

Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz kakaove ljuske

Pavlović, Nika

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:537373>

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

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

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

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



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

Nika Pavlović, dipl. ing., univ. mag. sanit. publ.

**PRIMJENA INOVATIVNIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE
BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ KAKAOVE LJUSKE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale

Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju

Katedra za kemiju i ekologiju

Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 66.061.3 : 663.918.3 (043)

663.918.3 : 581.19 (043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Znanstvena grana Inženjerstvo

Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 29. lipnja 2018.

Voditelj: *prof. dr. sc. Stela Jokić*

PRIMJENA INOVATIVNIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ KAKAOVE LJUSKE

Nika Pavlović, 0113017907

Sažetak: Cilj istraživanja bio je usporediti i odabrati najučinkovitiju zelenu tehniku ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima (DES/MAE), ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED), superkritična CO₂ ekstrakcija (SC-CO₂) te ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju (SWE)) bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda prehrambene industrije – kakaove ljuske. Identificirane su i kvantificirane sljedeće komponente: metilksantini (teobromin, kofein i teofilin), fenolne komponente (galna kiselina, epikatehin, epigalokatehin, katehin, klorogenska kiselina, kafeinska kiselina i vanilin) te hidroksimetilfurfural u različitim udjelima, u ovisnosti o odabranoj tehnici ekstrakcije, primjenom visoko djelotvorne/tlačne tekućinske kromatografije s detektorom niza dioda. Ispitan je utjecaj različitih parametara ekstrakcije kako slijedi: UAE – temperatura, vrijeme, omjer tekuće/kruće, snaga ultrazvuka, DES/MAE – vrsta otapala odnosno odgovarajuća eutektička smjesa, udio vode u otapalu, temperatura, vrijeme, HVED – omjer tekuće/kruće, frekvencija, vrijeme, SC-CO₂ – tlak, temperatura, vrijeme, SWE – temperatura, vrijeme i omjer tekuće/kruće. Optimizacija svake pojedine tehnike ekstrakcije provedena je metodom odzivnih površina. Određena je i antioksidacijska aktivnost dobivenih ekstrakata kao i ukupni fenolni sadržaj. U SC-CO₂ ekstraktima utvrđen je i masnokiselinski sastav (oleinska, palmitinska, stearinska, linolna i palmitoleinska masna kiselina) plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskim detektorom. Za izolaciju teobromina, katehina i epikatehina najpogodnijom se pokazala SWE kao i za najveći ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata dok se za izolaciju kafeina najpogodnijim pokazao SC-CO₂. Hidroksimetilfurfural i teofilin bili su prisutni samo u ekstraktima dobivenim SWE i to u eksperimentima provedenima na višoj temperaturi (220 °C). Za izolaciju galne kiseline najpogodnijom se pokazala UAE dok se za izolaciju kafeinske kiseline najpogodnijom pokazala DES/MAE. Klorogenska kiselina kao i epigalokatehin te vanilin bili su ispod granice detekcije.

Ključne riječi: *Kakaova ljuska, bioaktivne komponente, zelene tehnike ekstrakcije, optimizacija*

Rad sadrži: 167 stranica
58 slika
59 tablica
3 priloga
213 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | | |
|----|--|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i> | predsjednik |
| 2. | prof. dr. sc. <i>Maja Miškulin</i> | član |
| 3. | izv. prof. dr. sc. <i>Maja Molnar</i> | član |
| 4. | prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 13. srpnja 2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

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

Department of Process Engineering
Sub-department of Process Design and Construction Materials
Department of Applied Chemistry and Ecology
Sub-department of Applied Chemistry and Instrumental Methods
Sub-department of Chemistry and Ecology

Franje Kuhača 18 HR-31000 Osijek, Croatia

UDC: 66.061.3 : 663.918.3 (043)
663.918.3 : 581.19 (043.3)

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

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IX. held on June 29, 2018.

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

APPLICATION OF INNOVATIVE TECHNIQUES FOR EXTRACTING BIOACTIVE COMPONENTS FROM COCOA SHELL

Nika Pavlović, 0113017907

Summary: The aim of the study was to compare and select the most efficient green extraction technique (ultrasound-assisted extraction (UAE), deep eutectic solvent microwave-assisted extraction (DES/MAE), high voltage electric discharge extraction (HVED), supercritical CO₂ extraction (SC-CO₂) and subcritical water extraction (SWE) of bioactive compounds from food industry by-product – cocoa shell. The following compounds were identified and quantified: methylxanthines (theobromine, caffeine and theophylline), phenolic compounds (gallic acid, epicatechin, epigallocatechin, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid and vanillin) and hydroxymethylfurfural in different concentrations depending on the selected extraction technique. The amount of compounds was determined by using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector. The influence of different extraction parameters was examined as follows: UAE – temperature, time, liquid/solid ratio, ultrasound power; DES/MAE – type of eutectic solvent, water content in solvent, temperature, time; HVED – liquid/solid ratio, frequency, time; SC-CO₂ – pressure, temperature, time, and SWE – temperature, time, liquid/solid ratio. The optimization of each individual extraction technique was performed by response surface methodology (RSM). The antioxidant activity of the obtained extracts as well as the total phenolic content were determined as well. In SC-CO₂ extracts, the fatty acid composition was determined by gas chromatography with flame ionization detector as follows: oleic, palmitic, stearic, linoleic and palmitoleic acid. SWE proved to be the most suitable for the isolation of theobromine, catechin and epicatechin, as well as for the highest total phenolic content and antioxidant activity, while SC-CO₂ proved to be the most suitable solvent for the extraction of caffeine. Hydroxymethylfurfural and theophylline were presented only in extracts obtained by SWE performed at higher temperature (220 °C). UAE proved to be the most suitable for the extraction of gallic acid while DES/MAE was most suitable for extraction of caffeic acid. Chlorogenic acid as well as epigallocatechin and vanillin were under the limit of detection.

Key words: Cocoa shell, bioactive compounds, green extraction methods, optimization

Thesis contains: 167 pages
58 figures
59 tables
3 supplements

213 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | <i>Drago Šubarić</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. | <i>Maja Miškulin</i> , PhD, full prof. | member |
| 3. | <i>Maja Molnar</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. | <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, full prof. | stand-in |

Defense date: July 13, 2020.

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

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na velikoj pomoći, zajedničkom radu, savjetima i vodstvu tijekom cijelog poslijediplomskog studija kao i pri izradi doktorske disertacije.

Veliko hvala prof. dr. sc. Maji Miškulin na iskrenoj podršci, poticaju i razumijevanju tijekom svih ovih godina zajedničke suradnje.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Molnar na potpori i konstruktivnim savjetima tijekom izrade doktorske disertacije.

Hvala prof. dr. sc. Lidiji Jakobek Barron na nesebičnoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela doktorskoga rada.

Veliko hvala doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću na odvojenom vremenu te pomoći pri izradi analiza masnokiselinskog sastava.

Hvala također i svim kolegama na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek na iznimnoj susretljivosti kao i ugodnoj atmosferi u svakome trenutku.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom cijelog studija.

*Ovaj rad posvećujem kćerki **Nevi** koja mi je najveća motivacija za sva moja dosadašnja znanstvena postignuća a kao poticaj, putokaz i ohrabrenje da i ona jednoga dana zakorači u svijet znanosti.*



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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROCES PRERADE KAKAOVCA (<i>Theobroma cacao</i> L.)	3
2.1.1. Kakaovac (<i>Theobroma cacao</i> L.)	3
2.1.2. Fermentacija	4
2.1.3. Sušenje	5
2.1.4. Prženje	5
2.1.5. Nusproizvodi u industriji čokoladnih proizvoda	7
2.2. KAKAOVA LJUSKA	8
2.3. BIOAKTIVNE KOMPONENTE KAKAOVE LJUSKE	8
2.3.1. Metilksantini	9
2.3.1.1. Teobromin	10
2.3.1.2. Kofein	10
2.3.1.3. Teofilin	11
2.3.1.4. Katabolizam metilksantina u biljkama	11
2.3.2. Fenolne komponente	13
2.3.2.1. Katehin	14
2.3.3. Hidroksimetilfurfural	15
2.4. OSTALE KOMPONENTE KAKAOVE LJUSKE	16
2.4.1. Prehrambena vlakna	16
2.4.2. Masne kiseline	16
2.4.3. Vitamin D	17
2.4.4. Biogeni amini	18
2.5. POTENCIJALNA UPORABA KAKAOVE LJUSKE	18
2.6. ZELENE TEHNIKE EKSTRAKCIJE	19
2.6.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	20
2.6.1.1. Parametri koji utječu na UAE	21
2.6.2. Ekstrakcija eutektičkim otapalima	22
2.6.2.1. Parametri koji utječu na DES ekstrakciju	24
2.6.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	24
2.6.3.1. Parametri koji utječu na MAE	25
2.6.4. Ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja	26
2.6.4.1. Parametri koji utječu na HVED	27
2.6.5. Superkrična fluidna ekstrakcija	28
2.6.5.1. Superkrični CO ₂	29
2.6.5.1.1. Parametri koji utječu na SC-CO ₂	29
2.6.6. Ekstrakcija vodom u supkričnom stanju	30

2.6.6.1. Parametri koji utječu na SWE.....	32
2.7. KONVENCIONALNE METODE EKSTRAKCIJE	32
2.7.1. Soxhlet ekstrakcija.....	33
2.8. OPTIMIZACIJA PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	34
2.8.1. Box-Behnkenov plan pokusa.....	36
2.9. KROMATOGRFSKE TEHNIKE U ANALIZI EKSTRAKATA.....	37
2.9.1. Validacija kromatografskih metoda	38
3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. ZADATAK	41
3.2. MATERIJALI	42
3.2.1. Kakaova ljuska.....	42
3.2.2. Kemikalije i standardi.....	43
3.3. METODE	45
3.3.1. Priprema uzorka za ekstrakciju	45
3.3.2. Ispitivane tehnike ekstrakcije	45
3.3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	45
3.3.2.2. Ekstrakcija eutektičkim otapalima	46
3.3.2.3. Ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima	48
3.3.2.4. Ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja	50
3.3.2.5. Ekstrakcija superkričnim CO ₂	52
3.3.2.6. Ekstrakcija vodom u supkričnom stanju	54
3.3.2.7. Soxhlet ekstrakcija.....	55
3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	56
3.3.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala	56
3.3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	56
3.3.4. Određivanje bioaktivnih komponenata u ekstraktima.....	56
3.3.5. Određivanje sastava masnih kiselina u ekstraktima	58
3.3.6. Statistička obrada podataka i optimizacija procesa	60
4. REZULTATI.....	61
4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA	62
4.2. UDJELI BIOAKTIVNIH KOMPONENATA U EKSTRAKTIMA KAKAOVE LJUSKE DOBIVENI PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE	63
4.2.1. Utjecaj procesnih uvjeta UAE na sastav ekstrakata kakaove ljuske	63
4.2.1.1. Statistička analiza parametara UAE.....	64
4.2.2. Utjecaj procesnih uvjeta DES/MAE na sastav ekstrakata kakaove ljuske	77
4.2.2.1. Statistička analiza parametara DES/MAE	80
4.2.3. Utjecaj procesnih uvjeta HVED ekstrakcije na sastav ekstrakata kakaove ljuske	87
4.2.3.1. Statistička analiza parametara HVED	88
4.2.4. Utjecaj procesnih uvjeta SC-CO ₂ ekstrakcije na sastav ekstrakata kakaove ljuske	96
4.2.4.1. Statistička analiza parametara SC-CO ₂	97

4.2.5. Utjecaj procesnih uvjeta SWE na sastav ekstrakata kakaove ljuske	104
4.2.5.1. Statistička analiza parametara SWE	105
4.3. USPOREDBA UČINKOVITOSTI ODABRANIH ZELENIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE	111
5. RASPRAVA.....	113
5.1. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA ODABRANIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE NA SASTAV EKSTRAKATA KAKAOVE LJUSKE	114
5.1.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	117
5.1.2. Ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima	122
5.1.3. Ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja	127
5.1.4. Ekstrakcija superkričnim CO ₂	130
5.1.5. Ekstrakcija vodom u supkričnom stanju	135
6. ZAKLJUČCI	140
7. LITERATURA.....	143
8. PRILOZI.....	160

Popis oznaka, kratica i simbola

2HEAA	2-hidroksietilamonijev-acetat (engl. <i>2 hydrohyl ammonium acetate</i>)
β_0	konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
β_i	koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ii}	koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ij}	koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
AA	acetamid (engl. <i>Acetamide</i>)
AMP	adenozin-monofosfat (engl. <i>Adenosine monophosphate</i>)
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>Analysis of variance</i>)
BBD	Box-Behnken plan pokusa (engl. <i>Box-Behnken design</i>)
BD	butan-1,4-diol (engl. <i>Butane-1,4-diol</i>)
C	katehin (engl. <i>Catechin</i>)
C10:0	kaprinska kiselina (engl. <i>Capric acid</i>)
C13:0	tridekanska kiselina (engl. <i>Tridecanoic acid</i>)
C14:0	miristinska kiselina (engl. <i>Myristic acid</i>)
C14:1	miristoleinska kiselina (engl. <i>Myristoleic acid</i>)
C16:0	palmitinska kiselina (engl. <i>Palmitic acid</i>)
C16:1	palmitoleinska kiselina (engl. <i>Palmitoleic acid</i>)
C17:0	margarinska kiselina (engl. <i>Margaric acid</i>)
C18:0	stearinska kiselina (engl. <i>Stearic acid</i>)
C18:1	oleinska kiselina (engl. <i>Oleic acid</i>)
C18:2	linolna kiselina (engl. <i>Linoleic acid</i>)
C18:3	linolenska kiselina (engl. <i>Linolenic acid</i>)
C20:0	arahinska kiselina (engl. <i>Arachidic acid</i>)
C22:0	behenska kiselina (engl. <i>Behenic acid</i>)
C24:0	lignocerinska kiselina (engl. <i>Lignoceric acid</i>)
C8:0	kaprilna kiselina (engl. <i>Caprylic acid</i>)

c_p	broj ponavljanja eksperimenta u centralnoj točki
CA	limunska kiselina (engl. <i>Citric acid</i>)
CCD	centralno kompozitni plan pokusa (engl. <i>Central composite design</i>)
CCF	plošno centrirani kompozitni plan (engl. <i>Face centred composite design</i>)
CG	katehin galat (engl. <i>Catechin gallate</i>)
ChCl	kolin-klorid (engl. <i>Choline chloride</i>)
CO ₂	ugljičkov dioksid (engl. <i>Carbon dioxide</i>)
DAD	detektor niza dioda (engl. <i>Diode-array detector</i>)
DD	Doehlert pokus (engl. <i>Doehlert design</i>)
DES	eutektičko otapalo (engl. <i>Deep Eutectic Solvent</i>)
DES/MAE	ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima (engl. <i>Deep Eutectic Solvent extraction coupled with microwave extraction</i>)
df	stupnjevi slobode (engl. <i>Degrees of freedom</i>)
DHA	dokozaheksaenska kiselina (engl. <i>Docosahexaenoic acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (engl. <i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)
EC	epikatehin (engl. <i>Epicatechin</i>)
ECG	epikatehin galat (engl. <i>Epicatechin gallate</i>)
EGC	epigalokatehin (engl. <i>Epigallocatechin</i>)
EGCG	epigalokatehin galat (engl. <i>Epigallocatechin gallate</i>)
EPA	eikozapentaenska kiselina (engl. <i>Eicosapentaenoic acid</i>)
FID	plameno ionizacijski detektor (engl. <i>Flame Ionization Detector</i>)
FFD	faktorijalni plan pokusa (engl. <i>Full factorial design</i>)
Fru	fruktoza (engl. <i>Fructose</i>)
GAE	ekvivalenti galne kiseline (engl. <i>Gallic acid equivalents</i>)
GC	galokatehin (engl. <i>Gallocatechin</i>)
GC-FID	plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i>)
GCG	galokatehin galat (engl. <i>Gallocatechin gallate</i>)

GD	granica detekcije (engl. <i>Limit of detection</i>)
Glu	glukoza (engl. <i>Glucose</i>)
Gly	glicerol (engl. <i>Glycerol</i>)
GRAS	generalno prihvaćeno kao sigurno (engl. <i>Generally Recognized as Safe</i>)
H ₂ O	voda
HBA	akceptor vodika (engl. <i>Hydrogen bond acceptor</i>)
HBD	donor vodika (engl. <i>Hydrogen bond donor</i>)
HMF	hidroksimetilfurfural (engl. <i>Hydroxymethylfurfural</i>)
HPLC	visoko djelotvorna/tlačna tekućinska kromatografija (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HVED	Visokonaponsko električno pražnjenje (engl. <i>High Voltage Electric Discharge</i>)
HRN	hrvatska norma
ISO	međunarodna organizacija za normizaciju (engl. <i>International Standard Organisation</i>)
<i>k</i>	broj faktora
LA	mliječna kiselina (engl. <i>Lactic acid</i>)
LC	tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid chromatography</i>)
LevA	levulinska kiselina (engl. <i>Levulic acid</i>)
MA	jabučna kiselina (engl. <i>Malic acid</i>)
MAE	ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. <i>Microwave-Assisted Extraction</i>)
Mal	malonska kiselina (engl. <i>Malonic acid</i>)
MS	varijanca (engl. <i>Mean Square</i>)
OA	oksalna kiselina (engl. <i>Oxalic acid</i>)
PTFE	politetrafluoroetilen (engl. <i>Polytetrafluoroethylene</i>)
R ²	koeficijent determinacije (engl. <i>Predicted R²</i>)
RSM	metoda odzivnih površina (engl. <i>Response Surface Methodology</i>)
R _t	vrijeme zadržavanja (engl. <i>Retention time</i>)
s. tv.	suha tvar (engl. <i>dry weight</i>)
SC-CO ₂	superkritični CO ₂ (engl. <i>Supercritical CO₂</i>)

SE	Soxhlet ekstrakcija (engl. <i>Soxhlet extraction</i>)
SFE	ekstrakcija superkričnim fluidima (engl. <i>Supercritical fluid extraction</i>)
Sor	sorbitol (engl. <i>Sorbitole</i>)
SS	suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti (engl. <i>Sum of Squares</i>)
SWE	ekstrakcija vodom u supkričnom stanju (engl. <i>Subcritical water extraction</i>)
T	temperatura (engl. <i>Temperature</i>)
t	vrijeme (engl. <i>Time</i>)
TA	vinska kiselina (engl. <i>Tartaric acid</i>)
TP	ukupni fenolni sadržaj (engl. <i>Total Phenol Content</i>)
U	urea (engl. <i>Urea</i>)
UAE	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>)
UHPLC-QTOF-MS	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preleta (engl. <i>The ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>)
UV/VIS	Ultraljubičasto/Vidljivo (engl. <i>UltraViolet-VISible</i>)
$X_{i,j}$	ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)
Xy	ksilitol (engl. <i>Xylitol</i>)

1. UVOD

Nusproizvodi prehrambene industrije koji u procesu proizvodnje zaostaju kao nejestivi dijelovi, smatraju se otpadom te se nakupljaju i uklanjaju u bilijunima tona što postaje sve veći ekonomski i ekološki problem današnjice (Jokić i sur., 2018a; Pavlović i sur., 2019; Viganó i sur., 2014). Posljedično tome, ljudi počinju razmišljati i istraživati u smjeru njihova iskorištenja i moguće primjene. Različiti autori navode kako nusproizvodi sadrže značajne količine korisnih bioaktivnih komponenata poput polifenola, fenolnih kiselina, flavonoida, procijanidina, proantocijanidina, antocijanina, glikozida, karotenoida, tanina, alkaloida, sterola, ugljikohidrata i mnogih drugih, za koje je dokazano da posjeduju raznovrsne biološke aktivnosti poput antioksidacijske, antibakterijske, antikancerogene, protuupalne kao i antivirusne aktivnosti (Viganó i sur., 2014).

S obzirom na porast svjetske populacije kao i sve veću prijetnju smanjenju izvora hrane, počinje se više razmišljati u smjeru iskorištenja materijala koji se zapravo smatra otpadom. Jedan od takvih nusproizvoda je i kakaova ljuska u proizvodnji čokolade i proizvoda od čokolade (Hamzat i Adeola, 2011). Kakaova ljuska smatra se industrijskim otpadom bez obzira na njezinu nutritivnu vrijednost. Osim što je dobar i vrijedan izvor prehrambenih vlakana (Martín-Cabrejas i sur., 1994), neki autori navode kako je i potencijalan izvor antioksidanasa, većinom zbog svog fenolnog sadržaja. Shodno tome, kakaova ljuska pogodna je kao sirovina u drugim industrijama tj. za moguću daljnju upotrebu (Martín-Cabrejas i sur., 1994, Martínez i sur., 2012, Okiyama i sur., 2017) i to zahvaljujući njezinom sastavu koji ju čini nutritivno vrijednim nusproizvodom (Martín-Cabrejas i sur., 1994).

Inovacije u industriji kao i odgovornija proizvodnja, važni su pokretači istraživanja u području održive suvremene proizvodnje (Gil-Chávez i sur., 2013; Cvjetko Bubalo i sur., 2016a).

Prednosti inovativnih tehnika ekstrakcija pred klasičnim postupcima ekstrakcije osim samog doprinosa očuvanja okoliša su i u kraćem vremenu procesiranja, bez primjene ili sa smanjenim udjelom organskih otapala kao i primjena znatno nižih temperatura što utječe na kvalitetu finalnog proizvoda, smanjenu potrošnju energenata te veće iskorištenje izoliranih komponenata (Chemat i sur., 2012; Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

S obzirom na današnju situaciju u svijetu, postoji stalna potreba za razvojem novih tehnika ekstrakcije, ekološki prihvatljivih, sigurnih te dovoljno selektivnih pri izolaciji prirodnih sastojaka hrane (Armenta i sur., 2015). Tehnolozi su stoga u konstantnoj potrazi za novim „alatima“ kako bi prevladali problem velike količine otpada prehrambene industrije. Razne su i brojne mogućnosti optimizacije inovativnih zelenih tehnika ekstrakcija koje bi mogle pridonijeti najboljem iskorištenju bioaktivnih komponenata iz nusproizvoda nastalih tijekom proizvodnje u raznim industrijama, kao što je kakaova ljuska, pa tako i njihovom smanjenju što bi pozitivno utjecalo na okoliš. Osim iskorištenja kakaove ljuske (izdvojene nakon prženja zrna) u

doktorskoj disertaciji definirali su se optimalni uvjeti odabranih inovativnih zelenih postupaka ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem, superkrična CO₂ ekstrakcija te ekstrakcija vodom u supkričnom stanju) bioaktivnih komponenti (metilksantina, fenolnih komponenti te hidrosimetilfurfurala) iz kakaove ljuske. Dokazalo se kako je promjenom procesnih parametara moguće postići različit željeni sastav ekstrakata kakaove ljuske bogatih određenim bioaktivnim komponentama a koji se potencijalno mogu koristiti kao sirovine u prehrambenoj, farmaceutskoj, kemijskoj i/ili kozmetičkoj industriji. Također, ekstrakcijom i eliminacijom određenih bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske koje bi mogle biti toksične u većim količinama (kao npr. teobromin), moguće je dobiti materijal koji bi se bez ograničenja mogao kasnije primjenjivati u hranidbi životinja.

Osim što je istraživanje zbrinjavanja otpada tj. pronalaska novih rješenja u iskorištenju nusproizvoda prehrambene industrije u skladu s minimalno pet strateških dokumenata Republike Hrvatske (Strategija poticanja inovacija ([Ministarstvo znanosti i obrazovanja, 2014](#)) Strategija pametne specijalizacije ([Ministarstvo gospodarstva 2016](#)), Strategija regionalnog razvoja ([Ministarstvo regionalnog razvoja i fondova Europske unije, 2017](#)), Industrijska strategija ([Ministarstvo gospodarstva, 2014](#)), Operativni program Učinkoviti ljudski potencijali ([Ministarstvo rada i mirovinskog sustava, 2014](#)), Europska strategija za pametan, održivi i uključiv rast - Europa 2020 ([Europska komisija, 2010](#)), te UN-ovi Ciljevi održivog razvoja ([Pavić-Rogošić i sur., 2015](#))), ono također daje uvid u daljnje mogućnosti primjene i u drugim sferama gospodarskog sektora. Ovakvo iskorištenje navedenog prehrambenog nusproizvoda u smislu zbrinjavanja, svakako bi umanjilo nagomilavanje otpada u svijetu.

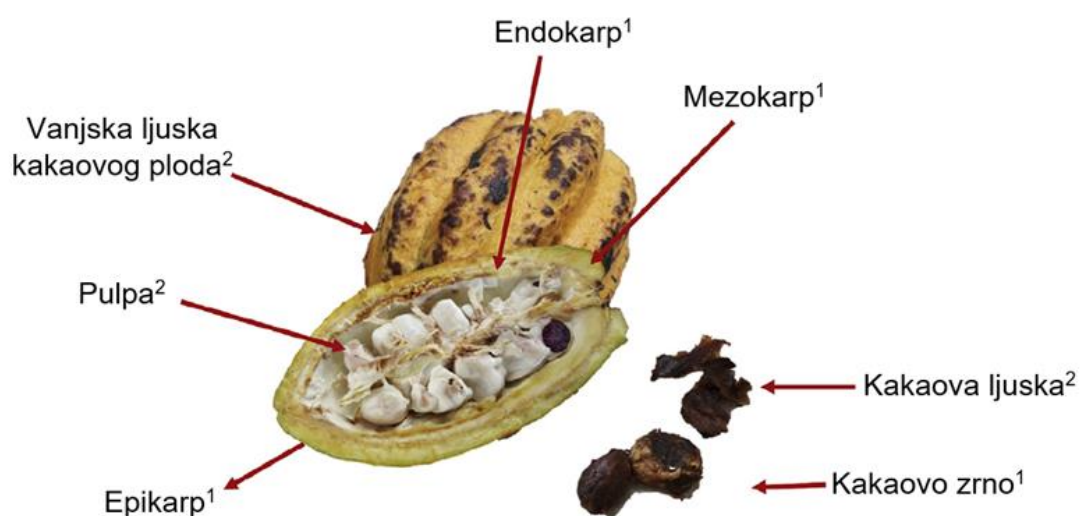
Preliminarnim istraživanjima na kakaovoj ljusci primjenom klasične Soxhlet ekstrakcije utvrđeni su izuzetno niski udjeli bioaktivnih komponenti zbog primjene visokih temperatura i dugog vremena ekstrakcije ([Pavlović i sur., 2019](#)), stoga je naglasak u doktorskoj disertaciji stavljen upravo na potencijal inovativnih tzv. zelenih tehnika ekstrakcije te mogućnost njihove buduće primjene u obradi kakaove ljuske.

2. TEORIJSKI DIO

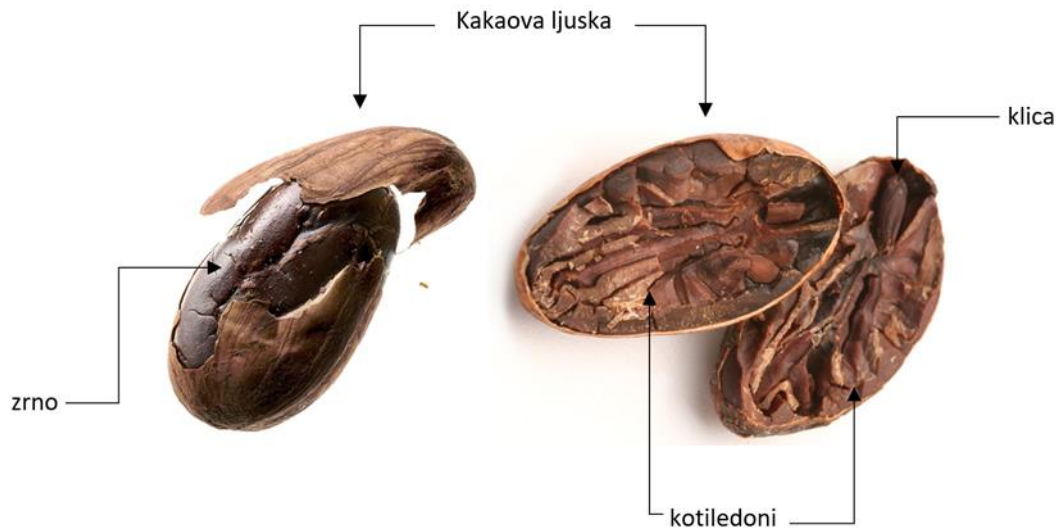
2.1. PROCES PRERADE KAKAOVCA (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1. Kakaovac (*Theobroma cacao* L.)

Kakaovac ili drvo kaka (*Theobroma cacao* L.) je drvo manjeg rasta, do 15 m visine, koje potječe iz nižih kišnih šuma Amazone. Listovi kakaovog drveta su zimzeleni, dugački oko 300 mm. Postoji više vrsta kakaovog drveta: Criollo, Forastero, Trinitario i National. Najpogodnije područje uzgoja kakaovca je južno od ekvatora i to Zapadna Afrika, Jugoistočna Azija i Južna Amerika dok među sedam najvećih proizvođača kakaovca spadaju Obala Bjelokosti, Gana, Indonezija, Nigerija, Kamerun, Brazil i Ekvador. Samo Obala Bjelokosti proizvodi 1/3 cjelokupnog svjetskog usjeva kakaovca (Beckett i sur., 2017). Uglavnom podrijetlom iz zemalja u razvoju, kakaovac se "naveliko" izvozi i konzumira u razvijenim zemljama (Afoakwa i sur., 2013). Plod kakaovog drveta sa svim svojim strukturnim i otpadnim dijelovima prikazan je na **Slici 1**. Vanjsku kakaovu ljusku čini 67-76% kakaovog ploda, 8,7-9,9% otpada na kakaovu pulpu, 2,1-2,3% na ljusku kakaovog zrna dok samo zrno čini svega 21-23% ploda (Campos-Vega i sur., 2018). Kakaovo zrno ovalnog je oblika, prekriveno crvenkasto-smeđom tankom ljuskom (Fowler, 1914) (**Slika 2**) a osim što je fermentirano i suho zrno kakaovca, osnovni je sastojak u proizvodnji čokolade i proizvoda od čokolade (Afoakwa i sur., 2013). Već je ranije znanstveno dokazana uključenost kaka i njegovih proizvoda u promociju zdravlja s obzirom na bioaktivne komponente koje sadrži. Njegovi antioksidansi štite kožu iznutra neutralizirajući oksidativni stres. Dokazano je i blagotvorno djelovanje kod kožnih oboljenja, pri zacjeljivanju rana, te kod akni i psorijaze (Scapagnini i sur., 2014).



Slika 1 Strukturni¹ i otpadni² dijelovi kakaova ploda (Campos-Vega i sur., 2018)



Slika 2 Dijelovi kakaovog zrna (Okuyama i sur., 2017. (modif.))

2.1.2. Fermentacija

Nakon pobiranja, svježa zrna kakaovca koja su prekrivena bijelom pulpom slažu se na platformu za fermentaciju, prekrivaju listovima banane te ostavljaju tako kroz šest dana, prevrćući sadržaj svakih 48 sati (Afoakwa i sur., 2013). U procesu fermentacije pulpa se razara enzimima i mikroorganizmima poput anaerobnih kvasaca i mliječno kiselih bakterija što dovodi do smanjenja udjela šećera i limunske kiseline te formiranja karakteristične boje kakaa (smeđa i ljubičasto-smeđa) kao i specifične arome. Saharoza se uz invertazu konvertira u reducirajuće šećere dok peptidaza hidrolizira proteine u oligopeptide i aminokiseline koji su ujedno i prekursori Maillardovih reakcija posmeđivanja u kasnijim koracima procesiranja u kakaovoj industriji. Također, u procesu fermentacije dolazi do smanjenja gorčine i oporosti zbog značajnog smanjenja proantocijanidina (Dai, 2017).

Kim i Keeney (1984) dokazali su kako se udio (-)-epikatehina u zrnju tijekom šest dana fermentacije smanjio čak za oko 85%. Nasuprot tome, njegova koncentracija u kakaovoj ljusci povećala se sa 1 mg/g na 7 mg/g odmašćene ljuske nakon samo 3 dana fermentacije. Daljnjom fermentacijom (sveukupno nakon 6 dana fermentacije) ta koncentracija se opet smanjila na oko 2 mg/g odmašćene kakaove ljuske (Kim i Keeney, 1984). Neki autori smatraju kako je do smanjenja (-)-epikatehina, kako u zrnju tako i u kakaovoj ljusci, vjerojatno došlo zbog reakcija aminokiseline uz polifenol oksidazu te kako je (-)-epikatehin također podložan reakcijama polimerizacije u različite složene tanine. Do povećanja (-)-epikatehina u kakaovoj je ljusci

tijekom prva tri dana fermentacije vjerojatno došlo zbog migracije polifenola iz zrna u kakaovu ljusku (Dai, 2017).

2.1.3. Sušenje

Nakon procesa fermentacije kakaova se zrna suše kako bi se smanjio udio vlage s oko 55-60% na oko 6-7% suhog ostatka te kako bi ih se moglo sigurno uskladištiti. Sušenje je vrlo važan korak u procesu prerade kakaa jer direktno utječe na kvalitetu dobivenih zrna i sadržaj polifenola u njima s obzirom na inhibicijski efekt (Hii, 2013). Što je trajanje procesa sušenja duže to se više fenolnih komponenti gubi. Istraživanja navode smanjenje fenolnog sadržaja za čak 23% tijekom 12-40 sati na 60 °C (Dai, 2017). Knapp i sur. (1935) navode kako se tijekom zadnjeg stadija fermentacije kao i u procesu sušenja, boja unutar kakaovog zrna tj. kotiledona, postepeno mijenja iz ljubičaste u smeđu uslijed oksidacije tanina. Dio tanina tada zajedno s teobrominom, prelazi iz kotiledona u kakaovu ljusku a rezultat je tamnija boja kakaove ljuske. Zrna se okreću na suncu najmanje kroz period od šest dana te se oksidacija tanina odvija dok god je kakaovo zrno vlažno. Sušenje se također može vršiti i umjetnim putem.

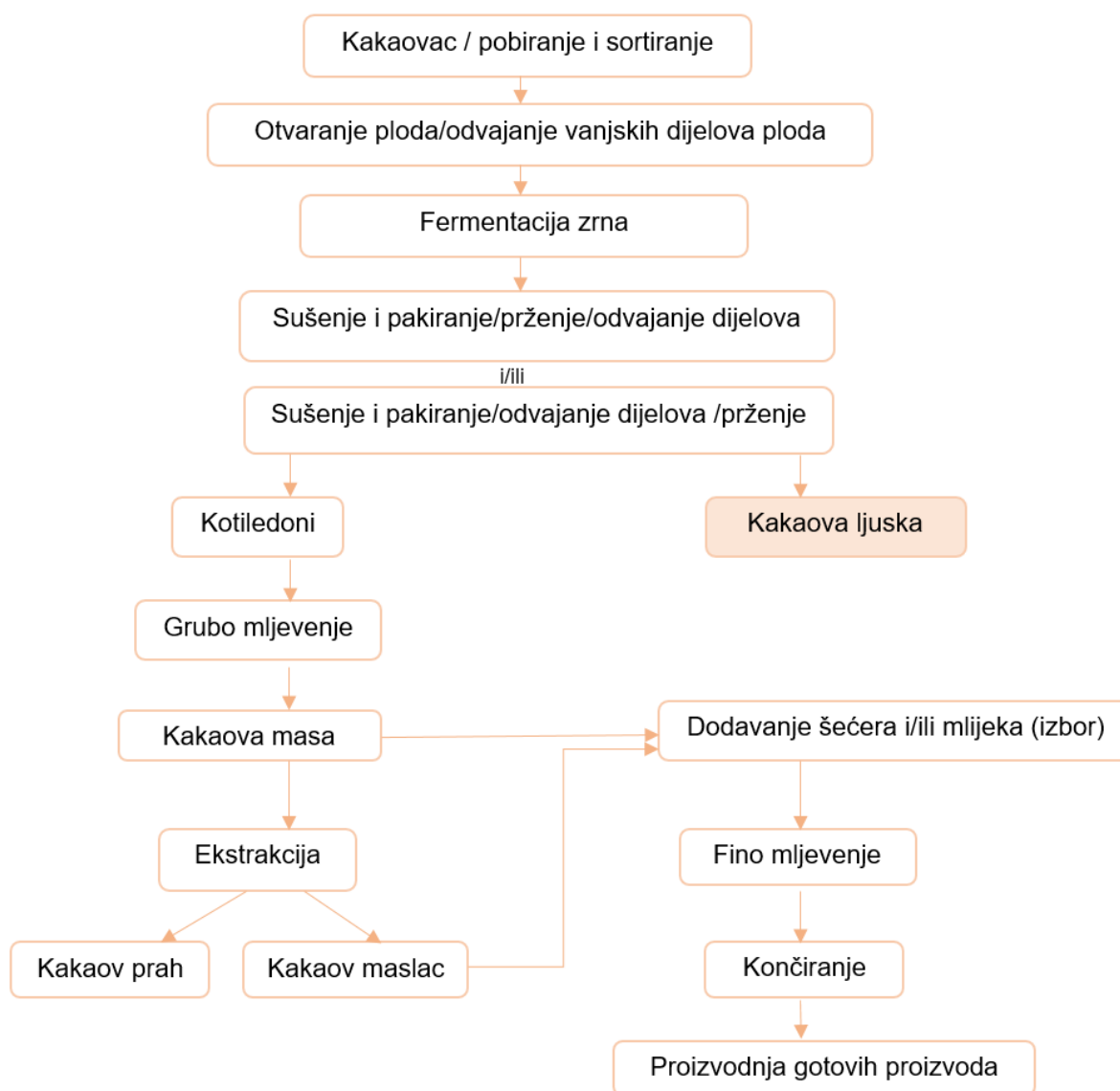
Sastav i udio polifenola u kakau uvelike ovise o njegovom podrijetlu, tipu zrna a ponajviše o procesu prerade kakaa. Proces sušenja nakon fermentacije odvija se prirodnim putem (na suncu) ili umjetno (toplim zrakom). Različite kemijske i biokemijske promjene do kojih dolazi prilikom sušenja, dovode do stvaranja prekursora arome koji ujedno i određuju kvalitetu kakaova zrna (Hii, 2013).

Unatoč tome što na prirodni proces sušenja kakaovih zrna na drvenim daskama direktno utječu vremenske prilike, manje plantaže ga češće koriste dok veće plantaže preferiraju sušenje kakaovih zrna umjetnim toplim zrakom (Wood i Lass, 1985). Kod takvog umjetnog sušenja upotrebljavaju se pećnice u kojima ventilira zrak temperature 60 °C. Svakako je i kod procesa sušenja bitno okretanje zrna kako bi se postigla ujednačenost. Tijekom noći zrna se temperiraju na sobnoj temperaturi što je uobičajen korak kako bi se unutarnja vlaga u zrnu rasporedila u vanjske dijelove nakon svakog ciklusa sušenja (Guehi i sur., 2010).

2.1.4. Prženje

Osim što se procesom prženja smanjuje udio vlage u kakaovim zrnima na ~2%, opušta se i kakaova ljuska koju je tada lakše odvojiti dok se ujedno smanjuje i broj mikroorganizama. Prženjem se također nastavlja razvoj specifične kakaove arome različitim kemijskim reakcijama poput Maillardovog posmeđivanja, smanjenja kiselosti kao i smanjenja interakcije polifenola i proteina te promjenama u fenolnim komponentama poput njihove degradacije,

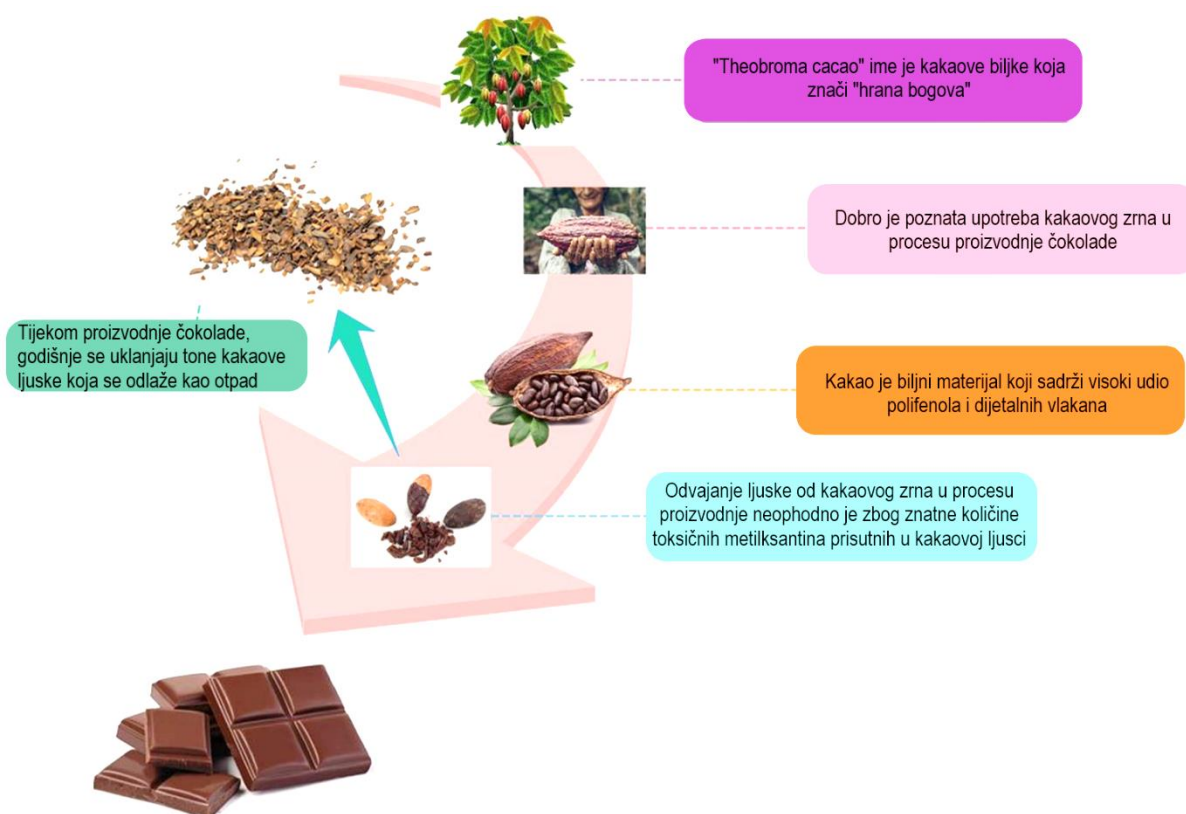
epimerizacije i polimerizacije proantocijanidina. Vrijeme i temperatura ključni su parametri procesa prženja. Dokazano je kako primjena visoke temperature kroz kratko vrijeme može znatno sačuvati relativno visok udio proantocijanidina. Primjena niže temperature kroz duži period prženja može dovesti do formiranja visoko-molekularnih proantocijanidina. S obzirom da su flavonoli osjetljivi na povišenu temperaturu, njihov udio tijekom procesa prženja se smanjuje. Redukcija (-)-epikatehina i povećanje koncentracije (+)-katehina pri procesu prženja već je ranije dokazana. Neki autori također navode kako do epimerizacije jednog spoja u drugi dolazi otvaranjem prstena na C-2 koji sadrži kisik, te ponovnim zatvaranjem prstena čime se stvara enantiomer. Osim procesa prženja i neki drugi uvjeti poput vlažnosti i prozračivanja također mogu utjecati na fenolni sadržaj (Dai, 2017). Nakon procesa prženja izdvaja se kakaova ljuska (Slika 3).



Slika 3 Shema prerade kakaovca (Gutiérrez, 2017)

2.1.5. Nusproizvodi u industriji čokoladnih proizvoda

U samome procesu proizvodnje čokolade i proizvoda od čokolade stvara se više intermedijarnih produkata poput kakaove mase, kakaovog maslaca, kakaove pogače i sirovog kakaovog praha. Osim što se oni upotrebljavaju u nekim drugim proizvodnjama poput industrije pića i kozmetičkih proizvoda, koriste se i za aromatiziranje keksa, sladoleda te različitih premaza. Kakaova ljuska, koja je također nusproizvod u industriji čokoladnih proizvoda, osim kao gnojivo, upotrebljava se još i u hranidbi životinja ([Afoakwa i sur., 2013](#)). U procesu proizvodnje čokolade ovaj je nusproizvod neophodno ukloniti zbog visokog udjela metilksantina (**Slika 4**).



Slika 4 Prerada kakaovog zrna ([Gagić i sur., 2018](#))

2.2. KAKAOVA LJUSKA

S obzirom da je dio kakaovog zrna, kakaova se ljuska može odvojiti od kotiledona zajedno sa klicom prije ili poslije prženja (Arlorio i sur., 2005). Na kakaovo zrno, kao sirovinu u proizvodnji kakaa i njegovih proizvoda, otpada oko 33% ploda, dok se 67% smatra otpadom (Campos-Vega i sur., 2018). Autori navode kako kakaova ljuska inače predstavlja 12-20% kakaovog ploda (Okiyama i sur., 2017) te da kao vanjski dio kakaovog zrna predstavlja njezin omotač koji se obično odlaže kao otpad (Grillo i sur., 2019).

Ovaj nusproizvod sadrži vrijedne bioaktivne komponente koje je moguće različitim metodama ekstrakcija izolirati ili eliminirati čime bi se pak omogućila njezina daljnja uporaba. Takav profitabilniji način iskorištenja kakaove ljuske svakako bi nadalje osigurao pokretanje novih industrijskih procesa, zapošljavanje te stvaranje dodatnih prihoda, a usput poboljšavajući zdravlje ljudi medicinski djelotvornim komponentama koje ona sadrži (Awarikabey i sur., 2014). Ranih godina prošlog stoljeća kakaova ljuska ekstrahirana je s ciljem određivanja njezine probavljivosti, uz eliminaciju alkaloida (Fowler, 1914). U današnje vrijeme, uz pojavu nekih novih ekstrakcijskih tehnika, ovaj nusproizvod mogao bi biti korisno upotrijebljen. Sastav kakaove ljuske prikazan je na **Slici 5**.



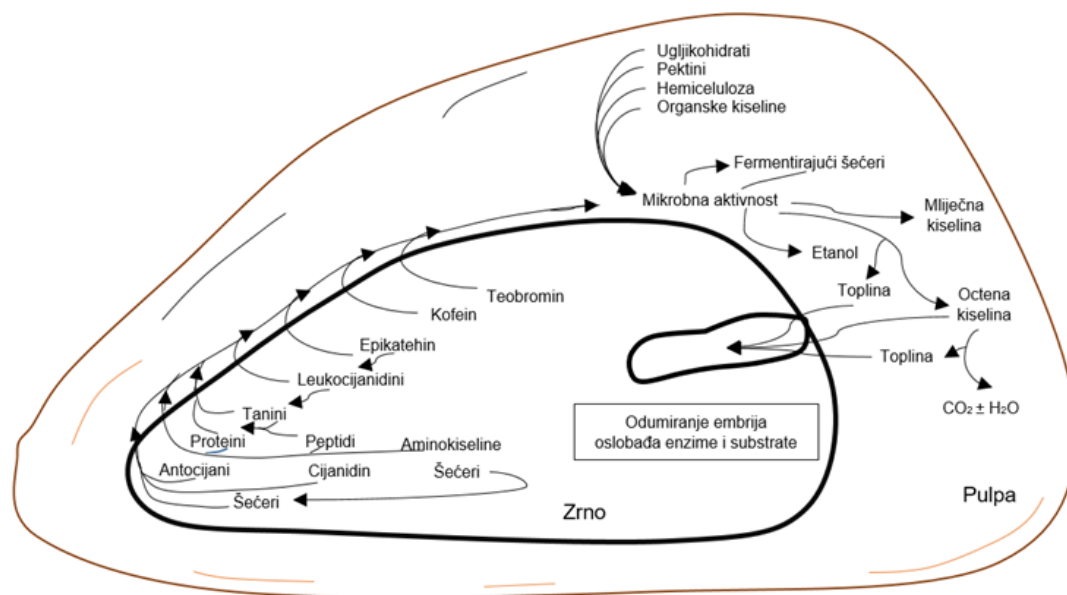
Slika 5 Sastav kakaove ljuske (Jurić i Nutrizio, 2014)

2.3. BIOAKTIVNE KOMPONENTE KAKAOVE LJUSKE

Biljke općenito predstavljaju vrijedan izvor kemijskih komponenata koje se tradicionalno koriste u proizvodnji lijekova, funkcionalnoj hrani te kao prehrambeni aditivi. Zbog svojih farmakoloških i toksikoloških efekata u ljudi i životinja, ove komponente specificiraju se kao bioaktivne komponente koje se kao sekundarni metaboliti stvaraju raznim biološkim putevima u procesu sekundarnog metabolizma biljke, igrajući tako značajnu ulogu u zaštiti biljke od biotičkog i abiotičkog stresa (Dixon, 2001; Azmir i sur., 2013). Kategorizacija bioaktivnih komponenata u biljkama prema biokemijskim i kemijskim klasama može se svrstati u nekoliko glavnih kemijskih

skupina: glikozidi, fenolne komponente, tanini, mono- di i sekvi-terpenoidi, fenilpropanoidi, lignani, resini, alkaloidi, furokumarini, naftodiantroni, proteini, peptidi (Bernhoft, 2010).

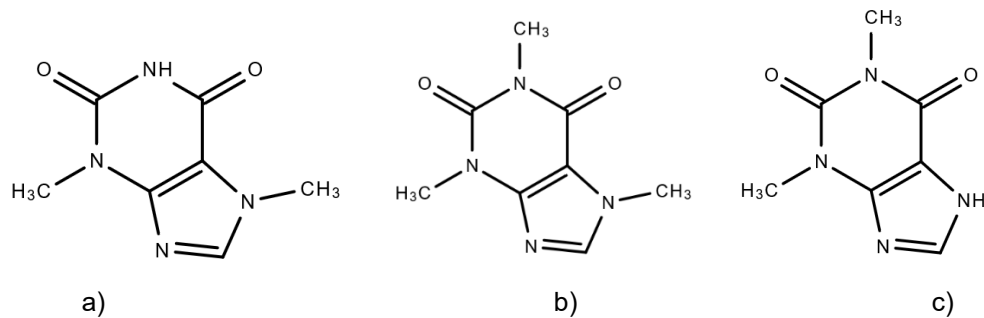
Znanstveno je dokazano kako se značajne količine određenih fenolnih komponenata, koje se nalaze u kotiledonima kakaovog zrna, tijekom procesa fermentacije difuzijom gube tj. migriraju u kakaovu ljusku (Slika 6). Tako obogaćena kakaova ljuska potencijalni je izvor bioaktivnih komponenata za upotrebu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Industrijski tretman za iskorištenje ovih vrijednih komponenti nažalost još uvijek ne postoji (Hernández-Hernández i sur., 2018a).



Slika 6 Kemijske promjene unutar kakaovog zrna tijekom procesa fermentacije (Beckett, 2011)

2.3.1. Metilksantini

Glavna i osnovna struktura alkaloida je purinska jezgra – aromatski heterociklički prsten. Alkaloidi tj. metilksantini, koji su metilirani derivati ksantina, klasificirani su brojem i pozicijom metilnih grupa. Tako metilksantin kofein ima tri metilne grupe na prvom, trećem i sedmom ugljiku, teofilin dvije metilne skupine na prvom i trećem ugljiku dok teobromin ima također dvije metilne grupe, ali na trećem i sedmom ugljiku (Preedy, 2012; Monteiro, 2016) (Slika 7). Kofein i teofilin sličnih su psihoaktivnih efekata no različitog djelovanja na organizam (Okiyama i sur., 2017). Teobromin koji je nenutritivna i ponekad toksična komponenta, sadržan je u svim dijelovima kakaovog zrna te ponajviše ima zaštitnu ulogu (Hartati, 2010). Zbog velikog udjela teobromina u kakaovoj ljusci upitna je njezina primjena u hranidbi životinja (Bentil i sur., 2015; Hartati, 2010; Okiyama i sur., 2017).



Slika 7 Molekulska struktura metilksantina; a) teobromin; b) kofein; c) teofilin

2.3.1.1. Teobromin

Teobromin (3,7-dimetilksantin) (**Slika 7a**), bezbojna je gorkasta tvar bez mirisa (temperatura taljenja na 357 °C), koja daje gorčinu kakau i proizvodima od kakaa. Prirodno je prisutan u svim dijelovima sjemenki te u mahuni biljke gdje najvjerojatnije služi kao obrambeni mehanizam biljke kakaovca. Iako se smatra toksičnom komponentom, posjeduje mnoga farmakološka svojstva poput antikancerogenih, diuretičnih i stimulacijskih svojstava. Slabo je topiv u vodi pa ga je stoga teže ekstrahirati. Jedna od predloženih ekstrakcijskih metoda je hidrotropija tj. povećavanje topljivosti određene komponente uz dodatak agensa visoke topivosti u vodi koji pak ne reagira s traženom komponentom. Hidrotropni agens adsorbira se na stijenske membrane, ometajući njegovu strukturu na način da olakšava ekstrakciju komponente. Ovakav ekološki prihvatljiv proces uvelike bi smanjio uporabu ekstrakcije organskim otapalima ([Hartati, 2010](#)). Poznata je i uporaba kakaove ljuske u hranidbi životinja, no s oprezom, zbog velikog udjela teobromina koje ona sadrži što opet može imati štetno djelovanje poput oštećenja reproduktivnog i razvojnog sustava životinja. U današnje vrijeme pronalaze se razna nova rješenja deteobrominacije kako bi se ovaj nusproizvod mogao šire upotrebljavati poput ekstrakcije toplom vodom, tretmana alkalijama te tretiranja mikroorganizmima ([Adamafio, 2013](#)). Uporaba kakaove ljuske u hranidbi životinja također je ograničena i zbog većeg udjela kofeina te zbog toga njezina primjena varira ovisno o vrsti i godini životinje ([Hamzat i Adeola, 2011](#)). Europska Unija ograničila je udio teobromina u stočnoj hrani na 300 mg/kg što bi značilo prosječno na 13,7% kakaove ljuske. Teobromin, osim što djeluje na fiziologiju životinje, usporava njezin rast, smanjuje primjerice i prinos mlijeka kod goveda te prinos jaja u pilića ([Oduro-Mensah i sur. 2018](#)).

2.3.1.2. Kofein

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) (**Slika 7b**), inače u prirodi prisutan alkaloid, najčešće se nalazi u listovima, grahoricama i plodovima različitih biljaka ([Preedy, 2012](#)) te ima ponajviše zaštitnu ulogu ([Ashihara i sur., 2011](#)). Topiv je u vodi, izrazito kipućoj, u ulju te kloroformu a topivost mu se može povećati dodatkom alkalnih benzoata, citrata ili salicilata. Do degradacije ove

relativno stabilne molekule dolazi u prisutstvu alkalija te prilikom zagrijavanja. Ovaj metilksantin poznat je po stimulaciji mentalne funkcije te simpatičkog živčanog sustava (Preedy, 2012). Neki autori navode da osim što ubrzava rad srca, podiže krvni tlak te stimulira mišiće potičući ih na iskorištavanje masnoće kao goriva. Također, štetni učinci kofeina mogu se manifestirati kao pojava nesanice, nervoze, glavobolje, tahikadije, aritmije te mučnine (Higgins i sur., 2010). Bitno je napomenuti kako niže koncentracije kofeina imaju pozitivan te stimulirajući učinak na organizam s obzirom da potiču aktivnost i budnost dok pri većim dozama mogu prouzrokovati štetne posljedice (Preedy, 2012). Bitno je napomenuti kako je kofein najčešće korištena psihoaktivna tvar na svijetu s obzirom na njegov utjecaj na organizam (Preedy, 2012; Gaspar i Ramos, 2016).

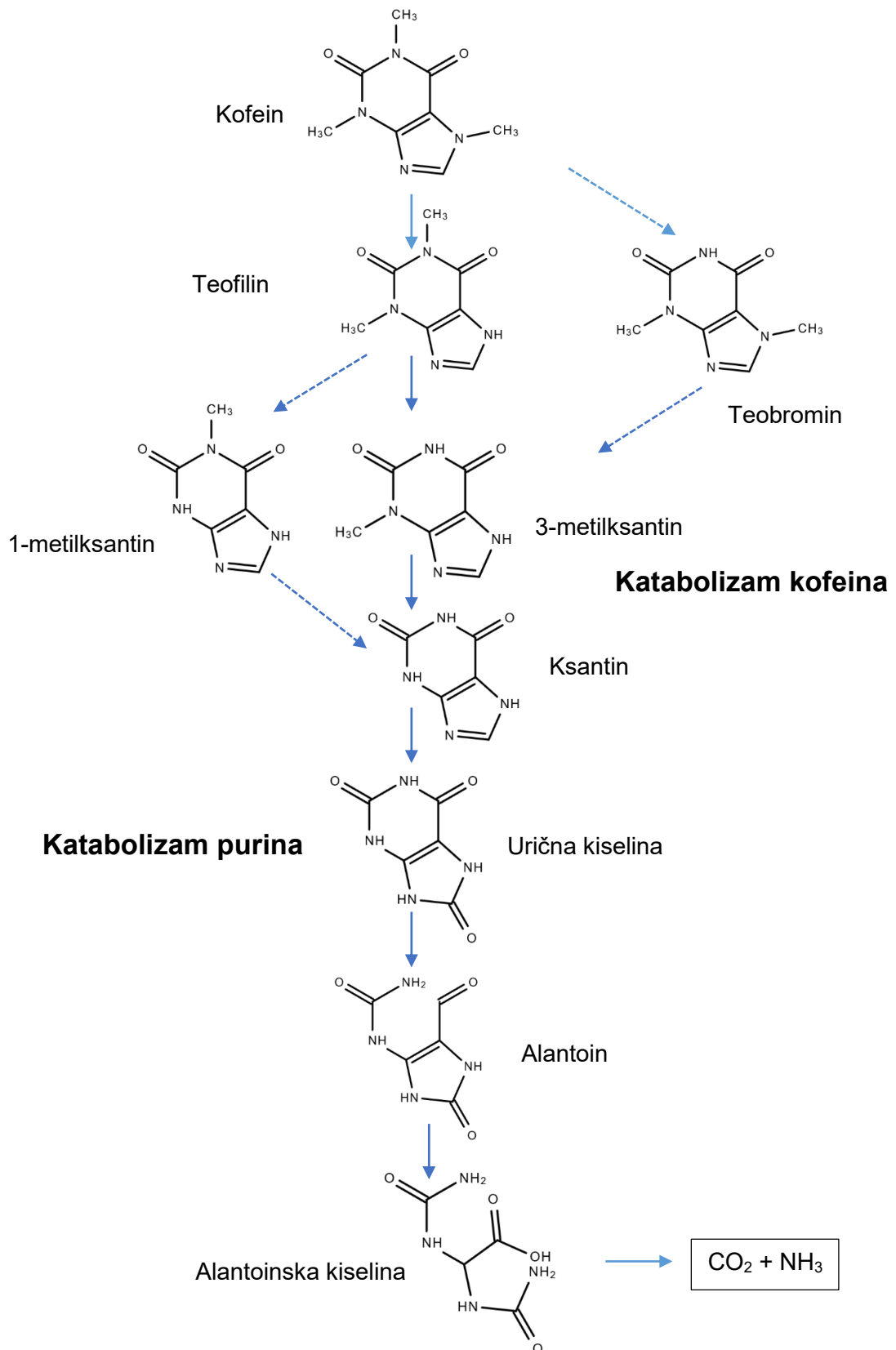
2.3.1.3. Teofilin

Teofilin (1,3-dimetilksantin) (**Slika 7c**), zapravo je više glavni dimetilirani produkt kofeina nego prekursor u biljkama. Također, kao i kofein, odgovoran je za stimulaciju središnjeg živčanog sustava te je moćan diuretik. Teobromin nije toliko jak stimulans kao kofein i teofilin, vjerojatno zbog fizikalno-kemijskih svojstava koja ometaju njegovu raspodjelu u središnjem živčanom sustavu. Sporom degradacijom kofeina tj. uklanjanjem tri metilne skupine, formira se ksantin, gotovo u svim biljkama koje sadrže kofein, uz teofilin kao središnji produkt u tom procesu. Sva tri metilksantina moguće je također dobiti kemijskom sintezom. Teofilin je učinkovitiji od kofeina pri stimulaciji srca, koronarnoj dilataciji te relaksaciji mišića (Monteiro i sur., 2016).

