

Određivanje funkcionalnih spojeva u kavi i njenim nusproizvodima

Papić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:531184>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH SPOJEVA U KAVI I NJENIM
NUSPROIZVODIMA**

ZAVRŠNI RAD

**JELENA PAPIĆ
MATIČNI BROJ: 137**

Split, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH SPOJEVA U KAVI I NJENIM
NUSPROIZVODIMA

ZAVRŠNI RAD

JELENA PAPIĆ
MATIČNI BROJ: 137

Split, rujan 2024.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY
FOOD TECHNOLOGY**

**DETERMINATION OF FUNCTIONAL COMPOUNDS IN COFFEE
AND COFFEE BY-PRODUCT**

BACHELOR THESIS

JELENA PAPIĆ

Parent number: 137

Split, September 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Prijediplomski studij

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza
Komentor: doc. dr. sc. Barbara Soldo

ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH SPOJEVA U KAVI I NJENIM NUSPROIZVODIMA Jelena Papić, 137

Sažetak: Nusproizvodi kave kao što su pulpa, ljuske i talog kave bogati su bioaktivnim spojevima, uključujući fenole. Na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz ovih nusproizvoda može se značajno utjecati metodom ekstrakcije i izborom otapala. Trenutna istraživanja usmjerena su na principe zelene ekstrakcije. Cilj ovog rada je bio odrediti fenolni sastav ekstrakata sirove kave, pržene kave i nusproizvoda koji nastaje tijekom njenog prženja pripremljenih dvjema ekstrakcijskim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, UZV i ubrzana ekstrakcija otapalima, ASE) uz korištenje različitih otapala (etanol, voda i njihove mješavine). Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski, dok su pojedine fenolne kiseline detektirane tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC). Rezultati su pokazali značajan sadržaj ukupnih fenola u svim uzorcima kod ASE (520-5910 mg GAE/L) i UZV (343-5020 mg GAE/L) metode. Kod obiju ekstrakcijskih metoda klorogenska kiselina je najdominantnija fenolna kiselina, nakon koje slijedi kava kiselina. Na razlike u rezultatima značajno su utjecali korišteno otapalo i metoda ekstrakcije. U ekstraktima ASE, sadržaj ukupnih fenola se smanjio sa smanjenjem sadržaja vode u smjesi otapala, trend koji nije primijećen u ekstraktima UZV. Ova studija pruža uvid u razvoj učinkovitih procesa ekstrakcije za proizvodnju visokokvalitetnih ekstrakata koji se potencijalno mogu koristiti u prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: kava, ekstrakcija, nusproizvodi, fenolni spojevi, klorogenska kiselina

Rad sadrži: 41 stranica, 10 slika, 6 tablica, 33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Sanja Perinović Jozić
2. doc. dr. sc. Barbara Soldo
3. izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate studies

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Supervisor: Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor
Co-supervisor: Ph. D. Barbara Soldo, Assistant Professor

DETERMINATION OF FUNCTIONAL COMPOUNDS IN COFFEE AND COFFEE BY-PRODUCT

Jelena Papić, 137

Abstract: Coffee by-products such as pulp, husks and coffee grounds are rich in bioactive compounds, including phenols. The efficiency of extraction of phenolic compounds from these by-products can be significantly influenced by the extraction method and the choice of solvent. Current research focuses on the principles of green extraction. The aim of this work was to determine the phenolic composition of green coffee extracts, roasted coffee and by-products produced during its roasting, prepared by two extraction methods (ultrasound-assisted extraction, UAE and accelerated solvent extraction, ASE) using different solvents (ethanol, water and their mixtures). The total phenols were determined spectrophotometrically, while the individual phenolic acids were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed a significant content of total phenols in all samples using the ASE (520-5910 mg GAE/L) and UAE (343-5020 mg GAE/L) methods. In both extraction methods, chlorogenic acid is the dominant phenolic acid, followed by caffeic acid. The differences in the results were significantly influenced by the solvent used and the extraction method. In ASE extracts, the content of total phenols decreased with decreasing water content in the solvent mixture, a trend that was not observed in UAE extracts. This study provides valuable insights into the development of efficient extraction processes for the production of high-quality extracts that can potentially be used in the food industry.

Keywords: coffee, extraction, by-products, phenolic compounds, chlorogenic acid

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 6 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

1. Ph. D. Sanja Perinović Jozić, Associate Professor
2. Ph. D. Barbara Soldo, Assistant Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Skroza i na Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod komentorstvom doc. dr. sc. Barbare Soldo, u razdoblju od lipnja do rujna 2024. godine.

Izradu rada pomogla je firma D16 Coffee koja je za eksperimentalni dio rada donirala uzorke kave.

Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018.

Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta AgriBioPack.

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Skroza, kao i komentorici doc. dr. sc. Barbari Soldo, na ukazanom povjerenju, uloženom trudu, savjetima i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Također, zahvaljujem asistentici Petri Brzović na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci, razumijevanju i ohrabrenju tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Cilj ovog rada je bio odrediti fenolni sastav ekstrakata sirove kave, pržene kave i nusproizvoda koji nastaje tijekom njenog prženja pripremljenih dvjema ekstrakcijskim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ubrzana ekstrakcija otapalima) uz korištenje različitih otapala (etanol, voda i njihove mješavine). Na osnovu dobivenih rezultata donijeti će se zaključak o mogućnosti iskorištenja ovih ekstrakata u različitim industrijama čime se usklađujemo s modernim ciljevima održivosti.

SAŽETAK

Nusproizvodi kave kao što su pulpa, ljuske i talog kave bogati su bioaktivnim spojevima, uključujući fenole. Na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz ovih nusproizvoda može se značajno utjecati metodom ekstrakcije i izborom otapala. Trenutna istraživanja usmjerena su na principe zelene ekstrakcije. Cilj ovog rada je bio odrediti fenolni sastav ekstrakata sirove kave, pržene kave i nusproizvoda koji nastaje tijekom njenog prženja pripremljenih dvjema ekstrakcijskim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, UZV i ubrzana ekstrakcija otapalima, ASE) uz korištenje različitih otapala (etanol, voda i njihove mješavine). Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski, dok su pojedine fenolne kiseline detektirane tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC). Rezultati su pokazali značajan sadržaj ukupnih fenola u svim uzorcima kod ASE (520-5910 mg GAE/L) i UZV (343-5020 mg GAE/L) metode. Kod obiju ekstrakcijskih metoda klorogenska kiselina je najdominantnija fenolna kiselina, nakon koje slijedi kava kiselina. Na razlike u rezultatima značajno su utjecali korišteno otapalo i metoda ekstrakcije. U ekstraktima ASE, sadržaj ukupnih fenola se smanjio sa smanjenjem sadržaja vode u smjesi otapala, trend koji nije primijećen u ekstraktima UZV. Ova studija pruža uvid u razvoj učinkovitih procesa ekstrakcije za proizvodnju visokokvalitetnih ekstrakata koji se potencijalno mogu koristiti u prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: kava, ekstrakcija, nusproizvodi, fenolni spojevi, klorogenska kiselina

