

Utjecaj ekstrakcijskih uvjeta na izdvajanje bioaktivnih spojeva iz ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha

Vrtar, Sonja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:766534>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2021.

Sonja Vrtar

1351/PI

**UTJECAJ EKSTRAKCIJSKIH
UVJETA NA IZDVAJANJE
BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
LJUSKE KAKAOVOG ZRNA I
LJUSKE ORAHA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda, na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes te uz pomoć više asistentice dr. sc. Aleksandre Vojvodić Cebin.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta *Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina* (IP-2018-01-9717, Hrvatska zaklada za znanost).

ZAHVALA

Veliko hvala dragoj mentorici, prof. dr. sc. Draženki Komes, na susretljivosti, podršci i svim savjetima tijekom studija.

Hvala i višoj asistentici, dr. sc. Aleksandri Vojvodić Cebin, na pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Najveće hvala mami i bratu na podršci, a ovaj rad posvećujem onomu koji je prekratko bio s nama, tati.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ EKSTRAKCIJSKIH UVJETA NA IZDVAJANJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LJUSKE KAKAOVOG ZRNA I LJUSKE ORAHA

Sonja Vrtar, 1351 PI

Sažetak:

Cilj ovoga rada bio je istražiti ljusku kakaovog zrna te ljusku oraha kao potencijalne inovativne izvore polifenola i metilksantina te ispitati učinkovitost konvencionalnih i inovativnih tehnika ekstrakcije u izdavanju istih. Ekstrakti su pripremljeni korištenjem vodeno - etanolnih otopina, u kombinaciji s tri konvencionalne tehnike ekstrakcije (infuzija, dekokcija, maceracija) te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Dobivenim ekstraktima određen je udjel ukupnih polifenola, ukupnih proantocijanidina i antioksidacijski kapacitet primjenom spektrofotometrijskih metoda, kao i udjel pojedinačnih spojeva primjenom HPLC-DAD analize. Najviši udjeli mjerenih parametara određeni su u ekstraktima pripremljenima dekokcijom i infuzijom, dok je primjena ultrazvuka rezultirala nižom ekstrakcijskom učinkovitošću. Od bioaktivnih spojeva u ljusci kakaovog zrna dominirali su teobromin (0,66 %) i proantocijanidini (0,13 %). U ljusci oraha, uz proantocijanidine, najviše su bili zastupljeni derivati hidroksibenzojevih kiselina, među kojima se isticala elaginska kiselina (0,015 %).

Ključne riječi: *ekstrakcija, ljuska kakaovog zrna, ljuska oraha, metilksantini, polifenoli,*

Rad sadrži: 59 stranica, 22 slike, 7 tablica, 150 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. prof. dr. sc. Draženka Komes
3. prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjena)

Datum obrane: 6. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb Graduate Thesis
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE IMPACT OF EXTRACTIONS CONDITIONS ON BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTABILITY FROM COCOA BEAN SHELL AND WALNUT SHELL

Sonja Vrtar, 1351 PI

Abstract:

The aim of this study was to investigate cocoa bean shell and walnut shell as potential innovative sources of polyphenols and methylxanthines, and to evaluate the effectiveness of conventional and innovative extraction methods in terms of their isolation. The extracts were prepared using aqueous - ethanolic solutions, combined with three conventional extraction techniques (infusion, decoction, maceration) and ultrasonically assisted extraction. The obtained extracts were evaluated for total polyphenols and total proanthocyanidins contents, as well as the antioxidant capacity, using spectrophotometric methods, while the contents of individual compounds was determined using HPLC-DAD analysis. The highest results of measured parameters were determined in extracts prepared by decoction and infusion, while the application of ultrasound resulted in generally lower extraction efficiencies. Among the bioactive compounds in cocoa bean shell, theobromine (0,66 %) and proanthocyanidins (0,13 %) dominated. In addition to proanthocyanidins, hydroxybenzoic acid derivatives were the most represented in the walnut shell, among which especially ellagic acid (0,015 %).

Keywords: *cocoa bean shell, extraction, methylxanthines, polyphenols, walnut shell*

Thesis contains: 59 pages, 22 figures, 7 tables, 150 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Draženka Komes, Full Professor

Technical support and assistance: PhD. Aleksandra Vojvodić Cebin

Reviewers:

1. PhD. Božidar Šantek, Full professor
2. PhD. Draženka Komes, Full professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full professor
4. PhD. Nada Vahčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: 6th July 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. AGRO-INDUSTRIJSKI OTPAD	2
2.1.1. Mogućnosti primjene agro-industrijskog otpada	3
2.1.2. Ljuska kakaovog zrna	7
2.1.3. Ljuska oraha	9
2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI	11
2.2.1. Polifenolni spojevi	12
2.2.1.1. Flavonoidi	13
2.2.2. Metilksantini	16
2.2.3. Antioksidacijski potencijal bioaktivnih spojeva	16
2.3. EKSTRAKCIJA	18
2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije	18
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. MATERIJAL	22
3.1.1. Kemikalije	22
3.1.2. Pribor i aparatura	24
3.2. METODE RADA	25
3.2.1. Priprema ekstrakata	25
3.2.1.1. Konvencionalne ekstrakcije	25
3.2.1.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	26
3.2.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata	27
3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola	27
3.2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	28
3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	29
3.2.2.4. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina	30
3.2.2.5. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC metodom	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. BIOAKTIVNI SASTAV EKSTRAKATA LJUSKE KAKAOVOG ZRNA I LJUSKE ORAHA	34
4.1.1. Udjel ukupnih polifenola	34
4.1.2. Antioksidacijski kapacitet	36
4.1.3. Udjel ukupnih proantocijanidina	38
4.1.4. Udjel pojedinačnih bioaktivnih spojeva	40
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	47



UVOD

1. UVOD

U današnje vrijeme otpad u proizvodnji hrane postaje sve veći izazov u postizanju održive budućnosti. S obzirom da u svijetu svake godine nastaju velike količine agro-industrijskog otpada, istražuju se različite mogućnosti njegove primjene s ciljem potpunog iskorištavanja njegovog potencijala, što uključuje proizvodnju stočne hrane, biogoriva, ekološki prihvatljivog građevinskog materijala, industrijski važnih enzima, biorazgradivih polimera, limunske ili mliječne kiseline, aroma, pigmenata, askorbinske kiseline, fruktooligosaharida i pektina. Osim navedenoga, u zadnje vrijeme sve više znanstvenih istraživanja posvećuje se izdvajanju bioaktivnih spojeva, posebice polifenola iz biljnog agro-industrijskog otpada i njihovoj daljnjoj implementaciji u različite funkcionalne prehrambene proizvode.

Kakao (*Theobroma cacao* L.) i orah (*Juglans regia* L.) su biljne vrste koje imaju značajnu primjenu u prehrambenoj industriji, posebice konditorskoj. Njihovom preradom generiraju se relativno velike količine agro-industrijskog otpada. Ljuska kakaovog zrna nastaje kao nusproizvod u proizvodnji čokolade, a s obzirom na kemijski sastav predstavlja značajan izvor vlakana, polifenola i metilksantina. Preradom oraha zaostaju ljuska i pregrada te vanjska zelena mesnata ljuska. Ljuska oraha predstavlja izvor galne i elaginske kiseline kao bioaktivnih, polifenolnih spojeva.

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se u biljkama sintetiziraju kao obrambene komponente protiv fizioloških i okolišnih čimbenika (Rasouli i sur., 2017). Najzastupljeniji su u vanjskim biljnim tkivima koja se često odbacuju tijekom prerade neke biljne sirovine. Uz polifenole, za ljusku kakaovog zrna značajni su metilksantini - purinski alkaloidi s brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Brojna znanstvena istraživanja usmjerena su upravo na optimiranje uvjeta ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog agro-industrijskog otpada konvencionalnim i inovativnim tehnikama.

Konvencionalne tehnike ekstrakcije podrazumijevaju uporabu otapala sa ili bez primjene topline, dok se u inovativnim ekstrakcijama primjenjuje specifična tehnologija koja se temelji na unosu određenih oblika energije u matriks uzorka (Bursać-Kovačević i sur., 2018).

Cilj ovoga rada je istražiti ljusku kakaovog zrna te ljusku oraha kao potencijalne inovativne izvore polifenola i metilksantina te ispitati učinkovitost konvencionalnih i inovativnih tehnika ekstrakcije u izdvajanju istih.



TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. AGRO-INDUSTRIJSKI OTPAD

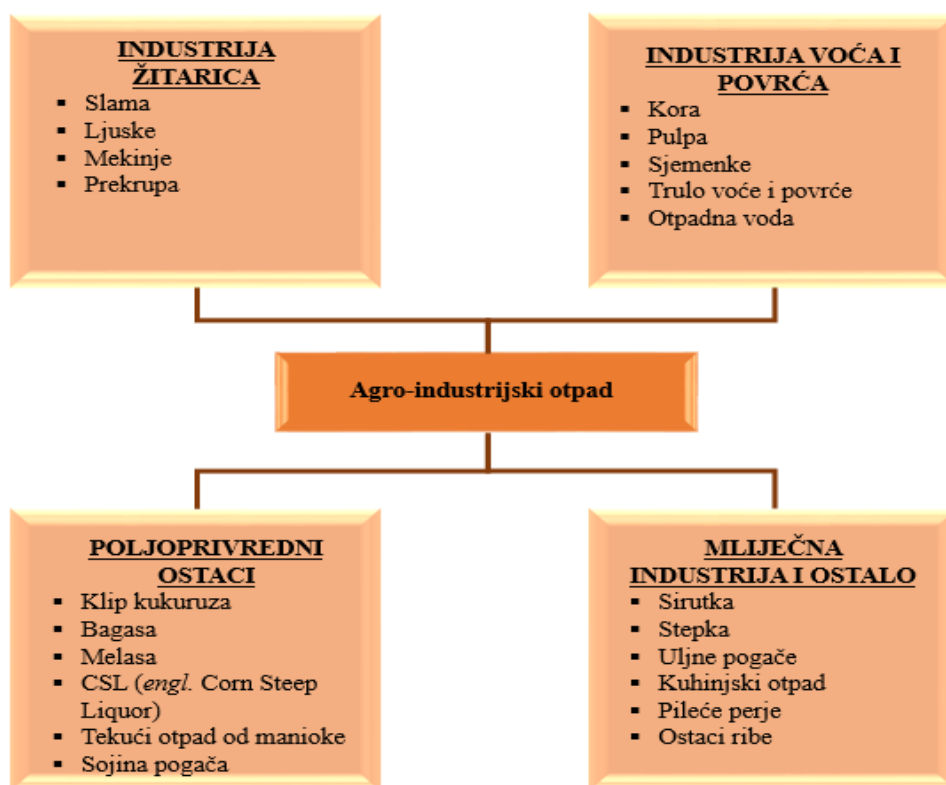
U današnje vrijeme, globalni naponi u borbi za prehranjivanje rastućeg svjetskog stanovništva nemaju jedino za cilj povećati svjetsku proizvodnju hrane, već sve više smanjiti gubitke i otpad u proizvodnji hrane u zemljama u razvoju i u razvijenim zemljama (Manoj i sur., 2020). Izrazi „gubitci“ i „otpad“ u proizvodnji hrane obično se koriste za opisivanje ukupnih gubitaka i otpada unutar različitih segmenata lanca opskrbe hranom: berbe, prerade, proizvodnje, distribucije i potrošnje (Vilarino i sur., 2017). Gubici u proizvodnji hrane odnose se na smanjenje mase jestive hrane koja nastaje u proizvodnji, fazi nakon berbe i obrade u lancu opskrbe hranom te prije potrošnje. Otpad u proizvodnji hrane odnosi se na hranu koja je dobre kvalitete i pogodna za prehranu ljudi, ali se ne konzumira jer se odbacuje na kraju lanca proizvodnje i opskrbe (Lipinski i sur., 2013). Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) procijenila je 2011. godine da se približno 1,3 milijardi tona hrane godišnje na globalnoj razini izgubi ili postane otpad što iznosi 24 % ukupno proizvedene hrane (Vilarino i sur., 2017; Lauri i sur., 2012). Do gubitaka i otpada u proizvodnji hrane može doći u bilo kojem segmentu proizvodno - opskrbnog lanca. Tijekom berbe nastane približno 20 % gubitaka i otpada, dok tijekom proizvodnje nastaje 24 - 30 % globalnog gubitka i otpada u proizvodnji hrane, a u fazi potrošnje 30 - 35 % (Lauri i sur., 2012; Lipinski i sur., 2013). U pogledu gubitaka u proizvodnji hrane odabranih prehrambenih sirovina, najveći gubici ostvaruju se u proizvodnji voća i povrća (39 - 44 %), zatim slijede korijeni i gomolji s 33 % te žitarice (20 - 22 %), dok u proizvodnji mesa nastane relativno mali udjel gubitaka i otpada (Lauri i sur., 2012).

Agro-industrijskim otpadom smatra se otpad koji nastaje tijekom proizvodnje hrane, a kako bi se smanjila njegova količina potrebno je razviti i primjenjivati adekvatnu strategiju gospodarenja istim. Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) 2013. godine predstavila je plan ciljanog smanjenja gubitaka i otpada hrane za pola do 2030. godine na globalnoj razini (Omolayo i sur., 2021). Na osnovu toga, mnoge države istražuju načine smanjenja gubitaka i otpada u proizvodnji hrane na lokalnoj i regionalnoj razini (Omolayo i sur., 2021).

U literaturi se, u kontekstu gospodarenja otpadom iz proizvodnje hrane, koristi „obrnuta piramida“ kao hijerarhija za maksimalno smanjenje količine otpada prema kojoj se prvenstveno predlaže: (i) prevencija kroz minimalizaciju viška hrane i otpada od hrane, zatim (ii)

preraspodjela, doniranje i redistribucija viška hrane, a potom (iii) prenamjena bačene hrane u stočnu hranu. Niže prioriteta namjena uključuje (iv) industrijsku upotrebu ostataka hrane i kompostiranje, nakon čega slijedi (v) odlaganje, kao način zbrinjavanja s najnižim prioritetom (Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Država, 2019).

U prehrambenoj industriji nastaju velike količine otpada u proizvodnji voća i povrća (Slika 1) kao što su kora krumpira, jabuke ili citrusa, pulpa ili sjemenke. Nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki, zaostaje velika količina prerađenih ostataka koji su poznati kao uljne pogače. Taj agro-industrijski otpad je relativno jeftin, a sadrži veliku količinu sastojaka koji imaju neograničeni potencijal (Sadh i sur., 2018). U industriji žitarica nastaje agroindustrijski-otpad poput slame, ljuške ili mekinja.



Slika 1. Neke vrste agro-industrijskog otpada (Panesar i sur., 2015)

2.1.1. Mogućnosti primjene agro-industrijskog otpada

Proizvodnja stočne hrane jedan je od najčešćih načina ponovnog korištenja agro-industrijskog otpada (Ajila i sur., 2012). Iako je agro-industrijski otpad jeftin izvor hranjivih sastojaka, mnogo je ograničenja za njegovu upotrebu u prehrani životinja poput: udjela proteina i njihove

biološke vrijednosti, probavljivosti, energetske vrijednosti, udjela vitamina i minerala, udjela vlakana te prisutnosti za životinje potencijalno toksičnih spojeva. Kada agro-industrijski otpad nije primjenjiv za prehranu životinja, zbrinjava se postupkom kompostiranja koje podrazumijeva konverziju biljnog supstrata u stabilan produkt – kompost, uz pomoć zajednice različitih mikroorganizama te je praćeno oslobađanjem plinova (ugljikov dioksid i amonijak), topline i vode (Kučić Grgić i sur., 2019).

Danas se velika pažnja pridaje razvoju ekološki prihvatljivih pesticida, tzv. biopesticida za suzbijanje štetočina i osiguranje održive poljoprivredne proizvodnje. Neke vrste agro-industrijskog otpada (odbačeni krumpir, srebrna pokožica kave i bagasa šećerne trske) mogu se koristiti u proizvodnji spora *Beauveria bassiana* za dobivanje biopesticida primjenjivih za kontrolu štetnika banane, šećerne trske, soje i kave (Santa i sur., 2005).

Agro-industrijski otpad također se koristi za proizvodnju različitih vrsta biogoriva, kao alternativa fosilnim gorivima, od kojih se najčešće koristi bioetanol (Sadh i sur., 2018).

Također, agro-industrijski otpad može se koristiti i u proizvodnji ekološki prihvatljivog građevinskog materijala. Ljuska ili talog kave te bagasa pokazuju potencijal kao alternativni aditivi glinenim opekama (Yasodha, 2018).

Agro-industrijski otpad poput pšenične slame, bagase, rižinih mekinja, pšeničnih mekinja itd. sadrži velike količine prirodnog izvora ugljika pa se može koristiti za proizvodnju industrijski važnih enzima (Jecu, 2000).

Osim navedenoga, agro-industrijski otpad ima primjenu i u proizvodnji biorazgradivih polimera, koje sintetiziraju razni mikroorganizmi, primjerice iz hidrolizata rižine slame (Sindhu i sur., 2013).

S obzirom da limunska kiselina ima široku primjenu u prehrambenoj industriji, veliki je interes znanstvenika za pronalaženjem jeftinih sirovina za njezinu proizvodnju. Proizvodnja limunske kiseline, ali i drugih organskih prehrambenih kiselina, poput mliječne, fermentacijom iz agro-industrijskog otpada najekonomičniji je i najčešći način, a mogu se koristiti različite vrste agro-industrijskog otpada, poput otpada iz prerade ananasa, komina jabuke i kore citrusa (Torrado i sur., 2011). Istraživanje Couto i Sanroman (2006) pokazalo je da se mliječna kiselina može proizvesti od bagase šećerne trske ili otpada nakon prerade mrkve.

Isto tako, mnoga istraživanja usmjerena su i na primjenu agro-industrijskog otpada u proizvodnji pigmenata visoke stabilnosti i čistoće, pri čemu se najčešće koriste različiti

nusproizvodi prerade voća. Zbog svog prirodnog podrijetla, mikrobnno proizvedeni pigmenti imaju nekoliko prednosti u odnosu na sintetske, poput biorazgradivosti, niske toksičnosti te ekološke prihvatljivosti (Yusuf i sur., 2017). *Monascus purpureus* ima dobru sposobnost fermentacije agro-industrijskog otpada za proizvodnju žutih pigmenata (Yusuf i sur., 2017). Također, pigmenti se mogu i izdvajati iz biljnog agro-industrijskog otpada. Zbog svoje hidrofilnosti, betalain iz kore cikle može se ekstrahirati vodom ili vodenom otopinom metanola odnosno etanola (Zin i sur., 2020).

Budući da je vanilin jedna od najvažnijih aroma u prehrambenoj industriji, posljednjih godina znanstvena istraživanja usmjerena su na pronalazak ekonomičnih, ekološki prihvatljivih i održivih načina proizvodnje iz agro-industrijskog otpada. U tu svrhu koriste se nusproizvodi žitarica kao što su kukuruz, riža i pšenica te pulpa šećerne repe (Yusuf i sur., 2017).





Potencijal agro-industrijskog otpada istražuje se i u smislu proizvodnje prebiotika kao zamjena konvencionalnim supstratima u postupcima enzimske sinteze, a posebice se u tom smislu istražuje proizvodnja fruktooligosaharida zbog njihove poznate i dokazane prebiotičke učinkovitosti. U tu svrhu mogu se iskoristiti nusproizvodi bogati saharozom (melasa šećerne trske, melasa šećerne repe i nusproizvod datulja), kore različitog voća (manga, banane, ananasa i naranče) i druga biljna tkiva (lišće banane, kukuruza i šećerne trske) (Arfelli i sur., 2016).

Kora citrusa i pulpa šećerne repe sadrže značajne količine pektina koji se može iskoristiti u proizvodnji džemova, želea i jestivih filmova ili kao funkcionalni dodatak, odnosno za obogaćivanje prehrambenih proizvoda topljivim vlaknima ili kao prebiotički sastojak (Rastall i sur., 2005).