2.3.1.4. Katabolizam metilksantina u biljkama

Određene količine kofeina se vrlo sporo (zavisno od vrste biljke) degradiraju formirajući ksantin u gotovo svim biljkama koje sadrže kofein (**Slika 8**). Katabolizam kofeina započinje njegovom konverzijom u teofilin što katalizira N7-demetilaza. Teofilin također ima svoje rute degradacije zavisno od vrste biljaka u kojima se nalazi. Teobromin je pak, za razliku od teofilina, prekursor kofeina. Degradacija teobromina odvija se u kakaovom plodu preko 3-metilksantina, ksantina i alantoinne kiseline sve do CO₂. Iako je moguća konverzija kofeina u teobromin u kakaovcu (*Theobroma cacao*), kofein se katabolizira prvenstveno do CO₂ i to preko teofilina, što predstavlja isti degradacijski put kao i u kavi (*Coffea arabica*) te čaju (*Camellia sinensis*) (Ashihara i sur., 2011). U kakaovu plodu, teobromin se sintetizira kako u perikarpu tako i u kotiledonima zrna. Akumulira se već u mladim listovima, a kako biljka sazrijeva, njegova koncentracija opada u perikarpu dok se u kotiledonima povećava vjerojatno zbog migracije iz perikarpa. Teobromin se sintetizira iz adenosin-monofosfata (engl. *Adenosine monophosphate* – AMP) preko ksantozina te se metabolizira demetilacijom preko ksantina kako u zrnu tako i u lišću biljke. Faza sazrijevanja, uvjeti rasta, sastav tla te klimatski uvjeti utječu značajno na sadržaj metilksantina u kakaovu plodu (Smit, 2011). U stadiju fermentacije, udio teobromina

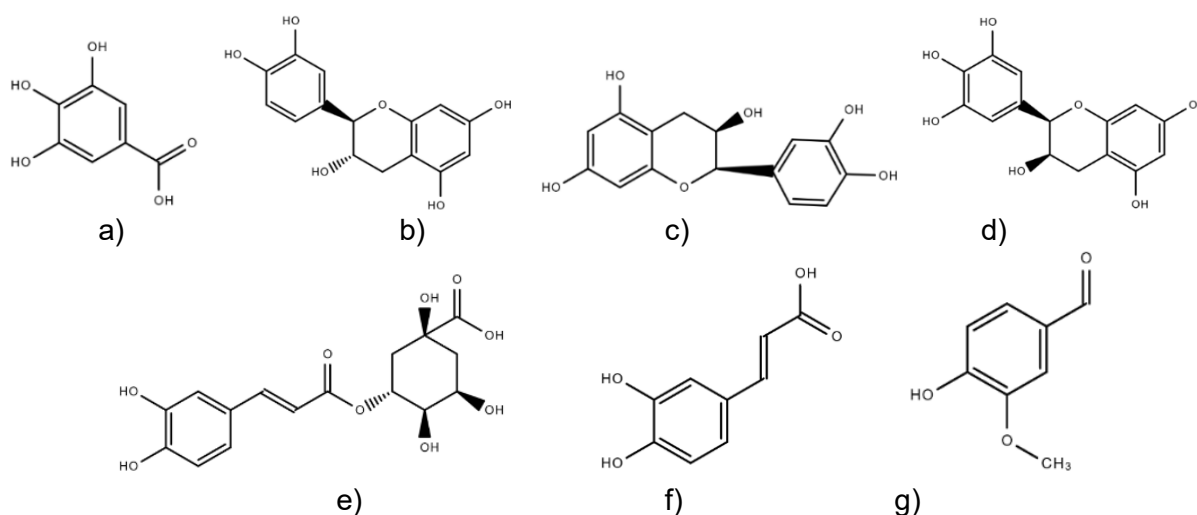
se u zrnu mijenja tj. smanjuje za oko 25%, i to zbog migracije metilksantina iz zrna u kakaovu ljusku (Okiyama i sur., 2017; Timbie i sur., 1978).



Slika 8 Katabolizam kofeina i teobromina (Ashihara i sur., 2011)

2.3.2. Fenolne komponente

Fenolne komponente su sekundarni metaboliti koji se nalaze u pigmentnim stanicama kotiledona te vrše različite funkcije u biljci (Hernández – Hernández i sur., 2018b). Osim što pigmentacijom pridonose morfologiji biljke, polifenoli su također uključeni u rast i reprodukciju biljke. Na taj način štite biljku od različitih štetnika ponašajući se kao fitoaleksini ili povećavajući astringenciju hrane čineći je nepoželjnom. Polifenolni profil biljke razlikuje se unutar sorte svake vrste (Bravo, 1998). Flavonoidi su najveća i najrazličitija grupa fenolnih komponenata sadržanih u kakaovom zrnu, a najzastupljeniji su epikatehin (čak oko 35% ukupnog fenolnog sadržaja), katehin i procijanidini (Hernández – Hernández i sur., 2018b). Jaka antioksidacijska aktivnost određenih fenolnih komponenti smanjuje oksidativni stres (Santos i sur., 2017) te poboljšava kardiovaskularnu funkciju (Aprotosoae i sur., 2016). Štiteći stanice od oksidativnog oštećenja ove komponente sprječavaju rizik od određenih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Vjeruje se kako određene fenolne komponente migriraju iz kotiledona kakaovog zrna u kakaovu ljusku tijekom različitih faza u proizvodnom procesu kao što su fermentacija, prženje te alkalizacija. Ovim procesima dolazi do smanjenja polifenola u kakaovu zrnu tj. obogaćenja kakaove ljuske polifenolima (Okiyama i sur., 2017). Između ostalog, za fenolne komponente dobro je znano kako imaju antitumorna, protuupalna, antineurodegenerativna, antibakterijska i antikancerogena svojstva (Hernández – Hernández i sur., 2018b). Nsor-Antidana i sur. (2012) dokazali su prisutnost polifenolnih komponenti u kakaovoj ljusci upotrebom različitih metoda ekstrakcije uz primjenu organskih otapala i vode. **Slika 9** prikazuje potencijalne fenolne komponente koje se nalaze u kakaovoj ljusci.



Slika 9 Strukturne formule flavonoida prisutnih u kakaovoj ljusci

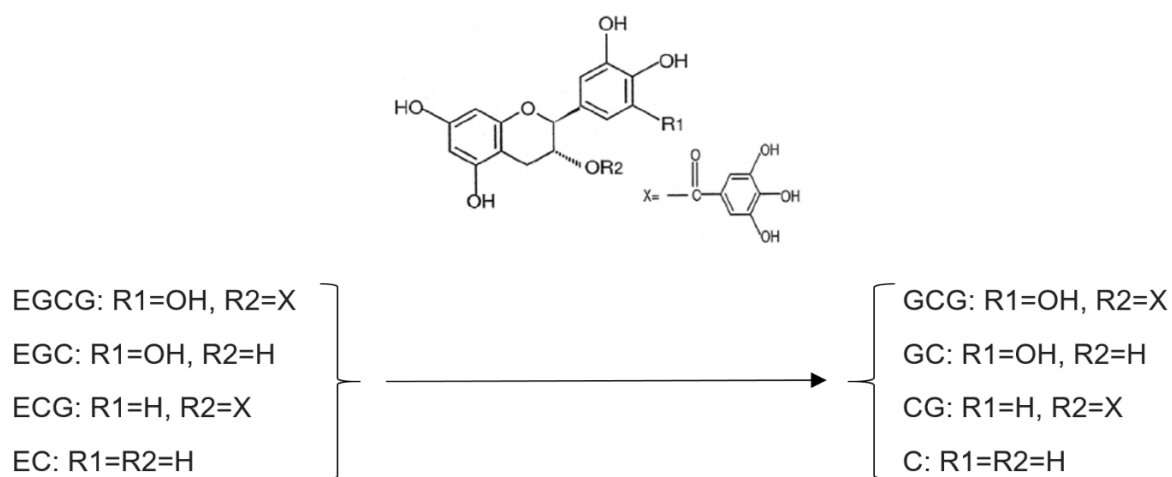
- a) galna kiselina b) (+)-katehin c) (-)-epikatehin d) epigalokatehin,
e) klorogenska kiselina f) kafeinska kiselina g) vanilin

2.3.2.1. Katehin

Tijekom procesa fermentacije, koja može trajati od 5-10 dana, kombinacijom endogenih i mikrobnih enzimatskih aktivnosti, uz povišenje temperature na oko 50 °C te difuzijom metabolita unutar i van kotiledona, dolazi do polimerizacije polifenola kao i mogućnosti njihovog stupanja u reakcije s drugim komponentama te time i mogućeg nastanka određenih kompleksa. Iz toga razloga, fermentacija je izrazito bitan i najodgovorniji korak smanjenja sadržaja flavan-3-ola u kakaovom zrnju, konkretno (-)-epikatehina, dok količina smanjenih polifenola ovisi o stupnju fermentacije. Postupak sušenja kakaovog zrna nakon fermentacije (zbog smanjenja udjela vode) također pridonosi smanjenju polifenola u zrnju što opet ovisi o klimatskim uvjetima. Flavan-3-oli su fenolne komponente koje zajedno formiraju dimerne, oligomerne ili polimerne kombinacije tj. proantocijanidine iz zasebnih jedinica poput procijanidina (oligomera epikatehina). Oligomerni i polimerni proantocijanidini prisutni u sirovim zrnima mogu se dalje polimerizirati tek u procesu proizvodnje. Esteri katehina poput galokatehina i epigalokatehina sadržani su također u sirovim kakaovim zrnima te se isto tako mogu formirati tijekom procesiranja, točnije, tijekom prženja (epigalokatehin galat). Antocijanini se pak uslijed hidrolize degradiraju tijekom procesa fermentacije te polimeriziraju u kondenzirane tanine. Manje fenolne komponente poput flavonola, fenolnih kiselina, jednostavnijih fenola i isokumarina, stilbena, i njihovih glukozida prisutni su u manjim količinama te je zbog toga njihov doprinos ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ograničen (Di Mattia i sur., 2017).

Epistrukturirani katehini

Ne-epistrukturirani katehini



Slika 10 Epimerizacija epistrukturiranih katehina na odgovarajuće neepistrukturirane katehine

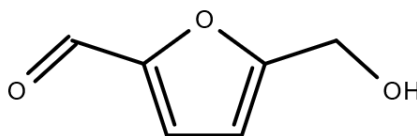
EGCG= epigalokatehin galat; EGC= epigalokatehin; ECG= epikatehin galat; EC= epikatehin; GCG= galokatehin galat; GC= galokatehin; CG= katehin galat; C= katehin (Vuong i sur., 2011)

Glavni flavan-3-oli u nefermentiranim, sušenim, neprženim kakaovim zrnima su (-)-epikatehin i (+)-katehin (Di Mattia i sur., 2017). Tijekom procesa prženja, zbog primjene visokih temperatura, kao i dijelom zbog procesa alkalizacije formira se još i atipični flavan-3-ol (-)-katehin i to epimerizacijom iz (-)-epikatehina (Oracz i sur., 2015) (Slika 10).

Neki autori napominju kako se polifenoli nalaze u vanjskim dijelovima biljke, što uključuje i kakaovu ljusku (Lecumberri i sur., 2007). Genetska predispozicija, zrelost, fermentacija te različiti vanjski utjecaji, glavni su faktori koji utječu na udio polifenola u biljci (Bruna i sur., 2009). Više studija potvrdilo je različiti udio fenola i metilksantina u više različitih genotipova kakaovca i to nakon procesiranja, što se također odražava na senzorne karakteristike i krajnju kvalitetu samoga zrna (Hernández – Hernández i sur., 2018b).

2.3.3. Hidroksimetilfurfural

Zbog prirode prehrambene industrije, te posebno zbog kemijskog sastava obrađenih sirovina kao i jediničnih operacija te uvjeta obrade, sinteza hidroksimetilfurfurala (HMF-a, engl. *Hydroxymethylfurfural*) je u hrani česta pojava. Tome pridonosi i akumulacija ne samo jednostavnih šećera nego i polisaharida, proteina i aminokiselina, niski pH te visoke temperature. Termičko tretiranje poput prženja (pogotovo namirnica bogatih ugljikohidratima) znatno pridonosi stvaranju HMF-a. Također, mnogi polisaharidi su u kiseloj sredini podložniji hidrolizi te se mogu transformirati u jednostavne šećere tj. početni materijal za stvaranje HMF-a. HMF heterociklički je aldehid sa šest ugljikovih atoma. Derivat je furana te sadrži aldehidnu i alkoholnu (hidroksimetilnu) funkcionalnu skupinu koje su vezane na 2. i 5. mjestu u prstenu (Kowalski i sur., 2013) (Slika 11).



Slika 11 Struktura HMF-a

U proizvodnji kakaovih proizvoda prženje je najvažnija tehnološka operacija. Pri tom termičkom tretiranju dolazi do Maillardovih reakcija neenzimskog posmeđivanja tijekom kojih se formiraju razni produkti. Osim što je intermedijarni produkt Maillardovih reakcija, formira se i pri degradaciji šećera na visokim temperaturama (Oliviero i sur., 2009). Jokić i sur. (2018a) su detektirali prisutnost HMF-a pri višim temperaturama u ekstraktima kakaove ljuske dobivenima ekstrakcijom supkritičnom vodom te time i ukazali na važnost optimizacije samoga ekstrakcijskog procesa kako bi se dobile željene komponente u ekstraktima.

2.4. OSTALE KOMPONENTE KAKAOVE LJUSKE

2.4.1. Prehrambena vlakna

Kakaova ljuska sadrži skoro tri puta više ukupnih prehrambenih vlakana nego kakaovo zrno (504 g/kg suhe tvari) od čega najviše netopivih prehrambenih vlakana (355 mg/kg suhe tvari) (Martin-Cabrejas i sur., 1994). Antioksidacijska svojstva kakaovih vlakana kao i njihova fizikalno-kemijska svojstva čine ovaj nusproizvod prikladnim za uporabu u pripremi niskokalorične hrane bogate vlaknima (Handojo i sur., 2019).

Udio vlakana u kakaovoj ljusci svakako ovisi o vanjskim čimbenicima poput klimatskih uvjeta i kvalitete tla. Visoke dnevne i noćne temperature uz dovoljnu količinu vlage pomažu akumuliranju ovih komponenti u kakaovoj ljusci. Na neplodnim i ne-vulkanskim tlima zabilježena je u kakaovoj ljusci manja količina pektina topivih u vodi. Također, moguća je i heterogenost tla zbog miješanja sjemena sa susjednih plantaža (Bruna i sur., 2009).

Navodi se također kako kakaova ljuska sadrži pektin koji inače ima visoku sposobnost formiranja gela a koji se koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju đemova, smrznute hrane te nisko-kalorične hrane (Arlorio i sur., 2001). Redgwell i sur. (2003) navode kako udio vlakana u kakaovoj ljusci ovisi i o procesu prženja pa se tako u prženom kakaovom zrnu i ljusci formiranjem Mailardovih produkata povećava i udio vlakana.

2.4.2. Masne kiseline

Masne kiseline sudjeluju u transportu i pohrani energije u organizmu, esencijalne su komponente svih membrana te su regulatori gena. Sastavljene od ravnolančanih lanaca ugljika, s jedne strane vezana im je metilna skupina, a s druge karboksilna skupina na koju je vezan α -ugljik. Masne kiseline hidrofobne su tj. slabo topive u vodi. Pravu topivost u vodi teško je odrediti, pogotovo za više lančane masne kiseline, što zbog utjecaja pH, što zbog tendencije asocijacije i formiranja micela. Masne kiseline lako se ekstrahiraju nepolarnim otapalima iz otopina ili suspenzija i to smanjivanjem pH (Rustan i Devon, 2005). Esencijalne masne kiseline su one koje su potrebne za biološko funkcioniranje organizma a koje tijelo ne može samo sintetizirati već ih nadoknađuje prehranom. Dvije takve esencijalne masne kiseline koje su čovjeku neophodne su linolenska (C18:2n-6) i α -linolenska (C18:3n-3) masna kiselina (Glick i Fischer, 2013). Glavne masne kiseline kakaove ljuske su palmitinska i oleinska kiselina, slično kao u kakaovom maslacu, uz duplo veći udio linolenske kiseline (Okiyama i sur., 2017). Udjeli masnih kiselina u kakaovoj ljusci i kakaovom maslacu prikazani su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Usporedba sadržaja masnih kiselina u kakaovoj ljusci i kakaovom maslacu (u postocima, %)

Masna kiselina	Kakaova ljuska	Kakaov maslac			
	El-Saied, 1981.	El-Saied, 1981.	Atawia, 1969.	Pietrzyk i Warzecha 1970.	Vasconcelos i sur. 1976.
Kaprilna (C8:0)			0,341		
Kaprinska (C10:0)	16,89	12,95	0,299		
Laurinska (C12:0)	tragovi	tragovi	1,021		tragovi
Tridekanska (C13:0)	tragovi	tragovi			
Miristinska (C14:0)	3,19	4,32	0,653		tragovi-0,2
Miristoleinska (C14:1)	2,43	1,29			
Palmitinska (C16:0)	27,27	23,31	22,155	22,5-28,2	24,9-29,2
Palmitoleinska (C16:1)	2,55	0,95	1,618		0,2-0,5
Margarinska (C17:0)	tragovi	tragovi			0,2-0,4
Stearinska (C18:0)	12,05	24,51	32,163	33,2-33,6	32,5-37,0
Oleinska (C18:1)	28,16	28,74	37,336	37,5-37,9	32,6-35,8
Linolna (C18:2)	7,49	3,93	1,832	1,3-3,9	2,6-3,7
Linolenska (C18:3)			1,232	0,0-1,4	tragovi – 0,3
Arahidska (C20:0)			1,091		0,9-1,4
Behenska (C22:0)			0,291		
Lignocerinska (C24:0)			0,112		

Lessa i sur. (2017) ustanovili su kako se tijekom fermentacije uz *Penicilium roqueforti* smanjuje sadržaj zasićenih masnih kiselina u ekstraktima kakaove ljuske dok se sadržaj nezasićenih masnih kiselina bitnih za zdravlje, povećava (oleinska, linolna i γ -linolenska masna kiselina).

2.4.3. Vitamin D

Kakaova ljuska koja se nalazi na svježem nefermentiranom kakaovom zrnu osušenom na suncu može sadržavati male količine vitamina D, dok ljuska fermentiranog kakaovog zrna može sadržavati puno veće količine. To je vjerojatno zbog specifičnog prekursora koji se pretvara u vitamin D tijekom izlaganja sunčevoj svjetlosti. Knapp i Coward (1935) odlučili su napraviti eksperiment i odrediti kako fermentacija i odabir vrste sušenja utječu na sadržaj vitamina D u kakaovoj ljusci. Fermentirana kakaova zrna se već uobičajeno prostiru na stolove i ostavljaju sušiti na suncu tijekom šest dana uz povremeno prevrtanje. Kvasci, koji sadrže ergosterol, razvijaju se tijekom procesa fermentacije kakaovih zrna, te se tijekom ovog

prirodnog načina sušenja na tropskom suncu ergosterol konvertira u vitamin D. Primijetili su kako je ovo slučaj samo kod izloženosti sunčevoj svjetlosti dok kod umjetnog procesa sušenja, vitamin D nije bio prisutan u kakaovoj ljsuci ([Knapp i Coward, 1935](#)). Također, dodavanjem ovako obogaćene kakaove ljsuke u hranu za životinje dokazano je povećanje sadržaja vitamina D u životinjskom mlijeku i maslacu ([Knapp i Churchman, 1937](#)).

2.4.4. Biogeni amini

Potencijalno toksični spojevi kao što su biogeni amini poput tiramina te nehranjive komponente poput fitinske kiseline te inhibitora tripsina, ne umanjuju mogućnost daljnje uporabe kakaove ljsuke kao izvora pektina. Pektinski gel dobiven iz kakaove ljsuke može se pročistiti otapalima poput etanola i 2-propanola. Neke studije ukazuju kako biogeni amini mogu uzrokovati ubrzan rad srca, hipertenziju i hipotenziju, vrtoglavicu, glavobolju i crvenilo lica. Kakaova ljsuka sadrži relativno male udjele ovakvih komponenti koje stoga nemaju toksični učinak ([Arlorio i sur., 2001](#)).

2.5. POTENCIJALNA UPORABA KAKAOVE LJUSKE

S obzirom da je nusproizvod u industriji proizvodnje kakaa i proizvoda od kakaa, kakaova ljsuka se nagomilava kao otpad bez obzira na njezinu hranjivu vrijednost. Osim što je izvor vlakana, potencijalni je izvor antioksidansa i to zbog visokog sadržaja fenola, što je čini dobrom sirovinom za daljnju uporabu. Visoki sadržaj prehrambenih vlakana čini je zanimljivim sastojkom u pripremi hrane ([Martín-Cabrejas i sur., 1994](#); [Martínez i sur., 2012](#); [Okiyama i sur., 2017](#)). Relativno visoke vrijednosti prehrambenih vlakana zajedno s fenolnim komponentama povećavaju mogućnost ovog nusproizvoda za iskorištenje u prehrambenoj industriji, proizvodnji konditorskih proizvoda, pekarstvu ili pripremi proizvoda s niskokaloričnom dijetetskom kao i vlaknastom hranom ([Nsor-Atindana i sur., 2012](#)). Još jedan inovativan pristup bio bi dodavanje izoliranih polifenolnih spojeva kao i vodotopivih pektina iz kakaove ljsuke u čokoladu, obogaćujući je antioksidansima ([Bruna i sur., 2009](#)).

Pojedine studije dokazale su kako fenolne komponente iz kakaove ljsuke, zbog svojih antioksidacijskih svojstava, mogu smanjiti oksidaciju lipida kod nekih vrsta mesa u koje su dodane. Preporuka je stoga koristiti ih kao zamjenu za sintetske antioksidanse za ulja koja su namijenjena prženju ([Okiyama i sur., 2017](#)). Time se znatno može poboljšati kvaliteta tog ulja i njihova stabilnost bez utjecaja na boju ulja. Njihovim dodatkom u ulja usporava se stvaranje slobodnih masnih kiselina i razina peroksida a povećava se antioksidacijska aktivnost ([Manzano i sur., 2017](#)).

Promatrajući situaciju danas u svijetu, kada su proizvođačima najvažniji ekonomski dobitci i profit, povećava se i uporaba antibiotika u liječenju stoke koji preventivno održavaju njihovo

zdravlje. Sve je učestalija otpornost na patogene bakterije, a prekomjerna uporaba antibiotika dovodi do njihovog nakupljanja u okolišu što ujedno postaje sve veći ekološki problem. Dokazi višebrojnih potvrdnih istraživanja ukazuju na tragove antibiotika u nekim lokalnim i otpadnim vodama. Iz tog razloga neki autori spominju uporabu nusproizvoda tropskih biljaka poput kakaove ljuske kao moguće zamjene za antibiotike u hrani za životinje zbog njezinog značajnog antimikrobnog potencijala, a što bi poboljšalo zdravlje domaćih životinja na farmama. Bioaktivni spojevi tih nusproizvoda mogu utjecati na patogene bakterije, izbjegavajući oštećenje same stanice. Neki pak bioaktivni spojevi mogu djelovati sinergistički i povećati antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija. Dakako, te pretpostavke i istraživanja zahtijevaju posebnu opreznost jer neki bioaktivni spojevi mogu biti otrovni (Guil-Guerrero i sur., 2016). Među ostalim prirodnim materijalima, kakaova ljuska koja ima niski stupanj poroznosti se naširoko koristi pri dekontaminaciji tla od raznih metala (Meunier i sur., 2004), plinova ili industrijskih boja (Fioresi i sur., 2017). Također, može se primjenjivati na sličan način pri različitim tretmanima vode (npr. otpadne vode) što neke studije i potvrđuju (Ahmad i sur., 2012), pri biofiltraciji otpadnih voda u proizvodnji hrane kao i pri proizvodnji bioplina. Studije ističu i upotrebu fenolnih ekstrakata u prevenciji zubnih šupljina (Okiyama i sur., 2017), a zaključeno je i kako je kakaova ljuska obećavajući prekursor aktivnog ugljena za upotrebu u adsorpciji proteina sirutke (Pereira i sur., 2014).

Kakaova ljuska se može koristiti kao gnojivo jer formira humusni supstrat, ali se ne razgrađuje lako, što može dovesti do njegove akumulacije tijekom sezone (Prabhakaran Nair, 2010).

Zbog svog polisaharidnog sastava i sposobnosti vezanja vode, kakaova ljuska potencijalna je sirovina za proizvodnju proizvoda na bazi vlakana. Ekstrakti kakaove ljuske zanimljivi su ne samo zbog svoje arome, već i zbog sadržaja proteina i saharida (Dongowski i sur., 1991).

Kakaova ljuska inače se preporučuje za prehranu preživača, ali uz dodatak određenih komponenata koje bi poboljšale okus ili razrijedile toksični učinak određenih komponenata (Aregheore, 2002). Osim što se koristi kao gorivo za kotlove, hranu za životinje i pripremu gnojiva, ovaj se nusproizvod može koristiti kao kozmetički ili farmaceutski dodatak te kao dodatak prehrani s visokom hranjivom vrijednošću što ga čini ekonomski prihvatljivom sirovinom (Okiyama i sur., 2017).

2.6. ZELENE TEHNIKE EKSTRAKCIJE

Konstantno povećavanje populacije u današnjem svijetu podrazumijeva također sve veće potrebe za hranom i energijom. Iz tog su razloga potrebni dodatni naponi kako bi se pronašli alternativni načini generiranja istih ali uz interakciju s našim planetom na više ekološki način. Zbog zabrinutosti utjecaja kemikalija na okoliš, razvijen je novi pristup tzv. „zelene kemije“ kako

bi se smanjio štetni utjecaj (Ibáñez i Cifuentes 2017). Chemat i sur. (2012) su definirali šest principa zelene ekstrakcije prirodnih proizvoda:

- pronalazak novih izvora biljnih materijala i uporaba obnovljivih izvora
- uporaba alternativnih otapala, uglavnom vode i otapala iz prirodnih izvora
- smanjenje potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjenom inovativnih tehnologija
- proizvodnja nusproizvoda umjesto otpada kako bi se obuhvatila bio- i agro- industrija prerade
- smanjenje broja operacija i provođenje sigurnih i kontroliranih procesa
- usmjerenje k proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez kontaminanata.

Tehnike ekstrakcije prirodnih proizvoda od davnina su se koristile za proizvodnju hrane i lijekova (Chemat i sur., 2012) a s vremenom se nastojalo minimalizirati probleme koje one nose poput velikog utroška energije i otapala te malog prinosa. Zelene tehnike ekstrakcije, kao visoko-učinkoviti procesi, mogu osigurati veće prinose iz obnovljivih izvora i to bez opasnih kemijskih supstanci (Mustafa i Turner, 2011; Pavlič, 2017). Korištenjem alternativnih otapala (poput vode i uglavnom na bazi vode), uz manju potrošnju energije, te smanjenim brojem eksperimenata u postupku ekstrakcije, moguće je dobiti stabilne ekstrakte bez kontaminanata (Chemat i sur., 2012; Pavlič, 2017). Konvencionalne tehnike ekstrakcije zahtjevaju duže vrijeme ekstrakcije, veće količine organskih otapala što ima negativan utjecaj na ljude i životnu sredinu te su neekonomične (Ramos i sur., 2002) a ujedno i zahtjevne. Nadalje, zbog manje selektivnosti otapala korištenih pri konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, potreba za koncentriranjem i pročišćavanjem dobivenih ekstrakata također je još jedan nedostatak jer otežava ekstrakciju ionako već malih koncentracija termolabilnih komponenti iz sirovine (Mustafa i Turner, 2011; Pavlič, 2017).

2.6.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Razlika između ultrazvuka i zvuka je u frekvenciji vala. Valovi zvuka su pri frekvencijama koje ljudsko uho može čuti (od 16 Hz do 16-20 kHz), dok ultrazvuk čine mehanički valovi frekvencija iznad ljudskog sluha ali ispod mikrovalnih frekvencija (od 20 kHz do 10 MHz) (Chemat, 2011). Za klasifikaciju primjene ultrazvuka ključni kriterij leži u količini proizvedene energije, snazi zvuka (W) te intenzitetu snage (W/m²). Razlikuje se ultrazvuk visokog intenziteta i ultrazvuk niskog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta koristi visoku frekvenciju (od 100 kHz do 1 MHz), slabiju snagu (<1W/cm²) te se koristi za nedestruktivne analize i procjenu kvalitete. Nasuprot tome, ultrazvuk visokog intenziteta koristi nisku frekvenciju (16-100 kHz) i jaču snagu (10-1000 W/cm²) te se upotrebljava većinom za ubrzavanje i progresiju efektivnosti pripreme uzoraka (Grumezescu i Holban, 2017). Mehanički učinak ultrazvuka, tj. djelovanje kavitacije

na staničnu stjenku dovodi do njezinog oštećenja, čime se olakšava pristup otapala staničnom sadržaju i ujedno poboljšava prijenos mase (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Patist i Bates, 2008). Primjena visoke temperature i tlaka dovodi do razaranja stijenke stanica biljnog matriksa što omogućava otpuštanje njezinog sadržaja u medij (Chemat i sur., 2011). Ova tehnika zahtijeva tekući medij, generator energije i transduktor koji pretvara električnu, magnetnu ili kinetičku energiju u akustičnu. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom značajno smanjuje vrijeme potrebno za ekstrakciju traženih komponenata, uz veće prinose i kvalitetu samoga ekstrakta. Smatra se dobrom opcijom za ekstrakciju organskih komponenata iz različitih matriksa jer pruža efikasniji kontakt između krutine i otapala što zbog povišenja tlaka (bolja penetracija i transport), što zbog povišenja temperature (poboljšava topivost i difuznost). Osim toga, moguće je simultano provođenje više ekstrakcija te je relativno jeftina laboratorijska tehnika za razliku od ostalih modernih ekstrakcijskih metoda. Zbog svojih karakteristika, ultrazvučna ekstrakcija može se koristiti i kao predtretman sofisticiranijim metodama ekstrakcije (Grumezescu i Holban, 2017).

2.6.1.1. Parametri koji utječu na UAE

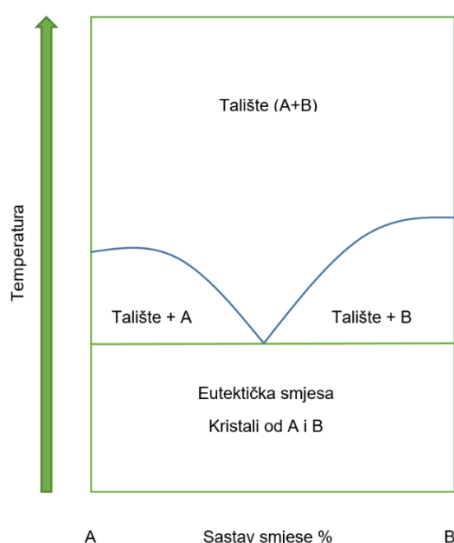
Na proces ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction* – UAE) utječe nekoliko procesnih parametara poput vrste ultrazvučnog reaktora, frekvencije i snage ultrazvučnog zračenja, temperature, vremena ekstrakcije te karakteristike uzorka kao i odabranog otapala za ekstrakciju. Povišena snaga ultrazvučnog zračenja može dovesti do većeg intenziteta miješanja ali ujedno i do degradacije određenih komponenti dok se niže frekvencije ultrazvuka većinom povezuju s većim prinosima samoga procesa. Povišena temperatura pak povećava interakcije između uzorka i odabranog otapala kao i difuzivnost samoga otapala dok snižena temperatura pospješuje akustičnu kavitaciju. Duže vrijeme ekstrakcije može osigurati veće prinose željenih komponenata ali isto tako i dovesti do određenih kemijskih promjena u dobivenom ekstraktu. Veličina čestica kao i omjer tekuće/kruto glavne su karakteristike uzorka koje mogu utjecati na ishod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Povišena temperatura se općenito povezuje s povećanjem prinosa ekstrakcije no potrebno je također voditi računa kako više temperature mogu dovesti do različitih kemijskih promjena u ekstraktu i do degradacije određenih komponenata. Iz tog razloga, temperaturu je potrebno optimirati s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa željenih komponenata a ne ukupnog prinosa ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije u kombinaciji s povišenom temperaturom ponekad može također dovesti do degradacije željenih komponenata (Pavlič, 2017). Fizikalne karakteristike odabranog otapala za ekstrakciju poput viskoziteta, površinske napetosti, tlaka para iznad otapala, i dielektrične konstante, izravno utječu na selektivnost ekstrakcije kao i na konačni kemijski sastav ekstrakata. Tako je kod otapala većeg viskoziteta i površinske

napetosti smanjen utjecaj ultrazvučne kavitacije na fenomene prijenosa te je preporučljivo u tim slučajevima primijeniti zračenje većeg intenziteta (Chemat i sur., 2017). U skladu s trendovima „zelene“ kemije uglavnom se koristi voda kao jedno od najpoželjnijih otapala pri ekstrakciji. Uzimajući u obzir sve ove parametre, jasno je kako je njihova optimizacija ključna kako bi se postigao željeni rezultat ekstrakcije (Pavlić, 2017).

2.6.2. Ekstrakcija eutektičkim otapalima

Eutektička otapala spadaju u novu, četvrtu generaciju ionskih tekućina kako zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava tako i zbog jednostavne i ekonomične pripreme. Ta priprema može u određenim slučajevima biti dugotrajna ili rezultirati „karameliziranjem“ produkta što je opet vezano uz kontrolu temperature tijekom procesa pripreme (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a).

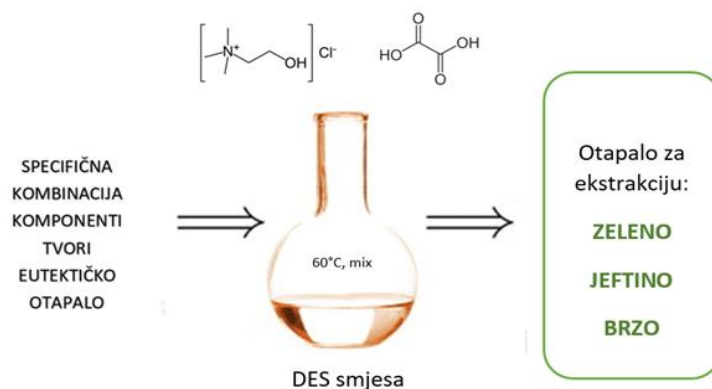
Eutektičko otapalo je otopina dviju ili više tvari koja u određenom omjeru ima niže talište nego svaka od tih tvari posebno. Pri pripremi ovih otapala ne dolazi do kemijske reakcije već se komponente povezuju vodikovim vezama tvoreći eutektičko otapalo (engl. *Deep Eutectic Solvent* – DES) (Slika 12).



Slika 12 Nastanak eutektičke smjese (Fischer, 2015)

Novonastale vodikove veze u ovim otapalima uzrokuju mjestimičnu delokalizaciju naboja što dovodi do snižavanja tališta smjese u odnosu na talište pojedinačnih komponenti. Eutektičke smjese (Slika 13) su u pravilu biorazgradive, stabilne te ostaju duže vrijeme bez taloga u tekućem stanju, imaju nizak tlak para, ekološki su prihvatljivije od organskih otapala te su jeftine (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Na stabilnost same eutektičke smjese utječu i različiti omjeri komponenata, a uz kemijsku strukturu, na stabilnost vodikovih veza veliki utjecaj ima i

prostorni raspored skupina unutar molekule. Kolin-klorid (ChCl), organska je sol koja se široko primjenjuje u pripravi eutektičkih otapala ponajprije zbog svoje ekonomičnosti, biorazgradivosti i netoksičnosti te se kao kvarterna amonijeva sol može lako ekstrahirati iz biomase ili sintetizirati iz fosilnih goriva. Kolin-klorid ulazi u interakciju s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika tvoreći eutektičko otapalo. Promatrajući s aspekta zelene kemije, priprava ovakve vrste otapala održivi je proces koji se ostvaruje sa 100%-tnom atomskom učinkovitošću tj. svi atomi se ugrađuju u produkt pri čemu ne dolazi do stvaranja otpada. Jedan od načina pripreme eutektičkih otapala uključuje blago zagrijavanje točno odvaganih masa komponenata (uz mogućnost dodatka vode ili ne) uz miješanje na temperaturi do 100 °C u trajanju od 30 do 240 minuta tj. sve do formiranja bistre tekućine. Vrijeme pripreme tekućeg otapala razlikuje se i mijenja s obzirom na tip komponenti i udio vode u samom otapalu dok molarni omjeri odabranih komponenata kao i temperatura taljenja ovise o njihovoj kemijskoj prirodi (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a).



Slika 13 Priprema eutektičke smjese (modif. Wikene i sur., 2015; Park i Lee, 2017)

Svojstva eutektičkih smjesa, poput polarnosti i afiniteta ekstrakcije mogu se do određene mjere regulirati, i to promjenom molarnih udjela i vrste komponenata smjese. Tako je dodatkom vode moguće smanjiti viskoznost eutektičke smjese (Bajkacz i Adamek, 2018), kao i površinsku napetost te poboljšati polarnost (Peng i sur., 2016), no svakako treba odabrati optimalne uvjete jer prevelik udio vode može imati negativan utjecaj kako na strukturu samo eutektičkog otapala, tako i na interakcije eutektičke smjese i ciljanog analita. Eutektičke smjese s većim udjelom vode u pravilu učinkovitije ekstrahiraju polarne komponente (Bajkacz i Adamek, 2018).

U današnje vrijeme raste zanimanje za ekstrakciju fenolnih spojeva eutektičkim otapalima zbog njihovih dobrih svojstava otapanja. Nedavno su rađena istraživanja na ekstrakciji različitih fenolnih spojeva poput fenolnih kiselina, flavonoida i stilbena iz različitih biljnih izvora (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Dosad su se eutektička otapala uspješno koristila također i za ekstrakciju fenolnih spojeva iz maslinovog ulja (García i sur., 2016), zatim iz kožice grožđa

(Cvjetko Bubalo i sur., 2016b), nekih fenolnih komponenti iz lišća *Barsonima intermedia* (Fraige i sur., 2018), te rutina iz *Sophora japonica* (Zhao i sur., 2015) ili iz *Ruta graveolens* (Molnar i sur., 2018).

2.6.2.1. Parametri koji utječu na DES ekstrakciju

Učinkovitost DES smjese ovisi o svojstvima njegova otapanja. S obzirom na njihovu sposobnost stvaranja vodikovih veza povećava se i njihova sposobnost otapanja.

U nekim se studijama ekstrakcijom različitim smjesama eutektskih otapala utvrdilo kako ona imaju veliku moć ekstrakcije fenolnih komponenata. Veliki utjecaj na ekstrakciju ima polaritet te viskoznost odabrane DES smjese. Također, osim što eutektske smjese imaju veću gustoću od gustoće vode, većinom imaju i veću gustoću od gustoće tvari koja je donor vodikove veze. Ta veća gustoća karakterizirana je pojavom jakih vodikovih veza između molekula. Gustoća DES smjese pak ovisi o udjelu vode i o primjenjenoj temperaturi (Paiva i sur., 2014) a gotovo se linearno smanjuje porastom temperature zbog vibracije aniona i kationa u eutektskom otapalu. Na taj se način preraspodjeljuju molekule zbog slabljenja ionskih interakcija što opet zauzvrat smanjuje gustoću same tekućine. Gustoća DES smjese također se drastično smanjuje povećanjem ugljikovodičnog lanca donora vodikove veze. Također, utjecaj na gustoću ima i molarni omjer organske soli i donora vodikove veze (Zhang i sur., 2012). Što se tiče polarnosti DES smjese, najpolarnije su one na bazi organskih kiselina, dok su one na osnovi šećera i polialkohola najmanje polarne. Viskoznost DES smjese utječe na vodljivost koja se povećava s povećanjem udjela soli u DES smjesi (Paiva i sur., 2014). Inače DES smjese imaju relativno nisku električnu vodljivost zbog smanjene pokretljivosti iona (Alomar i sur., 2016), no s porastom temperature kao i povećanjem količine donora vodikove veze u DES smjesi moguć je porast vodljivosti.

2.6.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi se sve češće danas primjenjuju u raznim kemijskim procesima. To su elektromagnetski valovi u području frekvencija od 0,3 - 300 GHz koji stupaju u interakcije s tvarima u matriksu uzrokujući migraciju iona i rotaciju dipola bez promjene u molekularnoj strukturi. Rotacija dipola je interakcija vezana uz poredak molekula, a uzrokuje ju brzo mijenjajuće električno polje mikrovalova koje dovodi do dielektričnog zagrijavanja. U današnje vrijeme koristi se kombinacija mikrovalne energije s dodatnim tehnikama ekstrakcije kako bi se poboljšao prinos ekstrakcije, selektivnost i termalna stabilnost ciljanih komponenti. Odabir

optimalnih parametara za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraction* - MAE) ovisi o topljivosti, isparljivosti i stabilnosti ciljanih analita kao i o interakcijama s drugim komponentama koje mogu biti prisutne u uzorku (De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017). Mikrovalovi većinom ulaze u interakcije s polarnim komponentama kako bi proizveli toplinu. Postupak zagrijavanja i učinkovitost mikrovalova temelji se na faktoru disipacije materijala (*tan delta*) (Chan i sur., 2011). Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima može se odvijati na jedan ili kroz sva tri mehanizma zagrijavanja:

- ekstrakcija analita u otapalo ili mješavinu otapala koji jako apsorbiraju mikrovalnu energiju;
- ekstrakcija analita u kombinirano otapalo koje sadrži visoke i niske dielektrične gubitke u različitim omjerima;
- ekstrakcija analita iz uzorka visokih dielektričnih gubitaka i to otapalom transparentnim mikrovalovima.

Logično je da čestice koje su bliže zidu posude za ekstrakciju, doživljavaju jače mikrovalnu energiju od onih koje su više unutra, i to zbog snage absorpcije duž smjera širenja. Jednostavnije rečeno, pretpostavlja se kako se mikrovalovi šire prvenstveno od bočnih stijenki posude prema unutrašnjosti i to zbog toga što je bočna površina posude obično veća od gornje površine (Chan i sur., 2016).

2.6.3.1. Parametri koji utječu na MAE

Generalno gledajući, glavni parametri koji utječu na ovaj tip ekstrakcije su otapalo, omjer tekuće/kruto, priroda matriksa (veličina čestica, kontaktna površina te udio vode), tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije, snaga mikrovalova kao i miješanje za vrijeme ekstrakcije. Izbor otapala osim što ovisi o njegovim svojstvima, ovisi i o topivosti ciljane komponente kao i interakcije otapala s matriksom. Otapala s visokom dielektričnom konstantom snažno apsorbiraju mikrovalnu energiju a dodatak vode poboljšava hidrolizaciju čime je smanjena oksidacija ciljanog analita (De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017). Važan parametar je i omjer tekuće/kruto jer treba osigurati homogenu i efektivno zagrijavanje (Chan i sur., 2011; Pavlić, 2017). S obzirom da otapalo apsorbira veći dio energije zračenja, uporaba veće količine otapala dovodi do slabijeg zagrijavanja uzorka, te je u tom slučaju potrebno povećati snagu mikrovalova. Premalo otapala opet ograničava prijenos mase čineći manji koncentracijski gradijent iz čvrste u tekuću fazu. Iz tog razloga ovaj procesni parametar često se uzima u obzir pri optimizaciji ove vrste ekstrakcije (Pavlić, 2017).

Učinak miješanja također je izravno povezan s prijenosom mase u otapalo. Snaga mikrovalova i tlak, posebno u zatvorenim sustavima u izravnoj su vezi s temperaturom, količinom upotrebljenog uzorka i vremenom trajanja ekstrakcije (De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017). Veća snaga mikrovalova povećava prinos ekstrakcije no ujedno može dovesti do degradacije termolabilnih komponenti kao i izazvati mjestimično zagrijavanje u stanicama matriksa, njihovo razaranje te olakšati difuziju unutarstaničnog sadržaja. Uslijed toga prinos željenih komponenti može biti niži uslijed koekstrakcije balastnih tvari (Chan i sur., 2011; Pavlić, 2017). Generalno, efikasnost ekstrakcije povećava se povećanjem temperature do optimalne vrijednosti nakon čega se smanjuje pri višim temperaturama. Također, pri višim temperaturama mogući su i loši prinosi ekstrakcije zbog stvaranja međuprodukata ili moguće degradacije termički osjetljivih komponenata poput flavonoida. Prekomjerna izloženost mikrovalnom zračenju također može dovesti do gubitka kemijske strukture određenih aktivnih komponenata. Vrijeme trajanja MAE relativno je kratko u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije čime se ujedno izbjegava pregrijavanje. Zbog toga je kod duže primjene mikrovalnog zagrijavanja moguće podijeliti MAE u više ciklusa (De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017) te time provesti potpuno iskorištenje uzorka bez moguće degradacije komponenti (Chan i sur., 2011).

2.6.4. Ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Visokonaponsko električno pražnjenje (engl. *High Voltage Electric Discharge - HVED*) odnosi se na 4. stanje materije ili djelomično ionizirani plin bez termodinamičke ravnoteže između visokoenergetskih elektrona i glavnog dijela atoma plina ili molekula što rezultira visokim sadržajem kinetičke energije pri nižim temperaturama. Dolazi do emisije energetski nabijenih čestica, radikala i fotona pri čemu se kidaju kovalentne veze i potiču kemijske reakcije. Osim pri dekontaminaciji hrane (Bursać Kovačević i sur., 2016; Barišić i sur., 2019), visokonaponsko električno pražnjenje može se primijeniti za pasteriziranje u proizvodnji voćnih sokova kako bi se očuvale vrijedne bioaktivne komponente uz istodobno osiguranje mikrobne sigurnosti (Bursać Kovačević i sur., 2016; Herceg i sur., 2016) a zamijećeno je čak i povećanje fenolnih komponenti nakon ovog tretmana (Herceg i sur., 2016). Barišić i sur. (2019) navode kako je visokonaponsko električno pražnjenje moguće koristiti kao predtretman u procesiranju kakaove ljuske a spominju i autore koji navode mogućnost njegove primjene i u tretiranju otpadnih produkata u prehrambenoj industriji kao i ekstrakciji bioaktivnih komponenata, većinom fenolnih komponenata te proteina iz različitih namirnica.

Osnovni principi rada za svaki od ova tri sustava potpuno su identični – formiranje visokonaponskog električnog pražnjenja zbog visokog električnog polja, uništenje stanice te poboljšanje prijenosa mase uzrokovano različitim sekundarnim fenomenima. Jedina razlika je u strukturi uređaja, posebno elektroda, zbog čega su koncentracije električnog polja različite kod svakog od njih (Li i sur., 2019).

Visokonaponsko električno pražnjenje jedna je od inovativnih tehnika ekstrakcije koja za razliku od konvencionalnih metoda ekstrakcije koristi kraće vrijeme procesiranja, daje veći prinos i poboljšanu kvalitetu dobivenih produkata uz kontrolu nad produktima Maillardovih reakcija te su u konačnici poboljšana funkcionalna svojstva ekstrakata (Barišić i sur., 2019).

2.6.4.1. Parametri koji utječu na HVED

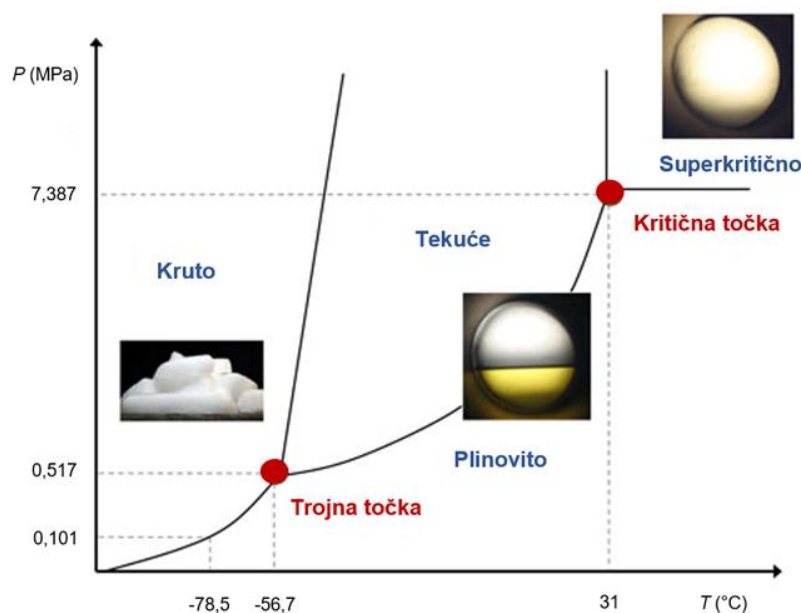
Efikasnost ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem ovisi o nekoliko procesnih parametara poput omjera tekuće/kruto tj. koncentracije otopine, odabira otapala, protoka otapala, napona, frekvencije i jakosti električnog polja, elektroprovodljivosti medija u kojem se ekstrakcija odvija te vremena ekstrakcije.

Što je viša vrijednost napona, a udaljenost između elektroda manja, jakost električnog polja je veća što dovodi do električnog pražnjenja, razaranja stanice i izlaska unutarstaničnih komponenti (Almohammed i sur., 2017). Veća jakost električnog polja osim toga utječe i na strukturu određenih komponenti kao i na njihovu antioksidacijsku aktivnost (Ju i sur., 2018). Prevelika jakost električnog polja uslijed previsokog napona konstantne frekvencije može dati smanjeno iskorištenje određenih komponenti s obzirom na njihovu moguću oksidaciju uzorkovanu slobodnim radikalima generiranim intenzivnim električnim pražnjenjem (Moubarik i sur., 2010). Duže vrijeme trajanja ekstrakcije visokonaponskim električnim pražnjenjem dovodi do učinkovitijeg razaranja stanične strukture i fragmentiranja komponenata (Rajha i sur., 2015). No opet, predugim trajanjem ekstrakcije iskorištenje fenolnih komponenti može biti manje zbog nastalih radikala (Brianceau i sur., 2016). Također, ako su elektrode izrađene od nehrđajućeg čelika, uslijed duže ekstrakcije moguća je migracija metalnih iona koji opet mogu utjecati na elektroprovodljivost otopine a time i na stupanj biološkog oštećenja materijala. Nadalje, veći stupanj oštećenja biološkog materijala omogućuje veći izlazak unutarstaničnih komponenti koje također mijenjaju ionski sastav i elektroprovodljivost otopine (Boussetta i Vorobiev, 2014). Većim omjerom tekuće/kruto poboljšana je molekularna difuzija između dvije faze a samim time i uspješnija ekstrakcija (Xi i sur., 2017) dok preveliki omjer može pokazati slabiju antioksidacijsku aktivnost (Barba i sur., 2015). Odabir otapala također ovisi i o topljivosti traženih komponenti (Cui i sur., 2018). Dodavanjem određenih organskih otapala moguće je povećati njihovu topljivost npr. u vodi no potrebno je voditi računa i o tom omjeru, tj. pronaći

optimalni omjer vode i organskog otapala kako se ne bi smanjila elektroprovodljivost otopine (Zhu i sur., 2018). Protok otapala bitan je samo kod cirkulirajuće i kontinuirane ekstrakcije. Veći protoci smanjuju laminarni sloj a samim time i prijenos mase (Psillakis i Kalogerakis, 2001) dok preveliki protoci smanjuju iskorištenje zbog prevelike brzine otopine i nemogućnosti postizanja ravnoteže ekstrakcije (Li i sur., 2019).

2.6.5. Superkrična fluidna ekstrakcija

Superkrična fluidna ekstrakcija (engl. *Supercritical Fluid Extraction* – SFE) predstavlja jednu od izvrsnih alternativa klasičnim postupcima ekstrakcije a razlog tome su brojne prednosti superkričnog fluida poput bolje difuzije, niže viskoznosti, manje površinske napetosti, visoke selektivnosti, kontrole sposobnosti otapanja superkričnog fluida promjenom tlaka i temperature kao i njegovo jednostavno uklanjanje iz dobivenog ekstrakta. Kao superkrični fluid najčešće se koristi ugljikov dioksid (CO_2) koji je netoksičan, nezapaljiv, neeksplozivan, nekorozičan, lako dostupan i jeftin, bez mirisa i boje, uz kritičnu temperaturu od $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ (Jokić i sur., 2011). Superkrična fluidna ekstrakcija je operacija prijenosa tvari bazirana na činjenici kako pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke tj. u superkričnom području gdje se fluid podvrgava tlaku i temperaturi blizu ili iznad kritične točke kako bi se poboljšala snaga otapanja mobilne faze (Aladić, 2015) (Slika 14).



Slika 14 Fazni dijagram (tlak-temperatura) za CO_2 (Jokić, 2011)

2.6.5.1. Superkritični CO₂

Otapalo poput superkritičnog CO₂ je zeleno i ekološko otapalo. Općenito se smatra potpuno sigurnim otapalom i ima oznaku GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*). Uzimajući u obzir posljedice klimatskih promjena kao što su globalno zagrijavanje i emisije stakleničkih plinova, potencijalno veće procesiranje CO₂ dovelo bi do njegove češće primjene u drugim industrijama, umjesto njegova otpuštanja u atmosferu. Superkritični CO₂ (SC-CO₂) pogodno je otapalo za ekstrakciju nepolarnih komponenti dok njegov veliki kvadrupolni moment također omogućava otapanje nekih umjereno polarnih komponenti. Također, veća je sposobnost za otapanje komponenata manje molekularne mase a manja sposobnost otapanja onih komponenata s većom molekularnom masom. Osim toga, superkritični CO₂ ima visok afinitet prema oksigeniranim organskim komponentama srednje molekularne mase. Proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli netopivi su u SC-CO₂. Moć otapanja stlačenog CO₂ može se objasniti kroz gustoću samog fluida. Gustoća CO₂ varira od 0,15 do 1,0 g/cm³ te se može modificirati izmjenom glavnih procesnih parametara, tlaka i temperature. Dodatkom polarnih kootapala poput etanola i metanola moguće je također izmijeniti polarnost superkritičnog fluida i povećati njegovu moć otapanja analita od interesa. Kootapalo svakako snažno djeluje sa topljivom supstancom povećavajući ujedno njezinu topljivost (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Kritična temperatura CO₂ ključna je za očuvanje termički osjetljivih bioaktivnih komponenata u ekstraktima te se može reći kako SFE svakako omogućuje selektivnu ekstrakciju kao i frakcionirano odvajanje željenih komponenata (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

2.6.5.1.1. Parametri koji utječu na SC-CO₂

Procesni parametri koji utječu na efikasnost superkritične CO₂ ekstrakcije su tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije, protok otapala, karakteristike otapala (gustoća, viskoznost i difuzivnost) te karakteristike uzorka (oblik, veličina čestica, raspodjela veličina čestica kao i poroznost čestica i sloja). Na proces ekstrakcije utječu i interakcije između otapala i matriksa kao i mogući dodatak kootapala (Reverchon i De Marco, 2006; Wang i Weller, 2006; Pourmortazavi i Hajimirsadeghi, 2007; Martinez, 2008).

Fluidima u superkritičnom stanju se malim promjenama tlaka i temperature mijenja sposobnost otapanja bez promjene njegova sastava. Na početku, tj. u prvoj fazi, efikasnost ekstrakcije ovisi o topljivosti komponenti u superkritičnom otapalu. Povećanjem tlaka a pri konstantnoj temperaturi, ta topljivost komponenti raste, što je izravno povezano s povećanjem gustoće superkritičnog fluida. Povećanje temperature pak izaziva smanjenje gustoće fluida te povećanje tlaka pare komponenti. Pri višim temperaturama i višim tlakovima također se povećava topljivost komponenti. „Prijelazni tlak“ (engl. „*Crossover pressure*“) je tlak pri kojem

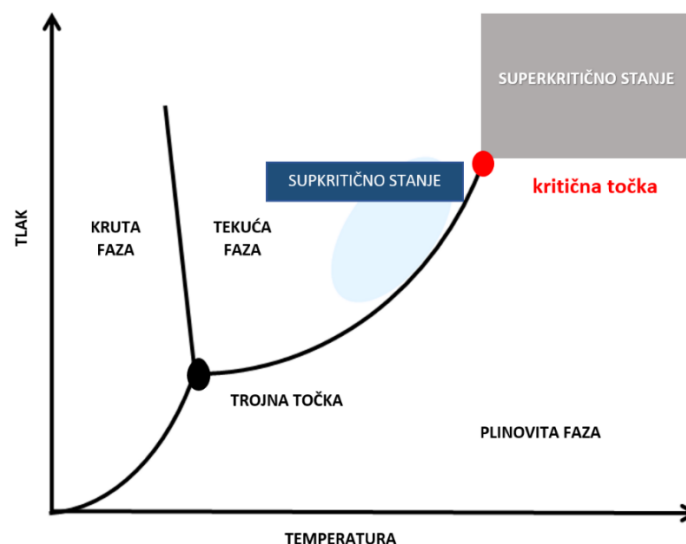
temperatura nema utjecaja na prinos ekstrakta te je karakterističan za svaku komponentu (efekt „temperaturna inverzija“). Na vrijednostima tlakova ispod prijelaznog tlaka, povećanjem temperature smanjuje se gustoća superkritičnog fluida kao i njegova sposobnost otapanja. Brzina druge faze ekstrakcije uvjetovana je brzinom difuzije što produžava trajanje procesa (Chimowitz i sur., 1988; Mukhopadhyay, 2001). Povećanjem protoka CO₂ povećava se prijenos mase no prevelikim protokom moguće je smanjenje prinosa zbog kraćeg vremena kontakta kao i nedovoljnog vremena za unutrašnju difuziju (Pavlič, 2017).

Na učinkovitost superkritične CO₂ ekstrakcije uvelike utječe i dodatak kootapala, koji se često dodaje u cilju promjene selektivnosti otapala (De Melo i sur., 2014) a čije uklanjanje kasnije može biti problem ako se radi o toksičnom organskom otapalu (Reverchon i De Marco, 2006). İçen i Gürü (2018), Kobori i sur. (2013) te Sökmen i sur. (2018) istakli su bolju topivost određenih bioaktivnih komponenti u superkritičnom CO₂ uz primjenu etanola kao kootapala s obzirom da etanol kao polarno otapalo bolje ekstrahira polarne komponente poput fenolnih. Osim što pretjerano usitnjeni materijal može dovesti do gubitka lakohlapivih komponenti (Reverchon i De Marco, 2006) dokazano je kako općenito veličina čestica ima znatan utjecaj na brzinu prijenosa tvari tijekom ekstrakcije. Usitnjavanjem materijala povećava se površina kontakta između krute tvari i otapala (u ovom slučaju CO₂) što pogoduje prijenosu tvari. Presitne čestice pak mogu težiti aglomeraciji čime se opet smanjuje učinkovitost same ekstrakcije te se u tom slučaju unutar ekstrakcijskog sloja formiraju kanali kroz koje prolazi otapalo, koje na kraju uopće ne dolazi u kontakt s materijalom koji se ekstrahira. Takvi slučajevi česta su pojava kod procesa superkritične ekstrakcije u industrijskom mjerilu (Jokić, 2011; Nikolovski 2009).

2.6.6. Ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju

Ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju (engl. *Subcritical Water Extraction* - SWE) zelena je tehnologija širokog spektra moguće primjene u preradi hrane i prirodnih proizvoda većinom zbog svojih jedinstvenih svojstava. Jeftina je te ekološki prihvatljivija, selektivnija i brža tehnika ekstrakcije od konvencionalnih metoda ekstrakcija. Nadalje, niža viskoznost te veće vrijednosti koeficijenta difuzije i toplinske vodljivosti pri supkritičnim temperaturama poboljšavaju prijenos mase i topline (Jokić i sur., 2018b). Voda je ekstremno polarno otapalo zbog čega se većinom koristi za ekstrakciju visokopolarnih komponenata. Nezapaljiva je i netoksična te ekološki prihvatljiva, lako dostupna i jeftina što ju čini prikladnom u proizvodnji sigurnih ekstrakata bez tragova toksičnih otapala. Velika polarnost i smanjena selektivnost slabo polarnih i nepolarnih komponenata glavni je nedostatak vode kao otapala koji se pak može prevladati povećanjem njezina tlaka i temperature (Brunner, 2014). Supkritična voda je voda na temperaturama iznad

svoje točke vrenja (100 °C) i ispod svoje kritične točke (374 °C) pri tlaku kod kojeg još uvijek ostaje u tekućem stanju (Ramos i sur., 2002). Pri tim uvjetima, voda postaje manje polarna te time i primjerenija kao zamjena organskim otapalima. Pri temperaturama iznad 374 °C i tlaku iznad 220 bara, voda se nalazi u superkritičnom stanju (Jokić i sur., 2018b) (Slika 15).



Slika 15 Fazni dijagram za vodu (Quitain i sur., 2015)

Supkritična voda je naime zbog svojih svojstava prikladna za ekstrakciju polarnih i nepolarnih komponenata. Povećanjem temperature vode smanjuje se njezina dielektrična konstanta, viskoznost, površinska napetost i gustoća. Smanjenjem površinske napetosti omogućuje se vlaženje materijala i otapanje ciljanih komponenata u kraćem vremenu. Smanjena viskoznost također poboljšava prodiranje unutar materijala pa tako i brzinu difuzije čime se također skraćuje vrijeme ekstrakcije (Plaza i Turner, 2015).

Primjena ekstrakcije supkritičnom vodom u današnje je vrijeme sve češća (Jokić i sur., 2018b; Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Prihvatljiva je tehnika ekstrakcije vrijednih komponenata poput aromatičnih tvari, fenola i antocijana te se zbog toga može svrstati u grupu efikasnih „zelenih“ procesnih tehnika u proizvodnji visoko vrijednih sastojaka. SWE selektivno može ekstrahirati različite komponente pa tako se pri nižim temperaturama ekstrahiraju polarnije komponente dok se pri višim temperaturama ekstrahiraju manje polarne komponente (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.6.6.1. Parametri koji utječu na SWE

Procesni parametri koji utječu na ekstrakciju vodom u supkritičnom stanju su temperatura, tlak, omjer tekuće/kruto, protok otapala, vrijeme ekstrakcije te veličina čestica (Pavlič, 2017). Porastom temperature, koja je jedan od ključnih parametara učinkovitosti ove vrste ekstrakcije, smanjuje se površinska napetost, viskoznost i dielektrična konstanta vode. Na taj način otapalo brže i bolje prodire u pore uzorka te ostvaruje brži prijenos mase. Također, moguća je ekstrakcija i nepoželjnih komponenata što dodatno otežava proces pročišćavanja ekstrakata. Na gornjim temperaturama samoga procesa moguće su degradacije određenih komponenti no to ovisi i o vremenu trajanja ekstrakcije (Carr i sur., 2011; Pavlič, 2017). Povišen tlak u kombinaciji s visokom temperaturom također utječe na bolje prodiranje otapala u pore matriksa i brži prijenos mase (Mustafa i Turner, 2011). Protok otapala utječe na proces samo kod polukontinuiranog tipa ekstrakcije vodom u supkritičnom stanju te se u tom slučaju povećanjem protoka dolazi do većih prinosa. Veći protoci nisu poželjni ako su željene komponente malih koncentracija (Güçlü-Üstündağ i Mazza, 2008). Vrijeme ekstrakcije ovisi i o drugim parametrima procesa. Kod šaržne SWE, dulje vrijeme ekstrakcije ne osigurava uvijek potpuno iskorištenje željenih komponenata. Također, vrijeme ekstrakcije kao parametar procesa često je povezano s temperaturom i prirodom uzorka, u ovisnosti o termolabilnosti željenih komponenata, a i povećanjem temperature skraćuje se vrijeme ekstrakcije (Rovio i sur., 1999). Naravno, što je manja veličina čestica uzorka veća je slobodna površina za prijenos mase iz čvrste u tekuću fazu što većinom dovodi do većih prinosa ekstrakcije. Kod šaržne SWE, presitne čestice mogu povećati viskozitet ekstrakta te otežati proces filtracije zbog mogućeg začepjenja pora filtera. Kod polukontinuirane SWE pak može doći do smanjenog protoka otapala kroz ekstraktor (Plaza i Turner, 2015). Omjer tekuće/kruto također je bitan procesni parametar kod ovog tipa ekstrakcije. Kod većih omjera tekuće/kruto potrebno je veću količinu vode zagrijati i stlačiti, što posljedično tome znatno povećava potrošnju tj. cijenu procesa. Zbog toga je od velike važnosti odrediti najniži mogući omjer tekuće/kruto a opet dovoljno visok kako bi pružio najveće moguće iskorištenje komponenti (Ravber i sur., 2015).

