Profil bioaktivnih tvari kakaove ljuske i utjecaj obrade hladnom plazmom na njihov sastav i udio

Križić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:109:883448

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Križić

PROFIL BIOAKTIVNIH TVARI KAKAOVE LJUSKE I UTJECAJ OBRADE HLADNOM PLAZMOM NA NJIHOV SASTAV I UDIO

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za kakvoću hrane
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode I
Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 12. srpnja 2018.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*

Profil bioaktivnih tvari kakaove ljuske i utjecaj obrade hladnom plazmom na njihov sastav i udio

Ivana Križić, 405-DI

Sažetak:
Kakaova ljuska je jedan od nusproizvoda koji nastaje tijekom proizvodnje čokolade i dugo se smatrala otpadom. Međutim, novija istraživanja pokazuju da je kakaova ljuska bogata fenolnim tvarima, metilksantinima, prehrambenim vlaknima i vitaminom D te se danas koristi kao izvor bioaktivnih komponenti u proizvodnji funkcionalnih proizvoda koji su sve zastupljeniji na tržištu. Prema tome je određen sastav i udio 6 fenolnih komponenti (galne kiseline, kava kiseline, *p*-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata) i 2 metilksantina (teobromina i kofeina) HPLC metodom s detektorom s nizom dioda te udio ukupnih fenolnih tvari spektrofotometrijskom metodom. Najzastupljenije komponete u netretiranom uzorku kakaove ljuske su teobromin, kofein i (+)-katehin, a slijede ih galna kiselina i (-)-epikatehin. Promatrane su i promjene sastava bioaktivnih komponenti s obzirom na tretman hladnom plazmom. Pritom je ustanovljeno da dolazi do snižavanja koncentracije svih ispitivanih bioaktivnih komponenti. Isto tako je primijećeno da tretman koji uključuje samo miješanje u vodi ima veći utjecaj na gubitak komponenti od tretmana hladnom plazmom.

Ključne riječi: kakaova ljuska, fenolne komponente, metilksantini, hladna plazma

Rad sadrži: 55 stranica
17 slika
12 tablica
0 priloga
55 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. *Đurđica Ačkar*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Antun Jozinović*	član
4.	prof. dr. sc. *Mirela Kopjar*	zamjena člana

Datum obrane: 12. prosinca 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdrpartment of Food Quality
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Science and Nutrition

Scientific area: Biotechnical science
Scientific field: Food technology
Course title: Instrumental methods of analysis I
Thesis subjecta Was approved by Faculty of Food Technology Council at its session no X. held on July 12, 2018.
Mentor: Ivana Flanjak, PhD, associate prof.

Cocoa Shell Bioactive Component Profile and the Impact of Cold Plasma Treatment on their Composition and Content

Ivana Križić, 405-DI

Summary:
Cocoa shell is one of the by-products obtained in chocolate industry which was considered as waste for a very long time. However, recent studies showed that cocoa shell is rich in phenolic compounds, methylxanthines, dietary fiber and vitamin D, so it is used as a source of high-valuable bioactive components in a production of functional food whose market is constantly growing. According to that, qualitative and quantitative determination of 6 phenolic components (gallic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin gallate) and 2 methylxanthines (theobromine and caffeine) was performed by HPLC method with absorbance detection, while total phenolic content was determined by spectrophotometric method. The most abundant bioactive components of untreated cocoa shell are theobromine, caffeine and (+)-catechin, followed by gallic acid and (-)-epicatechin. Furthermore, the effect of cold plasma treatment on their composition and content was evaluated and results showed decrease of all evaluated bioactive components. Also, water extraction had greater impact on degradation of bioactive components compared to cold plasma treatment.

Key words: cocoa shell, phenolic components, methylxantines, cold plasma treatment

Thesis contains: 55 pages
17 figures
12 tables
0 supplements
55 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Đurđica Ačkar, PhD, associate prof. — chair person
2. Ivana Flanjak, PhD, associate prof. — supervision
3. Antun Jozinović, PhD, assistant prof. — member
4. Mirela Kopjar, PhD, prof. — stand in

Defense date: December 12, 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-8709.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na pomoći, trudu i vremenu koje je uložila da prenese svoje znanje, a posebno na vjeri u mene i moj rad tijekom studija. Zahvaljujem obitelji koja mi je uvijek pružala veliku podršku i davala snagu kada mi je bilo teško. Za kraj zahvaljujem svim profesorima koji su uložili veliki trud da od nas naprave stručnjake, nadam se da ću opravdati njihovo povjerenje.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. LJUSKA KAKAOVOG ZRNA 4

2.1.1. KEMIJSKI SASTAV KAKAOVE LJUSKE 6

2.1.2. PRIMJENA KAKAOVE LJUSKE 11

2.2. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA 13

2.3. METODE ODREĐIVANJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI 15

2.3.1. SPEKTROSKOPSKE METODE 15

2.3.2. KROMATOGRAFSKE METODE 18

2.4. HLADNA PLAZMA 21

3. EKSPERIMENTALNI DIO 23

3.1. ZADATAK 24

3.2. MATERIJALI I METODE 24

3.2.1. KROMATOGRAFSKA METODA 24

3.2.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA 27

4. REZULTATI 28

5. RASPRAVA 41

6. ZAKLJUČCI 47

7. LITERATURA 49

1. UVOD

Porast proizvodnje sektora prehrambene industrije povlači za sobom ogroman rast nusproizvoda od kojih ti isti proizvođači većinom nemaju koristi. Samim time nusprodukti predstavljaju otpad koji se s vremenom nagomilava. Problemi odlaganja tog otpada i troškovi koji su posljedica istog mogu biti riješeni tako da otpad jedne industrije posluži kao sirovina nekoj drugoj industriji (Galanakis, 2015). Nusproizvodi prerade ploda kakaovca su samo jedni u nizu primjera otpada čijim se iskorištavanjem pokušavaju zadovoljiti ekonomski, ali i ekološki aspekti (Martínez i sur., 2012). Zemlje Zapadne i Središnje Afrike zauzimaju velike udjele ukupne proizvodnje na svjetskoj razini (71,4 %) te kao posljedica same prerade zrna kakaa nastane oko 6,7 milijuna tona ukupnih nusproizvoda: kakaove mahune, kakaove ljuske, pogače… (Adamafio, 2013). Samo ljuska koja se otklanja prije ili nakon prženja može sačinjavati 14 – 20 % zrna (Okyama i sur., 2017). U skladu s time sve je veći broj istraživanja koja su usredotočena na pronalazak različitih načina iskorištenja kakaove ljuske kao sirovine.

Dosada je ljuska korištena za proizvodnju biogoriva, te kao sastojak hrane za životinje (Ntiamoah i Afrane, 2007) ili sredstava za gnojenje, a novija istraživanja pokazuju kako zahvaljujući visoko vrijednom nutritivnom sastavu može poslužiti kao sastavni dio funkcionalnih proizvoda (Okyama i sur., 2017). Ustanovljeno je da bi mogla predstavljati dobar izvor bioaktivnih komponenata poput vitamina D (Adeyina i sur., 2010), prehrambenih vlakana, fenolnih spojeva te metilksantina (Okyama i sur., 2017).

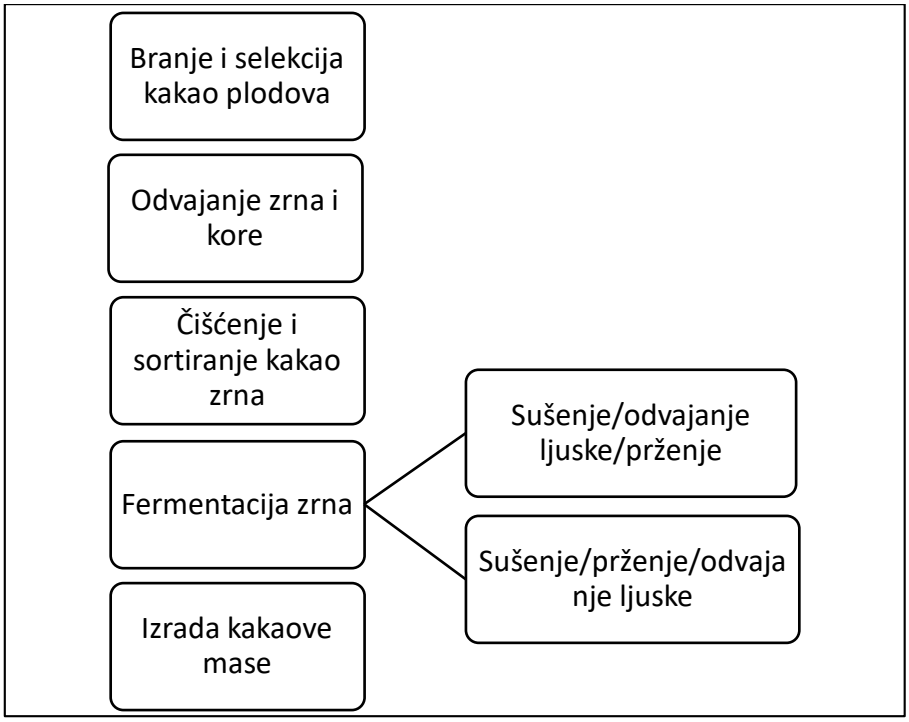
Cilj ovog rada je odrediti sastav i udio fenolnih tvari u kakaovoj ljusci (galne kiseline, kava kiseline, *p*-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata) i metilksantina (teobromina i kofeina) HPLC metodom te udio ukupnih fenolnih tvari spektrofotometrijskom metodom. Nadalje, ispitati utjecaj obrade kakaove ljuske hladnom plazmom na sastav i udio bioaktivnih komponenti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJUSKA KAKAOVOG ZRNA

Kakaovac (*Theobroma cacao* L.) je tropska biljka koja potječe iz Središnje i Južne Amerike. Njezini plodovi tj. dijelovi ploda služe za dobivanje različitih kakao proizvoda. Plod se sastoji od kore i sjemenki. Sjemenke su te koje idu na daljnju obradu, a svaka od njih sadrži ljusku unutar koje se nalaze dva kotiledonska listića i klica. Ljuska se odvaja od kotiledona koji postaje glavna sirovina za proizvodnju kakaa i čokoladnih proizvoda (Beckett, 2009; Gutiérrez, 2017).

Proces obrade sjemenki ploda kakaovca se odvija u nekoliko faza (**Slika 1**). Nakon odvajanja kore, sjemenke se podvrgavaju fermentaciji te sušenju (Gutiérrez, 2017).



Slika 1 Shematski prikaz obrade kakao zrna (Gutiérrez, 2017)

Promatrajući cijelo zrno, udio ljuske prije fermentacije se kreće od 12,8 do 25,1 %. Uslijed fermentacije i sušenja dolazi do značajne redukcije njene količine (Afoakwa i sur., 2013). Slijedi čišćenje i sortiranje zrna, nakon čega može uslijediti drobljenje i odvajanje ljuski koje se može odviti prije ili nakon prženja (Gutiérrez, 2017). Na **Slici 2** je prikaz kakaove ljuske odvojene nakon prženja zrna (Panak Balentić i sur., 2018).



Slika 2 Kakaova ljuska (Panak Balentić i sur., 2018)

Prženje cijelog zrna sa stajališta odvajanja kakaove ljuske može imati pozitivan utjecaj jer olakšava njezino uklanjanje, međutim promatrajući sastav samog kotiledona uočeni su potencijalni gubici kakao maslaca koji prelazi u ljusku prilikom izlaganja toplini. U slučaju odvajanja ljuske prije samog prženja može se primijeniti kratkotrajni toplinski predtretman koji uzrokuje brzo isparavanje vode tj. snižavanje vlage kojim se postiže lakše odvajanje iste (Gutiérrez, 2017).

Kotiledon odlazi na daljnju obradu u kakao masu, dok ljuska zaostaje kao otpadni materijal. Budući da ljuska može utjecati na kvalitetu konačnog proizvoda i na sam proces proizvodnje pokušava se u što većoj količini otkloniti (Okyama i sur., 2017). Njezina količina je i zakonski regulirana, u skladu s tim, kakao-lom ne smije sadržavati više od 5 % kakao ljuske i klice zajedno računajući na bezmasnu suhu tvar (DZNM, 1996).

2.1.1. Kemijski sastav kakaove ljuske

Na kemijski sastav kakao zrna utječu brojni čimbenici: okolišni (podrijetlo, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti) i uvjeti obrade (fermentacija, prženje, sušenje itd.), stoga je za očekivati varijabilnost rezultata različitih uzoraka (Hernández-Hernández i sur., 2017). Promatrajući sastav kakaove ljuske kao najvažniji čimbenici nameću se podrijetlo te način odvajanja ljuske od kotiledona (Okyama i sur., 2017). **Tablica 1** prikazuje kemijski sastav kakaove ljuske prema različitim autorima. Količine su izražene u gramima osnovnih komponenti na kilogram suhe tvari. Udio proteina u kakaovoj ljusci se ne razlikuje bitno od udjela u kotiledonu, međutim gotovo 99 % je povezano na druge komponente te se samo 1 % proteina nalazi u slobodnom obliku.

Tablica 1 Kemijski sastav kakaove ljuske

Komponenta	Arlorio i sur. (2001)	Martínez i sur. (2012)
	Količina (g kg^{-1} suhe tvari)	
Voda	101,1 ± 6	77 ± 1
Proteini	181 ± 8	150 ± 2
Masti	68 ± 2	20,2 ± 0,3
Ugljikohidrati	-	178,0 ± 0,9
Pepeo	81,4 ± 4	73 ± 1
Fitinska kiselina	6 ± 1	-

Razlike u udjelu masti su značajne, ali se vrlo jednostavno mogu objasniti. Naime, ovisno o tretmanu uklanjanja ljuske količina masti može varirati, prženjem cijelog zrna dio masti može prijeći u ljusku (Okyama i sur., 2017). U usporedbi s kakaovim maslacem iz zrna, lipidi iz kakaove ljuske imaju nižu pH vrijednost što je najvjerojatnije posljedica hidrolize

triacilglicerola uslijed izlaganja visokoj temperaturi prilikom prženja. U kakaovoj ljusci su pronađene nešto veće količine fosfolipida te određenih masnih kiselina poput miristinske, kapronske, palmitinske i linoleinske kiseline (El-Saied i sur., 1981). Lecumberri i sur. (2007) ukazuju na to da je upravo ljuska dobar izbor za pripravu funkcionalnih proizvoda s nižom energetskom vrijednosti zbog niskog udjela vodotopljivih šećera (manje od 0,5% suhe tvari).