Biljni agro-industrijski otpad danas se sve više koristi za proizvodnju bioaktivnih spojeva koji imaju široku primjenu i brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje te se mogu koristiti za obogaćivanje prehrambenih proizvoda, kao i za proizvodnju dodataka prehrani. Stoga je u Tablici 1 prikazan popis znanstvenih istraživanja na tu temu.

Za proizvodnju bioaktivnih spojeva posebno su zanimljivi nusproizvodi industrije voća i povrća jer su jeftini i dostupni u velikim količinama. Kora slatke i gorke naranče, limuna i mandarine značajni su izvori fenolnih kiselina i flavonoida, posebice polimetoksiflavona, flavanona i glikoziliranih flavanona (Castro-Vazquez i sur., 2016). Ti bioaktivni spojevi imaju antialergijsko, protuupalno, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje (Benavente-Garcia i Castillo, 2008).

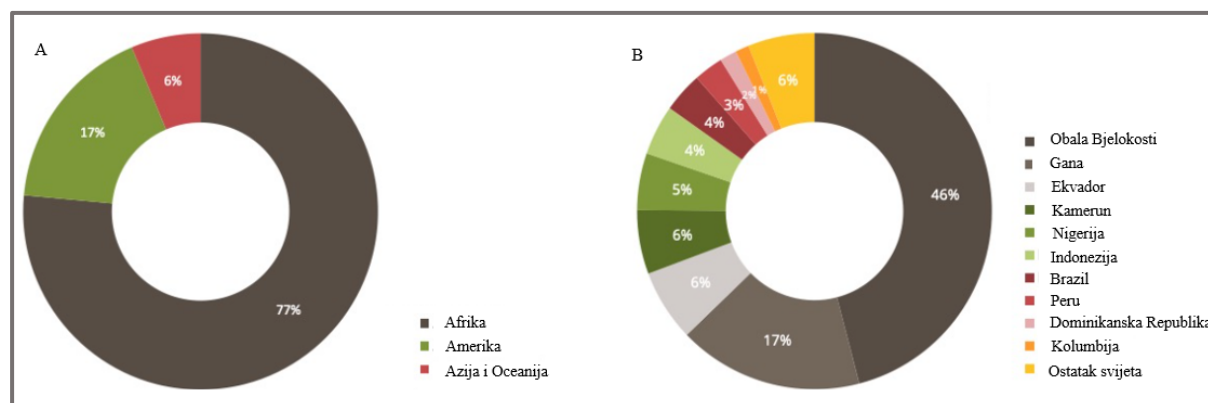
Tablica 1. Pregled izdvajanja bioaktivnih spojeva iz nekih vrsta biljnog agro-industrijskog otpada

Biljni agro-industrijski otpad	Bioaktivni spoj	Uvjeti ekstrakcije	Primjena	Referenca
Ljuska crvenog luka 	Kvercetin, kvercetin-3-glukozid, izoramnetin i kemferol	Ekstrakcija metanolom, 145 min, 44 °C	Dodatak pšeničnom kruhu za povećanje antioksidacijskog kapaciteta	Piechowiak i sur., 2020
	Kvercetin i njegovi derivati	Ekstrakcija vodom i glicerolom uz suotapalo 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin	Obogaćivanje jogurta	Mourtzinis i sur., 2018
Kora krumpira 	Flavonoidi, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina	Ekstrakcija hidroalkalnom otopinom, 120 min, 75 °C	Sprječavanje oksidacije sojinog ulja	Rodriguez i sur., 2014
	Polifenoli	Ekstrakcija 96 % - tnm etanolom, 8 h, sobna temperatura	Sprječavanje oksidacije lipida i bjelančevina u filetima skuše	Farvin i sur., 2011
Pokožica i sjemenke rajčice 	Likopen	Ekstrakcija etilnim acetatom, 15 min, sobna temperatura	Proizvodnja jestivih filmova	Gomez-Estaca i sur., 2015
Komina crnog grožđa 	Polifenoli	Maceracija 80 % - tnm etanolom, 48 h, sobna temperatura	Sprječavanje oksidacije lipida u pilećem mesu	Shirahigue i sur., 2011
		Ekstrakcija etanolom, omjer otapala i uzorka 9:1, pH = 1,5, 180 min	Sprječavanje oksidacije djevičanskog maslinovog ulja i suncokretovog ulja	Lafka i sur., 2007

Kora jabuke, osim što ima sposobnost inhibicije oksidacije lipida, sadrži i fitokemikalije antikancerogenih svojstava (Knekt i sur., 2002). Pozitivni učinci na zdravlje posljedica su prisutnosti različitih polifenolnih spojeva čiji antioksidacijski kapacitet je pet do šest puta veći nego u pulpi jabuke (Leccese i sur., 2009). Kora jabuke također sadrži jedinstvene flavonoide, poput kvercetin glikozida, kojih nema u pulpi (Rupasinghe i Kean, 2008). Komina narančasto – ljubičasto - crvene mrkve sadrži fenolne kiseline koje imaju veliki antioksidacijski potencijal, a antocijanini imaju preventivno djelovanje na kardiovaskularne bolesti te sprječavaju oksidaciju lipida (Arscott i Tanumihardjo, 2010).

2.1.2. Ljuska kakaovog zrna

Kakaovo zrno je sjemenka ploda kakaovca (*Theobroma cacao* L.), a njegova proizvodnja u sezoni 2018./2019. iznosila je 4,8 milijuna tona (ICCO, 2019). Najveći proizvođači kakaovog zrna su Obala Bjelokosti i Gana koje čine 60 % svjetske proizvodnje, slijedi Ekvador sa 7 %, dok je u Aziji najveći proizvođač Indonezija (Slika 2).



Slika 2. Udjel proizvodnje kakaovog zrna na kontinentima (A) i u državama (B) tijekom sezone 2018./2019. (ICCO, 2019)

Kakaova zrna smještena su unutar mahune (ploda) i obavijena su bijelom, ljepljivom i sluzavom pulpom (Slika 3). Ovalnog su oblika, a sastoje se od vanjske ljuske (testa) koja obavija dva kotiledona i malu klicu (Okiyama i sur., 2017). Nakon berbe plodova, kakaova zrna izdvajaju se zajedno s pulpom i podvrgavaju fermentaciji, nakon koje slijedi faza sušenja. U proizvodnji čokolade, fermentirana i osušena kakaova zrna prže se, prilikom čega se izdvaja vanjska ljuska zrna, dok kotiledoni odlaze na daljnju preradu. Ljuska kakaovog zrna čini 10 - 17 % ukupne mase zrna (Hashimoto i sur., 2018), a u nešto manjem udjelu izdvaja se kao nusproizvod s obzirom da se nikada u cijelosti ne ukloni sa zrna. Ljuske su vlaknasti materijali vrlo velike čvrstoće pa u daljnjoj preradi kakaovog zrna mogu značajno otežati mljevenje ili pak oštetiti

strojeve (Figueroa i sur., 2019) te je njihovo izdvajanje u postupku prerade kakaovog zrna vrlo važno. Prema Codex Alimentariusu, u kakaovim proizvodima nije dopušten udjel kakaove ljuske veći od 5 % (Beckett, 2018).



Slika 3. Dijelovi ploda kakaovca i kakaovog zrna (Rojo-Poveda i sur., 2020)

Uzimajući u obzir udjel ljuske u zrnu i podatke o proizvodnji kakaovog zrna, u svijetu se u prosjeku proizvede više od 700 000 tona ljuske godišnje, a od toga samo u Europi proizvede se više od 250 000 tona godišnje (Rojo-Poveda i sur., 2020).

Ljuska kakaovog zrna konvencionalno se koristi u poljoprivredi za malčiranje tla u voćnjacima, vrtovima, urbanim krajolicima, a povremeno i u organskoj proizvodnji povrća kako bi se suzbio rast korova (Bond i Grundy, 2001). Također, može se djelomično koristiti kao dodatak uobičajenoj životinjskoj prehrani, a budući da sadrži teobromin može imati negativan učinak na neke vrste životinja (Andrade i sur., 2010). Nadalje, može se koristiti za proizvodnju etanola, bioplina, kao adsorbens te za proizvodnju biofilamenata koji se koriste u 3D printanju različitih predmeta za kućanstvo i biomedicinske svrhe (Tran i sur., 2017).

Ipak, zbog bogatog kemijskog sastava (Tablica 2) sve više se istražuje potencijal ljuske kakaovog zrna za ponovnu primjenu u prehrambenoj industriji. Jozinović i suradnici (2017) proizveli su kukuruzni snack - proizvod obogaćen ljuskom kakaovog zrna postupkom ekstruzije, a Sanchez Mundo i suradnici (2017) uspješno su iskoristili brašno ljuske kakaovog zrna u proizvodnji muffina i keksa. Također, ljuska kakaovog zrna u kombinaciji sa začinima može se iskoristiti u pripremi napitka (Munichiello, 2016). Topljiva vlakna ljuske kakaovog zrna mogu se potencijalno iskoristiti kao zamjena za mast u čokoladnim muffinima ili se mogu upotrijebiti u pripremi pšeničnog kruha (Martinez-Cervera i sur., 2011). Aladedunye (2014) predložio je dodatak ekstrakta ljuske kakaovog zrna u ulja koja se koriste za prženje radi usporavanja oksidacije.

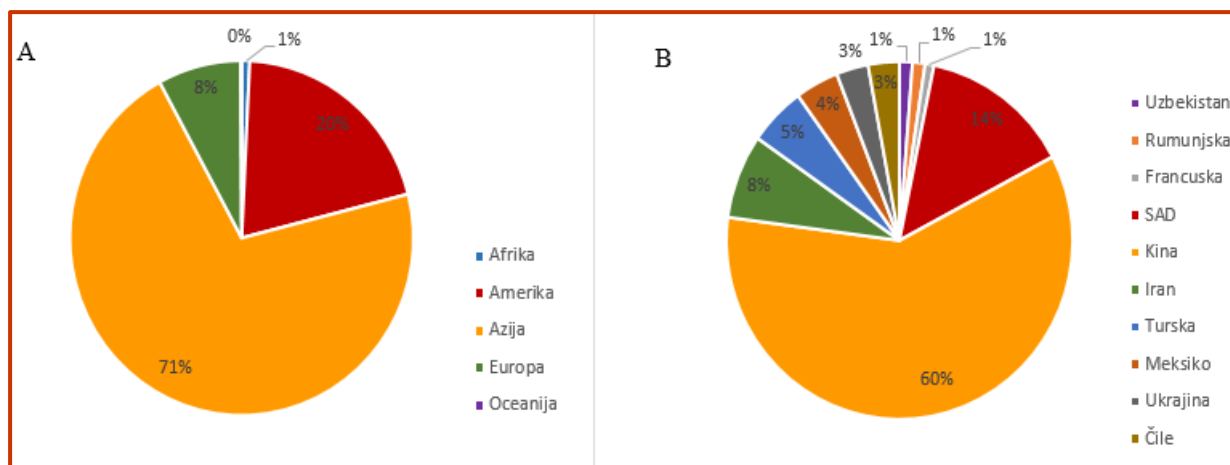
Tablica 2. Kemijski sastav ljuske kakaovog zrna

Sastojak		Količina (g 100g ⁻¹)	Referenca	
Proteini		20,9	Rojo-Poveda i sur., 2020	
Masti		2,3		
Ugljikohidrati		7,9		
Ukupna vlakna		55,1		
Netopljiva vlakna		42,3		
Topljiva vlakna		12,8		
Voda		5,9		
Pepeo		7,9		
Pektin		7,5	Vriesmann i sur., 2011	
Minerali	Kalcij	0,23	Chung i sur., 2003	
	Magnezij	0,48		
	Kalij	1,71		
	Natrij	0,016		
	Željezo	0,048		
	Bakar	0,004		
	Selen	0,0002		
	Kobalt	0,0001		
	Cink	0,001		
	Krom	0,005		
Bioaktivni spojevi	Polifenoli	Ukupni ^a	Nsor-Atindana i sur., 2012	
		Flavonoidi ^b		
		Tanini ^b		
	Metilksantini	Teobromin	1,09	Barbosa-Pereira i sur., 2018
		Kafein	0,42	

^a izraženo kao ekvivalent galne kiseline; ^b izraženo kao ekvivalent katehina

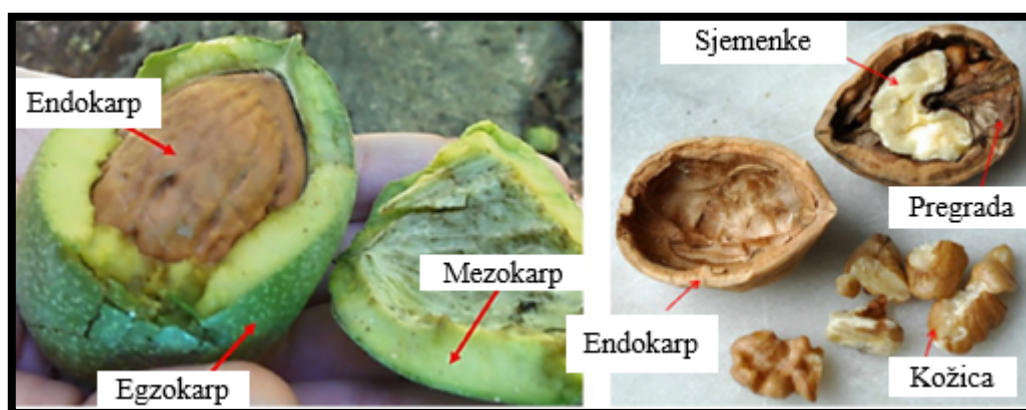
2.1.3. Ljuska oraha

Orah (*Juglans regia* L.) se u svijetu intenzivno uzgaja zbog iznimno bogatog nutritivnog sastava i raznovrsne primjene u prehrambenoj industriji. Ukupna proizvodnja oraha u svijetu u 2019. godini iznosila je oko 4,5 milijuna tona (FAO, 2020). Daleko najveći proizvođači su azijske zemlje s približno 71 % svjetske proizvodnje među kojima je dominantna Kina (60 %), a u Europi je najveći proizvođač Turska (Slika 4).



Slika 4. Udjel proizvodnje oraha na kontinentima (A) i u državama (B) tijekom 2019. godine (FAO, 2020)

Plod oraha (Slika 5) sastoji se od zelene mesnate, glatke ljuske koja je nejestiva, a kada se ta ljuska ukloni ostaje smeđa ljuska u kojoj se nalazi jezgra (sjemenka) koju obavija tanka kožica (Jahanban-Esfahlan i Amarowicz, 2018).



Slika 5. Dijelovi ploda oraha (Queiros i sur., 2019)

Ljuska je središnji dio ploda oraha i morfološki predstavlja endokarp te čini i do 67 % ukupne mase oraha (Ayrilmis i sur., 2013). S obzirom na svjetsku proizvodnju oraha, može se procijeniti da njihovom preradom zaostane godišnje približno 1,5 milijuna tona otpada u obliku smeđe čvrste ljuske (Ayrilmis i sur., 2013). Ljuska oraha lignocelulozne je prirode te u njezinom sastavu dominiraju lignin, celuloza i hemiceluloza (Tablica 3).

Tablica 3. Udjel dominantnih komponenata u sastavu ljuske oraha

Sastojak	Udjel (%)	Referenca
Lignin	52,3	Dermibas, 2005
Celuloza	25,5	
Hemiceluloza	22,2	

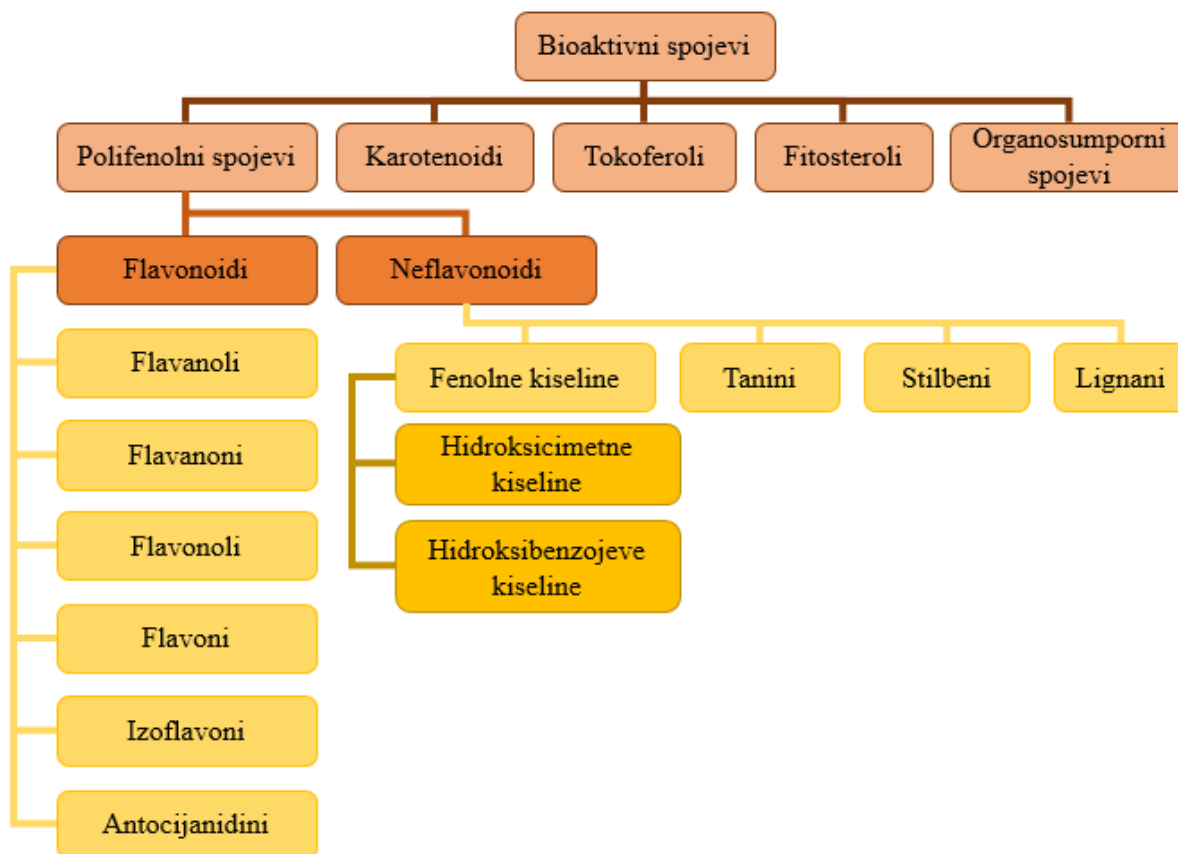
Ljuska oraha konvencionalno se koristi kao gorivo ili za ogrijev, ali takav način iskorištavanja nije energetski učinkovit, niti ekološki prihvatljiv (Ayrilmis i sur., 2013). Yang i suradnici (2015) predložili su razne metode hidrolize celuloze i hemiceluloze iz ljuske oraha kako bi se dobili jednostavni šećeri koji se mogu koristiti u proizvodnji bioetanolu. Također, ljuska oraha može se koristiti u proizvodnji aktivnog ugljena, prirodnih vlakana i praha koji se mogu koristiti u različitim industrijama (Khantwal i sur., 2016). Tako su Uddin i Nasar (2020) iskoristili prah ljuske oraha kao adsorbent za uklanjanje metilen plave boje iz onečišćene vode.

Neka istraživanja pokazala su da je ljuska oraha bogata fenolnim kiselinama i drugim polifenolnim spojevima (Almonte-Flores i sur., 2015).

Primjena ljuske oraha u prehrambenoj industriji nedovoljno je istražena, ali pretpostavlja se da ekstrahirani polifenoli mogu poslužiti kao potencijalni prirodni antioksidansi.