2.7. KONVENCIONALNE METODE EKSTRAKCIJE

Koncepti ekstrakcije datiraju još daleko u povijest ljudskoga vijeka tijekom kojega su važni prirodni sastojci ljekovitih kao i drugih ekonomski važnih biljaka bili podvrgnuti tretmanu maceracijom. Maceracija je unatoč pratećim nedostacima poput neučinkovitog iskorištenja željenih sastojaka te dugotrajnosti samoga procesa ostala popularna sve do pojave Soxhletovog ekstraktora potkraj 17.-og stoljeća. Soxhlet ekstrakcija (SE) se posljedično tome

počinje široko primjenjivati u različitim sektorima poput zaštite okoliša, farmaciji, proizvodnji hrane, kemijskoj i agro- industriji te mnogim drugima. Unatoč brojnim nedostacima ova metoda ostaje relevantna kao najbolji izbor za ekstrakciju komponenata iz čvrstih uzoraka. Na slični način i konvencionalna tehnika ekstrakcije tekuće/tekuće također zadržava „*status quo*“ poput SE i to prvenstveno zbog svoje jednostavnosti, jeftinih troškova aparature kao i zbog kontinuirane višestupne ekstrakcije. Ova konvencionalna metoda ekstrakcije nadasve se koristi pri pročišćavanju antibiotika, prirodnih produkata, dragocjenih metala, proteina i ugljikovodika i sl. (Daso i Okonkwo, 2015). Hidrodestilacija kao konvencionalna tehnika ekstrakcije izdvaja hlapivu frakciju, ne koristi organska otapala i obično traje 6 do 8 sati. Uključuje glavne fizikalno-kemijske procese: hidrodifuziju, hidrolizu i raspad prilikom primjene visokih temperatura što ograničava samu primjenu ove metode (Bromberger Soquetta i sur., 2018). Učinkovitost bilo koje konvencionalne metode ekstrakcije ovisi o izboru otapala (Selvamuthukumaran i Shi, 2017).

2.7.1. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija standardna je tehnika ekstrakcije već više od jednog stoljeća i metode bazirane na njoj primarne su reference na temelju kojih se mjeri učinkovitost novonastalih metoda (López-Bascón i Luque de Castro, 2019). To je kruto/tekuća ekstrakcija čiji princip se temelji na kontinuiranom prijenosu analita od interesa iz krutog uzorka u odgovarajuće organsko otapalo pri visokoj temperaturi procesa (Daso i Okonkwo, 2015). Ova klasična konvencionalna metoda ekstrakcije prošla je i različite modifikacije kako bi se približila novijim tehnikama ekstrakcije i to skraćivanjem vremena ispiranja, upotrebom dodatnih energija te automatizacijom procesa. Najveći nedostaci SE su:

- Dugo trajanje procesa ekstrakcije
- Uporaba toksičnih organskih otapala
- Visoka temperatura
- Nemogućnost mućkanja prilikom ekstrakcije što bi uvelike skratilo proces
- Poslije ekstrakcije potrebno je izvršiti i korak otparavanja tj. koncentriranje uzorka
- Tehnika je ograničena na selektivnost otapala (López-Bascón i Luque de Castro, 2019)

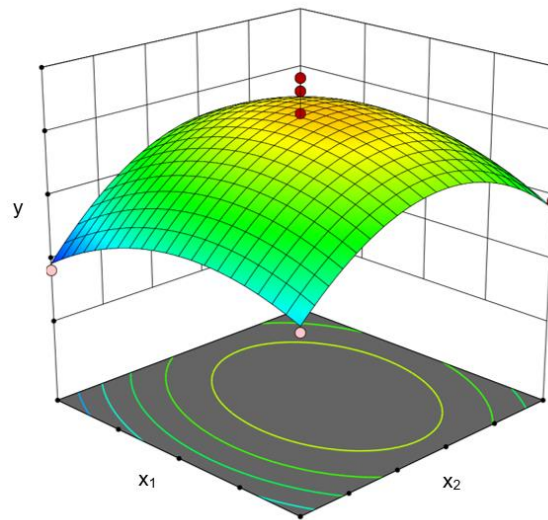
Prirodni lijekovi davno prije bili su jedina opcija u prevenciji i liječenju bolesti i to tisućama godina. Količine bioaktivnih prirodnih sastojaka u takovim lijekovima uvijek su bile i ostale prilično male te je u današnje vrijeme presudno razvijati učinkovite i selektivne metode njihove ekstrakcije i izolacije prvenstveno zbog potreba potrošača kao i njegove sigurnosti te sigurnosti okoliša (Zang i sur., 2018). Tradicionalne metode pokazale su se dugotrajnima i nedovoljno

ekološkim u odnosu na alternativne zelene moderne ekstrakcije koje nastoje biti brze, ekonomične, održive i ekološki prihvatljive (Ameer i sur., 2017). Međutim, ne postoji univerzalna ekstrakcijska metoda koja bi bila idealna za svaki polazni materijal i svaki analit već je svaka po sebi jedinstvena te ovisi o brojnim parametrima koje je potrebno optimirati (Azwanida, 2015).

2.8. OPTIMIZACIJA PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Optimizacija se u analitičkoj kemiji koristi kako bi se pronašli najprikladniji procesni uvjeti za određenu metodu a koji mogu dati najbolje tražene rezultate. Pri optimizaciji se prati utjecaj jednog parametra u vremenu na eksperimentalni odziv gdje je jedan parametar podložan promjeni dok su ostali konstantni. U tu se svrhu koriste multivarijantne statističke tehnike a jedna od najvažnijih je metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Metodology - RSM*). To je skup matematičkih i statističkih tehnika temeljenih na polinomialnoj jednadžbi dobivenoj iz eksperimentalnih podataka koji bi trebali opisati ponašanje skupa podataka s ciljem izrade statističkih vizija. Cilj je istodobno optimizirati razine tih varijabli kako bi se postigla najbolja učinkovitost sustava (Bezerra i sur., 2008). S obzirom da na kemijske i biokemijske procese utječu brojni parametri, nije ih moguće baš sve identificirati, no potrebno je odabrati one koji imaju najveći utjecaj (Bas i Boyaci, 2007). Optimizacija je inače osnovno sredstvo u inženjerskim procesima vezanim uz hranu čiji produktivni rad daje vrijedan i prihvatljiv proizvod (Aladić i sur., 2015). U današnje je vrijeme RSM široko primjenjiva metoda u kemijskim i biokemijskim procesima za različite svrhe te dijeli optimizaciju na tri faze. Prva, preliminarna faza, uključuje određivanje nezavisnih parametara i njihovih razina. Druga faza je odabir eksperimentalnog dizajna uz predviđanje i verifikaciju modela jednadžbe a posljednja je faza izrada trodimenzionalnih odzivnih površina kao funkcija nezavisnih parametara uz određivanje optimalnih točaka. Trodimenzionalna odzivna površina prikazuje vezu između odziva i nezavisnih varijabli. Dok klasične metode zahtijevaju puno vremena i izradu velikog broja eksperimenata kako bi se shvatio sustav, RSM nudi veliki broj informacija kroz malo eksperimenata. Kroz RSM je moguće promatrati međusobnu interakciju neovisnih parametara na odziv. Ipak, RSM metoda nije primjenjiva na sve kemijske i biokemijske procese bez ograničenja već se koristi za promatranje promjena koje se mogu opisati preko polinomne jednadžbe drugoga reda (Bas i Boyaci, 2007). Odgovarajući odabir RSM dizajna kao i neovisne varijable i razine faktora značajno utječu na učinkovitost ove metode (Yolmeh i Jafari, 2017). Primarno je dobiti odnos nezavisnih varijabli koje utječu na zavisnu varijablu preko odzivne funkcije i shvatiti na koji način članovi modela tj. ulazni faktori utječu na promatrani

odziv. Odabirom odgovarajućeg dizajna eksperimenta definiraju se eksperimenti koji će se provesti u ispitivanom eksperimentalnom području. Dizajn eksperimenta je tzv. matrica plana pokusa koja određuje sve kombinacije za provedbu pokusa te daje kontinuiranu površinu koja spaja visine izmjerenih vrijednosti tj. odzivnu površinu. Odzivna funkcija opisuje odzivnu površinu (**Slika 16**) i prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama kao i njihovim interakcijama. Svako odzivnoj funkciji moguće je pridružiti odgovarajući polinom i izračunati koeficijente jednadžbe (Aladić, 2015).



Slika 16 Primjer prikaza odzivne površine

Nadalje, kod odabira plana pokusa cilj je uz minimalni utrošak resursa odlučiti se za onaj koji će dovoljno dobro opisati promatranu pojavu pa je to ujedno i osnovni problem eksperimentiranja. Literatura predlaže već postojeće algoritme koji nude rješenje problema okvirnog odabira modela plana pokusa oslanjajući se na prirodu pojave koja se promatra i želi opisati (Aladić, 2015; Bas i Boyaci, 2007). Najčešći oblici plana pokusa su:

- Centralno kompozitni plan pokusa (engl. *Central composite design, CCD*);
- Plošno centrirani kompozitni plan (engl. *Face centred composite design, CCF*);
- Faktorijalni plan pokusa (engl. *Full factorial design, FFD*);
- Doehlert pokus (engl. *Doehlert design, DD*).

Navedeni planovi pokusa razlikuju se obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka te razinu ispitivanih varijabli (Bezzer, 2008). Odabir plana pokusa ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Plan pokusa za modele prvog reda koristi se samo u slučajevima kada se eksperimentalne vrijednosti međusobno zavisnih varijabli mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo

ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije (npr. faktorijalni dizajn) (Myers i Montgomery, 1995).

Međutim za aproksimaciju nelinearnih eksperimentalnih podataka koristi se plan pokusa za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su: trofaktorijalni plan pokusa na tri razine, Box-Behnken-ov plan pokusa i centralno kompozitni plan pokusa. Takvi modeli daju funkcionalnu zavisnost mjerene varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama te njihovoj interakciji, kao i informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma) (Bezerra i sur., 2008).

2.8.1.Box-Behnkenov plan pokusa

Box-Behnken plan pokusa (engl. *Box-Behnken design - BBD*), detaljno objašnjen u radu autora Bas i Boyaci (2007), korišten je za određivanje optimalnih procesnih uvjeta za sve zelene tehnike ekstrakcije u ovoj disertaciji. Nezavisne varijable (X_i, X_j, \dots) ispitivane su kako bi se optimizirao proces ekstrakcije u smislu dobivanja većih količina željenih bioaktivnih komponenata u ekstraktima uz što manji broj pokusa. Eksperimentalni podaci usklađeni su modelom odzivnih površina drugog reda prema jednadžbi (1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \dots \quad (1)$$

gdje su:

Y – modeli predviđene odzivne funkcije (metilksantini, fenolne komponente, ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijska aktivnost u dobivenim ekstraktima kakaove ljuske)

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

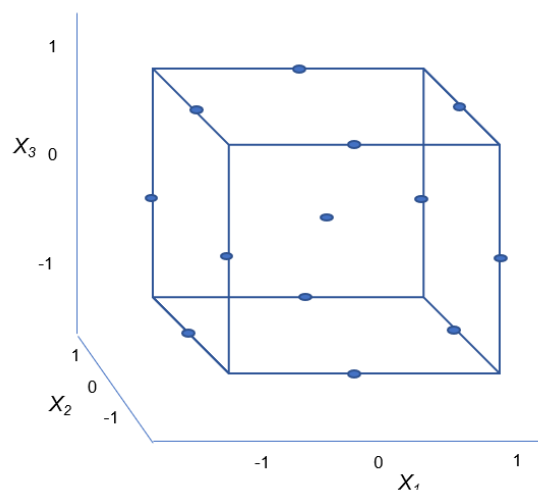
β_i – koficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

X_i i X_j - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti određene tehnike ekstrakcije)

Slika 17 prikazuje BBD plan pokusa koji predlaže odabir točaka eksperimenta kod ispitivanja utjecaja više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenta matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn efikasan je i učinkovit jer pruža mogućnost ispitivanja od čak tri do deset varijabli.



Slika 17 Box Behnken plan pokusa (Yolmeh i Jafari, 2017)

Osnovne karakteristike BBD dizajna zahtjevaju broj eksperimenata prema sljedećoj jednadžbi (2):

$$N = 2k(k - 1) + c_p \quad (2)$$

gdje su:

k – broj faktora

c_p – broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki.

Nužno je također sve razine faktora svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina.

2.9. KROMATOGRFSKE TEHNIKE U ANALIZI EKSTRAKATA

Kromatografske tehnike služe za odjeljivanje komponenata smjese te za njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Komponente smjese odjeljuju se ovisno o brzinama kojom ih tekuća odnosno plinska mobilna faza provodi kroz kolonu stacionarne faze. Kod izbora metode za određivanje nekog sastojka u smjesi, potrebno je imati i saznanje o prisutnosti drugih elemenata/spojeva prisutnih u tom uzorku. Literatura često ne pruža metode specifične za analiziranu vrstu uzoraka te izbor ovisi o procjeni analitičara. Ako postojeći postupci nisu primjenjivi na uzorak od interesa, potrebno je razmotriti mogućnost modifikacije metode, a ponekad nužno i razviti potpuno novu metodu. Pri tom treba uzeti u obzir sva kemijska i fizikalna svojstva analita (Skoog i sur., 1999). Postoji više vrsta podjela kromatografije dok se tehnike kromatografije mogu podijeliti na visoko djelotvornu/tlačnu tekućinsku kromatografiju, plinsku kromatografiju, kromatografiju na papiru, kromatografiju na koloni i tankoslojnu kromatografiju (Luxminarayan i sur., 2017).

Visoko djelotvorna/tlačna tekućinska kromatografija (engl. *High pressure Liquid chromatography* – HPLC) modernija je verzija tekućinske kromatografije (engl. - *Liquid Chromatography* - LC) koja zbog primjene visokog tlaka koristi kraće kolone, čime je analiza ujedno i brža. Tehnika je vrlo osjetljiva te koristi specifične detektore koji mogu odrediti nanogramske, pikogramske pa čak i femtogramske koncentracije. Ne postoji univerzalni detektor za ovakve vrste analiza već se zavisno od željene komponente uvijek koristi onaj najprikladniji (Dong, 2006). Izbor detektora ovisi o prirodi uzorka te se najčešće temelji na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja. Prednost detektora niza dioda (engl. *Diode Array Detector* – DAD) je mogućnost istodobnog promatranja više valnih duljina čime je omogućena spektroskopija velikih brzina (Skoog i sur., 1999).

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography* – GC) instrumentalna je analitička metoda odjeljivanja komponenata smjese u kojoj je mobilna faza inertni plin koji eluira komponente smjese iz kolone napunjene stacionarnom fazom (Skoog i sur., 1999). Jedan od najčešćih detektora koji se koriste u plinskoj kromatografiji je plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector* – FID). Osim velike osjetljivosti te velikog raspona linearnog odziva, jednostavne je izvedbe te je s njime iznimno lako rukovati. Primjenjuje se u identifikaciji organskih spojeva koji sagorjevaju na temperaturi plamena vodik/zrak uslijed čega dolazi do stvaranja ionskih međuspojeva i elektrona. Sabirna elektroda privlači nabijene analite a struja nastalih iona ih pojačava i bilježi (Skoog i sur., 1999).

2.9.1. Validacija kromatografskih metoda

Validirati metodu znači provjeriti tj. dokazati i potvrditi da je ona prikladna za određenu namjenu. Prije izvođenja same validacije potrebno je napraviti njezin protokol koji će olakšati izvedbu mjerenja. Cilj provođenja postupka validacije metoda, da li razvijenih u laboratoriju ili normiranih, je osigurati pouzdanost i vjerodostojnost analitičkih rezultata proizašlih iz mjerenja, kao i komparabilnost dobivenih rezultata. Validacija analitičke metode sastoji se od praćenja određenih parametara koji bi mogli utjecati na rezultat i time ugroziti njihovu točnost. Potrebno je sastaviti organizacijski protokol validacije, izvesti mjerenja te rezultate dokumentirati u izvješću validacije. Sirove podatke mjerenja također je potrebno pohraniti jer su oni dokazni materijal sljedivosti podataka. Za bilo koji osnovni rad, određivanje ili izdavanje rezultata, bitno je izvršiti validaciju ili barem djelomičnu validaciju pojedinog parametra i te podatke također pohraniti kao izvješće. Izvješće validacije mora sadržavati bitne informacije do kojih se dolazi slijedeći propisane parametre validacije, što osigurava pouzdan rezultat. Parametri validacije uključuju specifičnost/selektivnost, linearnost, područje linearnosti, preciznost, točnost, robustnost metode kao i granice detekcije i kvantifikacije. Protokolom validacije određuju se

ključni parametri kao i određenim kriterijima prihvatljivosti koje određuje analitičar s obzirom na zahtjeve pojedine metode. Postupak validacije ili djelomičnu validaciju potrebno je ponoviti i revalidirati nakon izmjena u metodi rada (npr. promjena tipa kolone, aparata, pomicanja aparata s jednog mjesta na drugo) i to prema procjeni analitičara. U slučaju pojave većih odstupanja u očitavanju standarda od zahtjeva pojedine metode, preporuke su vezane za provjeru parametara prikladnosti sustava. Svaka laboratorijska metoda kojom se određuje traženi analit u određenom uzorku treba biti validirana s procijenjenom mjernom nesigurnošću što znači da je prikladna za postojeću namjenu, potvrđena, te da osigurava dobre i prihvatljive rezultate. Svaki zaključak o validiranoj metodi mora biti dokumentiran i pratiti sljedivost kako bi se u svakom trenutku mogla dokazati valjanost dobivenih rezultata ([HMD, 2006](#)).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- Prikupljanje uzoraka: kakaova ljuska nabavljena je iz tvornice Kandit d.o.o. (Osijek).
- Priprema materijala za ekstrakciju - usitnjavanje uzoraka s ciljem povećanja površine uzorka (POLYMIXR LAB MILL PX-MFC 90 D, KINEMATICA GmbH).
- Klasiranje prosijavanjem na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200, Njemačka); utvrđivanje raspodjele veličine čestica.
- Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom standardne Soxhlet metode.
- Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske potpomognuta ultrazvukom uz pomoć ultrazvučne kupelji. Ispitivanje utjecaja parametara ekstrakcije (temperature, vremena ekstrakcije, snage ultrazvuka i omjera tekuće/kruto) na udio bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima.
- Provedba probira sa 16 različitih eutektičkih smjesa na bazi kolin-klorida za pronalazak odgovarajuće eutektičke smjese za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske pomoću izabranog eutektičkog otapala te ispitivanje utjecaja parametara ekstrakcije (udjela vode u eutektičkoj smjesi, vremena ekstrakcije i temperature) na udio bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima.
- Ekstrakcija eutektičkim otapalima bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske potpomognuta mikrovalovima te ispitivanje utjecaja parametara ekstrakcije (udjela vode u eutektičkoj smjesi, vremena ekstrakcije i temperature) pri konstantnoj snazi mikrovalova na udio bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima.
- Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem te ispitivanje utjecaja parametara ekstrakcije (vremena ekstrakcije, omjera tekuće/kruto i frekvencije) na udio bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima.
- Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske s CO₂ u superkričnom stanju te ispitivanje utjecaja parametara ekstrakcije (tlaka, temperature, vremena ekstrakcije) na udio bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima.

- Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske vodom u supkritičnom stanju te ispitivanje utjecaja parametara ekstrakcije (temperature, vremena ekstrakcije i omjera tekuće/kruto) na udio bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima.
- Razvoj prikladne HPLC metode za određivanje ciljanih bioaktivnih komponenata u ekstraktima kakaove ljuske.
- Identifikacija i kvantifikacija metilksantina (teobromina, teofilina i kofeina), fenolnih komponenti (galne kiseline, epikatehina, epigalokatehina, katehina, klorogenske kiseline, kafeinske kiseline i vanilina) te 5-HMF-a u dobivenim ekstraktima kakaove ljuske primjenom visoko djelotvorne/tlačne tekućinske kromatografije sa detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD).
- Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina u ekstraktima dobivenim superkritičnim CO₂ i Soxhlet metodom pomoću plinske kromatografije sa plameno-ionizacijskim detektorom (GC - FID).
- Određivanje ukupnog fenolnog sadržaja te antioksidacijske aktivnosti dobivenih ekstrakata primjenom spektrofotometrijskih metoda.
- Statistička obrada eksperimentalno dobivenih podataka i optimizacija odabranih inovativnih tehnika ekstrakcija primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa *Design Expert*[®].

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Kakaova ljuska

Uzorak kakaove ljuske (**Slika 18**) nabavljen je iz tvornice Kandit d.o.o. (Osijek) u lipnju 2017. godine. Kakaovac koji se koristi pri proizvodnji čokolade nabavlja se iz Gane i Obale Bjelokosti te pristiže u tvornicu u jutenim vrećama od 62 kg te prije prerade prolazi kontrolu kvalitete. Nakon čišćenja kakaovog zrna od vanjskog sloja zrna i neželjenih nečistoća kakaovo zrno se prži na temperaturama od 132-135 °C što dovodi do nastanka specifične arome. Slijedi drobljenje u drobilici gdje se odvaja kakaova ljuska i klica od jezgre kakaovog zrna.



Slika 18 Kakaova ljuska korištena u istraživanju

3.2.2. Kemikalije i standardi

Kod pripreme uzoraka za analizu korišteni su:

- demineralizirana voda iz sustava za obradu vode nanofiltracijom/reverznom osmozom, Enviro Tech d.o.o. (Kikinda, Srbija)
- Ultračista Millipore voda, 0,054 $\mu\text{s}/\text{cm}$ iz aparata Simpapak®, Simplicity 185 (Molsheim, Francuska).

Za određivanje sastava masnih kiselina korištena je smjesa estera masnih kiselina: Supelco™ 37 Component FAME Mix (engl. FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*) (Bellefonte, Pennsylvania, SAD).

Za superkritičnu CO₂ ekstrakciju korišten je CO₂ čistoće 99,97%, proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).

Za pripremu eutektičkih smjesa korišteni su:

- Kolin-klorid, $\geq 99\%$, Acros Organics (Belgija)
- Acetamid, $\sim 99\%$, čisti, Acros Organics (Belgija)
- Butan-1,4-diol, 99%, Acros Organics (Belgija)
- Etan-1,2-diol, 99,5%, Carlo Erba Reagents (Španjolska)
- D - Fruktaza, p.a., Gram mol d.o.o. (Hrvatska)
- Glicerol, 99,5%, Gram mol d.o.o. (Hrvatska)
- D(+)-Glukoza, bezvodna, p.a., Gram mol d.o.o. (Hrvatska)

- Jabučna kiselina, 99%, Acros Organics (Belgija)
- Ksilitol, ≥99%, Acros Organics (Belgija)
- Levulinska kiselina, ≥98%, Acros Organics (Belgija)
- Limunska kiselina monohidrat, p.a., T.T.T. d.o.o. (Hrvatska)
- Malonska kiselina, 99% (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Mliječna kiselina, 88%, T.T.T. d.o.o. (Hrvatska)
- Oksalna kiselina, bezvodna, 98%, Acros Organics (Belgija)
- Sorbitol, Fischer Scientific (Velika Britanija)
- Urea, p.a., Gram mol d.o.o. (Hrvatska)
- L(+)-Vinska kiselina, Fischer Scientific (Velika Britanija).

Pri HPLC analizi korištena su:

- Organska otapala HPLC čistoće (mravlja kiselina, metanol, acetonitril) kupljena od proizvođača Baker J.T. (Milano, Italija)
- Teobromin, 10 mg, 99,6% čistoće, ChromaDex (SAD)
- Kofein, 0.25 g, 99.8% čistoće, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka)
- Teofilin, čistoće 99%, Acros Organics (Geel, Belgija)
- Galna kiselina, 250 g, čistoće 99%, Merck (Njemačka)
- Klorogenska kiselina, čistoće 97,2%, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka)
- Epigalokatehin, 5 mg, Merck (Njemačka)
- Kafeinska kiselina, ≥98,0% HPLC, Merck (Njemačka)
- Vanilin, 98%, Merck (Njemačka)
- Katehin, 99% čistoće, Merck (Njemačka)
- Epikatehin, 10 mg, 97% čistoće, Merck (Njemačka)
- 5-Hidroksimetilfurfural, 1 g, 98% čistoće, Acros Organics™ (Belgija).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode korišten je DPPH (1,1 – difenil –pikrilhidrazil) dobavljen od proizvođača Sigma Aldrich (SAD).

Za određivanje ukupnog fenolnog sadržaja korišteni su:

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.o.o. (Hrvatska)
- Na₂CO₃, Gram-mol d.o.o. (Hrvatska).

3.3. METODE

3.3.1. Priprema uzorka za ekstrakciju

Prije provođenja procesa ekstrakcije uzorak kakaove ljuske se usitnio na laboratorijskom mlinu IKA A11 Basic s ciljem povećanja površine uzorka. Klasiranje usitnjenog uzorka prosijavanjem provelo se na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200, Njemačka) kako bi se utvrdila raspodjela veličine čestica te odredio srednji promjer čestica (d) a koji je izračunat prema jednadžbi (3) (Vidović, 2011):

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right) \quad (3)$$

gdje su: d – srednji promjer čestica; m_i – maseni udio i -te frakcije (%); d_i – srednji promjer i -te frakcije (mm)

3.3.2. Ispitivane tehnike ekstrakcije

3.3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske potpomognuta ultrazvukom rađena je na ultrazvučnoj kupelji ELMA, Elmasonic P 120 H (Elma Schmidbauer GmbH, Njemačka). Nakon usitnjavanja i odvage 1 g kakaove ljuske, pripremile su se različite koncentracije uzoraka za ekstrakciju uz dodatak vode kao otapala.

U **Tablici 2** prikazane su kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Ekstrakcija je provedena pri frekvenciji 37 kHz u *sweep modu* za homogenu raspodjelu ultrazvučnih valova unutar vodene kupelji. Provedeno je dvadesetdevet eksperimenata, uključujući pet ponavljanja, prema RSM metodi i BBD planu pokusa a ispitivao se utjecaj temperature, vremena ekstrakcije, omjera tekuće/kruto te snage ultrazvuka na iskorištenje bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima kakaove ljuske. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prikazani su u **Tablici 3**. Pri završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani te se filtrat koristio u daljnjim analizama.

Tablica 2 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (+1)
Temperatura (°C)	X_1	40	60	80
Vrijeme (min)	X_2	30	60	90
Omjer tekuće/kruto (mL/g)	X_3	10	30	50
Snaga (%)	X_4	30	50	70

Tablica 3 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske potpomognute ultrazvukom prema BBD

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (mL/g)	Snaga (%)
1	40	60	30	30
2	60	90	30	70
3	40	60	10	50
4	40	90	30	50
5	60	60	30	50
6	40	60	30	70
7	60	90	10	50
8	80	60	30	70
9	60	60	30	50
10	60	30	30	70
11	40	60	50	50
12	80	90	30	50
13	60	60	30	50
14	60	60	50	30
15	60	60	30	50
16	60	60	50	70
17	60	30	10	50
18	40	30	30	50
19	60	30	30	30
20	60	60	10	70
21	60	90	30	30
22	80	30	30	50
23	60	90	50	50
24	60	60	30	50
25	80	60	50	50
26	80	60	30	30
27	60	60	10	30
28	60	30	50	50
29	80	60	10	50

3.3.2.2. Ekstrakcija eutektičkim otapalima

Šesnaest različitih smjesa eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida pripremljene su za potrebe probira (engl. „*screening*“) kako bi se odabrala najpogodnija smjesa za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske. Pri tome se kolin-klorid kao akceptor vodika (engl. „*hydrogen bond acceptor*“ - HBA) kombinirao s različitim donorima vodika (engl. „*hydrogen bond donor*“ - HBD) kako je prikazano u **Tablici 4**. Eutektičke smjese pripremljene su miješanjem i zagrijavanjem na temperaturi do 80 °C kroz sat vremena do nastanka prozirne tekućine te su se kao takve koristile u daljnjim eksperimentima (**Slika 19**).

Za potrebe probira, u mikroeprevetu je odvagano 50 mg usitnjene kakaove ljuske te dodano 1 mL pripremljenog otapala (10% ili 50% H₂O/DES smjese). Ekstrakcije su provedene pri 50 °C tijekom 60 minuta uz miješanje nakon čega su ekstrakti centrifugirani i odekantirani te se ekstrakt koristio za daljnje analize. U **Tablici 5** prikazane su kodirane i nekodirane razine

nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije eutektičkim otapalima. Nadalje, nakon što je odabrana najpogodnija eutektička smjesa za ovu vrstu ekstrakcije (kolin-klorid-oksalna kiselina i voda), provedeno je sedamnaest eksperimenata, uključujući pet ponavljanja, prema RSM metodi i odabranom BBD planu pokusa (**Tablica 6**). Nakon usitnjavanja kakaove ljuske, odvagano je 50 mg uzorka te je dodano 1 mL pripremljenog odabranog DES otapala s različitim udjelima H₂O. Ispitivao se utjecaj temperature, vremena ekstrakcije te omjer udjela vode u eutektičkim smjesama na iskorištenje bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima.

Tablica 4 Lista DES otapala korištenih za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske

RB	Skaćenica	Komponente		Molarni omjer (HBA:HBD)
		HBAs	HBDs	
1.	ChCl-AA	Kolin-klorid	Acetamid	1:2
2.	ChCl-BD		Butan-1,4-diol	1:2
3.	ChCl-EG		Etan-1,2-diol	1:2
4.	ChCl-Fru		Fruktoza	1:1
5.	ChCl-Gly		Glicerol	1:2
6.	ChCl-Glu		Glukoza	1:1
7.	ChCl-MA		Jabučna kiselina	1:1
8.	ChCl-Xy		Ksilitol	1:1
9.	ChCl-LeA		Levulinska kiselina	1:1
10.	ChCl-CA		Limunska kiselina	1:2
11.	ChCl-Mal		Malonska kiselina	1:1
12.	ChCl-LA		Mliječna kiselina	1:1
13.	ChCl-OA		Oksalna kiselina	1:1
14.	ChCl-Sor		Sorbitol	1:1
15.	ChCl-U		Urea	1:2
16.	ChCl-TA		Vinska kiselina	1:1

AA-Acetamid; BD-Butan-1,4-diol; EG-Etan-1,2-diol; Fru-Fruktoza; Gly-Glicerol; Glu-Glukoza; MA-Jabučna kiselina; Xy-Ksilitol; LeA-Levulinska kiselina; CA-Limunska kiselina; Mal-Malonska kiselina; LA-Mliječna kiselina; OA-Oksalna kiselina; Sor-Sorbitol; U-Urea; TA-Vinska kiselina



Slika 19 Priprema eutektičke smjese kolin-klorid-oksalna kiselina (lijevo), ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske u različitim udjelima eutektičkog otapala i vode (desno)

Tablica 5 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije eutektičkim otapalima

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (+1)
Temperatura (°C)	X_1	30	60	90
Vrijeme ekstrakcije (min)	X_2	5	10	15
Udio vode (%)	X_3	10	30	50

Tablica 6 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom eutektičkog otapala (kolin-klorid-oksalna kiselina i voda) prema BBD

Broj eksperimenta	T (°C)	t (min)	udio vode (%)
1	90	15	30
2	60	10	30
3	60	10	30
4	90	10	10
5	60	15	50
6	90	5	30
7	60	5	10
8	60	10	30
9	60	10	30
10	60	10	30
11	60	5	50
12	60	15	10
13	30	10	10
14	90	10	50
15	30	15	30
16	30	5	30
17	30	10	50

3.3.2.3. Ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima

Za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske eutektičkim otapalima potpomognutu mikrovalovima (engl. *Deep Eutectic Solvent Extraction Coupled With Microwave Extraction – DES/MAE*) primjenila se najpogodnija DES smjesa kolin-klorid:oksalna kiselina (1:1), dobivena probirom 16 različitih eutektičkih smjesa (poglavlje 3.3.2.2.).

Korišteni mikrovalni uređaj za ekstrakciju i sintezu koristi ukupnu snagu duplog magnetrona od 1900 W što ujedno i omogućuje jednakomjernu raspodjelu snage. Uređaj pruža mogućnost odabira kontinuirane ili pulsne mikrovalne emitirane snage u rasponu od 0 do 1800 W. Rotor uređaja je podijeljen po segmentima sa 15 pozicija za *PTFE* (politetrafluoroetilen) posude

volumena od 100 mL koji su prilagođeni za rad na temperaturama do 300 °C. Uređaj također sadrži senzor za direktnu kontrolu i praćenje temperature u referentnoj posudi s prikazom u realnom vremenu i mogućnošću bilježenja podataka. Sustav se kontrolira preko softverski vođenog kontrolera osjetljivog na dodir.

Odvagano je 500 mg usitnjene kakaove ljske u visokotlačnu posudu mikrovalnog ekstraktora uz dodatak 10 mL otapala (10, 30 ili 50% H₂O/DES smjese). U **Tablici 7** prikazane su kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije eutektičkim otapalima potpomognute mikrovalovima. Svi eksperimenti provedeni su pri identičnim uvjetima kao i ekstrakcija eutektičkim otapalima uz miješanje (3.3.2.2.) što je prikazano u **Tablici 8**. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljske eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima odrađena je u mikrovalnom ekstraktoru (Milestone flexiWAVE, Italija) (**Slika 20**), a ispitan je utjecaj temperature, vremena ekstrakcije i udjela vode na iskorištenje bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima. Nakon provedene ekstrakcije, uzorci su centrifugirani i odekantirani te se dekant koristio za daljnje analize.



Slika 20 Mikrovalni ekstraktor (Milestone flexiWAVE, Italija)

Tablica 7 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije eutektičkim otapalima potpomognute mikrovalovima

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (+1)
Temperatura (°C)	X ₁	30	60	90
Vrijeme ekstrakcije (min)	X ₂	5	10	15
Udio vode (%)	X ₃	10	30	50

Tablica 8 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske eutektičkim otapalima potpomognute mikrovalovima* prema BBD

Broj eksperimenta	T (°C)	t (min)	udio vode (%)
1	90	15	30
2	60	10	30
3	60	10	30
4	90	10	10
5	60	15	50
6	90	5	30
7	60	5	10
8	60	10	30
9	60	10	30
10	60	10	30
11	60	5	50
12	60	15	10
13	30	10	10
14	90	10	50
15	30	15	30
16	30	5	30
17	30	10	50

*Sve ekstrakcije su provedene pri konstantnoj snazi mikrovalova od 600 – 800 W

3.3.2.4. Ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja provedena je na novokonstruiranom uređaju (SFE Systems Ltd., Osijek) na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek (**Slika 21**) a ispitivani su utjecaj omjera tekuće/kruto, frekvencije te vremena ekstrakcije na iskorištenje bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima prema RSM metodi i BBD planu pokusa. Novokonstruirani uređaj za generiranje visokonaponskog električnog pražnjenja sastoji se od šest komponenti:

- Visokonaponskog generatora koji je ujedno i izvor visokog napona od 30 kV te maksimalnog iznosa struje 10 mA. Snaga generatora maksimalno iznosi 120 W dok je napon istosmjernan.
- Spremnika energije gdje se skladišti energija koja se kasnije prazni u obliku izboja unutar komore. Kondenzator omogućava skladištenje energije a ovisno o njegovom kapacitetu i naponu moguće je odrediti količinu energije koja je skladištena.
- Visokonaponske sklopke koja osigurava pražnjenje spremnika energije (kondenzatora) u komoru, u određenom intervalu.
- Komore koja sadrži uzorak koji se tretira.
- Automatike koja osigurava rad uređaja bez nadzora i potrebe za ručnim upravljanjem.

- Upravljača pomoću kojega je omogućeno upravljanje uređajem sa sigurne udaljenosti. Sastoji se od tipki za pokretanje zaustavljanje kao i tipki za podešavanje frekvencije i vremena trajanja procesa.

Nakon usitnjavanja kakaove ljuske, odvagano je 1 g uzorka te je dodana voda u različitim omjerima kako bi se pripremile različite koncentracije uzorka za ekstrakciju. U **Tablici 9** prikazane su kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja. Pripremljeni uzorak položio se u uređaj za generiranje visokonaponskog električnog pražnjenja te je provedena ekstrakcija pri uvjetima prikazanim u **Tablici 10**. Nakon provedene ekstrakcije uzorak se filtrirao, te se ekstrakt koristio za daljnje analize.



Slika 21 Uređaj za generiranje visokonaponskog električnog pražnjenja (SFE Systems Ltd.)

Tablica 9 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (+1)
Omjer tekuće/kruto (mL/g)	X_1	10	30	50
Frekvencija (Hz)	X_2	40	70	100
Vrijeme (min)	X_3	30	60	90

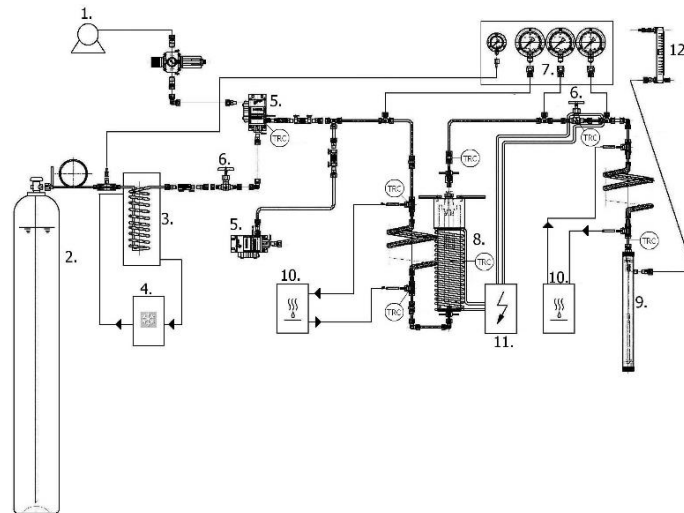
Tablica 10 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja prema BBD

Broj eksperimenta	Omjer tekuće/kruto (mL/g)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme (min)
1	30	40	30
2	30	70	60
3	30	70	60
4	30	100	30
5	30	70	60
6	30	70	60
7	30	70	60
8	50	40	60
9	30	100	90
10	50	100	60
11	10	40	60
12	10	100	60
13	30	40	90
14	50	70	30
15	50	70	90
16	10	70	90
17	10	70	30

3.3.2.5. Ekstrakcija superkričnim CO₂

Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske superkričnim CO₂ provedena je na uređaju na Prehrambeno tehnološkom fakultetu u Osijeku čija je procesna shema prikazana na **Slici 22**, a ispitivao se utjecaj tlaka, temperature i vremena ekstrakcije na iskorištenje bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima. Dijelovi ovog ekstraktora su od nehrđajućeg čelika AISI 316Ti i AISI 304. Tlak u ekstraktoru kontroliran je s dva WIKA manometra (model 212.20) od 60 MPa dok je tlak u separatoru kontroliran s jednim WIKA manometrom (model 212.20) od 4 MPa. Protok CO₂ kontroliran je preko Matheson FM-1050 (E800) mjeraca protoka. Električni grijač od staklenih vlakana kontroliranih s centraliziranim sustavom grije ekstraktor uz kontrolu temperature PID regulatorom s lag delay kompenzacijom zbog velike mase ekstraktora. Ulaz CO₂ u ekstraktor grije se pomoću izmjenjivača topline, što je omogućeno sustavom za grijanje vode. Pumpa koja se koristi za tlačenje tekućeg CO₂ je marke Haskel ®MS-71.

Odvagano je 100 g usitnjene kakaove ljuske te položeno u ekstraktor nakon čega je uslijedila ekstrakcija. Protok CO₂ korišten pri svim ekstrakcijama bio je konstantan te je iznosio 2 kg/h. U **Tablici 11** prikazane su kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije superkričnim CO₂. Uvjeti ekstrakcije superkričnim CO₂ prikazani su u **Tablici 12**. S obzirom da su dobiveni ekstrakti bili u polučvrstom stanju, za daljnje su se analize pripremili razrijeđivanjem s vodom u omjeru 1:10.



Slika 22 Procesna shema uređaja za superkričnu CO₂ ekstrakciju (Aladić, 2015)

1. Kompresor; 2. Spremnik; 3. Izmjjenivač topline od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

Tablica 11 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije superkričnim CO₂

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (+1)
Tlak (bar)	X ₁	100	200	300
Temperatura (° C)	X ₂	40	50	60
Vrijeme ekstrakcije (min)	X ₃	30	75	120

Tablica 12 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije superkričnim CO₂ bioaktivnih komponentata iz kakaove ljuske prema BBD

Broj ekperimenta	Tlak (MPa)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)
1	200	40	30
2	300	50	30
3	100	50	30
4	300	40	75
5	200	50	75
6	200	60	30
7	200	50	75
8	100	50	120
9	300	50	120
10	200	50	75
11	200	50	75
12	100	40	75
13	100	60	75
14	200	60	120
15	200	40	120
16	300	60	75
17	200	50	75

3.3.2.6. Ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju

Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske vodom u supkritičnom stanju odrađena je na laboratorijskom ekstraktoru za ekstrakciju supkritičnom vodom (Parr Instrument Company, USA) (**Slika 23**), a ispitivao se utjecaj temperature, vremena ekstrakcije te omjera tekuće/kruto na iskorištenje bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima. U **Tablici 13** prikazane su kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije vodom u supkritičnom stanju. Uvjeti ekstrakcije prikazani su u **Tablici 14**.



Slika 23 Ekstraktor s vodom u supkritičnom stanju (Parr Instrument Company, USA)

Nakon usitnjavanja kakaove ljuske, odvagano je 1 g uzorka te je dodana voda u različitim omjerima kako bi se pripremile različite koncentracije. Ovako pripremljen uzorak položio se u šaržni reaktor od 75 m, dizajniran za rad do maksimalne temperature od 540 °C te tlaka do 580 bara. Pri ekstrakciji, reaktor se zagrijavao a smjesa miješala pri 600 rpm. Plin CO₂ koristio se za kontrolu tlaka te uklanjanje prisutnog kisika kako bi se izbjegle reakcije oksidacije. Nakon provedene ekstrakcije, reaktor se odmah hladio u ledenoj kupelji a sadržaj filtrirao vakuum filtracijom. Filtrat tj. dobiveni ekstrakt koristio se u daljnjoj analizi.

Tablica 13 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu ekstrakcije vodom u supkritičnom stanju

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (+1)
Temperatura (° C)	X ₁	120	170	220
Vrijeme ekstrakcije (min)	X ₂	15	45	75
Omjer tekuće/kruto (mL/g)	X ₃	10	20	30

Tablica 14 Eksperimentalni uvjeti ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske vodom u supkritičnom stanju

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće/kruto (mL/g)
1	170	45	20
2	120	75	20
3	170	45	20
4	170	75	30
5	120	45	30
6	170	75	10
7	120	45	10
8	220	45	10
9	120	15	20
10	170	15	10
11	170	45	20
12	170	45	20
13	170	15	30
14	170	45	20
15	220	45	30
16	220	15	20
17	220	75	20

3.3.2.7. Soxhlet ekstrakcija

Udio ulja tj. masti kakaove ljuske određen je u aparaturi po Soxhletu koji se sastoji od hladila, ekstraktora, tuljka i tikvice (Inkolab d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (**Slika 24**). Nakon usitnjavanja kakaove ljuske, odvagano je 5 g uzorka te ekstrahirano sa 120 mL heksana kao organskog otapala na vodenoj kupelji temperature 100 °C ([HRN ISO 6492:2001](#)). Ekstrakcija je izvršena u tri ponavljanja.

**Slika 24** Aparatura po Soxhletu (Inkolab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

3.3.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala

Antiradikalna aktivnost dobivenih ekstrakata određena je primjenom opisanog DPPH postupka u radu [Jokić i sur. \(2016\)](#) na UV/Vis spektrofotometru (ThermoSpectronic, Cambridge, Velika Britanija).

Otopine za mjerenje pripravljene su dodatkom 1,2 mL ekstrakta kakaove ljuske (10 mg/mL) i 0,5 mL 0,2 mM svježe pripravljene DPPH otopine. Mjerenje se provelo u tri ponavljanja pri apsorpciji od 517 nm a DPPH sposobnost hvatanja radikala određena pomoću jednadžbe (4):

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

gdje su:

A_{DPPH} - kontrola apsorbanca (umjesto uzorka dodan je metanol)

A_b - apsorbanca uzorka (umjesto DPPH otopine dodan je metanol)

A_s - apsorbanca uzorka pomiješana s DPPH otopinom.

3.3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupni fenolni sadržaj (engl. *Total Phenol Content* - TPC) ekstrakata određen je prema modificiranoj spektrofotometrijskoj metodi koristeći Folin-Ciocalteu reagens, uz galnu kiselinu kao kalibracijski standard ([Jakobek i sur., 2007](#)) na UV/Vis spektrofotometru Selecta (UV 2005, Španjolska). Otopine za mjerenje pripravljene su dodatkom 20 μL uzorka, 1580 μL destilirane vode, 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa te 300 μL Na_2CO_3 otopine (200 g/L). Pripremljeni uzorci stavljeni su u termostat na 40 °C kroz 30 minuta nakon čega se provelo mjerenje. Rezultati su izračunati prema kalibracijskim krivuljama izvedenim iz tri analize te izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g ekstrakta. Mjerenje se provelo u tri ponavljanja pri valnoj duljini od 765 nm.

3.3.4. Određivanje bioaktivnih komponenata u ekstraktima

Identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih komponenata u dobivenim ekstraktima odrađena je metodom tekućinske kromatografije s visokim učinkom s detektorom niza dioda (HPLC/DAD). Instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (SAD) (**Slika 25**) sadrži slijedeće komponente:

- Autosampler (automatski uzorkivač) G7129A 1260 Vialsampler, serijskog broja DEAEQ07567
- Pumpa: G7111B 1260 Quat Pump, serijskog broja DEAET00636
- Detektor: G7117C 1260 DAD HS, serijskog broja DEAK01052.

Uvjeti na kojima je provedena analiza dani su u **Tablici 15**, a primjer kromatograma u **Prilogu 1**.

Standardi za analizu pripremljeni su metodom odvage te otapanjem u vodi kako bi se dobile stock-otopine svake pojedine bioaktivne komponente. Razrijeđivanjem su pripremljeni radni standardi, prvo pojedinačno kako bi se pomoću retencijskog vremena (R_t) identificirali spojevi, te smjese pet različitih koncentracija radnih standarda u području mjerenja potrebnih za kalibraciju metode, validaciju te procjenu mjerne nesigurnosti uhodane analitičke metode. Svi standardi su prije analize na HPLC instrumentu bili otopljeni i izmješani pomoću ultrazvučne kupelji i vortexa, te na kraju profiltrirani preko 0.2 μm najlon-filtera za HPLC i odgovarajuće šprice.

Svi uzorci ekstrakata kakaove ljuske prije HPLC analize bili su razrijeđeni u odgovarajućem omjeru 1:1 te također filtrirani kroz 0.2 μm najlon-filter za HPLC i špicu. Također, neki su uzorci bili razrijeđivani i u većem omjeru, zavisno od njihove konzistencije, dok je u neke bio dodan standard zbog potrebe potvrde određene komponente (engl. „*spike*“).



Slika 25 Visoko djelotvorni/tlačni tekućinski kromatograf sa detektorom s nizom dioda (Agilent Technologies 1260 Infinity II, SAD)

Tablica 15 Uvjeti HPLC/DAD metode za određivanje bioaktivnih komponenti kakaove ljuske

Kromatografska kolona:	Zorbax C18; 150 mm x 4,6 mm x 5µm (Agilent Technologies)		
Temperatura kolone:	30 °C		
Detektor:	DAD		
Protok mobilne faze:	1mL/min		
Mobilna faza:	1% mravlja kiselina: acetonitril (95:5)		
	Gradijent mobilne faze:		
	Vrijeme (min)	1% mravlja kiselina (%)	Acetonitril (%)
	0.00	95.00	5.00
9.00	80.00	20.00	
13.00	95.00	5.00	
Vrijeme trajanja analize:	13 min		
Volumen injektiranja:	20 µl		
Valna duljina:	276 nm		

3.3.5. Određivanje sastava masnih kiselina u ekstraktima

Sastav masnih kiselina određen je kako u ekstraktima kakaove ljuske dobivenim primjenom superkritičnog CO₂ tako i u ekstraktima dobivenim Soxhlet metodom.

Za određivanje sastava masnih kiselina korištena je smjesa metilnih estera masnih kiselina: Supelco™ 37 Component FAME Mix (Bellefonte, Pennsylvania, SAD; engl. FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*). Priprema metilnih estera masnih kiselina provedena je prema normi [HRN EN ISO 12966-2:2017](#). Odvagano je 100 mg ekstrahiranog uzorka masti, dodano 10 mL heksana i mučkano u tresilici (HS260 control, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka) dok se sva mast nije otopila. Za pripravu metilnih estera masnih kiselina, dodano je 200 µL 2M metanolne otopine kalij hidroksida (bazno katalizirana transesterifikacija). Uzorci su mučkani 30 s, a nakon toga centrifugirani 15 min na 3000 rpm i temperaturi od 15 °C. Prije injektiranja u plinski kromatograf, 200 µL uzorka je filtrirano kroz *PTFE* filter. Pripravljeni metilni esteri masnih kiselina analizirani su plinskom kromatografijom prema normi [HRN EN ISO 12966-1:2015](#). Korišten je plinski kromatograf 7890B s plameno ionizacijskim detektorom (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD) (**Slika 26**) po temperaturnom programu prikazanom u **Tablici 16**, a primjer kromatograma u **Prilogu 2**. Metilni esteri masnih kiselina identificirani su usporedbom s vremenima zadržavanja (engl. *Retention time*) 37 metil estera masnih kiselina standardne smjese analizirane pri istim uvjetima. Uz uzorke i standard, pri svakoj analizi korišten je i certificirani referentni materijal, pripremljen i analiziran na isti način kao i uzorci. Rezultat je izražen kao postotak (%) pojedine masne kiseline u odnosu na ukupno određene

masne kiseline. Granica detekcije metode je bila 0,1%. Vrijednosti utvrđene u validacijskom postupku za parametar istinitosti su uspoređivane sa kriterijem definiranim Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata.



Slika 26 Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom (7890B Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)

Tablica 16 GC/FID uvjeti za određivanje sastava masnih kiselina

Kolona:	Kapilarna kolona HP88 100 x 0,25 mm x 0,20 μ m (Agilent Technologies, Lake Forest, SAD)
Detektor:	FID detektor
Autoinjektor:	Agilent 7683 A
Temperatura injektora:	250 °C
Volumen injektiranja:	1 μ l
Split / splitless mod:	Split 1:50
Plin nosač i protok:	Helij 5.0; 2 mL/min
Temperaturni program:	120 °C, 1 min; 10 °C/min do 175 °C zadržavanje 10 min; 5 °C / min do 210 °C zadržavanje 5 min; 5 °C/min do 230 °C zadržavanje 5 min
FID parametri:	Helij 40 mL/min; Zrak 450 mL/min; Dušik 30 mL/min
Vrijeme uravnoteženja kolone između analiza:	2 minute na 120 °C

3.3.6. Statistička obrada podataka i optimizacija procesa

Za analizu utjecaja parametara suvremenih tehnika ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija eutektičkim otapalima, ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem, superkrična CO₂ ekstrakcija te ekstrakcija vodom u supkričnom stanju) na ispitivane odzive te optimizaciju procesa korištena je metoda odzivne površine (RSM).

Svaka primjenjena tehnika je posebno ispitana i optimirana pri čemu je ispitan utjecaj najvažnijih parametara procesa na različite odzive. U svim slučajevima je korišten Box-Behnken plan pokusa (BBD) sa tri numerička faktora na tri nivoa (osim kod ekstrakcije s ultrazvukom gdje su se koristila četiri faktora). Dizajn se sastojao od sedamnaest eksperimenata sa pet ponavljanja u centralnoj točki, osim u slučaju ultrazvučne ekstrakcije gdje je provedeno dvadesetdevet eksperimenata sa pet ponavljanja u centralnoj točki. U **Tablicama 2, 5, 7, 9, 11 i 13** su prikazani eksperimentalni dizajni sa realnim i kodiranim parametrima ekstrakcije za svaku ispitivanu tehniku.

Procjena koeficijentata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara odabranih zelenih metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske provedena je korištenjem softverskog programa *Design-Expert*®, v.9 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Adekvatnost dobivenih modela određena je koeficijentom determinacije (R^2), te p -vrijednostima za model i nedostatkom prilagođavanja (eng. *lack of fit*). Na osnovi dobivenih matematičkog modela (polinoma) konstruirane su odzivne površine koje omogućavaju vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese (**Slike 44 - 70**). Odzivne površine mogu se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina. Kako bi razvijeni modeli imali primjenu u simulaciji, provodi se završni korak u metodi odzivnih površina, optimiranje promatranog procesa (**Myers i Montgomery, 1995**). Za optimiranje procesa primjenila se metoda temeljena na konceptu željene funkcije (engl. *Desirability function*, D). Optimiranje se provelo na način da su se praćeni odzivi (y) prevodili u individualne željene funkcije čije su se vrijednosti kretale od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavljala je najlošiju, odnosno 1, najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija (D) bila je jednaka geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija.

4. REZULTATI

4.1. RASPODJELA VELIČINE ČESTICA

Tablica 17 Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima kakaove ljuske

Broj sita	Veličina otvora sita (mm)	1. uzorak (g)	2. uzorak (g)	3. uzorak (g)
0	3,15	0,050	0,130	0,170
1	2,00	0,180	0,370	0,590
2	0,80	9,860	11,500	13,870
3	0,56	34,190	32,950	31,960
4	0,32	26,790	35,400	34,170
5	0,25	18,760	11,150	13,270
6	0,16	8,160	8,050	5,930
7	0,10	1,430	0,980	0,830
8	Slijepo sito	0,740	0,310	0,370

Srednja veličina čestica (tri ponavljanja) iznosi $0,282 \pm 0,011$ mm (izračunata prema jednadžbi 3).

4.2. UDJELI BIOAKTIVNIH KOMPONENATA U EKSTRAKTIMA KAKAOVE LJUSKE DOBIVENI PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

4.2.1. Utjecaj procesnih uvjeta UAE na sastav ekstrakata kakaove ljuske

Tablica 18 Udjeli bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljuske dobiveni primjenom ultrazvuka prema BBD

Uvjeti metode												
Eksp.	T (°C)	t (min)	omjer tekuće/kruto (mL/g)	snaga (%)	Galna kiselina (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Kofein (mg/g)	Kafeinska kiselina (mg/g)	Katehin (mg/g)	Epikatehin (mg/g)	TPC (mgGAE/g ekstrakta)	%DPPH
1.	40	60	30	30	0,504	2,077	0,276	0,000	0,165	tragovi	54,692	36,420
2.	60	90	30	70	0,517	2,696	0,410	0,255	0,266	0,077	87,000	65,108
3.	40	60	10	50	0,904	3,767	0,486	0,000	0,065	0,024	21,103	14,624
4.	40	90	30	50	0,622	2,493	0,360	0,000	0,317	0,055	82,385	56,907
5.	60	60	30	50	0,368	4,122	0,295	0,274	0,409	0,082	92,385	67,703
6.	40	60	30	70	0,642	3,120	0,444	0,398	0,342	0,020	96,487	64,783
7.	60	90	10	50	0,968	3,872	0,497	0,000	0,080	0,005	23,667	16,923
8.	80	60	30	70	0,738	4,098	0,580	0,447	0,457	0,029	132,897	74,943
9.	60	60	30	50	0,807	4,545	0,618	0,527	0,333	0,060	108,282	85,106
10.	60	30	30	70	0,749	3,424	0,486	0,443	0,321	0,078	109,821	73,244
11.	40	60	50	50	1,197	5,916	0,570	0,000	0,134	0,042	91,872	74,812
12.	80	90	30	50	0,727	3,725	0,537	0,431	0,354	0,100	123,410	86,377
13.	60	60	30	50	0,570	3,610	0,508	0,434	0,309	0,085	114,436	70,598
14.	60	60	50	30	1,077	5,195	0,726	0,000	0,208	0,054	118,538	82,326
15.	60	60	30	50	0,769	4,134	0,589	0,000	0,336	0,067	91,615	73,795
16.	60	60	50	70	1,407	5,431	0,785	0,000	0,341	tragovi	108,282	77,594
17.	60	30	10	50	0,866	3,642	0,433	0,000	0,033	tragovi	21,872	13,683
18.	40	30	30	50	0,605	2,255	0,315	0,000	0,185	0,023	78,538	59,304
19.	60	30	30	30	0,584	3,325	0,486	0,392	0,245	0,000	105,718	68,167
20.	60	60	10	70	0,110	2,916	0,698	0,000	0,111	0,012	34,436	27,471
21.	60	90	30	30	0,469	3,419	0,472	0,381	0,446	tragovi	93,410	81,569
22.	80	30	30	50	0,520	2,402	0,358	0,000	0,289	tragovi	91,872	82,941
23.	60	90	50	50	1,249	5,600	0,587	0,000	0,175	0,023	124,179	14,034
24.	60	60	30	50	0,785	3,456	0,537	0,000	0,340	tragovi	101,103	81,815
25.	80	60	50	50	1,080	4,128	0,678	0,000	0,247	0,070	123,923	85,485
26.	80	60	30	30	0,586	2,568	0,400	0,000	0,243	0,036	105,974	74,944
27.	60	60	10	30	0,854	3,193	0,439	0,000	0,044	0,006	20,590	14,130
28.	60	30	50	50	1,118	5,297	0,646	0,000	0,170	0,023	106,487	76,097
29.	80	60	10	50	0,687	3,234	0,421	0,000	0,051	0,006	22,128	17,334

4.2.1.1. Statistička analiza parametara UAE

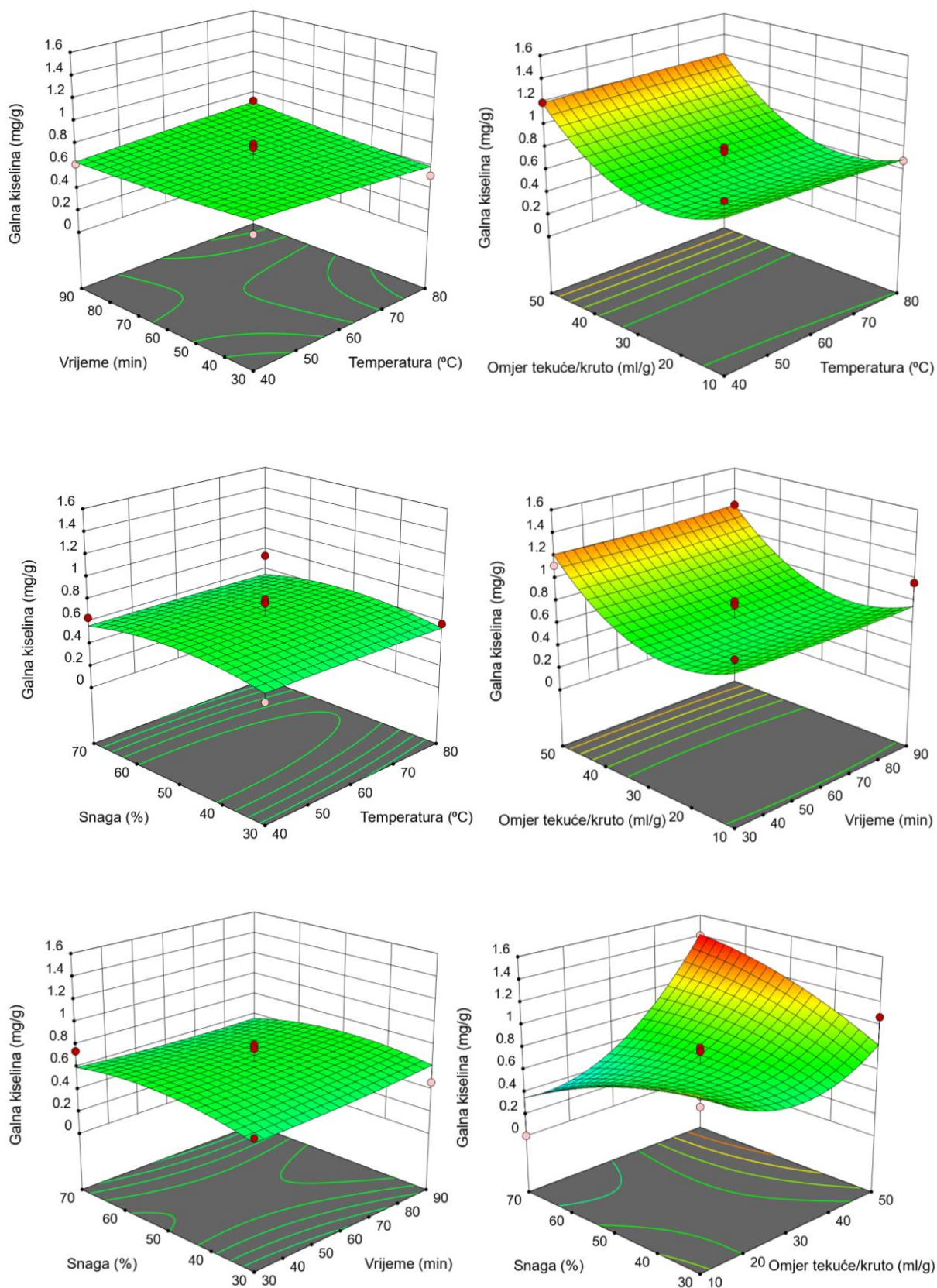
Statistička analiza ANOVA određenih parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom napravljena je samo za najzastupljenije bioaktivne komponente u dobivenim ekstraktima dok za bioaktivne komponente u tragovima kao i one u niskim koncentracijama nije rađena statistička analiza.