Prehrambena vlakna

Osim što predstavlja bogat izvor prehrambenih vlakana kakaova ljuska sadrži i dobar omjer netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana (Martínez i sur., 2012). **Tablica 2** prikazuje rezultate istraživanja koje su proveli Redgwell i sur. (2003) te Lecumberri i sur. (2007) iz kojih je vidljivo kako najveći udio prehrambenih vlakana zauzimaju netopljiva prehrambena vlakna.

Tablica 2 Udio prehrambenih vlakana kakaove ljuske

Komponenta	Redgwell i sur. (2003)	Lecumberri i sur. (2007)
	Količina (% suhe tvari)	
Ukupna prehrambena vlakna	63,6 ± 0,40	60,51 ± 0,32
Topljiva prehrambena vlakna	11,7 ± 0,10	10,09 ± 0,38
Netopljiva prehrambena vlakna	51,9 ± 0,40	50,42 ± 0,70

Bitno je napomenuti kako pektini, izraženi prema uronskoj kiselini, čine najveći udio topljivih prehrambenih vlakana dok Klasonovi lignini zauzimaju najveći udio netopljivih prehrambenih vlakana (Lecumberri i sur., 2007). Međutim postavlja se sumnja precjenjuje li se udio vlakana budući da u Klasonovim ligninima prema nekim ispitivanjima dominiraju kompleksi proteina,

tanina i produkata Maillardovih reakcija nastalih uslijed izlaganja visokoj temperaturi (Redgwell i sur., 2003).

Mineralne tvari

Kakaovu ljusku karakterizira visoki udio pepela (Arlorio i sur., 2001; Martínez i sur., 2012). Osundahunsi i sur. (2007) su ustanovili kako pepeo kakaove ljuske može biti primijenjen za alkaliziranje kakao mase. **Tablica 3** prikazuje udio pojedinih mineralnih tvari pepela korištenog u tu svrhu. Zaključeno je kako ljuska nije značajno utjecala na fizikalna i kemijska svojstva kakao mase, kao niti na ukupnu senzorsku prihvatljivost.

Tablica 3 Udio pojedinih mineralnih tvari pepela kakaove ljuske (Osundahunsi i sur., 2007)

Komponenta	**Količina**
Kalij (g 100 g^{-1})	3,1 ± 0,10
Natrij (g 100 g^{-1})	7,2 ± 0,15
Natrijev karbonat (g 100 g^{-1})	33,1 ± 0,13

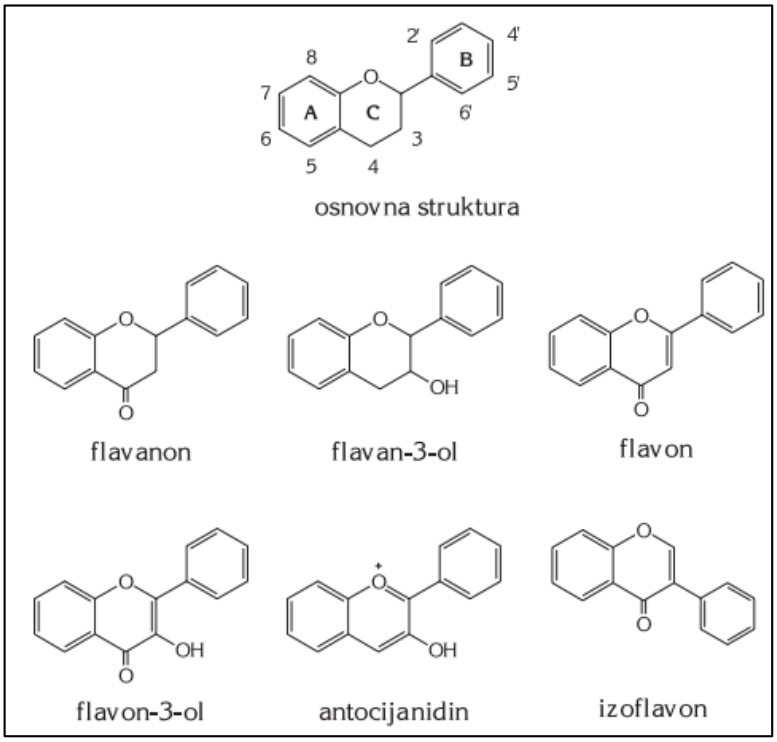
Aregheore (2002) navodi činjenicu da kakaova ljuska sadrži kalcij u količini 1,26 g kg^{-1} suhe tvari, kao i nešto niže količine fosfora i magnezija (0,44 i 0,24 g kg^{-1} suhe tvari) te mikrominerale među kojima su željezo i bakar vodeći prema količinama (456,8 i 133,6 mg kg^{-1} suhe tvari).

Martínez i sur. (2012) ukazuju na to da se zbog sadržaja metala mora pripaziti na količinu i matriks u koje se kakaova ljuska kao i ostali nusproizvodi dodaju zbog mogućeg utjecaja na izazivanje oksidacijskih reakcija. Isto tako se zbog velike sposobnosti ljuske da adsorbira metale, osobito olovo, mora voditi računa o uvjetima uzgoja i procesiranja kakao zrna kako ne bi došlo do kontaminacije konačnih proizvoda u koje je ljuska dodana (Rankin i sur., 2005).

Polifenoli

Polifenoli (fenolne komponente) čine veliku skupinu spojeva veoma raširenu u biljnom svijetu. Biljke ih sintetiziraju u svrhu zaštite od mikroorganizama, zacijeljivanju u slučaju oštećenja nekih dijelova, ali i privlačenju kukaca od kojih biljke imaju koristi npr. onih koji sudjeluju u oprašivanju (Webb, 2006; Kondakova i sur., 2009). Jedna od podjela ukazuje na postojanje tri skupine polifenolnih spojeva: fenolne kiseline, flavonoide i stilbene (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Strukturna karakteristika zajednička svim skupinama je hidroksilirani aromatski prsten koji je često prisutan u većem broju (Webb, 2006).

Flavonoidi čine najveću skupinu polifenola, a mogu se podijeliti na sljedeće podskupine: flavanoni, flavoni, flavonoli, izoflavoni, antocijanidini i flavani. **Slika 3** prikazuje osnovne strukture pojedinih podskupina (Kazazić, 2004). Najzastupljeniji flavonoidi u kakaovoj ljusci su epikatehin i katehin koji pripadaju skupini flavonola te kondenzirani tanini tj. procijanidini koji nastaju polimerizacijom katehina i epikatehina (Panak Balentić i sur., 2018). Zahvaljujući kemijskoj strukturi pridaju im se antioksidacijska svojstva zbog sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala te keliranja odnosno vezanja iona prijelaznih metala (Kazazić, 2004; Abbe i Amin, 2008).

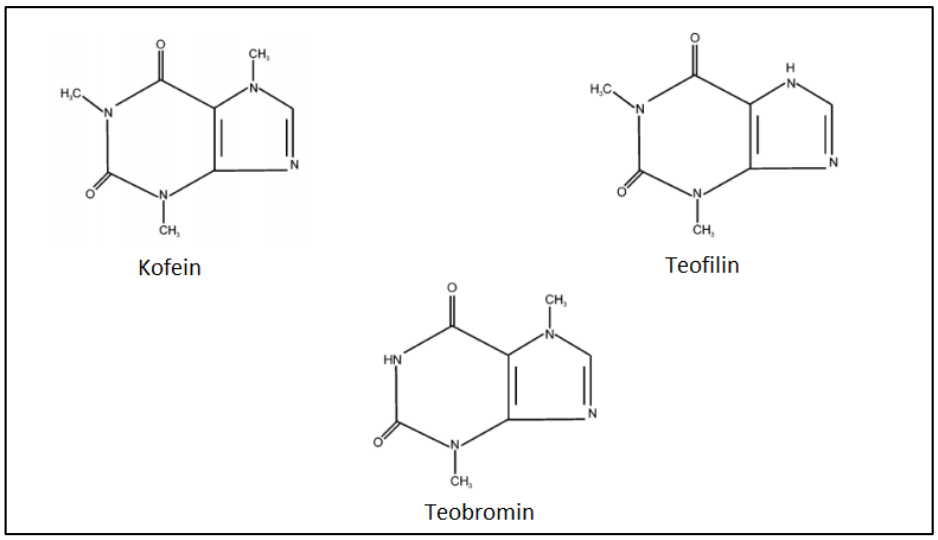


Slika 3 Osnovne strukture flavonoida (Kazazić, 2004)

Metilksantini

Važni predstavnici bioaktivnih komponenti kakaove ljuske su metilksantini svrstani u skupinu purinskih alkaloida zbog specifične građe odnosno pirimidinskog i imidazolnog prstena na koje se vežu određene kemijske skupine. **Slika 4** prikazuje strukture najzastupljenijih metilksantina u kakaovom zrnu odnosno kakaovoj ljusci (Andreeva i sur., 2012).

Poznato je kako su kakao proizvodi bogati metiksantinima (Abbe i Amin, 2008). Prilikom prerade zrna na ljusci mogu zaostati dijelovi kotiledona i to čak u količinama 2 do 3 % što posljedično može utjecati na kemijski sastav ljuske, preciznije na količinu metilksantina koji i tijekom fermentacije djelomično prelaze u ljusku (Beckett, 2009). Količina metilksantina u ljusci osim o fermentacijskom procesu ovisi i o podrijetlu te zrelosti ploda (Bonvehí i Jordà, 1998).



Slika 4 Strukture najzastupljenijih metilksantina u kakaovoj ljusci (Andreeva i sur., 2012)

Najzastupljeniji metilksantin u kakaovoj ljusci je teobromin, prvi puta izoliran je upravo iz ljuske kakao ploda 1842. godine. Odgovoran je za gorak okus kakao proizvoda (Andreeva i sur., 2012). Tijekom procesa prženja se može vezati na diketopirazine čime gorčina postaje još istaknutija (Bonvehí i Jordà, 1998). Zajedno s kofeinom djeluje stimulirajuće na središnji živčani sustav posljedično ubrzavajući rad srca i bubrega (Andreeva i sur., 2012). Iako se u slučaju kakao proizvoda metilksantini nalaze uz polifenolne komponente njihovo međudjelovanje nije

poznato. Zbog kontradiktornih rezultata dosadašnjih studija nije poznato niti imaju li u konačnici prooksidativni ili antioksidativni učinak (Abbe i Amin, 2008).

Metilksantini su dio brojnih farmaceutskih pripravaka, a ovisno o dozi i stanju osobe mogu imati toksične učinke na organizam. S obzirom na prethodno navedenu tvrdnju te činjenicu da mehanizam njihovog djelovanja nije do kraja razjašnjen treba biti oprezan pri njihovom korištenju (Andreeva i sur., 2012; Hartati, 2010).

2.1.2. Primjena kakaove ljuske

Ljuska može činiti od 10 do 12 % kakao zrna (Awarikabey i sur., 2014), a prema nekim autorima njezin udio raste i do 20 % što znači da se u konačnici velike količine kao otpadni materijal nakupljaju i često odbacuju (Okyama i sur., 2017). Osim što se povećavaju ukupni troškovi industrije zbog zbrinjavanja ljuske, problemi se očituju i u nepravilnom upravljanju istim što može dovesti do mogućeg negativnog utjecaja na okoliš (Bentil i sur., 2015). Sve je više istraživanja koja se bave pronalaskom alternativnih rješenja pa tako zahvaljujući kemijskom sastavu ljuska može biti iskorištena za tretiranje tla, odnosno kao gnojivo (Okyama i sur., 2017). Fiset i sur. (2002) navode kako se kakaova ljuska može koristiti kao adsorbens za uklanjanje metala iz kiselih otopina, a to se osobito odnosi na olovo čija koncentracija pri određenim uvjetima može biti smanjena za čak 90 %. Isto tako može biti iskorištena za izolaciju pektina (Okyama i sur. 2017) koji je poznat kao sredstvo za geliranje i stabiliziranje proizvoda prehrambene i farmaceutske industrije (Arlorio i sur., 2001). Mashuni i sur. (2017) su ustanovili da se bio ulje dobiveno sakupljanjem kondenzata prilikom pirolize kakaove ljuske može koristiti kao konzervans u različitim prehrambenim proizvodima te kao bio pesticid upravo zahvaljujući specifičnom kemijskom sastavu tj. sadržaju amonijaka, fenolnih komponenti, octene kiseline, heksana itd. Isto tako zbog nutritivnih svojstava ljuska je pronašla ulogu i u hranidbi životinja. Pritom se mora pripaziti na doziranje ljuske zbog visokog sadržaja teobromina koji u određenim koncentracijama može imati toksičan učinak (Aregheore, 2002).

Potencijal upotrebe u prehrani ljudi

U posljednje vrijeme se sve više istraživanja bazira na ispitivanju mogućnosti korištenja kakaove ljuske u ljudskoj prehrani. Funkcionalna hrana se nudi kao idealno sredstvo za postizanje cilja. Potencijalni pozitivan učinak na zdravlje čovjeka se može pripisati visokom udjelu prehrambenih vlakana i polifenolnih komponenti (Nsor-Atindana i sur., 2012). Poznato je kako konzumacija prehrambenih vlakana može imati utjecaj na čitav niz funkcija organizma prvenstveno uključenih u probavni i kardiovaskularni sustav (Dhingra i sur., 2012). Dok se polifenolne komponente obično spominju u kontekstu zaštite od oksidativnog stresa koji se nameće kao jedan od glavnih pokretača kroničnih nezaraznih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009). Jozinović i sur. (2017) su u svome istraživanju ispitivali kombinaciju ekspandiranog kukuruznog snack proizvoda s dodatkom mljevene kakaove ljuske u udjelu od 5, 10 i 15 % suhe tvari, pritom je ustanovljeno povećanje udjela fenolnih komponenti i rezistentnog škroba te povećanje antioksidacijske aktivnosti u konačnom proizvodu. Lecumberi i sur. (2007) su ustanovili da se ekstrakt kakaove ljuske može koristiti za pripremu čokoladnih torti, keksa i dodataka prehrani u svrhu obogaćivanja vlaknima. Svakako postoje mogućnosti dodatka kakaove ljuske u određenim oblicima u proizvode pekarske i konditorske industrije što bi se budućim istraživanjima trebalo potvrditi (Panak Balentić i sur., 2018).