2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI

Bioaktivni spojevi definiraju se kao oni spojevi koji posjeduju biološku aktivnost i sposobnost moduliranja metaboličkih procesa, što rezultira povoljnim učinkom na zdravlje konzumenta (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020). Aktivnost ovih spojeva uključuje antioksidacijsko djelovanje, inhibiciju ili indukciju enzima, inhibiciju aktivnosti receptora te indukciju i inhibiciju ekspresije gena (Correia i sur., 2012). Bioaktivni spojevi pripadaju različitim kemijskim skupinama spojeva te su izrazito heterogeni s obzirom na sastav, strukturu i svojstva. Zbog toga, njihova podjela nije jednoznačna, odnosno, mogu se klasificirati na više načina. Jedna od najčešćih podjela prikazana je na Slici 6. Različita biljna tkiva i dijelovi biljaka, poput ljuske, koštica, lišća, korijenja i stabljika mogu biti bogati i smatrati se izvorom različitih bioaktivnih spojeva (Veneziani i sur., 2017), a u nastavku su opisane skupine bioaktivnih spojeva zastupljene u ljusci kakaovog zrna i ljusci oraha.



Slika 6. Podjela bioaktivnih spojeva (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020)

2.2.1. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji u svojoj strukturi sadrže aromatski prsten (hidrofobna domena) i jednu ili više hidroksilnih skupina (hidrofilna domena) vezanih na njega (Vermerris i Nicholson, 2006). U biljnim materijalima su mnogobrojni i danas ih je poznato više od 8 000 (Crozier i sur., 2006). Unutar biljnog matriksa, bilo da se radi o biljnim sirovinama ili nusproizvodima prerade istih, nalaze se u obliku monomera, oligomera i polimera te vrlo često u konjugiranim oblicima poput estera ili glikozida. Oligomerni polifenoli imaju stupanj polimerizacije u rasponu od 2 do 10, dok polimeri imaju stupanj polimerizacije veći od 10 (De Camargo i sur., 2018).

Polifenolni spojevi poznati su po svojim fiziološkim učincima koji u prvom redu uključuju antioksidacijsko i modulacijsko djelovanje na imunološki sustav i mikrobiotu (Kawabata i sur., 2019). Osim toga, mogu imati i antibakterijsko, antiparazitno, antivirusno, protuupalno, antikancerogeno i antihipertenzivno djelovanje (Suleria i sur., 2015). Djelovanje polifenola, posebice antioksidacijsko, proizlazi iz njihove kemijske strukture. Broj i položaj hidroksilnih skupina, prisutnost dvostruke veze i sposobnost delokalizacije elektrona određuju sposobnost

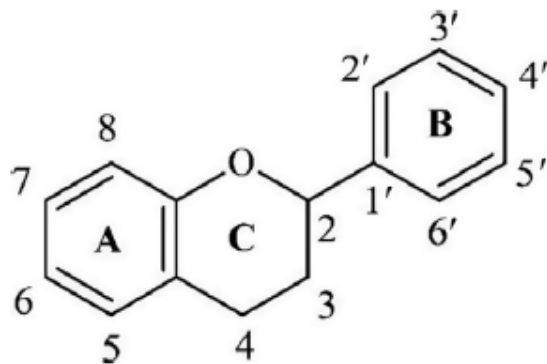
polifenola da neutraliziraju slobodne radikale i doniraju atome vodika (Leicach i Chludil, 2014). Također, polifenoli mogu ući u interakciju s komponentama stanične membrane, enzimima, transkripcijskim faktorima i receptorima (Fraga i sur., 2010). Stoga se smatra da su polifenolni spojevi najvažniji nehranjivi bioaktivni spojevi u ljudskoj prehrani (Zhang i Tsao, 2016). Pozitivan utjecaj polifenola na ljudsko zdravlje ovisi o konzumiranoj količini i bioraspoloživosti. Udjel polifenolnih spojeva u pojedinim biljnim vrstama ovisi o brojnim faktorima, kao što su ekološki uvjeti (temperatura, vlaga, tlo, nadmorska visina i klimatski uvjeti) i biotički utjecaji (biljojedi i ljudski faktori) (Boros i sur., 2010).

Biljni agro-industrijski otpad sadrži značajne količine polifenolnih spojeva. Konkretno, nusproizvodi orašastih plodova, prerade žitarica, uljarica, voća i povrća mogu biti bogatiji polifenolima od produkata njihove prerade (De Camargo i sur., 2018) jer su polifenoli koncentrirani u vanjskim dijelovima biljaka. Istraživanje De Oliveira i suradnika (2017) pokazalo je da polifenoli iz nusproizvoda prerade grožđa mogu učinkovitije smanjiti razinu kolesterola i triglicerida od onih u crnom vinu.

2.2.1.1. Flavonoidi

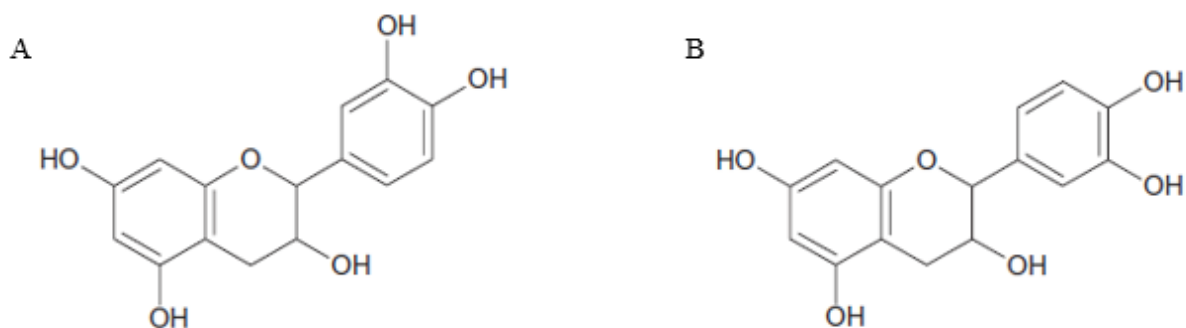
Flavonoidi su najveća skupina polifenolnih spojeva u biljkama, a do danas ih je identificirano više od 6 400 (Harborne i Baxter, 1999).

Flavonoidi se u osnovnoj strukturi (Slika 7) sastoje od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena (C₆-C₃-C₆). A i B su aromatski prsteni, a C je povezan s 3 ugljikova atoma u oblik heterocikličkog prstena. Na temelju broja nezasićenih/zasićenih veza i supstituenta na C prstenu, flavonoidi se dijele u 6 podskupina (Slika 6). U biljnim materijalima flavonoidi mogu biti prisutni u slobodnom ili konjugiranom obliku, a uglavnom se nalaze kao glikozidi. Glikanski dio molekule može biti vezan na OH skupinu (O-glikozid) ili na ugljikov atom (C-glikozid). Otkriveno je više od 80 različitih molekula šećera koji mogu biti vezani na flavonoide, a uobičajeni glikozidi su glukozidi, glukuronidi, galaktozidi, arabinozidi i ramnozidi (Hollman i Arts, 2000). Flavonoidi se također pojavljuju kao sulfatirani i metilirani derivati te mogu tvoriti derivate s lipidima, aminima, karboksilnim i organskim kiselinama (Duthie i sur., 2003).



Slika 7. Osnovna struktura flavonoida (Luna-Guevara i sur., 2019)

Flavanoli čine vrlo složenu podskupinu flavonoida uključujući monomerne (flavan-3-oli), oligomerne (procijanidini) i vrlo složene polimerne oblike, poznate kao kondenzirani tanini. Struktura flavanola ima dva asimetrična atoma ugljika (C-2 i C-3) koji su odgovorni za postojanje četiri izomera molekule flavan-3-ola: katehin, epikatehin, galokatehin i epigalokatehin (Slika 8) (De Pascual-Teresa i sur., 2010). Katehin je najvažniji predstavnik iz skupine flavanola. Flavan-3-oli mogu se lako kondenzirati u oligomerne procijanidine i polimerne kondenzirane tanine (Hollman i Arts, 2000).

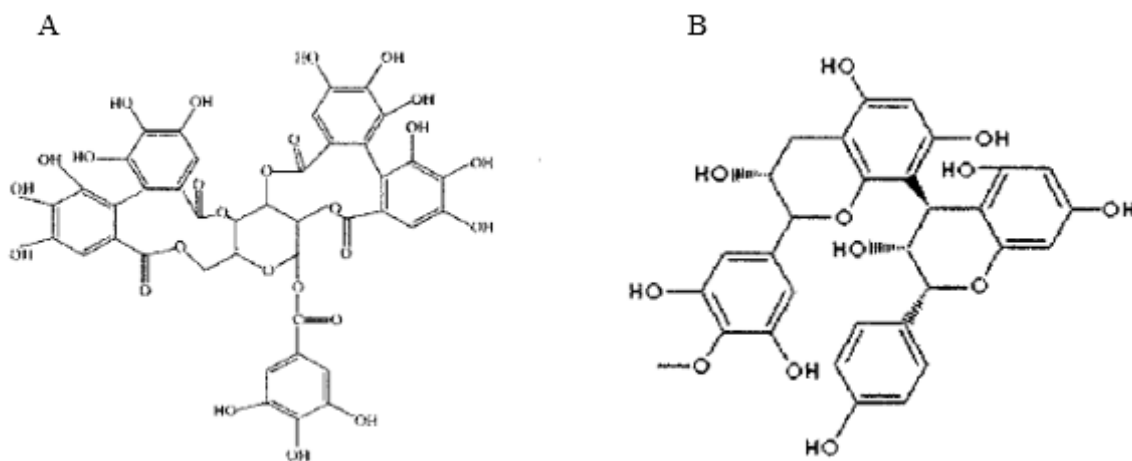


Slika 8. Kemijska struktura katehina (A) i epikatehina (B) (Kumar i Pandey, 2013)

Tanini se mogu naći u preko 500 različitih biljnih vrsta u kojima su locirani u korijenju, kori, plodovima, lišću i/ili sjemenkama (Hassanpour i sur., 2011), a čini ih heterogena skupina spojeva relativno velike molekulske mase (do 20 000 Da) i složene strukture (Olivas i sur., 2015). Mogu se klasificirati u dvije velike skupine: (i) tanini koji se mogu hidrolizirati (hidrolizabilni tanini) i (ii) oni koji se ne mogu hidrolizirati, tj. kondenzirani tanini (Chung i sur., 1998).

Tanini koji se mogu hidrolizirati (Slika 9A) su esteri šećernog alkohola kao što je glukoza i galne kiseline (galotanini) ili heksahidroksidifenske kiseline (elagitanini) (Chung i sur., 1998). Dijele se u tri podskupine: (i) jednostavne derivate galne kiseline, (ii) galotanine i (iii) elagitanine (Amarowicz i Janiak, 2018). Oni se lako hidroliziraju s kiselinama, bazama ili enzimima pri čemu se oslobađaju odgovarajući ugljikohidrati i fenolne kiseline (Wang i sur., 2013), ali se mogu i oksidativno kondenzirati i tvoriti polimere velikih molekulskih masa. Najpoznatiji hidrolizabilni tanin je taninska kiselina, po strukturi galotanin, koja se sastoji od molekule pentagaloil glukoze (glukoza esterificirana s 5 molekula galne kiseline) koja se može esterificirati s još pet jedinica galne kiseline (Bravo, 1998). Relevantni izvori hidrolizabilnih tanina su različito voće poput jagoda, malina, kupina, artičoka, nara; orašasti plodovi poput pekan oraha, oraha i kestena te pića poput soka od nara, grožđa, kao i konjak, crno vino i viski (Lipinska i sur., 2014).

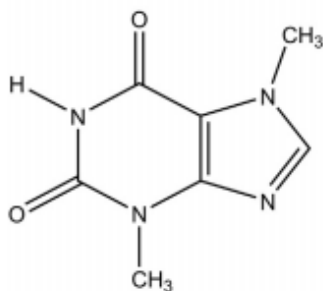
Kondenzirani tanini ili proantocijanidini (Slika 9B) nastaju polimerizacijom monomera flavan-3-ola, kao što su katehin, epikatehin, galokatehin ili leukocijanidin i vežu se preko C-C veza, a ponekad preko C-O-C veza kojima nedostaju ugljikohidratne jezgre (Gu i sur., 2003). Kondenzirani tanini mogu se naći u voću poput aronije, brusnica, borovnica, šljiva, crnog ribizla, jagoda i jabuka; zatim u ljusci kakaovog zrna, crvenom grahu; orašastim plodovima poput lješnjaka, pekan oraha, pistacija i badema; u pićima poput crnog vina i piva te u začinima kao što su cimet i curry (Prior i Gu, 2005).



Slika 9. Kemijska struktura elagitanina (A) i proantocijanidina (B) (Reis Giada, 2013)

2.2.2. Metilksantini

Metilksantini su metilirani derivati ksantina koji se proizvode u biljkama i životinjama i može ih se naći u većini ljudskih tekućina i tkiva (Zrenner i sur., 2006). Te purinske baze su heterociklički kompleksi koji nastaju spajanjem pirimidinskih i imidazolnih prstenova (Talík i sur., 2012). Među najpoznatijim metilksantinima su: 3,7-dimetilksantin, 1,3,7-trimetilksantin i 1,3-dimetilksantin, poznatiji kao teobromin (Slika 10), kafein i teofilin (Carrageta i sur., 2018).



Slika 10. Kemijska struktura teobromina, najdominantnijeg metilksantina u ljusci kakaovog zrna (Carrageta i sur., 2018)

Izvori metilksantina u prehrani su kakaovi proizvodi, kava i čaj. Udjel teobromina u suhoj tvari kakaovog zrna kreće se u rasponu od 1 do 2,9 %, dok je udjel kafeina znatno niži, oko 0,23 % (Vega i Kwik-Urbe, 2012). Metilksantini djeluju na središnji živčani sustav i krvožilni sustav povećavajući protok krvi kroz koronarne arterije, gastrointestinalni, mišićni te respiratorni sustav, što relaksira bronhijalne mišiće (Spiller, 1998).

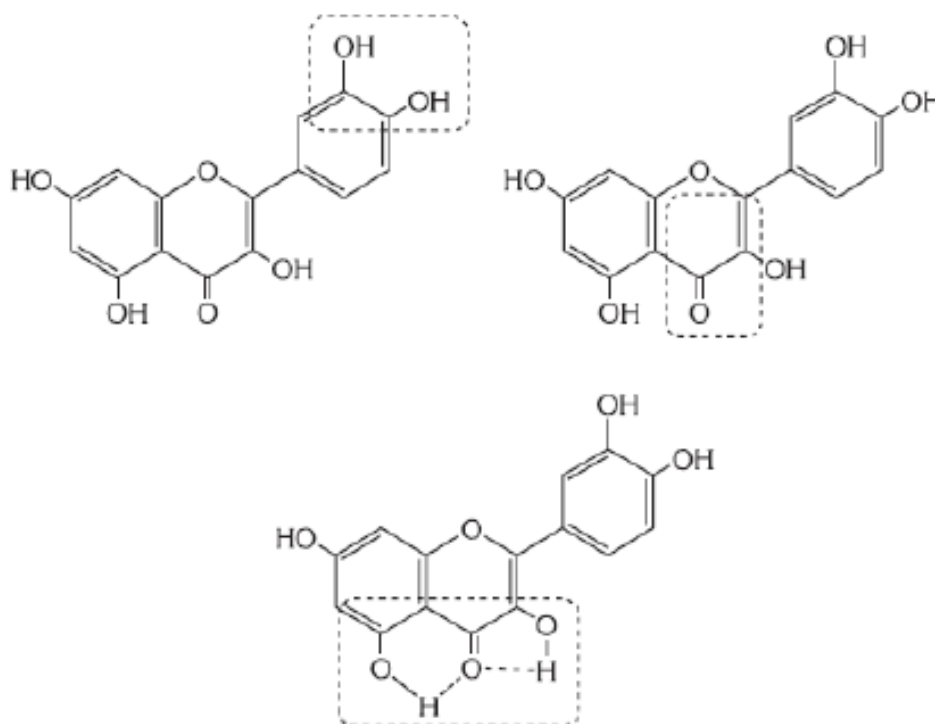
2.2.3. Antioksidacijski potencijal bioaktivnih spojeva

Slobodni radikali su atomi ili molekule kojima u posljednjoj orbitali nedostaje elektron što ih čini nestabilnima i visoko reaktivnima. Oni postižu ravnotežu primanjem elektrona drugih molekula (Fernandes i sur., 2018). Te reaktivne molekule stvaraju se tijekom normalnog staničnog metabolizma, a neki od primjera su superoksidni anion, hidroksilni radikal i hidroperoksidni radikal (Ayala i sur., 2014). Višak slobodnih radikala ima štetne učinke na važne stanične makromolekule, poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Pizzino i sur., 2017).

Antioksidansi su kemijski spojevi sposobni neutralizirati slobodne radikale ili smanjiti oštećenja koja oni uzrokuju (Kumar i sur., 2018). Antioksidacijsko djelovanje može se postići izravnim doniranjem elektrona slobodnim radikalima i njihovom stabilizacijom ili regulacijom aktivnosti transkripcijskih faktora koji sudjeluju u regulaciji ekspresije gena detoksikacijskih i

antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza (Lingappan, 2018).

Upravo se flavonoidi smatraju jednim od najjačih biljnih antioksidanasa, a izvrsno antioksidacijsko djelovanje ovih spojeva povezano je s: (i) prisutnošću hidroksilnih skupina na položaju 3' i 4' B prstena, koje daju visoku stabilnost formiranom radikalu i omogućuju delokalizaciju elektrona, i (ii) 2,3-dvostruke veze u prstenu C, zajedno s karbonilnom skupinom na položaju 4 atoma, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz prstena B. Pored toga, slobodne hidroksilne skupine na položaju 3 prstena C i na položaju 5 prstena A, zajedno s karbonilnom skupinom na položaju 4 također su važne za antioksidacijsko djelovanje ovih spojeva (Slika 11) (Sanchez-Moreno, 2002). Antioksidacijska učinkovitost flavonoida smanjuje se supstitucijom hidroksilnih skupina sa šećerima (glikozilirani oblici flavonoida) (Rice-Evans i sur., 1996).



Slika 11. Strukturne skupine važne za antioksidacijsko djelovanje flavonoida (Kazazić, 2004)

Iako je antioksidacijsko djelovanje tanina znatno slabije izraženo u usporedbi s antioksidacijskim djelovanjem flavonoida, istraživanja su pokazala da je antioksidacijsko djelovanje tanina povezano s njihovim stupnjem polimerizacije (Reis Giada, 2013). U kondenziranim i hidrolizabilnim taninima velike molekulske mase antioksidacijsko djelovanje

može biti 15 do 30 puta jače od onoga koje se pripisuje jednostavnim polifenolnim spojevima (Sanchez-Moreno, 2002).

Metilksantinima, također se pripisuju antioksidacijska svojstva. Istraživanja pokazuju da je kafein učinkoviti hvatač hidroksilnih i alkoksilnih radikala (Leon-Carmona i Galano, 2011) što ima za posljedicu antioksidacijsko djelovanje i zaštitu stanica od oštećenja putem smanjenja peroksidacije lipida (Grucka-Mamczar i sur., 2009).

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je prvi korak u analizi biljnog materijala jer omogućuje izdvajanje i karakterizaciju željenih komponenata. Prije ekstrakcije biljni materijal priprema se pranjem, sušenjem i mljevenjem kako bi se dobio homogeni uzorak i povećao kontakt površine uzorka s otapalom (Sasidharan i sur., 2010).

Za ekstrakciju polifenola najčešće se koristi voda u kombinaciji s organskim otapalima (acetonom, etanolom, metanolom ili etil acetatom). Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Prilikom izbora potrebno je uzeti u obzir: (i) polarnost; (ii) točku ključanja - treba biti što niža da olakša odvajanje otapala od komponente; (iii) reaktivnost - otapalo ne smije reagirati s ekstraktom, niti se smije razgrađivati; (iv) viskoznost - otapalo mora biti niske viskoznosti; (v) stabilnost otapala na toplinu, kisik i svjetlo; (vi) sigurnost otapala pri upotrebi - po mogućnosti nezapaljivo, neškodljivo za tehničara i konzumenta te prilikom odlaganja ne smije ugrožavati okoliš; (vii) dostupnost otapala; (viii) cijena otapala - po mogućnosti što jeftinije; (ix) pogodnost otapala za ponovnu upotrebu (Albu i sur., 2004).