Tablica 19 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **galne kiseline** pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,79	14	0,1277	3,70	0,0100*
X ₁ -Temperatura	0,0015	1	0,0015	0,0444	0,8362
X ₂ -Vrijeme	0,0010	1	0,0010	0,0286	0,8681
X ₃ -Omjer tekuće/kruto	0,6523	1	0,6523	18,10	0,0008*
X ₄ -Snaga	0,0007	1	0,0007	0,0193	0,8915
X ₁ X ₂	0,0091	1	0,0091	0,2625	0,6164
X ₁ X ₃	0,0025	1	0,0025	0,0714	0,7932
X ₁ X ₄	0,0000	1	0,0000	0,0014	0,9703
X ₂ X ₃	0,0002	1	0,0002	0,0060	0,9392
X ₂ X ₄	0,0035	1	0,0035	0,1001	0,7564
X ₃ X ₄	0,2884	1	0,2884	8,35	0,0119*
X ₁ ²	0,0008	1	0,0008	0,0223	0,8835
X ₂ ²	0,0009	1	0,0009	0,0262	0,8738
X ₃ ²	0,6944	1	0,6944	20,10	0,0005*
X ₄ ²	0,0447	1	0,0447	1,29	0,2744
Ostatak	0,4837	14	0,0346		
Nedostatak modela	0,3411	10	0,0341	0,9561	0,5689
Pogreška	0,1427	4	0,0357		
Ukupno	2,27	28			
R²	0,7870				

SS- suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS- varijanca

*Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



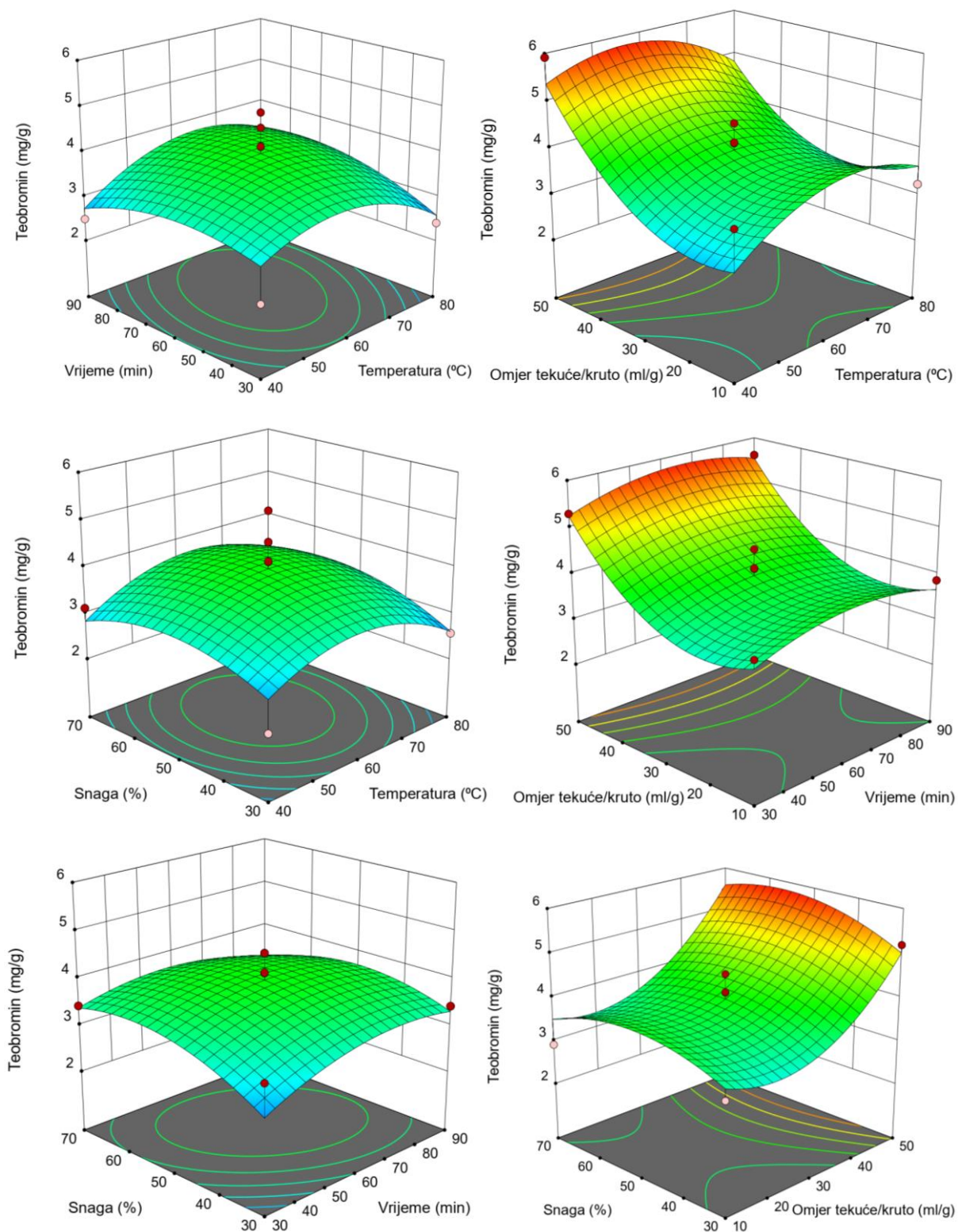
Slika 27 Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina galne kiseline u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, omjeru tekuće/kruho, temperaturi i snazi ultrazvuka pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom

Tablica 20 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **teobromina** pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	23,72	14	1,69	3,96	0,0073*
X_1 -Temperatura	0,0232	1	0,0232	0,0543	0,8191
X_2 -Vrijeme	0,1774	1	0,1774	0,4150	0,5298
X_3 -Omjer tekuće/kruto	9,98	1	9,98	23,35	0,0003*
X_4 -Snaga	0,3033	1	0,3033	0,7095	0,4138
X_1X_2	0,2946	1	0,2946	0,6892	0,4204
X_1X_3	0,3939	1	0,3939	0,9214	0,3534
X_1X_4	0,0591	1	0,0591	0,1383	0,7155
X_2X_3	0,0013	1	0,0013	0,0031	0,9563
X_2X_4	0,1690	1	0,1690	0,3953	0,5397
X_3X_4	0,0658	1	0,0658	0,1539	0,7008
X_1^2	2,93	1	2,93	6,85	0,0203*
X_2^2	0,9173	1	0,9173	2,15	0,1651
X_3^2	5,01	1	5,01	11,73	0,0041*
X_4^2	1,38	1	1,38	3,24	0,0935
Ostatak	5,98	14	0,4275		
Nedostatak modela	5,21	10	0,5211	2,69	0,1760
Pogreška	0,7737	4	0,1934		
Ukupno	29,71	28			
R²	0,7985				

SS- suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS- varijanca

*Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



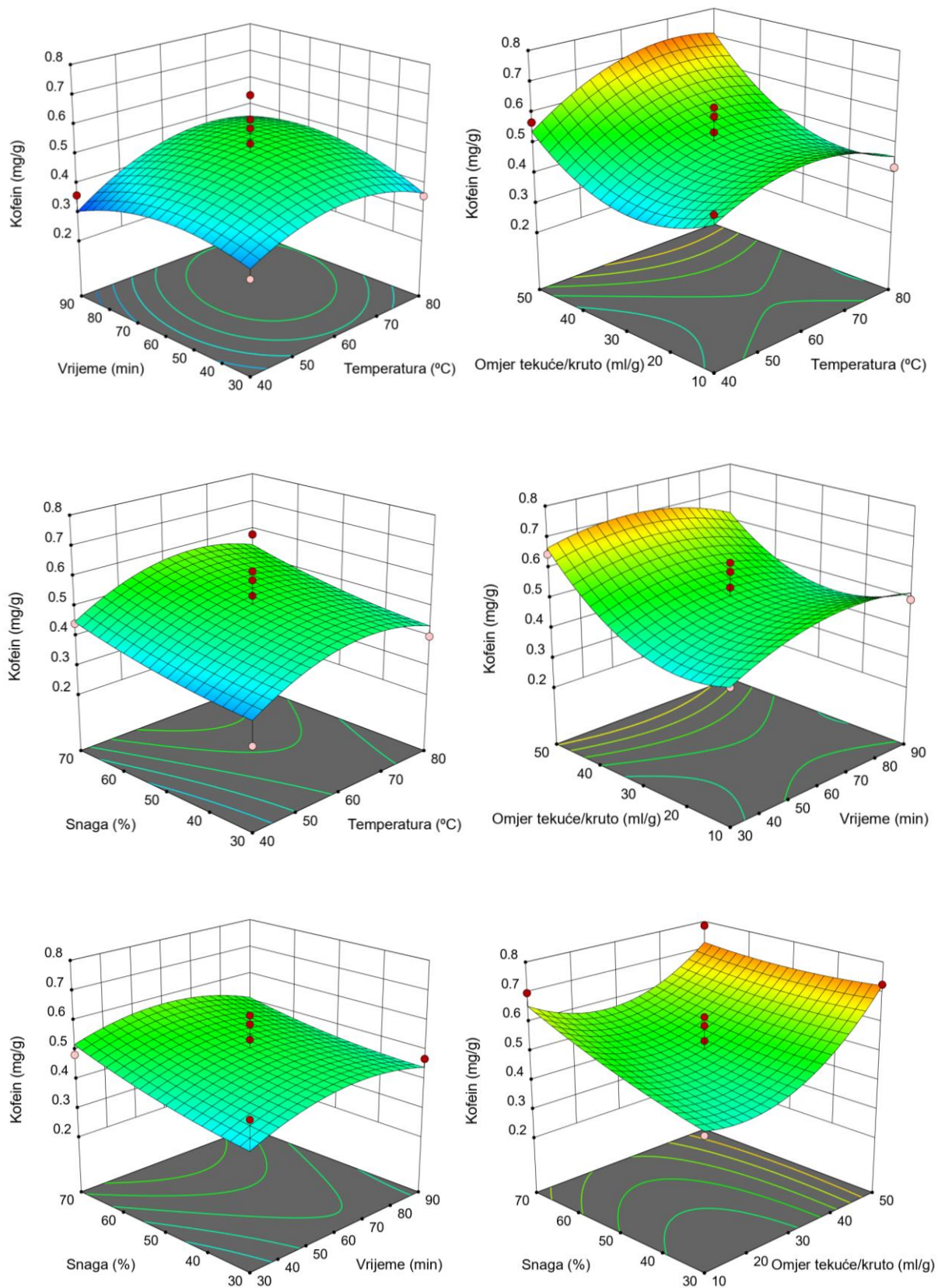
Slika 28 Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina **teobromina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, omjeru tekuće/kruto, temperaturi i snazi ultrazvuka pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom**

Tablica 21 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **kofeina** pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,3512	14	0,0251	2,94	0,0263*
X ₁ -Temperatura	0,0228	1	0,0228	2,67	0,1245
X ₂ -Vrijeme	0,0016	1	0,0016	0,1912	0,6686
X ₃ -Omjer tekuće/kruto	0,0859	1	0,0859	10,07	0,0068*
X ₄ -Snaga	0,0304	1	0,0304	3,56	0,0801
X ₁ X ₂	0,0044	1	0,0044	0,5209	0,4823
X ₁ X ₃	0,0075	1	0,0075	0,8850	0,3628
X ₁ X ₄	0,0000	1	0,0000	0,0041	0,9496
X ₂ X ₃	0,0038	1	0,0038	0,4422	0,5169
X ₂ X ₄	0,0010	1	0,0010	0,1120	0,7429
X ₃ X ₄	0,0099	1	0,0099	1,17	0,2985
X ₁ ²	0,0420	1	0,0420	4,92	0,0436*
X ₂ ²	0,0235	1	0,0235	2,76	0,1189
X ₃ ²	0,0818	1	0,0818	9,59	0,0079*
X ₄ ²	0,0018	1	0,0018	0,2136	0,6511
Ostatak	0,1194	14	0,0085		
Nedostatak modela	0,0543	10	0,0054	0,3336	0,9275
Pogreška	0,0651	4	0,0163		
Ukupno	0,4706	28			
R²	0,7463				

SS- suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS- varijanca

*Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



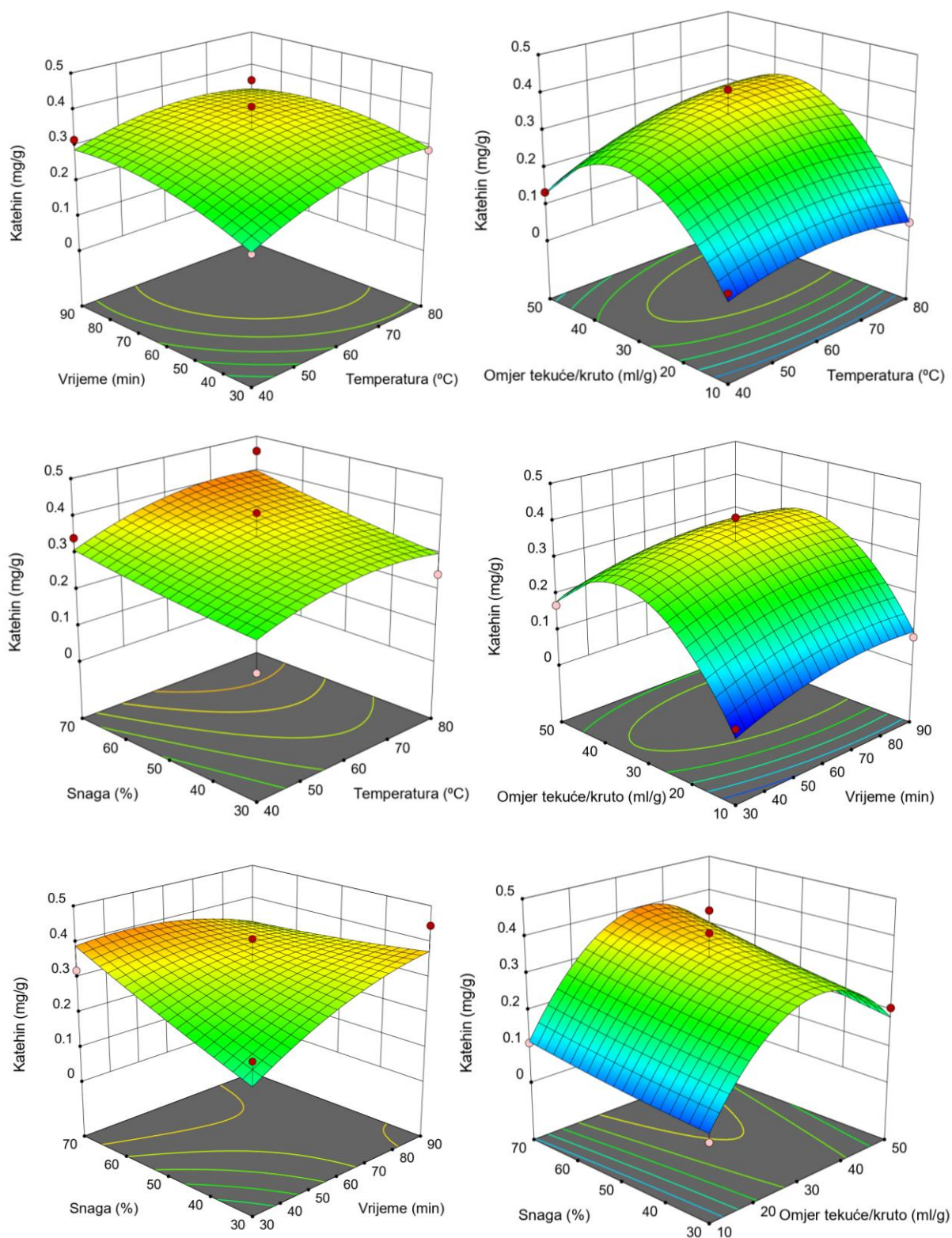
Slika 29 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **kofeina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, omjeru tekuće/kruto, temperaturi i snazi ultrazvuka pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom**

Tablica 22 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **katehina** pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,3733	14	0,0267	8,03	0,0002*
X_1 -Temperatura	0,0155	1	0,0155	4,66	0,0486*
X_2 -Vrijeme	0,0130	1	0,0130	3,90	0,0683
X_3 -Omjer tekuće/kruto	0,0662	1	0,0662	19,93	0,0005*
X_4 -Snaga	0,0196	1	0,0196	5,91	0,0291*
X_1X_2	0,0011	1	0,0011	0,3361	0,5713
X_1X_3	0,0040	1	0,0040	1,22	0,2885
X_1X_4	0,0003	1	0,0003	0,1021	0,7541
X_2X_3	0,0004	1	0,0004	0,1302	0,7236
X_2X_4	0,0163	1	0,0163	4,91	0,0437*
X_3X_4	0,0011	1	0,0011	0,3231	0,5788
X_1^2	0,0088	1	0,0088	2,64	0,1267
X_2^2	0,0071	1	0,0071	2,14	0,1656
X_3^2	0,2240	1	0,2240	67,46	< 0,0001*
X_4^2	0,0002	1	0,0002	0,0618	0,8073
Ostatak	0,0465	14	0,0033		
Nedostatak modela	0,0408	10	0,0041	2,85	0,1624
Pogreška	0,0057	4	0,0014		
Ukupno	0,4197	28			
R²	0,8893				

SS- suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS- varijanca

*Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



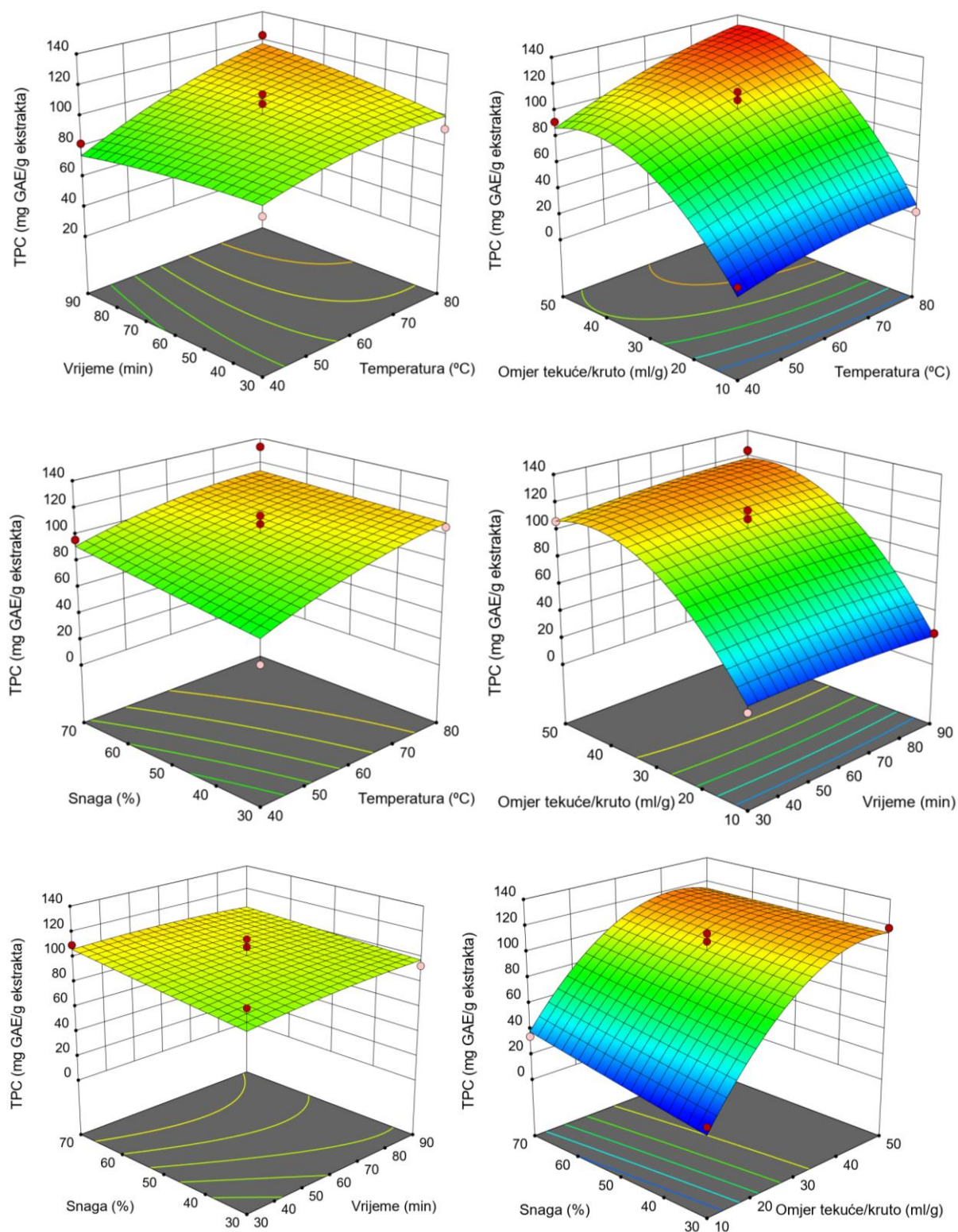
Slika 30 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **katehina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, omjeru tekuće/kruho, temperaturi i snazi ultrazvuka pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom**

Tablica 23 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **ukupnog fenolnog sadržaja** pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	33668,56	14	2404,90	14,83	< 0,0001*
X ₁ -Temperatura	2555,82	1	2555,82	15,76	0,0014*
X ₂ -Vrijeme	32,48	1	32,48	0,2003	0,6613
X ₃ -Omjer tekuće/kruto	23363,05	1	23363,05	144,06	< 0,0001*
X ₄ -Snaga	408,33	1	408,33	2,52	0,1349
X ₁ X ₂	191,72	1	191,72	1,18	0,2953
X ₁ X ₃	240,65	1	240,65	1,48	0,2433
X ₁ X ₄	55,29	1	55,29	0,3409	0,5686
X ₂ X ₃	63,18	1	63,18	0,3896	0,5425
X ₂ X ₄	27,63	1	27,63	0,1704	0,6860
X ₃ X ₄	145,23	1	145,23	0,8956	0,3600
X ₁ ²	168,18	1	168,18	1,04	0,3258
X ₂ ²	31,60	1	31,60	0,1949	0,6656
X ₃ ²	6280,86	1	6280,86	38,73	< 0,0001*
X ₄ ²	0,3391	1	0,3391	0,0021	0,9642
Ostatak	2270,42	14	162,17		
Nedostatak modela	1876,16	10	187,62	1,90	0,2801
Pogreška	394,27	4	98,57		
Ukupno	35938,99	28			
R²	0,9368				

SS- suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS- varijanca

*Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



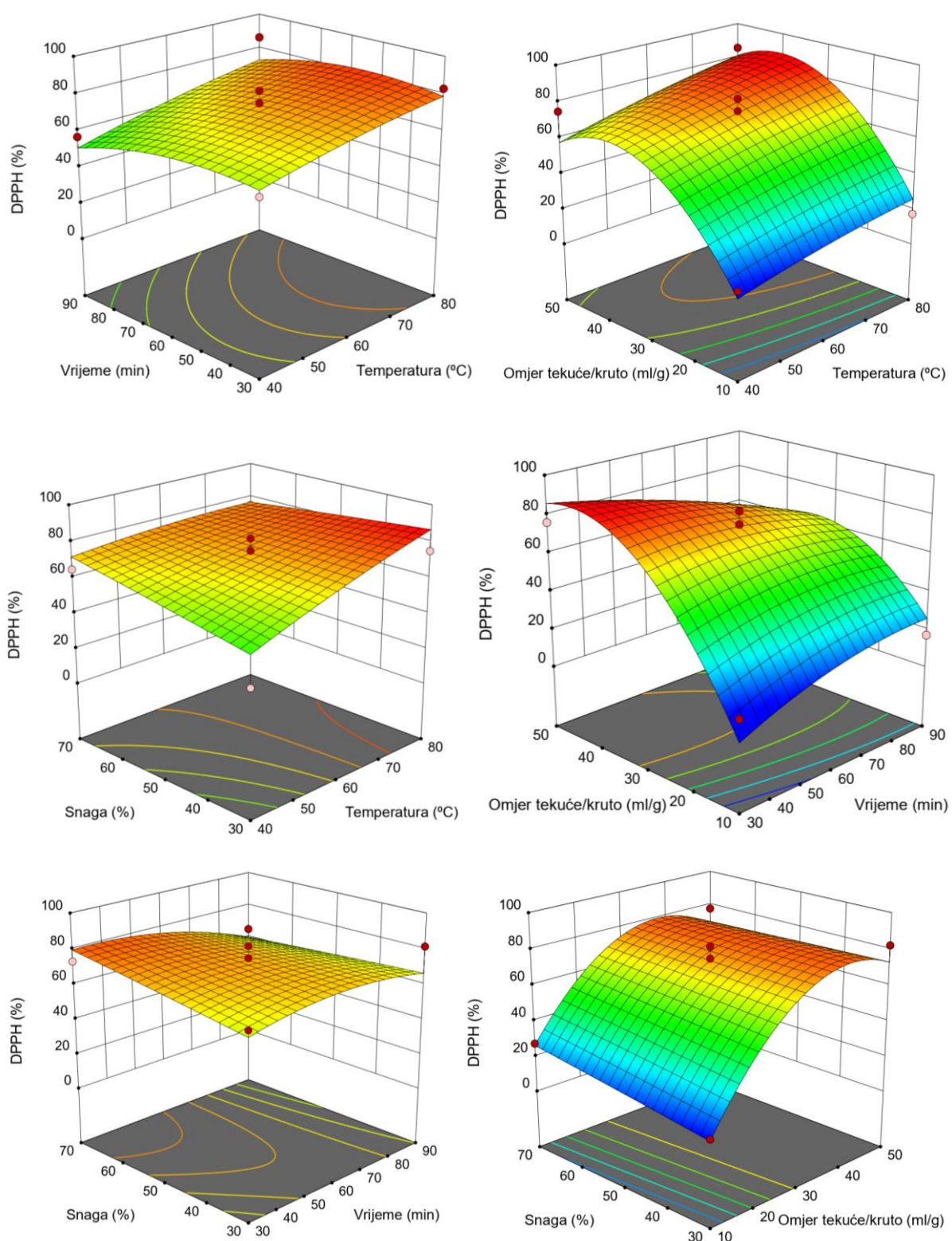
Slika 31 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **ukupnog fenolnog sadržaja** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, omjeru tekuće/kruto, temperaturi i snazi ultrazvuka pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom

Tablica 24 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **antioksidacijske aktivnosti (% DPPH)** pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	16501,16	14	1178,65	5,44	0,0016*
X_1 -Temperatura	1105,42	1	1105,42	5,10	0,0404*
X_2 -Vrijeme	229,85	1	229,85	1,06	0,3205
X_3 -Omjer tekuće/kruto	7812,42	1	7812,42	36,06	< 0,0001*
X_4 -Snaga	54,55	1	54,55	0,2518	0,6236
X_1X_2	8,51	1	8,51	0,0393	0,8458
X_1X_3	15,85	1	15,85	0,0732	0,7907
X_1X_4	201,12	1	201,12	0,9284	0,3516
X_2X_3	1066,11	1	1066,11	4,92	0,0436*
X_2X_4	115,97	1	115,97	0,5353	0,4765
X_3X_4	81,66	1	81,66	0,3769	0,5491
X_1^2	43,62	1	43,62	0,2014	0,6605
X_2^2	309,58	1	309,58	1,43	0,2518
X_3^2	5602,18	1	5602,18	25,86	0,0002*
X_4^2	8,07	1	8,07	0,0372	0,8498
Ostatak	3032,98	14	216,64		
Nedostatak modela	2813,55	10	281,36	5,13	0,0646
Pogreška	219,43	4	54,86		
Ukupno	19534,14	28			
R²	0,8447				

SS- suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS- varijanca

*Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 32 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **antioksidacijske aktivnosti (% DPPH)** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, omjeru tekuće/kruuto, temperaturi i snazi ultrazvuka pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom**

Tablica 25 Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa pri **ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom**

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda
Galna kiselina (Y₁)	$0,6599 - 0,0113X_1 + 0,0091X_2 + 0,2283X_3 - 0,0075X_4 - 0,0109X_1^2 + 0,0118X_2^2 + 0,3272X_3^2 - 0,0830X_4^2 + 0,0476X_1X_2 + 0,0248X_1X_3 + 0,0035X_1X_4 + 0,0072X_2X_3 - 0,0294X_2X_4 + 0,2685X_3X_4$
Teobromin (Y₂)	$3,97 + 0,0440X_1 + 0,1216X_2 + 0,9120X_3 + 0,1590X_4 - 0,6720X_1^2 - 0,3760X_2^2 + 0,8792X_3^2 - 0,4620X_4^2 + 0,2714X_1X_2 - 0,3138X_1X_3 + 0,1216X_1X_4 + 0,0183X_2X_3 - 0,2055X_2X_4 + 0,1282X_3X_4$
Kofein (Y₃)	$0,5095 + 0,0436X_1 + 0,0117X_2 + 0,0846X_3 + 0,0503X_4 - 0,0804X_1^2 - 0,0602X_2^2 + 0,1123X_3^2 + 0,0168X_4^2 + 0,0333X_1X_2 + 0,0434X_1X_3 + 0,0030X_1X_4 - 0,0307X_2X_3 - 0,0155X_2X_4 - 0,0499X_3X_4$
Katehin (Y₄)	$0,3454 + 0,0359X_1 + 0,0329X_2 + 0,0743X_3 + 0,0404X_4 - 0,0367X_1^2 - 0,0331X_2^2 - 0,1858X_3^2 + 0,0056X_4^2 - 0,0167X_1X_2 + 0,0318X_1X_3 + 0,0092X_1X_4 - 0,0104X_2X_3 - 0,0639X_2X_4 + 0,0164X_3X_4$
TPC (Y₅)	$101,56 + 14,59X_1 + 1,65X_2 + 44,12X_3 + 5,83X_4 - 5,09X_1^2 - 2,21X_2^2 - 31,12X_3^2 + 0,2286X_4^2 + 6,92X_1X_2 + 7,76X_1X_3 - 3,72X_1X_4 + 3,97X_2X_3 - 2,63X_2X_4 - 6,03X_3X_4$
% DPPH (Y₆)	$75,80 + 9,60X_1 - 4,38X_2 + 25,52X_3 + 2,13X_4 - 2,59X_1^2 - 6,91X_2^2 - 29,39X_3^2 - 1,12X_4^2 + 1,46X_1X_2 + 1,99X_1X_3 - 7,09X_1X_4 - 16,33X_2X_3 - 5,38X_2X_4 - 4,52X_3X_4$

$$^a y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

X₁: temperatura; X₂: vrijeme ekstrakcije; X₃: omjer tekuće/kruto; X₄: snaga ultrazvuka

4.2.2. Utjecaj procesnih uvjeta DES/MAE na sastav ekstrakata kakaove ljuske

Tablica 26 Rezultati probira ekstrakcije s različitim eutektičkim smjesama pri 10 i 50 % udjela vode, pri T od 50 °C i u trajanju od 60 minuta

HBD*	DES	% H ₂ O	Galna kis. (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Katehin (mg/g)	Kofein (mg/g)	Kafeinska kiselina (mg/g)	Epikatehin (mg/g)	TPC (mgGAE/g ekstrakta)	% DPPH
Acetamid	ChCl:AA	10	0,009	3,020	0,052	0,775	0,024	0,031	90,846	33,582
		50	0,016	3,003	0,062	0,776	0,029	0,029	108,538	44,741
Butan-1,4-diol	ChCl:BD	10	0,000	2,282	0,000	0,571	0,023	0,051	81,359	34,280
		50	0,000	3,639	0,063	0,868	0,034	0,028	115,846	53,401
Etan-1,2-diol	ChCl:EG	10	0,008	3,019	0,057	0,766	0,025	0,019	86,744	50,521
		50	0,002	3,133	0,055	0,715	0,028	0,022	117,641	52,944
Fruktoza	ChCl:Fru	10	0,000	2,062	0,051	0,560	0,026	0,039	96,615	48,911
		50	0,000	3,414	0,095	0,752	0,037	0,031	107,513	53,067
Glicerol	ChCl:Gly	10	0,000	2,786	0,064	0,734	0,031	0,027	83,538	30,410
		50	0,000	3,380	0,062	0,763	0,036	0,033	102,385	55,000
Glukoza	ChCl:Glu	10	0,000	2,086	0,048	0,546	0,024	0,034	78,410	27,31
		50	0,009	2,413	0,000	0,657	0,031	0,039	95,974	52,50
Jabučna kiselina	ChCl:MA	10	0,000	1,017	0,000	0,207	0,011	0,000	85,462	42,00
		50	0,000	2,655	0,000	0,639	0,030	0,066	100,333	50,32
Ksilitol	ChCl:Xy	10	0,000	1,362	0,000	0,326	0,016	0,033	77,128	23,63
		50	0,000	3,052	0,074	0,684	0,029	0,029	120,974	24,08
Levulinska kiselina	ChCl:LevA	10	0,000	3,382	0,000	0,916	0,034	0,057	85,718	43,44
Limunska kiselina	ChCl:CA	50	0,000	3,032	0,000	0,706	0,027	0,071	129,051	45,18
Malonska kiselina	ChCl:Mal	10	0,000	2,773	0,000	0,701	0,023	0,055	83,795	42,65
		50	0,000	3,600	0,000	0,865	0,031	0,114	116,872	48,04
Mliječna kiselina	ChCl:LA	10	0,000	3,145	0,000	0,790	0,036	0,059	57,000	39,65
		50	0,000	2,854	0,000	0,665	0,026	0,063	70,128	51,52
Oksalna kiselina	ChCl:OA	10	0,000	0,620	0,000	0,156	0,000	0,000	67,385	64,32
		50	0,000	3,605	0,000	0,909	0,019	0,104	87,000	66,31
Sorbitol	ChCl:Sor	50	0,000	3,008	0,062	0,635	0,040	0,110	95,077	32,15
Urea	ChCl:U	10	0,000	2,329	0,000	0,665	0,028	0,022	97,000	31,15
		50	0,000	3,613	0,069	0,848	0,037	0,011	108,282	50,46
Vinska kiselina	ChCl:TA	10	0,000	2,056	0,000	0,642	0,026	0,030	116,231	46,30

Tablica 27 Udjeli bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljuske dobiveni primjenom eutektičkih otapala (na bazi kolin-klorida u smjesi s oksalnom kiselinom) prema BBD

uvjeti metode				Galna kiselina (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Katehin (mg/g)	Kofein (mg/g)	Kafeinska kiselina (mg/g)	Epikatehin (mg/g)	TPC (mgGAE/g ekstrakta)	%DPPH
Eksp.	T (°C)	t (min)	udio vode (%)								
1.	90	15	30	0,000	4,682	0,042	1,330	0,000	0,064	78,307	74,805
2.	60	10	30	tragovi	4,185	0,056	1,436	0,000	0,077	64,973	61,089
3.	60	10	30	tragovi	4,241	0,054	1,400	0,000	0,069	60,840	51,264
4.	90	10	10	tragovi	3,102	0,045	1,389	0,022	0,034	57,240	55,350
5.	60	15	50	tragovi	4,537	0,046	1,524	0,040	0,033	58,040	42,023
6.	90	5	30	tragovi	4,564	0,051	1,397	0,058	0,027	56,573	48,249
7.	60	5	10	0,000	2,145	0,035	0,681	0,056	0,030	61,373	46,790
8.	60	10	30	tragovi	3,943	0,053	1,243	0,047	0,067	40,173	37,549
9.	60	10	30	tragovi	4,010	0,056	1,208	0,040	0,066	45,507	33,463
10.	60	10	30	tragovi	4,119	0,053	1,182	0,031	0,061	55,640	40,175
11.	60	5	50	tragovi	4,024	0,051	1,252	0,064	0,017	42,707	24,027
12.	60	15	10	tragovi	4,010	0,032	0,871	0,098	0,015	50,173	31,128
13.	30	10	10	tragovi	2,324	0,031	0,710	0,045	0,011	40,307	37,160
14.	90	10	50	tragovi	4,285	0,034	1,289	0,104	0,005	60,573	31,420
15.	30	15	30	tragovi	2,630	0,051	1,185	0,073	0,000	35,373	24,222
16.	30	5	30	0,000	3,195	0,054	1,084	0,043	0,000	35,240	30,350
17.	30	10	50	0,000	2,877	0,053	1,032	0,047	0,000	37,907	35,798

Tablica 28 Udjeli bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljuske dobiveni primjenom eutektičkih otapala (na bazi kolin-klorida u smjesi s oksalnom kiselinom) u kombinaciji s mikrovalovima prema BBD

uvjeti metode				Galna kiselina (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Katehin (mg/g)	Kofein (mg/g)	Kafeinska kiselina (mg/g)	Epikatehin (mg/g)	TPC (mgGAE/g ekstrakta)	%DPPH
Eksp.	T (°C)	t (min)	udio vode (%)								
1.	90	15	30	0,463	4,754	0,050	1,311	0,120	0,059	35,219	32,315
2.	60	10	30	0,103	5,004	0,047	1,599	0,103	0,000	63,890	55,444
3.	60	10	30	0,101	4,912	0,040	1,412	0,083	0,000	57,575	55,315
4.	90	10	10	0,000	3,348	0,066	0,969	0,098	0,000	81,751	48,238
5.	60	15	50	0,221	4,823	0,056	1,590	0,128	0,017	51,065	48,597
6.	90	5	30	0,304	4,765	0,067	1,531	0,067	0,137	55,676	41,290
7.	60	5	10	0,043	2,502	0,043	0,792	0,047	0,000	56,683	24,392
8.	60	10	30	0,103	4,241	0,050	1,585	0,096	0,000	59,357	43,803
9.	60	10	30	0,110	4,769	0,048	1,490	0,079	0,000	56,257	42,162
10.	60	10	30	0,096	4,875	0,052	1,417	0,085	0,000	48,586	43,956
11.	60	5	50	0,191	4,386	0,062	1,403	0,132	0,085	41,728	28,469
12.	60	15	10	0,211	4,500	0,042	0,927	0,102	0,000	59,202	22,777
13.	30	10	10	0,019	2,465	0,047	0,778	0,054	0,014	39,675	11,751
14.	90	10	50	0,201	4,804	0,058	1,509	0,116	0,036	43,510	35,521
15.	30	15	30	0,148	4,263	0,061	1,356	0,116	0,071	41,457	21,521
16.	30	5	30	0,117	4,591	0,064	1,451	0,123	0,074	38,473	17,726
17.	30	10	50	0,200	4,505	0,065	1,443	0,137	0,107	37,815	24,667

4.2.2.1. Statistička analiza parametara DES/MAE

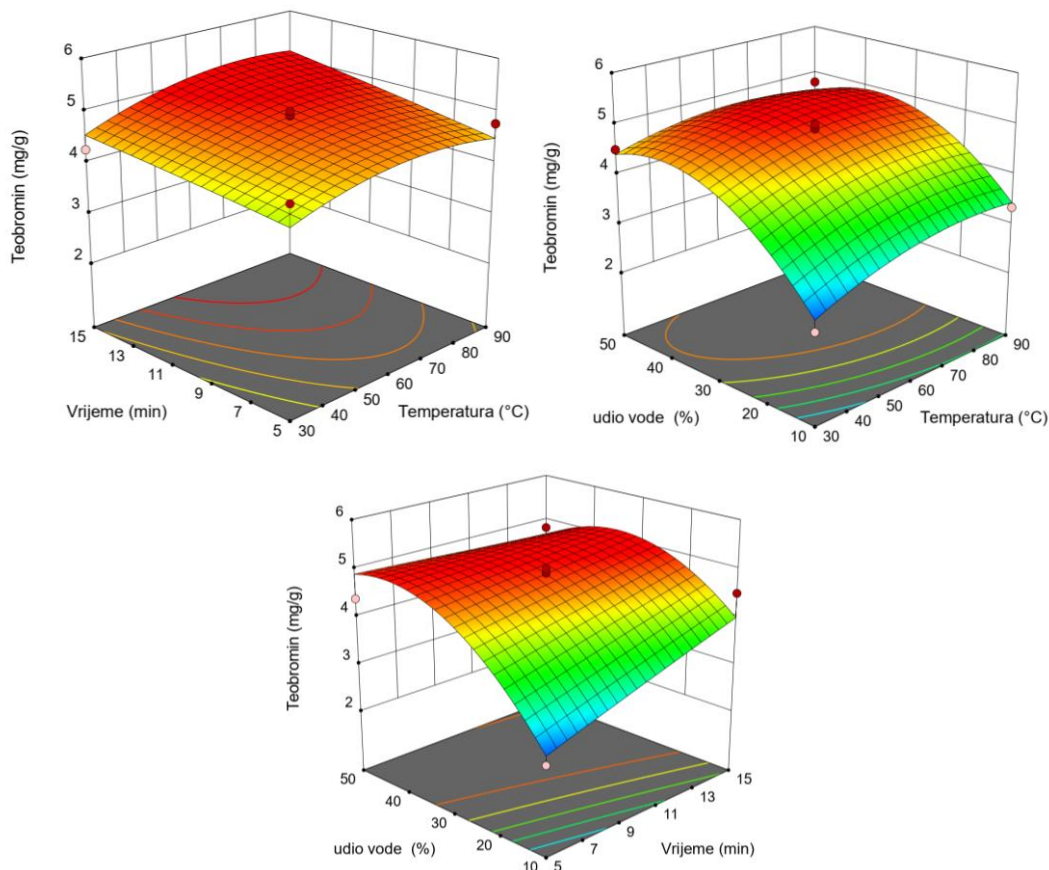
Statistička analiza ANOVA određenih parametara ekstrakcije eutektičkim otapalima potpomognutoj s mikrovalovima napravljena je samo za najzastupljenije bioaktivne komponente u dobivenim ekstraktima dok za bioaktivne komponente u tragovima kao i one u niskim koncentracijama nije rađena statistička analiza.

Tablica 29 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **teobromina** pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	8,48	9	0,9429	4,20	0,0358*
X_1 -Temperatura	0,4264	1	0,4264	1,90	0,2102
X_2 -Vrijeme	0,5492	1	0,5492	2,45	0,1614
X_3 -Udio vode	4,07	1	4,07	18,15	0,0037*
X_1X_2	0,0251	1	0,0251	0,1121	0,7475
X_1X_3	0,0853	1	0,0853	0,3806	0,5568
X_2X_3	0,6092	1	0,6092	2,72	0,1431
X_1^2	0,2030	1	0,2030	0,9063	0,3728
X_2^2	0,0227	1	0,0117	0,0521	0,826
X_3^2	2,43	1	2,43	10,86	0,0132*
Ostatak	1,57	7	0,2240		
Nedostatak modela	1,20	3	0,4010	4,39	0,0935
Pogreška	0,3653	4	0,0913		
Ukupno	10,05	16			
R²	0,8439				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



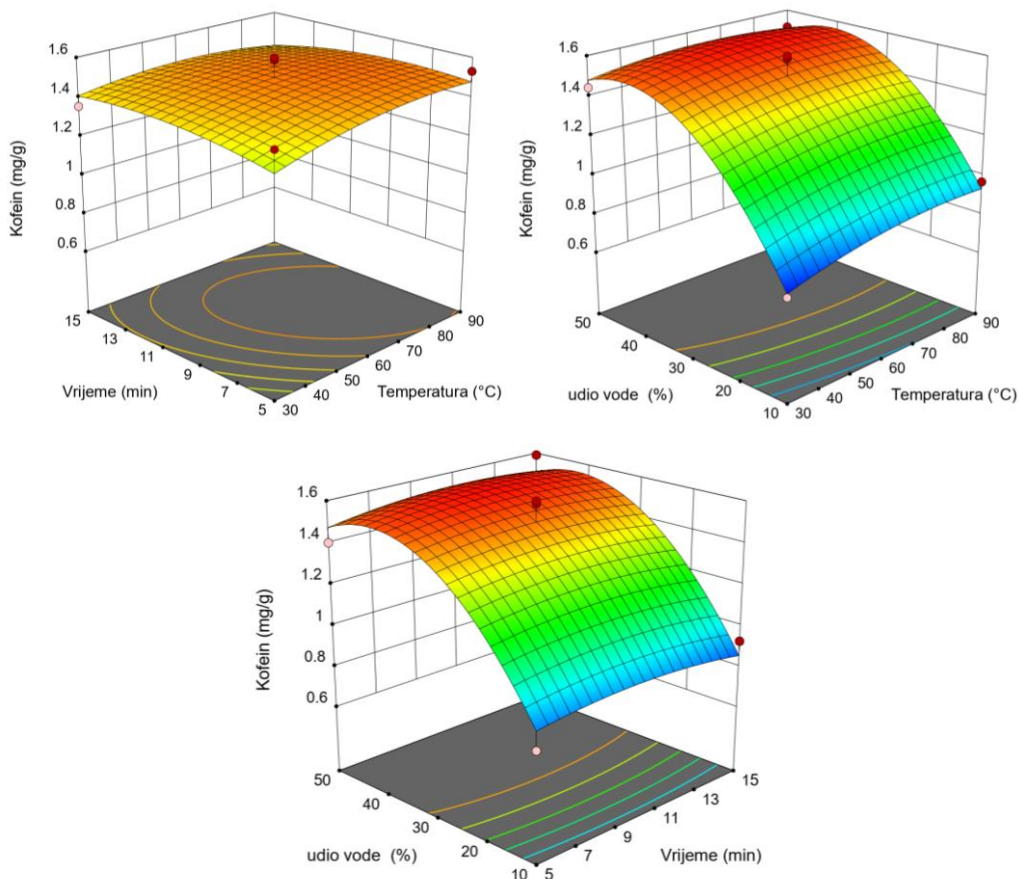
Slika 33 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **teobromina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i udjelu vode pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima**

Tablica 30 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **kofeina** pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,15	9	0,1276	10,01	0,0031*
X ₁ -Temperatura	0,0107	1	0,0107	0,8361	0,3909
X ₂ -Vrijeme	6,125E-06	1	6,125E-06	0,0005	0,9831
X ₃ -Udio vode	0,7682	1	0,7682	60,26	0,0001*
X ₁ X ₂	0,0039	1	0,0039	0,3064	0,5971
X ₁ X ₃	0,0039	1	0,0039	0,3064	0,5971
X ₂ X ₃	0,0007	1	0,0007	0,0530	0,8245
X ₁ ²	0,0088	1	0,0088	0,6928	0,4327
X ₂ ²	0,0076	1	0,0076	0,5980	0,4646
X ₃ ²	0,3302	1	0,3302	25,90	0,0014*
Ostatak	0,0892	7	0,0127		
Nedostatak modela	0,0575	3	0,0192	2,41	0,2071
Pogreška	0,0318	4	0,0079		
Ukupno	1,24	16			
R²	0,9279				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

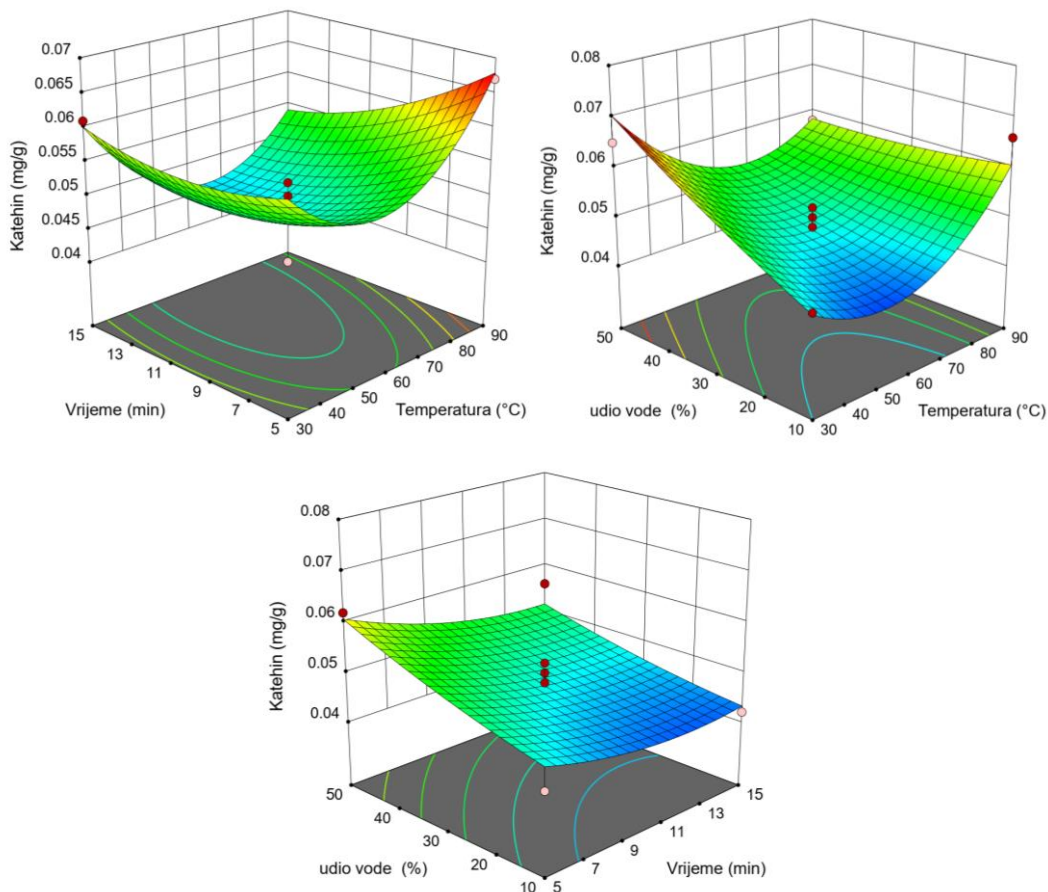


Slika 34 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **kofeina** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i udjelu vode pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima**

Tablica 31 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **katehina** pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0011	9	0,0001	3,80	0,0461*
X_1 -Temperatura	$2,000 \cdot 10^{-6}$	1	2,000E-06	0,0635	0,8083
X_2 -Vrijeme	0,0001	1	0,0001	2,89	0,1327
X_3 -Udio vode	0,0002	1	0,0002	7,34	0,0302*
X_1X_2	0,0000	1	0,0000	1,56	0,2524
X_1X_3	0,0002	1	0,0002	5,37	0,0537
X_2X_3	$6,250 \cdot 10^{-6}$	1	6,250E-06	0,1985	0,6694
X_1^2	0,0005	1	0,0005	15,24	0,0059*
X_2^2	0,0000	1	0,0000	0,7862	0,4047
X_3^2	$3,603 \cdot 10^{-6}$	1	3,603E-06	0,1144	0,7451
Ostatak	0,0002	7	0,0000		
Nedostatak modela	0,0001	3	0,0000	2,20	0,2306
Pogreška	0,0001	4	0,0000		
Ukupno	0,0013	16			
R²	0,8302				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

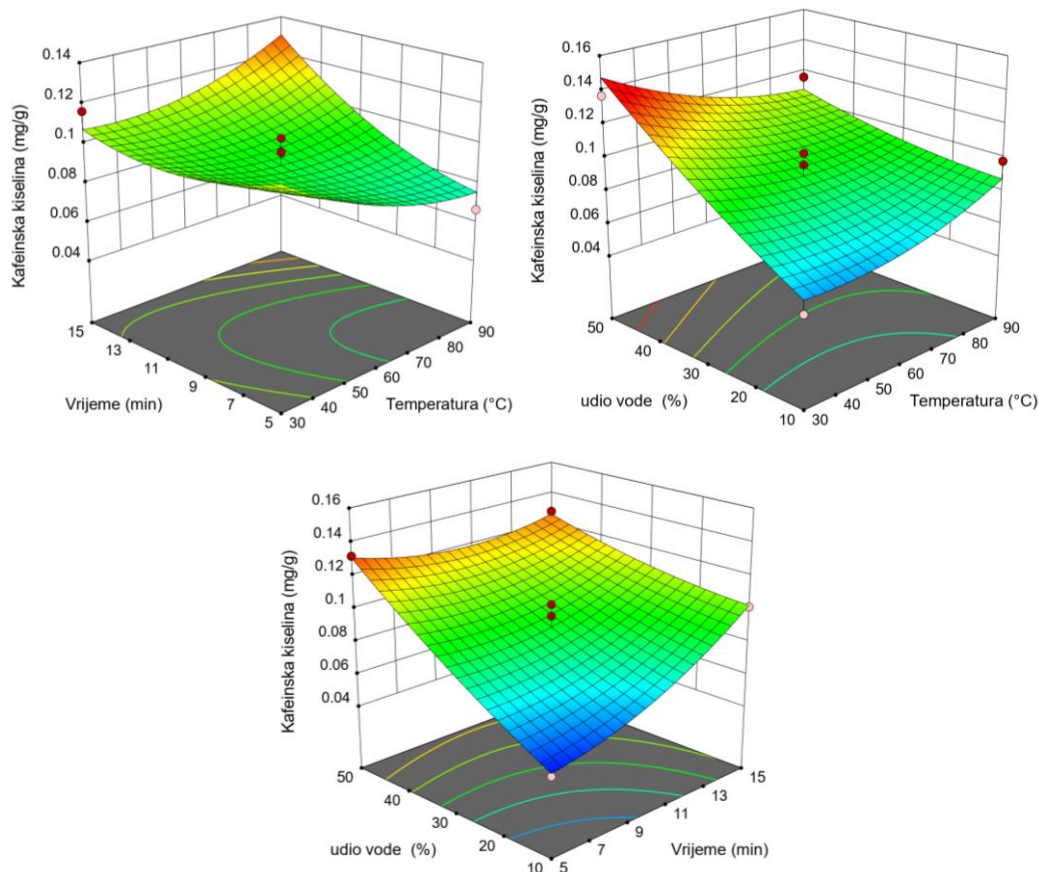


Slika 35 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina katehina u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i udjelu vode pri ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima

Tablica 32 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva kafeinske kiseline pri ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0104	9	0,0012	7,31	0,0078*
X_1 -Temperatura	0,0001	1	0,0001	0,6575	0,4441
X_2 -Vrijeme	0,0012	1	0,0012	7,45	0,0294*
X_3 -Udio vode	0,0056	1	0,0056	35,15	0,0006*
X_1X_2	0,0009	1	0,0009	5,79	0,0470*
X_1X_3	0,0010	1	0,0010	6,53	0,0378*
X_2X_3	0,0008	1	0,0008	5,28	0,0551
X_1^2	0,0003	1	0,0003	1,83	0,2183
X_2^2	0,0004	1	0,0004	2,21	0,1806
X_3^2	0,0001	1	0,0001	0,4092	0,5427
Ostatak	0,0011	7	0,0002		
Nedostatak modela	0,0007	3	0,0002	2,48	0,2009
Pogreška	0,0004	4	0,0001		
Ukupno	0,0115	16			
R²	0,9038				

SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

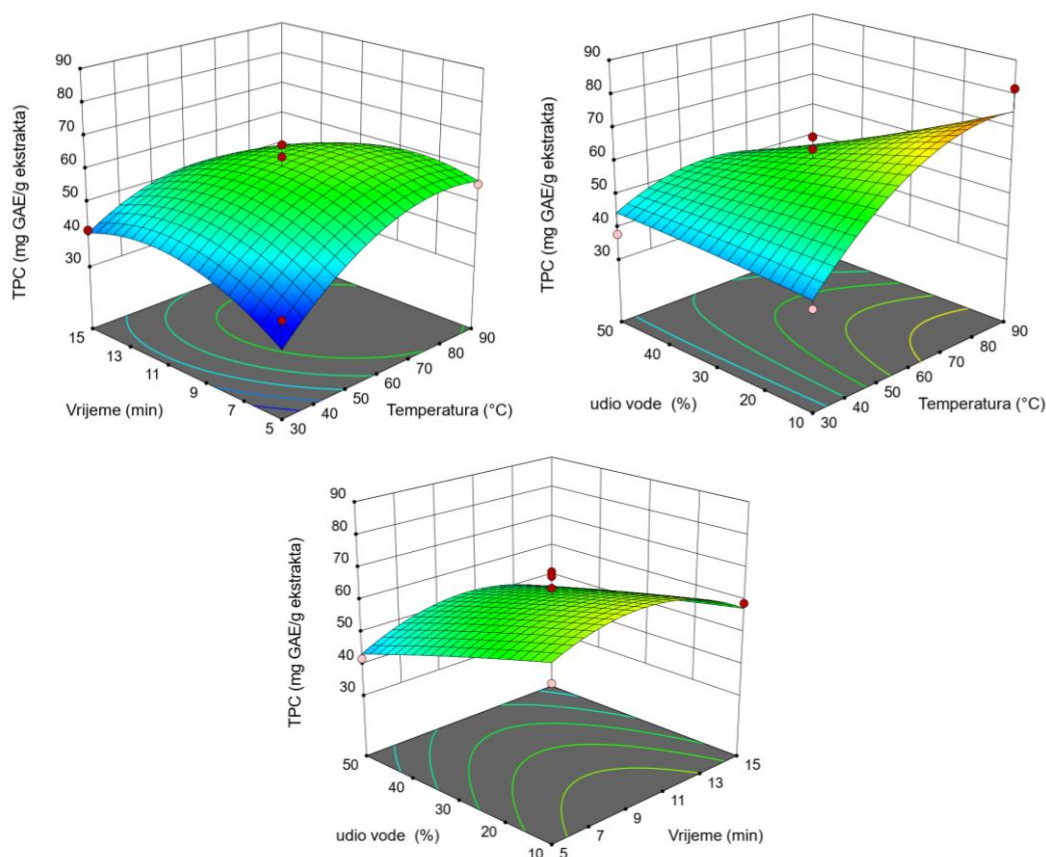


Slika 36 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **kafeinske kiseline** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i udjelu vode pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima**

Tablica 33 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **ukupnog fenolnog sadržaja** pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	2182,89	9	242,54	4,29	0,0339*
X_1 -Temperatura	431,25	1	431,25	7,63	0,0280*
X_2 -Vrijeme	3,95	1	3,95	0,0698	0,7992
X_3 -Udio vode	499,16	1	499,16	8,83	0,0207*
X_1X_2	137,36	1	137,36	2,43	0,1629
X_1X_3	330,90	1	330,90	5,86	0,0461*
X_2X_3	11,62	1	11,62	0,2057	0,6639
X_1^2	417,21	1	417,21	7,38	0,0299*
X_2^2	302,23	1	302,23	5,35	0,0540
X_3^2	1,01	1	1,01	0,0180	0,8972
Ostatak	395,55	7	56,51		
Nedostatak modela	313,04	3	104,35	5,06	0,0757
Pogreška	82,51	4	20,63		
Ukupno	2578,44	16			
R²	0,8466				

SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



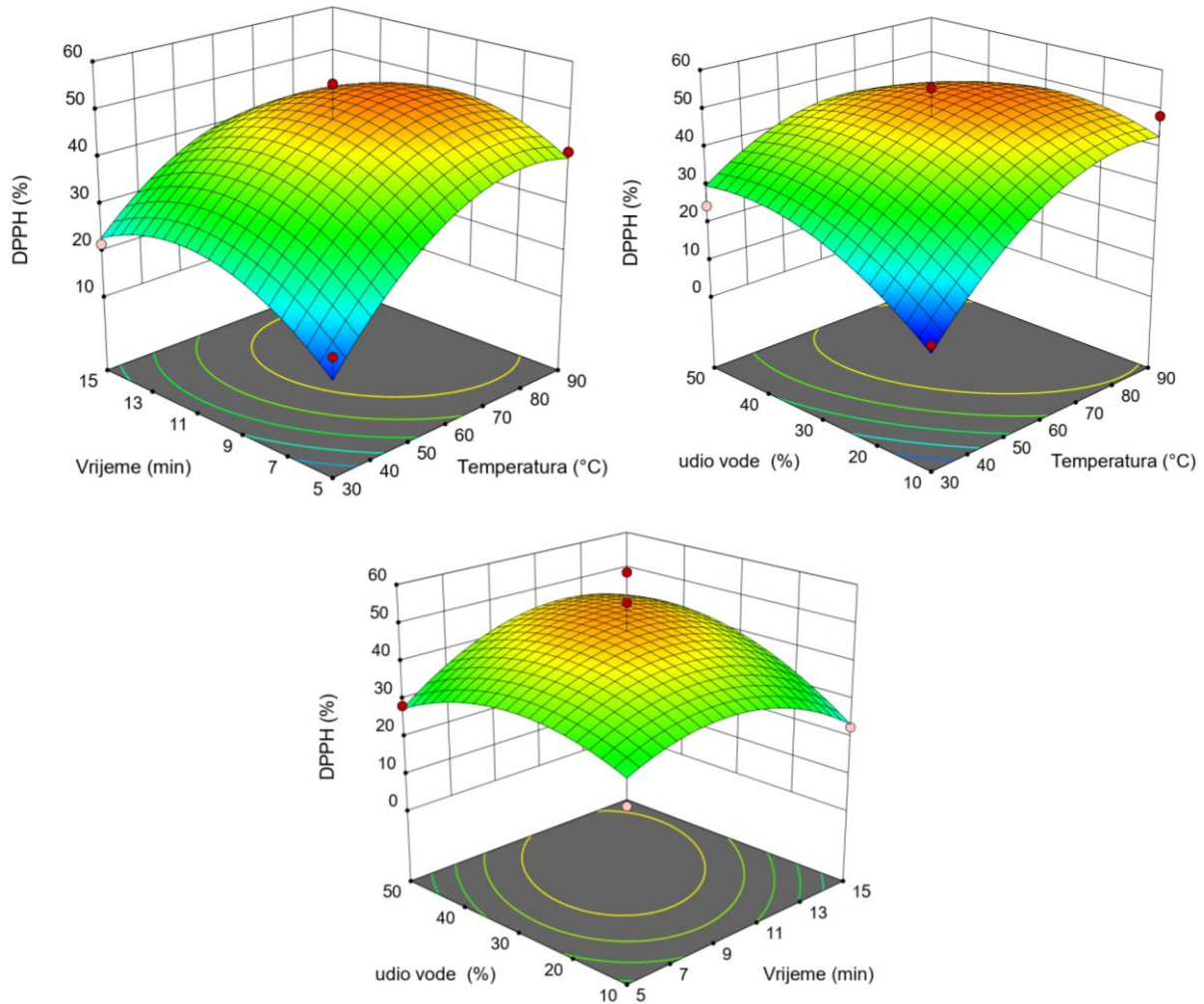
Slika 37 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **ukupnog fenolnog sadržaja** u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i udjelu vode pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima**

Tablica 34 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **antioksidacijske aktivnosti (% DPPH)** pri **ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	2499,90	9	277,77	5,14	0,0211*
X ₁ -Temperatura	834,36	1	834,36	15,44	0,0057*
X ₂ -Vrijeme	22,22	1	22,22	0,4111	0,5418
X ₃ -Udio vode	113,21	1	113,21	2,09	0,1911
X ₁ X ₂	40,76	1	40,76	0,7541	0,4140
X ₁ X ₃	164,27	1	164,27	3,04	0,1248
X ₂ X ₃	118,20	1	118,20	2,19	0,1827
X ₁ ²	461,47	1	461,47	8,54	0,0223*
X ₂ ²	376,34	1	376,34	6,96	0,0335*
X ₃ ²	244,66	1	244,66	4,53	0,0709
Ostatak	378,38	7	54,05		
Nedostatak modela	201,49	3	67,16	1,52	0,3389
Pogreška	176,89	4	44,22		
Ukupno	2878,28	16			
R²	0,8685				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 38 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina antioksidacijske aktivnosti (% DPPH) u ovisnosti o vremenu ekstrakcije, temperaturi i udjelu vode pri ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima

Tablica 35 Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa pri ekstrakciji eutektičkim otapalima potpomognutoj mikrovalovima

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda
Teobromin (Y_1)	$4,76 + 0,2309X_1 + 0,2620X_2 + 0,7129X_3 - 0,2196X_1^2 + 0,0526X_2^2 - 0,7601X_3^2 + 0,0793X_1X_2 - 0,1460X_1X_3 - 0,3902X_2X_3$
Kofein (Y_2)	$1,50 + 0,0365X_1 + 0,0009X_2 + 0,3099X_3 - 0,0458X_1^2 - 0,0426X_2^2 - 0,2800X_3^2 - 0,0312X_1X_2 - 0,0313X_1X_3 + 0,0130X_2X_3$
Kofeinska kiselina (Y_3)	$0,0892 - 0,0036X_1 + 0,0121X_2 + 0,0264 + 0,0083X_1^2 + 0,0091X_2^2 + 0,0039X_3^2 + 0,0151X_1X_2 - 0,0161X_1X_3 - 0,0145X_2X_3$
Katehin (Y_4)	$0,0474 + 0,0005X_1 - 0,0034X_2 + 0,0054X_3 + 0,0107X_1^2 + 0,0024X_2^2 + 0,0009X_3^2 - 0,0035X_1X_2 - 0,0065X_1X_3 - 0,0013X_2X_3$
TPC (Y_5)	$61,13 + 7,34X_1 - 0,7022X_2 - 7,90X_3 - 9,95X_1^2 - 8,47X_2^2 - 0,4909X_3^2 - 5,86X_1X_2 - 9,10X_1X_3 + 1,70X_2X_3$
DPPH (Y_6)	$48,14 + 10,21X_1 + 1,67X_2 + 3,76X_3 - 10,47X_1^2 - 9,45X_2^2 - 7,62X_3^2 - 3,19X_1X_2 - 6,41X_1X_3 + 5,44X_2X_3$

$$^a y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

X_1 : temperatura; X_2 : vrijeme ekstrakcije; X_3 : udio vode

4.2.3. Utjecaj procesnih uvjeta HVED ekstrakcije na sastav ekstrakata kakaove ljuske

Tablica 36 Udjeli bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljuske dobiveni primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja prema BBD

uvjeti metode				Galna kiselina (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Katehin (mg/g)	Kofein (mg/g)	Epikatehin (mg/g)	TPC (mg GAE/g ekstrakta)	%DPPH
Eksp.	omjer tekuće/kruto mL/g*	frekvencija (Hz)	t (min)							
1.	30	40	30	0,171	4,295	0,169	0,574	0,109	69,051	39,900
2.	30	70	60	0,164	4,732	0,209	0,484	0,229	65,205	38,963
3.	30	70	60	0,161	4,484	0,186	0,603	0,215	70,077	36,589
4.	30	100	30	0,219	5,246	0,184	0,752	0,270	72,385	40,368
5.	30	70	60	0,180	4,943	0,216	0,608	0,155	67,000	29,833
6.	30	70	60	0,196	4,531	0,233	0,617	0,133	77,256	41,906
7.	30	70	60	0,143	5,209	0,204	0,542	0,160	66,744	35,686
8.	50	40	60	0,061	4,685	0,047	0,660	0,020	69,051	39,532
9.	30	100	90	0,153	2,866	0,199	0,403	0,134	75,462	41,438
10.	50	100	60	0,091	6,032	0,055	0,850	0,125	92,385	45,452
11.	10	40	60	0,047	3,478	0,083	0,438	0,226	60,846	27,692
12.	10	100	60	0,016	3,750	0,085	0,468	0,212	59,821	27,525
13.	30	40	90	0,145	3,867	0,200	0,509	0,181	77,513	42,241
14.	50	70	30	0,105	4,581	0,098	0,620	0,075	94,949	50,970
15.	50	70	90	0,126	4,103	0,024	0,559	0,093	78,026	44,415
16.	10	70	90	0,046	3,479	0,136	0,431	0,218	58,282	25,552
17.	10	70	30	0,054	2,530	0,168	0,316	0,159	52,385	24,916

4.2.3.1. Statistička analiza parametara HVED

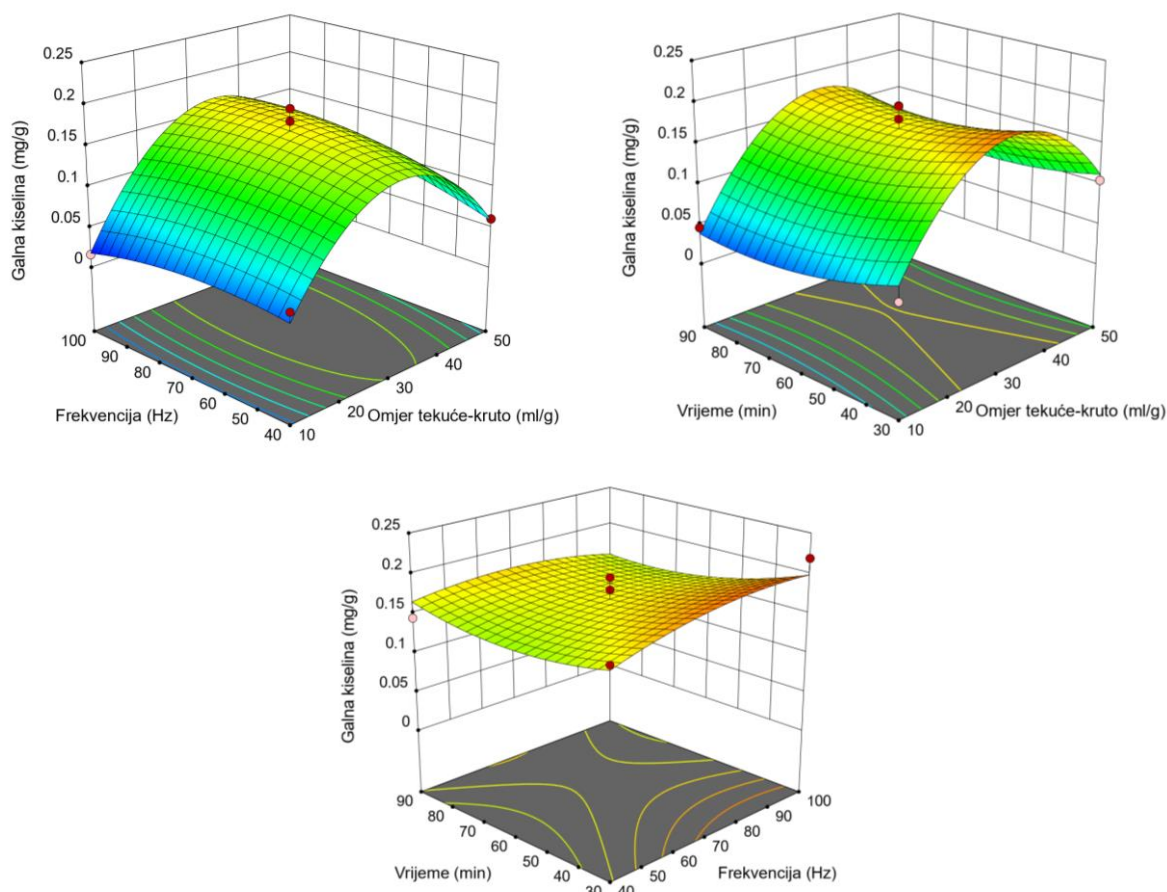
Statistička analiza ANOVA određenih parametara ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja napravljena je samo za najzastupljenije bioaktivne komponente u dobivenim ekstraktima dok za bioaktivne komponente u tragovima kao i one u niskim koncentracijama nije rađena statistička analiza.