ABSTRACT

Coffee by-products such as pulp, husks and coffee grounds are rich in bioactive compounds, including phenols. The efficiency of extraction of phenolic compounds from these by-products can be significantly influenced by the extraction method and the choice of solvent. Current research focuses on the principles of green extraction. The aim of this work was to determine the phenolic composition of green coffee extracts, roasted coffee and by-products produced during its roasting, prepared by two extraction methods (ultrasound-assisted extraction, UAE and accelerated solvent extraction, ASE) using different solvents (ethanol, water and their mixtures). The total phenols were determined spectrophotometrically, while the individual phenolic acids were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed a significant content of total phenols in all samples using the ASE (520-5910 mg GAE/L) and UAE (343-5020 mg GAE/L) methods. In both extraction methods, chlorogenic acid is the dominant phenolic acid, followed by caffeic acid. The differences in the results were significantly influenced by the solvent used and the extraction method. In ASE extracts, the content of total phenols decreased with decreasing water content in the solvent mixture, a trend that was not observed in UAE extracts. This study provides valuable insights into the development of efficient extraction processes for the production of high-quality extracts that can potentially be used in the food industry.

Keywords: coffee, extraction, by-products, phenolic compounds, chlorogenic acid

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Fenolni spojevi kave	2
1.1. Biološka svojstva kave.....	3
1.1.1. Antioksidacijska aktivnost.....	3
1.1.2. Antimikrobna aktivnost	4
1.1.3. Ostale aktivnosti.....	5
1.2. Nekonvencionalne (zelene) metode ekstrakcije	5
1.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	6
1.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalom.....	7
1.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	8
1.3. Otapala za ekstrakciju	9
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
2.1. Materijal.....	11
2.2. Priprema ekstrakata.....	12
2.2.1. Priprema ekstrakata metodom ASE	12
2.2.2. Priprema ekstrakata metodom UZV	13
2.3. Određivanje ukupnih fenola.....	15
2.4. Određivanje fenolnih kiselina HPLC metodom.....	15
3. REZULTATI I RASPRAVA	17
3.1. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola	17
3.2. Rezultati određivanja pojedinih fenolnih kiselina	19
4. ZAKLJUČCI.....	24
5. LITERATURA.....	25

UVOD

Kava predstavlja jedno od najčešće konzumiranih napitaka i njena konzumacija tijekom godina raste, što u konačnici dovodi i do povećanja proizvodnje sirove kave. Kava je cijenjena ne samo zbog stimulirajućih svojstva već i zbog bogatog kemijskog sastava. Posebno se izdvajaju funkcionalni spojevi, poput polifenola, alkaloida i diterpena, koji osim što utječu na okus i kvalitetu kave, pozitivno djeluju na zdravlje zbog svojih antioksidacijskih, antivirusnih, hipoglikemijskih i drugih bioloških svojstava. Najzastupljeniji fenolni spojevi u pulpi kave su kondenzirani tanini, a u sjemenu kave klorogenska kiselina (esteri hidroksicimetne i kininske kiseline). Osim zrna kave, vrijedan izvor brojnih funkcionalnih spojeva predstavljaju i njeni nusproizvodi, poput pulpe, ljuske i taloga kave. Upravo zbog toga, nusproizvodi se sve manje tretiraju kao otpad a sve više smatraju vrijednim izvorom bioaktivnih spojeva koji bi se mogli iskoristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Određivanje ovih funkcionalnih spojeva važno je za razumijevanje kemijskog sastava i biološke aktivnosti uzoraka. No valja istaknuti da na sadržaj fenolnih tvari utječe odabir metode ekstrakcije kao i vrsta otapala. Danas se sve više spominju zelene ekstrakcijske tehnike koje uključuju korištenje novih metoda poput ekstrakcije potpomognute ultrazvučnim ili mikrovalnim zračenjem, tlakom i sl. Kako bi se postigla što bolja učinkovitost ekstrakcije željenih komponenta, uz optimiranje uvjeta ekstrakcije (temperatura, vrijeme, udio otapala), smanjuje se upotreba organskih otapala uz prednost korištenja zelenih otapala poput etanola.

Cilj ovog rada je bio odrediti fenolni sastav sirove kave, pržene kave i nusproizvoda koji nastaje tijekom njenog prženja korištenjem dviju metoda ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ubrzana ekstrakcija otapalima), pomoću različitih otapala (etanol, voda i njihove mješavine). Na osnovu dobivenih rezultata donijeti će se zaključak o mogućnosti iskorištenja nusproizvoda u različitim industrijama čime se usklađujemo s modernim ciljevima održivosti.

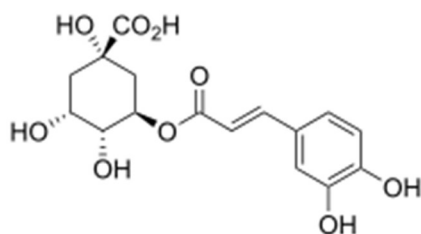
1. OPĆI DIO

1.1. Fenolni spojevi kave

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji se mogu s obzirom na strukturu klasificirati u četiri glavne skupine: flavonoide, fenolne kiseline, lignane i stilbene.^{1,2} Ovi spojevi imaju ključnu ulogu u fiziologiji i staničnom metabolizmu biljaka te su tako uključeni u brojne funkcije, poput osjetilnih svojstava (boja, miris, okus i trpkost), strukture, oprašivanja, otpornosti na štetnike i predatore, klijanja sjemena nakon žetve i rasta, te razvoja i reprodukcije.³

Kava i njeni nusproizvodi sadrže bogatstvo fenolnih kiselina, od kojih se osobito ističe klorogenska kiselina i njeni derivati. Klorogenska kiselina, zajedno s kava, ferulinskom, i *p*-kumarinskom kiselinom, čini dominantnu, vodotopljivu, nehlapljivu polifenolnu frakciju u kavi, a njena koncentracija u zrnu zelene kave značajno varira ovisno o sorti, geografskom podrijetlu, stupnju zrelosti, klimatskim uvjetima i poljoprivrednim praksama.⁴ Biosinteza klorogenske kiseline u kavi odvija se u perispermu i lišću, nakon čega se transportira i intracelularno nakuplja u sjemenkama.⁵ Ona se sintetizira esterifikacijom *trans*-cimetnih kiselina, kao što su kava, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina s kininskom kiselinom.⁴

Maksimalna koncentracija klorogenske kiseline, prema literaturno dostupnim podacima, je prisutna u zelenim plodovima, dok se njen sadržaj smanjuje tijekom prženja kave, budući da visoke temperature uzrokuju razgradnju klorogenske u kininsku kiselinu. Istraživanja također ističu da osim prženjem razine klorogenske kiseline opadaju s dozrijevanjem zrna te da su njene koncentracije više u plodovima biljaka izloženih suncu u odnosu na one uzgojene u sjeni.⁵