Prema radu Chew i suradnika (2011) porast temperature tijekom ekstrakcije povećava učinkovitost ekstrakcije polifenola. Vrijeme ekstrakcije je također bitan parametar jer dugotrajno vrijeme ekstrakcije može utjecati na proces oksidacije polifenola (Dai i Mumper, 2010).

2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Konvencionalne tehnike ekstrakcije temelje se na primjeni selektivnih otapala uz povišenu temperaturu miješajući reakcijsku smjesu. Uključuju: (i) infuziju, (ii) dekokciju i (iii) maceraciju.

Infuzija je tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala u otapalu kao što je voda, ulje ili alkohol tako da materijal s vremenom ostane suspendiran u otapalu.

Dekokcija je tehnika ekstrakcije koja uključuje kontinuiranu vruću ekstrakciju korištenjem određene količine vode ili nekog drugog otapala. Osušeni, samljeveni ili biljni materijal u prahu stavlja se u čistu posudu, a zatim se ulije voda ili neko drugo otapalo i promiješa. Tada se tijekom postupka primjenjuje temperatura oko 100 °C kako bi se ubrzala ekstrakcija, a postupak traje oko 30 minuta.

Maceracija se smatra tehnikom ekstrakcije u ustaljenom stanju. Usitnjeni biljni materijal stavi se u zatvorenu posudu s otapalom i ostavi stajati na sobnoj temperaturi dva do tri dana, uz povremeno miješanje da se topljiva tvar otopi. Koristi se zatvorena posuda kako bi se spriječilo isparavanje ekstrakcijskog otapala. Nakon ekstrakcije smjesa se filtrira ili dekantira (Manousi i sur., 2019). Kako bi se povećao prinos ekstrakcije, maceracija može biti višestruka. Dvostruka ili trostruka maceracija pogodna je kada se ekstrahiraju komponente visoke vrijednosti i u slučajevima kada koncentrirani macerat sadrži ulje. Obično je potrebno isparavanje drugog ili trećeg ekstrakta kako bi se smanjio ukupni volumen otapala (Handa i sur., 2008).

Glavni nedostaci konvencionalnih tehnika ekstrakcije su upotreba velikih količina organskih otapala i dugo vrijeme ekstrakcije (Zhang i sur., 2018).

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvuk predstavlja zvučne valove u području od 20 do 2 000 kHz (Rodino i Butu, 2019). Prolaskom takvih valova kroz tekući medij dolazi do pojave kavitacije, odnosno lokalno izraženih i naglih promjena u tlaku i temperaturi koji uzrokuju nastanak, rast i imploziju mjehurića plina u otapalu (Azmir i sur., 2013). To može prouzročiti daljnje mehaničke efekte, poput disrupcije staničnog materijala (Shams i sur., 2015). Osim toga, dio oslobođene energije ultrazvukom se transformira u toplinu, što za posljedicu također ima smanjenje viskoznosti otapala, njegovo lakše prodiranje u čvrsti materijal i pospješivanje difuzije komponente koja se ekstrahira.

Općenito, ultrazvučna ekstrakcija provodi se pomoću ultrazvučne kupelji i ultrazvučne sonde. Ultrazvučna kupelj je ekonomičnija i jednostavnija za uporabu, ali niska ponovljivost ekstrakcija provedenih u istoj ograničava njezinu primjenu u postupku ekstrakcije (Kumar i sur., 2020). Ultrazvučna sonda je pogodnija od ultrazvučne kupelji zbog većeg ultrazvučnog









intenziteta te se koristi kao snažno sredstvo za ekstrakciju bioaktivnih spojeva (Chemat i sur., 2017).

Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog agro-industrijskog otpada obično se koristi ultrazvuk snage između 20 i 120 kHz jer niska frekvencija visokog intenziteta proizvodi jako smicanje i mehaničku silu poželjnu za ekstrakciju, dok visoka frekvencija niskog intenziteta proizvodi veliki broj reaktivnih radikala (Kumar i sur., 2020). Kao otapalo za ekstrakciju polifenola iz agro-industrijskog otpada, najčešće se koristi etanol jer ima najveći afinitet za polifenole, lako je dostupan, dobiva se iz obnovljivih izvora te ima GRAS status (Ramić i sur., 2015).

Moderne tehnike ekstrakcije kao što je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom imaju prednosti pred konvencionalnim tehnikama koje uključuju: manju potrošnju organskih otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i veću selektivnost (Zhang i sur., 2018). Međutim, ultrazvuk ponekad može imati negativan utjecaj na bioaktivne spojeve jer može utjecati na stvaranje slobodnih radikala koji uzrokuju neželjene promjene na molekulama (Handa i sur., 2008).

Zbog navedenih prednosti, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom istražuje se za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog agro-industrijskog otpada, a neki primjeri s parametrima ekstrakcije navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Pregled primjene ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljnog agro-industrijskog otpada

Biljni agro-industrijski otpad	Bioaktivni spoj	Otapalo	Vrijeme	Temperatura	Frekvencija	Prinos	Referenca
Ljuska makadamijinog oraha 	Polifenoli	50 % - tni aceton	30 min	35 °C	50 Hz	165 mg GAE g ⁻¹	Dailey i Vuong, 2015
	Flavonoidi					120 mg RUE g ⁻¹	
	Proantocijanidini	50 % - tni etanol				170 mg CATE g ⁻¹	
Komina jabuke 	Katehin	50 % - tni etanol	28 min	30 °C	24 kHz	33,9 mg g ⁻¹	Viroi i sur., 2010
Kora mandarine 	Hesperidin	Metanol	60 min	40 °C	60 kHz	57 mg g ⁻¹	Ma i sur., 2008
Kora nara 	Karotenoidi	58,8 % - tno suncokretovo ulje	30 min	51,5 °C	20 kHz	0,3255 mg 100g ⁻¹	Goula i sur., 2017
Pokožica crvenog grožđa 	Antocijani	Etanol i 0,1 % - tni HCl	3 h	21 °C	2450 MHz	2,17 mg g ⁻¹	Ghassempour i sur., 2008
Kora krumpira 	Polifenoli	80 % - tni metanol	30 min	35 °C	33 kHz	4,24 mg GAE g ⁻¹	Kumari i sur., 2017
Pokožica i sjemenke rajčice 	Karotenoidi	Etanol:heksan 50:50	10 min	25 °C	20 kHz	11,32 mg 100g ⁻¹	Luengo i sur., 2014
Pšenične mekinje 	Polifenoli	70 % - tni etanol	25 min	60 °C	40 kHz	3,12 mg GAE g ⁻¹	Wang i sur., 2008

GAE - ekvivalenti galne kiseline; RUE - ekvivalent rutina; CATE - ekvivalent katehina



EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U ovome radu korištene su ljuska kakaovog zrna (*Theobroma cacao* L.) i ljuska oraha (*Juglans regia* L.) (Slika 12). Ljuska kakaovog zrna dobivena je iz prehrambene industrije Zvečevo d.d., kao nusproizvod prženja kakaovog zrna u postupku proizvodnje čokolade. Dodatno je usitnjena u mlinu za kavu za domaćinstvo kako bi se dobila homogena frakcija za analize. Ljuska oraha pripremljena je kao otpad iz domaćinstva nakon izdvajanja jezgri oraha. Izdvojena ljuska dodatno je usitnjena u kugličnom mlinu (Mixer Mill MM 400, Retsch, Njemačka) uzastopnim ciklusima u trajanju od 1 min do postizanja željene homogenosti materijala za analize.



Slika 12. Sekundarne biljne sirovine korištene za ekstrakcije bioaktivnih spojeva
(Anonymous 1; Anonymous 2)

3.1.1. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p. a.) ili HPLC čistoće.

Priprema ekstrakata

- Etanol, 96 %, Kefo d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata spektrofotometrijskim metodama

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens; Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni; Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, > 97, 5 %; Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- Metanol; J.T.Baker (Pennsylvania, SAD)

- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal; Fluka (Buchs, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox); Fluka (Buchs, Švicarska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- Etanol, 96 %; Kefo d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev peroksodisulfat; Fluka (Buchs, Švicarska)
- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), diamonijeva sol (ABTS); Sigma Algrich/Merck (St. Louis, SAD)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox); Fluka (Buchs, Švicarska)

Određivanje ukupnih proantocijanidina

- Amonijev željezo (II) sulfat dodekahidrat; Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 96 %; Kefo d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (37 % - tna otopina); Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- n-butanol; Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC metodom

- Acetonitril, HPLC kvalitete, Fischer Scientific (Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Analitički standardi bioaktivnih spojeva:
 - Elaginska kiselina (> 97 %); Fluka Biochemika/ Sigma Aldrich/Merck, (St. Louis, SAD)
 - Epikatehin (> 90 %); Sigma Aldrich/Merck, (St. Louis, SAD)
 - Galna kiselina (> 97,5 %); Sigma Aldrich/Merck, (St. Louis, SAD)
 - Kafein (> 99 %); Fluka/Sigma Aldrich/Merck, (St. Louis, SAD)
 - Protokatehinska kiselina (> 97 %); Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
 - Teobromin (> 99 %); Sigma Aldrich/Merck, (St. Louis, SAD)
- Metanol, J.T.Baker (Pennsylvania, SAD)
- Mravlja kiselina; Carlo Erba (Val de Reuil, Francuska)
- Voda HPLC kvalitete (vodljivost < 10 μS)

3.1.2. Pribor i aparatura

Priprema ekstrakata

- Aparatura za filtraciju (Büchnerov lijevak, filter papir Whatman No.1, Erlenmeyerova tikvica)
- Laboratorijska centrifuga SL8 R s rotorom s utorima pod fiksnim kutem (HIGHConic™III); Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijska vaga preciznosti 0,01g, GF- 3000 EC; A&D Instruments (Tokio, Japan)
- Laboratorijski pribor: teflonski magnetići, silikonske cijevi, metalni stalci, parafinsko ulje, gumene brtve, termometar
- Laboratorijsko posuđe: tikvice s okruglim dnom, staklene čaše, staklene menzure, magnetići, kapaljke, laboratorijska žlica, odmjerne tikvice, vodeno hladilo, kristalizirke, Falcon epruvete 50 mL
- Magnetska mješalica Wise Stir SMHS-6; Witeg (Werthrim, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj, Elmasonic S 60 H; Elma (Singen, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda UW3100 (promjera 3 mm); Bandelin Electronic (Berlin, Njemačka)

Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata spektrofotometrijskim metodama

- Laboratorijski pribor: mikropipete P200 i P1000 (Gilson, Francuska)
- Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete, mikropipete, pipete, kivete za spektrofotometrijsko mjerenje s čepovima
- Spektrofotometar, Genesys 10 Ss UV-Vis, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Tresilica (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)

Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva u ekstraktima primjenom HPLC analize

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- HPLC kolona Zorbax Extended C - 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,2 µm (13/45) (Macherey-Nagel, Njemačka), lađice za vaganje
- Laboratorijsko stakleno posuđe: reagens boce, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, menzure

- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1 200, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) sastavljen od degazera, kvaterne pumpe, automatskog injektora s autosamplrom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora
- Ultrazvučna kupelj, Elmasonic S 60 H, Elma (Singen, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema ekstrakata

Za potrebe istraživanja provedene su različite vrste ekstrakcija ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha u vodenim otopinama etanola različitih koncentracija (Slika 13). U svim ekstrakcijama kao otapalo korištene su vodene otopine etanola (96 %) volumnog udjela 50 % i 80 %, dok je omjer uzorak:otapalo iznosio 1:20 (w/v).

Infuzija (I)	<ul style="list-style-type: none"> • 30 minuta • 80 °C
Dekokcija (D)	<ul style="list-style-type: none"> • 20 minuta • 100 °C
Maceracija (M)	<ul style="list-style-type: none"> • 48 sati • sobna temperatura
Ultrazvučna kupelj (Uk)	<ul style="list-style-type: none"> • 30 minuta • nije kontrolirana
Ultrazvučna sonda (Us)	<ul style="list-style-type: none"> • 5 minuta • nije kontrolirana

Slika 13. Vrste ekstrakcija primijenjene u istraživanju

3.2.1.1. Konvencionalne ekstrakcije

Od konvencionalnih ekstrakcija primijenjene su: infuzija, dekokcija i maceracija. Za provedbu infuzije i dekokcije, uzorci (1 g) pomiješani su s otapalom (20 mL) u tikvicama s okruglim dnom te su tikvice postavljene na povratno vodeno hladilo i uronjene u uljnu kupelj prethodno zagrijanu na ciljanu temperaturu ekstrakcije (infuzija – 80 °C; dekokcija – 100 °C). Ekstrakcija

je provedena uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici tijekom 30 min (infuzija), odnosno 20 min (dekokcija). Po završetku ekstrakcije, tikvice su skinute s hladila i uronjene kratko (5 min) u hladnu vodu. Sadržaj tikvica zatim je filtriran preko Büchnerovog lijevka i Whatman No.1 filter papira, a u boci sisaljki izdvojen je filtrat koji je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjen do oznake prikladnim otapalom. Za provedbu maceracije, uzorak je pomiješan s otapalom u Falcon epruveti od 50 mL te ostavljen tijekom 48 h pri sobnoj temperaturi na mračnom mjestu. Uzorci su kratko homogenizirani na tresilici svakih 10 - 12 h. Po završetku maceracije, sadržaj Falcon epruveta je vakuum - filtriran preko Büchnerovog lijevka i Whatman No.1 filter papira te je u boci sisaljki izdvojen filtrat koji je zatim kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjen do oznake prikladnim otapalom. Za izdvajanje 50 % - etanolnog ekstrakta (supernatanta) ljuske kakaovog zrna korištena je centrifuga (9500 o min^{-1} , 10 min, sobna temperatura) zbog otežane filtracije. Pripremljeni ekstrakti čuvani su u hladnjaku u Falcon epruvetama do provedbe analiza.

3.2.1.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

U ekstrakcijama potpomognutima ultrazvukom kao izvor ultrazvuka korištene su: ultrazvučna kupelj i ultrazvučna sonda. Uzorci su pomiješani s otapalom (1:20, w/v) u Falcon epruvetama od 50 mL i uronjeni u ultrazvučnu kupelj (200 W, 37 kHz) ispunjenu vodom sobne temperature. Ekstrakcija je provedena tijekom 30 min kontinuiranog rada kupelji, a po isteku vremena izmjerena je temperatura vode u kupelji (nije prelazila 40 °C). Ekstrakt je izdvojen filtriranjem sadržaja epruveta preko Büchnerovog lijevka i Whatman No.1 filter papira te je zatim kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopunjen do oznake prikladnim otapalom. Kod primjene ultrazvučne sonde, sonda je uronjena u smjesu uzorka i otapala u Falcon epruveti (50 mL) do pola visine te je zatim uključen uređaj pri amplitudi 60 %. Ekstrakcija je provedena u trajanju od 5 min. Izmjerena temperatura u uzorku nakon provedene ekstrakcije iznosila je: za ljusku kakaovog zrna približno 50 °C (50 % EtOH), odnosno 60 °C (80 % EtOH) te za ljusku oraha približno 60 °C (50 % EtOH), odnosno 65 °C (80 % EtOH). Po isteku vremena, ekstrakti su izdvojeni vakuum - filtracijom preko Büchnerovog lijevka i Whatman No.1 filter papira, a izdvojeni filtrati u boci sisaljki zatim su kvantitativno preneseni u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjeni do oznake prikladnim otapalom. Za izdvajanje 50 % - etanolnog ekstrakta (supernatanta) ljuske kakaovog zrna korištena je centrifuga ($9\ 500 \text{ o min}^{-1}$, 10 min, sobna temperatura) zbog otežane filtracije. Pripremljeni ekstrakti čuvani su u hladnjaku u Falcon epruvetama do provedbe analiza.

3.2.2. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata

3.2.2.1. *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Princip metode:

Za određivanje udjela ukupnih polifenola primijenjena je metoda kolorimetrijske reakcije reducirajućih agenasa (fenola) s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se reduciraju do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida uslijed oksidacije fenoksidnih iona iz uzorka. Intenzitet nastalog plavog obojenja, proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva u uzorku, mjeri se 2 h od početka reakcije, pri 765 nm (Ough i Amerine, 1988; Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U epruvetu se otpipetira 3,95 mL destilirane vode, 50 μ L uzorka, 2,50 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2, v/v) i 7,5 mL 20 % - tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3), čime se pokreće reakcija, te se reakcijska otopina dobro homogenizira na tresilici. Uzorci se ostave 2 h pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon isteka vremena izmjeri se apsorbancija pri 765 nm, uz slijepu probu koja umjesto uzorka sadrži 50 μ L destilirane vode.

Izračun rezultata:

Udjel ukupnih polifenola računa se pomoću jednadžbe (1):

$$y = 0,001x + 0,0162; \quad R^2 = 0,9999 \quad [1]$$

Gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg L^{-1}),

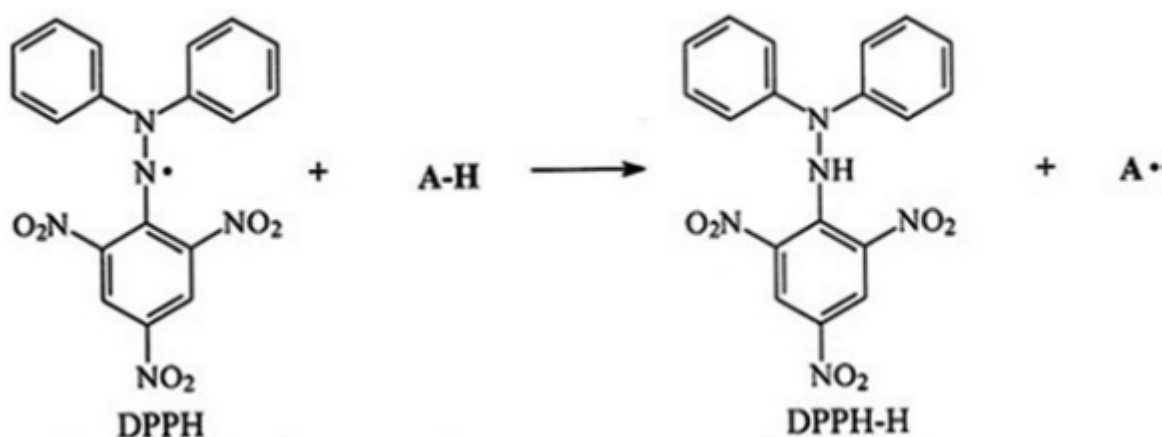
y – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 765 nm u odnosu na slijepu probu.

Baždarni pravac (1) konstruira se za standard galne kiseline, pri čemu se za otopine galne kiseline u rastućim, poznatim koncentracijama provede reakcija i mjerenje prema gore opisanom postupku. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha analizirani su u paraleli, a rezultati udjela ukupnih polifenola izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja ($n = 2$) s odgovarajućom standardnom devijacijom te se interpretiraju kao ekvivalenti koncentracije galne kiseline (mg EGK g^{-1} uzorka).

3.2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini (Slika 14). DPPH radikal zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbanacije u opadanju (Brand-Williams i sur.,1995).



Slika 14. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom (Casanovas i sur., 2015)

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i doda se 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te se reakcijska otopina dobro homogenizira na tresilici. Epruvete se ostave na tamnom mjestu i pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min, a zatim se izmjeri apsorbanacija pri 515 nm (A_{515}) uz slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 100 μ L metanola.

Izračun rezultata:

Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom računa se pomoću jednadžbe (2):

$$y = 0,603x - 0,0068; \quad R^2 = 0,9993 \quad [2]$$

Gdje su:

x - koncentracija otopine Trolox-a (mmol L^{-1}),

y - izmjerena vrijednost apsorbanacije pri 515 nm u odnosu na slijepu probu.