Tablica 37 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **galne kiseline** pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0544	9	0,0060	11,69	0,0019*
X_1 -Omjer tekuće/kruto	0,0060	1	0,0060	11,69	0,0112*
X_2 -Frekvencija	0,0004	1	0,0004	0,7163	0,4254
X_3 -Vrijeme	0,0008	1	0,0008	1,53	0,2563
X_1X_2	0,0009	1	0,0009	1,80	0,2220
X_1X_3	0,0002	1	0,0002	0,4148	0,5400
X_2X_3	0,0004	1	0,0004	0,8054	0,3993
X_1^2	0,0438	1	0,0438	84,76	< 0,0001*
X_2^2	0,0007	1	0,0007	1,38	0,2790
X_3^2	0,0011	1	0,0011	2,14	0,1871
Ostatak	0,0036	7	0,0005		
Nedostatak modela	0,0020	3	0,0007	1,68	0,3070
Pogreška	0,0016	4	0,0004		
Ukupno	0,0580	16			
R²	0,9376				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

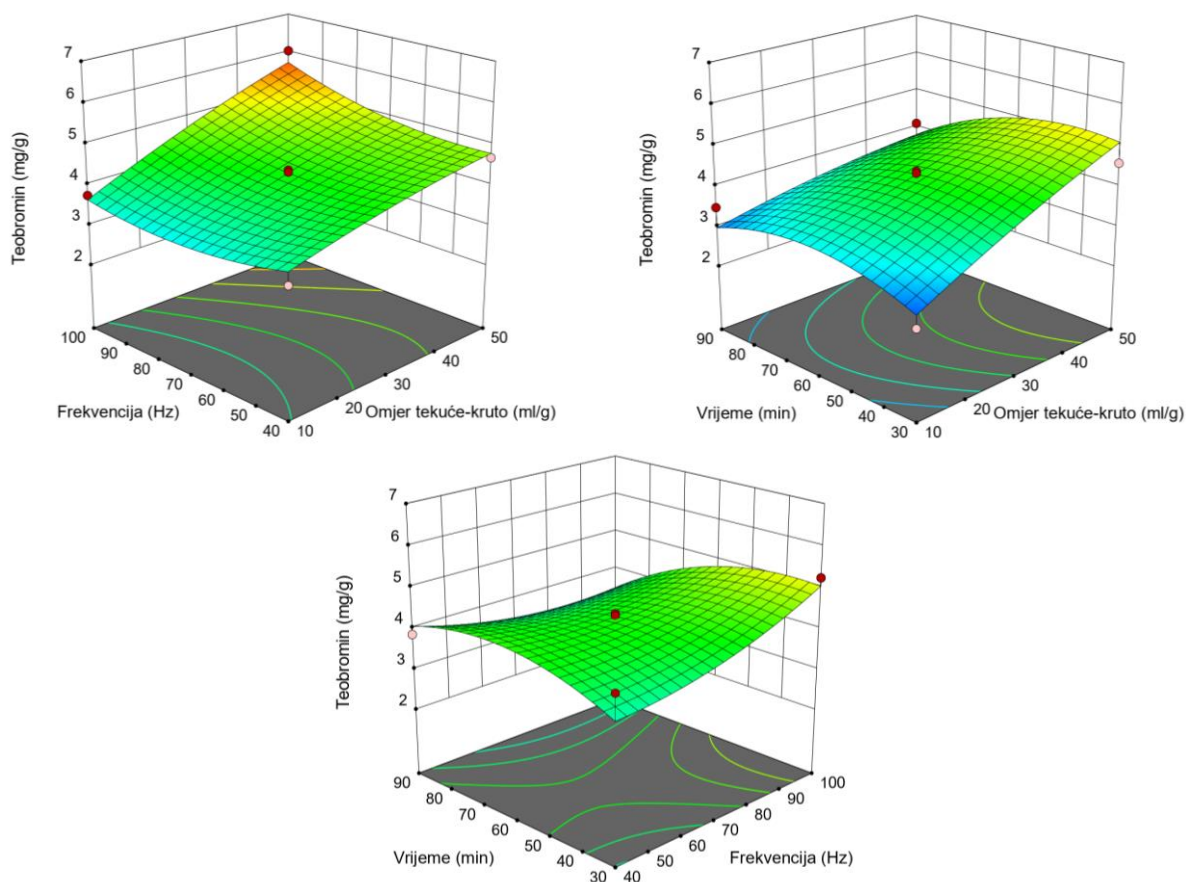


Slika 39 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **galne kiseline** u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruto i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja**

Tablica 38 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **teobromina** pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	10,56	9	1,17	3,84	0,0449*
X_1 -Omjer tekuće/kruto	4,75	1	4,75	15,55	0,0056*
X_2 -Frekvencija	0,3080	1	0,3080	1,01	0,3487
X_3 -Vrijeme	0,6828	1	0,6828	2,24	0,1785
X_1X_2	0,2885	1	0,2885	0,9447	0,3635
X_1X_3	0,5092	1	0,5092	1,67	0,2376
X_2X_3	0,9533	1	0,9533	3,12	0,1206
X_1^2	0,4993	1	0,4993	1,64	0,2418
X_2^2	0,0108	1	0,0108	0,0355	0,8560
X_3^2	2,45	1	2,45	8,01	0,0254*
Ostatak	2,14	7	0,3054		
Nedostatak modela	1,77	3	0,5915	6,52	0,0509
Pogreška	0,3630	4	0,0907		
Ukupno	12,70	16			
R²	0,8317				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

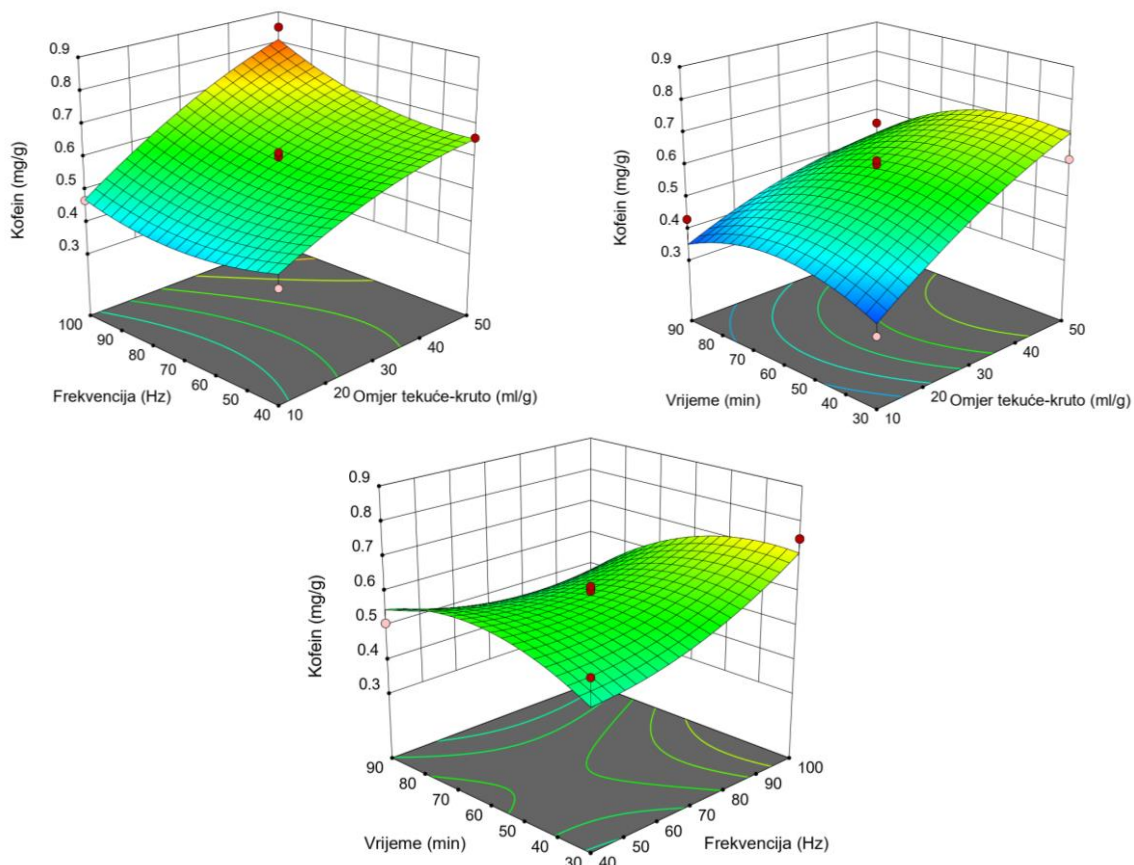


Slika 40 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **teobromina** u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruto i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja**

Tablica 39 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **kofeina** pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,2277	9	0,0253	3,76	0,0472*
X_1 -Omjer tekuće/kruto	0,1339	1	0,1339	19,91	0,0029*
X_2 -Frekvencija	0,0107	1	0,0107	1,59	0,2484
X_3 -Vrijeme	0,0163	1	0,0163	2,43	0,1633
X_1X_2	0,0063	1	0,0063	0,9404	0,3645
X_1X_3	0,0078	1	0,0078	1,16	0,3170
X_2X_3	0,0202	1	0,0202	3,00	0,1269
X_1^2	0,0021	1	0,0021	0,3151	0,5921
X_2^2	0,0130	1	0,0130	1,94	0,2063
X_3^2	0,0188	1	0,0188	2,80	0,1381
Ostatak	0,0471	7	0,0067		
Nedostatak modela	0,0341	3	0,0114	3,49	0,1292
Pogreška	0,0130	4	0,0033		
Ukupno	0,2747	16			
R²	0,8287				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

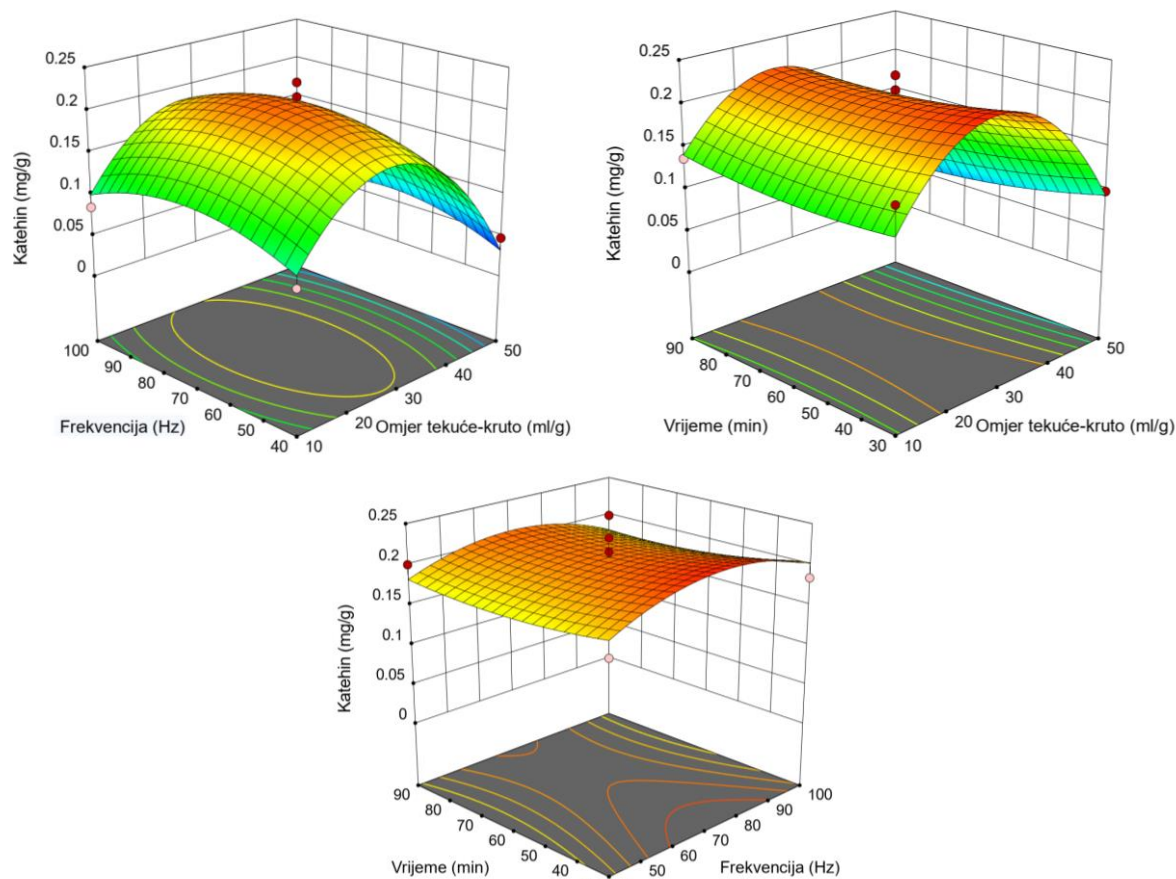


Slika 41 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **kofeina** u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruto i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja**

Tablica 40 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **katehina** pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0670	9	0,0074	9,14	0,0040*
X ₁ -Omjer tekuće/kruto	0,0077	1	0,0077	9,51	0,0177*
X ₂ -Frekvencija	0,0001	1	0,0001	0,0758	0,7910
X ₃ -Vrijeme	0,0004	1	0,0004	0,5454	0,4842
X ₁ X ₂	9,904 · 10 ⁻⁶	1	9,904 · 10 ⁻⁶	0,0122	0,9153
X ₁ X ₃	0,0005	1	0,0005	0,5576	0,4796
X ₂ X ₃	0,0001	1	0,0001	0,0816	0,7834
X ₁ ²	0,0527	1	0,0527	64,77	< 0,0001*
X ₂ ²	0,0038	1	0,0038	4,68	0,0673
X ₃ ²	0,0003	1	0,0003	0,4093	0,5427
Ostatak	0,0057	7	0,0008		
Nedostatak modela	0,0045	3	0,0015	5,19	0,0728
Pogreška	0,0012	4	0,0003		
Ukupno	0,0727	16			
R²	0,9216				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

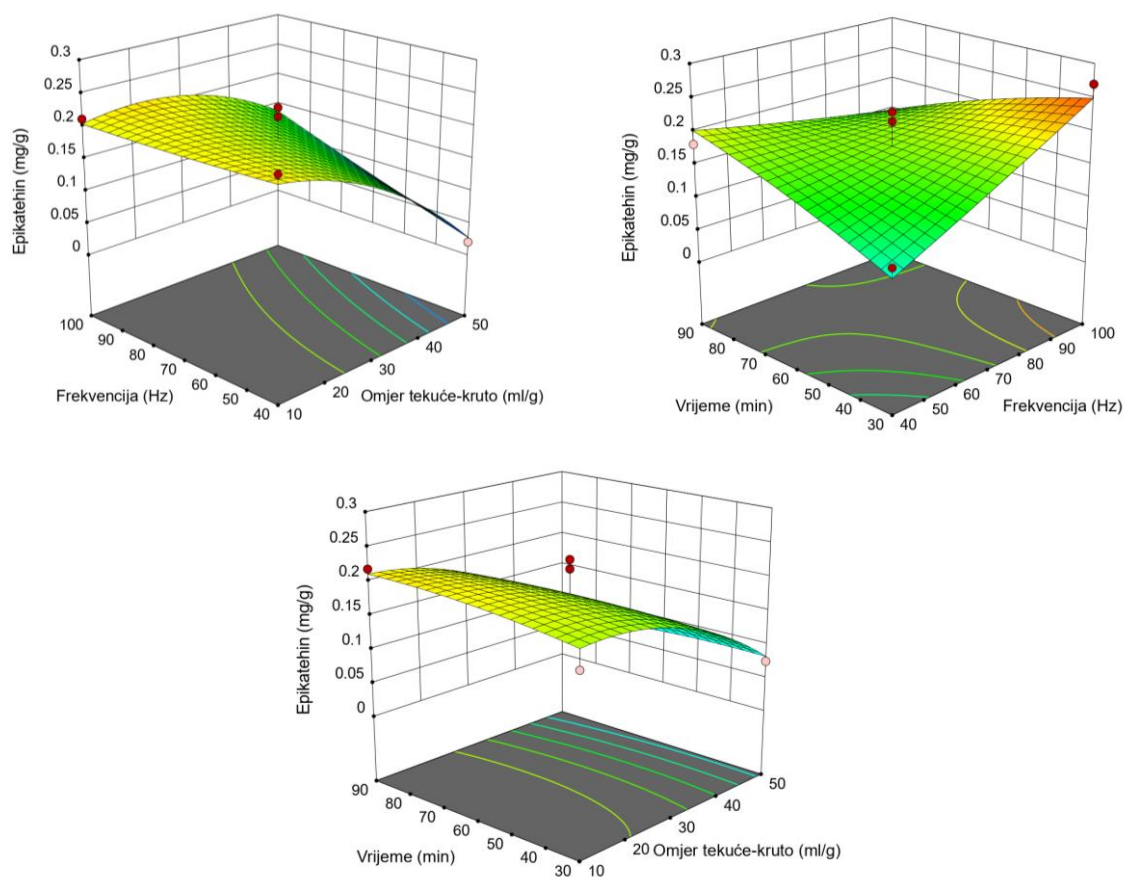


Slika 42 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **katehina** u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruto i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja**

Tablica 41 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **epikatehina** pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,0570	9	0,0063	4,29	0,0340*
X_1 -Omjer tekuće/kruto	0,0315	1	0,0315	21,31	0,0024*
X_2 -Frekvencija	0,0052	1	0,0052	3,53	0,1023
X_3 -Vrijeme	0,0000	1	0,0000	0,0147	0,9068
X_1X_2	0,0036	1	0,0036	2,42	0,1634
X_1X_3	0,0004	1	0,0004	0,2845	0,6103
X_2X_3	0,0109	1	0,0109	7,37	0,0300*
X_1^2	0,0051	1	0,0051	3,44	0,1059
X_2^2	0,0000	1	0,0000	0,0145	0,9076
X_3^2	0,0002	1	0,0002	0,1454	0,7143
Ostatak	0,0103	7	0,0015		
Nedostatak modela	0,0034	3	0,0011	0,6621	0,6173
Pogreška	0,0069	4	0,0017		
Ukupno	0,0674	16			
R²	0,8465				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



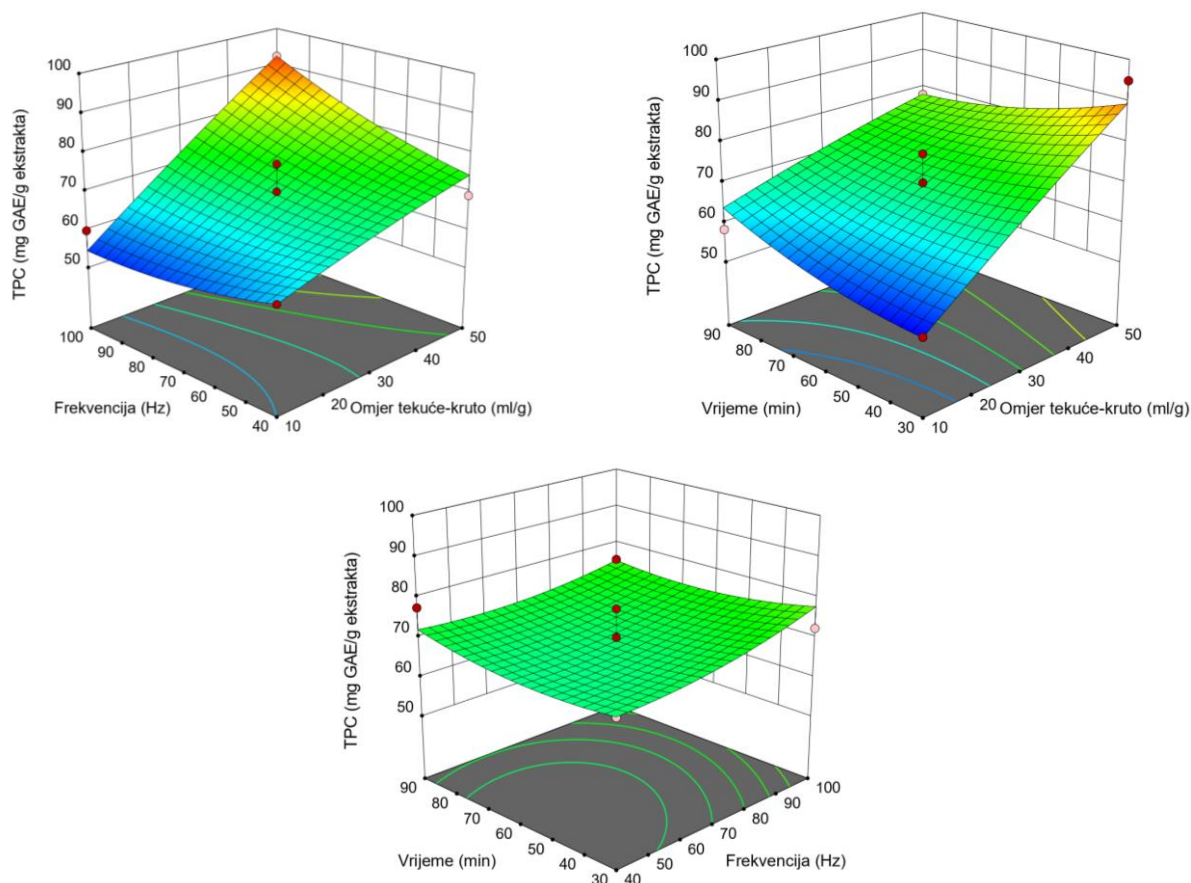
Slika 43 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina epikatehina u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruho i vremenu ekstrakcije pri ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Tablica 42 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva ukupnog fenolnog sadržaja pri ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1726,69	9	191,85	4,99	0,0229*
X_1 -Omjer tekuće/kruho	1328,11	1	1328,11	34,51	0,0006*
X_2 -Frekvencija	69,56	1	69,56	1,81	0,2207
X_3 -Vrijeme	0,0329	1	0,0329	0,0009	0,9775
X_1X_2	148,34	1	148,34	3,85	0,0904
X_1X_3	130,19	1	130,19	3,38	0,1085
X_2X_3	7,25	1	7,25	0,1884	0,6774
X_1^2	2,13	1	2,13	0,0554	0,8207
X_2^2	16,52	1	16,52	0,4293	0,5333
X_3^2	23,56	1	23,56	0,6122	0,4596
Ostatak	269,38	7	38,48		
Nedostatak modela	176,89	3	58,96	2,55	0,1938
Pogreška	92,49	4	23,12		
Ukupno	1996,07	16			
R²	0,8650				

SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

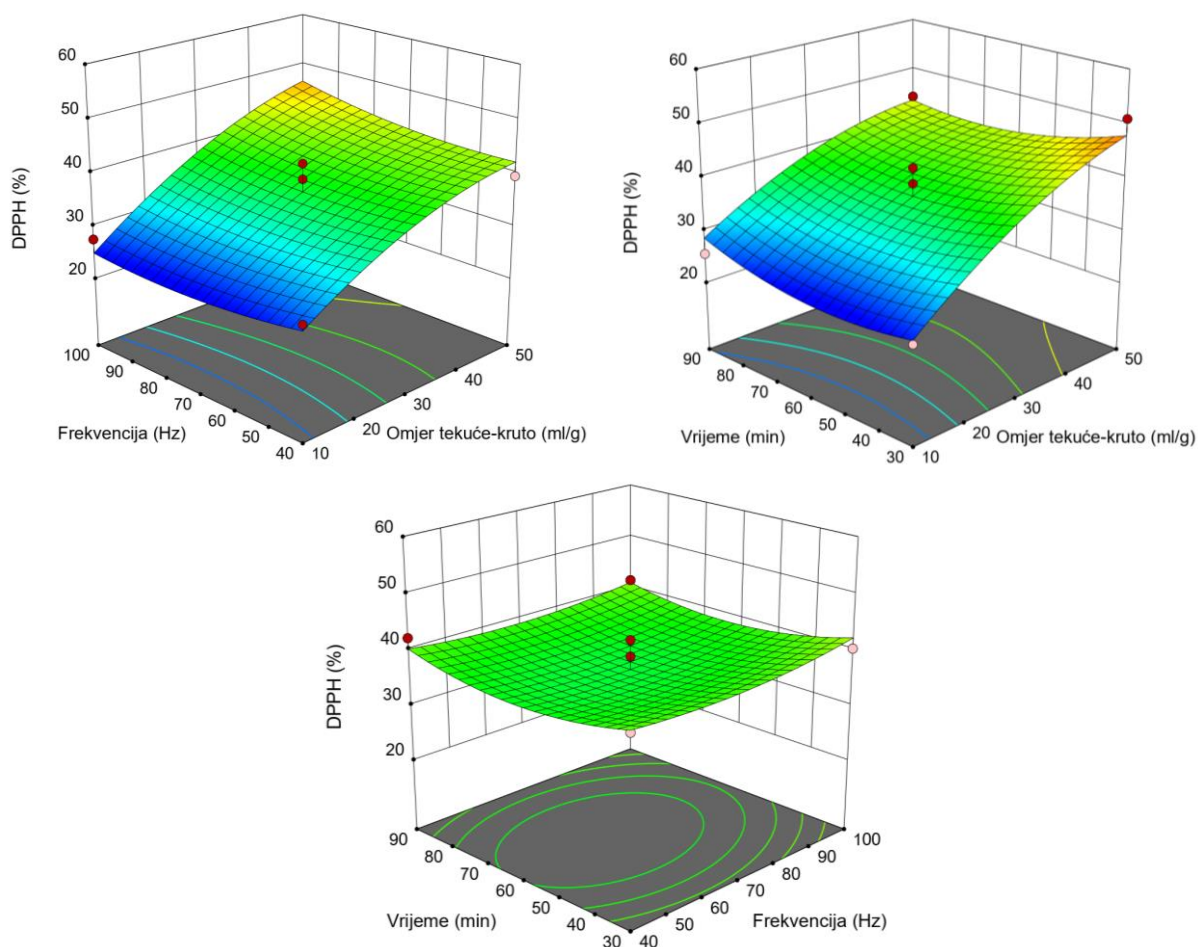


Slika 44 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **ukupnog fenolnog sadržaja** u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruto i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja**

Tablica 43 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **antioksidacijske aktivnosti (% DPPH)** pri **ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	804,05	9	89,34	5,02	0,0225*
X_1 -Omjer tekuće/kruto	697,18	1	697,18	39,17	0,0004*
X_2 -Frekvencija	3,67	1	3,67	0,2062	0,6635
X_3 -Vrijeme	0,7865	1	0,7865	0,0442	0,8395
X_1X_2	9,26	1	9,26	0,5205	0,4940
X_1X_3	12,93	1	12,93	0,7263	0,4223
X_2X_3	0,4038	1	0,4038	0,0227	0,8845
X_1^2	38,77	1	38,77	2,18	0,1835
X_2^2	9,34	1	9,34	0,5246	0,4924
X_3^2	35,46	1	35,46	1,99	0,2009
Ostatak	124,58	7	17,80		
Nedostatak modela	44,21	3	14,74	0,7334	0,5841
Pogreška	80,37	4	20,09		
Ukupno	928,63	16			
R²	0,8658				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 45 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina antioksidacijske aktivnosti (% DPPH) u ovisnosti o frekvenciji, omjeru tekuće/kruho i vremenu ekstrakcije pri ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Tablica 44 Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa pri ekstrakciji primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda
Galna kiselina (Y_1)	$0,1687 + 0,0275X_1 + 0,0068X_2 - 0,0099X_3 - 0,1020X_1^2 - 0,0130X_2^2 + 0,0162X_3^2 + 0,0152X_1X_2 - 0,0073X_1X_3 - 0,0102X_2X_3$
Teobromin (Y_2)	$4,31 + 0,7703X_1 + 0,1962X_2 - 0,2921X_3 - 0,1093X_1^2 + 0,2857X_2^2 - 0,5272X_3^2 + 0,2685X_1X_2 - 0,3568X_1X_3 - 0,4882X_2X_3$
Kofein (Y_3)	$0,5908 + 0,1294X_1 + 0,0365X_2 - 0,0451X_3 - 0,0324X_1^2 + 0,0457X_2^2 - 0,0769X_3^2 + 0,0398X_1X_2 - 0,0442X_1X_3 - 0,0710X_2X_3$
Katehin (Y_4)	$0,2095 - 0,0311X_1 + 0,0028X_2 - 0,0075X_3 - 0,1119X_1^2 - 0,0301X_2^2 + 0,0089X_3^2 + 0,0016X_1X_2 - 0,0107X_1X_3 - 0,0041X_2X_3$
Epikatehin (Y_5)	$0,1784 - 0,0627X_1 + 0,0255X_2 + 0,0016X_3 - 0,0348X_1^2 + 0,0028X_2^2 - 0,0071X_3^2 + 0,0299X_1X_2 - 0,0103X_1X_3 - 0,0522X_2X_3$
TPC (Y_6)	$69,26 + 12,88X_1 + 2,95X_2 + 0,0641X_3 - 0,7115X_1^2 + 1,98X_2^2 + 2,37X_3^2 + 6,09X_1X_2 - 5,71X_1X_3 - 1,35X_2X_3$
DPPH (Y_7)	$36,60 + 9,34X_1 + 0,6773X_2 - 0,3135X_3 - 3,03X_1^2 + 1,49X_2^2 + 2,90X_3^2 + 1,52X_1X_2 - 1,80X_1X_3 - 0,3177X_2X_3$

$$^a y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

X_1 : omjer tekuće/kruho; X_2 : frekvencija; X_3 : vrijeme ekstrakcije

4.2.4. Utjecaj procesnih uvjeta SC-CO₂ ekstrakcije na sastav ekstrakata kakaove ljuske

Tablica 45 Udjeli bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljuske dobiveni primjenom superkričnog CO₂ prema BBD

uvjeti metode				Teobromin (mg/g)	Katehin (mg/g)	Kofein (mg/g)	Vanilin (mg/g)	TPC (mg GAE/g ekstrakta)	% DPPH
Eksp.	Tlak (bar)	T (° C)	t (min)						
1.	200	40	30	0,345	0,019	1,297	tragovi	38,282	6,404
2.	300	50	30	0,450	0,024	1,470	tragovi	33,667	5,622
3.	100	50	30	0,257	0,000	1,119	tragovi	41,615	12,598
4.	300	40	75	0,602	0,018	1,493	tragovi	37,513	3,247
5.	200	50	75	0,291	0,013	0,773	tragovi	29,564	5,171
6.	200	60	30	0,290	0,012	0,850	tragovi	34,949	9,29
7.	200	50	75	0,606	0,031	1,677	tragovi	39,564	7,877
8.	100	50	120	0,734	0,035	1,834	tragovi	72,641	38,364
9.	300	50	120	1,044	0,016	1,140	tragovi	51,359	4,57
10.	200	50	75	0,878	0,037	2,084	tragovi	51,615	5,652
11.	200	50	75	0,784	0,021	1,570	tragovi	41,103	2,435
12.	100	40	75	0,316	0,026	1,362	tragovi	40,077	10,695
13.	100	60	75	0,516	0,027	0,972	tragovi	62,897	30,995
14.	200	60	120	0,843	0,027	2,340	tragovi	55,462	12,629
15.	200	40	120	0,567	0,014	0,964	tragovi	38,538	9,604
16.	300	60	75	1,190	0,058	3,418	tragovi	44,179	11,381
17.	200	50	75	0,249	0,024	1,747	tragovi	45,205	11,635

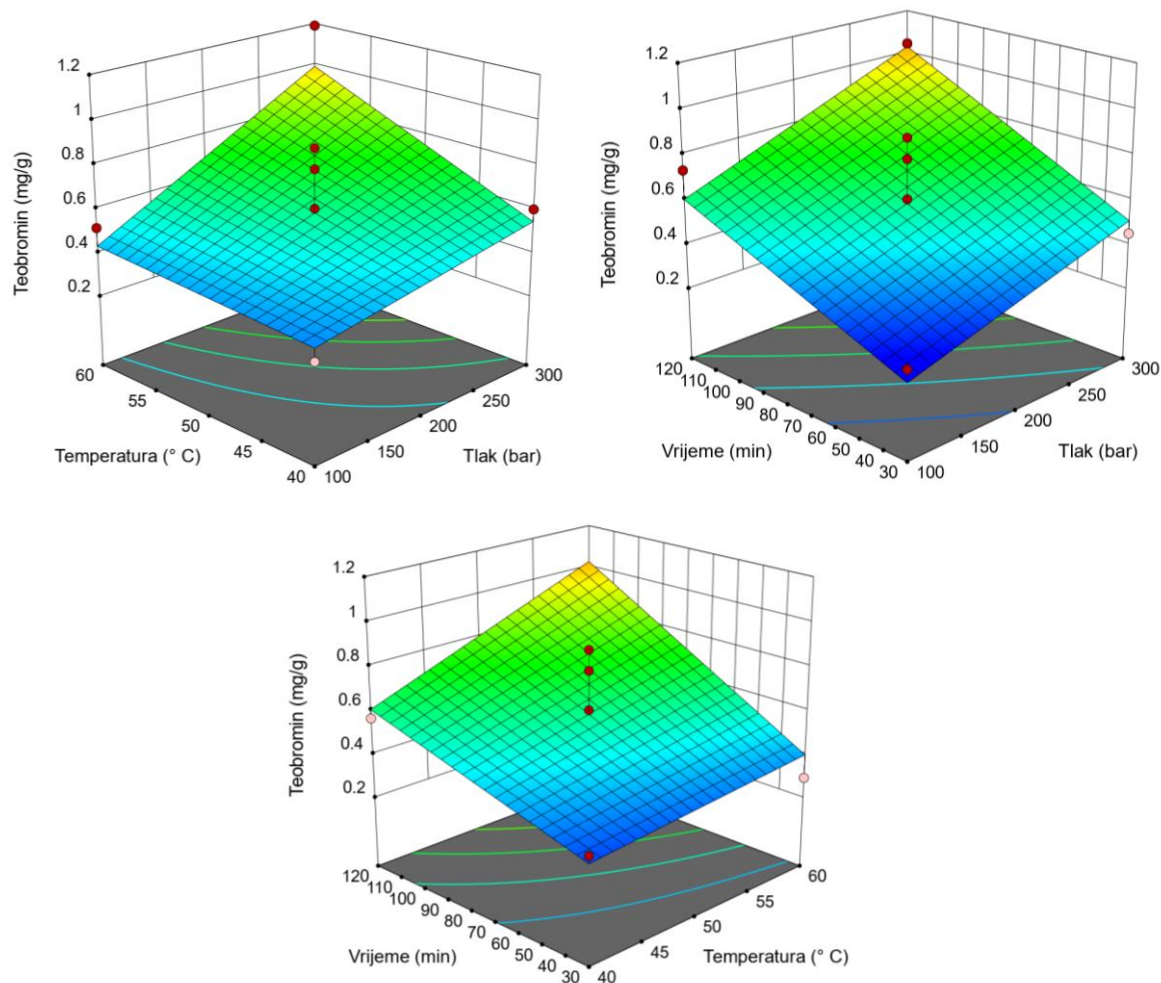
4.2.4.1. Statistička analiza parametara SC-CO₂

Statistička analiza ANOVA određenih parametara ekstrakcije superkritičnim CO₂ napravljena je samo za najzastupljenije bioaktivne komponente u dobivenim ekstraktima dok za bioaktivne komponente u tragovima kao i one u niskim koncentracijama nije rađena statistička analiza.

Tablica 46 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **teobromina** pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂** 2FI modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,888	6	0,1481	3,29	0,0468*
X ₁ -Tlak	0,2675	1	0,2675	5,95	0,0349*
X ₂ -Temperatura	0,1273	1	0,1273	2,83	0,1234
X ₃ -Vrijeme	0,4258	1	0,4258	9,47	0,0117*
X ₁ X ₂	0,0375	1	0,0375	0,8335	0,3828
X ₁ X ₃	0,0034	1	0,0034	0,0765	0,7877
X ₂ X ₃	0,0273	1	0,0273	0,6076	0,4537
Ostatak	0,4496	10	0,0450		
Nedostatak modela	0,1272	6	0,0212	0,2629	0,9287
Pogreška	0,3225	4	0,0806		
Ukupno	1,34	16			
R²	0,6641				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

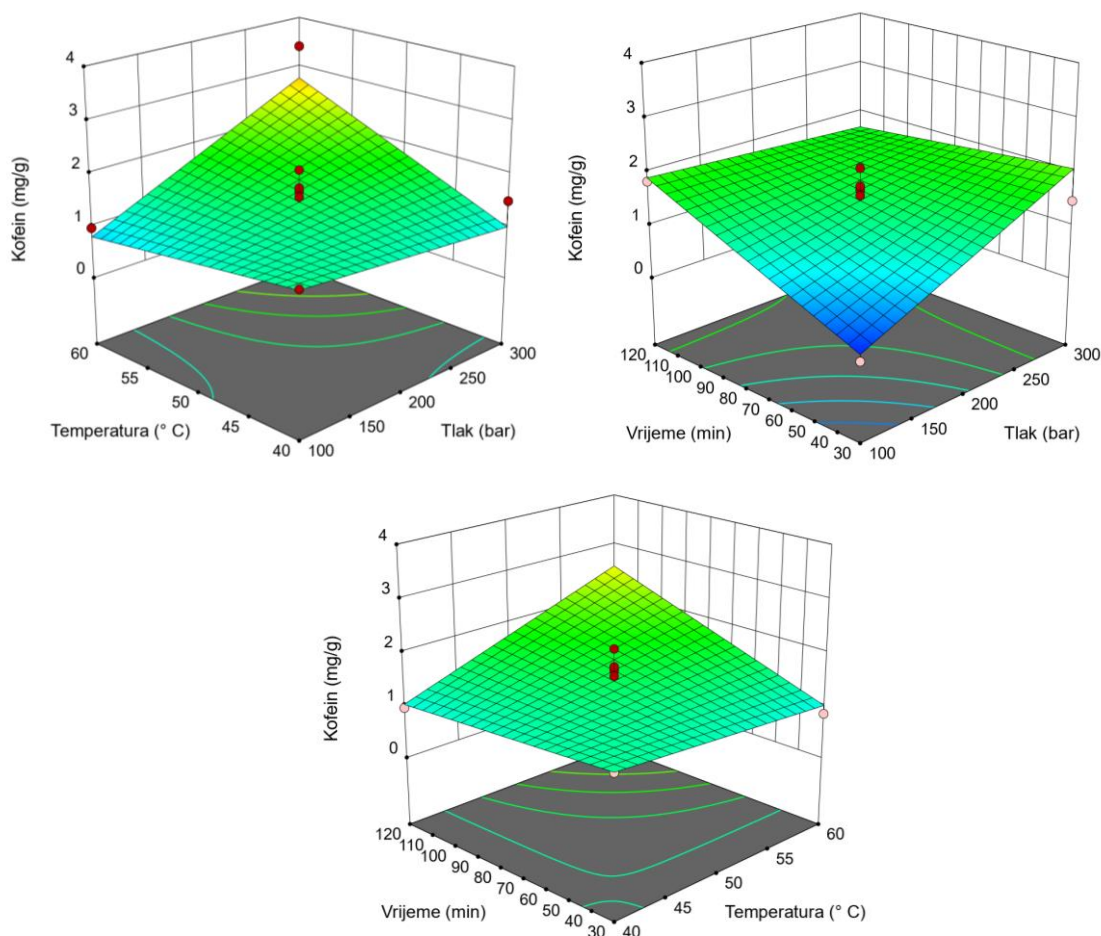


Slika 46 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **teobromina** u ovisnosti o tlaku, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂**

Tablica 47 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **kofeina** pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂** 2FI modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	6,09	6	1,02	4,14	0,0237*
X ₁ -Tlak	1,31	1	1,31	5,34	0,0435*
X ₂ -Temperatura	0,7586	1	0,7586	3,10	0,1090
X ₃ -Vrijeme	0,8077	1	0,8077	3,30	0,0995
X ₁ X ₂	1,34	1	1,34	5,47	0,0415*
X ₁ X ₃	1,05	1	1,05	4,27	0,0657
X ₂ X ₃	0,8315	1	0,8315	3,39	0,0953
Ostatak	2,45	10	0,2450		
Nedostatak modela	1,51	6	0,2513	1,07	0,4980
Pogreška	0,9422	4	0,2355		
Ukupno	8,54	16			
R²	0,7131				

SS–suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

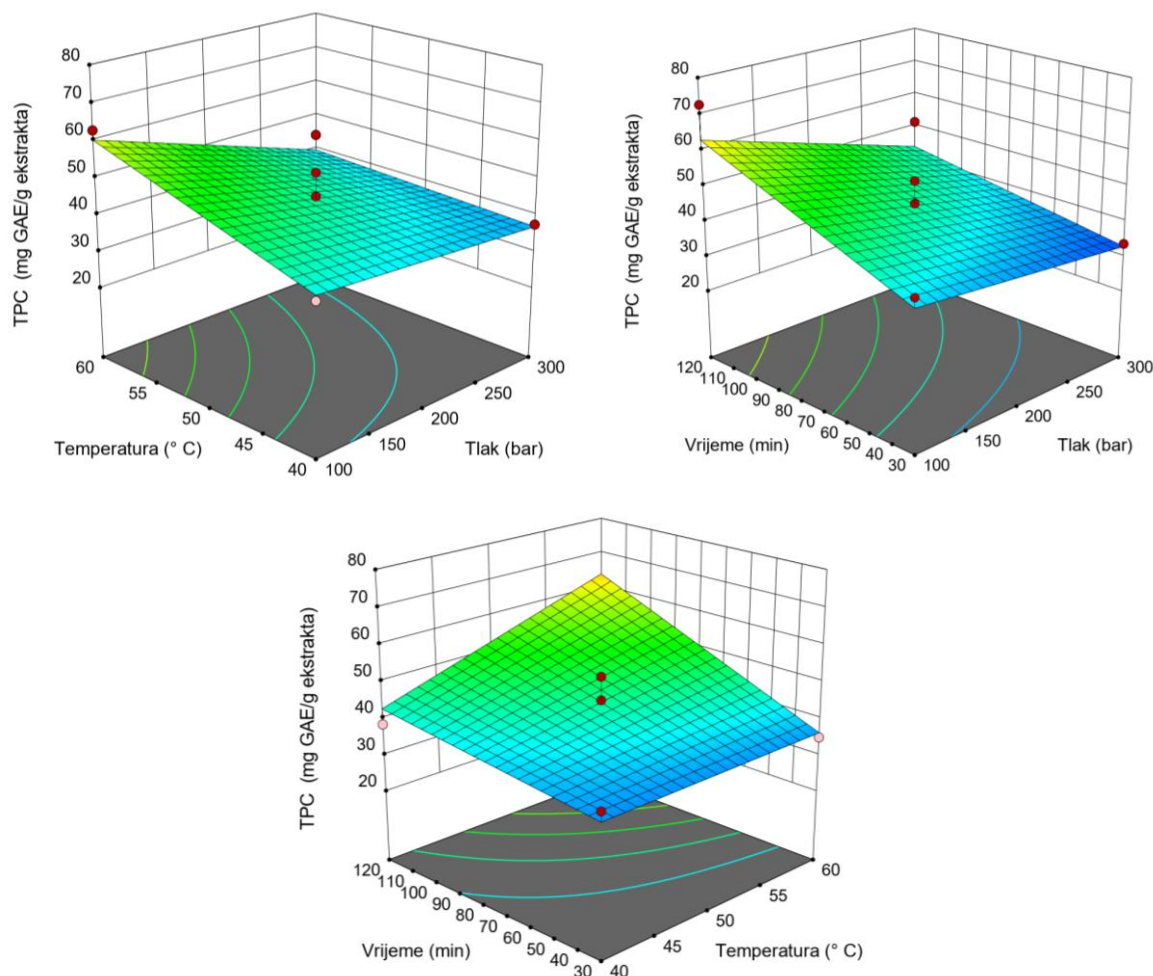


Slika 47 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **kofeina** u ovisnosti o tlaku, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂**

Tablica 48 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **ukupnog fenolnog sadržaja** pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂** 2FI modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1366,71	6	227,79	3,79	0,0310*
X ₁ -Tlak	318,93	1	318,93	5,31	0,0439*
X ₂ -Temperatura	231,95	1	231,95	3,86	0,0777
X ₃ -Vrijeme	603,56	1	603,56	10,05	0,0100*
X ₁ X ₂	65,24	1	65,24	1,09	0,3218
X ₁ X ₃	44,45	1	44,45	0,7403	0,4097
X ₂ X ₃	102,59	1	102,59	1,71	0,2204
Ostatak	600,39	10	60,04		
Nedostatak modela	338,01	6	56,34	0,8589	0,5876
Pogreška	262,37	4	65,59		
Ukupno	1967,10	16			
R²	0,6948				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



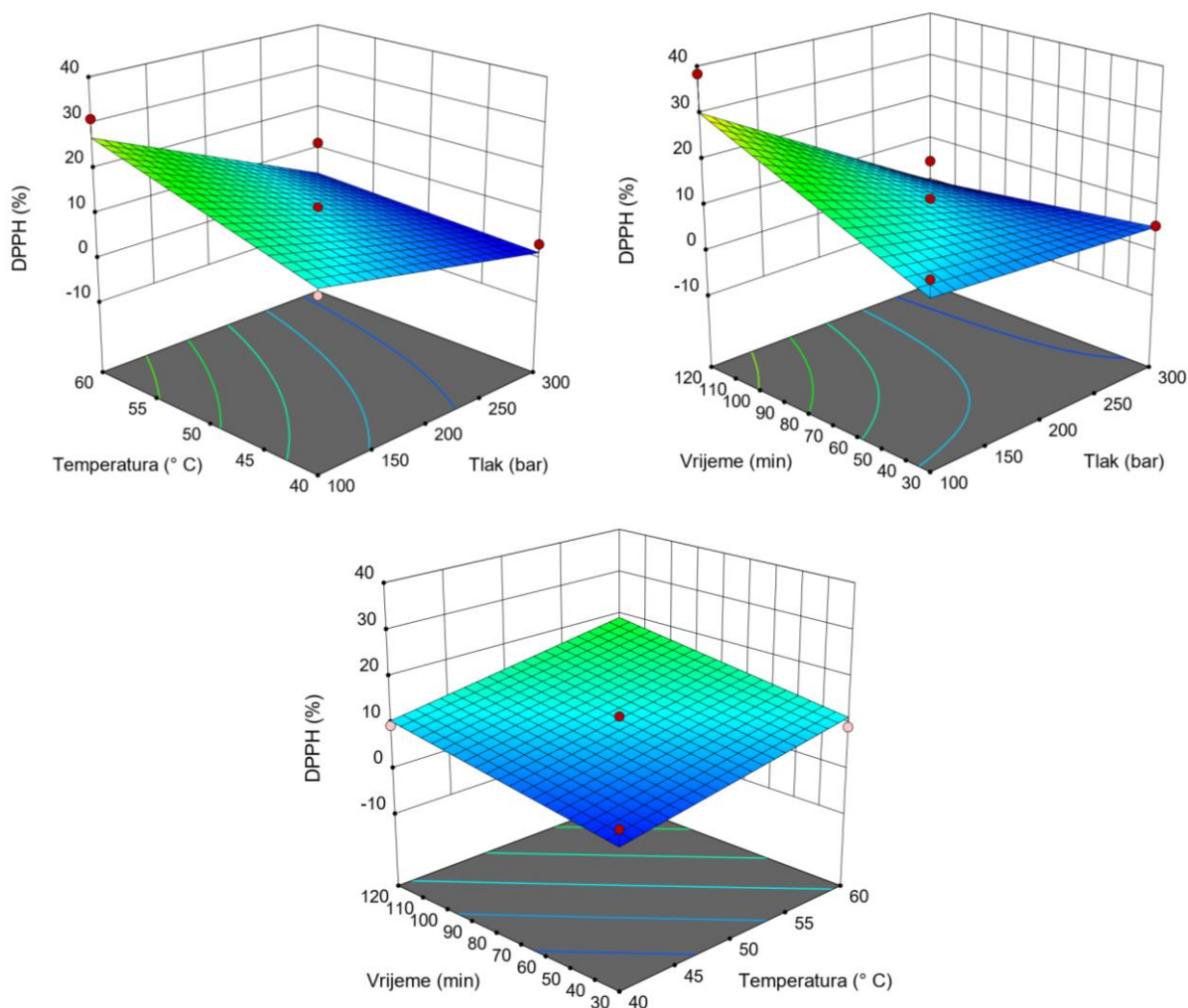
Slika 48 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **ukupnog fenolnog sadržaja** u ovisnosti o tlaku, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂**

Tablica 49 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **% DPPH vrijednosti** pri **ekstrakciji superkritičnim CO₂** 2FI modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1061,50	6	176,92	4,48	0,0185*
X ₁ -Tlak	575,15	1	575,15	14,56	0,0034*
X ₂ -Temperatura	147,45	1	147,45	3,73	0,0821
X ₃ -Vrijeme	122,09	1	122,09	3,09	0,1092
X ₁ X ₂	37,00	1	37,00	0,9370	0,3559
X ₁ X ₃	179,80	1	179,80	4,55	0,0587
X ₂ X ₃	0,0048	1	0,0048	0,0001	0,9914
Ostatak	394,92	10	39,49		
Nedostatak modela	347,66	6	57,94	4,90	0,0728
Pogreška	47,26	4	11,81		
Ukupno	1456,42	16			
R²	0,7288				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca

*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 49 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina % DPPH vrijednosti u ovisnosti o tlaku, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri ekstrakciji superkritičnim CO₂

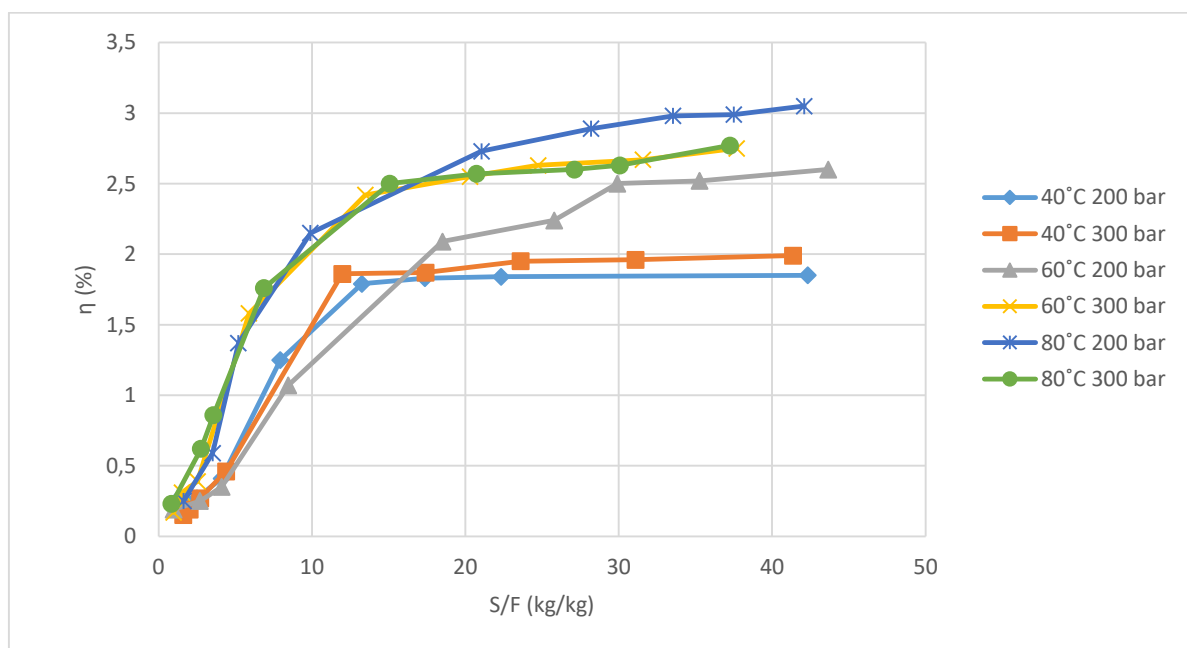
Tablica 50 Procijenjeni koeficijenti 2FI modela nakon implementacije BBD plana pokusa pri ekstrakciji superkritičnim CO₂

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda
Teobromin (Y₁)	$0,5860 + 0,1829X_1 + 0,1261X_2 + 0,2307X_3 + 0,0968X_1X_2 + 0,0293X_1X_3 + 0,0826X_2X_3$
Kofein (Y₂)	$1,48 + 0,4043X_1 + 0,3079X_2 + 0,3178X_3 + 0,5787X_1X_2 - 0,5114X_1X_3 + 0,4559X_2X_3$
TPC (Y₃)	$44,60 - 6,31X_1 + 5,38X_2 + 8,69X_3 - 4,04X_1X_2 - 3,33X_1X_3 + 5,06X_2X_3$
DPPH (Y₄)	$11,07 - 8,48X_1 + 4,29X_2 + 3,91X_3 - 3,04X_1X_2 - 6,70X_1X_3 + 0,0348X_2X_3$

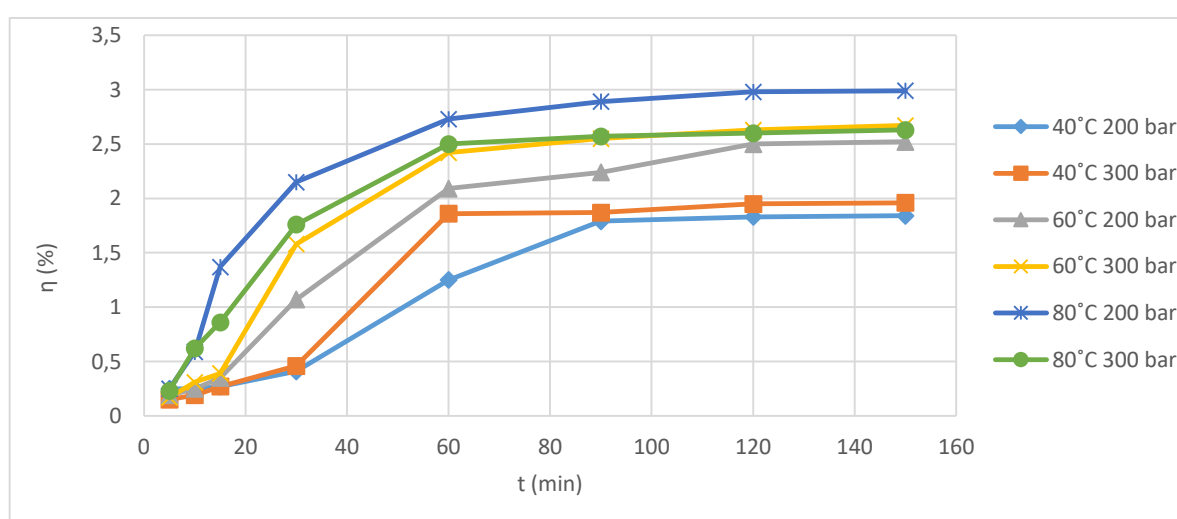
$$^a y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

X₁: tlak; X₂: temperatura; X₃: vrijeme

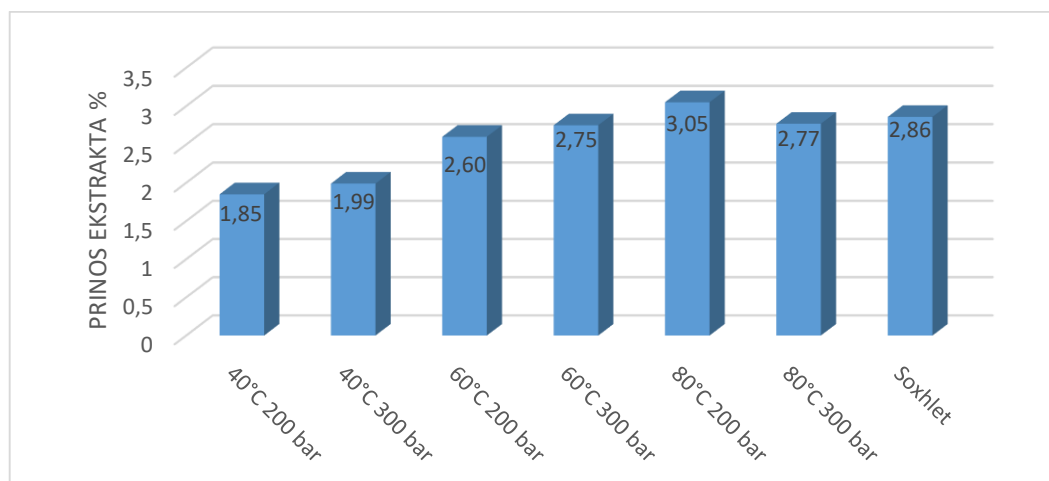
Budući da su se ekstrakti kakaove ljuske dobiveni ekstrakcijom sa superkričnim CO₂ pokazali izuzetno voskastim i prema polaznim pretpostavkama bogati masnim kiselinama (a dokazano iz **Tablice 45** relativno siromašni aktivnim komponentama) provedena su i dodatna istraživanja na tlakovima koji su pokazali veća iskorištenja (200 i 300 bar) ali i na 3 temperature većeg raspona radi usporedbe (40, 60, 80 °C) te je praćena kinetika procesa ekstrakcije (**Slika 50** i **51**). Dobiveni prinosi kao i sastav masnih kiselina uspoređeni su sa standardnom Soxhlet tehnikom (heksan kao otapalo) (**Slika 52**).