Slika 1. Kemijska struktura klorogenske kiseline⁶

Uz već istaknutu klorogensku kiselinu u pulpi i kožici kave, nalaze se kava, ferulinska i kumarinska kiselina, slično kao i u zrnu zelene kave. U zrnu kave među hidroksicimetnim kiselinama, kava kiselina je najzastupljenija, a slijede ferulinska i *p*-kumarinska kiselina.⁷ I nusproizvodi kave, sadrže fenolne kiseline, klorogensku, vanilinsku, protokatehinsku i *p*-kumarinsku kiselinu te kofein.⁴

Od polifenolnih spojeva u srebrnoj pokožici prisutni su uglavnom flavonoidi rutin, kvercetin i kemferol, uz naravno klorogensku kiselinu.⁴ Osim već istaknutih fenola u kožici i pulpi kave nalazimo i tanine koji čine 0,8%-2,8% ovog dijela ploda.⁷

1.1. Biološka svojstva kave

Fenolni spojevi općenito i oni koji se nalaze u kavi imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Razlog tome su brojna svojstva koja posjeduju, kao što su: antioksidacijska, antimikrobna, protuupalna, antiradikalna, hipoglikemijska, antivirusna, i druga svojstva.^{4,7} Različite vrste polifenola koje nalazimo u kavi i njenim nusproizvodima, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline i hidrolizabilni tanini pokazuju i antikancerogena svojstva.⁴ Klorogenska kiselina, kao najdominantniji fenol, posjeduje antivirusno, antifungalno, hipoglikemijsko, hepatoprotektivno, antispazmodičko, antibakterijsko i antihistaminsko djelovanje, čime pridonosi funkcionalnim svojstvima kave i čini kavu značajnim izvorom prirodnih antioksidansa u prehrani.⁵

1.1.1. Antioksidacijska aktivnost

Fenolni spojevi s izraženim antioksidacijskim svojstvom su flavonoidi, tanini i fenolne kiseline među kojima se ističu hidroksibenzojeva, hidroksicimetna, kava i klorogenska kiselina. Antioksidacijska svojstva ovih spojeva uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, tj. o broju i položaju hidroksilnih skupina u molekuli.³ Veći broj hidroksilnih skupina rezultira većom antioksidativnom aktivnošću, dok se gubitkom hidroksilnih skupina ta aktivnost smanjuje.¹ Metode koje se mogu koristiti za procjenu antioksidacijskog kapaciteta se temelje na različitim mehanizmima djelovanja poput metoda hvatanja slobodnih radikala ili redukcije metalnih iona.³

Fenolni spojevi djeluju kao antioksidansi na način da inhibiraju stvaranje slobodnih radikala i oksidaciju hranjivih tvari.⁴ Na taj način usporavaju napredovanje mnogih kroničnih bolesti, te oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) što je povezano s aterosklerozom.⁸

Primjerice, bioaktivne komponente kave i nusproizvoda kave su pokazale visoku antioksidacijsku učinkovitost u prehrambenim proizvodima gdje su spriječile oksidaciju lipida.⁹ Jedno od istraživanja posebno ističe mogućnost primjene ekstrakta pržene kave kao prirodnog antioksidansa u govedini, kako bi se produžio rok trajanja ove namirnice.⁴

1.1.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna sredstva su tvari koja ubijaju mikroorganizme ili inhibiraju njihov rast, a mogu biti prirodna ili sintetska. Biljni ekstrakti s fenolnim spojevima pokazuju antimikrobno djelovanje protiv različitih mikroorganizama.⁴

Razna istraživanja pokazuju da nusproizvodi kave sadrže antimikrobne tvari koje mogu inhibirati patogene u hrani. Primjerice, ekstrakti srebrne kože i taloga kave su pokazali minimalni inhibitorni učinak na bakterije *Staphylococcus aureus* i *E. coli*, dok je pulpa kave pokazala učinkovitost protiv sljedećih bakterija: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *E.coli*.⁴

Fenolni spojevi u kavi kao što su flavan-3-oli, flavonoli i tanini posjeduju antimikrobna svojstva, na način da mogu smanjiti sposobnost mikroorganizama da uzrokuju infekcije, te poboljšati djelovanje antibiotika kada se koriste zajedno. Međutim, kada fenolni spojevi dođu u kontakt s proteinima, njihova učinkovitost u borbi protiv mikroorganizama se može smanjiti.¹⁰

1.1.3. Ostale aktivnosti

Osim antioksidativnih učinaka, konzumacija kave može pružiti zaštitu protiv dijabetesa tipa 2 pomoću protuupalnih učinaka koji su ključni za kontrolu razine glukoze u krvi.¹¹

Također, poznato je antispazmodičko i antimutageno djelovanje klorogenske kiseline iz kave što može pridonijeti smanjenju brzine oslobađanja glukoze u krv nakon obroka i na taj način pomaže boljoj regulaciji šećera u krvi.¹²

Polifenoli koji se nalaze u kavi također mogu u plazmi inducirati efluks kolesterola iz makrofaga putem lipoproteina visoke gustoće (HDL). Ovim procesom se smanjuje nakupljanje kolesterola u krvnim žilama, što ukazuje na antikancerogeni učinak kave.¹²

1.2. Nekonvencionalne (zelene) metode ekstrakcije

Ekstrakcija je tehnološki proces koji omogućuje odvajanje ili koncentriranje tvari na temelju njihove topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Razlikuju se dva tipa ekstrakcije, a to su tekuće-tekuće i čvrsto-tekuće.^{13, 14}

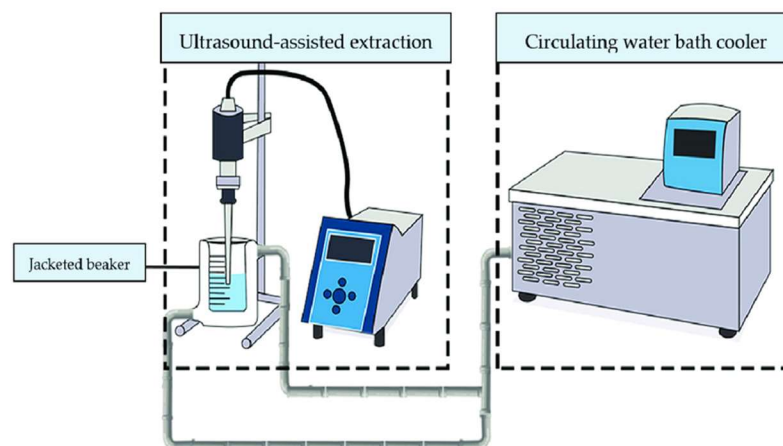
Razlikuju se klasične ili konvencionalne metode za ekstrakciju i nove ili nekonvencionalne metode. Uz klasične ili konvencionalne metode ekstrakcije (maceracija, perkloracija, *Soxhlet* i dr.) sve češće se koriste nove ili nekonvencionalne metode ekstrakcije u koje se ubrajaju: ultrazvučna ekstrakcija (engl. *Ultrasound Assisted Extraction*, UAE), mikrovalna ekstrakcija (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE), superkritična tekućinska ekstrakcija (engl. *Supercritical fluid Extraction*, SFE), ekstrakcija pod visokim tlakom (engl. *Pressurized liquid Extraction*, PEF), ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *Accelerated solvent extraction*, ASE) itd.^{13, 14} Danas se često ove nove metode nazivaju i zelene ekstrakcijske metode zbog smanjene uporabe organskih otapala i na taj način omogućuju učinkovitiju, bržu i čišću ekstrakciju bioaktivnih spojeva uz minimalan utjecaj na okoliš i zdravlje. Osim toga koriste se manje količine otapala, te je vrijeme ekstrakcije kraće.¹⁵

