	3	8.8679	88.679
8	15	150	315	3	8.5724	85.724
9	25	50	315	6	8.8637	92.186
10	15	250	315	6	16.150	96.898
11	15	50	315	6	3.9899	89.696
12	5	50	315	6	7.8850	52.480
13	5	250	315	6	36.108	83.383
14	15	150	315	6	9.4677	94.677
15	15	150	315	6	8.5249	85.249
16	25	250	315	6	4.3993	93.693
17	5	150	600	6	24.730	84.340
18	25	150	30	6	4.4481	74.136
19	15	150	30	3	3.7840	40.840
20	15	150	315	6	8.5148	85.148
21	15	150	315	3	8.2782	82.782
22	15	150	315	9	9.5119	95.119
23	15	150	315	6	9.0615	90.615
24	15	250	315	6	16.001	96.008
25	15	150	315	6	9.3088	93.088
26	15	250	600	6	17.493	95.297
27	15	50	315	3	2.8371	79.112
28	15	150	600	6	9.5646	95.646
29	15	150	315	6	8.9251	91.180
30	15	150	30	6	5.9250	74.993
31	15	250	30	6	10.585	55.520
32	15	250	315	9	15.667	94.000
33	25	150	315	6	5.3506	89.177
34	15	50	30	6	1.6980	56.499
35	15	250	315	3	13.845	77.103
36	5	150	315	6	21.681	75.604
37	15	150	315	6	8.9213	76.033
38	15	150	315	6	8.9309	89.617
39	15	150	315	6	8.9284	91.110
40	25	150	315	6	5.5334	92.224
41	15	150	600	6	9.1781	91.781
42	25	150	315	3	6.9594	89.324
43	15	50	600	6	3.2997	89.904
44	15	150	315	6	8.9267	91.667
45	5	150	315	6	21.011	70.037
46	15	50	315	9	3.8979	86.937
47	15	150	30	6	6.2729	65.729
48	5	150	315	9	24.471	88.904
49	25	150	315	9	2.7154	87.423
50	5	150	315	3	16.497	41.895

A: masa adsorbenta (g/L); B: koncentracija boje (mg/L); C: vreme mešanja (s); D: pH;
Y₁: adsorpcioni kapacitet (mg/g); Y₂: količina uklonjene boje iz rastvora (%).

Tabela P-2.4. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije procesa adsorpcije pesticida parakvata na aktiviranu kafu

Proba	Faktori				Odzivi	
	A	B	C	D	Y ₁	Y ₂
1	12.5	600	37.5	5	24.90	8.593
2	5.0	600	37.5	3	1.766	1.816
3	5.0	600	37.5	7	26.78	29.34
4	5.0	200	37.5	5	20.47	7.323
5	12.5	600	60	7	20.14	8.827
6	20.0	200	37.5	5	10.29	0.920
7	12.5	1000	15	5	29.38	19.43
8	12.5	200	15	5	21.70	3.104
9	12.5	600	15	3	9.260	3.808
10	12.5	600	60	3	5.632	2.316
11	20.0	600	37.5	7	26.29	7.201
12	12.5	600	37.5	5	25.27	13.06
13	5.0	600	60	5	7.313	7.998
14	12.5	600	37.5	5	24.27	10.62
15	12.5	1000	60	5	27.00	17.86
16	20.0	600	37.5	3	9.690	2.490
17	12.5	1000	37.5	3	18.45	12.93
18	12.5	600	37.5	5	22.93	10.03
19	12.5	600	15	7	33.99	14.90
20	20.0	600	15	5	26.00	7.109
21	5.0	1000	37.5	5	16.91	27.97
22	12.5	1000	37.5	7	29.56	20.88
23	5.0	600	15	5	21.82	23.86
24	12.5	200	37.5	3	3.056	0.477
25	12.5	600	37.5	5	25.48	11.15
26	12.5	200	60	5	6.036	0.864
27	20.0	600	60	5	21.49	5.876
28	20.0	1000	37.5	5	33.64	13.91
29	12.5	200	37.5	7	21.63	3.116
30	12.5	600	37.5	5	24.90	8.593

A: masa adsorbenta (g/L);

B: koncentracija pesticida (mg/L);

C: vreme mešanja (min);

D: pH;

Y₁: adsorpcioni kapacitet (mg/g);

Y₂: količina uklonjenog pesticida iz rastvora (%).

Tabela P-2.5. Vrednosti procesnih promenljivih i odziva u eksperimentalnom dizajnu modela optimizacije procesa adsorpcije polifenola epigalokatehin galata na oksidovanu kafu

Proba	Faktori			Odziv Y
	A	B	C	
1	6	0.3	100	54.48
2	6	0.1	100	43.75
3	3	0.3	200	19.00
4	6	0.2	200	68.52
5	6	0.2	200	67.21
6	6	0.2	200	66.17
7	6	0.2	200	68.50
8	3	0.2	100	38.53
9	3	0.2	300	32.60
10	9	0.2	100	51.28
11	6	0.3	300	40.25
12	3	0.1	200	22.64
13	6	0.2	200	61.10
14	9	0.2	300	72.94
15	6	0.2	200	61.11
16	9	0.1	200	60.71
17	6	0.1	300	72.34
18	9	0.3	200	45.54

A: visina stuba nosača (cm);

B: zapremina rastvora EGKG (L);

C: koncentracija rastvora EGKG (mg/L);

Y: količina adsorbovanih polifenola EGKG na nosaču (%).