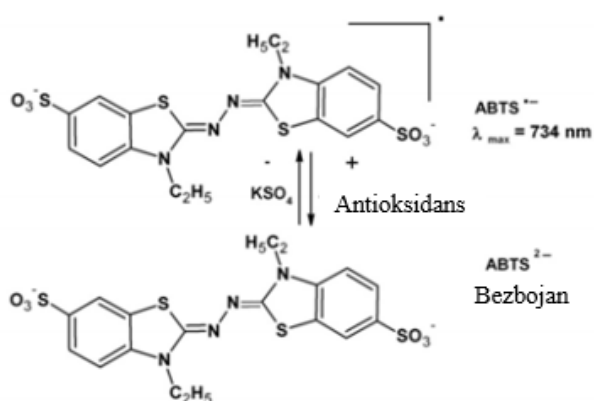
S obzirom na izostanak reakcije, slijepa proba iskazuje više vrijednosti apsorbancije od uzorka te se vrijednost ΔA_{515} , tj. antioksidacijski učinak uzorka dobiva oduzimanjem vrijednosti A_{515} uzorka od vrijednosti A_{515} za slijepu probu.

Baždarni pravac (2) konstruirana se za standard Trolox-a (vodeno - topljiv analog vitamina E), pri čemu se za otopine Trolox-a u rastućim, poznatim koncentracijama provede reakcija i mjerenje prema gore opisanom postupku. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha analizirani su u paraleli, a rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja ($n = 2$) s odgovarajućom standardnom devijacijom te se interpretiraju kao ekvivalentna koncentracija Trolox-a ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka).

3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode:

Ova metoda temelji se na oksido - redukcijskoj reakciji „gašenja“ plavo - zelenog radikal - kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal - kation) koji se formira kemijskom oksidacijom otopine ABTS-a, što prethodi analizi (Slika 15). U ovome radu oksidacija otopine ABTS-a provedena je otopinom kalijevog persulfata. Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog ABTS radikala, ovisno o koncentraciji antioksidansa, njegovom antioksidacijskom potencijalu i trajanju reakcije te se prati mjerenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala spektrofotometrijski pri 734 nm (Re i sur., 1999).



Slika 15. Mehanizam reakcije ABTS radikala s antioksidansom (Venkatachalam i sur., 2012)

Postupak rada:

Oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa sa 140 mM otopinom kalijevog peroksodisulfata pripremi se otopina ABTS^+ radikala, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Tako pripremljena otopina ostavi se tijekom najmanje

16 h i pri sobnoj temperaturi kako bi oksidacija bila potpuna. Prije analize pripremljena otopina oksidiranog ABTS radikala otopina se razrijedi 96 % - tnm etanolom do konačnog udjela ABTS⁺ radikala od 1 % (v/v). Apsorbancija tako pripremljene otopine trebala bi iznositi $0,70 \pm 0,02$. U epruvetu se otpipetira 40 μ L uzorka i 4 mL etanolne otopine ABTS⁺ radikala te se reakcijska otopina dobro homogenizira na tresilici. Epruvete se ostave u mraku i pri sobnoj temperaturi tijekom 6 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 734 nm uz slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 40 μ L vode.

Izračun rezultata:

Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom računa se pomoću jednadžbe (3):

$$y = 0,303x + 0,0006; \quad R^2 = 0,9995 \quad [3]$$

Gdje su:

x - koncentracija otopine Trolox-a (mmol L^{-1}),

y - izmjerena vrijednost apsorbancije pri 734 nm u odnosu na slijepu probu.

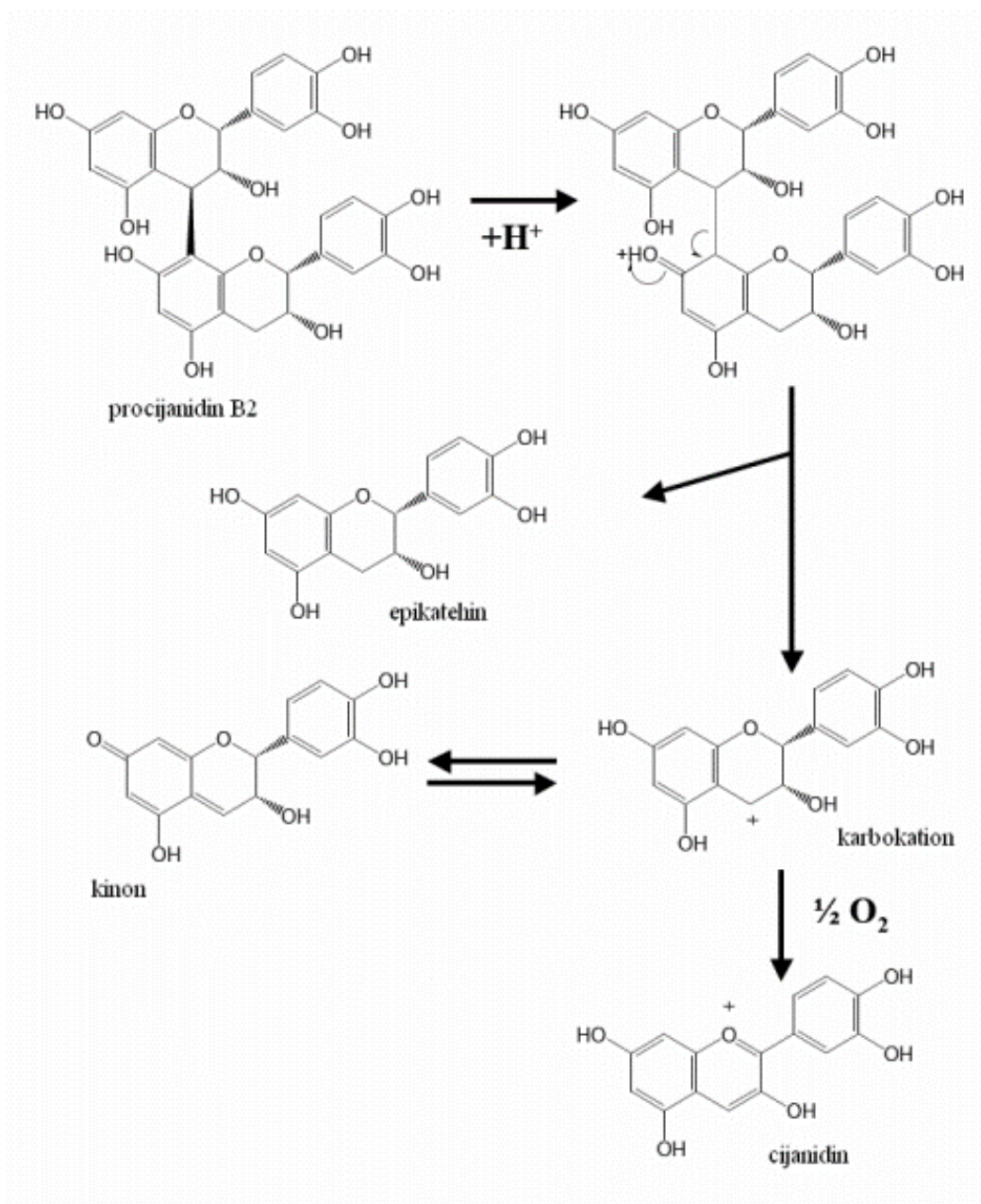
S obzirom na izostanak reakcije, slijepa proba iskazuje više vrijednosti apsorbancije od uzoraka te se vrijednost ΔA_{734} , tj. antioksidacijski učinak uzorka dobiva oduzimanjem vrijednost A_{734} uzorka od vrijednosti A_{734} za slijepu probu.

Kao i kod DPPH metode, baždarni pravac (3) konstruira se za standard Trolox-a (vodeno - topljiv analog vitamina E), pri čemu se za otopine Trolox-a u rastućim, poznatim koncentracijama provede reakcija i mjerenje prema gore opisanom postupku. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha analizirani su u paraleli, a rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja ($n = 2$) s odgovarajućom standardnom devijacijom te se interpretiraju kao ekvivalentna koncentracija Trolox-a ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka).

3.2.2.4. Određivanje udjela ukupnih proantocijanidina

Princip metode:

Metoda se temelji na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula proantocijanidina s klorovodičnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini (Slika 16). Reakcija je popraćena nastankom crvenog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm (Bate-Smith, 1973; Porter i sur., 1986).



Slika 16. Put hidrolize procijanidina B₂ do cijanidina (Wollgast, 2005)

Postupak rada:

Pripreme se otopine n-butanola i koncentrirane klorovodične kiseline (n-BuOH:HCl = 95 : 5, v/v) i 2 % (w/v) otopina amonijevog željezo (II) sulfata dodekahidrata (NH₄Fe(SO₄)₂ × 12 H₂O) u 2 M HCl-a. Otpipetira se 1 mL razrijeđenog uzorka u staklenu epruvetu s čepom i zatim se doda 2 mL otopine n-butanol/HCl i 100 μL pripremljene otopine NH₄Fe(SO₄)₂. Reakcijska otopina dobro se homogenizira na tresilici te se inkubira tijekom 45 minuta pri 95 °C u dobro začepljenim epruvetama. Zatim, epruvete se ohlade u hladnoj vodi te se očita apsorbancija

reakcijske otopine pri 550 nm uz slijepu probu. Slijepa proba priprema se po istom postupku, ali umjesto uzorka sadrži jednaki volumen otapala u kojem je pripremljen uzorak.

Izračun rezultata:

Udjel proantocijanidina računa se pomoću jednadžbe (4):

$$y = 0,0321x + 0,0574 \quad R^2 = 0,9995 \quad [4]$$

Gdje su:

x - koncentracija otopine cijanidin klorida (mg L^{-1}),

y - izmjerena vrijednost apsorbancije pri 550 nm u odnosu na slijepu probu.

Baždarni pravac (4) konstruirao se za standard cijanidin klorida u rastućim, poznatim koncentracijama ($1 - 25 \text{ mg L}^{-1}$) te se provede reakcija i mjerenje prema gore opisanom postupku. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha analizirani su u paraleli, a rezultati udjela proantocijanidina izraženi su kao srednja vrijednost mjerenja ($n = 2$) s odgovarajućom standardnom devijacijom te se interpretiraju kao ekvivalentna koncentracija cijanidin klorida (mg CyCl g^{-1} uzorka).

3.2.2.5. Određivanje pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC metodom

Priprema uzorka:

Ekstrakti ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha su prije injektiranja u kromatografski sustav profiltrirani kroz mikrofiltre $0,2 \mu\text{m}$ (regenerirana celuloza) izravno u HPLC vijale.

Postupak rada:

Analiza je provedena prema metodi razvijenoj u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda (Belščak-Cvitanović i sur., 2011). U analizi je korištena kromatografska kolona Zorbax Extend C18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 100 \AA) (Agilent Technologies, SAD). Uzorak je injektiran u volumenu od $5 \mu\text{L}$, a elucija je provedena dvokomponentnom mobilnom fazom (A - 1% (v/v) mravlja kiselina u vodi, B - 1% (v/v) mravlja kiselina u acetonitrilu), pri protoku od 1 mL min^{-1} i uz gradijent kako slijedi: 0. min – 7% B, 5. min – 7% B, 45. min – 40% B, 47. min – 70% B, 52. min – 70% B + 10 min ekvilibracije na početne uvjete analize. Temperatura kolone iznosila je $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Detekcija analita omogućena je primjenom detektora s nizom fotodioda (engl. diode array detector, DAD), snimanjem pri valnim duljinama 260, 276 i 278 nm, što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara očekivanih bioaktivnih spojeva koji su analizirani ovom metodom.

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva:

Pikovi na kromatogramima identificirani su usporedbom retencijskih vremena s poznatim čistim standardima te usporedbom apsorpcijskih spektara snimljenih u valnom području 190 - 600 nm. Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je korištenjem konstruiranih baždarnih pravaca za pojedini standard (Tablica 5). Prikupljanje i obrada podataka provedeni su aplikacijom OpenLAB CDS ChemStation (v. C.01.10) (Agilent Technologies), a rezultati su dodatno obrađeni u programu Microsoft Office Excel. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

Tablica 5. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u pripremljenim ekstraktima, koeficijenti determinacije (R^2), valna duljina detekcije te koncentracijski raspon valjanosti

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca	R^2	Valna duljina detekcije (nm)	Koncentracijski raspon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Teobromin	$y = 13,986x + 1,8873$	1,0000	278	5 - 100
Kafein	$y = 15,688x + 2,3310$	1,0000	278	5 - 100
Epikatehin	$y = 11,424x + 6,2562$	0,9999	276	2 - 100
Protokatehinska kiselina	$y = 18,711x + 3,5437$	1,0000	260	5 - 100
Galna kiselina	$y = 14,827x + 2,3495$	1,0000	278	5 - 100
Elaginska kiselina	$y = 19,983x + 2,0246$	1,0000	260	5 - 100



REZULTATI I RASPRAVA

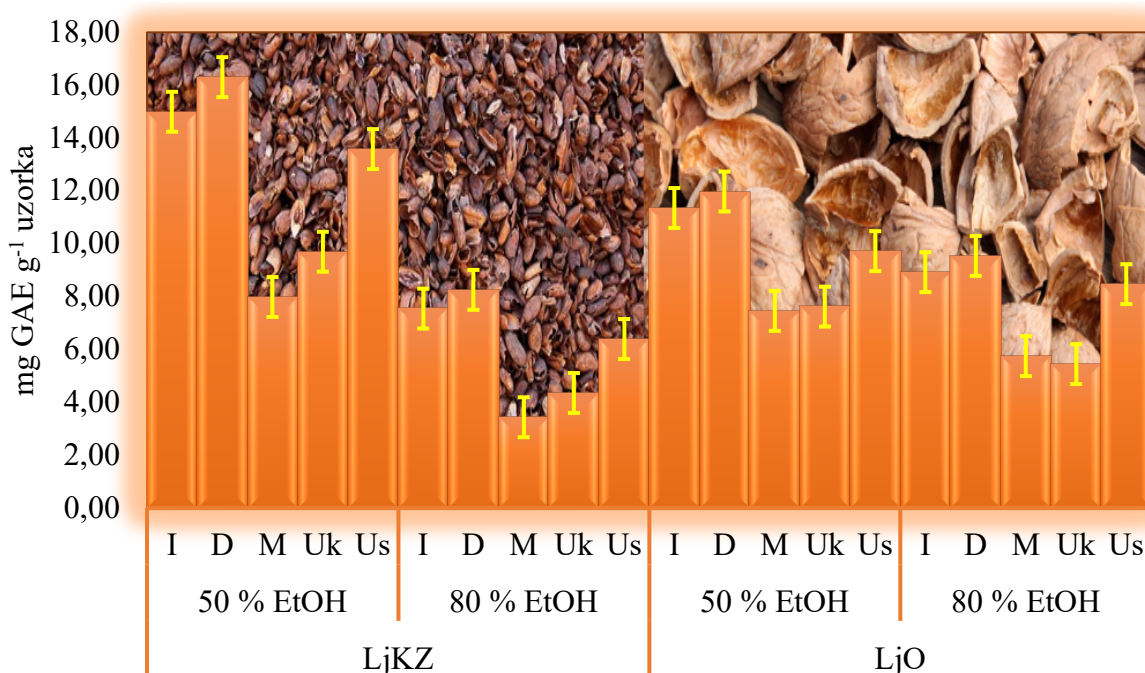
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu ispitana je učinkovitost konvencionalnih tehnika ekstrakcije (infuzije, dekokcije i maceracije) te ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (ultrazvučne kupelji i ultrazvučne sonde), kao inovativne ekstrakcijske tehnike, u izdvajanju bioaktivnih spojeva iz ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha. Dobivenim etanolnim ekstraktima određen je udjel ukupnih polifenola i proantocijanidina te antioksidacijski kapacitet DPPH i ABTS metodama, dok su primjenom HPLC-DAD analize određeni pojedinačni bioaktivni spojevi.

4.1. BIOAKTIVNI SASTAV EKSTRAKATA LJUSKE KAKAOVOG ZRNA I LJUSKE ORAHA

4.1.1. Udjel ukupnih polifenola

Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha prikazani su na Slici 17. Najveći udjel ukupnih polifenola određen je u 50 % - tnom etanolnom dekoktu, ljuske kakovog zrna (16,30 mg GAE g⁻¹ uzorka) i ljuske oraha (11,98 mg GAE g⁻¹ uzorka). U 50 % - tnim etanolnim infuzijama određen je nešto niži udjel ukupnih polifenola, ali i dalje relativno visok s obzirom na primijenjene tehnike ekstrakcije.



Slika 17. Udjel ukupnih polifenola (mg GAE g⁻¹ uzorka) u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha

Među konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, maceracija je rezultirala najnižim udjelom ukupnih polifenola, posebice za uzorak ljuske kakaovog zrna, gotovo upola manjim u usporedbi s ekstrakcijama tipa dekokcija i infuzija. S obzirom na udjele etanola u ekstrakciji, vidljivo je da su u 50 % - tnm etanolnim ekstraktima postignute maksimalne vrijednosti koje su gotovo dvostruko veće u odnosu na iste u 80 % - tnm etanolnim ekstraktima, u uzorku ljuske kakaovog zrna. U ekstraktima pripremljenima ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, bilo primjenom ultrazvučne kupelji ili ultrazvučne sonde, određen je manji udjel ukupnih polifenola nego u ekstraktima pripremljenima konvencionalnim tehnikama ekstrakcije tipa infuzija i dekokcija. Ipak, primjena ultrazvučne sonde pokazala se učinkovitijom od ultrazvučne kupelji u ekstrakciji polifenola. Kao i kod konvencionalnih tehnika ekstrakcije, 50 % - tna otopina etanola pokazala se učinkovitijim otapalom za ekstrakciju polifenola od 80 % - tne, odnosno određeni udjeli polifenola su bili približno dvostruko veći. Stoga je primjenom ultrazvuka najviši udjel ukupnih polifenola određen u ekstraktu pripremljenom pomoću ultrazvučne sonde u 50 % - tnom etanolu (13,58 mg GAE g⁻¹ uzorka).

U ljusci oraha je primjena 80 % - tnog etanola rezultirala u prosjeku nešto nižim udjelom ukupnih polifenola u odnosu na vrijednosti dobivene u ekstraktima pripremljenima u 50 % - tnoj otopini etanola. Infuzija je, imala nešto niži udjel ukupnih polifenola u odnosu na dekokt, dok je u maceratu određen najniži udjel ukupnih polifenola koji iznosi 7,46 mg GAE g⁻¹ uzorka (50 % - tni etanol) i 5,75 mg GAE g⁻¹ uzorka (80 % - tni etanol). Od inovativnih tehnika ekstrakcije, najviši udjel ukupnih polifenola ekstrahiran je ultrazvučnom sondom u 50 % - tnoj otopini etanola (9,72 mg GAE g⁻¹ uzorka), dok je najniži udjel ukupnih polifenola određen u 80 % - tnom ekstraktu pripremljenom u ultrazvučnoj kupelji (5,45 mg GAE g⁻¹ uzorka). Na temelju dobivenih rezultata udjela ukupnih polifenola u ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha, vidljivo je da je dominantan utjecaj imao odabir otapala, tj. udjel etanola u vodenoj otopini, pri čemu se niži udjel etanola (50 %) pokazao učinkovitijim. Osim udjela etanola, temperatura se također pokazala kao faktor koji doprinosi boljoj ekstrakciji ukupnih polifenola te su više vrijednosti postignute u ekstrakcijama u kojima su korištene više temperature. U usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, primjena ultrazvuka pokazala je potencijal s obzirom na skraćivanje vremena ekstrakcije.