1.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ili UAE (*eng. Ultrasound-assisted extraction*) je metoda koja koristi zvučne valove frekvencija iznad 20 kHz za ekstrakciju analita iz krutih uzoraka pomoću otapala.¹⁶ Prilikom ove metode događa se kavitacija kada mehanički valovi stvaraju mjehuriće koji kolabiraju i stvaraju pritisak na površini biljnog materijala, razbijajući tkivo i oslobađajući spojeve.¹⁷

U laboratoriju se mogu koristiti dvije vrste ultrazvučne opreme; ultrazvučna kupelj i sonde. Kupelj se uglavnom koristi za disperziju krutih tvari u otapalo ili za čišćenje materijala. Jednostavne su za rukovanje i ekonomski su povoljne, ali se manje koriste za kemijske reakcije jer je intenzitet nizak i jako oslabljen vodom sadržanom u kupelji i stjenkama staklenog posuđa koji se koristi za eksperiment. Ultrazvučna sonda znatno je snažnija jer isporučuje ultrazvučni intenzitet na maloj površini, točnije na vrhu sonde, za razliku od ultrazvučne kupelji. Dodatna prednost sonde je to što je izravno uronjena u reakcijsku tikvicu, što smanjuje mogućnost slabljenja ultrazvučnih valova. Obično se upotrebljava za sonikaciju (ultrazvučna homogenizacija) malih volumena uzoraka, pri čemu je potrebno paziti na nagli porast temperature u uzorku.¹⁸

Ekstrakcija ovom tehnikom osim jednostavnosti i niske cijene opreme ima i druge prednosti: povećani prinos i selektivnost bioaktivnih tvari, smanjenje vremena i energije potrebnih za ekstrakciju.¹⁷ Uspoređujući s MAE i UAE, ova tehnika ima prednosti tako što nije ograničen otapalom vrstom upotrijebljene matrice ili sadržajem vlage uzorka.¹⁸



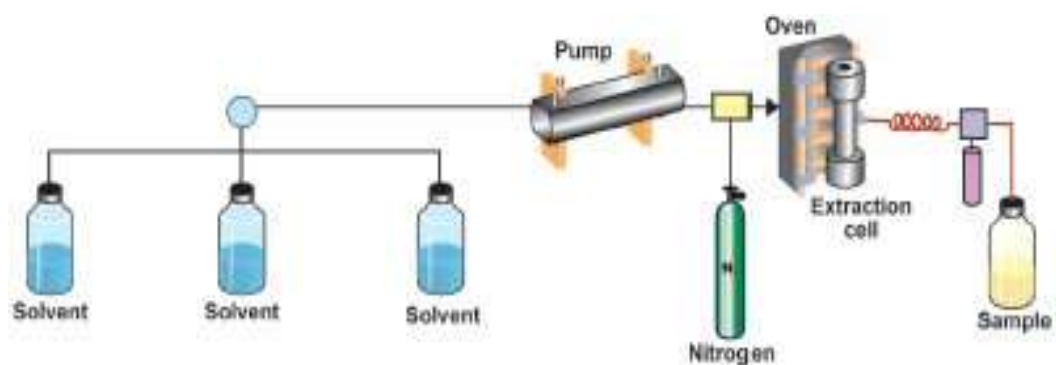
Slika 2. Prikaz ultrazvučne sonde i ultrazvučne kupke¹⁹

1.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalom

Ubrzana ekstrakcija potpomognuta otapalom ili ASE (eng. *Accelerated solvent extraction*) je moderna tehnika ekstrakcije koja se odvija na visokoj temperaturi (iznad vrelišta otapala) pri visokom tlaku. Visoka temperatura poboljšava topljivost analita, brzinu difuzije, te smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala. Visoki tlak unutar ćelije za ekstrakciju omogućava da otapalo ostane u tekućem stanju.²⁰ Na učinkovitost ove metode utječu i drugi faktori kao što su brzina protoka, sastav matrice, otapalo i vrsta vlakana.

Ova metoda ima brojne prednosti u odnosu na tradicionalne metode, a kao glavnu prednost može se istaknuti brzina ekstrakcije i smanjena upotreba količine otapala.²¹ Često se koriste ekološki prihvatljiva otapala npr. voda, etanol, aceton i acetonitril.²² Potrebno je izbjegavati otapala s temperaturom zapaljenja 40–200 °C.²⁰ Sustav je potpuno automatiziran, te kontrolira svaki dio procesa.²¹

Osim prednosti, postoje i nedostaci ove metode kao što je visoka cijena cijele opreme. Iako je sami proces ekstrakcije brz, priprema uzoraka za ekstrakciju oduzima vremena. Osim toga, velika je osjetljivost analize i potrebno je redovno ispiranje, pri čemu se troši dosta otapala.²¹



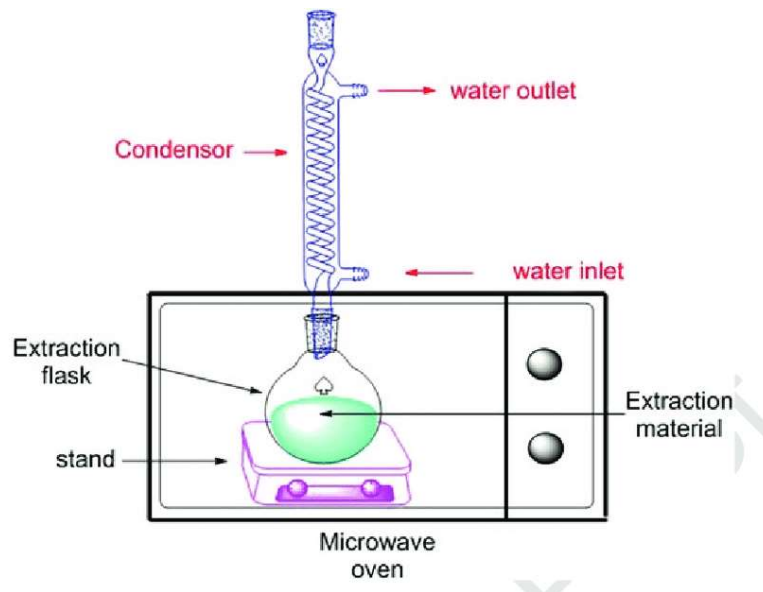
Slika 3. Shema rada ubrzanog ekstrakcijskog sustava²³