2.2. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA

Slobodni radikali predstavljaju vrlo reaktivne atome ili molekule koje sadrže nespareni elektron, a nastaju kao posljedica normalnog metabolizma stanice. Uslijed nakupljanja prekomjernih količina slobodnih radikala tj. reaktivnih vrsta kisika i/ili dušika u organizmu nastupa stanje koje se naziva oksidativni stres. Pritom može doći do oksidativnih oštećenja lipida, nukleinskih kiselina, proteina te pokretanja promjena u funkciji stanice koje odsutstvom sustava popravaka mogu dovesti do ozbiljnih posljedica odnosno razvoja bolesti poput karcinoma i ateroskleroze. Tijelo se protiv oksidativnog stresa nastoji obraniti antioksidativnim enzimima te spomenutim sustavima popravka molekula. Unosom antioksidanasa putem prehrane tzv. egzogenim antioksidansima se također može utjecati na redoks status organizma (Webb, 2006).

Zahvaljujući sadržaju bioaktivnih komponenata kakaova ljuska ima potencijalno antioksidativno djelovanje (Awarikabey i sur., 2014). Kada se govori o kemijskom sastavu i povezanosti s antioksidativnim učinkom poseban naglasak se stavlja na polifenolne komponente. Tome u prilog govore rezultati epidemioloških studija kojima se potvrđuje pozitivna korelacija unosa hrane bogate polifenolima i smanjenog rizika oboljevanja od kroničnih nezaraznih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

Intervencijske studije ukazuju na mogućnost povećanja antioksidacijskog kapaciteta plazme uslijed konzumacije ekstrakata koji su bogati polifenolnim komponentama. Postoje brojne teorije o mehanizmu njihovog djelovanja. Moguće je da djeluju kao reducirajući agensi i tako smanjuju oksidativni stres (Pandey i Rizvi, 2009). Međutim isto tako je moguće da u organizmu djeluju prooksidativno i time aktiviraju signalne puteve u stanici koji dovode do antioksidativnog odgovora. Isto tako brojna istraživanja upućuju na antikancerogeni učinak polifenola izazivanjem apoptoze promijenjenih stanica upravo prooksidativnim djelovanjem. Dakle, ovisno o okolini u kojoj se nalaze njihovo djelovanje će se razlikovati. Međutim upitno je kolika je mogućnost njihovog djelovanja u organizmu zbog male bioraspoloživosti (Khan i sur., 2012).

Antioksidansi se obično dodaju u hranu kako bi produžili vijek trajnosti proizvoda tj. spriječili kvarenje uzrokovano oksidacijskim promjenama. Kako bi se smanjilo korištenje sintetskih antioksidanasa i izbjegli zdravstveni rizici vezani za njih, industrije se sve više okreću upotrebi

prirodnih antioksidanasa. Istraživanje provedeno praćenjem oksidacijskih promjena na kuhanoj i ohlađenoj govedini tretiranoj različitim sintetskim i prirodnim antioksidansima pokazuje kako etanolni ekstrakt kakaove ljuske može usporiti lipidnu peroksidaciju (Amin i Chew, 2006). Manzano i sur. (2017) također potvrđuju kako polifenoli iz kakaove ljuske u praškastom obliku dodani u sojino ulje za prženje mogu pozitivno utjecati na njegovu stabilnost, odnosno usporiti oksidaciju slobodnih masnih kiselina.

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti se koriste različite metode, obično jedna ne zadovoljava sve uvjete pa se kombinira više njih kako bi se dobili što točniji rezultati (Martínez i sur., 2012). Lecumberi i sur. (2007) su u svom istraživanju primijenili dvije metode: FRAP i TEAC metodu. FRAP metodom se ispituje sposobnost antioksidansa da reducira Fe^{3+} ion pri čemu se stvara kompleks zbog kojeg se povećava apsorbancija dok se TEAC metodom procjenjuje sposobnost sparivanja elektrona ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) radikal-kationa. Autori tvrde da dobiveni rezultati prema TEAC metodi govore kako je antioksidacijska aktivnost ekstrakta kakaove ljuske (7,73 ± 0,47 µmol TE g^{-1} suhe tvari) viša od aktivnosti žitarica, a usporediva s vrijednošću koja je izmjerena u povrću, voću i mahunarkama. Prema FRAP metodi dobivene vrijednosti ekstrakta kakaove ljuske (72,32 ± 0,67 µmol TE g^{-1} suhe tvari) su više od vrijednosti svih prethodno navedenih skupina hrane. Martínez i sur. (2012) su uspoređivali dvije različite metode ekstrakcije tj. vrste otapala pri čemu je jedna od metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta bila DPPH koja se temelji na sparivanju slobodnog elektrona 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala. Pritom je antioksidacijska aktivnost metanolno-acetonskog ekstrakta bila veća od aktivnosti etanolnog ekstrakta.

Čak i kada se metode temelje na istom mehanizmu, rezultati dosadašnjih istraživanja su teško usporedivi zbog različitosti u pripremi uzoraka, provođenju same metode i izražavanju rezultata. Količina ukupnih fenolnih komponenti i potencijalna visoka korelacija sa antioksidacijskom aktivnošću daju dobru podlogu za daljnja istraživanja (Martínez i sur., 2012).

2.3. METODE ODREĐIVANJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI

Budući da je sve veći interes za proizvode koji sadrže polifenolne komponente zbog blagotvornih učinaka na organizam, sve je veći broj istraživanja usmjeren na pronalazak analitičke metode koja može udovoljiti zahtjevima visoke osjetljivosti i selektivnosti za određivanje istih. Trenutno se najčešće koriste spektroskopske i kromatografske metode (Ignat i sur., 2011). Za udovoljavanje zahtjevima same metode jedna od važnijih stavki je priprema uzorka tj. izolacija komponenti iz primarnog matriksa (Luhria, 2006). Zaključci koji se izvode iz dobivenih rezultata ovise o metodi ekstrakcije i provedbi analitičke metode identifikacije i kvantifikacije te se iz toga razloga moraju pomno birati (Wollgast i Anklam, 2000).

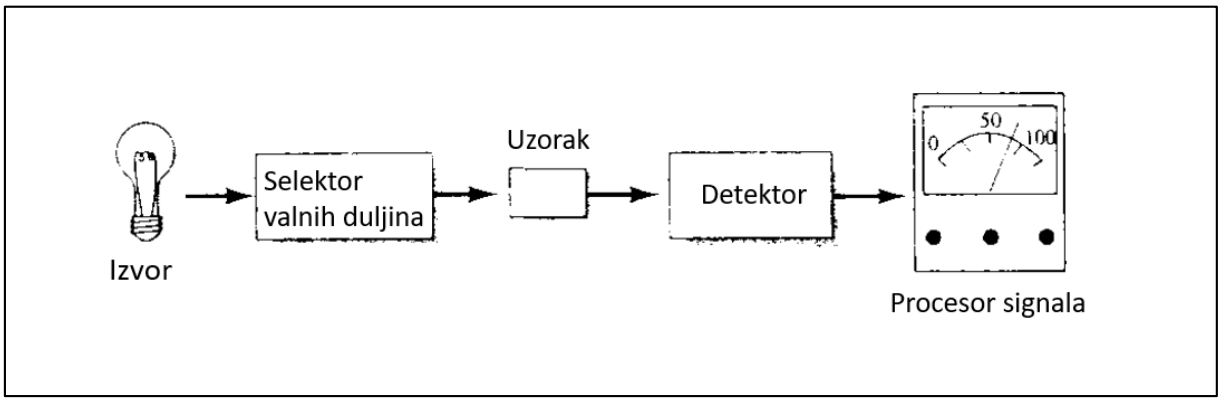
2.3.1. Spektroskopske metode

Spektroskopija predstavlja granu znanosti koja se bavi svjetlošću razlučenom u komponente tj. valne duljine koje čine spektar karakterističan za određenu tvar. Iako se u početku bavila proučavanjem vidljive svjetlosti s vremenom se proširila i na druge vrste elektromagnetskog zračenja poput X-zraka, ultraljubičastog, infracrvenog, mikrovalnog i radiofrekvencijskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje je okarakterizirano dvojnom prirodom, odnosno valnim i čestičnim svojstvima (Harvey, 2000).

Spektralna analiza se bazira na mjerenju energije zračenja koja je apsorbirana ili emitirana zahvaljujući atomskim ili molekularnim prijelazima. Pri predaji energije fotona ionu, atomu ili molekuli dolazi do prelaska iste u više energetsko stanje pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta neke frekvencije elektromagnetskog zračenja tj. apsorpcije. Pri povratku iz pobuđenog u osnovno energetsko stanje može doći do otpuštanja energije u obliku elektomagnetskog zračenja tj. emisije (Harvey, 2000).

Apsorpcija se zasniva na Lambert-Beer-ovu zakonu prema kojemu se intenzitet svjetla monokromatskog snopa koji prolazi kroz tekuću, krutu ili plinovitu tvar smanjuje uslijed apsorpcije zračenja, pritom je količina svjetla koju medij apsorbira proporcionalna koncentraciji medija i duljini puta svjetlosti (Skoog i sur., 2007).

Slika 5 prikazuje osnovne dijelove optičkog instrumenta: izvor zračenja, selektor valnih duljina, spremnik za uzorak (jedan ili više njih), detektor zračenja (uređaj za pretvorbu energije zračenja u mjerljivi signal) i procesor signala (Skoog i sur., 2007). S obzirom na to koriste li se filteri ili monokromator kao selektor valnih duljina, instrument se naziva fotometar ili spektrofotometar (Harvey, 2000).



Slika 5 Jednosnopni spektroskopski instrument (Skoog i sur., 2007)

Pri određivanju fenolnih komponenti spektrofotometrijske metode služe za grubu procjenu količine, međutim njihova prednost je u jednostavnosti provođenja metode. Neke od metoda koje se koriste za kvanifikaciju ukupnih fenola su Folin-Ciocalteu i metoda pruskog plavila, za katehine metoda s vanilinom te za proantocijanidine metoda kiselog butanola (Wollgast i Anklam, 2000).

Nsor-Atindana i sur. (2012) su proveli istraživanje s ciljem procjene koncentracije ukupnih fenolnih komponenti u različitim ekstraktima kakaove ljuske spektroskopskom metodom. Nakon uklanjanja masti Soxlet-ovom metodom na ostatak su primijenjena različita ekstrakcijska otapala (80 %-tni metanol, etanol, aceton te deionizirana voda). Ekstrakcijski proces je potpomognut mikrovalovima. Pri određivanju ukupnih fenola korištena je metoda koja uključuje Folin-Ciocalteu reagens te dodatak natrijevog karbonata dok je apsorbancija očitana na 750 nm UV spektrofotometrom. Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je kolorimetrijska metoda s aluminijevim kloridom pri čemu je vršeno mjerenje apsorbancije na 510 nm. Prikazani rezultati u **Tablici 4** se odnose na suhu tvar, kod ukupnih fenola su izraženi prema galnoj kiselini (GAE, eng. gallic acid equivalent – ekvivalent galne kiseline) dok su kod

flavonoida izraženi prema katehinu (CE, eng. catehin equivalent – ekvivalent katehina). O svojstvima otapala, odnosno njihovoj polarnosti ovisi ekstraktibilnost fenolnih komponenti, naime vidljivo je kako najmanje polarno otapalo (aceton) od primjenjenih ima najveću, dok najpolarnije otapalo (voda) najmanju moć ekstrakcije.

Tablica 4 Količina ukupnih fenola i flavonoida s obzirom na korišteno otapalo (Nsor-Atindana i sur., 2012)

Otapalo	**Komponenta**	
	Ukupni fenoli (mg GAE g^{-1})	Ukupni flavonoidi (mg CE g^{-1})
Aceton	41,82 ± 1,11	5,49 ± 0,03
Etanol	23,36 ± 1,59	2,23 ± 0,90
Metanol	25,15 ± 0,79	2,50 ± 0,02
Voda	17,21 ± 0,80	1,65 ± 0,14

Yapo i sur. (2013) su također koristili četiri različita ekstrakcijska otapala (80 %-tni etanol, 60 %-tni aceton, voda i zakiseljeni butanol) pri čemu su prve tri frakcije spojene te su ukupne fenolne komponente okarakterizirane kao topljive fenolne komponente (proantocijanidini, tanini), dok se zadnja frakcija sastoji od depolimeriziranih kondenziranih tanina netopljivih u organskim otapalima. Ustanovljena je koncentracija topljivih fenolnih komponenti od 26,71 ± 4,52 mg GAE g^{-1} suhe tvari.

2.3.2. Kromatografske metode

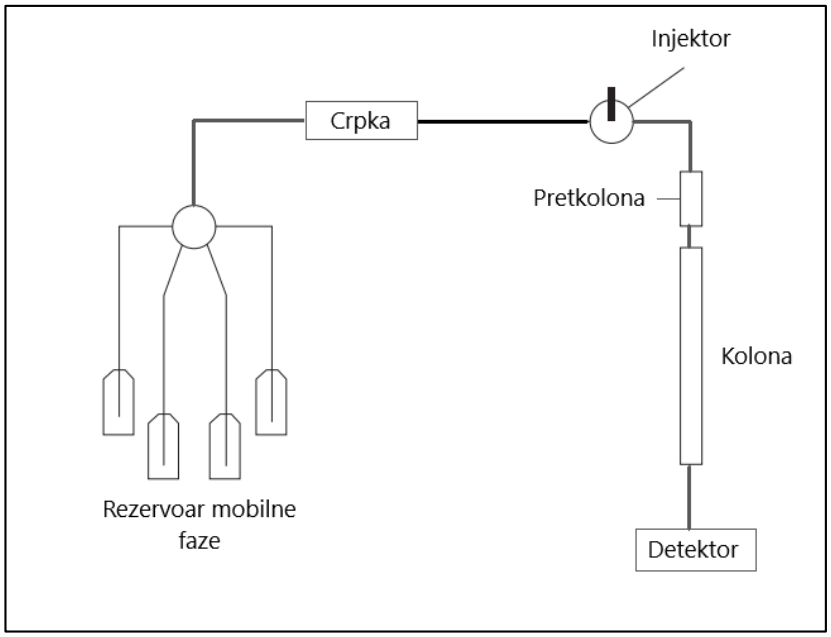
Kromatografija je skup separacijskih metoda kojima je omogućena identifikacija i kvantifikacija komponenata neke smjese. Princip kromatografije se temelji na raspodjeli sastojaka između pokretne i stacionarne faze pri čemu je uzorak otopljen u pokretnoj fazi koja može biti tekućina, plin ili fluid pri superkritičnim uvjetima. Ovisno o interakcijama pokretne i nepokretne faze odnosno o brzini prolaska sastojaka dolazi do razdvajanja istih. S obzirom na oblik kromatografske podloge razlikuju se plošna i kolonska kromatografija. U kolonskoj kromatografiji se koristi tehnika eluiranja prilikom čega se komponente ispiru kroz kolonu dodavanjem čistog otapala. Odijeljene komponente se uz pomoć detektora bilježe kao pikovi iz čijih se vremena zadržavanja i veličine identificira tj. kvantificira pojedina komponenta (Skoog i sur., 2007).