Slika 50 Prinos ekstrakta iz kakaove ljuske u ovisnosti o potrošnji CO₂



Slika 51 Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos ekstrakta iz kakaove ljuske tijekom superkrične CO₂ ekstrakcije



Slika 52 Usporedba prinosa ekstrakta dobiven superkričnom CO₂ ekstrakcijom pri različitim procesnim uvjetima i Soxhlet ekstrakcijom sa heksanom

Tablica 51 Sadržaj masnih kiselina u ekstraktima kakaove ljuske dobivenim superkričnom CO₂ ekstrakcijom i Soxhlet ekstrakcijom

Ekstrakcija		Palmitinska kiselina (%)	Palmitooleinska kiselina (%)	Stearinska kiselina (%)	Oleinska kiselina (%)	Linolna kiselina (%)
Superkrična CO ₂ ekstrakcija	40°C, 200 bar	18,130	1,940	14,570	22,880	7,980
	40°C, 300 bar	16,590	1,690	13,720	22,830	7,750
	60°C, 200 bar	20,480	2,080	16,840	24,430	7,860
	60°C, 300 bar	19,960	2,260	15,800	23,430	7,910
	80°C, 200 bar	19,090	2,090	16,150	23,980	7,930
	80°C, 300 bar	20,120	2,420	17,180	24,530	8,090
Soxhlet		17,410	2,390	12,400	19,740	7,590

4.2.5. Utjecaj procesnih uvjeta SWE na sastav ekstrakata kakaove ljske

Tablica 52 Udjeli bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljske dobiveni primjenom vode u supkričnom stanju prema BBD

Uvjeti metode				Galna kis. (mg/g)	HMF (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Teofilin (mg/g)	Katehin (mg/g)	Klorogenska kis. (mg/g)	Kofein (mg/g)	Epikatehin (mg/g)	TPC (mgGAE/g ekstrakta)	%DPPH
Eksp.	Temp (° C)	t (min)	Omjer tekuće/kruto mL/g										
1.	170	45	20	tragovi	tragovi	16,501	tragovi	tragovi	tragovi	0,916	4,480	95,97	62,99
2.	120	75	20	0	0	10,302	0	tragovi	tragovi	0,471	0,500	27,26	19,20
3.	170	45	20	tragovi	tragovi	19,200	tragovi	tragovi	tragovi	0,916	4,760	94,18	52,06
4.	170	75	30	0	tragovi	11,300	tragovi	tragovi	tragovi	0,797	5,910	57,01	48,36
5.	120	45	30	0	0	4,141	0	tragovi	tragovi	0,183	0,520	43,67	31,27
6.	170	75	10	tragovi	tragovi	14,100	tragovi	tragovi	tragovi	0,621	5,430	91,10	64,48
7.	120	45	10	0	0	6,960	0	tragovi	0	0,239	1,101	98,28	63,83
8.	220	45	10	0	tragovi	9,670	1,210	1,010	tragovi	0,460	1,628	93,41	66,33
9.	120	15	20	0	0	7,001	0	tragovi	0	0,337	0,600	94,44	65,46
10.	170	15	10	tragovi	tragovi	11,101	0	tragovi	tragovi	0,846	3,550	96,49	70,51
11.	170	45	20	tragovi	0	18,201	tragovi	tragovi	tragovi	0,893	3,610	101,35	74,47
12.	170	45	20	tragovi	tragovi	12,903	tragovi	tragovi	tragovi	0,792	4,160	85,72	80,60
13.	170	15	30	0	tragovi	12,601	tragovi	tragovi	tragovi	1,070	4,100	33,41	20,24
14.	170	45	20	tragovi	tragovi	14,200	tragovi	tragovi	tragovi	0,934	4,850	113,41	71,89
15.	220	45	30	0	3,500	10,901	0,143	0,959	0,959	0,541	1,938	117,51	83,62
16.	220	15	20	0	9,600	11,703	0,236	0,243	0,243	0,533	1,360	44,95	33,67
17.	220	75	20	0	0,300	11,000	0,521	1,370	1,370	0,545	2,765	130,33	91,69

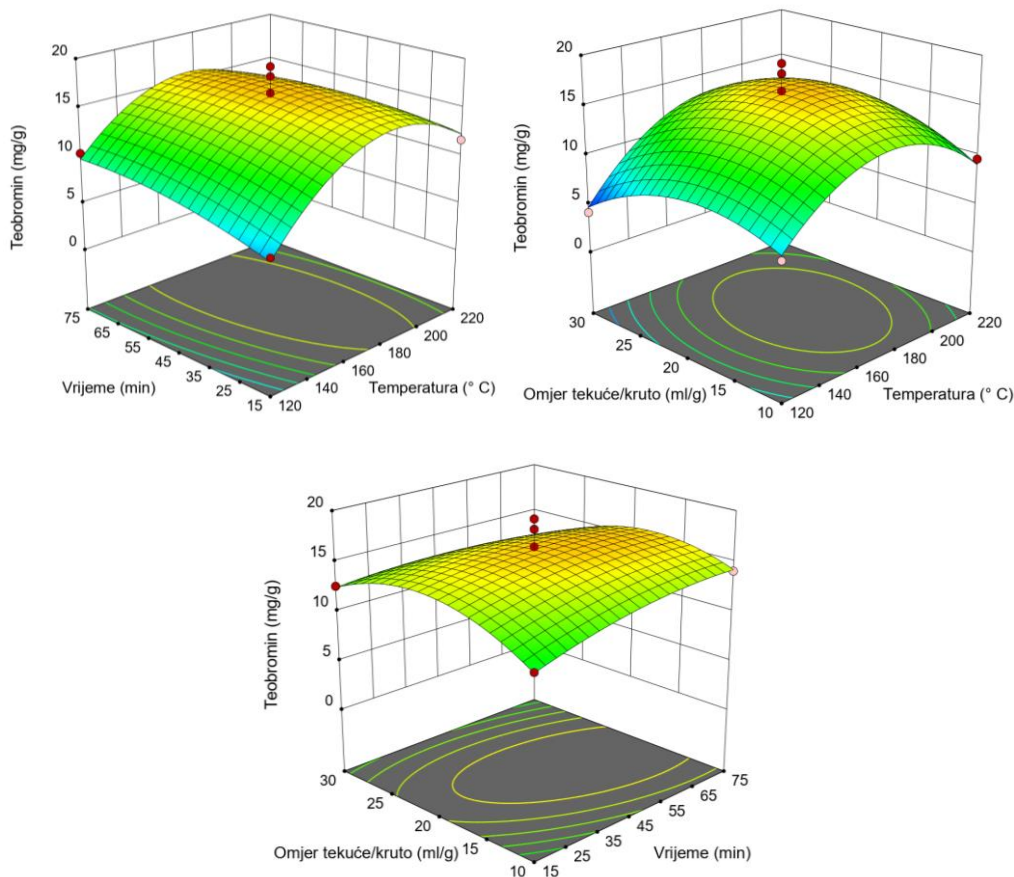
4.2.5.1. Statistička analiza parametara SWE

Statistička analiza ANOVA određenih parametara ekstrakcije vodom u supkritičnom stanju napravljena je samo za najzastupljenije bioaktivne komponente u dobivenim ekstraktima dok za bioaktivne komponente u tragovima kao i one u niskim koncentracijama nije rađena statistička analiza.

Tablica 53 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **teobromina** pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	214,60	9	23,84	5,53	0,0172*
X ₁ -Temperatura	27,64	1	27,64	6,41	0,0391*
X ₂ -Vrijeme	2,31	1	2,31	0,5364	0,4877
X ₃ -Omjer tekuće/kruto	1,04	1	1,04	0,2423	0,6376
X ₁ X ₂	4,00	1	4,00	0,9283	0,3674
X ₁ X ₃	4,10	1	4,10	0,9517	0,3618
X ₂ X ₃	4,62	1	4,62	1,07	0,3348
X ₁ ²	117,33	1	117,33	27,23	0,0012*
X ₂ ²	3,57	1	3,57	0,8293	0,3927
X ₃ ²	37,99	1	37,99	8,82	0,0208*
Ostatak	30,16	7	4,31		
Nedostatak modela	2,18	3	0,7275	0,1040	0,9535
Pogreška	27,98	4	6,99		
Ukupno	244,76	16			
R²	0,8768				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

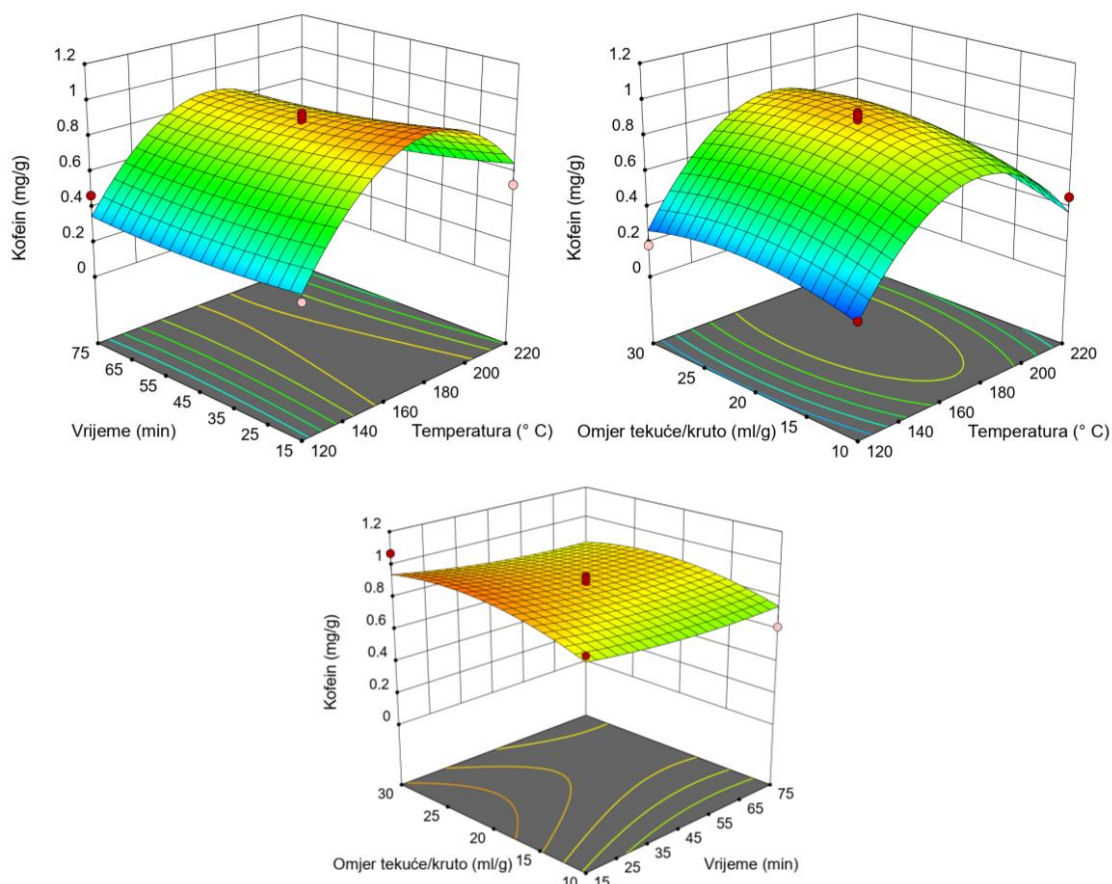


Slika 53 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **teobromina** u ovisnosti o omjeru tekuće/kruto, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju**

Tablica 54 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **koфеina** pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	0,9041	9	0,1005	6,35	0,0118*
X ₁ -Temperatura	0,0901	1	0,0901	5,69	0,00484*
X ₂ -Vrijeme	0,0155	1	0,0155	0,9787	0,3555
X ₃ -Omjer tekuće/kruto	0,0226	1	0,0226	1,43	0,2712
X ₁ X ₂	0,0037	1	0,0037	0,2351	0,6426
X ₁ X ₃	0,0047	1	0,0047	0,2965	0,6030
X ₂ X ₃	0,0006	1	0,0006	0,0364	0,8541
X ₁ ²	0,7365	1	0,7365	46,54	0,0002*
X ₂ ²	0,0149	1	0,0149	0,9427	0,3639
X ₃ ²	0,0133	1	0,0133	0,8411	0,3896
Ostatak	0,1108	7	0,0158		
Nedostatak modela	0,0814	3	0,0271	3,69	0,1199
Pogreška	0,0294	4	0,0074		
Ukupno	1,01	16			
R²	0,8909				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

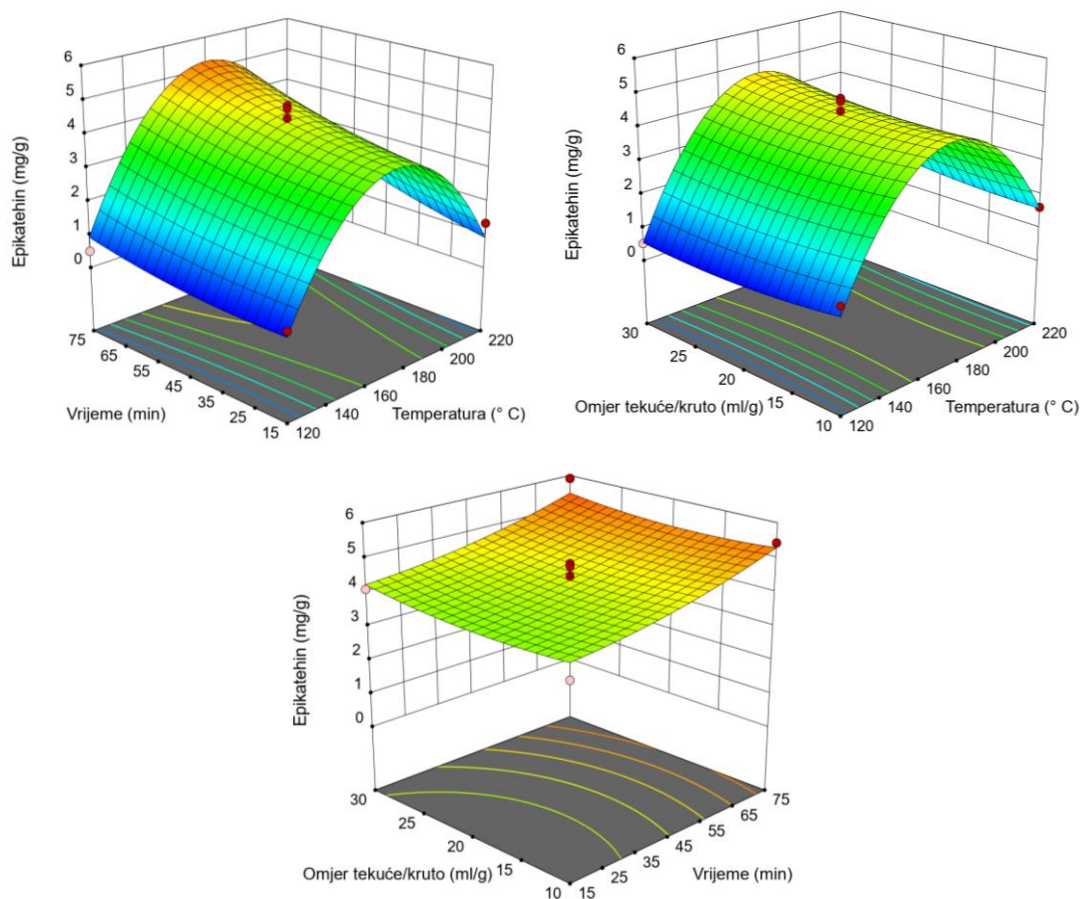


Slika 54 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **kofeina** u ovisnosti o omjeru tekuće/kruto, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju**

Tablica 55 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **epikatehina** pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju** polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	51,75	9	5,75	19,31	0,0004*
X_1 -Temperatura	3,09	1	3,09	10,37	0,0146*
X_2 -Vrijeme	3,12	1	3,12	10,48	0,0143*
X_3 -Omjer tekuće/kruto	0,0722	1	0,0722	0,2425	0,6375
X_1X_2	0,5663	1	0,5663	1,90	0,2103
X_1X_3	0,1980	1	0,1980	0,6651	0,4416
X_2X_3	0,0012	1	0,0012	0,0041	0,9506
X_1^2	44,70	1	44,70	150,15	< 0,0001*
X_2^2	0,1562	1	0,1562	0,5247	0,4923
X_3^2	0,1408	1	0,1408	0,4730	0,5138
Ostatak	2,08	7	0,2977		
Nedostatak modela	1,07	3	0,3559	1,40	0,3650
Pogreška	1,02	4	0,2541		
Ukupno	53,84	16			
R²	0,9613				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

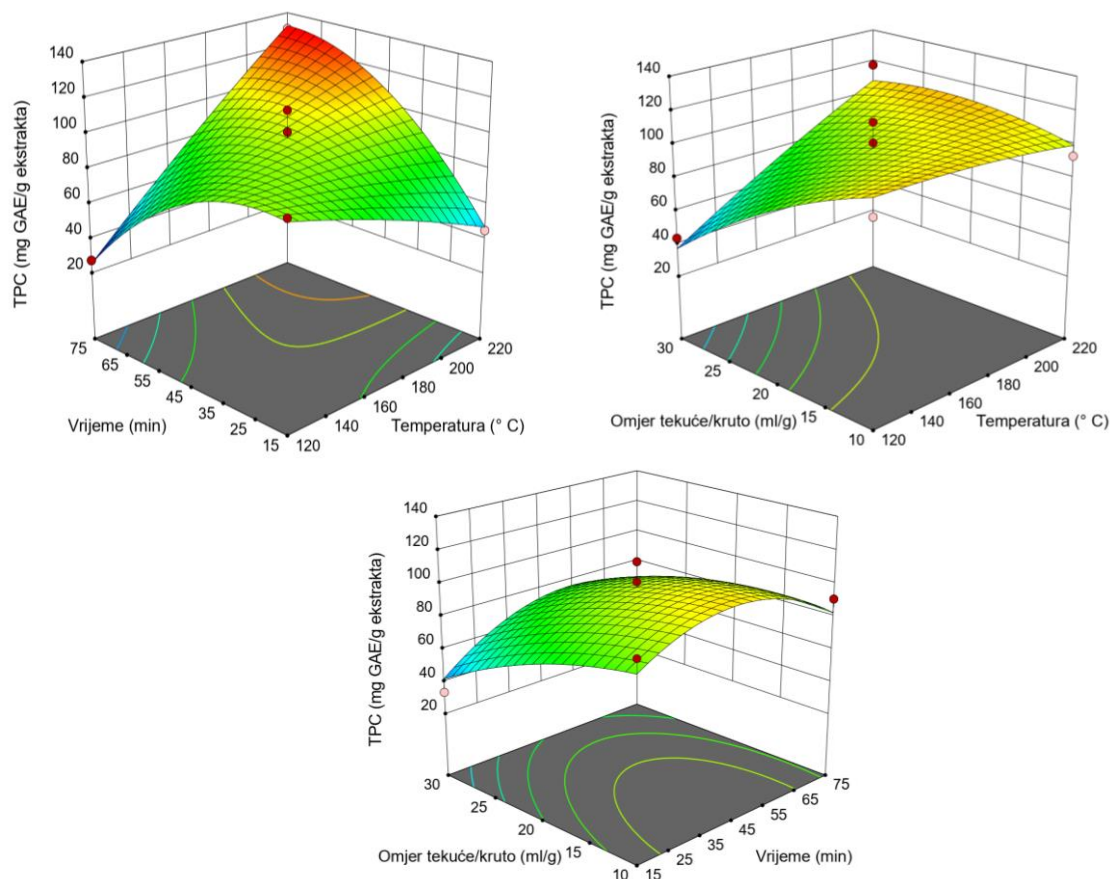


Slika 55 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina epikatehina u ovisnosti o omjeru tekuće/kruto, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju

Tablica 56 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva ukupnog fenolnog sadržaja pri ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	13943,25	9	1549,25	10,81	0,0024*
X_1 -Temperatura	1877,31	1	1877,31	13,10	0,0085*
X_2 -Vrijeme	165,71	1	165,71	1,16	0,3179
X_3 -Omjer tekuće/kruto	2037,77	1	2037,77	14,22	0,0070*
X_1X_2	5818,64	1	5818,64	40,60	0,0004*
X_1X_3	1548,82	1	1548,82	10,81	0,0133*
X_2X_3	210,11	1	210,11	1,47	0,2653
X_1^2	28,09	1	28,09	0,1960	0,6713
X_2^2	1909,91	1	1909,91	13,33	0,0082*
X_3^2	225,95	1	225,95	1,58	0,2495
Ostatak	1003,17	7	143,31		
Nedostatak modela	585,05	3	195,02	1,87	0,2762
Pogreška	418,12	4	104,53		
Ukupno	14946,43	16			
R²	0,9329				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

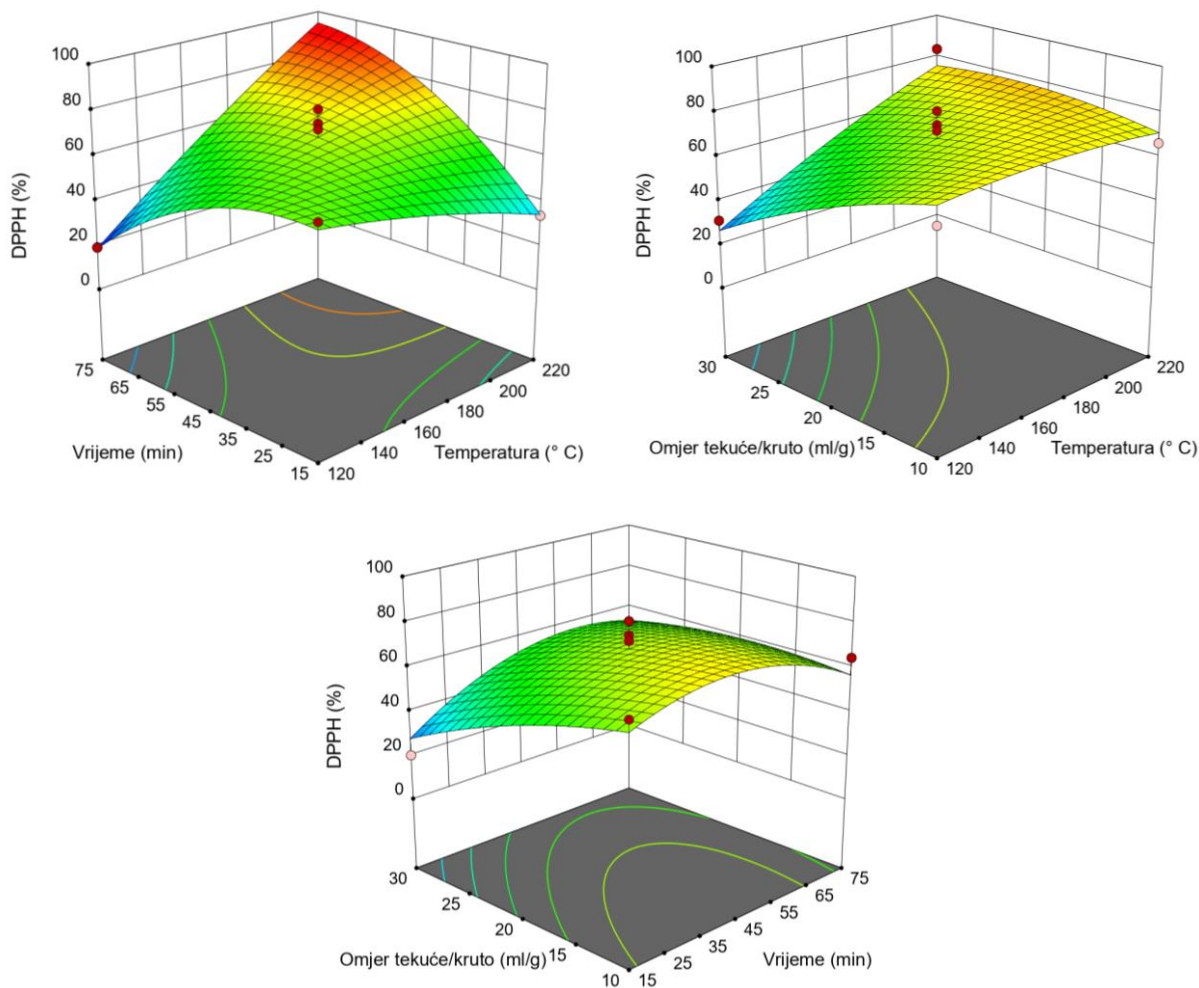


Slika 56 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina **ukupnog fenolnog sadržaja** u ovisnosti o omjeru tekuće/kruto, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju**

Tablica 57 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih odziva **antioksidacijske aktivnosti (% DPPH)** pri **ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju** polinomnim modelom

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	6642,87	9	738,10	6,01	0,0137*
X ₁ -Temperatura	1141,23	1	1141,23	9,30	0,0186*
X ₂ -Vrijeme	143,23	1	143,23	1,17	0,3158
X ₃ -Omjer tekuće/kruto	833,54	1	833,54	6,79	0,0351*
X ₁ X ₂	2718,58	1	2718,58	22,15	0,0022*
X ₁ X ₃	621,26	1	621,26	5,06	0,0592
X ₂ X ₃	291,56	1	291,56	2,38	0,1672
X ₁ ²	32,21	1	32,21	0,2625	0,6242
X ₂ ²	725,99	1	725,99	5,92	0,0453*
X ₃ ²	80,54	1	80,54	0,6562	0,4446
Ostatak	859,15	7	122,74		
Nedostatak modela	365,02	3	121,67	0,9850	0,4842
Pogreška	494,13	4	123,53		
Ukupno	7502,03	16			
R²	0,8855				

SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df–stupnjevi slobode; MS–varijanca
*utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$



Slika 57 Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina antioksidacijske aktivnosti (% DPPH) u ovisnosti o omjeru tekuće/kruto, temperaturi i vremenu ekstrakcije pri ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju

Tablica 58 Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa pri ekstrakciji vodom u supkritičnom stanju

Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda
Teobromin (Y_1)	$16,20 + 1,86X_1 + 0,5375X_2 - 0,3612X_3 - 5,28X_1^2 - 0,9212X_2^2 - 3,00X_3^2 - 1,00X_1X_2 + 1,01X_1X_3 - 1,07X_2X_3$
Kofein (Y_2)	$0,8902 + 0,1061X_1 - 0,0440X_2 + 0,0531X_3 - 0,4182X_1^2 + 0,0595X_2^2 - 0,0562X_3^2 - 0,0305X_1X_2 + 0,0343X_1X_3 - 0,0120X_2X_3$
Epikatehin (Y_3)	$4,37 + 0,6214X_1 + 0,6244X_2 + 0,0950X_3 - 3,26X_1^2 + 0,1926X_2^2 + 0,1829X_3^2 + 0,3762X_1X_2 + 0,2225X_1X_3 - 0,0175X_2X_3$
TPC (Y_4)	$98,13 + 15,32X_1 + 4,55X_2 - 15,96X_3 - 2,58X_1^2 - 21,30X_2^2 - 7,33X_3^2 + 38,14X_1X_2 + 19,68X_1X_3 + 7,25X_2X_3$
DPPH (Y_5)	$68,40 + 11,94X_1 + 4,23X_2 - 10,21X_3 - 2,77X_1^2 - 13,13X_2^2 - 4,37X_3^2 + 26,07X_1X_2 + 12,46X_1X_3 + 8,54X_2X_3$

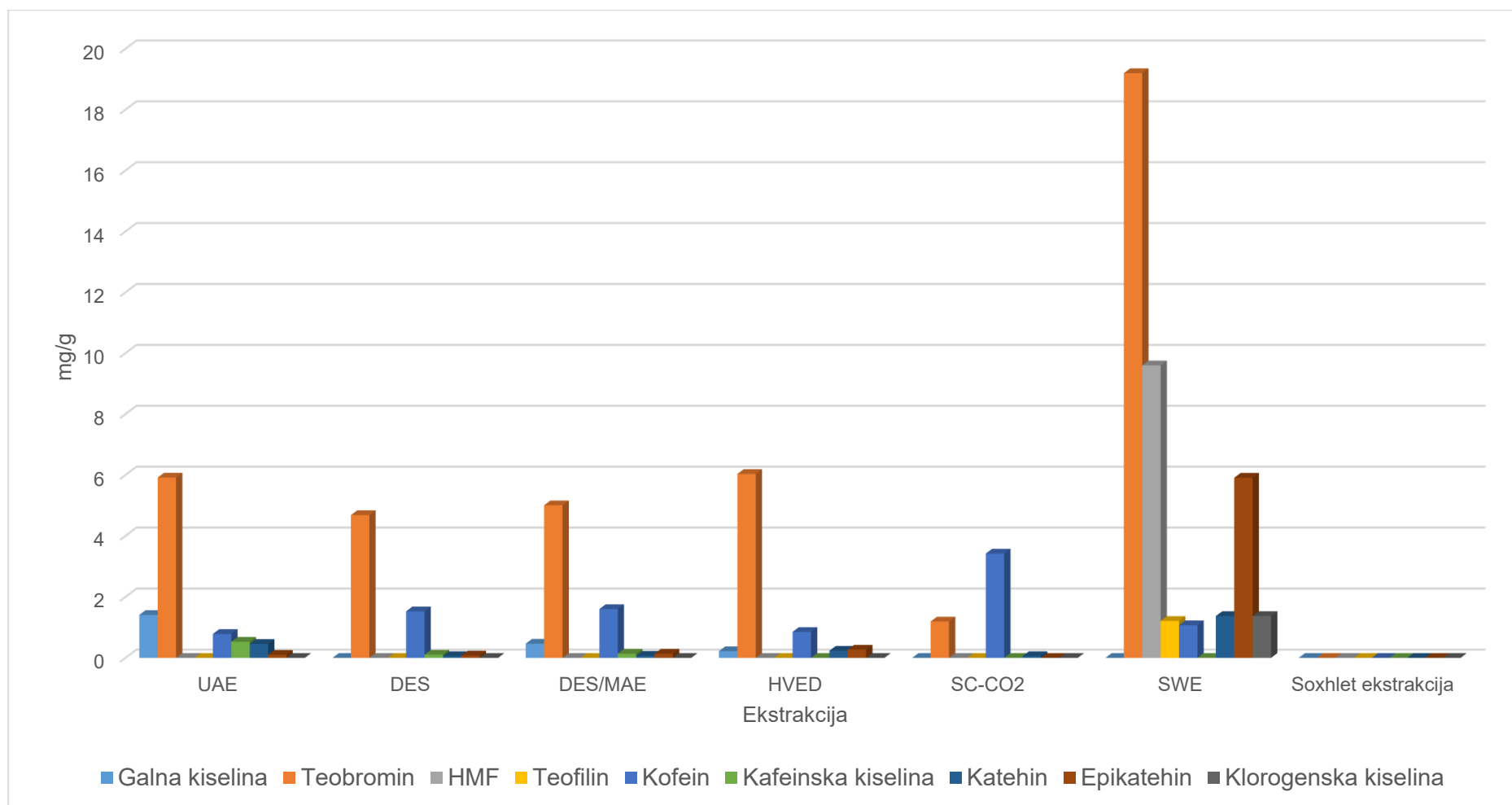
$$^a y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

X_1 : Temperatura; X_2 : Vrijeme ekstrakcije; X_3 : Omjer tekuće/kruto

4.3. USPOREDBA UČINKOVITOSTI ODABRANIH ZELENIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

Tablica 59 Prikaz izračunatih optimalnih uvjeta i koncentracija bioaktivnih komponenata koje se mogu ekstrahirati odabranim zelenim tehnikama ekstrakcije

Ekstrakcijska tehnika	Optimalni uvjeti	Bioaktivne komponente
UAE	Temperatura = 69,45 °C Vrijeme = 44,26 min Omjer tekuće/kruto = 49,99 mL/g Snaga = 69,99 %	Teobromin = 5,234 mg/g Kofein = 0,741 mg/g Katehin = 0,341 mg/g Galna kiselina = 1,434 mg/g TPC = 118,38 mg GAE/g ekstr. DPPH = 81,846 %
DES/MAE	Temperatura = 71,09 °C Vrijeme = 10,06 min Udio vode = 32,86%	Teobromin = 4,897 mg/g Kofein = 1,545 mg/g Kafeinska kiselina = 0,137 mg/g Katehin = 0,065 mg/g TPC = 60,834 mg GAE/g ekstr. DPPH = 50,538 %
HVED	Omjer tekuće/kruto = 47,54 mL/g Frekvencija = 99,85 Hz Vrijeme = 30,11 min	Galna kiselina = 0,189 mg/g Teobromin = 6,177 mg/g Kofein = 0,873 mg/g Katehin = 0,161 mg/g Epikatehin = 0,228 mg/g TPC = 98,823 mg GAE/g ekstr. DPPH = 51,004 %
SFE	Temperatura = 60 °C Tlak = 134,94 bar Vrijeme = 120 min	Teobromin = 0,824 mg/g Kofein = 2,252 mg/g TPC = 72,641 mg GAE/g ekstr. DPPH = 31,161 %
SWE	Temperatura = 191,37 °C Vrijeme = 57,69 min Omjer tekuće/kruto = 19,89 mL/g	Teobromin = 15,916 mg/g Kofein = 0,834 mg/g Epikatehin = 4,756 mg/g TPC = 109,26 mg GAE/g ekstr. DPPH = 77,168 %



Slika 58 Sumarni grafički prikaz maksimalnih udjela bioaktivnih komponenata (mg/g) u ekstraktima kakaove ljuske dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije

5. RASPRAVA

5.1. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA ODABRANIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE NA SASTAV EKSTRAKATA KAKAOVE LJUSKE

Za postizanje najbolje učinkovitosti neke konvencionalne ili nekonvencionalne tehnike ekstrakcije osim poznavanja svojstava matriksa polaznog materijala, kemije ciljanih bioaktivnih komponenata te karakteristika odabranog otapala, na proces ekstrakcije utječu i brojni procesni parametri ovisno o odabranoj tehnici ekstrakcije (poput tlaka, temperature, vremena ekstrakcije, omjera tekuće/kruće, snage ultrazvuka, snage mikrovalova, veličine čestica uzorka, frekvencije, protoka otapala i dr.) (Koffi i sur., 2010).

Preliminarna istraživanja objavljena u radu Pavlović i sur. (2019) na odabranim zelenim tehnikama ekstrakcije bioaktivnih komponenata (teobromina i kofeina) iz kakaove ljuske, dokazala su značajno bolju učinkovitost inovativnih zelenih tehnika ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom u izolaciji ciljanih komponenti kao i boljoj antioksidacijskoj aktivnosti dobivenih ekstrakata. Soxhlet metoda nije se pokazala kao dobar izbor za ekstrakciju ciljanih komponenti iz kakaove ljuske zbog dugotrajnosti procesa te primjene visokih temperatura. Mazzutti i sur. (2018) su u svom radu podsjetili na poznatu činjenicu kako visoka temperatura tijekom Soxhlet ekstrakcije smanjuje površinsku napetost i viskoznost otapala dopuštajući aktivnim tvarima ulazak u kruti materijal povećavajući time i moć otapanja. Ovaj način konvencionalne ekstrakcije je stoga prikladan za komponente topive u mastima dok je za metilksantine poznato kako su zapravo topivi u vodenom mediju. Proučavajući ukupni fenolni sadržaj te antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kakaove ljuske dobivenih različitim metodama ekstrakcije autori su došli do zaključka kako su ekstrakti dobiveni integriranim zelenim ekstrakcijskim tehnikama (ekstrakti kakaove ljuske dobiveni ekstrakcijom stlačenim etanolom nakon odmaščivanja superkričnim CO₂) dale veći ukupni fenolni sadržaj (od 35 do 51 mg GAE/g_{ekstr.} u zavisnosti od primjenjenih uvjeta ekstrakcije) kao i veću antioksidacijsku aktivnost od ekstrakata dobivenih primjenom superkričnog CO₂ te stlačenog etanola kao zasebnim tehnikama. Istakli su važnost ovih metoda pri dobivanju dvije bitne nutritivne frakcije iz kakaove ljuske, masnog ekstrakta dobivenog nakon SC-CO₂ te ekstrakta obogaćenog fenolima nakon ekstrakcije stlačenim etanolom. Zaključno tome, autori su sugerirali kako ovaj nusproizvod može biti vrijedan izvor bioaktivnih komponenti za primjenu u različitim proizvodnjama poput prehrambene, kozmetičke, farmaceutske ili biomedicinske industrije.

Slijedom preliminarnih istraživanja (Pavlović i sur., 2019), dobivenih kromatograma ekstrakata i dostupne literature, analizirano je jedanaest (11) potencijalnih komponenti za koje je pretpostavljeno da bi mogle biti prisutne u uzorcima kakaove ljuske (teobromin, kofein, teofilin, galna kiselina, epikatehin, epigalokatehin, katehin, klorogenska kiselina, kafeinska kiselina,

vanilin te 5-HMF-radi potencijalne termičke degradacije). Od svih jedanaest analiziranih bioaktivnih komponenti, metilksantini (teobromin i kofein) bili su najzastupljeniji u ekstraktima.

S obzirom na pretpostavljene i literaturno dokazane činjenice vezane uz značajan utjecaj veličine čestica uzorka na sam učinak ekstrakcije (Jokić, 2011) pri svim se eksperimentima koristila konstantna veličina čestica kakaove ljuške od 0,282 mm (prethodno određena prosijavanjem na standardnoj seriji sita, **Tablica 17**).

Prema 2. principu Zelene ekstrakcije prirodnih proizvoda, kao otapalo u ekstrakcijama uglavnom se koristi voda (Chemat i sur., 2012) koja se u većini slučajeva može smatrati najzelenijim otapalom. Ekološki je prihvatljiva, netoksična, nezapaljiva te pruža mogućnost za sigurnu i čistu obradu kao i spriječavanje zagađenja (Chemat i sur., 2019). Proteklih je godina, uporaba vode kao otapala u zelenim ekstrakcijama znatno porasla. Njezina fizikalno-kemijska svojstva koja su promjenjiva od sobnih pa sve do onih blizu kritičnih uvjeta gdje su tlak i temperatura odmah ispod kritične točke, čine ju iznimno zanimljivom za ekstrakciju (Castro-Puyana i sur., 2017; Plaza i Turner, 2015). Voda kao polarno otapalo otapa razne bioaktivne komponente te se široko upotrebljava u različitim metodama ekstrakcije, bilo konvencionalnim ili modernim (Mihaylova i sur., 2019). Iako je voda polarna molekula te u najvećoj mjeri otapa polarne komponente, pri višim temperaturama i tlakovima njezina se polarnost značajno smanjuje kako se vodikove veze cijepaju (Chemat i sur., 2019). Voda je pak također i najčešći medij za kavitacijski tretman zbog toga što prenosi ultrazvučne valove koji remete stanične stijenke (Chemat i sur., 2009). Dodatak određene količine vode u DES smjese može pak omogućiti prilagodbu nekih DES svojstava, ovisno o potrebi, što ponekad omogućava bolju ekstrakciju polarnih spojeva iz hrane (Gomez i sur., 2018), iako visoki udio vode u DES može narušiti strukturu samih DES-ova.

Kombiniranje DES i MAE ekstrakcije kao i dodavanje vode poboljšava i ubrzava ekstrakciju polarnih spojeva smanjujući viskoznost otapala (Gomez i sur., 2018). Nadalje, visokonaponsko električno pražnjenje koje pak nastaje u vodi (elektrohidrauličko pražnjenje) također pokreće razne kemijske i fizikalne procese (Touya i sur., 2006).

U preliminarnom istraživanju, za odabir najefikasnijeg otapala za ekstrakciju biokativnih komponenata iz kakaove ljuške, konkretno teobromina i kofeina te ukupnog fenolnog sadržaja i antioksidacijske aktivnosti dobivenih UAE tehnikom, koristila se voda, 50%-tna vodena otopina etanola, 75%-tna vodena otopina etanola te 97%-tni etanol kao otapalo. Voda se pokazala kao najučinkovitije otapalo za ekstrakciju teobromina kao i ukupnih fenolna (Pavlović i sur., 2019).

Uzimajući u obzir sve gore navedeno, kao daljnje otapalo u svim inovativnim tehnikama ekstrakcije (UAE, DES/MAE, HVED i SWE) u ovoj doktorskoj disertaciji koristila se voda i

samim time je bila omogućena dobra usporedba između primjenjenih metoda ekstrakcija. Tijekom DES/MAE ekstrakcije koristilo se eutektičko otapalo kolin-klorid-oksalna kiselina i voda dok se kod SFE koristio se SC-CO₂ kao otapalo iz već ranije spomenutih razloga.

Studije o koncentracijama metilksantina (teobromina i kofeina) u kakaovoj ljusci većinom su usklađene. [Arlorio i sur. \(2005\)](#) u smjesi kakaovih ljuski iz različitih geografskih regija odredili su koncentraciju teobromina od 12,9 mg/g s.tv. [Adamafio \(2013\)](#) je u svojoj preglednoj studiji prikazao kako sadržaj teobromina u kakaovoj ljusci može varirati od 5-21 mg/g zavisno od porijekla te naveo kako kakaovac porijeklom iz Afrike ima najviši udio teobromina. Povezanost koncentracije metilksantina u kakaovoj ljusci s porijeklom kakaovca navodili su i neki drugi autori ([Barbosa-Pereira i sur., 2018](#); [Carrillo i sur., 2014](#)) koji su također utvrdili vrijednosti ovih dominantnih komponenti u kakaovoj ljusci - teobromin od 4,64 i 10,92 mg/g, kofein od 1,59 do 4,21 mg/g ([Barbosa-Pereira i sur., 2018](#)) te kofein od 0,73 do 1,73 mg/g ([Carrillo i sur., 2014](#)). [Beckett i sur. \(2011\)](#) također su odredili koncentracije ovih komponenata u kakaovoj ljusci (teobromin od 0,2-1,3%, te kofein od 0,04-0,3%) te su ukazali na povezanost vrste zrna s metodama analize. Slične vrijednosti je prikazao i [Prabhakaran Nair \(2010\)](#) (1,3% za teobromin te 0,1% za kofein) dok je [Hartati \(2010\)](#) pak dao prosječni sastav kakaove ljuske i u njemu naveo sadržaj teobromina od 0,55%.

S obzirom na činjenicu da različite tehnike ekstrakcije, a isto tako i različiti predtretmani imaju značajan utjecaj na udjele bioaktivnih komponenata u različitim ekstraktima, tako su i sljedeće studije pokazale to isto i na primjeru kakaove ljuske. Tako su, [Sotelo i Alvarez \(1991\)](#) ekstrahirajući vodom aktivne tvari iz kakaove ljuske zaključili kako koncentracije metilksantina variraju u odnosu na vrstu kakaovca i sam proces fermentacije tj. da su u pravilu veće u fermentiranoj kakaovoj ljusci. Naveli su i kako se u fermentiranoj kakaovoj ljusci teobromin kretao u koncentracijama od 0,032 mg/g do 0,223 mg/g, kofein od 0,056 mg/g do 0,252 mg/g, a teofilin u koncentracijama od 0,052 mg/g do 0,153 mg/g. U nefermentiranoj kakaovoj ljusci vrijednosti su također varirale za teobromin od 0,030 mg/g do 0,174 mg/g, kofein od 0,051 mg/g do 0,227 mg/g te teofilin u koncentracijama od 0,047 mg/g do 0,273 mg/g suhog uzorka. Slično su u svojoj studiji potvrdili i [Hernández-Hernández i sur. \(2018a\)](#) gdje su naveli vrijednosti teobromina u sirovoj (3,900 mg/g) i fermentiranoj kakaovoj ljusci (12,000 mg/g) te time dokazali snažan utjecaj fermentacije kako na sastav tako i na koncentracije bioaktivnih komponenata kakove ljuske (kafeinska kiselina, katehin, epikatehin i epigalokatehin). Ovi su autori također promatrali učinke različitih hidrotermalnih tretmana na dobivene ekstrakte kakaove ljuske te zaključili kako tretman na 170 °C tijekom 30 minuta daje ekstrakt bogat antioksidansima s visokim udjelom fenola (55 mg/g_{ekstr.}) i teobromina (16,400 mg/g uzorka), prikladan za primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Od fenolnih komponenti epikatehin i katehin bili su najzastupljeniji (3,900 mg/g uzorka za obje komponente pri istom

tretmanu). Istakli su također kako je ekstrakcijom uz primjenu različitih otapala moguće dobiti različite koncentracije ovih komponenti. [Okiyama i sur. \(2018\)](#) proveli su stlačenu tekuću ekstrakciju kakaove ljuske s apsolutnim etanolom i u njoj utvrdili koncentraciju teobromina $9,890 \pm 0,090$ mg/g, kofeina $1,440 \pm 0,01$ mg/g, epikatehina $3,500 \pm 0,1$ mg/g, i katehina $0,178 \pm 0,003$ mg/g uzorka. [Martínez i sur. \(2012\)](#) demonstrirali su pak kako ekstrakcija smjesom metanol:aceton daje znatno bolje rezultate za ukupni fenolni sadržaj (od 144,83 do 154,43 mg GAE/100g_{ekstr.}) u usporedbi s etanolnim ekstraktima (između 80,17 i 82,37 mg GAE/100g_{ekstr.}). Kao razlog tim varijacijama naveli su lokalitet i vrstu kakaovca. Zaključno su dodali kako ovaj nusproizvod može biti potencijalni izvor prirodnih supstanci sa značajnom antioksidacijskom aktivnošću. [Okiyama i sur. \(2017\)](#) u svom su preglednom radu naveli flavanole kao najzastupljenije fenolne komponente identificirane u kotiledonima kakaovih zrna (katehine, epikatehine i procijanidine) koji djelomično mogu migrirati u kakaovu ljusku te ju na taj način obogatiti. [Nazaruddin i sur. \(2006\)](#) su pak istakli kako do te migracije dolazi zbog difuzije iz kotiledona tijekom procesa fermentacije te se kao rezultat tog procesa, mnoge bioaktivne komponente koncentriraju u kakaovoj ljusci. [Ismail i Lee \(2006\)](#) objavili su također ukupni fenolni sadržaj kakaove ljuske od 112,90 mgGAE/g_{ekstr.} te antioksidacijsku aktivnost od 95,9% (%DPPH). Snažnu antioksidacijsku aktivnost fenolnih komponenti u kakaovoj ljusci u usporedbi sa sintetičkim antioksidansima prikazali su [Azizah i sur. \(1999\)](#). Do sada se samo par studija fokusiralo na individualni fenolni sadržaj u kakaovoj ljusci ([Jokić i sur., 2018a](#); [Jokić i sur., 2019](#); [Pavlović i sur., 2020](#)).

Spomenute bioaktivne komponente, kao i navedene studije o kakaovoj ljusci pružaju određene pretpostavke koje su se željele ispitati i u ovoj disertaciji ali na kakaovoj ljusci koja nastaje kao nusproizvod u tvornici Kandit d.o.o. (Osijek). U skladu s tim pretpostavkama, svaka pomno u radu odabrana i dostupna zelena ekstrakcijska tehnika dala je drugačiji sastav i koncentraciju bioaktivnih komponentata u ekstraktima kakaove ljuske u ovisnosti o njezinim procesnim parametrima. Sve identificirane i kvantificirane bioaktivne komponente u ekstraktima izražene su u mg/g kakaove ljuske.

5.1.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Prednosti UAE kao tehnologije u području Održive kemije su uporaba netoksičnih otapala, smanjenje potrošnje energije, kraće vrijeme i niža temperatura samog procesa što uvelike utječe na ekstrakciju termolabilnih spojeva ([Medina-Torres i sur., 2017](#)).

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u **Tablici 18**, od svih analiziranih bioaktivnih komponenata u ekstraktima kakaove ljuske dobivene primjenom UAE najzastupljeniji je bio

teobromin, zatim galna kiselina, kofein, katehin, epikatehin te naposljetku kafeinska kiselina u tragovima. Procesni parametri korišteni kod UAE su temperatura od 40 °C do 80 °C, omjer tekuće/kruto od 10 do 50 mL/g, snaga ultrazvuka od 30 do 70% u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 do 90 minuta (**Tablica 18**).

Teobromin, kao najzastupljeniji metilksantin ekstrahiran je u koncentracijama od 2,077 mg/g do 5,916 mg/g, a kofein od 0,276 mg/g do 0,785 mg/g. Najveća koncentracija teobromina (5,916 mg/g) ekstrahirana je pri uvjetima uz 50% snage ultrazvuka, 50 mL/g omjera tekuće/kruto, temperaturi 40 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 60 minuta. Najveća koncentracija kofeina (0,785 mg/g) ekstrahirana je pri uvjetima 70% snage ultrazvuka, 50 mL/g omjera tekuće/kruto, temperaturi 60 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 60 minuta. Najzastupljenija fenolna komponenta ekstrahirana ovom tehnikom bila je galna kiselina u koncentracijama od 0,110 mg/g do 1,407 mg/g te katehin od 0,033 mg/g do 0,457 mg/g. Najveće koncentracije kafeinske kiseline i epikatehina iznosile su 0,527 mg/g te 0,100 mg/g u ovisnosti od zadanih parametara ekstrakcije. Najviše galne kiseline (1,407 mg/g) ekstrahiralo se pri 70% snage ultrazvuka, 50 mL/g omjera tekuće/kruto, temperaturi 60 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 60 minuta. Najviše katehina (0,457 mg/g) ekstrahiralo se pri 70% snage ultrazvuka, 30 mL/g omjera tekuće/kruto, temperaturi 80°C i to kroz 60 minuta ekstrakcije. Ekstrakt kakaove ljuske u kojem je dobivena najveća koncentracija katehina ujedno je i ekstrakt s najvišim ukupnim fenolnim sadržajem (132,897 mgGAE/g_{ekstr.}). Najviše kafeinske kiseline (0,527 mg/g) ekstrahiralo se pri 50% snage ultrazvuka, 30 mL/g omjera tekuće/kruto, temperaturi 60 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 60 minuta. Najviše epikatehina (0,100 mg/g) ekstrahiralo se pri 50% snage ultrazvuka, 30 mL/g omjera tekuće/kruto, temperaturi 80 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 90 minuta. Ekstrakt kakaove ljuske u kojem je dobivena najveća koncentracija epikatehina ujedno je i ekstrakt s najvišim %DPPH (86,377%). Ostale fenolne komponente koje se nalaze u malim koncentracijama u kakaovoj ljusci, bile su ispod granice detekcije (GD) te ih nije bilo moguće kvantificirati dok 5-HMF nije bio detektiran. Od analiziranih metilksantina, teofilin nije bio detektiran ovom tehnikom.

Iz rezultata je vidljivo kako je šest odziva (teobromin, kofein, galna kiselina, katehin, ukupni fenolni sadržaj te antioksidacijska aktivnost) (**Tablica 18**) detektirano u svih 29 eksperimenata te su oni uzimani u obzir pri daljnjoj statističkoj analizi. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 19 - 24**.

Generalno, omjer tekuće/kruto pokazao je najveći statistički značajan utjecaj za sve ispitivane odzive ($p < 0,05$), dok vrijeme ekstrakcije nije uopće pokazalo statistički značajan utjecaj niti na jedan odziv. Temperatura je pokazala statistički značajan utjecaj za katehin ($p = 0,0486$), ukupni

fenolni sadržaj ($p=0,0014$) te DPPH vrijednost ($p=0,0404$), dok je snaga ultrazvuka imala statistički značajan utjecaj samo na koncentraciju katehina ($p=0,0291$).

Regresijski modeli za sve ispitivane odzive pokazali su statistički značajan utjecaj promatrajući njihove p -vrijednosti (od $<0,0001$ do $0,0263$) sa zadovoljavajućim koeficijentima determinacije (R^2) u rasponu od $0,75$ do $0,94$. S obzirom da je vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela ispod $0,05$, znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva.

Neprikladnost modela (engl. *lack of fit*) odnosno „odstupanje od modela“ u svim slučajevima nije bilo statistički značajno ($p>0,05$) što znači da je dobiveni polinom jednadžbe drugog reda adekvatan za preciznu procjenu eksperimentalnih vrijednosti.

Za metilksantine (teobromin i kofein) statistički značajan utjecaj pokazao je, osim linearnog člana modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p=0,0003$ i $p=0,0068$), također i njegov kvadratni član ($p=0,0041$ i $p=0,0079$). Kvadratni član modela koji se odnosi na temperaturu također je pokazao statistički značajan utjecaj za ove dvije komponente ($p=0,0203$ i $p=0,0436$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od $3,96$ za teobromin tj. $2,94$ za kofein velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od $0,73\%$ tj. $2,63\%$ (**Tablica 20** i **Tablica 21**). Za galnu kiselinu osim linearnog člana modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p=0,0008$), statistički značajan utjecaj pokazao je i njegov kvadratni član ($p=0,0005$). Interakcija između ulaznih varijabli tj. omjera tekuće/kruto i snage ultrazvuka pokazala je također statistički značajan utjecaj ($p=0,0119$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od $3,70$ za galnu kiselinu velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od $1,00\%$ (**Tablica 19**). Tri su procesna parametra za katehin pokazala linearni statistički značajan utjecaj, temperatura ($p=0,0486$), omjer tekuće/kruto ($p=0,0005$) te snaga ultrazvuka ($p=0,0291$) dok je kvadratni član modela omjera tekuće/kruto također pokazao statistički značajan utjecaj ($p<0,0001$). Interakcija između ulaznih varijabli vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka pokazala je također statistički značajan utjecaj ($p=0,0437$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od $8,03$ za katehin velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od $0,02\%$ (**Tablica 22**). Kod ukupnog fenolnog sadržaja (**Tablica 23**) kao i kod antioksidacijske aktivnosti (**Tablica 24**), osim linearnog ($p<0,0001$ za oba odziva), i kvadratni član modela omjera tekuće/kruto pokazao je statistički značajan utjecaj ($p<0,0001$ i $p=0,0002$). Temperatura je također pokazala statistički značajan utjecaj kod oba odziva ($p=0,0014$, $p=0,0404$). Interakcija između ulaznih varijabli tj. vremena ekstrakcije i omjera tekuće/kruto pokazala je statistički značajan utjecaj samo za antioksidacijsku aktivnost ($p=0,0436$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od $14,83$ za ukupni fenolni sadržaj tj. $5,44$

za antioksidacijsku aktivnost velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 0,01% tj. 0,16%.

Iz trodimenzionalnih dijagrama metilksantina (**Slika 28 i 29**) vidljivo je povećanje njihove koncentracije s povećanjem omjera tekuće/kruto. Povećanjem temperature do 60 °C, snage ultrazvuka do 50% kao i dužim vremenom ekstrakcije do 60 minuta koncentracija teobromina se prvo blago povećava nakon čega se smanjuje (**Slika 28**). Kod kofeina se također povećanjem temperature do 60 °C i ekstrakcijom do 60 minuta koncentracija prvo blago povećava nakon čega se smanjuje dok povećanje snage ultrazvuka nije pokazalo utjecaj na koncentraciju ove komponente (**Slika 29**). Povećanje omjera tekuće/kruto utjecalo je na povećanje koncentracije galne kiseline dok povećanje temperature, snage ultrazvuka kao i duljine vremena ekstrakcije nije imalo značajnog utjecaja na koncentraciju ove komponente (**Slika 27**). Porastom omjera tekuće/kruto od 10 prema 30 mL/g, povećava se koncentracija katehina, dok se daljnjim povećanjem omjera tekuće/kruto koncentracija katehina smanjuje. Iz dijagrama je također vidljiv i blagi porast koncentracije ove komponente povećanjem temperature, snage ultrazvuka te vremena ekstrakcije (**Slika 30**). Trodimenzionalni dijagrami za ukupni fenolni sadržaj (**Slika 31**) i DPPH vrijednost (**Slika 32**) pokazali su sličnost, što je bilo i za očekivati zbog njihove već dokazane korelacije. Oba promatrana parametra pokazala su tendenciju porasta s porastom omjera tekuće/kruto. Povećanje snage ultrazvuka kao i vremena ekstrakcije nije utjecalo na ukupni fenolni sadržaj i DPPH dok je povećanje temperature ipak pokazalo blagi porast kod oba odziva (**Slika 31 i 32**). Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa za UAE prikazani su u **Tablici 25**.