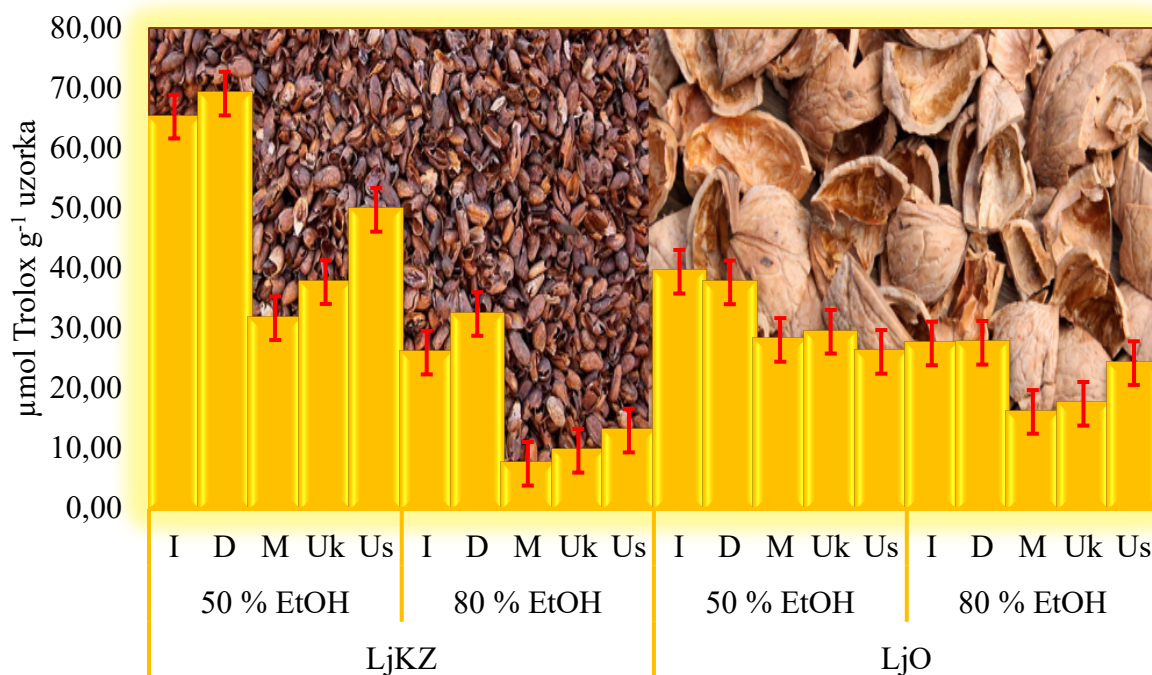
Istraživanje Martineza i suradnika (2012) pokazalo je znatno niži udjel ukupnih polifenola (0,82 mg GAE g⁻¹ uzorka) u ekstraktu ljuske kakaovog zrna pripremljenom konvencionalnom ekstrakcijom (24 h, 25 °C) u 96 % - tnom etanolu u odnosu na ovaj rad. Wiyono i suradnici (2020) su ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji primjenom 25 - 75 % - tnog etanola u trajanju 20

- 60 min odredili malo niži udjel ukupnih polifenola (395,2 - 3291,5 $\mu\text{g GAE mL}^{-1}$ uzorka) u ljusti kakaovog zrna u odnosu na rezultate u ovome radu dobivene istim tipom ekstrakcije. Barbosa-Pereira i suradnici (2018) su u vodenom ekstraktu ljuske kakaovog zrna dobivenom primjenom pulsirajućeg električnog polja (50 Hz) odredili udjel ukupnih polifenola u rasponu od 17,88 do 55,16 mg GAE g^{-1} suhe tvari, dok su Nsor-Atindana i suradnici (2012) primjenom mikrovalne ekstrakcije (5 min; 50 °C, 500 W) u 80 % - tnom etanolnom ekstraktu ljuske kakaovog zrna odredili 23,36 mg GAE g^{-1} uzorka ukupnih polifenola.

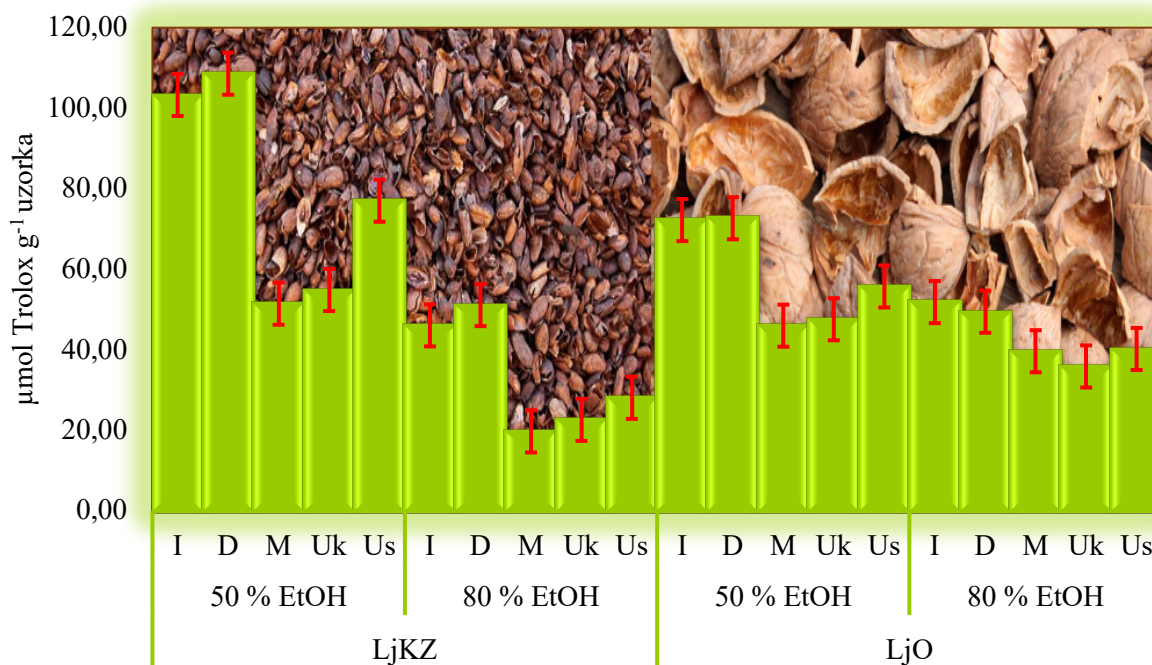
Wang i suradnici (2014) su u ljusti oraha odredili znatno viši udjel ukupnih polifenola (14,81 g GAE 100g^{-1} uzorka) konvencionalnom tehnikom ekstrakcije (4 h, 45 °C) koristeći 95 % - tni etanol u odnosu na ovaj rad, isto kao Han i suradnici (2018) u svom istraživanju (51,2 mg GAE g^{-1} uzorka) primjenivši ekstrakciju ultrazvučnom sondom (15 min, 25 °C) s 50 % - tnim etanolom. Yang i suradnici (2014) pripremili su vodeni ekstrakt (45 min, 100 °C) ljuske oraha u kojem su odredili 26,36 mg GAE g^{-1} uzorka ukupnih polifenola. Zarghami Moghaddam i suradnici (2017) su konvencionalnom ekstrakcijom ljuske oraha u metanolu (24 h, 25 °C) odredili udjel ukupnih polifenola u rasponu od 34,59 do 68,34 mg GAE g^{-1} uzorka. Akbari i suradnici (2012) proveli su Soxhlet ekstrakciju (30 min, 60 °C) ljuske oraha u 96 % - tnom etanolu i odredili udjel ukupnih polifenola u rasponu od 9,39 do 32,11 mg GAE 100g^{-1} uzorka. Ganesapillai i suradnici (2016) su u ekstraktu ljuske oraha dobivenom ekstrakcijom mikrovalovima (4 min, 180 W) u acetonu odredili 46 mg g^{-1} ukupnih polifenola.

4.1.2. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet etanolnih ekstrakata ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha određeni su DPPH i ABTS metodama, a dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 18 i 19. Najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH (69,09 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) i ABTS (108,58 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) metodama u ljusti kakaovog zrna određen je u ekstraktima dobivenima dekokcijom u 50 % - tnom etanolu, što je sukladno i najvišem udjelu ukupnih polifenola u ovom uzorku.



Slika 18. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) etanolnih ekstrakata ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha određen DPPH metodom



Slika 19. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) etanolnih ekstrakata ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha određen ABTS metodom

Jednako tako, najniži antioksidacijski kapacitet s obje metode određen je u maceratima u 80 % - tnom etanolu. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta za pojedine ekstrakte ljuske kakaovog zrna pratile su trend udjela ukupnih polifenola, što je očekivano, te je određeno da su ekstrakcijom u 50 % - tnom etanolu dobiveni ekstrakti većeg antioksidacijskog potencijala.

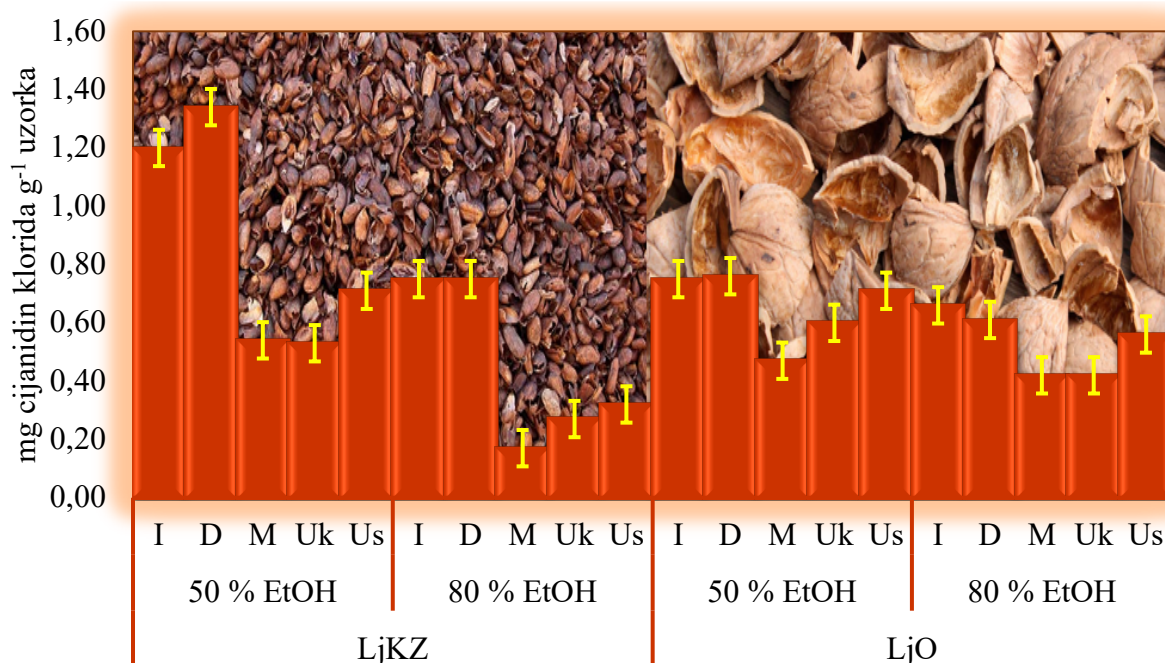
U ljusci oraha DPPH metodom određen je nešto viši antioksidacijski kapacitet u 50 % - tnoj etanolnoj infuziji (39,45 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) u odnosu na dekokt s istim udjelom etanola (37,68 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka), dok su ABTS metodom određene jednake vrijednosti (72,50 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) u ovim ekstraktima. Najmanje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta prate vrijednosti udjela ukupnih polifenola, uz iznimku da je u ekstraktu ljuske oraha dobivenom ultrazvučnom kupelji primjenom 80 % - tnog etanola određen najmanji antioksidacijski kapacitet ABTS metodom, iako taj uzorak nema najmanji udjel ukupnih polifenola.

Martinez i suradnici (2012) su u 96 % - tnom etanolnom ekstraktu ljuske kakaovog zrna odredili antioksidacijski kapacitet DPPH metodom u rasponu od 1,57 do 33,93 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka, a ABTS metodom 2,48 - 22,93 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka, što su značajno niže vrijednosti od rezultata u ovome radu. Wiyono i suradnici (2020) su u etanolnom ekstraktu ljuske kakaovog zrna pripremljenog u ultrazvučnoj kupelji odredili postotak antioksidansa u rasponu od 43,4 do 79,2 DPPH metodom. Zarghami Moghaddam i suradnici (2017) odredili su da metanolni ekstrakt ljuske oraha reducira DPPH radikal 10,3 %, dok su Akbari i suradnici (2012) u etanolnom ekstraktu dobivenom Soxhlet ekstrakcijom odredili da se taj postotak kreće u rasponu od 7,99 do 17,27.

4.1.3. Udjel ukupnih proantocijanidina

Ukupni proantocijanidini u pripremljenim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha određeni su modificiranom metodom po Bate-Smith-u, a rezultati su prikazani na Slici 20. Najveći udjel ukupnih proantocijanidina određen je u 50 % - tnim etanolnim dekoktima u obje sirovine. U navedenim ekstraktima udjel ukupnih proantocijanidina iznosio je 1,34 mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka, dok je u ljusci oraha taj udjel bio gotovo upola manji (0,76 mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka). U 50 % - tnoj infuziji ljuske kakaovog zrna određen je nešto manji udjel ukupnih proantocijanidina, nego u dekoktu, dok je među konvencionalnim tehnikama ekstrakcija najmanji udjel ipak određen u maceratima (0,54 mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka). Primjenom 80 % - tnog etanola u pripremljenoj infuziji i dekoktu određen je jednaki udjel ukupnih proantocijanidina (0,75 mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka), dok je maceracijom dobiveno

samo 0,17 mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka. Kao i u slučaju ukupnih polifenola, 80 % - tni etanol pokazao se kao manje učinkovito otapalo za ekstrakciju ukupnih proantocijanidina. U ekstraktima ljuske oraha pripremljenima infuzijom i dekokcijom u 50 % - tnom etanolu određen je najviši, gotovo jednaki udjel ukupnih proantocijanidina, dok je u ekstraktu pripremljenom maceracijom određeno tek 0,47 mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka. U ekstraktima ljuske oraha pripremljenima konvencionalnim ekstrakcijama, primjenom 80 % - tnog etanola, određeni su nešto manji udjeli ukupnih proantocijanidina u odnosu na iste tipove ekstrakcija provedene s 50 % - tnim etanolom. Primjenom ultrazvučne ekstrakcije u ljusci kakaovog zrna određen je upola manji udjel ukupnih proantocijanidina u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije, infuziju i dekokciju u 50 % - tnom i 80 % - tnom etanolu, dok se u ekstraktima ljuske oraha rezultati udjela ukupnih proantocijanidina nakon primjene ultrazvuka nisu značajno razlikovali u odnosu na one dobivene konvencionalnim tehnikama ekstrakcija za oba otapala. U ljusci kakaovog zrna i ljusci oraha, ekstrakcijom ultrazvučnom sondom dobiveni su veći udjeli ukupnih proantocijanidina u odnosu na ekstrakte pripremljene u ultrazvučnoj kupelji.



Slika 20. Udjel ukupnih proantocijanidina (mg cijanidin klorida g^{-1} uzorka) u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha

Grillo i suradnici (2018) su u svom istraživanju odredili nešto manje od 4 g 100g^{-1} oligomernih proantocijanidina u ljusci kakaovog zrna. Rusu i suradnici (2018) su u ekstraktu pregrade oraha dobivenog primjenom 75 % - tnog acetona odredili 237,20 mg katehina g^{-1} uzorka ukupnih proantocijanidina ili kondenziranih tanina, a Do Prado i suradnici (2014) su u ekstraktu ljuske

pekan oraha pripremljenom u obliku infuzije i sušenom raspršivanjem odredili 412,10 mg g⁻¹ uzorka kondenziranih tanina. De la Rosa i suradnici (2011) odredili su raspon proantocijanidina od 316,1 do 464,4 mg katehina g⁻¹ uzorka u ekstraktu ljuske pekan oraha pripremljenog u 80 % - tnoj otopini acetona.

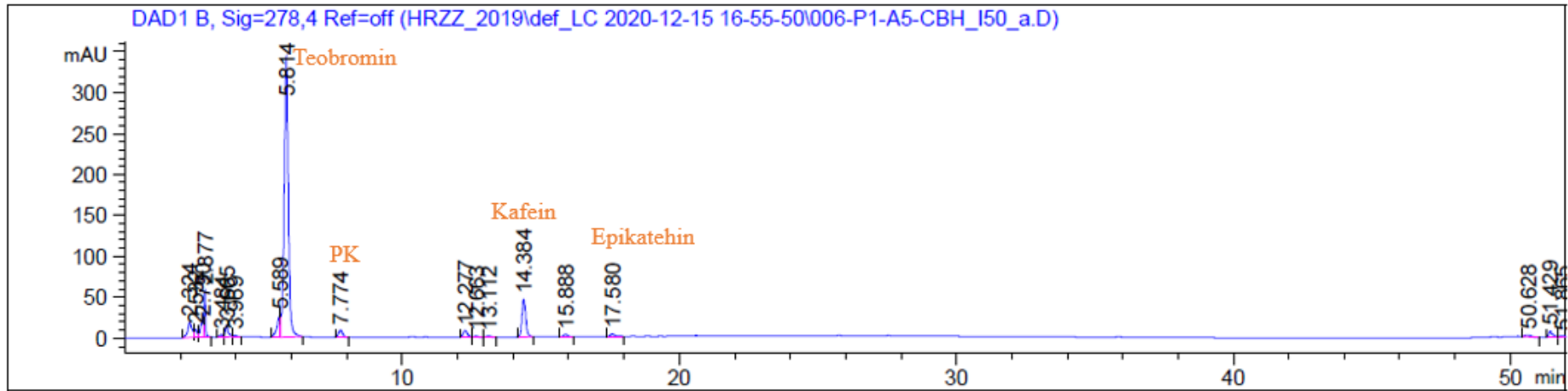
U Tablici 6 prikazane su korelacije rezultata određene u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha. Svi rezultati određivanja ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodama te ukupnih proantocijanidina pokazuju visoki stupanj korelacije. Kod ljuske kakaovog zrna najviša korelacija određena je između DPPH i ABTS analiza određivanja antioksidacijskog kapaciteta (0,9956), dok je najmanja korelacija vidljiva između udjela ukupnih polifenola i ukupnih proantocijanidina (0,9090). Kod ljuske oraha najviša korelacija vidljiva je između udjela ukupnih polifenola i proantocijanidina (0,9454), dok je najmanja korelacija određena između rezultata DPPH analize određivanja antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih proantocijanidina (0,8410).

Tablica 6. Korelacije rezultata udjela ukupnih polifenola (UP), antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i ABTS) i ukupnih proantocijanidina (PA) određenih u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha

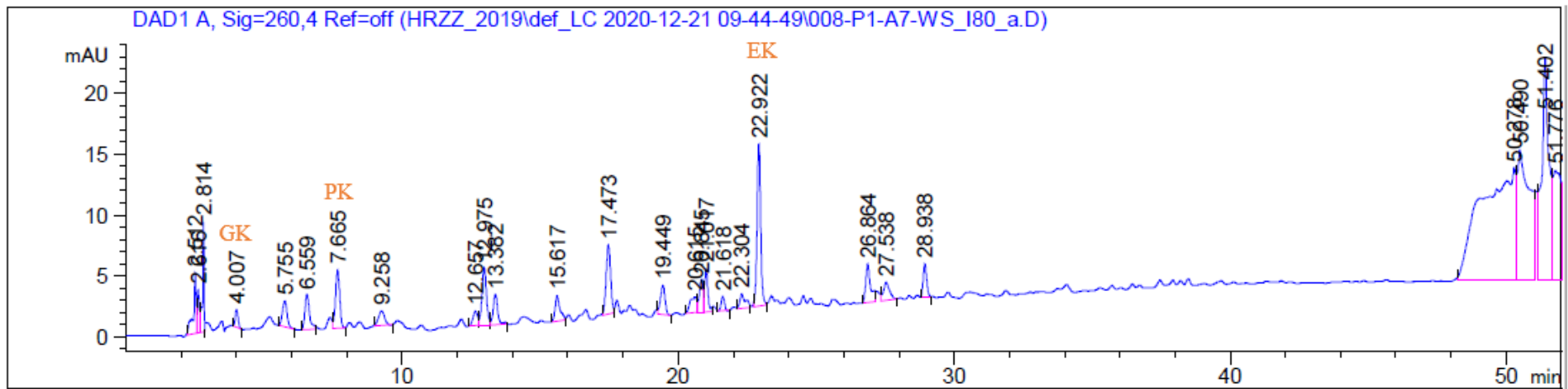
LjKZ		UP	DPPH	ABTS	PA
	UP	1,0000	0,9857	0,9843	0,9090
	DPPH		1,0000	0,9956	0,9355
	ABTS			1,0000	0,9494
	PA				1,0000
LjO		UP	DPPH	ABTS	PA
	UP	1,0000	0,8920	0,9195	0,9454
	DPPH		1,0000	0,9133	0,8410
	ABTS			1,0000	0,8895
	PA				1,0000

4.1.4. Udjel pojedinačnih bioaktivnih spojeva

Određivanje udjela pojedinačnih bioaktivnih spojeva u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha provedeno je HPLC-DAD analizom. Na Slikama 21 i 22 prikazani su kromatogrami ekstrakata ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha pripremljenih tehnikom infuzije u 50 % - tnoj i 80 % - tnoj otopini etanola.