Jedna od podjela kromatografskih metoda se odnosi na tip tj. agregatno stanje pokretne faze, prema tome postoje plinska, tekućinska kromatografija te fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima. Na temelju mehanizma odjeljivanja tekućinska kromatografija se može podijeliti na sljedećih pet skupina: razdjelna (particijska), adsorpcijska, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna i kromatografija isključenjem. Razdjelna kromatografija ima najveću primjenu u analitici, a temelji se na razlici u topljivosti sastojaka u pokretnoj i stacionarnoj fazi. Faze između kojih se razdjeljuju sastojci su različite polarnosti, ukoliko je nepokretna faza manje polarna od pokretne govori se o kromatografiji obrnutih faza pri čemu uslijed eluiranja polarnije komponente izlaze prve dok je kod kromatografije normalnih faza situacija obrnuta. Kromatografija obrnutih faza se puno češće koristi u današnje vrijeme samo jedan od uzroka tome je mogućnost korištenja vode kao pokretne faze koja je netoksična za razliku od organskih otapala (Skoog i sur., 2007).

Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija

Kao jedna od najprimjenjivijih tehnika nameće se visoko djelotvorna odnosno visoko tlačna tekućinska kromatografija (eng. HPLC). Visoka osjetljivost, točnost, pogodnost za određivanje čitavog niza nehlapivih komponenti samo su neke od prednosti HPLC metode. **Slika 6** prikazuje osnovne dijelove HPLC uređaja. Mobilna faza se po potrebi filtrira odnosno degazira, a iz

spremnika se doprema uz pomoć crpke. Postoje različite izvedbe crpki i injektora putem kojeg se uzorak unosi u sustav. Danas se najviše primjenjuju automatski uzorkivači (autosampleri). Pretkolona je prema sastavu slična kolonama, a služi za otklanjanje čestica koje bi mogle ometati analizu i time produžuje vijek trajnosti kolone. Kolona je središnji dio uređaja i njen odabir ovisi o komponentama koje se određuju odnosno o mehanizmu odjeljivanja. Detektori registriraju prisutnost komponente na temelju promjene nekog svojstva pokretne faze (konduktometrijski, detektor indeksa loma) ili direktnom detekcijom svojstva komponente (apsorpcijski, flourimetrijski, elektrokemijski). Signali detektora se bilježe te se u konačnici dobiva prikaz odziva detektora u vremenu tj. kromatogram (Skoog i sur., 2007).



Slika 6 Shematski prikaz HPLC uređaja (Harvey, 2000)

HPLC metode su veoma često korištene za detekciju fenolnih komponenata iz različitih složenih prirodnih matriksa (Del Carlo i Mascini, 2000). Najčešće se radi o kromatografiji obrnutih faza pri čemu se kao čvrsti nosač koristi silikagel, a na njega je vezana nepokretna faza i to alkilne skupine C_{18}. Za eluiranje se primjenjuju višekomponentna otapala te se u većini slučajeva prednost daje gradijentnom eluiranju. Kombinacije otapala koje se koriste su najčešće vodom razrijeđena octena, mravlja ili fosforna kiselina sa metanolom ili acetonitrilom. Budući da fenoli pokazuju apsorpcijsku aktivnost u UV području, najčešće se

koristi detektor s nizom dioda koji omogućuje snimanje cijelog spektra, a također je i osjetljiviji od ostalih UV detektora (Wollgast i Anklam, 2000).

Bonvehí i Jordà (1998) opisuju korištenje HPLC metode za analizu metanolnog ekstrakta kakaove ljuske. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju kako čak 73 % analiziranih uzoraka sadrži udio teobromina veći od 0,91 g 100 g^{-1}, dok su od fenolnih komponeti ovom metodom određene kava kiselina (0,14 ± 0,05 mg 100 g^{-1}) i 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (0,55 ± 0,11 mg 100 g^{-1}).

2.4. HLADNA PLAZMA

Plazma je plinovita tvar koju karakterizira ioniziranost, a sastoji se od nabijenih čestica, radikala, fotona, atoma i molekula. Postoje brojni kriteriji prema kojima se oblici plazme svrstavaju u određene skupine, prema temperaturi koja se primjenjuje postoji vruća i hladna plazma. Za razliku od vruće plazme koja je u stanju termodinamičke ravnoteže, kod hladne plazme neutralne čestice i ioni ostaju sobne temperature iako elektroni postižu puno više temperaturne vrijednosti (Vukušić, 2016).

Do same ionizacije tj. nastanka plazme može doći uslijed električnog pražnjenja između dvije elektrode priključene na vanjski izvor istosmjerne električne energije, radiofrekventnom ili mikrovalnom indukcijom (Pankaj i sur., 2014; Vukušić, 2016).

Plazma se može generirati i električnim pražnjenjem u tekućinama. Postoje dvije teorije kojima se pokušava razjasniti mehanizam nastanka plazme u tekućini. Prema teoriji mjehurića električno pražnjenje počinje u mikro-mjehurićima zbog manje gustoće nakon čega dolazi do propagacije izboja u tekuću fazu, dok druga teorija govori o direktnoj ionizaciji molekula i atoma u tekućini. Jedna od glavnih karakteristika visokonaponskog električnog pražnjenja u vodi je nastanak snažnih udarnih valova prilikom čega dolazi do generiranja slobodnih radikala tj. reaktivnih vrsta kisika, te kavitacija uslijed kojih se stvaraju sekundarni valovi koji mogu doći u interakciju sa stanicama i uzrokovati promjene na membrani (Vukušić, 2016).

Hladna plazma se sve češće primjenjuje u prehrambenoj industriji. Široko je rasprostranjena njezina primjena za dezinfekciju vode pomoću ozona. Osim toga istražuje se na koji način bi se mogla iskoristiti za dekontaminaciju drugih prehrambenih proizvoda (Vukušić, 2016). Jedan od primjera je istraživanje koje su proveli Amini i Ghoranneviss (2016) koji su primijenili hladnu plazmu za uništavanje plijesni *Aspergillus flavus* na površini svježeg i sušenog oraha. Slična istraživanja provedena su na sve popularnijim minimalno procesiranim proizvodima poput povrća i voća koji su odmah spremni za konzumaciju, ali isto tako svježeg mesa i suhih začina koji mogu predstavljati zdravstveni rizik za potrošače (Vukušić, 2016). Osim za dekontaminaciju hrane, tretmani plazmom bi se mogli koristiti i za ambalažne materijale. Mogućnosti modifikacije površine materijala za pakiranje hrane donose brojne prednosti poput poboljšanih svojstava propusnosti plinova (Pankaj i sur., 2014). Izloženost hladnoj

plazmi može dovesti do pucanja membrana stanica pa bi se samim time mogla upotrebljavati i za ekstrakcijske postupke (Vukušić, 2016).

Tretiranje hladnom plazmom se smatra novom tehnologijom koja je ekološki prihvatljiva te čija bi primjena značila manju upotrebu kemijskih i termičkih metoda (Pankaj i sur., 2014). Međutim njen utjecaj na sastojke hrane nije dovoljno istražen te su potrebna nova ispitivanja s kojima bi se mogao donijeti konačan zaključak (Vukušić, 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada je u kakaovoj ljusci odrediti sastav i udio sljedećih fenolnih komponenti: galne kiseline, kava kiseline, *p*-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata te metilksantina: teobromina i kofeina HPLC metodom te udio ukupnih fenolnih tvari spektrofotometrijskom metodom. Zatim, ispitati utjecaj obrade kakaove ljuske hladnom plazmom na sastav i udio bioaktivnih tvari.

3.2. MATERIJALI I METODE

Kakaova ljuska podvrgnuta procesima prženja i fermentacije je donirana od strane prehrambene industrije Kandit d.o.o.

Analiza kromatografskom i spektrofotometrijskom metodom je provedena na netretiranom uzorku kakaove ljuske te uzorcima koji su podvrgnuti različitim tretmanima hladnom plazmom.

Odvagano je ukupno 18 uzoraka kakaove ljuske u dvije skupine (6 i 12 g). Uzorak iz svake skupine je tretiran hladnom plazmom frekvencije 40 i 80 Hz pri različitim vremenima trajanja tretmana od 15, 30 i 45 minuta. Budući da su svi uzorci prilikom tretmana bili u vodi volumena 400 ml, pripremljeni su i uzorci koji nisu podvrgnuti hladnoj plazmi istih vremena miješanja u istoj količini vode. Nakon toga su svi uzorci sušeni u sušioniku na 40 °C te samljeveni u mlinu (IKA, M20).

3.2.1. Kromatografska metoda

Kao polazna metoda za određivanje bioaktivnih komponenti korištena je HPLC metoda prema Belščak i sur. (2009) s određenim modifikacijama kako bi se uvjeti prilagodili dostupnom uređaju. Takva modificirana metoda je zatim validirana.

Analiza je provedena na HPLC uređaju proizvođača Shimadzu kojega sačinjavaju kvarterna crpka LC-20AD, komora za kolonu CTO-20AC, pretkolona, detektor s nizom dioda (PDA, eng. photo diode array) SPD-M20A i autosampler SIL-10 AF. Odjeljivanje komponenti je izvršeno uz pomoć kolone Inertsil ODS-3V proizvođača GL Science, dimenzija 250 x 4,6 cm, punjena

česticama veličine 5 µm. Upravljanje sustavom se izvršilo uz pomoć računalnog programa LabSolution Life (Release 5.52).

Pri validaciji metode određene su sljedeće značajke: linearnost, istinitost i preciznost. Pritom su korišteni sljedeći standardi (-)-epikatehin (čistoće ≥ 90 %), (+)-katehin (čistoće ≥ 99 %), (-)-epikatehin galat (čistoće 98,59 %), galna kiselina (čistoće 95,5 %), *p*-kumarinska kiselina (čistoće ≥ 98 %), teobromin (čistoće ≥ 99 %), kofein (čistoće ≥ 99 %), kava kiselina (čistoće ≥ 98 %). Proizvođač svih standarda je Sigma-Aldrich (SAD). Za određivanje linearnosti pripravljene su otopine standarda u određenom koncentracijskom rasponu te je za svaki niz otopina dobivena krivulja prema kojoj je vršena provjera proporcionalnosti dobivenih rezultata i koncentracije analita u uzorku. Pri određivanju preciznosti evaluirani su ponovljivost mjerenja te ponovljivost pripreme otopina. Ponovljivost mjerenja je ispitana injektiranjem otopine kakaove ljuske pet puta, dok su za određivanje ponovljivosti pripreme otopina priređene tri otopine ljuske te je svaka jednom injektirana. Istinitost metode je određena uz pomoć otopine ljuske koja je obogaćena poznatom količinom mješavine standarda i neobogaćenog uzorka ljuske, pritom je izračunato iskorištenje (%).

Identifikacija odijeljenih komponenti provedena je na osnovu vremena zadržavanja i usporedbe apsorpcijskih spektara komponenti u uzorcima kakaove ljuske sa spektrima standarda, dok je kvantifikacija komponenti izvršena na temelju metode vanjske kalibracije. Za svaku komponentu je izrađena kalibracijska krivulja s otopinama standarda. Dobiveni kromatografski podaci su se uspoređivali s podacima kalibracijske krivulje svake pojedine komponente.

Priprema uzorka

Za svaki samljeveni uzorak, ukupno 18 koji su podvrgnuti različitim tretmanima te uzorak netretirane kakao ljuske pripremljene su po tri paralele za HPLC analizu.

Za analizu je odvagano 2,00 g uzorka te je izvršena ekstrakcija tri puta sa po 10 ml *n*-heksana Carlo Erba Reagents, Italija) HPLC čistoće, kako bi se uklonili lipidi. Nakon zadnjeg dekantiranja heksana talog je prenesen na filter papir i sušen na zraku 24 sata kako bi *n*-heksan otpario. Uslijedila je ekstrakcija suhog, odmašćenog uzorka s 5 ml 70 %-tnog metanola (J.T.Baker,

Nizozemska) HPLC čistoće te 30 minuta ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji. Nakon ekstrakcije, uzorak se centrifugirao 10 minuta na 3000 rpm, a supernatant se dekantirao u odmjernu tikvicu od 10 ml. Postupak ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji i centrifugiranje je ponovljeno još jednom s istom količinom 70 %-tnog metanola (5 ml). Nakon spajanja ekstrakata odmjerna tikvica je nadopunjena do oznake 70 %-tnim metanolom. Tako dobiveni ekstrakt se čuvao na -18 °C (Adamson i sur., 1999). Prije injektiranja u HPLC uređaj, ekstrakt je profiltriran kroz membranski filter promjera 0,45 μm.

Parametri analize

Kao pokretna faza su korišteni metanol, čistoće ≥ 99,9 % (J.T.Baker, Nizozemska) i 1 %-tna mravlja kiselina, čistoće 98 - 100 % (Scharlau Chemie, Španjolska). S obzirom da je primjenjeno gradijentno eluiranje udjeli otapala su se mijenjali prema prikazu u **Tablici 5**. Volumen injektiranja uzorka je iznosio 20 μl, protok pokretne faze podešen je na 0,8 ml min^{-1}, a temperatura kolone i detektora na 30 °C. Snimanje spektra je provedeno u rasponu valnih duljina od 200 do 400 nm, dok je detekcija komponenti izvršena na valnoj duljini od 278 nm.