1.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Princip rada ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction, MAE*) zasniva se na mikrovalnoj energiji koja služi za zagrijavanje otapala u kontaktu s određenim uzorkom, te se tako sastojci odvajaju od matrice u otapalo. Ovakav način grijanja temelji se na izravnom djelovanju mikrovalova na molekule kroz ionsku kondukciju i rotaciju dipola. Komercijalni sustavi za MAE sastoje se od pećnice, magnetorske cijevi, uređaja za kontrolu temperature i tlaka, te sigurnosnih značajki kao npr. detektor otapala, ispušni ventilator, membrane i izolator za smanjenje mikrovalne energije.²⁴

Glavni parametri koji utječu na ekstrakciju ovom metodom su otapalo, temperatura, vrijeme ekstrakcije i karakteristike matrice. Za sve metode, pa tako i za ovu metodu, temperatura je najbitniji faktor. Visoka temperatura tijekom MAE povećava topljivost analita, brzinu difuzije, te smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala. Visoki tlak zadržava otapalo u tekućem stanju na povišenim temperaturama, poboljšavajući učinkovitost ekstrakcije. Pri odabiru otapala za ekstrakciju, važno je razmotriti njegova svojstva u pogledu apsorpcije mikrovalova, topljivosti analita i interakcije s matricom. Ako otapalo ne može apsorbirati mikrovalnu energiju, neće doći do zagrijavanja niti do učinkovite ekstrakcije. Obično se koriste mali volumeni otapala (između 10 i 30 mL) po uzorku.²⁴

Glavna prednost ove metode u odnosu na druge konvencionalne metode, je smanjenje vremena ekstrakcije, što je moguće zahvaljujući razlikama u zagrijavanju između mikrovalne i konvencionalne metode. Kod konvencionalnog zagrijavanja potrebno je određeno vrijeme da se posuda zagrije prije nego što se toplina prenese na otopinu, dok mikrovalne pećnice zagrijavaju otopinu izravno. To održava temperaturni gradijent na minimumu i ubrzava brzinu zagrijavanja. Osim toga, MAE omogućava značajno smanjenje potrošnje organskih otapala i istovremenu obradu više uzoraka.²⁴



Slika 4. Prikaz dijelova za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima²⁵

1.3. Otapala za ekstrakciju

Prilikom izbora otapala za ekstrakciju potrebno je uzeti u obzir vrstu komponente koja se ekstrahira, te njena svojstva. Osim toga, postoje brojni čimbenici koji utječu na odabir otapala i osiguravaju učinkovitost i sigurnost prilikom ekstrahiranja, a to su:¹³

- Polarnost – otapalo treba imati polarnost koja odgovara polaritetu komponente koju ekstrahiramo
- Reaktivnost – otapalo ne bi smjelo reagirati s ekstraktom ili se razgrađivati tijekom samog procesa
- Točka ključanja – poželjno je da otapalo ima nisku točku ključanja kako bi se lakše odvojilo od ekstrahirane komponente
- Viskoznost – nizak viskozitet otapala poboljšava prijenos mase i ubrzava proces ekstrakcije
- Sigurnost – trebalo bi biti nezapaljivo, sigurno za rukovanje, te ne smije predstavljati opasnost za okoliš prilikom zbrinjavanja
- Stabilnost – treba biti otporno na toplinu, kisik i svjetlost
- Dostupnost i trošak – po mogućnosti dostupan i ekonomičan
- Mogućnost recikliranja – poželjno je da se otapalo može reciklirati i ponovno koristiti

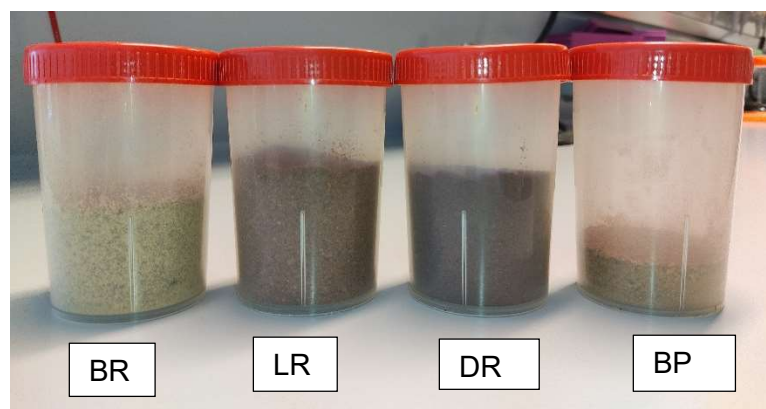
Studija koju su proveli *Costa i sur.*²⁶ pokazuje da je najlošije otapalo za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida 100%-tni etanol, upravo zbog srednjeg polariteta ovih spojeva, dok je najveći sadržaj fenola postignut s 50%-tnim etanolom (50 °C, 90min.). Smjesa koja je omogućila znatno bolju ekstrakciju flavonoida je 75%-tni etanol (60 °C, 90 min.).

Zelena ekstrakcijska otapala čine sva otapala koja su biorazgradiva i sigurna za okoliš. Biološka otapala, superkritični CO₂, ionske tekućine i duboko eutektične smjese čine obećavajuće alternative tradicionalnim organskim otapalima za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Ova otapala nude poboljšanja u usporedbi s konvencionalnim otapalima, uključujući manju toksičnost i manji utjecaj na okoliš. Iako ovakva otapala nude poboljšanja, važno je uzeti u obzir nekoliko ključnih parametara za održivost kao što su: potrošnja energije, količina prethodne obrade i pročišćavanja, količina otapala, fizikalno-kemijska svojstva i utjecaj na okoliš, tj. toksičnost samog otapala.²⁷

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U ovom eksperimentalnom radu korištena su četiri uzorka kave porijeklom iz Brazila koje su prikupljeni u pržionici kave *D16 Coffee* iz Splita. Prvi uzorak predstavlja sirovo zrno kave (BR – *before roasting*), drugi slabije pržena zrna kave (LR – *lightly roasted*), treći jače pržena zrna kave (DR – *dark roasted*) i četvrti nusproizvod kave, odnosno pokožica kave koja zaostaje nakon procesa prženja (BP – *by-product*) (slika 5). Prije postupka ekstrakcije uzorci su usitnjeni korištenjem mlinca Delimano PCML2014 (Hrvatska), te do trenutka daljnje analize pohranjeni u plastične čašice na suhom i tamnom mjestu.



Slika 5. Usitnjeni uzorci kave i nusproizvoda kave (vlastita fotografija)

Tablica 1. Oznake uzoraka

UZORAK	KRATICA UZORKA	OZNAKA UZORKA
Sirova zrna kave	BR	1
Slabije pržena zrna kava	LR	2
Jače pržena zrna kava	DR	3
Nusproizvod kave	BP	4

2.2. Priprema ekstrakata

Kao ekstrakcijska otapalo korištena je destilirana voda i etanol u različitim postocima. Prema dosadašnjim istraživanjima i pregledom dostupne literature odabrana su 4 različita otapala (tablica 2) za koje se navodi da imaju bolji ekstrakcijski učinak na sadržaj fenolnih spojeva.