Slika 21. Kromatogram ekstrakta ljuske kakaovog zrna (DAD 278 nm) pripremljenog infuzijom u otopini 50 % - tnog etanola (PK – protokatehinska kiselina)





Slika 22. Kromatogram ekstrakta ljuske oraha (DAD 260 nm) pripremljenog infuzijom u otopini 80 % - tnog etanola (GK - galna kiselina; PK - protokatehinska kiselina; EK - elaginska kiselina)

Na kromatogramu ekstrakta ljuske kakaovog zrna identificirani su pikovi teobromina, protokatehinske kiseline, kafeina i epikatehina, a na kromatogramu ekstrakta ljuske oraha galna kiselina, protokatehinska kiselina i elaginska kiselina. Ostali vidljivi pikovi na kromatogramima nisu mogli biti identificirani s obzirom na dostupne standarde.

Identificirani spojevi ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha su i kvantitativno određeni, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7. Očekivano, u ljusci kakaovog zrna dobivene su najveće vrijednosti teobromina, dok su udjeli ostala tri identificirana spoja bili značajno manji. Ekstraktabilnost metilksantina, teobromina i kafeina, iz ljuske kakaovog zrna, nije pokazala tako velike razlike s obzirom na tehniku ekstrakcije i primijenjeno otapalo, kao u slučaju ukupnih polifenola. Ipak, teobromin je najviše ekstrahirano u ekstraktu pripremljenom tehnikom infuzije u 50 % - tnom etanolu (6,56 mg g⁻¹ uzorka), a dekokcijom u istom otapalu ekstrahirano je približno jednako teobromina. Ekstrakcija 80 % - tnom etanolom u slučaju dekokcije i infuzije pokazala je nešto manju učinkovitost u izdvajanju teobromina (5,50 - 5,83 mg g⁻¹ uzorka), dok su macerati pripremljeni u ovim otapalima rezultirali gotovo jednakim udjelima teobromina. Ultrazvučna sonda pokazala je visoku učinkovitost u ekstrakciji teobromina, a pritom se 80 % - tni etanol pokazao kao učinkovitije otapalo te je postignuta vrijednost jednaka onoj za ekstrakt pripremljen infuzijom u 50 % - tnom etanolu. Ekstrakcijska učinkovitost kafeina bila je najveća za konvencionalne ekstrakcije tipa dekokcija i infuzija uz 80 % - tni etanol kao otapalo (0,82 - 0,85 mg g⁻¹ uzorka). Ekstrakcija maceracijom pokazala se gotovo jednako učinkovitom, poglavito u slučaju ekstrakcije 50 % - tnom etanolom. Najmanja učinkovitost određena je za ekstrakciju primjenom ultrazvučne kupelji, dok se ultrazvučna sonda pokazala jednako učinkovitom kao i konvencionalne ekstrakcijske tehnike, neovisno o primijenjenom otapalu. Od polifenolnih spojeva u ekstraktima ljuske kakaovog zrna, identificirani su epikatehin i protokatehinska kiselina. Učinkovitost ekstrakcije protokatehinske kiseline bila je podjednaka za sve ekstrakcijske tehnike i oba otapala, uz nešto više udjele dobivene konvencionalnim tehnikama dekokcije i infuzije, dok su za ekstrakciju epikatehina bile preferabilne konvencionalne tehnike dekokcije i infuzije uz primjenu 80 % - tnog etanola.

U ljusci oraha od polifenolnih spojeva identificirani su protokatehinska, galna i elaginska kiselina među kojima je elaginska kiselina bila najzastupljenija u svim ekstraktima. Elaginska kiselina najviše je ekstrahirana u ekstraktu pripremljenom infuzijom u 80 % - tnom etanolu (148,78 µg g⁻¹ uzorka). Dekokcija u istom otapalu dala je jednake vrijednosti elaginske kiseline kao i infuzija s 50 % - tnom etanolom (128,07 µg g⁻¹ uzorka), a maceracijom s oba otapala dobiveni su približno isti udjeli elaginske kiseline u ekstraktima ljuske oraha.

Tablica 7. Udjel pojedinačnih bioaktivnih spojeva u etanolnim ekstraktima ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha

Uzorak	Otapalo	Vrsta ekstrakcije	Bioaktivni spoj					
			Teobromin (mg g ⁻¹ uzorka ± SD)	Kafein (mg g ⁻¹ uzorka ± SD)	Epikatehin (μg g ⁻¹ uzorka ± SD)	Protokatehinska kiselina (μg g ⁻¹ uzorka ± SD)	Galna kiselina (μg g ⁻¹ uzorka ± SD)	Elaginska kiselina (μg g ⁻¹ uzorka ± SD)
 LjKZ	50 % EtOH	I	6,56 ± 0,26	0,70 ± 0,01	87,87 ± 1,32	278,74 ± 0,74	n.d.	n.d.
		D	6,38 ± 0,25	0,69 ± 0,06	93,97 ± 6,86	265,72 ± 18,13		
		M	5,57 ± 1,13	0,73 ± 0,03	53,73 ± 0,30	257,76 ± 9,88		
		Uk	5,52 ± 0,30	0,61 ± 0,03	49,47 ± 1,87	226,40 ± 9,63		
		Us	5,11 ± 0,04	0,78 ± 0,01	57,48 ± 0,30	258,31 ± 5,05		
	80 % EtOH	I	5,50 ± 0,02	0,82 ± 0,00	105,65 ± 1,58	283,05 ± 2,49	n.d.	n.d.
		D	5,83 ± 0,26	0,85 ± 0,02	110,00 ± 4,57	296,02 ± 7,31		
		M	5,68 ± 1,14	0,73 ± 0,02	54,32 ± 1,00	262,87 ± 13,17		
		Uk	4,39 ± 0,17	0,67 ± 0,02	53,27 ± 1,15	233,01 ± 4,72		
		Us	6,52 ± 0,00	0,74 ± 0,00	57,47 ± 0,57	256,27 ± 1,55		
 LjO	50 % EtOH	I	n.d.	n.d.	n.d.	65,99 ± 0,46	17,91 ± 1,57	128,40 ± 2,10
		D				61,64 ± 0,84	16,48 ± 0,34	121,26 ± 3,07
		M				57,76 ± 1,53	13,56 ± 0,57	98,98 ± 4,66
		Uk				52,30 ± 2,79	12,10 ± 0,66	99,58 ± 5,70
		Us				53,16 ± 0,11	12,02 ± 0,23	108,34 ± 2,64
	80 % EtOH	I	n.d.	n.d.	n.d.	64,90 ± 1,64	16,80 ± 0,27	148,78 ± 0,46
		D				59,91 ± 3,63	12,98 ± 1,21	128,07 ± 0,54
		M				59,12 ± 0,06	11,33 ± 0,49	114,74 ± 1,04
		Uk				48,34 ± 7,45	9,05 ± 0,20	99,25 ± 12,65
		Us				60,52 ± 1,66	11,16 ± 1,56	127,90 ± 2,34

„n.d.“- nije detektiran

U ekstraktima dobivenim ultrazvučnom sondom primjenom oba otapala određen je veći udjel elaginske kiseline, nego u ekstraktima pripremljenim ultrazvučnom kupelji. Ekstrakcijom ultrazvučnom sondom u 80 % - tnoj otopini etanola dobivena je gotovo jednaka vrijednost elaginske kiseline kao i dekokcijom u istom otapalu te infuzijom u 50 % - tnom etanolu. Ekstrakcijska učinkovitost protokatehinske kiseline bila je najveća za infuziju u 50 % - tnom etanolu ($65,99 \mu\text{g g}^{-1}$ uzorka), dekokcija i maceracija bile su gotovo jednako učinkovite primjenom 50 % - tnog i 80 % - tnog etanola, a približno istom vrijednosti rezultirala je i ekstrakcija ultrazvučnom sondom u 80 % - tnom etanolu. Najmanje učinkovito pokazale su se ultrazvučne ekstrakcije u 50 % - tnom etanolu kao i ekstrakcija ultrazvučnom kupelji u 80 % - tnom etanolu. Učinkovitost ekstrakcije galne kiseline bila je gotovo jednaka primjenom oba otapala u svim ekstrakcijskim tehnikama, no međutim infuzija i dekokcija primjenom 50 % - tnog etanola kao i infuzija u 80 % - tnom etanolu bile su nešto učinkovitije.

Grillo i suradnici (2018) su u ljusci kakaovog zrna odredili udjel teobromina $32,7 \pm 0,12 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka što je značajno više od rezultata u ovome radu, dok je udjel kafeina ($1,76 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka) sukladan vrijednostima dobivenima u ovome istraživanju. Hernandez-Hernandez i suradnici (2018) su u 80 % - tnom metanolnom ekstraktu ljuske kakaovog zrna odredili $10,20 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka teobromina, $1,02 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka katehina i $15,84 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka epikatehina, dok kafein nisu detektirali. U vodenom ekstraktu odredili su $8,47 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka teobromina, $1,65 \text{ mg g}^{-1}$ katehina i $6,93 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka epikatehina, a kafein niti tu nisu detektirali. Barbosa-Pereira i suradnici (2018) su u vodenom ekstraktu dobivenom primjenom pulsirajućeg električnog polja odredili raspon teobromina $4,64 - 10,92 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka, kafeina $1,59 - 4,21 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka, epikatehina $0,21 - 2,12 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka, a katehin nisu detektirali.



ZAKLJUČCI

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata u ovome istraživanju izvode se sljedeći zaključci:

- 1.** Primjena 50 % - tnog etanola u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha rezultirala je ekstraktima većeg udjela ukupnih polifenola i ukupnih proantocijanidina te većeg antioksidacijskog kapaciteta, nego primjenom istih ekstrakcijskih uvjeta i 80 % - tnog etanola kao otapala, što je posebno bilo izraženo za uzorak ljuske kakaovog zrna. Udjel etanola u otapalu pokazao se kao najvažniji faktor o kojem je ovisila ekstrakcijska učinkovitost bioaktivnih spojeva.
- 2.** Temperatura ekstrakcije također je bila važan faktor u postizanju učinkovite ekstrakcije, budući da su veći udjeli ukupnih polifenola, ukupnih proantocijanidina te veći antioksidacijski kapaciteti postignuti uz primjenu zagrijavanja, bilo primjenom grijača ili oslobađanjem topline uslijed djelovanja ultrazvuka. Najniža ekstrakcijska učinkovitost za navedene parametre postignuta je ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi (maceracija), usprkos tome što je u tom slučaju vrijeme ekstrakcije bilo najduže.
- 3.** U uzorku ljuske kakaovog zrna, najveći udjel ukupnih polifenola (16,30 mg GAE g⁻¹), ukupnih proantocijanidina (1,34 mg cijanidin klorida g⁻¹ uzorka) te najveći antioksidacijski kapacitet (108,58 μmol Trolox g⁻¹ uzorka) određeni su u 50 % - tnom etanolnom dekoku pri 100 °C tijekom 20 min, a tek nešto niži udjeli određeni su u 50 % - tnoj etanolnoj infuziji pri 80 °C tijekom 30 min.
- 4.** U uzorku ljuske oraha, najveći udjel ukupnih polifenola (11,98 mg GAE g⁻¹), ukupnih proantocijanidina (0,76 mg cijanidin klorida g⁻¹ uzorka) te najveći antioksidacijski kapacitet (72,71 μmol Trolox g⁻¹ uzorka) određeni su u 50 % - tnom etanolnom dekoku pri 100 °C tijekom 20 min, što je predstavljalo gotovo jednaku učinkovitost kao i za ekstrakciju tipa infuzije u 50 % - tnom etanolu pri 80 °C tijekom 30 min.
- 5.** Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, pri parametrima definiranim u radu, pokazala se manje učinkovitom u odnosu na konvencionalne tehnike tipa dekocije i infuzije, što je bilo različito izraženo s obzirom na uzorak i primijenjeno otapalo te su najveće razlike bile vidljive na uzorku ljuske kakaovog zrna. Ekstrakcijska učinkovitost pojedine primijenjene tehnike uvelike ovisi o samom uzorku, kao i udjelu bioaktivnih komponenata koje se izdvajaju te njihovim svojstvima.

- 6.** Kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, veća ekstrakcijska učinkovitost ukupnih polifenola, ukupnih proantocijanidina, kao i antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata, postignuta je primjenom ultrazvučne sonde.
- 7.** Analizom pojedinačnih bioaktivnih spojeva u ljusci kakaovog zrna dominirali su metilksantini teobromin i kafein, a od polifenola flavanoli, posebice proantocijanidini, dok je pojedinačno određen samo epikatehin, te protokatehinska kiselina iz skupine hidroksibenzojevih kiselina, ali u značajno manjim udjelima nego metilksantini.
- 8.** Određeni udjeli teobromina, kafeina, epikatehina i protokatehinske kiseline nisu pokazali značajnu ovisnost o primijenjenom otapalu ili ekstrakcijskoj tehnici; štoviše u ekstraktima pripremljenima infuzijom u 50 % - tnom etanolu i primjenom ultrazvučne sonde i 80 % - tnog etanola određeni su jednaki, ujedno i najviši udjeli teobromina od približno 0,66 % mase uzorka. Udjeli kafeina bili su u prosjeku deseterostruko manji, udjeli protokatehinske kiseline u prosjeku dvadeseterostruko manji, a epikatehina stostruko manji.
- 9.** S obzirom na visoke koeficijente korelacije između udjela ukupnih polifenola i proantocijanidina te antioksidacijskog kapaciteta pripremljenih ekstrakata, kao i relativnu neovisnost promjene udjela metilksantina ovisno o otapalu i ekstrakcijskoj tehnici, kao nositelji antioksidacijskog kapaciteta u ljusci kakaovog zrna ističu se proantocijanidini.
- 10.** Analizom pojedinačnih bioaktivnih spojeva u ljusci oraha, određene su 3 fenolne kiseline iz skupine hidroksibenzojevih kiselina: galna, protokatehinska i elaginska, s najvišim određenim udjelima od 20, 70 i 150 $\mu\text{g g}^{-1}$ uzorka, čija ekstrakcijska učinkovitost nije značajno ovisila o primijenjenom otapalu i ekstrakcijskim uvjetima. Uz proantocijanidine, ovi spojevi mogu se smatrati dominantnim nositeljima antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ljuske oraha.
- 11.** Ljuska kakaovog zrna i ljuska oraha mogu se smatrati novim vrijednim izvorima bioaktivnih spojeva, što može biti jedna od osnova njihove primjene u prehrambenoj industriji.



LITERATURA

6. LITERATURA

- Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Država (2019) <[https:// www.epa.gov/sustainable-management-food/food-recovery-hierarchy](https://www.epa.gov/sustainable-management-food/food-recovery-hierarchy)> Pristupljeno 11. veljače 2021.
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., Valero, J. R. (2012) Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 382 – 400.
- Akbari, V., Jamei, R., Heidari, R., Esfahlan, A. J. (2012) Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food Chem.* **135**, 2404 – 2410.
- Aladedunye, F. A. (2014) Natural antioxidants as stabilizers of frying oils. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **116**, 688 - 706.
- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J. P., Mason T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 261 – 265.
- Almonte-Flores, D. C., Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G., Rosales-Castro, M. (2015) Pharmacological and genotoxic properties of polyphenolic extracts of *Cedrela odorata* L. and *Juglans regia* L. barks in rodents. *Evid-Based Complalt.* **2015**, 1 - 8.
- Amarowicz, R., Janiak, M. (2018) Reference Module in Food Science, Elsevier, Amsterdam, str. 1 – 7.
- Andrade, I. V. O., Pires, A. J. V., Carvalho, G. G. P., de Veloso, C. M., Bonomo, P. (2010) Losses, fermentative characteristics and nutritional value of elephant grass silage containing agricultural by-products. *R. Bras. Zootec.* **39**, 2578 - 2588.
- Anonymous 1, <<https://explodingtree.com/shop/cocoa-husks/>>. Pristupljeno 10. siječnja 2021.
- Anonymous 2, <<https://www.magicnobilje.com/vesti/aktuelno/288982/ljuska-oraha-za-blistav-osmeh>>. Pristupljeno 10. siječnja 2021.
- Arfelli, V., Henn, C., Dapper, T. B., Arfelli, V. C., Henn, C., Simoes, M. R. (2016) Fructofuranosidase production by *Aspergillus versicolor* isolated from Atlantic forest and grown on apple pomace. *Afr. J. Microbiol. Res.* **10**, 938 - 948.
- Arscott, S. A., Tanumihardjo, S. A. (2010) Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **9** (2), 223 – 239.

- Ayala, A., Munoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 1-31.
- Ayırlımsı, N., Kaymakçı, A., Özdemir, F. (2013) Physical, mechanical, and thermal properties of polypropylene composites filled with walnut shell flour. *J. Ind. Eng. Chem.* **19**, 908 - 914.
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426 – 436.
- Barbosa-Pereira, L., Guglielmetti, A., Zeppa, G. (2018) Pulsed electric field assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shell and coffee silverskin. *Food Bioproc. Tech.* **11**, 818 – 835.
- Bate-Smith, E. C. (1973) Tannins in herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* **12**, 1809 – 1812.
- Beckett, S. T. (2018) *The Science of Chocolate*, 2. izd., Royal Society of Chemistry, London, str. 11 - 58.
- Belščak-Cvitanović, A., Stanojević, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094 - 1101.
- Benavente-Garcia, O., Castillo J. (2008) Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* **56 (15)**, 6185 – 6205.
- Bond, B., Grundy, A. C. (2001) Non-chemical weed management in organic farming systems. *Weed Res.* **41**, 383 – 405.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhar, Z. Kilar, F., Felinger, A. (2010) Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography – mass spectrometry in *Thymus* species. *J. Chromatogr. A* **1217**, 7972 - 7980.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *J. Food Sci.* **28**, 25 - 30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317 - 333.
- Bursać-Kovačević, D., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2018) Innovative technologies for the

- recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chem.* **268**, 513 – 521.
- Carrageta, D. F., Dias, T. R., Alves, M. G., Oliveira, P. F., Monteiro, M. P., Silva, B. M. (2018) Anti-obesity potential of natural methylxanthines. *J. Funct. Foods* **43**, 84 – 94.
 - Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) Azospirillum spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Handbook for Azospirillum, (Cassan i sur., ured.), Springer International Publishing Switzerland, str. 447 - 467.
 - Castro-Vazquez, L., Alañón, M. E., Rodriguez-Robledo, V., Perez-Coello, M. S., Hermosin-Gutierrez, I., Diaz-Maroto, M. C., Jordan, J., Galindo, M. F., Arroyo-Jiménez, M. del M. (2016) Bioactive Flavonoids, Antioxidant Behaviour, and Cytoprotective Effects of Dried Grapefruit Peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1 – 12.
 - Chew K., Khoo M., Ng S., Thoo Y., Aida W.W., Ho C. (2011) Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Int. Food Res. J.* **18**, 14 - 27.
 - Chung, B. Y., Iiyama, K., Han, K. W. (2003) Food Science: Compositional characterization of cacao (*Theobroma cacao* L.) hull. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**, 12 – 16.
 - Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., Lin, Y. (1998) Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**, 421 - 464.
 - Correia, R. T. P., Borges, K. C., Medeiros, M. F., Genovese, M. I. (2012) Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Sci. Technol. Int.* **18**, 539 - 547.
 - Couto, S. R., Sanroman, M. (2006) Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *J. Food Eng.* **76**, 291 - 302.
 - Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. U: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, (Crozier, A., Clifford, M. N. i Ashihar, H., ured.), Blackwell Publishing Ltd, London, str. 1 – 24.
 - Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313 – 7352.
 - Dailey, A., Vuong, Q. V. (2015) Effect of extraction solvents on recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. *Cogent Food Agric.* **1**, 1 - 10.