Ako se osvrnemo na druge slične studije, [Esclapez i sur. \(2011\)](#) spomenuli su kako temperatura, kao jedan od bitnih faktora kod ekstrakcije ultrazvukom, utječe na prinos pojedinih komponenata (povećanje temperature ekstrakcije poboljšava prijenos mase), a [McDonell i Tiwari \(2017\)](#) su pak napomenuli kako temperatura smanjuje viskozitet otapala povećavajući pritom kinetičku energiju molekula u otopini. Kod fenolnih komponenti je također sličan slučaj. Iako je u nekim istraživanjima dokazano kako se manje fenolnih komponenti ekstrahira na višim temperaturama zbog njihove moguće termalne degradacije ili polimerizacije ovdje to nije slučaj jer do toga u principu dolazi pri višim temperaturama nego u navedenom eksperimentu (110°C) ([De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017](#)). [McDonnell i Tiwari \(2017\)](#) dali su pregled bioaktivnih komponenti ekstrahiranih UAE tehnikom iz uzoraka raznih matriksa (kora šipka, sjemenki grejpa, lista masline i sl.) čime su predočili kako se UAE uspješno koristi pri ekstrakciji polifenola, antioksidanasa i drugih bioaktivnih komponenti. [Yusuf i sur. \(2019\)](#) su pri UAE flavonoida iz ekstrakata kakaove ljuske, porijeklom iz Malezije, primjenjivali različite koncentracije etanola (70-90 v/v %), temperaturu (45-65 °C) u različitom

vremenu trajanja ekstrakcije (30-60 min) te su u kakaovoj ljusci UHPLC-QTOF-MS metodom osim epikatehina otkrili i određene oligomere flavonoida (procijanidin B2, procijanidin C1, procijanidin B4, procijanidin A2, procijanidin trimer, procijanidin tetramer, procijanidin pentamer). Kao izračunate optimalne uvjete ekstrakcije ovih komponenti naveli su koncentraciju etanola od 80%, pri temperaturi od 55 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 45 minuta. [Quiroz-Reyes i sur. \(2013\)](#) su dokazali kako je UAE efikasnija od maceracije te da su ekstrakti dobiveni UAE pokazali višu antioksidacijsku aktivnost kao i dobru korelaciju između antioksidacijske aktivnosti i ukupnog fenolnog sadržaja. Također su istakli veći sadržaj katehina i epikatehina u ekstraktima kotiledona kakaovog zrna u usporedbi s ekstraktima kakaove ljuske. Za UAE su naveli kako je izvrsna ekstrakcijska metoda pri izolaciji antioksidanasa s obzirom na kraće vrijeme ekstrakcije, višu reproducibilnost kao i male gubitke bioaktivnih komponenata. [Oliveira i sur. \(2018\)](#) ekstrahirali su metilksantine (kofein i teobromin) iz kakaovog zrna uz pomoć protonske ionske tekućine 2HEAA (2-hidroksi etilamonij acetata) i ultrazvuka. Naglasili su kako su protonske ionske tekućine izvrsne pri ekstrakciji ovih spojeva te da se omjer kruto/tekuće pokazao kao glavna utjecajna varijabla pri ekstrakciji, dok snaga ultrazvuka nije imala značajan utjecaj što je i u ovom istraživanju slučaj. Uspoređujući UAE i konvencionalnu metodu ekstrakcije mješanjem, [Jiménez i Cañizares-Macías \(2013\)](#) su dokazali kako je UAE efikasnija pri izolaciji kofeina (za 57,7%) i teobromina (za 43,6%) iz kakaovih sjemenki. Kao razlog efikasnije ekstrakcije istakli su važnost ultrazvučnih valova koji ne uzrokuju modifikaciju ekstrakta. [Dent i sur. \(2015\)](#) također su uspoređivali neke konvencionalne metode ekstrakcije fenolnih komponenata iz kadulje (*Salvia officinalis* L.) primjenom dvije različite UAE tehnike (ultrazvučni uređaj uz direktno miješanje i izravnu sonifikaciju sondom). Istraživanja su pokazala kako je UAE s ultrazvučnim uređajem uz direktno miješanje postigla najviše iskorištenje ukupnih i pojedinačnih polifenola dok je izravna sonikacija također bila efikasnija od konvencionalnih ekstrakcija. [Bamba i sur. \(2018\)](#) prvi su proučavali utjecaj uvjeta UAE na prinos fenolnih komponenti iz borovnice (*Vaccinium angustifolium*) kao i antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata. Dokazali su kako efikasnost ove ekstrakcije uvelike ovisi o udjelu etanola u vodenom ekstraktu, omjeru kruto/tekuće, temperaturi i vremenu te o pH. UAE s 50% omjera etanol/voda dala je veće prinose flavonoida i antocijanina kao i veći ukupni fenolni sadržaj, dok se smanjenjem udjela kruto/tekuće povećao udio polifenola kao i antioksidacijska aktivnost ekstrakata. Pri upotrebi 50% etanola i uz više temperature povećali su se ukupni flavonoidi i antioksidacijska aktivnost dok se ukupni fenolni sadržaj smanjio. Slabo bazični pH imao je pozitivan utjecaj na ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijsku aktivnost za razliku od kiselog pH, no smanjio je udio antocijanina. Duže vrijeme ekstrakcije u vodi povećalo je sadržaj antocijanina. Autori su također naveli kako je u odabranim UAE uvjetima moguće selektivno obogaćivanje različitih fenolnih frakcija iz navedenog matriksa. [Papoutsis i sur. \(2018\)](#) optimirali su UAE za izolaciju

polifenola rutina iz nusproizvoda limuna (*Citrus limon* L.) (zaostali endokarp, sjemenke i egzokarp). Rezultate ukupnog fenolnog sadržaja, ukupnih flavonoida i antioksidacijsku aktivnost usporedili su s ekstrakcijom potpomognutom vrućom vodom te konvencionalnom ekstrakcijom s organskim otapalima. Ekstrakcija vrućom vodom pokazala se kao najefikasnija pri izolaciji najvišeg sadržaja flavonoida te najviše antioksidacijske aktivnosti. UAE pokazala je slične rezultate kao i konvencionalna ekstrakcija organskim otapalima, te se i preporučuje provoditi umjesto konvencionalne prvenstveno zbog kraćeg vremena trajanja ekstrakcije. Primjenom metode odzivnih površina u ovom radu dobiveni su optimalni uvjeti za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom UAE, uzimajući u obzir njihov maksimum: temperatura od 69,45 °C, omjer tekuće/kruto 49,99 mL/g, snaga ultrazvuka od 69,99% te vrijeme ekstrakcije od 44,26 minute. Pri tim uvjetima predviđena koncentracija teobromina iznosila je 5,234 mg/g, kofeina 0,741 mg/g, katehina 0,341 mg/g, galne kiseline 1,434 mg/g, ukupnog fenolnog sadržaja 118,380 mg GAE/g_{ekstr.} te DPPH 81,846% (**Tablica 59**) što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima.

5.1.2. Ekstrakcija eutektičkim otapalima potpomognuta mikrovalovima

Ekološki karakter eutektičkih smjesa postiže se upotrebom netoksičnih, biorazgradivih i jeftinih komponenti koje se koriste pri njihovom stvaranju, kao i niskog tlaka para te mogućnosti recikliranja. Jedna od zanimljivih karakteristika ove vrste otapala je mogućnost dobivanja velikog broja eutektičkih smjesa različitih kemijskih svojstava zbog promjene jednog ili oba spoja. Ova metoda ekstrakcije već se pokazala izvrsnom u kombinaciji s MAE ([Cunha i Fernandes, 2018](#)). MAE, kao jednu od najčešće korištenih i novih alternativnih metoda ekstrakcije karakterizira narušavanje stanične strukture uslijed toplinskog prodiranja mikrovalnog zračenja ([Kaderides i sur., 2019](#)). U DES/MAE ekstrakcijama, DES pod utjecajem mikrovalnog zračenja razara stanične stijenke oslobađajući pri tom komponente iz matriksa uzorka ([Chizoba Ekezie, Sun i Cheng, 2017](#)).

S obzirom da se eutektička otapala mogu formirati iz različitih HBA i HBD pokazalo se kako njihova kombinacija, kao i omjer, uvelike utječu na njihova fizikalna i kemijska svojstva. Zbog tih različitih kemijskih i fizikalnih svojstava, ova otapala mogu pokazati različit ekstrakcijski potencijal izabranih bioaktivnih komponenti. U doktorskoj disertaciji provedena je ekstrakcija odabranih bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske i to sa 16 različitih kombinacija eutektičkih smjesa. Istraživanje je provedeno korištenjem eutektičkih smjesa na bazi kolin-klorida te uz kombinaciju s različitim HBD-ima, kako je naznačeno u **Tablici 26**. Proveden je

probir (engl. *screening*) uz dodatak vode (10% i 50% v/v) u vremenu trajanja ekstrakcije od 60 minuta, na temperaturi od 50 °C. Razlog ovakvog odabira parametara je činjenica što dodatak vode smanjuje viskoznost eutektičkog otapala kao i povišenu temperaturu, dok oba parametra utječu na prijenos mase tijekom ekstrakcije. Vrijeme trajanja ekstrakcije od 60 minuta odabrano je na temelju prethodnih istraživanja i iskustva. Probirom je otkriveno da ekstrahirana količina bioaktivnih komponenti varira ovisno o vrsti otapala, kao što je bilo i za očekivati. Galna kiselina ekstrahirana je samo s ChCl: AA (0,009 i 0,016 mg/g), ChCl: EG (0,008 i 0,002 mg/g) i ChCl: Glu (0,009 mg/g). Najveći sadržaj teobromina ekstrahiran je sa ChCl: BD (3,639 mg/g), ChCl: OA (3,605 mg/g) i ChCl: U (3,613 mg/g) s 50% udjela vode, dok je najmanja količina teobromina bila ekstrahirana sa ChCl: OA (0,620 mg/g) sa 10% udjela vode. Katehin je ekstrahiran u najvećoj količini sa ChCl: Fru (0,095 mg/g) s 50% udjela vode, dok se ekstrakcijom s ChCl: MA, ChCl: LA, ChCl: CA, ChCl: Mal, ChCl: LevA, ChCl: OA i ChCl: TA katehin nije uopće ekstrahirao. Kofein se u najvećoj količini ekstrahirao s ChCl: OA (0,909 mg/g) sa 50% udjela vode i ChCl: LeVA (0,916 mg/g) sa 10% udjela vode, a u najmanjoj u ChCl: OA (0,156 mg/g) sa 10% udjela vode. Kafeinska kiselina bila je najzastupljenija u ChCl: Sor (0,040 mg/g) s 50% udjela vode, dok s ChCl: OA i s 10% udjela vode nije uopće bila detektirana. Količina epikatehina bila je najveća u ChCl: Mal (0,114 mg/g) sa 50% udjela vode, dok s ChCl: OA i 10% udjela vode kao i s ChCl: MA i 10% udjela vode nije uopće bio detektiran. Pored toga, najveća antioksidacijska aktivnost, izražena kao DPPH vrijednost dobivena je s ChCl: OA, 66,31% sa 50% udjela vode te 64,32% sa 10% udjela vode. Najveći ukupni fenolni sadržaj pokazao se u smjesi ChCl: CA (129,051 mgGAE/g_{ekstr.}) s 50% udjela vode. S obzirom na sve podatke i činjenicu da neki spojevi nisu uvijek poželjni u dobivenim ekstraktima, odlučeno je optimirati uvjete ekstrakcije odabranih spojeva s eutektičkom smjesom ChCl: OA. Ova eutektička smjesa odabrana je s obzirom da je utjecaj dodatka vode na količinu bioaktivnih spojeva bio najveći, pa je bio i najprikladniji za podešavanje parametara ekstrakcije željenih komponenti.

Optimizacija ekstrakcijskih parametara provedena je kroz 17 različitih eksperimenata, pri čemu su varirale temperatura (od 30 do 90 °C), vrijeme trajanja ekstrakcije (od 5 do 15 minuta) te udio vode u DES smjesi (od 10 do 50% udjela vode). Nadalje, svi su eksperimenti provedeni miješanjem s DES (**Tablica 27**) kao i u kombinaciji s MAE (**Tablica 28**) primjenjujući iste parametre. Prije svega, rezultati prikazani u obje **Tablice 27 i 28** dokazuju kako je ekstrakcija DES-a u kombinaciji s MAE dala nešto više koncentracije odabranih bioaktivnih komponenti u ekstraktima kakaove ljske. Neki spojevi, pronađeni u tragovima nakon DES ekstrakcije, bolje su se ekstrahirali u kombinaciji DES/MAE, poput galne kiseline. Nadalje, promatranjem dobivenih koncentracija bioaktivnih spojeva (**Tablica 28**), vidljivo je kako određeni parametri različito utječu na svaku pojedinu komponentu. Najveće koncentracije teobromina i kofeina

pronađene su u ekstraktu dobivenom primjenom temperature 60 °C i 30% udjela vode tijekom 10 minuta vremena ekstrakcije (5,004 mg/g i 1,599 mg/g), gdje je utvrđena i najveća antioksidacijska aktivnost (55,444%). Najviše katehina ekstrahirano je pri uvjetima od 30% udjela vode, temperaturi 90 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 5 minuta (0,067 mg/g) što su također najpogodniji uvjeti za ekstrakciju epikatehina (0,137 mg/g). Najveći sadržaj kafeinske kiseline dobiven je primjenom temperature od 30 °C i 50% udjela vode tijekom 10 minuta vremena ekstrakcije (0,137 mg/g).

Iz rezultata je vidljivo kako je šest odziva (teobromin, kofein, katehin, kafeinska kiselina, ukupni fenolni sadržaj te antioksidacijska aktivnost) detektirano u svih 17 eksperimenata te su se ove komponente uzimale u obzir pri daljnjim statističkim analizama. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki od ovih odabranih odziva evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 29 - 34**. Promatrajući iskorištenja dobivenih bioaktivnih komponenata ovih dviju ekstrakcija (DES i DES/MAE) veći prinosi galne kiseline, teobromina, katehina, kofeina i kafeinske kiseline su dobiveni kombinacijom DES/MAE. Iz tog razloga je provedena daljna ANOVA na parametrima dobivenima ekstrakcijom DES/MAE.

Udio vode u eutektičkom otapalu (kolin-klorid: oksalna kiselina) pokazao je najveći statistički značajan utjecaj za sve ispitivane odzive ($p < 0,05$) osim za antioksidacijsku aktivnost gdje utjecaj nije bio statistički značajan ($p = 0,1911$). Regresijski modeli za sve ispitivane odgovore bili su statistički značajni promatrajući njihove p -vrijednosti (od 0,0031 do 0,046) sa zadovoljavajućim koeficijentima determinacije (R^2) u rasponu od 0,83 do 0,93. Neprikladnost modela odnosno „odstupanje od modela“ u svim slučajevima nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$) što znači da je polinom jednadžbe drugog reda adekvatan za preciznu procjenu eksperimentalnih vrijednosti. S obzirom da je vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela ispod 0,05, znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva.

Za metilksantine, osim linearnog člana modela koji se odnosi na udio vode ($p = 0,0037$ i $p = 0,0001$), i njegov kvadratni član pokazao je statistički značajan utjecaj za teobromin ($p = 0,0132$) i kofein ($p = 0,0014$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 4,20 za teobromin tj. 10,01 za kofein velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 3,58% tj. 0,31% (**Tablica 29** i **Tablica 30**). Za katehin, osim linearnog utjecaja udjela vode ($p = 0,0302$) i kvadratni član temperature pokazao je statistički značajan utjecaj ($p = 0,0059$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 3,80 za katehin velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 4,61% (**Tablica 31**). Na kafeinsku kiselinu osim linearnog člana modela koji se odnosi na udio vode ($p = 0,0006$) i vremena ekstrakcije ($p = 0,0294$), statistički značajan utjecaj pokazala je i interakcija temperature i vrijeme ekstrakcije ($p = 0,0470$) te interakcija

temperature i udjela vode ($p=0,0378$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 7,31 za kafeinsku kiselinu velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 0,78% (**Tablica 32**). Linearni i kvadratni član modela koji se odnosi na temperaturu kod ukupnog fenolnog sadržaja pokazao je statistički značajan utjecaj ($p=0,0280$, $p=0,0299$) dok je linearni član modela koji se odnosi na udio vode također pokazao statistički značajan utjecaj ($p=0,0207$). Interakcija temperature i udjela vode također je pokazala statistički značajan utjecaj ($p=0,0461$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 4,29 za ukupni fenolni sadržaj velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 3,39% (**Tablica 33**). Što se tiče antioksidacijske aktivnosti, linearni i kvadratni član temperature pokazao je statistički značajan utjecaj ($p=0,0057$, $p=0,0223$) kao i kvadratni član modela koji se odnosi na vrijeme trajanja ekstrakcije ($p=0,0335$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 5,14 za antioksidacijsku aktivnost velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 2,11% (**Tablica 34**). Trodimenzionalni dijagrami za dva najzastupljenija metilksantina u kakaovoj ljusci, teobromin (**Slika 33**) i kofein (**Slika 34**) pokazali su se sličnima. Iz njih je vidljivo povećanje koncentracije tih komponenata povećanjem udjela vode. S obzirom na ograničenu moć otapanja teobromina u vodi (Nguyen i Nguyen, 2017) vjerojatno su dva međusobno suprotna efekta vode utjecala na njegovu ekstraktibilnost. Za pretpostaviti je kako veći udio vode smanjuje ekstrakciju teobromina dok ujedno smanjuje viskozitet otapala povećavajući time difuziju iz kakaove ljuske. Nadalje, dodatkom većeg udjela vode u DES otapalo slabe vodikove veze između DES otapala i bioaktivnih komponenata, što ujedno smanjuje i njihovu ekstraktibilnost (Cai i sur., 2019; Pavlović i sur., 2020). Nasuprot tome, temperatura i vrijeme ekstrakcije nisu imali značajan utjecaj na koncentraciju metilksantina u dobivenim ekstraktima. Trodimenzionalni dijagrami katehina pokazali su povećanje koncentracije za ovu komponentu s povećanjem udjela vode (**Slika 35**), dok se povećanjem sva tri parametra povećala koncentracija kafeinske kiseline (**Slika 36**). Povećanje temperature pokazalo je utjecaj na povećanje koncentracije ukupnog fenolnog sadržaja. (**Slika 37**). Za isti odziv primjećena je blaga tendencija porasta s porastom vremena ekstrakcije od 5 do 10 minuta trajanja ekstrakcije nakon čega je došlo do opadanja. Pri povećanju ili smanjenju udjela vode, ukupni fenolni sadržaj ostao je isti. Antioksidacijska aktivnost pokazala je tendenciju rasta s porastom temperature, omjera tekuće/kruto i vremena ekstrakcije (**Slika 38**). Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa za DES/MAE prikazani su u **Tablici 35**.

Rezultati ovih istraživanja u skladu su i s drugim studijama. Bajkacz i Adamek (2018) navode kako povećanje udjela vode (više od 10%) u smjesama eutektičkih otapala pokazuje povećanje iskorištenja flavonoida ekstrahiranih iz uzoraka hrane. Najbolje prinose dobili su sa 30% udjela vode, dok se daljnjim povećanjem udjela vode (do 75%) smanjivala učinkovitost

ekstrakcije flavonoida. Iako povećanje udjela vode u smjesi s eutekticima inače smanjuje viskoznost, prekomjerni udio vode negativno je utjecao na interakciju eutektičke smjese s traženom komponentom te je povećao polarnost medija. Također, autori navedene studije izjavili su kako je omjer tekuće/kruće pokazao sličan trend za sve ciljane komponente tj. što je veći omjer, to je bolja ekstrakcija ciljanih komponenata. [Dela Calle i sur. \(2017\)](#) napomenuli su kako je temperatura ključni parametar za ekstrakciju eutektičkim otapalima u kombinaciji s mikrovalovima. Do veće difuzije te smanjene interakcije ciljanih komponenti i matriksa dolazi zbog povećanja temperature, smanjenog viskoziteta te smanjene površinske napetosti, što opet dovodi do poboljšanja desorpcije i otapanja ciljane komponente u otapalu. Napomenuli su i važnost optimizacije procesa upravo zbog degradacije nekih komponenti pri visokim temperaturama. Takav slučaj primijećen je i kod ekstrakcije katehina eutektičkim otapalom na bazi kolin-klorida a zaključeno je da su optimalne temperature za njegovu ekstrakciju između 45-65 °C zbog moguće izomerizacije ovoga spoja na višim temperaturama. [Valadez-Carmona i sur. \(2017\)](#) istraživali su učinke mikrovalova, vrućeg zraka i sušenja smrzavanjem na fenolne spojeve, antioksidacijsku i enzimsku aktivnost te mikrostrukturu ljuske kakaovca kao glavnog nusproizvoda u industriji čokolade. Također, identificirali su katehin, kvercetin, (-)-epikatehin, galnu, kumarinsku i protokatehničnu kiselinu u svježoj i osušenoj ljusci kakaovca. Također su naveli kako sušenje mikrovalovima, kao i sušenje smrzavanjem čuva mikrostrukturu ljuske, te su istakli kako sušenje mikrovalovima može biti interesantna metoda za poboljšanu ekstraktibilnost fenolnih spojeva iz ovog nusproizvoda. [Cvjetko Bubalo i sur. \(2016b\)](#) upotrijebili su DES/MAE tehniku kao zeleniji pristup za ekstrakciju fenolnih spojeva iz kožice grožđa (*Vitis vinifera* cv. Plavac mali, Dalmacija), te se DES na bazi kolin-klorida s oksalnom kiselinom i 25% udjela vode pokazao kao najbolja opcija što pokazuje sličnost s odabirom otapala u ovoj disertaciji.

Primjenom metode odzivnih površina dobiveni optimalni uvjeti za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom eutektičkih otapala (na bazi kolin-klorida i oksalne kiseline) uz pomoć mikrovalova, uzimajući u obzir njihov maksimum su temperatura od 71,09 °C, udio vode 32,86% te vrijeme trajanja ekstrakcije od 10,06 minuta. Pri tim uvjetima predviđena koncentracija teobromina iznosila je 4,897 mg/g, kofeina 1,545 mg/g, katehina 0,065 mg/g, kafeinske kiseline 0,137 mg/g, ukupnog fenolnog sadržaja 60,834 mgGAE/g_{ekstr.} te DPPH 50,538% (**Tablica 59**) što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima.

5.1.3. Ekstrakcija primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Kao što je vidljivo iz dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 36**, pet bioaktivnih komponenata identificirano je u ekstraktima kakaove ljuske nakon ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja i to metilksantini (teobromin i kofein) te fenolne komponente (katehin, epikatehin i galna kiselina). Ostale ispitivane bioaktivne komponente nisu bile prisutne u ovim ekstraktima ili su bile ispod granice detekcije (GD) te iz tog razloga nisu predložene u tablicama. Od svih analiziranih komponenti, teobromin se pokazao kao najzastupljeniji, nakon čega su slijedili kofein, katehin, epikatehin i galna kiselina.

Optimizacija ekstrakcijskih parametara provedena je kroz 17 različitih eksperimenata, pri čemu su varirale omjer tekuće/kruto (od 10 do 50 mL/g), frekvencija (od 40 do 100 Hz) te vrijeme trajanja ekstrakcije (od 30 do 90 minuta). Uvjeti ekstrakcije primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja pri frekvenciji od 100 Hz kroz 60 minuta uz omjer tekuće/kruto od 50 mL/g dali su najbolje iskorištenje za dva dominantna metilksantina (teobromin 6,032 mg/g i kofein 0,850 mg/g), dok teofilin nije bio detektiran. Najmanja iskorištenja ovih komponenti dobivena su pri frekvenciji od 70 Hz kroz period trajanja ekstrakcije od 30 minuta uz omjer tekuće/kruto od 10 mL/g (2,530 mg/g za teobromin i 0,316 mg/g za kofein). S obzirom da su različite vrste i parametri ekstrakcija imale značajan utjecaj na sastav finalnog ekstrakta, za očekivati je bilo kako će koncentracija ovih komponenti varirati primjenom različitih parametara i ove ekstrakcijske metode. Od fenolnih komponenti najviše se ekstrahiralo epikatehina (0,270 mg/g) i to pri uvjetima 30 mL/g omjera tekuće/kruto, frekvenciji 100 Hz u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 minuta što su ujedno i najbolji uvjeti za ekstrakciju najveće koncentracije galne kiseline (0,219 mg/g). Najviše katehina (0,233 mg/g) ekstrahiralo se pri uvjetima 30 mL/g omjera tekuće/kruto, frekvenciji 70 Hz u vremenu trajanja ekstrakcije od 60 minuta. Najveći ukupni fenolni sadržaj (94,949 mg GAE/g_{ekstr.}) kao i % DPPH (50,970%) bio je pri uvjetima od 50 mL/g omjera tekuće/kruto, frekvenciji 70 Hz u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 minuta. Najniže vrijednosti za ukupni fenolni sadržaj (52,39 mg GAE/g_{ekstr.}) te za % DPPH (24,92%) bili su pri omjeru tekuće/kruto od 10 mL/g, frekvenciji od 70 Hz u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 minuta.

Iz rezultata je vidljivo kako je sedam odziva (galna kiselina, teobromin, kofein, katehin, epikatehin, ukupni fenolni sadržaj te antioksidacijska aktivnost) detektirano u svih 17 eksperimenata te kako su se uzimali u obzir pri daljnjim statističkim izračunima. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za sve odabrane odzive evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 37 - 43**. Omjer tekuće/kruto jedini je pokazao statističku

značajnost za sve ispitivane odzive ($p < 0,05$). Ostali procesni parametri (vrijeme trajanja ekstrakcije i frekvencija) nisu pokazali statistički značajan utjecaj. Regresijski modeli za sve ispitivane odgovore bili su statistički značajni promatrajući njihove p -vrijednosti (od 0,0019 do 0,0472) sa zadovoljavajućim koeficijentima determinacije (R^2) u rasponu od 0,83 do 0,94. Neprikladnost modela tj. „odstupanje od modela“ u svim slučajevima nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$) što znači da je polinom jednadžbe drugog reda adekvatan za preciznu procjenu eksperimentalnih vrijednosti. S obzirom da je vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela ispod 0,05, znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva. Osim linearnog člana modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p = 0,0112$) na galnu kiselinu statistički značajan utjecaj imao je i kvadrat omjera tekuće/kruto ($p < 0,0001$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 11,69 za galnu kiselinu velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 0,19% (**Tablica 37**). Kod teobromina osim linearnog člana modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p = 0,0056$) i kvadratni član vremena ekstrakcije pokazao je statistički značajan utjecaj ($p = 0,0254$) (**Tablica 38**). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 3,84 za teobromin tj. 3,76 za kofein velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 4,49% tj. 4,72% (**Tablica 38** i **Tablica 39**). Samo linearni član modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto imao je statistički značajan utjecaj kod kofeina ($p = 0,0029$) (**Tablica 39**), ukupnog fenolnog sadržaja ($p = 0,0006$) (**Tablica 42**) i antioksidacijske aktivnosti ($p = 0,0004$) (**Tablica 43**). Osim linearnog člana modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p = 0,0177$) na katehin statistički značajan utjecaj imao je i njegov kvadratni član ($p < 0,0001$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 9,14 za katehin velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 0,40% (**Tablica 40**). Linearni član modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p = 0,024$) pokazao je statistički značajan utjecaj i na epikatehin kao i interakcija između frekvencije i vremena trajanja ekstrakcije ($p = 0,003$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 4,29 za epikatehin velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 3,40% (**Tablica 41**). Utvrđena je i značajnost modela jer je F-vrijednost od 4,99 za ukupni fenolni sadržaj tj. 5,02 za antioksidacijsku aktivnost velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 2,29% tj. 2,25% (**Tablica 42** i **Tablica 43**). Također, dobiveni rezultati ekstrakcije pokazali su snažnu korelaciju između ukupnog fenolnog sadržaja i antioksidacijske aktivnosti.

Trodimenzionalni dijagrami predočeni za metilksantine (teobromin i kofein) ukazuju na sličnost ponašanja ove dvije komponente primjenom HVED ekstrakcije. Također dokazuju i povećanje njihove koncentracije povećanjem omjera tekuće/kruto. Iz dijagrama je vidljiv blagi porast koncentracija obje komponente s povećanjem frekvencije dok je povećanjem vremena ekstrakcije do 60 minuta koncentracija blago porasla nakon čega se smanjila (**Slike 40** i **41**). Trodimenzionalni dijagrami za galnu kiselinu i katehin također pokazuju sličnost tj. tendenciju

rasta koncentracije s porastom omjera tekuće/kruto od 10 do 30 mL/g nakon čega ta koncentracija pada (**Slike 39 i 42**). Iz dijagrama za galnu kiselinu vidljivo je također kako povećanje frekvencije te dulja ekstrakcija nije imala utjecaj na koncentraciju (**Slika 39**). Vrijeme ekstrakcije nije utjecalo niti na koncentraciju katehina dok je povećanje frekvencije od 40 do 70 Hz pokazalo blago povećanje koncentracije ove komponente nakon čega je došlo do smanjivanja (**Slika 42**). Koncentracija epikatehina pokazala je tendenciju rasta sa smanjenjem omjera tekuće/kruto dok je povećanjem frekvencije i vremena ekstrakcije koncentracija ove komponente rasla (**Slika 43**). Ukupni fenolni sadržaj kao i antioksidacijska aktivnost pokazale su međusobnu sličnost tj. tendenciju rasta s porastom omjera tekuće/kruto dok frekvencija kao i vrijeme ekstrakcije nisu imali na njih značajan utjecaj (**Slike 44 i 45**). Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa za HVED prikazani su u **Tablici 44**.

Ovi rezultati su naime u skladu s nekim publiciranim istraživanjima. [Barišić i sur. \(2019\)](#) istraživali su utjecaj HVED na zadržavanje bioaktivnih komponenti u netretiranoj i tretiranoj kakaovoj ljsuci te su analizirali koncentracije pojedinih bioaktivnih komponenti koje se u njoj mogu naći: teobromina, kofeina, galne kiseline, kafeinske kiseline, p-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina te (-)-epikatehin galata. Ispitivanja su vršili pri frekvencijama od 40 i 80 Hz u vremenu trajanja ekstrakcije od 15, 30 i 45 minuta te udjelu 1,5 i 3% kakaove ljsuke u vodi. U netretiranoj kakaovoj ljsuci najzastupljeniji metilksantini (teobromin i kofein) dobiveni su u koncentracijama od $3,906 \pm 0,070$ mg/g i $0,646 \pm 0,055$ mg/g dok je od fenolnih komponenti najzastupljeniji bio (+)-katehin u koncentraciji od $0,290 \pm 0,005$ mg/g, te (-)-epikatehin i galna kiselina u koncentracijama od $0,165 \pm 0,099$ mg/g i $0,147 \pm 0,041$ mg/g. Nešto veće rezultate za metilksantine iz kakaove ljsuke dobili su [Barbosa-Pereira i sur. \(2018\)](#) no ekstrakcijom uz pomoć pulsirajućeg električnog polja (teobromin u rasponu od 4,640 do 10,920 mg/g, te kofein 1,590 do 4,210 mg/g) te su istaknuli važnost porijekla same kakaove ljsuke. Također su se fokusirali na primjenu pulsirajućeg električnog polja kao inovativnog pred-tretmana za poboljšanje ekstraktibilnosti polifenola iz kakaove ljsuke i ustvrdili kako je tom ekstrakcijom moguće dobiti 20% veće iskorištenje kako metilksantina tako i polifenola (epikatehin od 0,31-2,24 mg/g s. tv.) nego što se može postići konvencionalnim ekstrakcijskim metodama. [Xi, He i Yan \(2017\)](#) optimirali su HVED kako bi ekstrahirali po prvi puta fenolne komponente iz kore šipka (*Punica granatum* L.), te su rezultate usporedili s rezultatima dobivenim maceracijom u vrućoj vodi. Istaknuli su prednosti HVED ekstrakcije zbog visoke efikasnosti pri ekstrakciji fenolnih komponenti. Ukupni fenolni sadržaj u njihovim ekstraktima varirao je od 24,93 do 32,30 mg GAE/g s.tv. prema centralnom kompozitnom dizajnu. Precizirali su kako sastav bioaktivnih komponenata iz različitih ekstrakata kakaove ljsuke te njihova antioksidacijska svojstva ovise o podrijetlu, vrsti i industrijskoj preradi same sirovine.

Također su istaknuli kako ovaj nusprodukt može biti obećavajući izvor prirodnih spojeva s potencijalnom primjenom u sektorima hrane i zdravlja.

Primjenom metode odzivnih površina u ovom istraživanju dobiveni optimalni uvjeti za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja, uzimajući u obzir njihov maksimum: frekvencija od 99,85 Hz, vrijeme trajanja ekstrakcije od 30,11 minuta i omjeru tekuće/kruto 47,54 mL/g. Pri tim uvjetima, predviđena koncentracija teobromina iznosila je 6,177 mg/g, kofeina 0,873 mg/g, ukupnog fenolnog sadržaja 98,823 mg GAE/g_{ekstr.} te DPPH 51,044% (**Tablica 59**) što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima.

5.1.4. Ekstrakcija superkritičnim CO₂

Optimizacija parametara ekstrakcije superkritičnim CO₂ provedena je kroz 17 različitih eksperimenata, pri čemu su varirali tlak (od 100 do 300 bara), temperatura (od 40 do 60 °C) te vrijeme trajanja ekstrakcije (od 30 do 120 minuta). Kao što je vidljivo iz dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 45**, tri su bioaktivne komponente pronađene u SC-CO₂ ekstraktima kakaove ljuske. Najzastupljeniji metilksantin bio je kofein, zatim teobromin dok se od fenolnih komponenti ekstrahirao samo katehin te vanilin u tragovima. Sve tri komponente ekstrahirale su se u najvećim koncentracijama pri uvjetima tlaka od 300 bara, pri temperaturi od 60 °C i u vremenu trajanja ekstrakcije od 75 minuta (kofein 3,418 mg/g, teobromin 1,190 mg/g te katehin 0,058 mg/g). Najveći ukupni fenolni sadržaj (72,641 mgGAE/g_{ekstr.}) kao i antioksidacijska aktivnost (38,364%) dobiveni su pri uvjetima tlaka od 100 bara, temperaturi 50 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 120 minuta što ujedno pokazuje i dobru korelaciju između ova dva parametra. Iako je literaturno poznato da je teobromin najzastupljeniji metilksantin u kakaovoj ljusci, ovom tehnikom ekstrakcije nije bio dominantna bioaktivna komponenta, vjerojatno iz razloga njegove slabije topivosti u CO₂ od kofeina koji se pak pokazao kao najzastupljenija komponenta u dobivenim ekstraktima. Poznato je kako su polarne komponente slabije topive u CO₂ jer je on nepolarno otapalo koje u pravilu najbolje otapa nepolarne komponente ([Skala i sur., 2002](#)). Teofilin, za koje je literaturno dokazano da je bolje topiv u CO₂ od teobromina, nije pronađen u SC-CO₂ ekstraktima. Također, poznato je kako je ovaj metilksantin i inače zastupljen u vrlo malim količinama u kakaovoj ljusci.

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 45** vidljivo je kako su samo četiri odziva (teobromin, kofein, ukupni fenolni sadržaj te antioksidacijska aktivnost) detektirani u svih 17 eksperimenata te su se oni uzimali u obzir pri daljnjim statističkim analizama. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki odabrani odziv evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u

Tablicama 46 - 49. U slučaju ekstrakcije sa superkričnim CO₂ i promatranim odzivima bilo je nužno odabrati drugi model koji će dobro opisati dobivene odzive, odnosno koji će dati željenu matematičku funkciju u ovisnosti o projektnim varijablama. Najbolje se pokazao 2FI model koji koristi linearne članove i njihove interakcije. Temperatura nije pokazala statistički značajan utjecaj ni na jedan promatrani odziv. Regresijski modeli za sve ispitivane odzive bili su statistički značajni promatrajući njihove p -vrijednosti (od 0,0185 do 0,0468) sa koeficijentima determinacije (R^2) u rasponu od 0,66 do 0,73. Neprikladnost tj odstupanje od modela u svim slučajevima nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$). S obzirom da je vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela ispod 0,05, znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva.

Od ulaznih procesnih parametara, osim tlaka, na teobromin i ukupni fenolni sadržaj ($p=0,0349$ i $p=0,0439$) utjecaj je imalo i vrijeme ekstrakcije ($p=0,0117$ i $p=0,010$). Na kofein, statistički značajan utjecaj imao je tlak ($p=0,0435$) te interakcija tlaka i temperature ($p=0,0415$), dok je na antioksidacijsku aktivnost statistički značajan utjecaj imao samo tlak ($p=0,0034$). Za teobromin i kofein utvrđena je značajnost modela jer je F-vrijednost od 3,29 za teobromin tj. 4,14 za kofein velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 4,68% tj. 2,37% (**Tablica 46** i **Tablica 47**). Za ukupni fenolni sadržaj kao i za antioksidacijsku aktivnost također je utvrđena značajnost modela jer je F-vrijednost od 3,79 za ukupni fenolni sadržaj tj. 4,48 za antioksidacijsku aktivnost velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 3,10% tj. 1,85% (**Tablica 48** i **Tablica 49**).

Trodimenzionalni dijagrami za teobromin prikazuju tendenciju povećanja koncentracije povećanjem tlaka i vremena (**Slika 46**) dok je za kofein vidljiv utjecaj povećanja tlaka na povećanje koncentracije (**Slika 47**). Temperatura u slučaju kofeina nije imala utjecaj. Trodimenzionalni dijagrami za ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijsku aktivnost pokazali su sličnost tj. tendenciju blagog pada koncentracije s povećanjem tlaka te blagog porasta s porastom temperature (**Slika 48** i **49**). Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa za SFE prikazani su u **Tablici 50**.

Slični rezultate vezani uz zastupljenost ovih komponenti u superkričnim CO₂ ekstraktima pokazale se i neke druge studije. Tako su [Johannsen](#) i [Brunner \(1994.\)](#) među prvima objasnili topljivost metilksantina (kofeina, teofilina i teobromina) u superkričnom CO₂. Ispitali su njihovu topljivost na različitim temperaturama (40,18 °C i 79,85 °C) te u rasponu tlakova od 200 do 350 bara nakon čega su došli do zaključka kako se unatoč njihovoj sličnoj kemijskoj strukturi, njihova topljivost u superkričnom CO₂ bitno razlikuje. Kofein je za jedan red veličine topljiviji od teofilina te za dva reda veličine topljiviji od teobromina. Zapravo, na njihovu topljivost utječe polarnost medija dok se polarnost ovih komponenti međusobno ne razlikuje

previše. Zbog utjecaja molekulskih interakcija koje su očito različite kod ovih komponenti, autori kao razlog navode odsutnost ili prisutnost metilne skupine. Tako veće molekulske interakcije metilksantina i CO₂ dovode do bolje topljivosti, dok se povećanjem temperature pri konstantnoj gustoći također povećava topljivost i to zbog povećanja tlaka para komponenti. [Brunner i sur. \(1992\)](#) su također naglasili bolju topivost kofeina u superkritičnom CO₂ od teobromina. Osim toga, osvrnuli su se i na udio vode u polaznom sirovom materijalu kao značajan parametar učinkovitosti same ekstrakcije, isto kao samo otapalo i primijenjeni tlak. [Mohamed i sur. \(2002\)](#) su ekstrahirajući kofein, teobromin i kakaovu mast iz brazilskog kakaovog zrna superkritičnim CO₂ uz etan kao kootapalo došli do zaključka kako su metilksantini topljiviji u etanu kao kootapalu nego u čistom CO₂. U ovome radu nije bilo korišteno kootapalo budući da sama konstrukcija uređaja nema mogućnost dodavanja kootapala te su dobivene koncentracije bioaktivnih komponenata kakaove ljuske bile niže u usporedbi sa sličnim studijama. Također za zaključiti je kako je ekstraktibilnost pojedinih komponenti u ovisnosti kako o položaju njihovih funkcionalnih skupina tako i o molekularnoj masi te polarnosti. Iako topivost fenolnih komponenata u ekstraktima nije bila velika, ukupni fenolni sadržaj bio je u korelaciji s antioksidacijskom aktivnošću te se pokazalo kako je veći pri višim temperaturama i duljim ekstrakcijama te pri nižem tlaku.

[Saldaña i sur. \(2002\)](#) također su potvrdili bolju ekstraktibilnost kofeina (čak 98%) iz mokrih *guaraná* sjemenki i *maté* listova čaja nego teobromina iz kakaovog zrna te su ustanovili veću selektivnost CO₂ prema kofeinu u usporedbi s teobrominom. Naveli su i utjecaj nekih ostalih mogućih komponenti u pojedinim prirodnim proizvodima na ekstrakciju metilksantina. Također su spomenuli kako je dodatak etanola od velike važnosti za bolju ekstraktibilnost metilksantina pogotovo teobromina iz kakaovih zrna.

[González-Alejo i sur. \(2019b\)](#) ekstrahirali su mast i metilksantine (teobromin i kofein) iz kakaove ljuske pod uvjetima tlaka od 137,90 do 413,69 bara i temperature od 44,85 do 59,85 °C. Dobili su kofeina u rasponu od 38,52% do 78,38% dok se teobromin zadržao u prahu kakaove ljuske za više od 90%. Ekstrakcijska metoda bila je učinkovita za uklanjanje masti i kofeina uz zaostatak kakaovog praha koji je također sadržavao visokofunkcionalne komponente. [González-Alejo i sur. \(2019a\)](#) u drugom su radu uz iste uvjete tlaka i pod temperaturama od 39,85 do 59,85 °C te vremenom trajanja ekstrakcije od 30 do 90 minuta dobili udio masti od 94,73%. Kofein je pokazao varijabilnost pri ekstrakciji, te ga se tek kroz šest uzastopnih ekstrakcija uspjelo ekstrahirati preko 90%, dok je teobromin bilo gotovo nemoguće ekstrahirati. Neki drugi autori poput [Li i Hartland \(1992\)](#) naveli su poteškoće kod ekstrahiranja masti i metilksantina iz kakaovih zrna zbog slabe topljivosti u čistom CO₂, indicirajući važnost korištenja polarnih otapala, poput etanola kao kootapala što poboljšava učinkovitost ekstrakcije masti. Štoviše, to nije isti slučaj s metilksantinima. Već je prije

spominjano kako je teobromin za dva reda veličine slabije topljiv u supekritičnom CO₂ za razliku od kofeina, što je posljedica razlika u točki fuzije i njezinoj entalpiji ovih komponenti.

Budući da su se superkritični ekstrakti pokazali izuzetno voskastim i prema polaznim pretpostavkama bogati masnim kiselinama, a siromašni metilksantinima i fenolnim komponentama (**Tablica 45**) provedena su i dodatna istraživanja na određenim tlakovima (200 i 300 bar) kao i na tri temperature (40, 60 i 80 °C) te je bila praćena i kinetika procesa ekstrakcije. Rezultati su pokazali prinose ekstrakta u ovisnosti o potrošnji CO₂ gdje se može primjetiti kako se ekstrakcija odvijala u tri dijela (period brze ekstrakcije, prijelazni period te period spore ekstrakcije). **Slike 50 i 51** predstavljaju prinose ekstrakcije u ovisnosti o potrošnji CO₂ odnosno o vremenu ekstrakcije. Pri temperaturi od 40 °C, malo veći prinos ekstrakta dobiven je pri 300 bara u odnosu na prinos ekstrakta pri 200 bara uz sličnu potrošnju CO₂. Porastom temperature, prinos ekstrakta također raste s manjom potrošnjom CO₂. Na temperaturama od 60 i 80 °C te tlaku od 300 bara rezultati su bili gotovo isti tj. prinos ekstrakta bio je jednak uz istu potrošnju CO₂. Najveći prinos od 3,05% ostvaren je pri temperaturi od 80 °C i tlaku od 200 bara, uz potrošnju od 42,09 kg CO₂/kg proizvoda. Stoga se može zaključiti kako porastom temperature i tlaka povećava se i prinos ekstrakcije. Međutim, pri temperaturi od 80 °C, tlak pokazuje različit utjecaj tj. veći prinosi ekstrakta dobiveni su pri nižem tlaku. To se vjerojatno može objasniti promjenama u gustoći CO₂. Naime, gustoća CO₂ povećava se povećanjem tlaka, što može smanjiti koeficijent difuzije uzrokujući smanjenu interakciju između superkritičnog CO₂ i matriksa te tako smanjiti prinos ekstrakcije. **Slika 52** predstavlja prinose ekstrakta dobivenih ekstrakcijom superkritičnim CO₂ pri različitim procesnim uvjetima kao i konvencionalnom Soxhlet ekstrakcijom s heksanom. Soxhlet ekstrakcija dala je slične rezultate (2,86%) kao ekstrakcija superkritičnim CO₂ (3,05%) no unatoč sličnosti u rezultatima ovih dviju ekstrakcija, konvencionalna Soxhlet ekstrakcija trajala je četiri sata, što je skoro dva puta duže od trajanja ekstrakcije superkritičnim CO₂. Nadalje, uklanjanje organskog otapala kao što je heksan zahtijeva dodatnu potrošnju energije dok ekstrakcija superkritičnim CO₂ predstavlja ekološki prihvatljivu tehniku bez potrebe uklanjanja otapala.

Sadržaj pojedinačnih masnih kiselina u SC-CO₂ ekstraktima kao i u ekstraktima dobivenim konvencionalnom Soxhlet metodom prikazan je u **Tablici 51**. Generalno promatrajući udjele masnih kiselina dobivene objema tehnikama može se reći kako je najviše masnih kiselina dobiveno ekstrakcijom superkritičnim CO₂ u ovisnosti o primjenjenim parametrima i to oleinske kiseline (od 22,830 do 24,530%) dok je konvencionalnom Soxhlet metodom dobiveno nešto manje oleinske kiseline (19,740%). Palmitinska masna kiselina bila je druga zastupljena masna kiselina u ekstraktu (od 16,590 do 20,480% - dobiveno s SC-CO₂ tj. 17,410% dobiveno Soxhlet metodom). Stearinske masne kiseline ekstrahirano je od 13,720 do 17,180% sa SC-CO₂ tj. 12,400% Soxhlet metodom ekstrakcije. Linolna masna kiselina bila je zastupljena u

SC-CO₂ ekstraktu u vrijednostima od 7,750 do 8,090% tj. 7,590% dobiveno Soxhlet metodom. Palmitoleinska masna kiselina bila je zadnja zastupljena masna kiselina u ekstraktu kakaove ljuske (od 1,690 do 2,420% dobiveno s SC-CO₂ te 2,390% dobiveno Soxhlet metodom). Sastav masnih kiselina u kakaovoj ljusci dobiven u ovoj doktorskoj disertaciji (**Tablica 48**) podudara se sa sastavom masnih kiselina prema [El-Said i sur. \(1981\)](#) (**Tablica 1**) gdje je također prvenstveno prevladavala oleinska kiselina (28,16%), zatim palmitinska (27,27%), stearinska (12,05%) i linolna kiselina (7,49%) uz palmitoleinska kiselinu (2,55%) u najmanjem omjeru. Promatrajući uvjete SC-CO₂ pri kojima su dobivena najbolja iskorištenja za pojedinu masnu kiselinu, vidljivo je kako je najviše oleinske, stearinske, linolne i palmitoleinske kiseline dobiveno pri temperaturi od 80 °C te tlaku od 300 bara, dok je najviše palmitoleinske kiseline dobiveno pri uvjetima od 60 °C te tlaku od 200 bara (**Tablica 48**).

S obzirom da čovjeku trebaju esencijalne masne kiseline za njegovo funkcioniranje (linolna i α – linolenska kiselina) a koje njegovo tijelo ne može samo sintetizirati ([Glick i Fisher, 2013](#)), ovaj dobiveni masnokiselinski sastav kakaove ljuske mogao bi biti od iznimne važnosti, tim više što kakaova ljuska u pravilu sadrži skoro duplo više linolne kiseline od kakaovog maslaca ([El Saied i sur., 1981](#)). Linolna kiselina, osim što je najčešća esencijalna masna kiselina koja se može pronaći u hrani, sastavni je dio majčinog mlijeka, adaptiranih mlijeka i kašica za novorođenčad, te sastojak biljnih ulja, mesa i jaja. Njezin nedostatak pak može izazvati određene poremećaje s kožom ([Whelan i Fritsche, 2013](#)). Također, preporučena je učestala konzumacija manjih količina ove masne kiseline jer sprječava upalu mozga te učestale glavobolje ako se uzima u kombinaciji s drugim masnim kiselinama (EPA i DHA (eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina)) ([Taha, 2020](#)).

Osim ovih autora, neki drugi navode čak do 90% iskorištenja masti iz kakaove ljuske, i to najvjerojatnije iz dva razloga: a) različiti uvjeti između biljnih matriksa temelje se na komponentama svakog od njih te b) šire istraživanje studijskih faktora gdje je vrijeme značajna stavka ([González-Alejo i sur., 2019a](#)). S obzirom da nisu mogli ekstrahirati više od 5% kakaove masti iz kakaovih zrna, a koja bi mogla uspješno biti ekstrahirana tradicionalnim metodama ekstrakcije, te uz optimizaciju odgovarajućih uvjeta veličine čestica, tlaka, temperature i vremena ekstrakcije [Salajegheh i sur. \(2013\)](#) su zaključili kako ovo nije za to prikladna ekstrakcijska metoda. Svakako su napomenuli i predložili korištenje kootapala koje bi znatno poboljšalo učinkovitost ekstrakcije no opet ne dovoljno za primjenu u industrijskim mjerilima. [Tan i sur. \(2008\)](#) koji su proučavali ekstrakciju kakaove masti iz kakaove mase pomoću superkritične CO₂ ekstrakcije također su zaključili kako su veća iskorištenja pri većim vrijednostima tlaka, temperature i vremena ekstrakcije. Tlak je imao jači utjecaj na ekstrakciju masti nego temperatura. Učinkovitost se također smanjivala s povećanjem veličine čestica. [Asep i sur. \(2013\)](#) proučavali su utjecaj polarnih kootapala na ekstrakciju kakaove masti iz

kakaove mase pomoću superkričnog CO₂. Između izopropanola, etanola i acetona odlučili su kako se etanol pokazao najefikasnijim pri ekstrakciji triglicerida i najvećeg sastava masnih kiselina. [Roiaini i sur. \(2016\)](#) uspoređivali su ekstrakciju kakaove masti različitim metodama ekstrakcije (SC-CO₂, UAE i Soxhlet ekstrakcija) te naveli kako se uz ekstrakciju fitosterola uz višu antioksidacijsku aktivnost najučinkovitijom pokazala baš SC-CO₂ uz etanol kao kootapalo jer je najefikasnije ekstrahirala kakaovu mast dok je Soxhlet ekstrakcija dala najlošiji prinos kako masti tako i fitosterola. [Arlorio i sur. \(2005\)](#) istraživali su pak vrijednosti antioksidacijske aktivnosti i fenola u ekstraktima kakaove ljuske dobivenim SC-CO₂. Rezultati su pokazali kako su ekstrakti bogati fenolnim komponentama te kako bi bili zanimljivi za proizvodnju bojila te kao izvor bioaktivnih komponenata sa funkcionalnim svojstvima.

Primjenom metode odzivnih površina dobiveni optimalni uvjeti za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske ekstrakcijom superkričnim CO₂ uzimajući u obzir njihov maksimum bili su pri tlaku od 134,94 bara, temperaturi od 60 °C u vremenu trajanja ekstrakcije od 120 minuta. Pri tim uvjetima koncentracija galne kiseline bila je 0,189 mg/g, teobromina 0,824 mg/g, kofeina 2,252 mg/g, ukupnog fenolnog sadržaja 72,641 mgGAE/g_{ekstr.} te DPPH 31,161% (**Tablica 59**) što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima.

5.1.5. Ekstrakcija vodom u supkričnom stanju

Prvo istraživanje ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske vodom u supkričnom stanju proveli su [Jokić i sur. \(2018a\)](#) navodeći kako je odabir procesnih parametara ekstrakcije izuzetno važan pri dobivanju ciljanih bioaktivnih komponenata poput metilksantina i fenolnih komponenti.

Optimizacija procesnih parametara ekstrakcije vodom u supkričnom stanju provedena je kroz 17 različitih eksperimenata, pri čemu su varirali temperatura (od 120 do 220 °C), omjer tekuće/kruće (od 10 do 30 mL/g) te vrijeme trajanja ekstrakcije (od 15 do 75 minuta). Kao što je vidljivo iz dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 52**, najzastupljenije bioaktivne komponente kakaove ljuske nakon SWE ekstrakcije bili su teobromin i epikatehin. Teofilin i HMF bili su pak detektirani samo pri temperaturama ekstrakcije od 220 °C. Koncentracija teobromina varirala je od 4,141 mg/g do 19,200 mg/g, dok je koncentracija epikatehina varirala od 0,500 mg/g do 5,910 mg/g. Koncentracija kofeina varirala je od 0,183 mg/g do 1,070 mg/g. Iz **Tablice 52** se također može zamijetiti povećanje koncentracije teobromina u dobivenim ekstraktima pri ekstrakciji provedenoj na temperaturama od 120 °C do 170 °C dok na višim temperaturama ta koncentracija znatno opada. Moguće objašnjenje je konverzija detektiranog kofeina u teobromin pri višim temperaturama ekstrakcije zbog moguće degradacije obiju ovih

komponentata u manje komponente (Jokić i sur., 2018a). Budući da se u istraživanjima gdje se primjenjuje SWE koriste povišene temperature, za očekivati je da će tada doći do degradacije pojedinih komponenata što je bio i slučaj u ovom istraživanju. Prema literaturnim podacima više je mogućih degradacijskih mehanizama metilksantina. Kofein tako može degradirati u teobromin, teofilin i paraksantin, te također u 1,3,7 – metiluričnu kiselinu. Istovremeno, teobromin može izomerizirati u teofilin i paraksantin. Također, moguća je i degradacija teobromina u 3-metilksantin i 7-metilksantin koji se također mogu formirati iz paraksantina, dok se 3-metilksantin može formirati iz teofilina. 1-metilksantin pak može biti produkt i paraksantina i teofilina. Svi ovi metilksantini mogu hidroksilacijom formirati uričnu kiselinu. Nadalje, otvaranjem imidazolskog prstena metilksantina moguća je tvorba manjih komponenti (Gummadi i sur., 2012; Sunil i sur., 2014).

Najzastupljenija fenolna komponenta dobivena ekstrakcijom supkritičnom vodom u svih 17 eksperimenata bio je epikatehin (maksimalni prinos od 5,910 mg/g) pri temperaturi od 170 °C, 30 mL/g omjera tekuće/kruće u vremenu trajanja ekstrakcije od 75 minuta dok je najmanja koncentracija izmjerena pri temperaturi od 120 °C, 20 mL/g omjera tekuće/kruće u vremenu trajanja ekstrakcije od 75 minuta (0,500 mg/g). Najveća koncentracija kofeina (1,07 mg/g) dobivena je pri temperaturi od 170 °C, 30 mL/g omjera tekuće/kruće u vremenu trajanja ekstrakcije od 15 minuta. Iz dobivenih rezultata može se zamijetiti kako su klorogenska kiselina kao i katehin detektirani samo na temperaturama višim od 220 °C dok je galna kiselina pronađena samo u tragovima. Klorogenska kiselina, osim što je poznata po mnogobrojnim medicinskim svojstvima, ima snažnu antioksidacijsku aktivnost, hepatoprotektivne, hipoglikemijske te antiviralne funkcije (Maalik i sur., 2016). HMF, koji je pri ovoj ekstrakciji ekstrahiran samo pri višim temperaturama zapravo nije poželjan spoj u ekstraktima s obzirom na njegove karakteristike. Iako se može metabolizirati u 5-sulfoksimetilfurfural koji ima antioksidativna i protuupalna svojstva, HMF se najčešće povezuje s nekim štetnim učincima uslijed svojih mutagenih, genotoksičnih i organotoksičnih svojstava (Shapla i sur., 2018) te je zbog toga njegova prisutnost u ekstraktima upitna.

Iz rezultata je vidljivo kako je samo pet odziva (teobromin, kofein, epikatehin, ukupni fenolni sadržaj te antioksidacijska aktivnost) detektirano u svih 17 eksperimenata te kako su se uzimali u obzir pri daljnjim statističkim izračunima. Statistička značajnost regresijskih jednadžbi za svaki odabrani odziv evaluirana je analizom varijance (ANOVA) i prikazana u **Tablicama 53-57**. Temperatura kao procesni parametar pokazala je najveći statistički značajan utjecaj za sve ispitivane odzive ($p < 0,05$). Regresijski modeli za sve ispitivane odgovore bili su statistički značajni promatrajući njihove p -vrijednosti (od 0,0004 do 0,0172) sa zadovoljavajućim koeficijentima determinacije (R^2) u rasponu od 0,88 do 0,96. Neprikladnost modela tj „odstupanje od modela“ nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$) što znači da je polinom

jednadžbe drugog reda adekvatan za preciznu procjenu eksperimentalnih vrijednosti. S obzirom da je vjerojatnost (p -vrijednost) svih regresijskih modela ispod 0,05, znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva. Za teobromin osim linearnog člana modela temperature ($p=0,0391$), i njegov kvadratni član pokazao je statistički značajan utjecaj ($p=0,0012$) kao i kvadrat člana modela koji se odnosi na omjer tekuće/kruto ($p=0,0208$) (**Tablica 53**). Kod kofeina linearni član modela koji se odnosi na temperaturu imao je statistički značajan utjecaj ($p=0,00484$) kao i njegov kvadratni član modela ($p=0,0002$) (**Tablica 54**). Utvrđena je i značajnost modela jer je F -vrijednost od 5,53 za teobromin tj. 6,35 za kofein velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 1,72% tj. 1,18% (**Tablice 53 i 54**). Linearni član temperature kao i vremena ekstrakcije pokazao je statistički značajan utjecaj kod epikatehina ($p=0,0004$ i $p=0,0143$) kao i kvadrat temperature ($p<0,0001$). Utvrđena je i značajnost modela jer je F -vrijednost od 19,31 za epikatehin velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 0,04% (**Tablica 55**). Za ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijsku aktivnost vidljiva je sličnost u statističkoj značajnosti određenih procesnih parametara. Temperatura je kod obje komponente pokazala statistički značajan utjecaj ($p=0,0085$ i $p=0,0186$) kao i omjer tekuće/kruto ($p=0,007$ i $p=0,0351$). Interakcija temperature i vremena također je pokazala statistički značajan utjecaj kod obje komponente ($p=0,0004$ i $p=0,0022$) kao i kvadratni član modela koji se odnosi na vrijeme trajanja ekstrakcije ($p=0,0082$ i $p=0,0453$). Samo kod ukupnog fenolnog sadržaja još je i interakcija temperature i omjera tekuće/kruto pokazala statistički značajan utjecaj ($p=0,0133$) što kod antioksidacijske aktivnosti nije bio slučaj. Utvrđena je i značajnost modela jer je F -vrijednost od 10,81 za ukupni fenolni sadržaj tj. 6,01 za antioksidacijsku aktivnost velika te je vjerojatnost da je to uslijed šuma manja od 0,24% tj. 1,37% (**Tablice 56 i 57**).

Iz prikaza trodimenzionalnih dijagrama vidljivo je kako je temperatura imala značajan utjecaj na dobivene koncentracije teobromina (**Slika 53**) i kofeina (**Slika 54**). Porastom temperature ekstrakcije više od 170 °C, ovi metilksantini pokazali su tendenciju smanjivanja koncentracije, dok omjer tekuće/kruto i vrijeme za njih nisu imali značajniji utjecaj. Rezultati su pokazali kako temperatura predstavlja ekstremno važan parametar zahvaljujući činjenici da se pri različitim temperaturama formiraju različite komponente. To je razlog zašto je toliko važno optimirati proces ekstrakcije. Trodimenzionalni dijagrami za epikatehin pokazali su tendenciju rasta koncentracije uz porast temperature do 170 °C. Daljnjim porastom temperature zamijećen je pad u koncentraciji epikatehina. Povećanje omjera tekuće/kruto kao i dulje vrijeme ekstrakcije nisu pokazali značajan utjecaj na koncentraciju epikatehina (**Slika 55**). Trodimenzionalni dijagrami za ukupni fenolni sadržaj (**Slika 56**) i antioksidacijsku aktivnost (**Slika 57**) pokazali su sličnost, što je bilo i za očekivati zbog njihove već dokazane korelacije. Također, dijagrami su potvrdili jednaki utjecaj procesnih parametara za oba ispitivana odziva tj. tendenciju

smanjivanja s povećanjem temperature ekstrakcije, omjera tekuće/kruto kao i primjenom dužeg vremena ekstrakcije. Dobiveni rezultati prikazuju kako ukupni fenolni sadržaj u ekstraktima kakaove ljuske dobivenim ovom tehnikom ekstrakcije može značajno varirati ovisno o ekstrakcijskim uvjetima, i to od 27,26 (SWE uvjeti: 120 °C, 75 min, 20 mL/g) do 130,33 mg GAE/g (SWE uvjeti: 220 °C, 75 min, 20 mL/g) dok je antioksidacijska aktivnost bila u rasponu od 19,20% DPPH (SWE uvjeti: 120 °C, 75 min, 20 mL/g) do 91,69% DPPH (SWE uvjeti: 220 °C, 75 min, 20 mL/g). Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije BBD plana pokusa za SWE prikazani su u **Tablici 58**.

Utjecaj temperature na ukupni fenolni sadržaj kao i na antioksidacijsku aktivnost proučavali su i drugi autori. Tako su u svojim preglednim radovima [Plaza i Turner \(2015\)](#) te [Okiyama i sur. \(2017\)](#) zapazili veći antioksidacijski kapacitet na temperaturama višim od 175 °C kao i primjenom dužeg vremena ekstrakcije, i to u usporedbi s ekstraktima dobivenim na nižim temperaturama i pri kraćim ekstrakcijama. U većini tih studija mjeren je samo ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijska aktivnost bez podataka o kvantifikaciji pojedinih bioaktivnih komponenti.

Već je prije spomenuto kako je za visoki ukupni fenolni sadržaj u kakaovoj ljusci najvjerojatnije zaslužna migracija nekih fenolnih komponenti poput katehina, epikatehina i procijanidina iz kotiledona kakaovog zrna u kakaovu ljusku tijekom procesa fermentacije ([Kim i Keeney, 1984](#); [Hammerstone i sur., 1999](#)).

Primjenom metode odzivnih površina u ovom istraživanju dobiveni su optimalni uvjeti procesa ekstrakcije vodom u supkritičnom stanju: temperatura od 191,37 °C, vrijeme trajanja ekstrakcije od 57,69 minuta te omjer tekuće/kruto od 19,89 mL/g. Pri tim optimalnim uvjetima, predviđena koncentracija teobromina bila je 15,916 mg/g, kofeina 0,834 mg/g, epikatehina 4,756 mg/g, ukupnog fenolnog sadržaja 109,26 mg GAE/g_{ekstr.} te DPPH 77,17% (**Tablica 59**) što se slaže s eksperimentalno dobivenim podacima.

Slika 58 prikazuje sumarni grafički prikaz maksimalnih udjela bioaktivnih komponenata (mg/g) u ekstraktima kakaove ljuske dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije. Najprikladnijom se pokazala SWE s obzirom na velika iskorištenja pojedinih komponenti (teobromin, epikatehin, teofilin, katehin, klorogensku kiselinu i kofein), no s posebnim naglaskom kako je potrebno voditi računa da se jedino primjenom ove tehnike ekstrakcije na višim temperaturama ekstrahira i HMF koji nije poželjan u ekstraktima. Soxhlet konvencionalna metoda ekstrakcije nije se pak pokazala prikladnom za ekstrakciju ovih komponenti.

Rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji dobiveni primjenom različitih inovativnih zelenih tehnika ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske ukazuju na mogućnost potencijalne primjene ovih obogaćenih ekstrakata kao potencijalnih sirovina u daljnjim

procesima (prehrambenoj, farmaceutskoj, kemijskoj i kozmetičkoj industriji). Slijedom toga, zamjena konvencionalnih metoda ekstrakcije inovativnim zelenim tehnikama ekstrakcije, osim dobivanja visokovrijednih ekstrakata, smanjila bi i uporabu toksičnih kemikalija. Nadalje, ekstrakcijom nekih komponenti iz ovoga nusproizvoda, poput teobromina koji je u većoj koncentraciji toksičan, moguće je dobiti primjereniji biljni materijal za hranidbu životinja i to bez ograničenja. Sam proces ekstrakcije zahtjeva i pomnu optimizaciju procesnih parametara zelenih tehnologija na prinos i sastav ekstrakata kakaove ljuske koja bi omogućila njihovo korištenje i primjenu dobivenih laboratorijskih rezultata i u industrijskim mjerilima. Slijedom toga, zelene tehnike ekstrakcije uvelike bi mogle pronaći svoje mjesto i u drugim industrijskim sektorima koji imaju problem otpada a sadrže visokovrijedne komponente koje se mogu implementirati u nove proizvode.

6. ZAKLJUČCI

Prema dobivenim rezultatima došlo se do sljedećih zaključaka:

- Utvrđen je utjecaj svih ispitanih inovativnih tehnika ekstrakcije (UAE, DES/MAE, HVED, SC-CO₂ i SWE), kao i procesnih parametara pojedine tehnike ekstrakcije, na udio ciljanih bioaktivnih komponenti u dobivenim ekstraktima kakaove ljuske.
- Prema statističkoj značajnosti (ANOVA) utjecaja različitih procesnih uvjeta na ekstrakciju bioaktivnih komponenti vidljivo je sljedeće: kod UAE na udio teobromina, kofeina, galne kiseline, katehina, epikatehina i kafeinske kiseline najveći utjecaj ima omjer tekuće/kruto. Pri DES/MAE odabir otapala te udio vode u eutektičkoj smjesi imaju statistički najznačajniji utjecaj na koncentraciju teobromina, kofeina, katehina, kafeinske kiseline i ukupni fenolni sadržaj dok je antioksidacijska aktivnost ovisila samo o temperaturi. Kod HVED najveći utjecaj na ekstrakciju bioaktivnih komponenti i antioksidacijsku aktivnost je pokazao omjer tekuće/kruto. Kod SC-CO₂ tlak se pokazao kao statistički najznačajnijim parametrom za sve ispitivane odzive za razliku od SWE gdje je temperatura bila dominantni parametar.
- Dobivene vrijednosti bioaktivnih komponenti određene visokosofisticiranom kromatografskom tehnikom kretale su se u sljedećim rasponima: teobromin od 0,249 mg/g do 19,200 mg/g uzorka, kofein od 0,156 mg/g do 3,418 mg/g uzorka, ukupni fenolni sadržaj od 20,590 mgGAE/g_{ekstr.} do 132,897 mgGAE/g_{ekstr.} te antioksidacijska aktivnost od 2,435% do 91,69%, u ovisnosti o odabranoj tehnici i parametrima ekstrakcije.
- Za ekstrakciju teobromina kao i fenolnih komponenti (katehina i epikatehina) iz kakaove ljuske najpogodnija se pokazala ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju (SWE), dok je za ekstrakciju kofeina najučinkovitija bila ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SC-CO₂). Za ekstrakciju galne kiseline najpogodnijom se pokazala UAE a za ekstrakciju kafeinske kiseline DES/MAE. Klorogenska kiselina kao i epigalokatehin te vanilin bili su ispod granice detekcije.
- Najveći ukupni fenolni sadržaj i antioksidacijsku aktivnost pokazali su ekstrakti kakaove ljuske dobiveni SWE.
- HMF i teofilin bili su prisutni samo u ekstraktima dobivenim SWE pri temperaturi od 220 °C.
- Primjenom suvremene metode ekstrakcije superkritičnim CO₂ moguće je ekstrahirati masne kiseline iz kakaove ljuske u značajnoj mjeri (oleinska, palmitinska, stearinska, linolna te palmitoleinska masna kiselina).
- Odabrane zelene inovativne metode ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih komponenata iz kakaove ljuske pokazale su se kao izvrsna zamjena konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama.

- Optimizacijom odabranih inovativnih zelenih tehnika ekstrakcije te utjecajem različitih procesnih parametara moguće je postići različit željeni sastav ekstrakata kakaove ljuske bogatih određenim bioaktivnim komponentama.
- Značenje predloženog istraživanja ogleda se u proizvodnji ekstrakata bogatih bioaktivnim komponentama iz nusproizvoda prehrambene industrije – kakaove ljuske koji se dalje mogu koristiti u različite svrhe i imati potencijalnu primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i /ili prehrambenoj industriji.

7. LITERATURA

- Adamafio NA: Theobromine Toxicity and Remediation of Cocoa By-products: An Overview. *Journal of Biological Sciences*, 13(7):570-576, 2013.
- Afoakwa EO, Qoao J, Takrama J, Simpson Budu A, Kwesi Saalia F: Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6):1097-1105, 2013.
- Ahmad F, Daud WMAW, Ahmad MA: Using cocoa (*Theobroma cacao*) shell-based activated carbon by CO₂ activation in removing of Cationic dye from aqueous solution: Kinetics and equilibrium studies. *Chemical Engineering Research and Design*, 90:1480-1490, 2012.
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkritičnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2015.
- Almohammed F, Koubaa M, Khelfa A, Nakaya M, Mhemdi H, Vorobiev E: Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. *Food and Bioprocess Technology*, 103:95-103, 2017.
- Alomar, MK, Hayyan MH, Alsaadi MA, Akib S, Hayyan A, Hashim MA: Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 215: 98–103, 2016.
- Ameer K, Shahbaz HM, Kwon J-H: Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2):295-315, 2017.
- Aprotosoae AC, Miron A, Trifan A, Luca VS, Costache II: The cardiovascular effects of cocoa polyphenols—An overview. *Diseases*, 4:39, 2016.
- Aregheore EM: Chemical evaluation and digestibility of cocoa (*Theobroma cacao*) byproducts fed to goats. *Tropical Animal Health and Production*, 34:339-348, 2002.
- Arlorio M, Coisson JD, Restani P, Martelli A: Characterization of Pectins and Some Secondary Compounds from *Theobroma cacao* Hulls. *Food Chemistry and Toxicology*, 66(5):653-656, 2001.
- Arlorio M, Coisson JD, Travaglia F, Varsaldi F, Miglio G, Lombardi G, Martelli A: Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*, 38:1009-1014, 2005.
- Armenta S, Garrigues S, de la Guardi M: The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 71:2-8, 2015.
- Asep EK, Jinap S, Jahurul MHA, Zaidul ISM, Singh H: Effects of polar cosolvents on cocoa butter extraction using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20:152–160, 2013.

- Ashihara H, Kato M, Crozier A: Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 200:11-31, 2011.
- Awarikabey E, Kingsley Amponsah I, Yeboah Woode M: The value of the cocoa bean shell (hull) and the effect of various processing methods on the phyto-constituents and antioxidant activity of the nib and shell. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4(3):58-64, 2014.
- Azizah AH, Nik Ruslawati NM, Swee Tee T: Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, 64(2):199–202, 1999.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM: Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4):426-436, 2013.
- Azwanida NN: A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3):196, 2015.
- Bajkacz S, Adamek J: Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Analytical Methods*, 11(5):1330-1344, 2018.
- Bamba BSB, Shi J, Tranchant CC, Xue SJ, Forney CF, Lim L-T: Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. *Molecules*, 23(7):1685, 2018.
- Barba FJ, Boussetta N, Vorobiev E: Emerging Technologies for the recovery of isothiocyanates, protein and phenolic compounds from rapeseed and rape-seed press-cake: Effect of high-voltage electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31: 61-72, 2015.
- Barbosa-Pereira L, Guglielmetti A, Zeppa G: Pulsed electric field assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shell and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 11(4):818–835, 2018.
- Barišić V, Flanjak I, Križić I, Jozinović A, Šubarić D, Babić J, Miličević B, Ačkar Đ: Impact of high-voltage electric discharge treatment on cocoa shell phenolic components and methylxanthines. *Journal of Food Process Engineering*, 43, 2019, doi:10.1111/jfpe.13057
- Baş D, Boyacı IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3):836–845, 2007.
- Beckett ST: *Industrial Chocolate Manufacture and Use*: Wiley-Blackwell, IV. Ed. 2011.
- Beckett ST, Fowler M, Ziegler GR: *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Wiley Blackwell, 5.izd, 2017.
https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=x_AaDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=RA1-PA9&dq=cocoa+shell+from+Ghana&ots=ul_KRTQQhS&sig=s6T0X1E7mTaLQ8X9IFCW FHuaV-0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false [06.04.2019]

- Bentil JA, Dzogbefia VP, Alemawor F: Enhancement of the nutritive value of cocoa (*Theobroma cacao*) bean shells for use as feed for animals through a two-stage solid state fermentation with *Pleurotus ostreatus* and *Aspergillus niger*. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 3:20-30, 2015.
- Bernhoft A: A brief review on bioactive compounds in plants. U: *Bioactive compounds in plants: benefits and risks for man and animals*. Editor: Bernhoft A, Norveška, str. 11-17, 2010.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:965-977, 2008.
- Boussetta N, Vorobiev E: Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3):197-203, 2014.
- Bravo L: Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11):317-333, 1998.
- Brianceau S, Turk M, Vitrac X, Vorobiev E: High voltage electric discharges assisted extraction of phenolic compounds from grape stems: Effect of processing parameters on flavan-3-ols, flavonols and stilbenes recovery. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35: 67-74, 2016.
- Bromberger Soquetta M, de Marsillac Terra L, Peixoto Bastos C: Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, 16(1):400-412, 2018.
- Bruna C, Eichholz I, Rohn S, Kroh IW, Huyskens-Keil S: Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83:9-13, 2009.
- Brunner G, Zwiefelhofer U, Simon A: Extraction of Xanthines from Cocoa Nut Shells with Carbon Dioxide. *Process Metallurgy*, 7(B):1661-1670, 1992
- Brunner G: Hydrothermal and supercritical water processes. U: *Supercritical fluid science and technology series*, 1. izd. Vol. 5, str. 569-588. 2014.
- Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z: Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chemistry*, 190:317-323, 2016.
- Cai C, Li F, Liu L, Tan Z: Deep eutectic solvents used as the green media for the efficient extraction of caffeine from Chinese dark tea. *Separation and Purification Technology*, 227(15):115723, 2019.
- Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD: Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81:172-184, 2018.
- Carr AG, Mammucari R, Foster NR: A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1):1-17, 2011.

- Carrillo LC, Londoño-Londoño J, Gil A: Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60:273–280, 2014.
- Castro-Puyana M, Marina ML, Plaza M: Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5:31-36, 2017.
- Chan CH, Yeoh HK, Yusoff R, Ngoh GC: A first-principles model for plant cell rupture in microwave-assisted extraction of bioactive compounds. *Journal of Food Engineering*, 188:98-107, 2016.
- Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL: Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37):6213-6225, 2011.
- Chemat F: Essential oils and aromas: Green extractions and Applications: HKB Publishers, Dehradun, 2009.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M: Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34:540-560, 2017.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G: Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7):8615-8627, 2012.
- Chemat F, Vian MA, Ravi HK, Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, Fabiano Tixier A-S: Review Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules* 2019, 24, 3007
- Chemat F, Zill e-H, Khan MK: Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4):813–835, 2011.
- Chimowitz EH, Kelley FD, Munoz FM: Analysis of retrograde behavior and the cross-over effect in supercritical fluids. *Fluid Phase Equilibria*, 44(1):23-52, 1988.
- Chizoba Ekezie F-G, Sun D-W, Cheng J-H: Acceleration of microwave assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. *Trends in Food Science & Technology*, 67:160-172, 2017.
- Cui Q, Liu J-Z, Wang L-T, Kang Y-F, Meng Y, Jiao J, Fu Y-J: Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184:826–835, 2018.
- Cunha SC, Fernandes J: Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends in Analytical Chemistry*, 105:225-239, 2018.
- Cvjetko Bubalo M, Čurko N, Tomašević M, Kovačević Ganić K, Radojčić Redovniković I: Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200:159-166, 2016b.

- Cvjetko Bubalo M, Panić M, Radošević K, Radojčić Redovniković I: Metode priprave eutektičkih otopala. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 11(3-4):164-168, 2016a.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90:1631–1639, 2015.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109:52-73, 2018.
- Dai Q: Effects of alkalization and roasting on free and bound phenolic compounds in cocoa nibs and shells. A Master Thesis in food science. The Pennsylvania State University, 144, 2017. [dostupno na: https://etda.libraries.psu.edu/files/final_submissions/15994]
- Daso AP, Okonkwo OJ: Conventional extraction techniques: Soxhlet and liquid-liquid extractions and evaporation. U: *Analytical Separation Science*, Editori: Anderson JL, Berthod A, Estévez VP, Stulcup AM. 1.izd., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 1437-1468, 2015.
- De la Calle I, Costas-Rodríguez M: Microwaves for greener extraction. U: *The application of green solvents in separation processes*, Editori: Pena-Pereira F, Tobiszewski M. Elsevier, Fedor J, str. 253-300, 2017.
- De Melo MMR, Silvestre AJD, Silva CM: Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176, 2014.
- Dent M, Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Bosiljkov T, Ježek D, Brnčić M: Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(3):475-484, 2015.
- Di Mattia CD, Sacchetti G, Mastrocola D, Serafini M: From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on *In Vitro* Antioxidant Activity and the Effects of Chocolate on Antioxidant Markers *In Vivo*. *Frontiers in Immunology*, 8,1207:2017.
- Dixon RA: Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847, 2001.
- Dong MW: Modern HPLC for practicing scientists, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.
- Dongowski G, Kruse HP, Petrzika M, Bock W: Untersuchungen über die Zusammensetzung der Polysaccharide und Ballaststoffe von Kakaoschalen sowie in deren Extraktionsrückständen und Extraktstoffen. *Nahrung*, 5:455-464, 1991.
- Drmić H, Režek Jambrak A: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of food science and technology*, 2(2):22-33, 2010.
- El-Saied HM, Morsi MK, Amer MMA: Composition of cocoa shell fat as related to cocoa butter. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 20(2):145-151, 1981.

- Esclapez MD, García-Pérez JV, Mulet A, Cárcel JA: Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3:108-120, 2011.
- Europska komisija: Europa 2020.: Europska strategija za pametan, održiv i uključiv rast. Bruxelles, 3.3.2010. [dostupno na: <https://mzo.hr/sites/default/files/migrated/europa-2020.pdf>]
- Fioresi F, Vieillard J, Bargougui R, Bouazizi N, Nkuigwe Fotsing P, Djoufac Wooumfo E, Brun N, Mofaddel N, Le Derf F.: Chemical modification of the cocoa shell surface using diazonium salts. *Journal of Colloid Interface and Science*, 494:92-97, 2017.
- Fischer V: Properties and applications of deep eutectic solvents and low-melting mixtures. Doktorski rad. Fakultet za kemiju i farmaciju, Regensburg, 2015. https://epub.uni-regensburg.de/31832/1/Doktorarbeit_Veronika_Fischer_04_05_15.pdf
- Fowler GS: The composition and feeding value of cocoa shells. Master Thesis, University of Massachusetts Amherst, 1914.
- Fraige K, Arrua RD, Sutton AT, Soleo Funari C, Cavalheiro AJ, Hilder EF, da Silva Bolzani V: Using natural deep eutectic solvents for the extraction of metabolites in *Byrsonima intermedia* leaves. *Journal of Separation Science*, 42(2):591-597, 2018.
- Gagić T, Jokić S, Knez Ž, Škerget M: High-pressure technologies as promising green methods for extraction of cocoa shell. 17.-ti Ružičkini dani, Vukovar, 2018.
- García A, Rodríguez-Juan E, Rodríguez-Gutiérrez G, Rios JJ, Fernández-Bolaños J: Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197:554-561, 2016.
- Gaspar S, Ramos F: Caffeine: Consumption and health effects. U: *Encyclopedia of food and health*. University of Coimbra, Coimbra, Portugal. Editori: Caballero B, Finglas PM, Toldra F, Academic Press, Oxford, str. 573-578, 2016.
- Gil-Chávez J, Villa JA, Ayla-Zavala JF, Heredia JB, Sepulveda D, Yahia EM, González-Aguilar GA: Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12:1-23, 2013.
- Glick NR, Fischer MH: The Role of Essential Fatty Acids in Human Health. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 18(4):268-289, 2013.
- Gomez AV, Biswas A, Tadini CC, Vermillion KE, Buttrum M, Cheng HN: Effects of Microwave and Water Incorporation on Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) and their Extraction properties. *Advances in Food Science and Engineering*, 2(4):125-135. 2018
- González-Alejo FA, Barajas-Fernández J, de los Ángeles Olán-Acosta M, Lagunes-Gálvez LM, García-Alamilla P: Supercritical Fluid Extraction of Fat and Caffeine with Theobromine Retention in the Cocoa Shell. *Processes*, 7(6):385, 2019a.

- González-Alejo FA, Barajas-Fernández J, García-Alamilla P: Extraction of soluble compounds from cocoa shell with supercritical CO₂. A methilxantines and fat case. *Ciencia UAT* 13(2):128-140. 2019b.
- Grillo G, Boffa L, Brinello A, Mantegna S, Cravotto G, Chemat F, Dizhbite T, Lauberte L, Telysheva G: Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilotscale cavitation reactors. *Food Research International*, 115:200-208, 2019.
- Grumezescu AM, Holban AM: Handbook of Food Bioengineering: Ingredients extraction by physicochemical methods in food. Vol.4, Elsevier, London UK, 2017.
- Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G: Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9):1600-1606, 2008.
- Guehi TS, Bi Zahouli I, Ban-Koffi L, Fae MA, Nemlin JG: Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(8):1564-1571, 2010.
- Guil-Guerrero JL, Ramos L, Moreno C, Zuniga-Paredes JC, Carlosama-Yopez M, Ruales P: Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189:32-49, 2016.
- Gummadi SN, Bhavya B, Ashok N: Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2):545-554, 2012.
- Gutiérrez TJ: State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6):1313-1344, 2017.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH: Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2):490-496, 1999.
- Hamzat RA, Adeola O: Chemical Evaluation of Co-products of Cocoa and Kola as Livestock Feeding Stuffs. *Journal of Animal Science Advances*, 1(1):61-68, 2011.
- Handojo L, Triharyogi H, Indarto A: Cocoa bean shell waste as potential raw material for dietary fiber powder. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 8:485-491, 2019.
- Hartati I: Hydrotropic extraction of theobromine from cocoa bean shell. *Momentum*, 6(2):17-20, 2010.
- Herceg Z, Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Režek Jambrak A, Zorić Z, Dragović-Uzelac V: Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chemistry*, 190:665-672, 2016.

- Hernández-Hernández C, Morales Sillero A, Fernández-Bolanós J, Bermúdez-Orla A, Azpeitia Morales A, Rodríguez-Gutiérrez G: Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 99(1):325-333, 2018a.
- Hernández-Hernández C, Viera-Alcaide I, Morales Sillero AM, Fernández-Bolanós J, Rodríguez-Gutiérrez G: Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240:831-839, 2018b.
- Higgins JP, MPhil TDT, Higgins CL: Energy Beverages: Content and Safety. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(11):1033-1041, 2010.
- Hii CI, Abhay SM, Law CL, Suzannah S: Effects of heat treatments on cocoa polyphenols during drying. *Malaysian International Cocoa Conference*, 1:210–214, 2013.
- HMD: Validacija analitičkih metoda, Zagreb, 2006.
- HRN EN ISO 12966-1:2015 Životinjske i biljne masti i ulja -- Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom -- 1. dio: Smjernice za suvremenu plinsku kromatografiju metilnih estera masnih kiselina (ISO 12966-1:2014; EN ISO 12966-1:2014)
- HRN EN ISO 12966-2:2017 Životinjske i biljne masti i ulja -- Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom -- 2. dio: Priprava metilnih estera masnih kiselina (ISO 12966-2:2017; EN ISO 12966-2:2017)
- HRN ISO 6492:2001 Stočna hrana – Određivanje udjela masti (ISO 6492:1999)
- Ibáñez E, Cifuentes A: Green extraction techniques: Principles, Advances and Applications, U: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Editor: Barceló D, 76, 1.izd. Wilson & Wilson's, USA, 2017.
- Içen H, Gürü M: Determination of mass transfer coefficients on the obtaining of caffeine from tea stalk by supercritical carbon dioxide with and without ethanol. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(5):2257-2262, 2018.
- Ismail A, Lye Yee C: Antioxidative effects of extracts of cocoa shell, Roselle seeds and a combination of both extracts on the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. *Journal of Food Technology*, 4(1):10-15, 2006.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M: Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103(8):369–378, 2007.
- Johannsen M, Brunner G: Solubilities of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, 95:215-226, 1994.
- Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO₂. Doktorska disertacija, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, 2011.
- Jokić S, Aladić K, Šubarić D: Subcritical Water Extraction Laboratory Plant Design and Application. *Annual of the Croatian Academy of Engineering*, 247-258. 2018b.

- Jokić S, Bijuk M, Aladić K, Bilić M, Molnar M: Optimization of supercritical CO₂ extraction of grape seed oil using response surface methodology. *International journal of food science & technology*, 51(2):403-410, 2016.
- Jokić S, Gagić T, Knez Ž, Šubarić D, Škerget M: Separation of Active Compounds from Food by-Product (Cocoa Shell) Using Subcritical Water Extraction. *Molecules*, 23:1-17, 2018a.
- Jokić S, Nagy B, Velić D, Bucić-Kojić A, Bilić M: Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkričnim CO₂ – pregledni rad. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3:39-542, 2011.
- Jokić S, Pavlović N, Jozinović A, Ačkar Đ, Babić J, Šubarić D: High-Voltage Electric Discharge Extraction of Bioactive Compounds from the Cocoa Bean Shell. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33(2):271-280, 2019.
- Ju T, Xi J, Deng Y: Optimization of Circulating Extraction of Polysaccharides from *Gracilaria Lemaneiformis* Using Pulsed Electrical Discharge. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7: 69-81, 2018.
- Jurić S, Nutrizio M: Potencijal sekundarnih biljnih sirovina kao izvora funkcionalnih sastojaka prehrambenih proizvoda. Znanstveni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 1-126, 2014.
- Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, Goula AM: Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137:1-11, 2019.
- Kim H, Keeney PG: (-) – Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science*, 49:1090-1092, 1984.
- Knapp AW, Churchman A: Cacao shell and its use as an accessory fodder. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56:29–33, 1937.
- Knapp AW, Coward KH: The vitamin D activity of cacao shell: The effect of the fermenting and drying of cacao on the vitamin D potency of cacao shell. II. The origin of vitamin D in cacao shell. *Biochemical Journal*, 29(12):2728-2735, 1935.
- Kobori K, Maruta Y, Mineo S, Shigematsu T, Hirayama M: Polyphenol-retaining decaffeinated cocoa powder obtained by supercritical carbon dioxide extraction and its antioxidant activity. *Foods*, 2(4):462-477, 2013.
- Koffi E, Sea T, Dodehe Y, Soro S: Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 5(3):550–558, 2010.
- Kowalski S, Lukasiewicz M, Dudnaika-Chodak A, Zięć G: 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(4):207-225, 2013.

- Lecumberri E, Mateos R, Izquierdo-Pulido M, Rupérez P, Goya L, Bravo L: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104:948-954, 2007.
- Lessa OA, dos Santos Reis N, Gomes Ferreira Leite S, Limoeiro Estrada Gutarra M, Oliveira Souza A, Andrade Gualberto S, Rangel de Oliveira J, Aguiar-Oliveira E, Franco M: Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science and Biotechnology*, 27(1):107-113, 2017.
- Li S, Hartland S: Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 5:7–12, 1992.
- Li Z, Fan Y, Xi J: Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chemistry*, 277:246-260, 2019.
- López-Bascón MA, Luque de Castro: Soxhlet Extraction. U: *Liquid-Phase Extraction*, Handbooks in Separation Science, Editor: Poole CF, United Kingdom. 2019.
- Luxminarayan L, Neha S, Amit V, Khinchi MP: A review on chromatography techniques. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 5(2):1-08, 2017.
- Maalik A, Bukharl SM, Zaidi A, Shah KH, Khan FA: Chlorogenic acid: A pharmacologically potent molecule. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 73(4):851–854, 2016.
- Manzano P, Hernández J, Quijano-Avilés M, Barragán A, Chóez-Guaranda I, Viteri R, Valle O: Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1):45-60, 2017.
- Martín-Cabrejas MA, Valiente C, Esteban RM, Mollá E, Waldron K: Cocoa hull: A potential source of dietary fibre. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 66(3):307-311, 1994.
- Martínez JL: Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. CRC Press Taylor i Francis Group, Boca Raton, 2008.
- Martínez R, Torres P, Meneses MA, Figueroa JG, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M: Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49:39-45, 2012.
- Mazzutti S, Rodrigues LGG, Mezzomo N, Venturi V, Ferreira SRS: Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. *Journal of Supercritical Fluids*, 135: 52–59, 2018.
- McDonnell C, Tiwari BK: Ultrasound: A clean, green extraction technology for bioactives and contaminants. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 76:1-15, 2017.
- Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N: Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47:1-19, 2017.

- Meunier N, Blais JF, Tyagi RD: Removal of heavy metals from acid soil leachate using cocoa shells in a batch counter – current sorption process. *Hydrometallurgy*, 73:225-235, 2004.
- Mihaylova D, Lante A: Water an Eco-Friendly Crossroad in Green Extraction: An Overview. *The Open Biotechnology Journal*, 13:155-162, 2019.
- Ministarstvo gospodarstva RH: Industrijska strategija Republike Hrvatske 2014. – 2020. 2014. [dostupno na: <http://europski-fondovi.eu/sites/default/files/dokumenti/Industrijska%20strategija%20RH%202014.-2020..pdf>]
- Ministarstvo gospodarstva RH: Strategija pametne specijalizacije Republike Hrvatske za razdoblje od 2016. do 2020. godine i akcijski plan za provedbu strategije pametne specijalizacije Republike Hrvatske za razdoblje od 2016. do 2017. godine. [dostupno na: http://www.obzor2020.hr/userfiles/obzor2020/pdfs/Strategija_pametne_specijalizacije_RH_2016_2020.pdf]
- Ministarstvo gospodarstva RH: Strategija poticanja inovacija Republike Hrvatske 2014.-2020. 2015. [dostupno na: <http://europski-fondovi.eu/sites/default/files/dokumenti/Strategija%20poticanja%20inovacija%202014-2020.pdf>]
- Ministarstvo regionalnog razvoja i fondova Europske unije RH: Strategija regionalnoga razvoja Republike Hrvatske za razdoblje do kraja 2020. godine. 2017. [dostupno na: <https://razvoj.gov.hr/o-ministarstvu/djelokrug-1939/regionalni-razvoj/razvojne-strategije/strategija-regionalnoga-razvoja-republike-hrvatske-za-razdoblje-do-kraja-2020-godine/3244>]
- Mohamed RS, Aranda Saldaña MD, Mazzafera P, Zetzi C, Brunner G: Extraction of Caffeine, Theobromine, and Cocoa Butter from Brazilian Cocoa Beans Using Supercritical CO₂ and Ethane. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(26):6751-6758, 2002.
- Molnar M, Jakovljević M, Jokić S: Optimization of the process conditions for the extraction of Rutin from *Ruta graveolens* L. by choline chloride based deep eutectic solvents. *Solvent extraction research and development Japan*, 25(2):109-116, 2018.
- Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PE, Silva BM: Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules*, 21:974, 2016.
- Moubarik A, El-Belghiti, Vorobiev E: Kinetic model of solute aqueous extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*) treated by pulsed electric field, electrical discharges and ultrasonic irradiation. *Food and Bioprocess Processing*, 89(4):356-361, 2010.
- Mukhopadhyay M: Natural extracts using supercritical carbon dioxide, CRC Press, Boca Raton, 2001.
- Mustafa A, Turner C: Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703:8-18, 2011.

- Myers RH, Montgomery DC: Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Wiley, New York 1995.
- Nazaruddin R, Seng LK, Hassan O, Said M: Effect of pulp pre-conditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1):87–94, 2006.
- Nguyen VT, Nguyen NH: Proximate composition, extraction, and purification of theobromine from cacao pod husk (*Theobroma Cacao* L.). *Technologies*, 5:14, 2017.
- Nikolovski B: Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis* L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim ugljendioksidom. Doktorski rad, Novi Sad, 2009.
- Nsor-Atindana J, Zhong F, Mothibe KJ: Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells, *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7):672-677, 2012.
- Oduro-Mensah D, Ocioo A, Lowor ST, Mingle C, Okine LKN, Adamafio NA: Bio-dettheobromination of cocoa pod husks: reduction of ochratoxin A content without change in nutrient profile. *Microbial Cell Factories*, 17(1): 79, 2018.
- Okiyama DCG Navarro SLB, Rodrigues CEC: Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 63:103-112, 2017.
- Okiyama DCG, Soares ID, Cuevas MS, Crevelin E, Moraes LAB, Melo MP, Oliveira AL, Rodrigues CEC: Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Research International*, 114:20-29, 2018.
- Oliveira NS, Carlos AL da S, Mattedi S, Soares CMF, Souza RL, Fricks AT, Lima AS: Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of alkaloids from cacao (*Theobroma cacao*). *Chemical engineering Transactions*, 64:49-54, 2018.
- Oliviero T, Capuano E, Cämmerer B, Fogliano V: Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(1):147-152, 2009.
- Oracz J, Nebesny E, Żyżelewicz D: Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by roasting conditions. *European Food Research and Technology*, 241:663-681, 2015.
- Paiva P, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC: Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2(5): 1063–1071, 2014.
- Papoutsis K, Pristijono P, Golding JB, Stathopoulos CE, Bowyer MC, Scarlett CJ, Vuong QV: Optimizing a sustainable ultrasound-assisted extraction method for the recovery of polyphenols from lemon by-products: comparison with hot water and organic solvent extractions. *European Food Research and Technology*, 244(8):1353-1365, 2018.

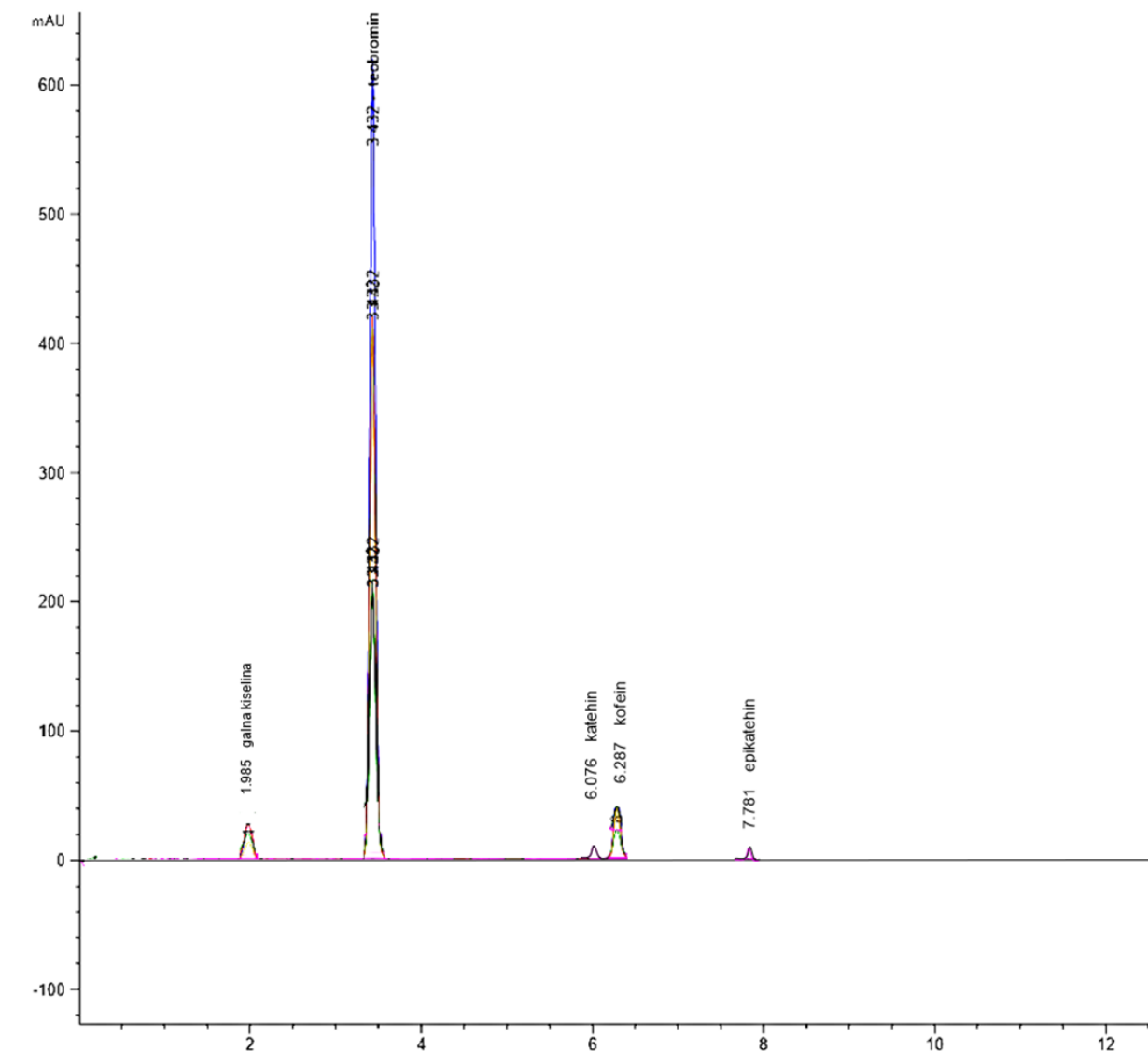
- Park T-J, Lee SH: Deep eutectic solvent systems for FeCl₃- catalyzed oxidative polymerization of 3-octylthiophene. *Green Chemistry*, 19:910-913, 2017.
- Patist A, Bates D: Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:147-154, 2008.
- Pavić-Rogošić L, Jelić Mück V, Jagnjić M: Novi izazov, Globalni ciljevi održivog razvoja do 2030. Zagreb, 2015. [dostupno na: http://www.odraz.hr/media/291518/globalni%20ciljevi%20odrzivog%20razvoja%20do%202030_web.pdf]
- Pavlič B: Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom sadu Tehnološki fakultet. 2017.
- Pavlović N, Jakovljević M, Miškulin M, Molnar M, Ačkar Đ, Jokić S: Green extraction techniques of bioactive components from cocoa shell. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(1): 11-20, 2019.
- Peng X, Duan M-H, Yao X-H, Zhang Y-H, Zhao C-J, Zu Y-G, Fu Y-J: Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Separation and Purification Technology*, 157:249-257, 2016.
- Pereira RG, Veloso CM, da Silva NM, de Sousa LF, Bonomo RCF, de Souza AO, da Guarda Souza MO, da Costa IFR: Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H₃PO₄ and ZnCl₂ as activating agents for BSA and α-lactalbumin adsorption. *Fuel Processing Technology*, 126:476-486, 2014.
- Plaza M, Turner C: Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry*, 71:39-54, 2015.
- Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS: Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163:2–24, 2007.
- Prabhakaran Nair KP: Cocoa (*Theobroma cacao* L.). U: *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World*. Elsevier, 5:131 – 180, 2010.
- Preedy VR: Caffeine: Chemistry, Analysis, Function and Effects. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012.
- Psillakis E, Kalogerakis N: Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *Journal of Chromatography*, A907 (1–2): 211–219, 2001.
- Quitain AT, Heng CY, Yusup S, Sasaki M, Uemura Y: Conversion of Biomass to bio-oil in Sub- and Supercritical water. U: *Biofuels – Status and Perspective*, Editor: Biernat K, InTech, Hrvatska, 2015. doi:10.5772/59947.
- Rajha H N, Boussetta N, Louka N, Maroun R G, Vorobiev E: Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenolextraction from vine shoots. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31:60–66, 2015.

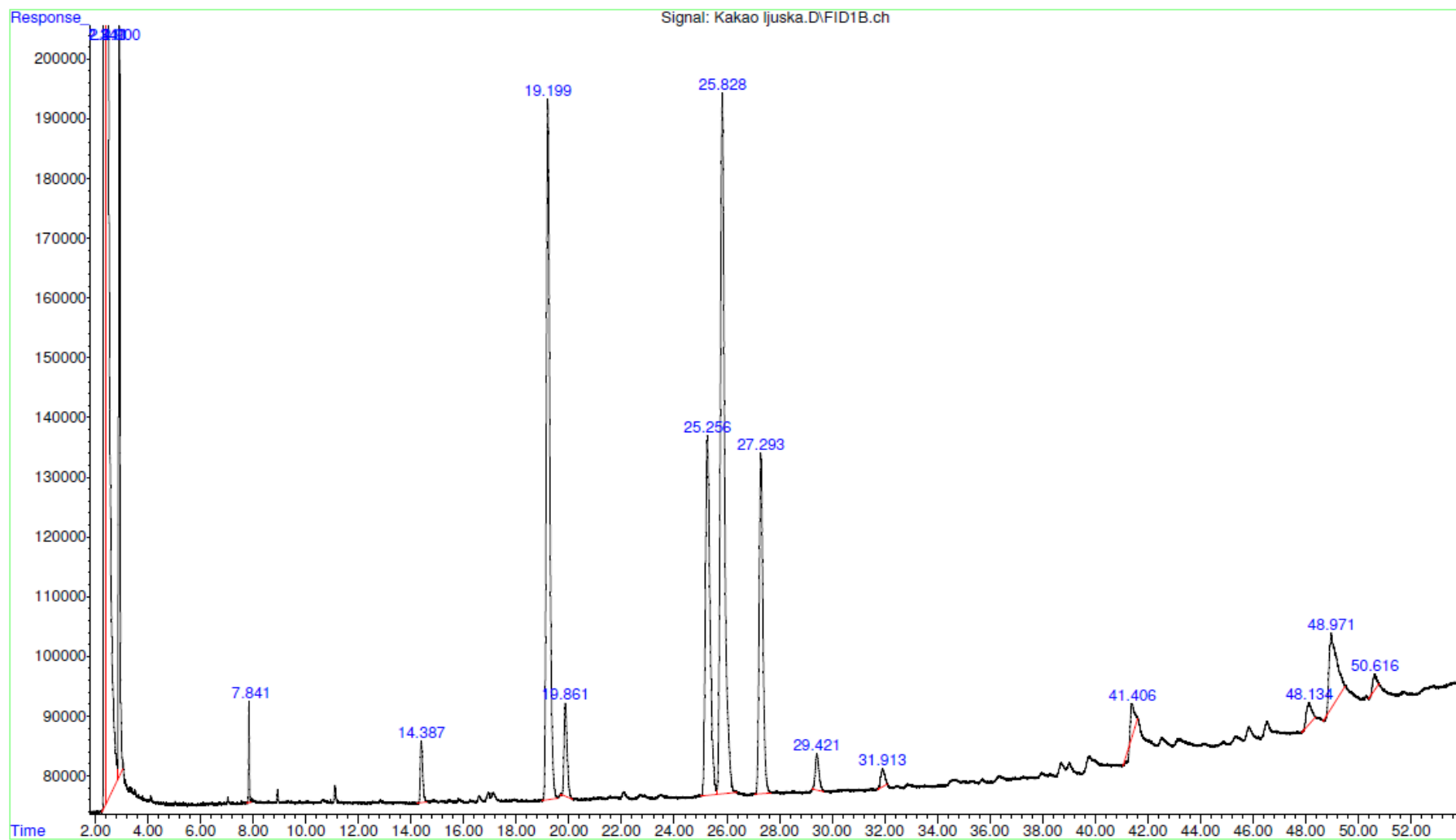
- Ramos L, Kristenson EM, Brinkman UT: Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975:3-29, 2002.
- Ravber M, Knez Ž, Škerget M: Simultaneous extraction of oil- and watersoluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food Chemistry*, 166:316–323, 2015.
- Redgwell R, Trovato V, Merinat S, Curti D, Hediger S, Manez A: Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81:103-112, 2003.
- Reverchon E, De Marco I: Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2):146–166, 2006.
- Roiaini M, Seyed HM, Jinap S, Norhayati H: Effect of extraction methods on yield, oxidative value, phytosterols and antioxidant content of cocoa butter. *International Food Research Journal*, 23(1):47-54, 2016.
- Rovio S, Hartonen K, Holm Y, Hiltunen R, Riekkola ML: Extraction of clove using pressurized hot water. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(6):399-404, 1999.
- Ruesgas-Ramón M, Figueroa-Espinoza MC, Durand E: Application of deep eutectic solvents (des) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(18):3591-3601, 2017.
- Rustan AC, Drevon CA: Fatty acids: Structures and properties. U: *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons, Chichester, UK. 1-7, 2005. doi: 10.1038/npg.els.0003894
- Salajegheh D, Vaziri A, Bastani D: Supercritical Extraction of Cocoa Butter from Cocoa Seed, Using Pure Carbon Dioxide, Carbon Dioxide with Ethanol as Co-Solvent and Ethane. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(8):1010-1015, 2013.
- Saldaña MDA, Zetzi C, Mohamed RS, Brunner G: Extraction of Methylxanthines from Guaraná Seeds, Maté Leaves, and Cocoa Beans Using Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50(17):4820-4826, 2002.
- Santos LFS, Stolfo A, Salvador CCM: Catechin and epicatechin reduce mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by amiodarone in human lung fibroblasts. *Journal of Arrhythmia*, 33:220–225, 2017.
- Scapagnini G, Davinelli S, Di Renzo L, De Lorenzo A, Hugo Olarte H, Micali G, Cicero AF, Gonzalez S: Cocoa Bioactive Compounds: Significance and Potential for the Maintenance of Skin Health. *Nutrients*, 6(8):3202-3213, 2014.
- Selvamuthukumar M, Shi J: Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1):61-81, 2017.
- Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH: 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: Effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1):35, 2018.
- Skala D, Žižović I, Gavrančić S: Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hemijska industrija* 56, 179-190, 2002.

- Skoog DA, West DM, Hooler FJ: Fundamentals of analytical chemistry, 6. izd. Zagreb, Školska knjiga, 1999.
- Smit HJ: Theobromine and the Pharmacology of Cocoa U: Methylxantines, Handbook of Experimental Pharmacology 200, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
- Sökmen, M.; Demir, E.; Yousuf, S. Optimization of sequential supercritical fluid extraction (SFE) of caffeine and catechins from green tea. *Journal of Supercritical Fluids*, 133(1):171-176, 2018.
- Sotelo A, Alvarez RG: Chemical composition of wild Theobroma species and their comparison to the cacao bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(11):1940–1943, 1991.
- Sunil Paul MM, Aravind UK, Pramod G, Saha A, Aravindakumar CT: Hydroxyl radical induced oxidation of theophylline in water: A kinetic and mechanistic study. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 12(30):5611–5620, 2014.
- Taha AY: Linoleic acid – good or bad for the brain?. *npj Science of Food*, 4(1):2746
- Tan T-J, Jinap S, Kusnadi AE, Hamid NSA: Extraction of cocoa butter by supercritical carbon dioxide: Optimization of operating conditions and effect of particle size. *Journal of Food Lipids*, 15(2):263-276, 2008.
- Timbie DJ, Sechrist L, Keeney PG: Application of high-pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *Journal of Food Science*, 43(2):560–562, 1978.
- Touya G, Reess T, Pécastaing L, Gibert A, Domens P: Development of subsonic electrical discharges in water and measurements of the associated pressure waves. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39(24):5236-5244. 2006.
- Valadez-Carmona L, Plazola-Jacinto CP, Hernández-Ortega M, Hernández-Navarro MD, Villarreal F, Necochea-Mondragón H, Ortiz-Moreno A, Ceballos-Reyes G: Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative food science & emerging technologies*, 41:378-386, 2017.
- Vidović, S: Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, 2011.
- Viganó J, da Fonesca Machado AP, Martínez J: Sub- and supercritical fluid technology applied to food waste processing. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96:272-286, 2014.
- Vuong QV, Stathopoulos CE, Nguyen MH, Golding JB, Roach PD: Isolation of green tea catechins and their utilisation in the food industry. *Food Reviews International*, 27:3, 227-247, 2011.
- Wang L, Weller CL: Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17:300–312, 2006.
- Whelan J, Fritsche K: Linoleic Acid. *Advances in Nutrition*, 4(3):311-312, 2013.

-
- Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH: Characterisation and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80:26-32, 2015.
- Wood GAR, Lass RA: From Harvest to Store, U: *Cocoa*. 4.izd., Editor: Longman Inc., New York. str. 444-504, 1985.
- Xi J, He L, Yan L: Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chemistry*, 230:354-361, 2017.
- Yolmeh M, Jafari SM: Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food and Bioprocess Technology*, 10:3, 413-433, 2017.
- Yusof AH, Gani SS, Zaidan UH, Halmi MIE, Zainudin BH: Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Condition for Flavonoid Compounds from Cocoa Shells (*Theobroma cacao*) Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 24:711, 2019.
- Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F: Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21):7108-7146, 2012.
- Zhao B-Y, Xu P, Yang F-X, Wu H, Zong M-H, Lou W-Y: Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(11):2746-2755, 2015.
- Zhu W, Chen L, Wang B, Wang Z: Online Detection in the Separation Process of Tobacco Leaf Stems as Biomass Byproducts Based on Low Energy X-Ray Imaging. *China Agriculture Almanac*, 17: 96-99, 2018.

8. PRILOZI

Prilog 1 Primjer kromatograma dobivenih bioaktivnih komponentata u ekstraktu kakaove ljuske (HVED ekstrakcija)

Prilog 2 Primjer kromatograma sastava masnih kiselina u ekstraktu kakaove ljuske dobivenog SC-CO₂

Prilog 3 Znanstveni radovi objavljeni iz teme doktorske disertacije

Croat. J. Food Sci. Technol. (2019) 11 (1)
"ARTICLES IN PRESS"

Croatian Journal of Food Science and Technology

journal homepage: www.ptfos.unios.hr/cjfst/

Original scientific paper

DOI: 10.17508/CJFST.2018.11.1.02

Green extraction techniques of bioactive components from cocoa shell

NIKA PAVLOVIĆ¹, MARTINA JAKOVLJEVIĆ², MAJA MIŠKULIN¹, MAJA MOLNAR², ĐURĐICA AČKAR², STELA JOKIĆ²

¹Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia

²Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

ARTICLE INFO

Article history:

Received: July 21, 2018

Accepted: December 4, 2019

Keywords:

cocoa shell,
green extractions,
bioactive components

ABSTRACT

The aim of this study was to demonstrate that certain types of extraction techniques can give extracts with various bioactive components in different concentrations. Four green extraction techniques were used in this study: supercritical CO₂ extraction, ultrasound-assisted extraction, cold atmospheric plasma extraction and extraction using deep eutectic solvents. Those modern techniques gave better yields of bioactive components and showed better antioxidant activity of obtained extracts than classical Soxhlet extraction. The bioactive components in obtained extracts were quantified by High Performance Liquid Chromatography. Supercritical CO₂ extraction gave the highest yields for theobromine content, while ultrasound-assisted extraction with 50% aqueous ethanol solution gave the highest caffeine yields during 30 min of extraction, 35 Hz and 60 °C. The extraction with deep eutectic solvent mixture of choline chloride: oxalic acid and 50% pure H₂O at room temperature during 180 min of extraction time gave the highest total phenol content while the same mixture under the same conditions, but during longer extraction time (360 min), gave the highest antioxidant activity.

Cocoa shell (CS), due to its nutritional value and bioactive components, has a potential to become a desirable raw material in a large spectrum of functional and pharmaceutical products.

Introduction

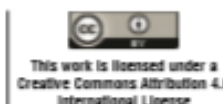
Food industry waste is a growing problem, both economically and ecologically. By-products in the food industry may contain valuable bioactive components and their utilization as raw material in some other production could result in less waste. That is the reason for today's growing interest in utilizing food industry by-products for different purposes (Jokić et al., 2017). Given the serious environmental side effects over the years due to the use of classical techniques, technologists have begun to design less harmful technologies.

The development of green technologies contributed to cheap, fast procedures that are safe for the environment (Armenta, Garrigues and de la Guardia, 2015). In comparison to classical extraction such as a

conventional method using organic solvents, green extraction technologies are more frequently used in food production and processing. One of these innovative technologies is definitely supercritical fluid extraction (SFE). The discovery of supercritical solvents has made a breakthrough and they gradually begin to replace toxic and ecologically unacceptable organic solvents (Jokić et al., 2011). It is a substance with both liquid and gas properties that occur above critical temperature and pressure of the component (Hitchen and Dean, 1993). Some advantages of supercritical solvent are better diffusion, lower viscosity and less surface tension with better penetration into material which contains the desired valuable components. This process provides better selectivity and the ability to control the solubility of supercritical fluid itself by changing the pressure and temperature, and thus easily removing the solvent from the extract. SFE belongs to "clean technology"

^{*}Corresponding author E-mail: nika.felicita@gmail.com

High-Voltage Electric Discharge Extraction of Bioactive Compounds from the Cocoa Bean Shell⁺



S. Jokić,^{a,*} N. Pavlović,^b A. Jozinović,^a
Đ. Ačkar,^a J. Babić,^a and D. Šubarić^a

^aJosip Juraj Strossmayer University of Osijek,
Faculty of Food Technology Osijek,
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

^bJosip Juraj Strossmayer University of Osijek,
Faculty of Medicine Osijek,
Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia

<https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1525>

Original scientific paper
Received: October 22, 2018
Accepted: June 10, 2019

This study is focused on the application of high-voltage electric discharge (HVED) to recover some bioactive compounds from the cocoa bean shell. Different extraction times (30, 60, 90 min), frequencies (40, 70, 100 Hz) and solvent-solid ratios (10, 30 and 50 mL g⁻¹) were used to obtain cocoa bean shell extracts. Desired bioactive compounds, methylxanthines and phenolic compounds were measured in obtained extracts by high-pressure liquid chromatography with diode array detector. The obtained extracts showed that theobromine was the most abundant, ranging from 2530.13 to 6031.51 mg kg⁻¹, while caffeine content was in the range from 316.08 to 849.88 mg kg⁻¹. In addition, significant amounts of phenolic compounds were found, namely catechin (115.91 to 284.33 mg kg⁻¹), epicatechin (20.20 to 358.90 mg kg⁻¹), and gallic acid (80.28 to 219.17 mg kg⁻¹). Results showed that different parameters of HVED extraction have statistically significant influence on cocoa bean shell composition, suggesting how this by-product can be used in the production of valuable extracts.

Keywords:

cocoa bean shell, by-product, high-voltage electric discharge, bioactive compounds

Introduction

Over the last decades, positive changes in analytical chemistry have been made, cutting down the use of toxic chemicals and reducing their influence on the environment due to Green Analytical Chemistry trends. Accordingly, the development of innovative sustainable green extraction techniques have become more interesting due to the cleaner, greener, and safer nature of these processes and easier usage¹. Thus, modern extraction techniques have been introduced and are being applied more and more for extraction of various materials and compounds. Some of these techniques are: supercritical fluid extraction (SFE), subcritical water extraction (SWE), superheated water extraction or pressurized hot water extraction (PHWE), microwave-assisted extraction (MAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), accelerated solvent extraction (ASE)².

One of these eco-friendly techniques, which gain more and more attention in the last years, is



also high-voltage electrical discharges (HVED), a non-thermal technology suitable for processes where high temperatures are undesirable. This technique enhances the yield of bioactive compounds from raw material at low treatment energy input³. Detailed description of the HVED process is given in the review published by Boussetta and Vorobiev⁴ where authors pointed out that HVED can be applied in numerous applications, particularly in the extraction of various bioactive compounds. Li *et al.*⁵ in their recently published review, pointed out that critical process factors for HVED-assisted extraction are electric field intensity, flow rate, solvent-solid ratio, treatment time, and solvent selection. The authors concluded how the further development of HVED-assisted extraction will definitely be a benefit in the future. Sarkis *et al.*⁶ investigated two different electrical technologies, pulsed electric fields (PEF) and HVED as pre-treatments to sesame seed oil extraction. The authors compared both procedures to a control sample, and concluded that treated samples had higher oil yield in comparison to controlled samples. Boussetta *et al.*⁷ explored the effect of HVED on the aqueous extraction of polyphenols from grape pomace, and obtained bet-

*Corresponding author. Tel.: +385 98 1666629, Fax: +385 31 207115, E-mail address: stela.jokic@ptfos.hr

⁺Paper was presented at the 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2018, 25–29 August 2018, Prague

Review

Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application

Jelena Panak Balentić¹, Durdica Ačkar^{1,*} , Stela Jokić¹ , Antun Jozinović¹, Jurislav Babić¹, Borislav Miličević¹, Drago Šubarić¹ and Nika Pavlović²

¹ Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kuhačeva 20, 31000 Osijek, Croatia; jelena.panak@ptfos.hr (J.P.B.); stela.jokic@ptfos.hr (S.J.); antun.jozinovic@ptfos.hr (A.J.); jbabic@ptfos.hr (J.B.); borislav.milicevic@ptfos.hr (B.M.); dsubaric@ptfos.hr (D.Š.)

² Faculty of Medicine, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Cara Hadrijana 10E, 31000 Osijek, Croatia; nika.felicita@gmail.com

* Correspondence: dackar@ptfos.hr; Tel.: +385-31-224-391

Received: 28 May 2018; Accepted: 7 June 2018; Published: 9 June 2018



Abstract: Solving the problem of large quantities of organic waste, which represents an enormous ecological and financial burden for all aspects of the process industry, is a necessity. Therefore, there is an emerged need to find specific solutions to utilize raw materials as efficiently as possible in the production process. The cocoa shell is a valuable by-product obtained from the chocolate industry. It is rich in protein, dietary fiber, and ash, as well as in some other valuable bioactive compounds, such as methylxanthines and phenolics. This paper gives an overview of published results related to the cocoa shell, mostly on important bioactive compounds and possible applications of the cocoa shell in different areas. The cocoa shell, due to its nutritional value and high-value bioactive compounds, could become a desirable raw material in a large spectrum of functional, pharmaceutical, or cosmetic products, as well as in the production of energy or biofuels in the near future.

Keywords: cocoa shell; cocoa by-product; bioactive compounds; reuse

1. Introduction

Food industry waste often consists of inedible parts, so-called by-products. Today, there are huge quantities of by-products that are discarded, causing enormous economic problems by polluting the environment. Considering the growing world population and disappearing raw materials, and a real threat of reduced food sources, it is not surprising that awareness about the needs of preservation and re-usage of materials that are treated as a waste is rising [1]. Cocoa shells are just one of the examples of by-products with high-value bioactive components and interesting nutritional value that have been discarded, although they could be re-used in many ways.

The main raw material for the production of all kinds of cocoa products is dried and fermented cocoa beans, and cocoa shells are one of the by-products of cocoa beans obtained in the chocolate industry. Approximately twenty types of cocoa (*Theobroma cacao*) are known, and the three most popular types (*Criollo*, *Forastero*, and *Trinitario*) make up 95% of the world's total cocoa production. World production of cocoa beans reached almost 3.7 million tons in 2007/2008 [2]. When cocoa is processed, there are three types of co-products: cocoa pod husk, cocoa bean shells (Figure 1), and cocoa mucilage.

These by-products are usually considered as “waste” and left to rot on the cocoa plantation, which can cause environmental problems, such as producing foul odors or propagate diseases (e.g., pod rot, because they are not composted) [3–5].

COCOA BEAN SHELL – A PROMISING BY-PRODUCT RICH IN BIOACTIVE COMPOUNDS

Nika Pavlović^{1*}, Maja Miškulin¹, Krunoslav Aladić², Stela Jokić³

¹Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia

²Croatian Veterinary Institute, Branch - Veterinary Institute Vinkovci, Josipa Kozarca 24, 32100 Vinkovci, Croatia

³Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

review

Summary

Nowadays, when we are increasingly becoming a generation of large quantities of waste materials from various industries, there is an emerged need for certain solutions to suppress waste or make it more economical in some other way. Some by-products from the different food industries are rich in various bioactive compounds which could be utilized in other production processes. Finding the purpose and use of these compounds could be valuable for future generations. One of those by-products is cocoa bean shell (CBS), by-product in the processing of cocoa and its products, that has already proven to contain large amount of different bioactive compounds like theobromine, caffeine, specific phenolic compounds as well as dietary fibres and other valuable compounds which will be reviewed in this paper. CBS could be used in the production of functional products or even in food industry, cosmetic or pharmaceuticals due to its high nutritional value what also makes it an economically acceptable raw material.

Keywords: by-product, cocoa bean shell, bioactive compounds, utilization

Introduction

During the production of different products in the food industry, large quantities of waste are also produced (Nguyen, 2014) that pollute the environment and cause major economic problems around the world. Consequently, people begin to think and explore in the direction of utilization and application of by-products from the food industry (Manzano et al., 2017; Okiyama et al., 2017; Pavlović et al., 2019; Viganó et al., 2015).

The fact of growing world population and disappearing raw materials, with a real threat of reduced food sources, does not surprise that the awareness is raising about the needs of storage and re-usage of materials that once were just a waste (Panak Balentić, 2018). Different types of waste are thrown away near the factories polluting the soil, nearby lakes and rivers, creating the major ecological problem while actually, those waste has the potential to be reused (Hamzat and Adeola, 2011).

By-products of the cocoa industry

Cocoa beans, as fermented and dried seeds of the *Theobroma cacao* plant are used as a main ingredient in the production of chocolate and its products. In Ghana, this raw material is called "golden pod" and has a "premium status" on the market because the cultivation of this plant is a tradition of private farms across the country, with the unique culture in the

production of high quality dried cocoa beans. The main process in the cocoa industry includes a wide range of intermediate products that include cocoa liquor, cocoa butter, cocoa cake and raw cocoa powder. Cocoa pulp juice is a by-product used in the production of industrial alcohol and alcoholic beverages while the pod husks and shells are used as animal feed or fertilizer. After harvest, crucial chocolate precursors are formed in the fermentation process due to diverse biochemical transformation inside the cocoa beans. The fermentation step depends mostly on type of the seed, climate, season, diseases, turning, quantity of beans and pre-conditioning of the pulp (Afoakwa et al., 2013). It is known how during the process of fermentation significant amounts of certain phenolic compounds migrate from cocoa bean to the shell making this by-product rich in these compounds. So enriched cocoa bean shell (CBS) could be a potential source of bioactive compounds in different industries like food, cosmetic or pharmaceuticals (Hernández-Hernández et al., 2018). Research on waste disposal in the way of finding new solutions for the use of different by-products would certainly reduce waste accumulation in a world that has become serious ecological and economical problem today.

CBS is a part of cocoa bean, which is separated from the cotyledon together with the nib before or after roasting (Arlorio et al., 2005). Since CBS is a waste in cocoa processing with certain bioactive compounds (Awarikabey et al., 2014), it is necessary

*Corresponding author: nika.felicita@gmail.com



Article

Green Extraction Methods for Active Compounds from Food Waste—Cocoa Bean Shell

Nika Pavlović ¹ , Stela Jokić ² , Martina Jakovljević ², Marijana Blažić ³ and Maja Molnar ^{2,*}

¹ Faculty of Medicine Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia; nika.felicita@gmail.com

² Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia; stela.jokic@ptfos.hr (S.J.); martina.jakovljevic@ptfos.hr (M.J.)

³ Karlovac University of Applied Sciences, Trg J. J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Croatia; marijana.blazic@vuka.hr

* Correspondence: maja.molnar@ptfos.hr; Tel.: +385-98-918-2391; +385-31-224-342

Received: 16 January 2020; Accepted: 28 January 2020; Published: 30 January 2020



Abstract: This is the first report on the extraction of cocoa bean shell (CBS) using deep eutectic solvents (DESs). Screening results with 16 different choline chloride-based DESs showed how choline chloride:oxalic acid DES was the most suitable solvent for the extraction of the bioactive compounds from CBS and that concentrations varied greatly depending on the used solvent. The DES extraction was compared to the DESs coupled with microwave extraction (MAE), and the yields of the extracted compounds were higher for DES/MAE. For theobromine, the obtained yields for DES extraction were 2.145–4.682 mg/g, and for caffeine, were 0.681–1.524 mg/g, whereas for DES/MAE, the same compounds were obtained in 2.502–5.004 mg/g and 0.778–1.599 mg/g. Antioxidant activity was also determined, using DPPH method, obtaining 24.027–74.805% activity for DES extraction and 11.751–55.444% for DES/MAE. Water content significantly influenced the extraction of targeted active compounds from CBS, whereas extraction time and temperature did not show statistically significant influence. The extraction temperature only influenced antioxidant activity. The study demonstrated how extraction using DES and microwaves could be of a great importance in the future trends of green chemistry for the production of CBS extracts rich in bioactive compounds.

Keywords: cocoa bean shell; waste; deep eutectic solvents; microwave-assisted extraction; active compounds

1. Introduction

To minimize food waste during processing of raw materials, a new age tendency is to transform it into valuable products with certain nutritional value. Cocoa bean shell (CBS) is just one of these food industry by-products, which contains a number of bioactive compounds that can be extracted and used for different purposes. In the production of chocolate and its products, the CBS is removed from the cocoa bean cotyledons, during the pre-roasting or after the roasting process. In the fermentation, roasting, and alkalization process, some bioactive compounds, like theobromine and phenols, can migrate from cocoa bean to CBS [1,2]. Thus, enriched CBS could potentially be an interesting ingredient in other production processes [1].

The chemical composition of CBS mostly depends on the origin of *Theobroma cacao* L. and its processing. Okyama et al. [2] in their review study mentioned Africa, America, Asia, and Oceania as the major parts in the world for the production of cocoa beans.

The basic composition, however, includes dietary fibers; carbohydrates; methylxantines, like theobromine (3,7-dimethylxantine), caffeine (1,3,7-trimethylxantine), and theophylline