Tablica 5 Uvjeti gradijentnog eluiranja

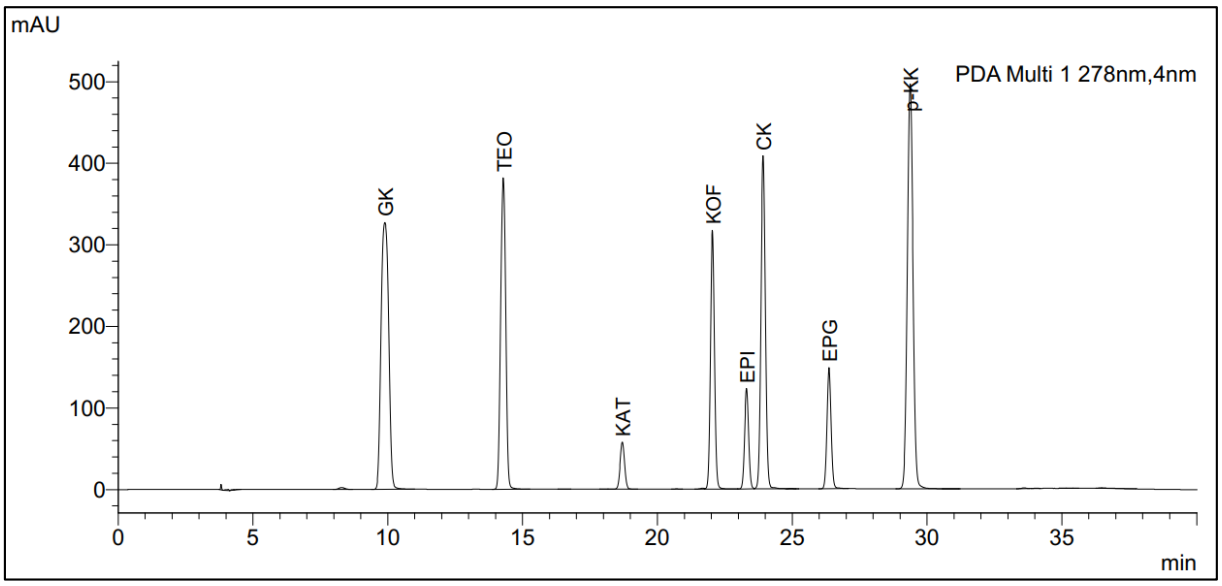
Vrijeme analize (min)	Udio metanola (%)
0	10
15	32
25	40
20	40
30	60
35	10

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

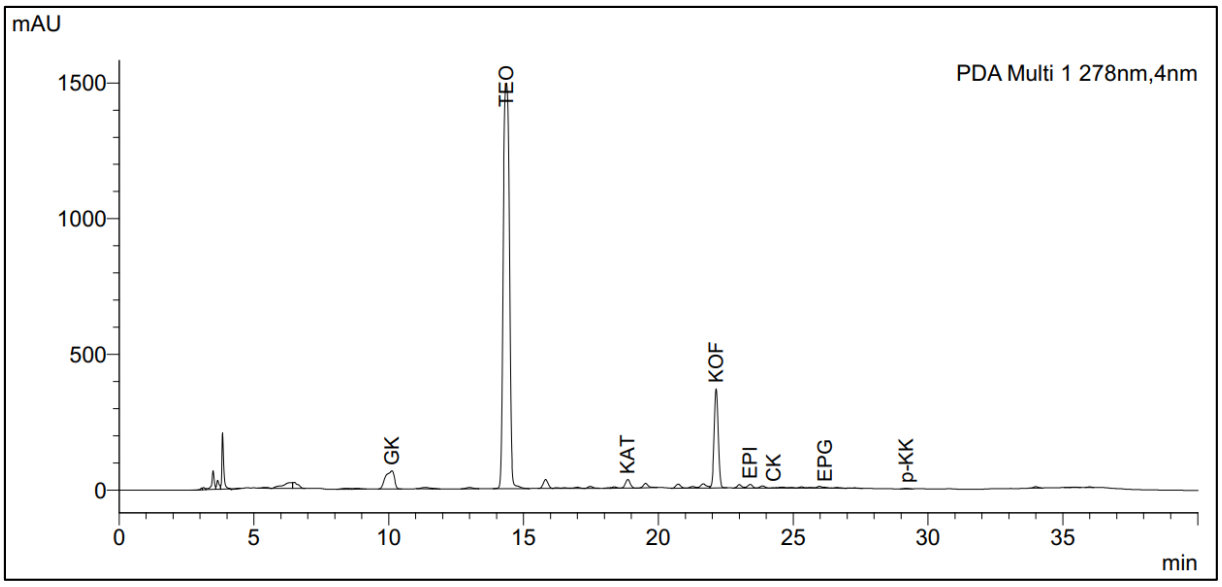
Za određivanje ukupnih fenolnih komponenti u uzorcima upotrijebljena je kolorimetrijska metoda prema Singleton i sur. (1999). Za pripremu uzoraka je korišten metanolni ekstrakt koji je pripremljen za HPLC analizu. Nakon što je temperiran na sobnu temperaturu i homogeniziran, 100 µl je preneseno u odmjernu tikvicu od 10 ml te je dodano 6 ml vode i 500 µl nerazrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa (Kemika, Hrvatska). Sve zajedno je promiješano mućkanjem. U šestoj minuti od dodatka reagensa je dodano 1,5 ml prethodno pripremljene otopine 20 %-tnog natrijevog karbonata (p.a. čistoće), te je na kraju tikvica nadopunjena vodom do oznake. Tako pripremljeni uzorci su ostavljeni dva sata u tamnom na sobnoj temperaturi. Uz uzorke je priređena i slijepa proba. Mjerenje je vršeno na spektrofotometru UV-1800 proizvođača Shimadzu, na valnoj duljini koja je iznosila 760 nm.

Za kvantifikaciju komponenti je izrađena kalibracijska krivulja. Kao standard je korištena galna kiselina (Sigma-Aldrich, SAD), a koncentracijski raspon se kretao od 0,02 do 0,5 mg ml^{-1} galne kiseline.

4. REZULTATI



Slika 7 Kromatogram standarda ispitivanih bioaktivnih komponenti pri 278 nm (GK, galna kiselina; TEO, teobromin; KAT, (+)-katehin; KOF, kofein; EPI, (-)-epikatehin; CK, kava kiselina; EPG, (-)-epikatehin galat; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina)



Slika 8 Kromatogram ekstrakta netretirane kakaove ljuske pri 278 nm (GK, galna kiselina; TEO, teobromin; KAT, (+)-katehin; KOF, kofein; EPI, (-)-epikatehin; CK, kava kiselina; EPG, (-)-epikatehin galat; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina)

Tablica 6 Ponovljivost pripreme otopina

Komponenta	Ekstrakt kakaove ljuske			Srednja vrijednost	Standardno odstupanje
	1	2	3		
GK (mg ml^{-1})	0,009	0,006	0,010	0,008	0,002
EPI (mg ml^{-1})	0,010	0,005	0,006	0,007	0,003
KAT (mg ml^{-1})	0,015	0,011	0,017	0,014	0,003
EPG (mg ml^{-1})	0,001	0,001	0,001	0,001	0
TEO (mg ml^{-1})	0,470	0,320	0,458	0,416	0,083
KOF (mg ml^{-1})	0,054	0,035	0,054	0,048	0,011
CK (mg ml^{-1})	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
***p*-KK (mg ml^{-1})**	n.d.	n.d.	n.d.	-	-

n.d.-nije detektiran
GK, galna kiselina; EPI, (-)-epikatehin; KAT, (+)-katehin; EPG, (-)-epikatehin galat; TEO, teobromin; KOF, kofein, CK, kava kiselina; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina

Tablica 7 Ponovljivost mjerenja

Komponenta	Ekstrakt kakaove ljuske					Srednja vrijednost	Standardno odstupanje
	1	2	3	4	5		
GK (mg ml^{-1})	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0
EPI (mg ml^{-1})	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0
KAT (mg ml^{-1})	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0
EPG (mg ml^{-1})	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
TEO (mg ml^{-1})	0,632	0,640	0,641	0,642	0,642	0,639	0,004
KOF (mg ml^{-1})	0,069	0,068	0,068	0,068	0,068	0,068	0
CK (mg ml^{-1})	0,001	0,001	0	0	0	0	0
***p*-KK (mg ml^{-1})**	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0

GK, galna kiselina; EPI, (-)-epikatehin; KAT, (+)-katehin; EPG, (-)-epikatehin galat; TEO, teobromin; KOF, kofein, CK, kava kiselina; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina

Tablica 8 Istinitost metode

Komponenta	Izmjerena vrijednost (mg ml^{-1})	Očekivana vrijednost (mg ml^{-1})	Iskorištenje (%)
GK	0,044	0,044	100
EPI	0,041	0,040	103
KAT	0,033	0,033	100
EPG	0,019	0,018	106
TEO	0,409	0,388	105
KOF	0,073	0,073	100
CK	0,034	0,034	100
***p*-KK**	0,036	0,034	106

GK, galna kiselina; EPI, (-)-epikatehin; KAT, (+)-katehin; EPG, (-)-epikatehin galat; TEO, teobromin; KOF, kofein; CK, kava kiselina; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina

Tablica 9 Srednje vrijednosti i standardna odstupanja (SO) mjerenja analiziranih fenolnih kiselina (GK, galna kiselina; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina; CK-kava kiselina) s obzirom na različite tretmane kakaove ljuske

Uzorak*	GK		*p*-KK		CK	
	Srednja vrijednost	SO	Srednja vrijednost	SO	Srednja vrijednost	SO
	mg g^{-1}		mg g^{-1}		mg g^{-1}	
NU**	0,147	0,041	0,017	0,002	0,004	0,001
6 g/15 min	0,011	0,002	n.d.	-	n.d.	-
6 g/30 min	0,009	0,002	n.d.	-	n.d.	-
6 g/45 min	0,004	0,001	n.d.	-	n.d.	-
6 g/15 min/40 Hz	0,021	0,002	0,008	0,007	n.d.	-
6 g/30 min/40 Hz	0,014	0,001	n.d.	-	n.d.	-
6 g/45 min/40 Hz	0,008	0,003	n.d.	-	n.d.	-
6 g/15 min/80 Hz	0,015	0,005	n.d.	-	n.d.	-
6 g/30 min/80 Hz	0,010	0,002	n.d.	-	n.d.	-
6 g/45 min/80 Hz	0,007	0	n.d.	-	n.d.	-
12 g/15 min	0,027	0,003	0,014	0,001	n.d.	-
12 g/30 min	0,015	0	n.d.	-	n.d.	-
12 g/45 min	0,021	0,001	0,013	0	n.d.	-
12 g/15 min/40 Hz	0,022	0	0,013	0	n.d.	-
12 g/30 min/40 Hz	0,020	0	0,013	0	n.d.	-
12 g/45 min/40 Hz	0,010	0,002	n.d.	-	n.d.	-
12 g/15 min/80 Hz	0,027	0	0,014	0	n.d.	-
12 g/30 min/80 Hz	0,009	0,001	n.d.	-	n.d.	-
12 g/45 min/80 Hz	0,011	0	n.d.	-	n.d.	-

n.d.-nije detektiran

*Količina kakaove ljuske u 400 ml vode/vrijeme tretiranja/frekvencija plazme

**Netretirani uzorak kakaove ljuske

Tablica 10 Srednje vrijednosti i standardna odstupanja (SO) mjerenja analiziranih katehina (KAT, (+)-katehin; EPI, (-)-epikatehin; EPG, (-)-epikatehin galat) s obzirom na različite tretmane kakaove ljuske

Uzorak*	KAT		EPI		EPG	
	Srednja vrijednost	SO	Srednja vrijednost	SO	Srednja vrijednost	SO
	mg g^{-1}		mg g^{-1}		mg g^{-1}	
NU**	0,290	0,005	0,165	0,099	0,009	0
6 g/15 min	0,026	0,009	0,037	0,004	0,004	0,001
6 g/30 min	0,030	0,005	0,033	0,003	0,004	0,001
6 g/45 min	0,017	0,002	0,029	0,002	0,003	0
6 g/15 min/40 Hz	0,054	0,003	0,074	0,003	0,008	0
6 g/30 min/40 Hz	0,058	0,003	0,055	0,002	0,006	0
6 g/45 min/40 Hz	0,036	0,005	0,041	0,006	0,004	0
6 g/15 min/80 Hz	0,048	0,014	0,059	0,012	0,006	0,001
6 g/30 min/80 Hz	0,045	0,005	0,049	0,004	0,006	0,001
6 g/45 min/80 Hz	0,030	0	0,042	0,001	0,004	0
12 g/15 min	0,077	0,006	0,004	0	0,006	0,001
12 g/30 min	0,053	0	0,043	0	0,005	0
12 g/45 min	0,074	0,001	0,054	0,001	0,006	0
12 g/15 min/40 Hz	0,064	0,001	0,074	0,001	0,007	0
12 g/30 min/40 Hz	0,065	0,001	0,074	0,001	0,006	0
12 g/45 min/40 Hz	0,037	0,002	0,051	0,003	0,004	0
12 g/15 min/80 Hz	0,044	0,001	0,085	0	0,007	0
12 g/30 min/80 Hz	0,037	0,001	0,051	0,001	0,005	0
12 g/45 min/80 Hz	0,039	0,002	0,050	0,002	0,005	0