Tablica 2. Oznake za korištena otapala

OTAPALA	OZNAKE OTAPALA
destilirana voda	a
20%-tni etanol	b
50%-tni etanol	c
80%-tni etanol	d

2.2.1. Priprema ekstrakata metodom ASE

Za ovu metodu ekstrakcije korišten je uređaj Dionex ASE 350, Thermo Scientific (slika 6), koji ima opciju automatizirane ekstrakcije 24 uzorka istovremeno. U ćelije za uzorke odvagana je određena masa uzorka kako je prikazano u tablici 3. U svaku ćeliju za ekstrakciju, volumena 22 mL, dodana je dijatomejska zemlja koja predstavlja inertno sredstvo za popunjavanje ćelije. S obje strane ćelije postavljeni su celulozni filter papiri.

Tablica 3. Prikaz oznaka i mase uzoraka za ekstrakciju ASE metodom

OZNAKA UZORKA	MASA UZORKA (g)	DIJATOMEJSKA ZEMLJA (g)
1a, 1b, 1c, 1d	5	1
2a, 2b, 2c, 2d	5	1
3a, 3b, 3c, 3d	5	1
4a, 4b, 4c, 4d	2,5	2

1 – BR (sirova zrna kave), 2 – LR (slabije pržena kava), 3 – DR (jače pržena kava), 4 – BP (nusproizvod kave); a– destilirana voda, b – 20%-tni etanol, c – 50%-tni etanol, d – 80%-tni etanol



Slika 6. Uređaj za ekstrakciju potpomognutu otapalom, ASE (vlastita fotografija)

Nakon stavljanja ćelija s uzorcima u uređaj, proces započinje zagrijavanjem na temperaturu od 60 °C i pod visokim tlakom. Nakon toga se kroz sustav cijevi ubacuje određeno otapalo u ćeliju, te se ćelija zagrijava zajedno s otapalom. Zatim se odvija statička ekstrakcija 5 min na 60 °C, a po potrebi se otpušta tlak. Na kraju ekstrakcije slijedi ispiranje otapalom i propuhivanje dušikom, kako bi se uklonili svi ostaci ekstrakta iz sustava i uređaj pripremio za sljedeći proces ekstrakcije. Ekstrahirani uzorci su spremljeni u falkon epruvete te do trenutka analize skladišteni u hladnjaku.

2.2.2. Priprema ekstrakata metodom UZV

Za UZV korištena je ultrazvučna kupelj (Digital ultrasonic cleaner DU-100, Velika Britanija). Kod pripreme ekstrakata koristio se omjer uzorka i otapala jednak kao kod metode ASE. Homogenizirani uzorci su izvagani u falkon epruvete, dodan im je odgovarajući volumen otapala te su stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 60 °C u vremenu od 60 min. Po završetku ekstrakcije, uzorci su centrifugirani 15 min na 4000 okretaja pomoću centrifuge (Hettich Rotofix 32A, Njemačka). Ekstrakti su dekantirani i filtrirani preko naboranog filter papira u falkon epruvete te do trenutka analize skladišteni u hladnjaku.



Slika 7. Ultrazvučna kupelj (vlastita fotografija)



Slika 8. Centrifuga (vlastita fotografija)

2.3. Određivanje ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin – Ciocalteu metodom²⁸, koja se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva reakcijom s Folin – Ciocalteu reagensom. Ovom reakcijom nastaje plavo obojenje čiji je intezitet izravno proporcionalan sadržaju fenolnih spojeva u uzorku.

Postupak se sastoji od pipetiranja 25 μL testiranih ekstrakata u kivete pri razrjeđenju 1:10 (100 μL uzorka na 900 μL destilirane vode). Zatim se doda 1975 μL destilirane vode, 125 μL Folin – Ciocalteu reagens i 375 μL 20%-tnog natrijevog karbonata. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su dva sata na sobnoj temperaturi u tami. Nakon inkubacije, uzorcima je na spektrofotometru očitana apsorbanca pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj ukupnih fenola izračunat je pomoću standardne otopine galne kiseline izražen kao mg ekvivalenata galne kiseline po litri ekstrakta (mg GAE/L). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD).

2.4. Određivanje fenolnih kiselina HPLC metodom

Fenolne kiseline su određene metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti, HPLC (*eng. High-performance liquid chromatography*) korištenjem Perkin Elmer HPLC sustava, model Series 200 (Waltham, Massachusetts, SAD). Sustav je opremljen termostatiranim autosamplerom, vakuumskim degazerom, binarnom pumpom, termostatiranom sekcijom kolone, UV/VIS detektorom, te programskim paketom TotalChrom Workstation za analizu. Razdvajanje fenolnih spojeva izvršeno je na C18 koloni (Ultra-Aqueous C-18, 250 x 4,6 mm, 5 Å) (Restek, SAD) u gradijentnom načinu rada s mobilnom fazom koja se sastojala od 0,2% fosforne kiseline (A), metanola (B) i acetonitrila (C).

Na početku analize (0 min), omjer mobilne faze bio je 96% A, 2% B i 2% C. Tijekom sljedećih 40 min, omjer se postupno mijenjao do 50% A, 25% B i 25% C. Od 40.-45. min, omjeri su se mijenjali na 40% A, 30% B i 30% C. Od 45.-60. min, gradijent se prilagodio na 50% B i 50% C, te je ostao stabilan do 70. min. Posljednjih 10 min analizom je održan dobiveni omjer otapala kako bi se kolona vratila u početne uvjete.

Brzina protoka mobilne faze bila je konstantna i iznosila je 0,8 mL/min, dok je volumen uzorka koji se ubrizgavao iznosio 20 μ L. Fenolni spojevi su detektirani na valnoj duljini od 280 nm. Ekstrakti su prije HPLC analize dodatno razrijeđeni 2-10 puta ovisno o udjelu fenola.

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskih vremena uzoraka s onima čistih standarda prikazanih u tablici 4. Kvantifikacija ovih spojeva, identificiranih pomoću standardnih tvari, izvedena je pomoću kalibracijske krivulje pripremljene za svaki standard, a rezultati su izraženi u mg/L pojedinog fenola.