- De Camargo, A. C., Schwember, A. R., Parada, R., Garcia, S., Marostica, M. R., Franchin, M., Regitano-dArce, M. A. B., Shahidi, F. (2018) Opinion on the hurdles and potential health benefits in value-added use of plant food processing by-products as sources of phenolic compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 34 - 98.
- De la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., Shahidi, F. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of mexican pecan (*Carya illinoensis*). *J. Agr. Food Chem.* **59**, 152 – 162.
- De Oliveira, W. P., Biasoto, A. C. T., Marques, V. F., Dos Santos, I. M., Magalhaes, K., Correa, L. C., Negro-Dellacqua, M., Miranda, M. S., de Camargo, A. C., Shahidi, F. (2017) Phenolics from winemaking by-products better decrease VLDL-cholesterol and triacylglycerol levels than those of red wine in Wistar rats. *J. Food Sci.* **82**, 2432 – 2437.
- De Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C. (2010) Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1679 - 1703.
- Dermibas, A. (2005) Estimating of Structural Composition of Wood and Non-Wood Biomass Samples. *Energy Sources* **27**, 761 - 767.
- Do Prado, A. C. P., da Silva, H. S., da Silveira, S. M., Barreto, P. L. M., Vieira, C. R. W., Maraschin, M., Ferreira, S. R. S. i Block, J. M. (2014) Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. *Ind. Crops Prod.* **52**, 552 – 561.
- Duthie, G. G, Gardner, P. T, Kyle, J. A. M. (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *P. Nutr. Soc.* **62**, 599 - 603.
- FAO (2020) Food and Agriculture Organization of the United Nations. < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> >. Pristupljeno 24. veljače 2021.
- Farvin, S. K. H., Grejsen, H. D., Jacobsen, C. (2012) Potato peel extract as a natural antioxidant in chilled storage of minced horse mackerel (*Trachurus trachurus*): Effect on lipid and protein oxidation. *Food Chem.* **131**, 843 - 851.
- Fernandes, R. D. P. P., Trindade, M. A., Melo, M. P. (2018) Natural antioxidants and food applications: Healthy perspectives. U: *Alternative and Replacement Foods*, (Holban, A. M. i Grumezescu, A. M., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 31 – 64.
- Figueroa, K. H. N., García, N. V. M., Vega, R. C. (2019). *Cocoa By - products*. U: *Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential*, (Campos-Vega, R., Oomah, B. D., Vergara-Castaneda, H. A., ured.), Wiley-Blackwell, Hoboken, str. 373 – 411.

- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* **31**, 435 – 445.
- Ganesapillai, M., Mathew, M., Singh, A., Simha, P. (2016) Influence of Microwave and Ultrasound pretreatment on Solvent Extraction of Bio-components from Walnut (*Julgans regia L.*) Shells. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **60**, 40 - 48.
- Ghassempour, A., Heydari, R., Talebpour, Z., Fakhari, A. R., Rassouli, A., Davies, N., Aboul-Enein, H. Y. (2008) Study of new extraction methods for separation of anthocyanins from red grape skins: Analysis by 1034 HPLC and LC-MS/MS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31**, 2686 – 2703.
- Gomez-Estaca, J., Calvo, M. M., Sanchez-Faure, A., Montero, P., Gomez-Guillen, M. C. (2015) Development, properties, and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products. *Food Sci. Technol.* **64**, 189 - 196.
- Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., Kaderides, K. (2017) Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 821 – 830.
- Grillo, G., Boffa, L., Binello, A., Mantegna, S., Cravotto, G., Chemat, F., Dizhbite, T., Lauberte, L., Telysheva, G. (2018) Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Res. Int.* **15**, 200 - 208.
- Grucka-Mamczar, E., Zalejska-Fiolka, J., Chlubek, D., Kasperczyk, S., Blaszczyk, U., Kasperczyk, A., Swietochowska, E., Birkner, E. (2009) The influence of sodium fluoride and caffeine on the activity of antioxidative enzymes and the concentration of malondialdehyde in rat liver. *Fluoride* **42**, 105 – 109.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R. L. (2003) Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 7513 – 7521.
- Han, H., Wang, S., Rakita, M., Wang, Y., Han, Q., Xu, Q. (2018) Effect of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds on the characteristics of walnut shells. *Food Nutr. Sci.* **9**, 1034 – 1045.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trieste, str. 67 - 83.

- Harborne, J.B., Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. 1. izd., John Wiley and Sons, Chichester
- Hashimoto, J. C., Lima, J. C., Celeghini, R. M., Nogueira, A. B., Efraim, P., Poppi, R. J., Pallone, J. A. (2018) Quality control of commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) by near-infrared spectroscopy. *Food Anal. Methods* **11**, 1510 – 1517.
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhah, B., Mehmandar, F. B. (2011) Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *Int. J. For. Soil Eros.* **1**, 47 - 53.
- Hernandez-Hernandez, C., Viera-Alcaide, I., Sillero, A.M.M., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. (2018) Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chem.* **240**, 831 - 839.
- Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1081 - 1093.
- ICCO (2019) <<https://www.icco.org/statistics/>> Pristupljeno 25. veljače 2021.
- Jahanban-Esfahlan, A., Amarowicz, R. (2018) Walnut (*Juglans regia* L.) shell pyrolytic acid: chemical constituents and functional applications. *RSC Adv.* **8**, 22376 – 22391.
- Jecu, L. (2000) Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Ind. Crops Prod.* **11**, 1 – 5.
- Jozinović, A., Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Babić, J., Pajin, B., Milićević, B., Guberac, S., Vrdoljak, A. i Šubarić, D. (2018) Cocoa husk application in the enrichment of extruded snack products. *J. Food Process. Preserv.* **43**, 61 - 70.
- Kawabata, K., Yoshioka, Y., Terao, J. (2019) Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* **24** (2), 370 - 395.
- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279 - 290.
- Khantwal, R., Gupta, G., Negi, R.S. (2016) Walnut shell reinforced composite: A Review. *Int. J. Eng. Sci.* **7**, 179 - 189.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 560 - 568.
- Kučić Grgić, D., Briški, F., Očelić Bulatović, V., Vuković Domanovac, M., Domanovac, T., Šabić Runjavec, M., Miloloža, M., Cvetnić, M. (2019) Kompostiranje agroindustrijskog

otpada, biootpada i biorazgradljivog komunalnog otpada u adijabatskom reaktoruu. *Kemija u Industriji* **68**, 381 - 388.

- Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V. S. (2020) Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing By-Products: A Review. *Ultrason. Sonochem.* **70**, 1 – 11.
- Kumar, S., Krishna, C. R., Preedy, V. R. (2018) Assessment of antioxidant potential of dietary components. U: HIV/AIDS, (Preedy, V. R. i Watson, R. R., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 239 - 253.
- Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* **2013**, 1 - 16.
- Kumari, B., Tiwari, B. K., Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P. (2017) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from potato peels: profiling and kinetic modelling. *Int. J. Food Sci. Technol.* **52**, 1432 - 1439.
- Lafka, T. I., Sinanoglou, V., Lazos, E. S. (2007) On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **3**, 1206 - 1214.
- Lauri, H., de Moel, H., Ward, P. J., Räsänen, T. A., Keskinen, M., Kumm, M. (2012) Future changes in Mekong River hydrology: impact of climate change and reservoir operation on discharge. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* **16** (12), 4603 – 4619.
- Leccese, A., Bartolini, S., Viti, R. (2009) Antioxidant property of peel and flesh in “GoldRush” and “Fiorina” scab-resistant apple (*Malus domestica*) cultivars. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **37**, 71 - 78.
- Leicach, S. R., Chludil, H. D. (2014) Plant secondary metabolites: Structure – activity relationships in human health prevention and treatment of common diseases. U: Studies in Natural Products Chemistry, (Attaur, R., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 267 - 304.
- Leon-Carmona, J. R., Galano, A. (2011) Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals?. *J. Phys. Chem. B* **115**, 4538 - 4546.
- Lingappan, K. (2018) NF- κ B in oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **7**, 81 – 86.
- Lipinska, L., Klewicka, E., Sojka, M. (2014) The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **13**, 289 – 299.
- Lipinski, B., Hanson, C., Lomax, J., Kitinoja, L., Waite, R., Searchinger, T. (2013) Reducing Food Loss and Waste: Working Paper. Washington, DC: World Resources Institute

- Luengo, E., Condon-Abanto, S., Condon, S., Alvarez, I., Raso, J. (2014) Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Sep. Purif. Technol.* **136**, 130 – 136.
- Luna-Guevara, M. L., Luna-Guevara, J. J., Hernandez-Carranza, P., Ruiz-Espinosa, H., Ochoa-Velasco, C. E. (2019) Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. U: *Studies in Natural Products Chemistry*, (Rahman, A., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 79 – 108.
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G., Liu D. (2008) Ultrasound assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 227 – 232.
- Manoj, D., Wesana, J., Gellynck, X., Seth, N., Dey, B., De Steur, H. (2020) Importance of sustainable operations in food loss: evidence from the Belgian food processing industry. *Ann. Oper. Res.* **290**, 47 - 72.
- Manousi, N., Sarakatsianos, I., Samanidou, V. (2019) Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. U: *Engineering Tools in the Beverage Industry*, (Grumezescu, A. M. i Holban, A. M., ured.), Woodhead, Cambridge, str. 283 – 314.
- Martinez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2012) Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Res. Int.* **49**, 39 – 45.
- Martinez-Cervera, S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L., Fiszman, S. M. (2011) Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *Food Sci. Technol.* **44**, 729 - 736.
- Mourtzinis, I., Prodromidis, P., Grigorakis, S., Makris, D. P., Biliaderis, C. G., Moschakis, T. (2018) Natural food colorants derived from onion wastes: Application in a yoghurt product. *Electrophoresis* **39**, 1975 - 1983.
- Munichello, K. A. (2016) Tea Trends: Cacao Shell Tea <<https://www.worldteanews.com/Features/tea-trends-cacao-shell-tea>> . Pristupljeno 27. veljače 2021.
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L., Lagnika, C. (2012) Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pak. J. Nutr.* **11**, 672 - 677.
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., Rodrigues, C. E. C. (2017) Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **63**, 103 - 112.

- Omolayo, Y., Feingold, B. J., Neff, R. A., Romeiko, X. X. (2021) Life cycle assessment of food loss and waste in the food supply chain. *Resour. Conserv. Recy.* **164**, 105 - 119.
- Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) *Methods for analysis of musts and wine*, 2. izd., John, Wiley & Sons, New York
- Panesar, R., Kaur, S., Panesar, P. S. (2015) Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 70 – 76.
- Piechowiak, T., Grzelak-Błaszczak, K., Bonikowski, R., Balawejder, M. (2020) Optimization of extraction process of antioxidant compounds from yellow onion skin and their use in functional bread production. *Food Sci. Technol.* **117**, 108 - 115.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017) Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1-13.
- Porter, L.J., Hrstich, L., Chan, B. G. (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **25**, 223 – 230.
- Prior, R. L., Gu, L. (2005) Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* **66**, 2264 – 2280.
- Queiros, C. S. G. P., Cardoso, S., Lourenco, A., Ferreira, J., Miranda, I., Lourenço, M. J. V., Pereira, H. (2019) Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition. *Biomass Convers. Bior.* **10**, 175 - 188.
- Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejic, A., Pavlić, B. (2015) Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrason. Sonochem.* **23**, 360 – 368.
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., Khodarahmi, R. (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *Int. Food Prop.* **20**, 1700 - 1741.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I. R., Sanders M. E. (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**, 145 - 152.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231 - 1237.

- Reis Giada, M. de L. (2013) Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. U: Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, (Morales-Gonzalez, J. A., ured.), IntechOpen, London, str. 87 - 112.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933 - 956.
- Rodino, S., Butu, M. (2019) Herbal Extracts — New Trends in Functional and Medicinal Beverages. U: Functional and Medicinal Beverages, (Grumezescu, A. M., Holban, A. M., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 73 - 108.
- Rodriguez, A. I., Franco, D., Sanchez, M., Zapata, C., Vazquez, J. A. (2014) Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chem.* **165**, 290 - 299.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., Stevigny, C. (2020) Cocoa Bean Shell- A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients* **12**, 1123 - 1152.
- Rupasinghe, H. P. V., Kean, C. (2008) Polyphenol concentrations in apple processing by products determined using electrospray ionization mass spectrometry. *Can. J. Plant Sci.* **88**, 759 - 762.
- Rusu, M., Gheldiu, A.-M., Mocan, A., Moldovan, C., Popa, D.-S., Tomuta, I., Vlase, L. (2018) Process Optimization for Improved Phenolic Compounds Recovery from Walnut (*Juglans regia* L.) Septum: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Molecules* **23**, 1 - 28.
- Sadh, P. K., Duhan, S., Duhan, J. S. (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* **5**, 1 - 15.
- Sanchez Mundo, M. L., Jaramillo Flores, M. E., Espinosa Solis, V., Chavez-Reyes, Y., Diaz Ramirez, M., Salgado Cruz, M. P., Calderon Dominguez, G. Muffins enriched with cocoa shell fiber. In Proceedings of the Fourth International Congress on Cocoa Coffee and Tea, Torino, Italy, 25 - 28 June 2017; p. 124
- Sanchez-Moreno, C. (2002) Compuestos polifenolicos: efectos fisiologicos: actividad antioxidante. *Alimentaria* **329**, 29 - 40.
- Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., Brand, D., Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R. (2005) Spore production of *beauveria bassiana* from agroindustrial residues. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **48**, 51 - 60.

- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., Latha, L. (2010) Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **8 (1)**, 1 – 10.
- Shams, K., Abdel-Azim, N., Saleh, I., Hegazy, M., El-Missiry, M., Hammouda, F. (2015) Green technology: economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J. Chem. Pharm. Res.* **7**, 1050 - 1074.
- Shirahigue, L. D., Ceccato-Antonini, S. R. (2020) Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Cienc. Rural* **50**, 1 - 18.
- Shirahigue, L. D., Contreras-Castillo, C. J., Selani, M. M., Nadai, A. P., Mourao, G. B., Gallo, C. R. (2011) Winery grape-residue extract: effects on quality and attributes of cooked chicken meat. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1257 - 1264.
- Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., Pandey, A. (2013) Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly3-hydroxybutyrate. *Biochem. Eng. J.* **78**, 67 - 72.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144 – 158.
- Spiller, G.A. (1998) U: Caffeine, (Spiller, G.A., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 225 - 231.
- Suleria, H., Osborne, S., Masci, P., Gobe, G. (2015) Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. *Mar. Drugs* **13 (10)**, 6336 – 6351.
- Talik, P., Krzek, J., Ekiert, R. J. (2012) Analytical techniques used for determination of methylxanthines and their analogues – Recent advances. *Sep. Purif. Rev.* **41**, 1 - 61.
- Torrado, A. M., Cortes, S., Salgado, J. M., Max, B., Rodriguez, N., Bibbins, B. P., Converti, A., Dominguez, J. M. (2011) Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 394 - 409.
- Tran, T. N., Bayer, I. S., Heredia-Guerrero, J. A., Frugone, M., Lagomarsino, M., Maggio, F. i Athanassiou, A. (2017) Cocoa Shell Waste Biofilaments for 3D Printing Applications. *Macromol. Mater. Eng.* **302**, 170 - 180.
- Uddin, M. K., Nasar, A. (2020) Walnut shell powder as a low-cost adsorbent for methylene blue dye: isotherm, kinetics, thermodynamic, desorption and response surface methodology examinations. *Sci. Rep.* **10**, 415 - 428.

- Vega, C., Kwik-Urbe, C. (2012) *Theobroma cacao* — An Introduction to the Plant, Its Composition, Uses, and Health Benefits. U: Cocoa Butter and Related Compounds, (Garti, N., Widlak, N., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 35 – 62.
- Veneziani, G., Novelli, E., Esposto, S., Taticchi, A., Servili, M. (2017) Applications of recovered bioactive compounds in food products. U: Olive Mill Waste, (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 231 – 253.
- Venkatachalam, H., Nayak, Y., Jayashree, B. S. (2012) Evaluation of the Antioxidant Activity of Novel Synthetic Chalcones and Flavonols. *Int. J. Chem. Eng.* **3**, 216 - 219.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006) *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, Dordrecht, str. 1 – 34.
- Vilarino, M. V., Franco, C., Quarrington, C. (2017) Food loss and Waste Reduction as an Integral Part of a Circular Economy. *Front. Environ. Sci. Eng.* **5**, 21 - 26.
- Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 1066 - 1074.
- Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011) Cacao pod husks (*Theobroma cacao L.*): Composition and hot-watersoluble pectins. *Ind. Crops Prod.* **34**, 1173 - 1181.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.* **106**, 804 - 810.
- Wang, X., Zhao, M., Su, G., Cai, M., Zhou, C., Huang, J., Lin, L. (2014) The antioxidant activities and the xanthine oxidase inhibition effects of walnut (*Juglans regia L.*) fruit, stem and leaf. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**, 233 - 239.
- Wang, Y., Zhang, H., Liang, H., Yuan, Q. (2013) Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food Chem.* **138**, 437 – 443.
- Wiyono, T., Nurhayati, R., Herawati, E. R. N., Laila, U. (2020) The effect of time, pH and solvent composition on cocoa shell polyphenol extraction and its antioxidant activity: response surface method approach. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 462.
- Wollgast, J. (2005) The contents and effects of polyphenols in chocolate: qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as

evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health, doktorska disertacija, Justus Liebig University Giessen, Gießen, 2005

- Yang, J.; Chen, C.; Zhao, S.; Ge, F., Liu, D. (2014) The inhibitory effect of different solvents extracts from walnut shell (*Juglans regia* L.) on pancreatic lipase and adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Food Nutr. Res.* **2**, 664 – 670.
- Yang, W., Shimizu, I., Ono, T., Kimura, J. (2015) Preparation of biodegradable foam from walnut shells treated by subcritical water. *J. Chem. Tehnol. Biotechnol.* **90**, 44 - 49.
- Yasodha, T. (2018) Agro–industrial wastes as sustainable resource for the production of bricks. *J. Civ. Eng.* **4**, 403 - 408.
- Yusuf, M., Shabbir, M., Mohammad, F. (2017) Natural colorants: historical, processing and sustainable prospects. *Nat. Prod. Bioprospect.* **7**, 123 - 145.
- Zarghami Moghaddam, P., Mohammadi, A., Feyzi, P., Alesheikh, P. (2017) In vitro antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. *Pak. J. Pharm. Sci.* **30**, 1725 – 1731.
- Zhang, H., Tsao, R. (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* **8**, 33 - 42.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., Ye, W.-C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin. Med.* **13**, 177 - 203.
- Zin, M. M., Marki, E., Banvolgyi, S. (2020) Conventional extraction of betalain compounds from beetroot peels with aqueous ethanol solvent. *Acta Aliment.* **49**, 163 - 169.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 805 - 836.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Sonja Vrtar

Sonja Vrtar