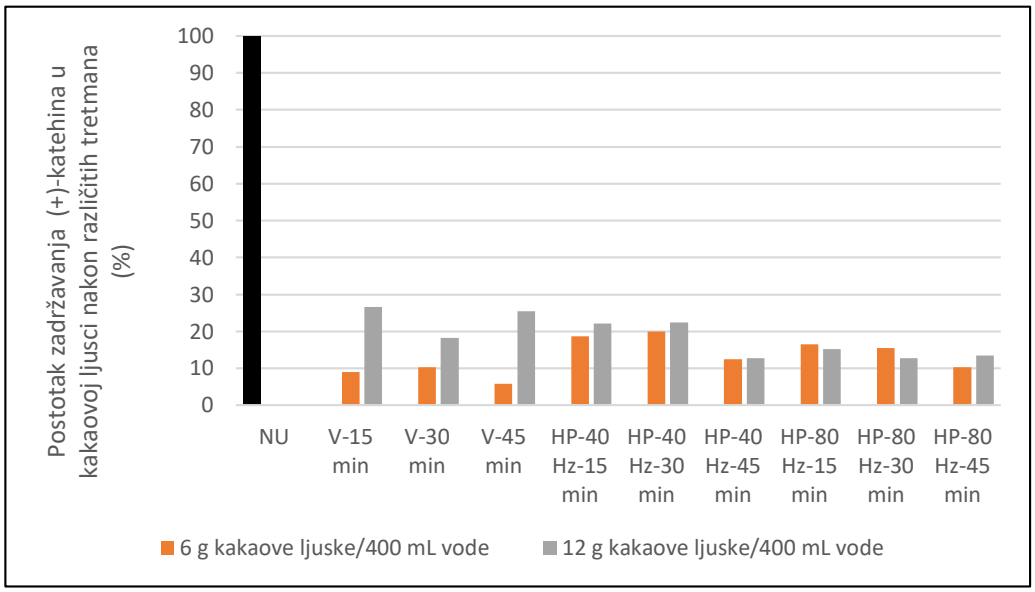
*Količina kakaove ljuske u 400 ml vode/vrijeme tretiranja/frekvencija plazme

**Netretirani uzorak kakaove ljuske

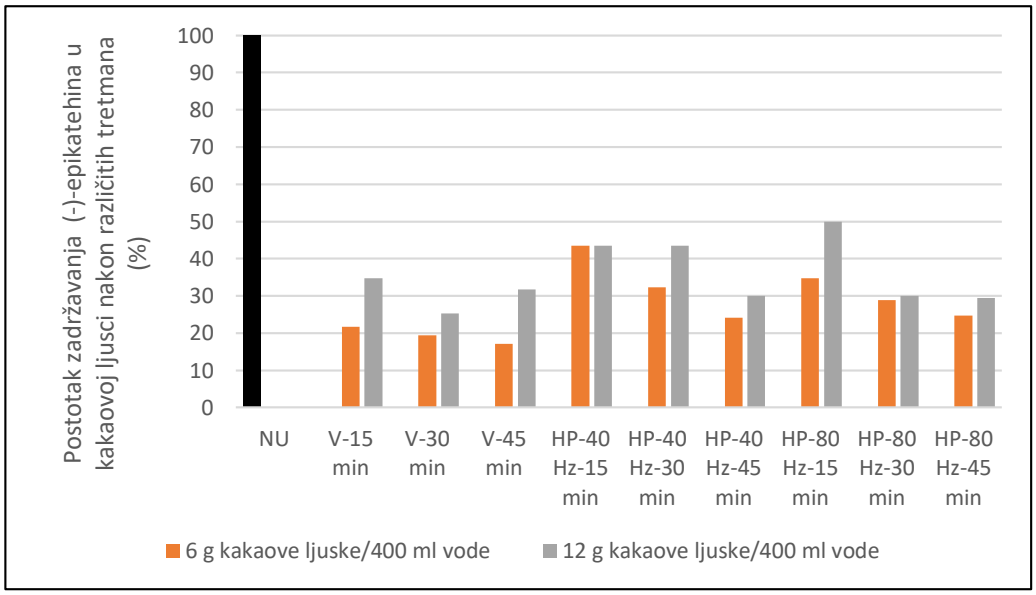
Tablica 11 Srednje vrijednosti i standardna odstupanja (SO) mjerenja analiziranih metilksantina (teobromin-TEO i kofein-KOF) s obzirom na različite tretmane kakaove ljuske

Uzorak*	TEO		KOF	
	Srednja vrijednost	SO	Srednja vrijednost	SO
	mg g^{-1}		mg g^{-1}	
NU**	3,906	0,070	0,646	0,055
6 g/15 min	2,335	0,721	0,296	0,066
6 g/30 min	1,832	0,195	0,253	0,027
6 g/45 min	1,334	0,161	0,184	0,023
6 g/15 min/40 Hz	3,008	0,109	0,462	0,024
6 g/30 min/40 Hz	2,481	0,089	0,364	0,019
6 g/45 min/40 Hz	1,868	0,323	0,271	0,053
6 g/15 min/80 Hz	2,547	0,389	0,366	0,068
6 g/30 min/80 Hz	2,122	0,224	0,297	0,036
6 g/45 min/80 Hz	1,813	0,022	0,234	0,007
12 g/15 min	2,739	0,185	0,388	0,035
12 g/30 min	2,209	0,020	0,287	0,005
12 g/45 min	2,933	0,051	0,434	0,006
12 g/15 min/40 Hz	2,832	0,017	0,439	0,009
12 g/30 min/40 Hz	2,974	0,031	0,467	0,003
12 g/45 min/40 Hz	2,032	0,124	0,283	0,024
12 g/15 min/80 Hz	3,283	0,020	0,549	0,002
12 g/30 min/80 Hz	1,928	0,060	0,248	0,011
12 g/45 min/80 Hz	2,036	0,081	0,258	0,008

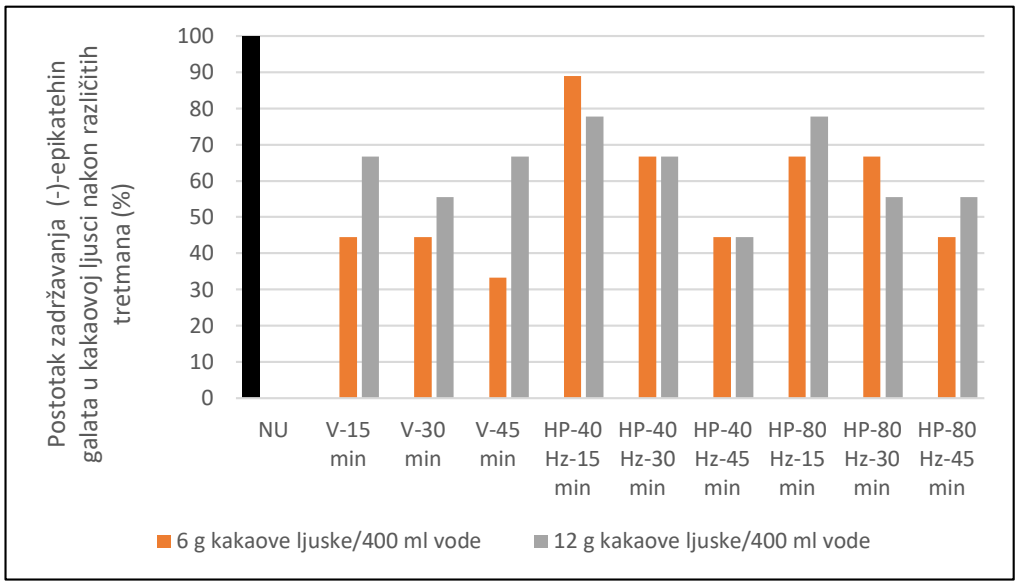
*Količina kakaove ljuske u 400 ml vode/vrijeme tretiranja/frekvencija plazme
**Netretirani uzorak kakaove ljuske



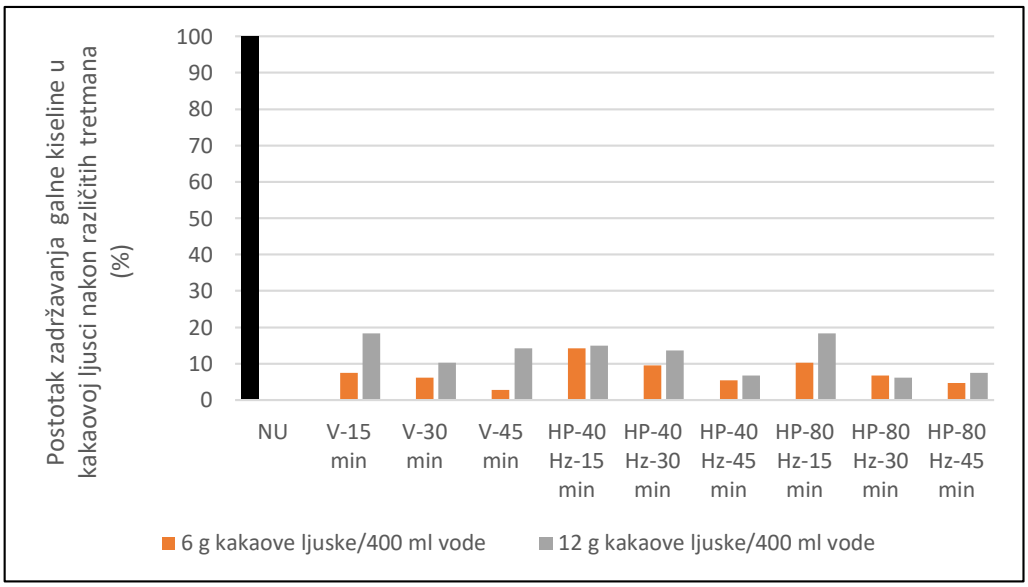
Slika 9 Zadržavanje (+)-katehina u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)



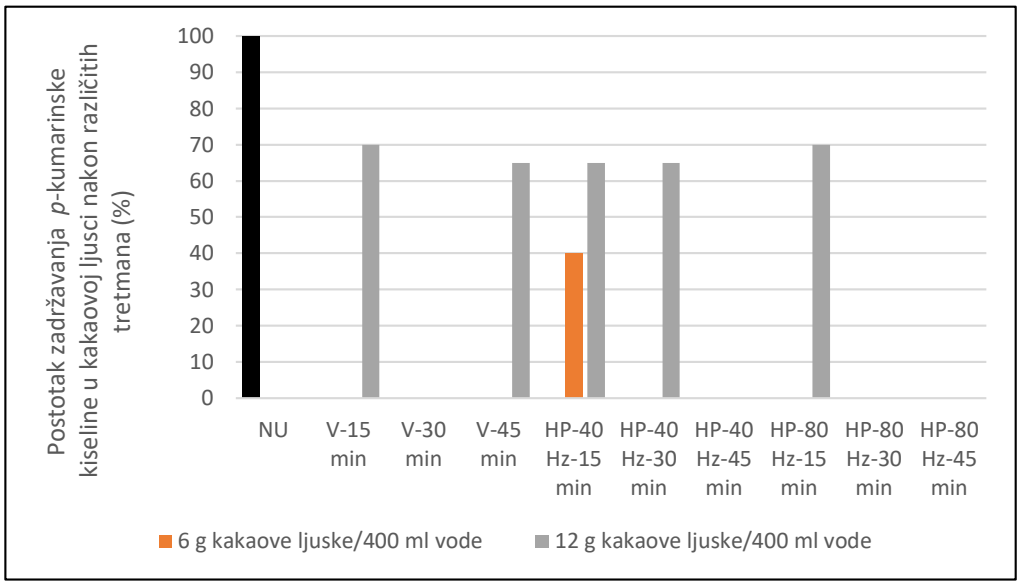
Slika 10 Zadržavanje (-)-epikatehina u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)



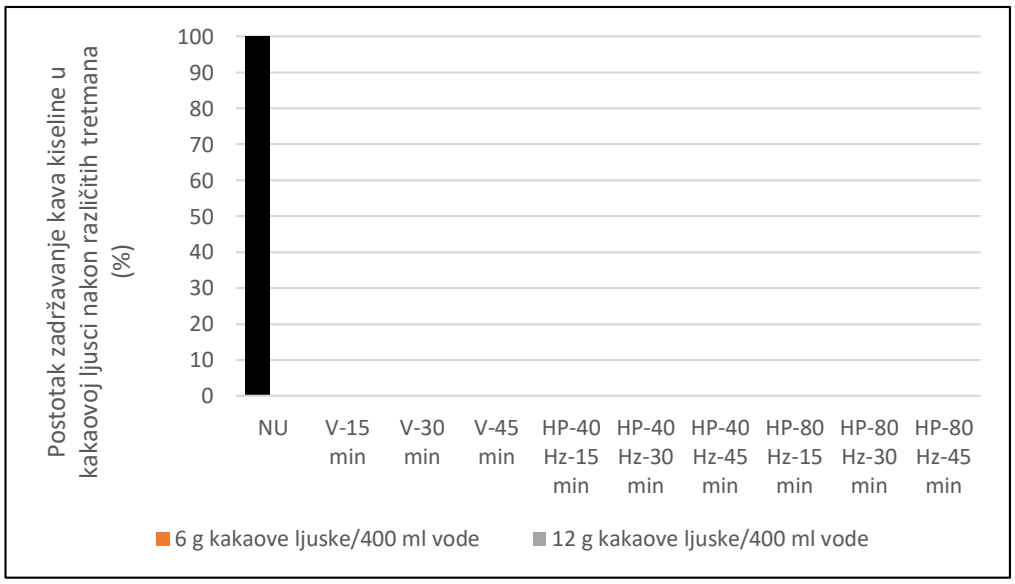
Slika 11 Zadržavanje (-)-epikatehin galata u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)



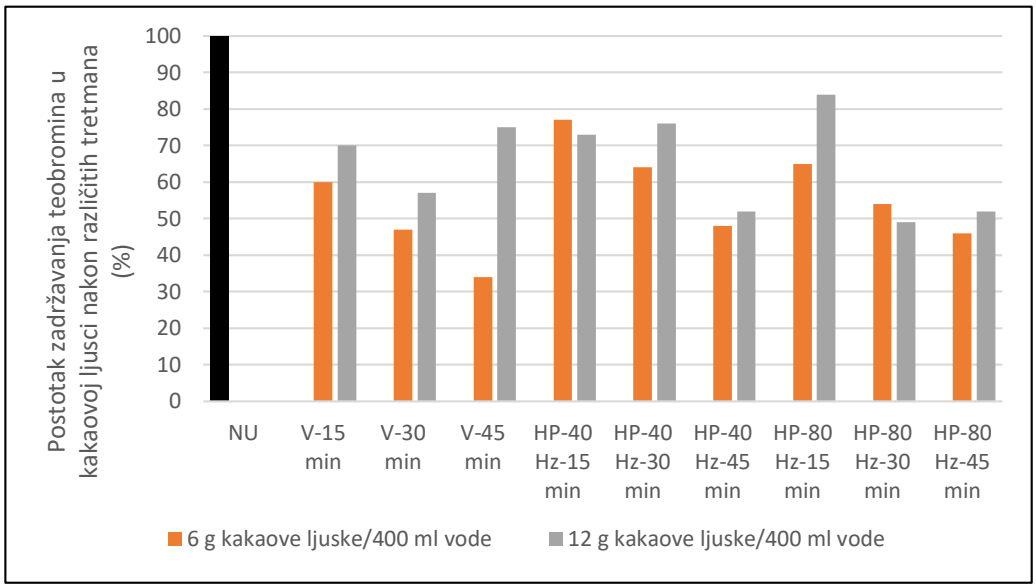
Slika 12 Zadržavanje galne kiseline u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)