PRILOG 3

SPISAK TERMINA I DEFINICIJE POJMOVA KORIŠĆENIH U DISERTACIJI

- **Aktivirana kafa** - otpadna kafa bez antioksidanasa aktivirana mikrotalasima i korišćena u svojstvu adsorbenta za ispitivanje adsorpcije tri vrste zagađivača.
- **Antioksidansi** - polifenoli sa antioksidativnom aktivnošću.
- **Ekstrakt** - etanolni izolat antioksidanasa iz otpadne kafe, dobijen metodom klasične i/ili mikrotalasne ekstrakcije.
- **Oksidovana kafa** - aktivirana kafa tretirana oksidacionim sredstvom (vodonik-peroksidom), u cilju potpunog neutralisanja neekstrahovanih polifenola. Korišćena je kao nosač u kontinualnom režimu adsorpcije polifenola epigalokatehin galata.
- **Otpadna kafa** - osušeni ostaci kafe prikupljeni nakon pripreme espresso napitka.
- **Otpadna kafa bez antioksidanasa** - ostaci otpadne kafe nakon ekstrakcije antioksidanasa.

PRILOG 4

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U DISERTACIJI

- **ABTS** - 2,2'-azino-bis(3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonska kiselina)
- **ANOVA** - analiza varijanse
- **BET** - Brauner-Emet-Teler (*Brunauer-Emmett-Teller*)
- **BHT** - butilhidroksi toluen
- **CCD** - centralni kompozitni dizajn (*Central Composite Design*)
- **CQA** - kafeoilhinska kiselina (*Caffeoyiquinic acid*)
- **DPPH** - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
- **EGKG** - epigalokatehin galat
- **FRAP** - antioksidativni potencijal neutralizacije jona gvožđa (*Ferric Reducing-Antioxidant Power*)
- **FTIR** - Furierova (*Fourier*) transformacija infracrvenog zračenja (*Fourier Transform Infrared Radiation*)
- **GAE** - ekvivalenti galne kiseline (*Gallic Acid Equivalents*)
- **GK** - galna kiselina
- **HK** - hlorogenska kiselina
- **HPLC** - tečna hromatografija pod visokim pritiskom (*High Pressure Liquid Chromatography*)
- **IC₅₀** - koncentracija antioksidanasa potrebna za inhibiciju 50% DPPH radikala u reakcionoj smeši (*Inhibition Concentration*)
- **ICO** - Internacionalna organizacija kafe (*International Coffee Organization*)
- **KV** - kristal violet
- **ORAC** - antioksidativni potencijal neutralizacije kiseoničnih radikala (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- **pH_{pzc}** - pH vrednost nultog naelektrisanja (*Point of Zero Charge*)
- **RSM** - metoda odzivne površine (*Response Surface Methodology*)

- **SEM** - skenirajući elektronski mikroskop
- **s.m.** - suva materija
- **SUP** - sadržaj ukupnih polifenola
- **TEAC** - antioksidativni potencijal u ekvivalentima troloksa
(*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
- **TRAP** - mera neutralizacije ukupnih slobodnih radikala
(*Total Radicaltrapping Antioxidant Parameter*)

Biografija

Marija Pavlović je rođena 19. jula 1987. godine u Surdulici, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju „Svetozar Marković“.

Školske 2006/2007. godine upisala je Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Diplomirala je 7. septembra 2010. godine, sa prosečnom ocenom 8.86, odbranom Završnog rada pod nazivom: „Antioksidativna aktivnost zelene kafe“.

Oktobra 2010. godine upisala je Master studije na istom fakultetu, u okviru studijskog programa: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, smer: Tehnologija hrane. 22. jula 2011. godine stekla je zvanje Master inženjer tehnologije, odbranom Završnog Master rada pod nazivom: „Antioksidativna aktivnost kafe“. Prosečna ocena u toku master studija bila je 9.75.

U periodu od 8. avgusta – 5. oktobra 2011. godine boravila je na radnoj praksi na Univerzitetu „Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara – Sao Paulo“, u Brazilu.

Školske 2011/2012. godine upisala je Doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, u Beogradu, na odseku za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Od marta 2012. godine do aprila 2015. godine angažovana je kao stipendista Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, na projektu „Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije“ (TR 31035), pod mentorstvom prof. Dr. Slavice Šiler-Marinković. Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 10.0, a 10. oktobra 2013. godine odbranila je sa ocenom 10 i Završni ispit pod nazivom: „Iskorišćenje nus-proizvoda od prerade kafe za pripremu aktivnog uglja u adsorpcionim procesima“. Od 01.04.2015. godine zaposlena je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Katedra za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, u okviru istog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja TR 31035. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 11.05.2015. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Павловић Марија
број индекса 4056/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИЗОЛОВАЊЕ БИОАКТИВНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ ОТПАДНЕ КАФЕ
И ЊЕНО ПОТПУНО ИСКОРИШЋЕЊЕ КАО АДСОРБЕНТА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 05.03.2015. год.

Павловић Марија

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора МАРИЈА ПАВЛОВИЋ
Број индекса 4056/2011
Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА
Наслов рада ИЗОЛОВАЊЕ БИОАКТИВНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ ОТПАДНЕ КАФЕ И
ЊЕНО ПОТПУНО ИСКОРИШЋЕЊЕ КАО АДСОРБЕНТА
Ментор ПРОФ. ДР. СЛАВИЦА ШИДЕР-МАРИНКОВИЋ, РЕД. ПРОФ. ТЕХНОЛОШКО-МЕТА-
ЛУРШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ
Потписани/а ПАВЛОВИЋ МАРИЈА

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 05.03.2015. год.

Marica Pavlovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИЗОЛОВАЊЕ БИОАКТИВНИХ ЈЕДИЦА ИЗ ОТПРАТНЕ КАФЕ И ЊЕНО ПОПУНО ИКОРИШЋЕЊЕ КАО АДОРБЕНТА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

у Београду, 05.03.2015 год.

Ћабловић Маруја