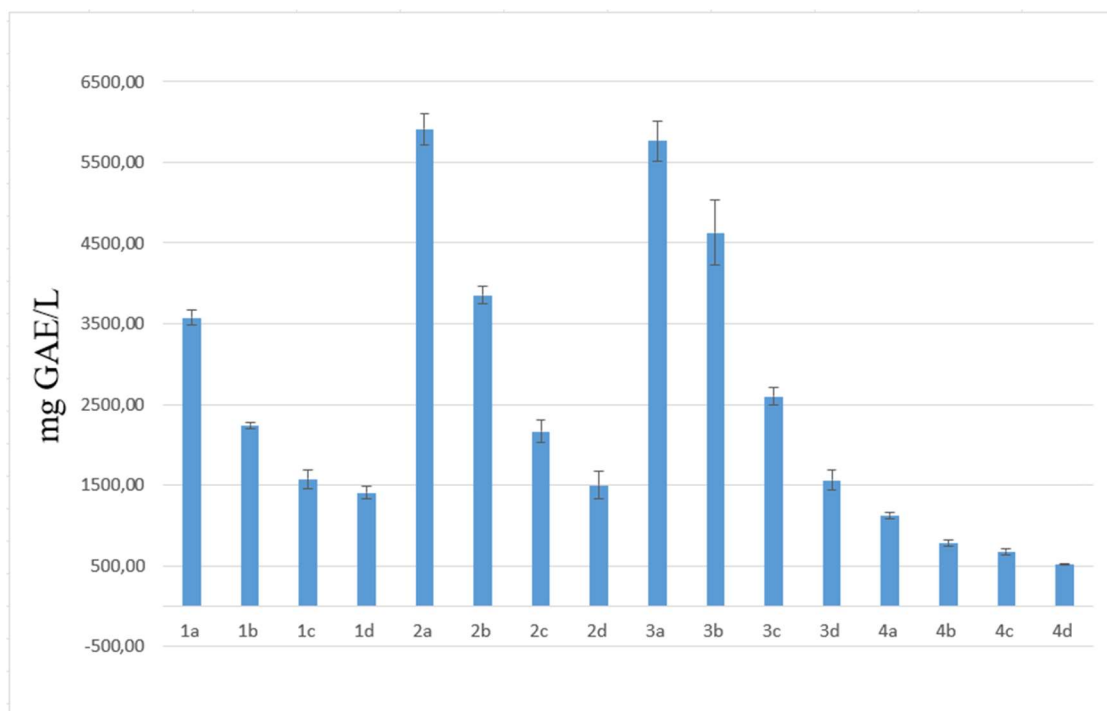
Tablica 4. Standardna retencijska vremena određenih fenolnih kiselina

Fenolne kiseline	Retencijsko vrijeme (min)	Koncentracije standardnih otopina (mg/L)	Faktor
3,4-dihidroksibenzojeva	19,610	0,460-268,800	0,9999
4-hidroksibenzojeva	24,962	0,240-149,900	0,9999
klorogenska	25,923	50,00-500,00	0,9999
vanilinska	27,133	0,200-124,600	0,9999
kava	28,042	0,200-124,600	0,9999
<i>p</i> -kumarinska	33,290	0,240-149,900	0,9999
<i>t</i> -ferulinska	34,740	0,240-149,900	0,9999
<i>o</i> -kumarinska	37,734	0,130-80,200	0,9999
cimetna	44,776	0,130-81,800	0,9996

3. REZULTATI I RASPRAVA

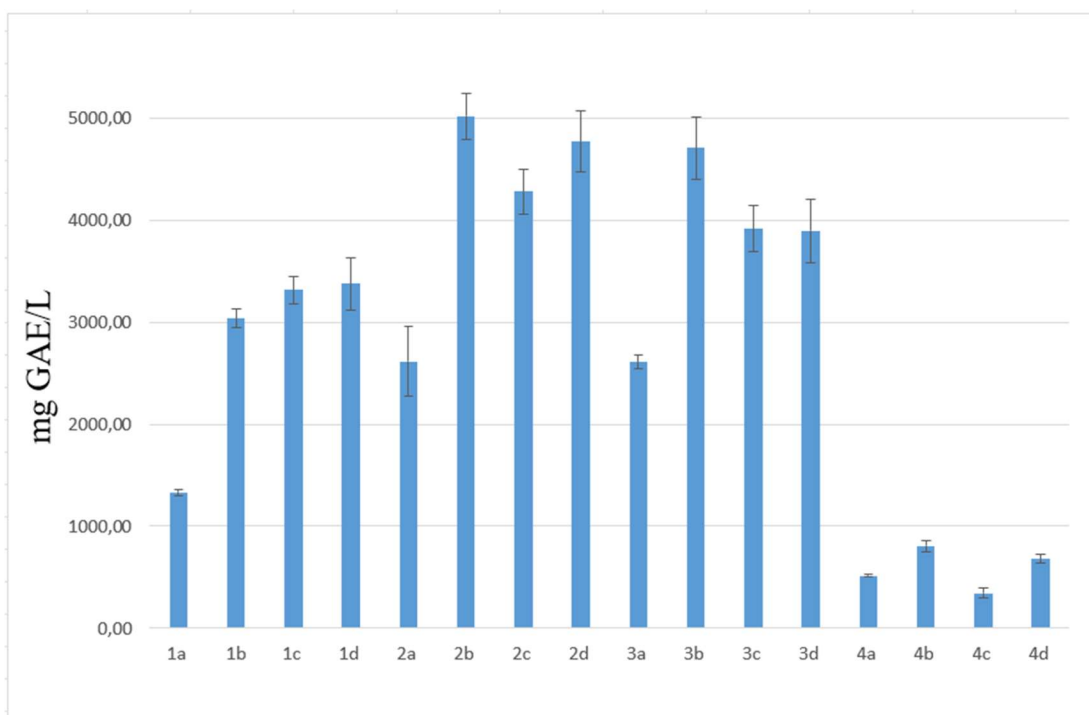
3.1. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola

Rezultati određivanja ukupnih fenola, uzoraka ekstrahiranih pomoću metoda ASE i UZV, prikazani su na slici 9 i 10. Vidljivo je kako različite metode ekstrakcije, te različita otapala rezultiraju različitim sadržajem ukupnih fenola u uzorcima.



Slika 9. Prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima pripremljenim metodom ASE

Kod uzoraka ekstrahiranih ASE metodom (slika 9) sadržaj ukupnih fenola se kretao u rasponu od 520-5910 mg GAE/L. Najveća količina ukupnih fenola zabilježena je u prženoj kavi (uzorci 2 i 3), a najmanja količina prisutna je u ekstraktima nusproizvoda kave (uzorci 4). Iz grafičkog prikaza se može uočiti utjecaj otapala na sadržaj fenola, pri čemu je korištenjem vode kao ekstrakcijskog otapala postignut najbolji učinak, dok povećanjem udjela etanola u ekstrakcijskoj smjesi dolazi do pada sadržaja ukupnih fenola u testiranim uzorcima.



Slika 10. Prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima pripremljenim metodom UZV

Sadržaj ukupnih fenola ekstrahiranih UZV metodom (slika 10), kretao se između 343-5020 mg GAE/L. Najveće koncentracije se nalaze u slabije prženoj kavi (uzorci 2) i jače prženoj kavi (uzorci 3), dok su najniže koncentracije prisutne u nusproizvodu kave (uzorci 4) što je isto kao i kod ekstrakata pripremljenih ASE metodom. Ono što se ovdje uočava u odnosu na ASE metodu je slabiji udio ukupnih fenola u vodenim ekstraktima u usporedbi s etanolnim ekstraktima (različitog postotka etanola u mješavini vode i etanola). Na slici 10 vidljivo je kako su najveće količine fenolnih spojeva dobivene pomoću 20%-tnog etanola kod svih uzoraka (2b, 3b i 4b) osim kod ekstrakta sirove kave (uzorak 1b).