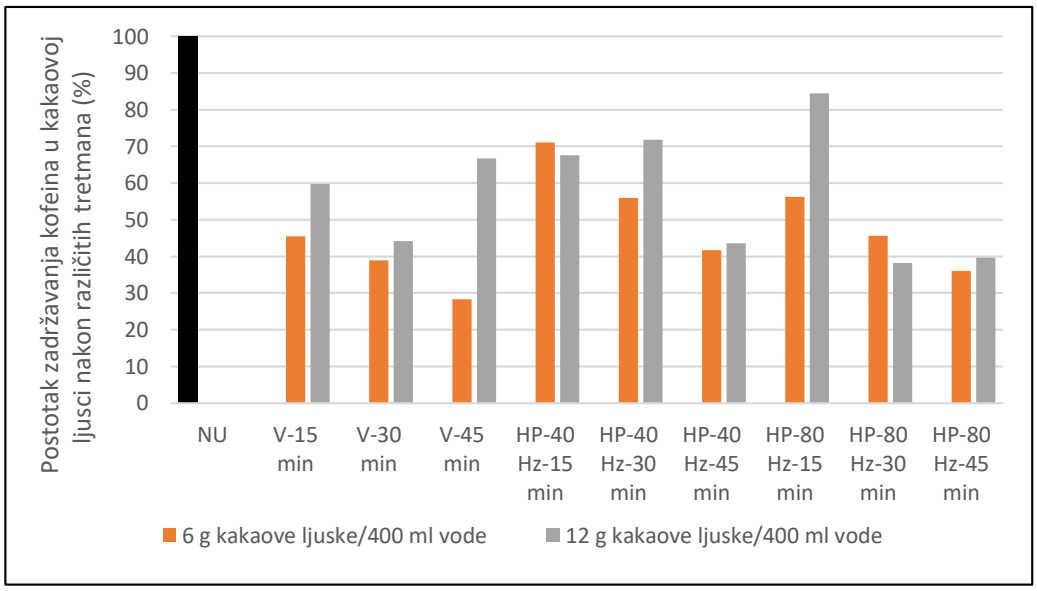
Slika 13 Zadržavanje *p*-kumarinske kiseline u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)



Slika 14 Zadržavanje kava kiseline u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)



Slika 15 Zadržavanje teobromina u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)

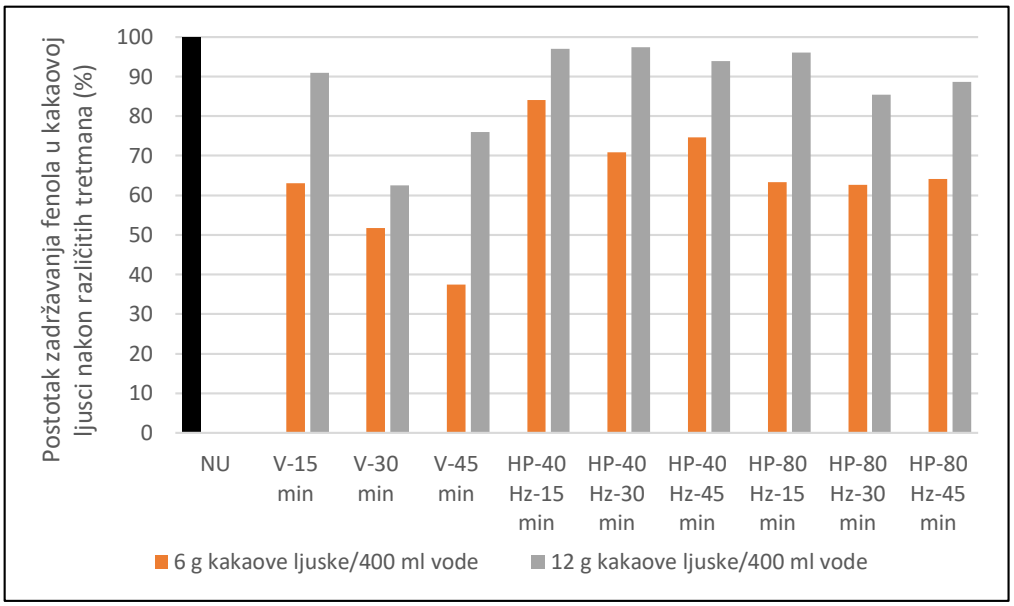


Slika 16 Zadržavanje kofeina u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)

Tablica 12 Srednje vrijednosti i standardna odstupanja (SO) mjerenja ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom s obzirom na različite tretmane kakaove ljuske

Uzorak*	Ukupni fenoli	
	Srednja vrijednost	SO
	mg GAE g^{-1}	
NU**	28,89	2,31
6 g/15 min	18,21	5,06
6 g/30 min	14,93	0,93
6 g/45 min	10,81	0,64
6 g/15 min/40 Hz	24,27	2,47
6 g/30 min/40 Hz	20,48	1,73
6 g/45 min/40 Hz	21,55	2,68
6 g/15 min/80 Hz	18,30	1,34
6 g/30 min/80 Hz	18,08	2,63
6 g/45 min/80 Hz	18,52	1,62
12 g/15 min	26,27	2,60
12 g/30 min	18,06	1,66
12 g/45 min	21,95	1,44
12 g/15 min/40 Hz	28,02	0,21
12 g/30 min/40 Hz	28,15	0,28
12 g/45 min/40 Hz	27,12	0,06
12 g/15 min/80 Hz	27,76	2,52
12 g/30 min/80 Hz	24,67	0,70
12 g/45 min/80 Hz	25,60	2,19

*Količina kakaove ljuske u 400 ml vode/vrijeme tretiranja/frekvencija plazme
**Netretirani uzorak



Slika 17 Zadržavanje ukupnih fenola u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom (NU)

5. RASPRAVA

Prema zadatku rada utvrđen je profil bioaktivnih komponenata u netretiranom uzorku kakaove ljuske te uzorcima podvrgnutim različitim tretmanima hladnom plazmom. Kromatografskom analizom na HPLC uređaju koja je prethodno validirana je određeno šest fenolnih komponenti te dva metilksantina, dok je spektrofotometrijskom metodom izmjeren ukupni udio fenola.

Identifikacija fenolnih komponenti i metilksantina HPLC metodom je izvršena na temelju usporedbe vremena zadržavanja komponenti uzoraka kakaove ljuske s vremenima zadržavanja standarda koji su ustanovljeni pod istim radnim uvjetima. **Slika 7** prikazuje kromatogram otopine sljedećih standarda: galne kiseline (GK), teobromina (TEO), (+)-katehina (KAT), kofeina (KOF), (-)-epikatehina (EPI), kava kiseline (CK), (-)-epikatehin galata (EPG) i *p*-kumarinske kiseline (*p*-KK) koji su snimljeni na 278 nm. Na **Slici 8** se nalazi prikaz kromatograma uzorka kakaove ljuske koji nije tretiran vodom, niti hladnom plazmom snimljen na istoj valnoj duljini.

Pri razvoju kromatografske metode bilo je potrebno izvršiti validaciju kako bi se provjerila prikladnost metode za predviđenu upotrebu. Pritom su određene sljedeće izvedbene značajke: linearnost, preciznost i istinitost. Linearnost metode je provjerena promatranjem rezultata mjerenja različitih koncentracija priređenih standarda. Preciznost metode je ispitana preko ponovljivosti pripreme otopina i ponovljivosti mjerenja. Prema podacima prikazanim u **Tablici 6** odnosno srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima rezultata mjerenja tri otopine istog uzorka ljuske pripremljene na isti način se može zaključiti kako je za zadovoljavanje postavljenih kriterija validacije metode bilo potrebno napraviti minimalno tri ekstrakcije svakog uzorka kakaove ljuske za HPLC analizu. Ponovljivost mjerenja je ispitana višestrukim injektiranjem iste otopine ekstrakta kakaove ljuske čiji su rezultati prikazani u **Tablici 7**. Obradom rezultata je zaključeno da se jednim injektiranjem uzorka zadovoljavaju postavljeni uvjeti analize. Istinitost metode je određena računanjem iskorištenja (%) pri čemu je analizirana otopina ljuske te otopina obogaćena mješavinom standarda u omjeru 1:1. U **Tablici 8** se nalazi prikaz rezultata iz kojih se može vidjeti kako većina vrijednosti iskorištenja iznosi 100 %, te kako se ostale nalaze u prihvatljivim granicama.

Za kromatografsku analizu na HPLC uređaju su pripremljene po 3 ekstrakcije za svaki od ukupno 19 uzoraka. **Tablice 9 i 10** prikazuju srednje vrijednosti tri mjerenja fenolnih

komponenti u netretiranom uzorku (NU) kakaove ljuske kao i u uzorcima koji su podvrgnuti različitim tretmanima (primjena hladne plazme različite frekvencije te različito vremensko trajanje tretmana) uz količine kakaove ljuske koje su se nalazile u 400 ml vode. Promatrajući netretirani uzorak, (+)-katehin (KAT) se pokazao kao najzastupljenija komponenta s koncentracijom u iznosu od 0,290 mg g^{-1} (**Tablica 10**), a slijedi ga (-)-epikatehin (EPI) i galna kiselina (GK) s 0,165 (**Tablica 10**) i 0,147 mg g^{-1} (**Tablica 9**). Hernández-Hernández i sur. (2017) su u rezultatima svoga istraživanja metanolno-vodenog ekstrakta dobili nešto veći sadržaj epikatehina (17,7 mg g^{-1} suhog i odmašćenog uzorka) u usporedbi s katehinom (1,2 mg g^{-1}). Iako su u oba istraživanja analizirani uzorci prošli proces fermentacije, u ovom istraživanju je ljuska podvrgnuta i prženju zbog čega može doći do promjena u kemijskom sastavu. Upravo prženje može uzrokovati povećanje koncentracije (+)-katehina i to na račun (-)-epikatehina koji se izomerizira (Abbe i Amin, 2008), a razlika postoji i u pripremi uzorka te parametrima analize stoga su rezultati samo djelomično usporedivi. Tretirani uzorci su s obzirom na masu kakaove ljuske u vodi podijeljeni u dvije skupine. U obje skupine je vidljiv sličan trend s obzirom na zastupljenost komponenti. Za razliku od netretirane kakaove ljuske u većini uzoraka je (-)-epikatehin najzastupljenija komponenta, a slijedi ga (+)-katehin. Također je u obje skupine primijećeno da tretman hladnom plazmom frekvencije 40 Hz u većini slučajeva ima manji utjecaj na gubitak fenolnih komponenti u odnosu na uzorke tretirane samo miješanjem u vodi te uzorke podvrgnute hladnoj plazmi frekvencije 80 Hz, međutim za potvrđivanje takvih tvrdnji je potrebno provesti opsežnije istraživanje. Isto tako je bitno napomenuti da je u analizu uključena i kava kiselina koja je pronađena samo u netretiranom uzorku u koncentraciji 0,004 mg g^{-1} (**Tablica 9**) što se slaže s rezultatima analize koju su proveli Hernández-Hernández i sur. (2017).

U **Tablici 11** se nalaze podaci o srednjoj vrijednosti s pripadajućim standardnim odstupanjima udjela teobromina i kofeina HPLC metodom. Rezultati analize ukazuju da je teobromin najzastupljeniji metilksantin u kakaovoj ljusci (3,906 ± 0,070 mg g^{-1}) što je u skladu sa literaturnim podacima (Bonvehí i Jordà, 1998.; Hartati, 2010). Prema Adamafiu (2013) udio teobromina u kakaovoj ljusci se najčešće kreće od 5 do 21 g kg^{-1}, a toliki raspon može biti objašnjen razlikama u podrijetlu, procesu fermentacije ali i drugim procesima poput prženja koje može značajno utjecati na njegov udio. Sljedeći metilksantin prema zastupljenosti u kakaovoj ljusci je kofein (Bonvehí i Jordà, 1998), a u ovom istraživanju utvrđena je prosječna

količina od 0,646 mg g^{-1}. Promatrajući rezultate analize se može zaključiti da tretiranje kakaove ljuske hladom plazmom i vodom utječe na smanjenje udjela teobromina i kofeina. Međutim kako bi se donijeli podrobniji zaključci o utjecaju hladne plazme na udio metilksantina u ljusci potrebno je provesti opsežnija istraživanja s većim brojem uzoraka.

Slike 9 – 13 prikazuju postotak zadržavanja pojedinih polifenolnih komponenti s obzirom na tretman kakaove ljuske. Uspoređujući zadržavanje (+)-katehina u tretiranim uzorcima s netretiranim uzorkom može se doći do zaključka da svi tretmani utječu na gubitak komponente. U većini slučajeva je veće zadržavanje u uzorcima koji su pri tretmanu sadržavali 12 g kakaove ljuske u 400 ml vode uz iznimke tretmana hladom plazmom frekvencije 80 Hz u trajanju od 15 i 30 minuta koja pokazuju veće zadržavanje u uzorcima sa 6 g kakaove ljuske u 400 ml vode. Za razliku od većine drugih komponenti (+)-katehin pokazuje svojstva većeg zadržavanja u vodi nego pri tretmanima plazmom što je vidljivo iz **Slike 9**. Promatrajući zadržavanje (-)-epikatehina vidljivo je kako je nakon svih tretmana veće zadržavanje u uzorcima koji su sadržavali 12 g kakaove ljuske u 400 ml vode, a najmanji gubitak od 50 % je zabilježen pri tretmanu hladnom plazmom frekvencije 80 Hz u trajanju od 15 min, dok su najveći gubitci primijećeni u uzorcima od 6 g koji su izloženi samo vodenom mediju (**Slika 10**). Najveću stabilnost u usporedbi s ostalim komponentama pokazuje (-)-epikatehin galat, najveće zadržavanje primijećeno je nakon tretmana hladnom plazmom frekvencije 40 Hz u trajanju od 15 minuta, kako kod uzoraka koji su sadržavali 6 g (postotak zadržavanja 89 %) tako i kod uzoraka koji su sadržavali 12 g kakaove ljuske (postotak zadržavanja 78 %) što je vidljivo na **Slici 11**. Ono što je zabrinjavajuće je činjenica da najzastupljenije komponente netretiranog uzorka pokazuju slabu stabilnost tj. zadržavanje pri svim tretmanima. Kod već prethodno spomenutog (+)-katehina je postotak zadržavanja u svim slučajevima niži od 30 % (**Slika 9**), a postotak zadržavanja galne kiseline je niži od 20 % što je prikazano na **Slici 12**. Tretmani na uzorcima od 12 g kakaove ljuske imaju manji utjecaj na gubitke galne kiseline za razliku od tretmana provedenih na uzorcima od 6 g, a takav trend je primijećen i kod (+)-katehina. Na **Slici 13** kod uzoraka koji su sadržavali 6 g kakaove ljuske je vidljivo 40 %-tno zadržavanje *p*-kumarinske kiseline nakon tretmana hladnom plazmom frekvencije 40 Hz u trajanju od 15 min. Nakon drugih tretmana na uzorcima od 6 g *p*-kumarinsku kiselinu nije bilo moguće odrediti jer su vrijednosti bile ispod limita detekcije. Kod uzoraka koji su sadržavali 12 g kakaove ljuske primijećeno je zadržavanje *p*-kumarinske kiseline nakon tretmana u vodi (15 i 45 minuta) te

tretmana plazmom frekvencije 40 Hz (15 i 30 min) i 80 Hz (15 min) pritom nisu uočene velike razlike, postotak zadržavanja se kretao od 65 do 70 %. Budući da udio kava kiseline nije detektiran niti u jednom uzorku koji je podvrgnut tretmanu jer su vrijednosti bile ispod limita detekcije, ne može se procijeniti niti postotak njezinog zadržavanja (**Slika 14)**.

Slike 15 i 16 prikazuju zadržavanje metilksantina u kakaovoj ljusci s obzirom na različite tretmane u usporedbi s netretiranim uzorkom izražene u postotcima. Teobromin i kofein pokazuju nešto veću stabilnost od fenolnih komponenti, a najveći postotak njihovog zadržavanja je nakon tretmana hladnom plazmom frekvencije 80 Hz u trajanju od 15 min (84 % za obje komponente). Kod uzoraka koji su sadržavali 6 g kakaove ljuske je zamijećeno smanjenje koncentracije metilksantina s povećanjem vremena trajanja tretmana, dok je kod uzoraka koji su sadržavali 12 g kakaove ljuske koji su se nalazili u vodi i nisu bili podvrgnuti tretmanu hladnom plazmom najveće zadržavanje postignuto kod najduljeg vremenskog trajanja (45 min).

Spektrofotometrijskom metodom je određen ukupni udio fenolnih komponenti u netretiranom uzorku te uzorcima koji su prošli određene tretmane kako je istaknuto u **Tablici 12**. Rezultati su dobiveni na temelju mjerenja istih metanolnih ekstrakata koji su korišteni za HPLC analizu. Iskazane srednje vrijednosti i pripadajuća standardna odstupanja su iskazana na temelju tri mjerenja. U netretiranom uzorku je izmjereno 28,89 ± 2,313 mg GAE g^{-1} što se slaže s rezultatima istraživanja provedenog od strane Karima i sur. (2014) koji su ustanovili da se koncentracije kreću od 16,3 ± 1,04 pa sve do 41,35 ± 2,23 mg GAE g^{-1} ovisno o podrijetlu kakaovca tj. okolišnim čimbenicima kojima su tijekom rasta biljke bile izložene. Martínez i sur. (2012) su ustanovili kako uzorak dobiven ekstrakcijom metanolom i acetonom u kombinaciji pokazuje veću sposobnost otapanja fenolnih komponenti (15,44 mg GAE g^{-1}) od etanolnog ekstrakta (8,02 mg GAE g^{-1}), u skladu s time je u ovom radu ekstrakcija napravljena sa 70 %-tnom otopinom metanola u vodi. Zbog najveće sličnosti u postupcima pripreme uzoraka (ekstrakcija s 80%-tnim metanolom) te parametrima analize rezultati ovoga rada se najbolje mogu usporediti s podacima koje su dobili Nsor-Atindana i sur. (2012) koji govore da se ukupno u kakaovoj ljusci nalazi 25,15 mg GAE g^{-1}. Promatrajući **Sliku 17** koja grafički prikazuje postotak zadržavanja ukupnih fenolnih komponenti u kakaovoj ljusci nakon različitih tretmana u usporedbi s netretiranim uzorkom može se zaključiti kako je najbolje zadržavanje tijekom tretmana hladom plazmom frekvencije 40 Hz u obje skupine uzoraka (6 i 12 g), a slijedi ju

tretman na 80 Hz. Ovakvi rezultati se podudaraju sa zaključcima iznesenim u istraživanju koje su proveli Pankaj i sur. (2017). Naime, navedeni autori su ustanovili da se tretmanom hladnom plazmom smanjuje udio fenolnih komponenti u soku od bijelog grožđa.

Fenomen većeg zadržavanja fenolnih komponenti pri tretmanu hladnom plazmom za razliku od uzoraka koji su bili samo u vodi može biti objašnjen remećenjem funkcije stanične membrane tj. depolimerizacijom polisaharida stanične stijenke utjecajem reaktivnih vrsta kisika generiranih plazmom prilikom čega može doći do oslobađanja fenolnih komponenti smještenih u vakuoli (Sarangapani i sur., 2017). Postoje brojna istraživanja koja govore u prilog očuvanja ili čak povećanja koncentracije fenola nakon tretiranja hladnom plazmom, međutim većina njih se odnosi na kraće vrijeme trajanja tretmana s čijim povećanjem dolazi do gubitaka. Osim toga utjecaj plazme ovisi i o drugim parametrima procesiranja tj. uvjetima pod kojima je tretman proveden počevši od načina na koji je plazma generirana te medija u kojem se proces provodi. Stoga je potrebno uzeti u obzir sve te parametre te ih optimirati i kontrolirati kako bi se umanjio negativni utjecaj plazme na funkcionalne komonente što bi u budućnosti moglo biti omogućeno provođenjem dodatnih istraživanja (Muhammad i sur., 2018).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Određivanjem izvedbenih značajki utvrđeno je da je kromatografska metoda identifikacije i kvantifikacije ispitivanih bioaktivnih komponenti prikladna namjeni.
- Najzastupljenija fenolna komponenta u netretiranom uzorku kakaove ljuske je (+)-katehin, a slijede ga (-)-epikatehin i galna kiselina, dok je teobromin najzastupljeniji metilksantin.
- Netretirani uzorak kakaove ljuske u usporedbi s tretiranim uzorcima ima veće koncentracije pojedinačnih fenola i metilksantina određenih HPLC metodom te ukupnih fenola određenih spektrofotometrijskom analizom.
- Primjena hladne plazme utječe na promjene koncentracije pojedinih fenolnih komponenti, metilksantina i ukupnih fenola pritom su promjene izraženije u uzorcima koji su sadržavali 6 g u usporedbi s 12 g kakaove ljuske u 400 ml vode.
- Tretiranje kakaove ljuske vodom ima veći utjecaj na gubitak bioaktivnih komponenti od tretmana hladnom plazmom u vodi.

7. LITERATURA

Abbe MMJ, Amin I: Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health?. *Molecules,* 13:2190-2219, 2008.

Adamafio NA: Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview. *Journal of Biological Sciences*, 13:50-576, 2013.

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH: HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:4184-4188, 1999.

Adeyina AO, Apata DF, Annongu AA, Olatunde OA, Alli OI, Okupke KM: Performance and Physiological Response of Weaner Rabbits Fed Hot Water Treated Cocoa Bean Shell Based Diet. *Research Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 5:53-57, 2010.

Afoakwa EO, Quao J, Takrama J, Budu AS, Saalia FK: 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.

Amin I, Chew LY: Antioxidative Effects of Exctracts 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.

Amini M, Ghoranneviss M: Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. *LWT - Food Science and Technology,* 73:178-184, 2016.

Andreeva EY, Dmitrienko SG, Zolotov YA: M*ethylxanthines: properties and determination in various objects. Russian Chemical Reviews,* 81(5):397-414, 2012.

Aregheore EM: Chemical evaluation and digestibility of cocoa (*Theobroma cacao*) by-products 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. *Journal Food Science,* 66(5):653-656, 2001.

Awarikabey E, Amponsah IK, Woode MY: 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.

Beckett ST: Industrial chocolate manufacture and use: Fourth edition, Blackwell Publishing, New York, 2009.

Belščak A, Komes D, Horžić D, Kovačević Ganić K, Karlović D: Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International,* 42:707-716, 2009.

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.

Bonvehí JS, Jordà RE: Constituents of Cocoa Husks. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 53(9):785-792, 1998.

Del Carlo M, Mascini M: Comparison among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48(4):1197-1203, 2000.

Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT: Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology,* 49(3):255-266, 2012.

DZNM, Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo: *Pravilnik o temeljnim zahtjevima za kakao-proizvode, proizvode slične čokoladi, krem-proizvode i bombonske proizvode*. Narodne novine 90/1996, 1996.

El-Saied HM, Morsi MK, Amer MMA: Composition of cocoa shell fat related to cocoa butter. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 20(2):145-151, 1981.

Fiset JF, Tyagi RD, Bais JF: Cocoa shells as adsorbent for metal recovery from acid effluent. *Water Quality Research Journal,* 37(2):379-388, 2002.

Galanakis CM: Food Waste Recovery Processing Technologies and Industrial Techniques, Academic Press, SAD, 2015.

Gutiérrez TJ: State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 16:131-1344, 2017.

Harvey D: *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill, SAD, 2000.

Hartati I: Hydrotropic Extraction Of Theobromine From Cocoa Bean Shell. *Momentum,* 6(2):17-20, 2010.

Hernández-Hernández C, Viera-Alcaide I, Sillero AMM, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez G: Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240:831-839, 2017.

Ignat I, Volf I, Pope VI: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry,* 126(4):1821-1835, 2011.

Jozinović A, Panak Balentić J, Ačkar Đ, Babić J, Pajin B, Miličević B, Guberac S, Šubarić D: Cocoa husk application in enrichment of extruded snack products. *In Proceedings of the Fourth International Congress on Cocoa Coffee and Tea*, str. 25-28. Torino, Italy, 2017.

Karim AA, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Abdullah A: Antioxidant properties of cocoa pods and shells. *Malayasian Cocoa Journal,* 8:49-56, 2014.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju,* 55:279-290, 2004.

Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM: A Prooxidant Mechanism for the Anticancer and Chemopreventive Properties of Plant Polyphenols. *Current Drug Targets,* 13:1738-1749.

Kondakova V, Tsvetkov I, Batchvarova R, Badjakov I, Dzhambazova T, Slavov S: Phenol compounds-qualitative index in small fruits. *Biotechnology & Biotechnological Equipment,* 23(4):1444-1448, 2009.

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.

Luthria DL: Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 86:2266-2272, 2006.

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): 45-50, 2017.

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.

Mashuni, Jahiding M, Kurniasih I, Zulkaidah: Characterization of preservative and pesticide as potential of bio oil compound from pyrolisis of cocoa shell using gas chromatography**.** *AIP Conference Proceedings,* 1823, 020008, 2017.

Muhammad AI, Liao X, Cullen P, Liu D, Xiang Q: Effects of Nonthermal Plasma Technology on Functional Food Components. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5):1379-1394, 2018.

Nsor-Atindana J, Zhong F, Mothibe KJ: *In vitro* hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food & Function,* 3:1044-1050, 2012.

Ntiamoah A, Afrane G: Environmental impacts of cocoa production and processingin Ghana: life cycle assessment approach. *Journal of Cleaner Production,* 16:1735-1740, 2008.

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.

Osundahunsi OF, Bolade MK, Akinbinu AA: Effect of Cocoa Shell Ash as an Alkalizing Agent on Cocoa Products. *Journal of Applied Sciences,* 7:1674-1678, 2007.

Panak Balentić J, Ačkar Đ, Jokić S, Jozinović A, Babić J, Miličević B, Šubarić B, Pavlović N: Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules,* 23(6), 1404, 2018.

Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* 2(5):270-278, 2009.

Pankaj SK, Bueno-Ferrer C, Misra NN, Milosavljević V, O'Donnell CP, Bourke P, Keener KM, Cullen PJ: Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology,* 35:5-17, 2014.

Pankaj SK, Wan Z, Colonna W, Keener KM: Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 97:4016-4021, 2017.

Rankin CW, Nriagu JO, Aggarwal JK, Arowolo TA, Adebayo K, Flegal AR: Lead Contamination in Cocoa and Cocoa Products: Isotopic Evidence of Global Contamination. *Environmental Health Perspectives,* 113(10):1344-1348, 2005.

Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske metode analize polifenola u vinima. Kromatografske analize polifenola. *Kemija u industriji,* 58(3):121-128, 2009.

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.

Sarangapani C, O'Toole G, Bourke P, Cullen P: Atmospheric Cold Plasma Dissipation Efficiency of Agrochemicals on Blueberries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 44, 235-241, 2017.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM: Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology,* 299:152-178, 1999.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR*: Principles of Instrumental Analysis*. Sixth edition, Thomson, 2007.

Vukušić T: Primjena hladne plazme pri obradi voćnih sokova. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2016.

Webb GP: *Dietary suplements and functional foods.* Blackwell Publishing, UK, 2006.

Wollgast J, Anklam E: Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International,* 33:423-447, 2000.

Yapo BM, Besson V, Koubala BB, Koffi KL: Adding Value to Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition* 1(3):38-46, 2013.