Pregledom dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da brojne vrste kave i njeni nusproizvodi sadrže bogat udio fenola. Tako npr. *Mussato i sur.*²⁹ navode udio ukupnih fenola od 16 mg GAE/g u metanolnom ekstraktu taloga kave pripremljenog pomoću kruto-tekuće metode. *Mehaya i Mohammad*³⁰ u svom istraživanju su uspoređivali razliku u sadržaju ukupnih fenola zelene i pržene kave tijekom prženja. Rezultati su pokazali da se sadržaj ukupnih fenola u zelenoj kavi (52,79 mg GAE/g) smanjuje s povećanjem temperature pri jednakom vremenu prženja (40 min). Pri temperaturi prženja od 160 °C sadržaj fenola se smanjio na 43,72 mg GAE/g, pri 180 °C

udio fenola je iznosio 42,98 mg GAE/g dok je pri temperaturi od 220 °C sadržaj ukupnih fenola pao na 30,93 mg GAE/g. *Bravo i sur.*³¹ u svom istraživanju ističu utjecaj otapala na izdvajanje ukupnih fenola. Najveći prinos fenola postigli su pomoću mješavine etanola s vodom (13,48 – 17,48 mg GAE/g), dok su najniže vrijednosti udjela fenola postignute sa 100%-tnim etanolom (2,65 mg GAE/g).

Na osnovu svega navedenog možemo reći da je polarnost otapala razlog ovim razlikama u količini ekstrahiranih ukupnih fenolnih spojeva u testiranim uzorcima kave, što potvrđuju i brojne studije koje govore u utjecaju polarnosti na različite podgrupe fenola. Kombinacijom vode (koja ima visoku polarnost) i etanola (srednje polarnost) postiže se optimalna ekstrakcija antioksidativnih spojeva, upravo zbog toga što voda pomaže u otapanju polarnih fenolnih spojeva, dok etanol smanjuje otapanje neželjenih tvari.³²

3.2. Rezultati određivanja pojedinih fenolnih kiselina

Rezultati određivanja pojedinih fenolnih kiselina prikazani su u tablicama 5 i 6. Iz navedenog se može uočiti da je dominantni spoj u obje metode ekstrakcije bila klorogenska kiselina. Također se uočava veći udio fenolnih kiselina u ekstraktima sirove i pržene kave u odnosu na ekstrakte nusproizvoda.

Klorogenska kiselina u uzorcima pripremljenim ASE metodom kretala se od 10,3 do 1774,8 mg/L, a najveća količina je potvrđena u uzorku 1a, odnosno u ekstraktu sirove kave pripremljenom korištenjem destilirane vode. Osim klorogenske, u ekstraktima pripremljenim ovom metodom ističe se i kava kiselina koja je prisutna u rasponu od 197,0 do 1828,8 mg/L, a najveća količina je zabilježena u uzorku 3a, odnosno vodenom ekstraktu jače pržene kave. U svim uzorcima prisutne su još 3,4-dihidroksibenzojeva i 4-hidroksibenzojeva kiselina u dosta velikim koncentracijama, dok su cimetna i vanilinska kiselina najmanje zastupljene (> 7 mg/L). Koncentracija *p*-kumarinske kiseline se ističe kod ekstrakata nusproizvoda kave jer je bila čak dva puta veća u usporedbi s sirovom kavom (uzorci 1) i tri puta veća u odnosu na prženu kavu (uzorci 2 i 3).

Tablica 5. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u ekstraktima pripremljenim ASE metodom.

Oznaka uzorka	3,4-dihidroksi- benzojeva kiselina	4-hidroksi- benzojeva kiselina	klorogenska kiselina	vanilnska kiselina	kava kiselina	p-kumarinska kiselina	t-ferulinska kiselina	o-kumarinska kiselina	cimetna kiselina	
1	a	242,29 ± 6,38	209,89 ± 3,75	1774,78 ± 14,10	4,44 ± 5,21	905,53 ± 60,51	21,18 ± 1,11	20,56 ± 7,34	11,65 ± 4,18	0,62 ± 0,57
	b	190,68 ± 0,10	186,72 ± 1,04	1685,11 ± 8,44	1,56 ± 0,22	682,99 ± 6,37	23,78 ± 6,61	209,32 ± 12,25	6,28 ± 3,14	1,15 ± 0,18
	c	128,08 ± 0,83	131,53 ± 1,08	1169,96 ± 21,17	0,23 ± 0,02	558,30 ± 1,41	13,38 ± 0,69	146,26 ± 2,40	35,48 ± 0,96	1,36 ± 0,80
	d	103,09 ± 2,42	102,56 ± 4,44	885,56 ± 3,80	3,20 ± 0,47	496,56 ± 4,72	24,64 ± 1,43	160,20 ± 9,04	8,82 ± 1,63	6,91 ± 6,59
2	a	921,30 ± 6,65	772,54 ± 19,47	1715,66 ± 20,91	1,58 ± 0,12	1568,48 ± 9,13	10,99 ± 0,82	36,94 ± 3,50	0,37 ± 0,14	2,95 ± 3,73
	b	580,14 ± 17,85	526,77 ± 7,94	1143,02 ± 6,54	7,55 ± 0,75	1387,81 ± 13,36	17,96 ± 1,97	72,39 ± 2,05	7,16 ± 1,24	0,94 ± 0,49
	c	288,20 ± 11,30	255,12 ± 2,95	554,43 ± 1,53	5,06 ± 1,08	875,11 ± 9,26	9,11 ± 0,47	8,95 ± 0,97	3,48 ± 0,86	1,69 ± 1,05
	d	168,75 ± 1,27	138,29 ± 2,13	333,95 ± 5,44	3,94 ± 0,51	703,47 ± 0,98	7,56 ± 1,09	6,86 ± 0,07	0,93 ± 0,65	1,39 ± 0,85
3	a	650,16 ± 16,85	586,52 ± 18,93	1076,31 ± 0,85	2,42 ± 0,29	1828,76 ± 3,02	7,11 ± 0,68	16,42 ± 3,24	15,87 ± 7,31	5,35 ± 5,04
	b	394,23 ± 1,71	399,02 ± 10,81	726,22 ± 16,06	5,19 ± 0,17	1611,40 ± 14,48	21,23 ± 6,76	34,27 ± 15,21	8,37 ± 2,44	3,53 ± 0,85
	c	224,64 ± 2,13	224,00 ± 9,72	409,15 ± 7,46	3,07 ± 1,26	1228,22 ± 25,97	8,83 ± 3,64	9,03 ± 1,41	4,84 ± 1,47	3,10 ± 1,62
	d	103,37 ± 2,47	103,46 ± 3,39	186,51 ± 1,80	1,74 ± 0,26	923,21 ± 3,48	4,20 ± 0,65	6,06 ± 1,59	2,48 ± 1,11	2,87 ± 1,96
4	a	10,14 ± 2,00	5,35 ± 1,27	25,84 ± 1,06	3,43 ± 1,42	478,09 ± 6,13	37,85 ± 0,05	1,15 ± 0,78	1,27 ± 0,17	1,35 ± 1,34
	b	6,12 ± 2,37	2,79 ± 0,35	20,00 ± 0,43	2,31 ± 0,46	414,84 ± 2,76	40,05 ± 1,47	1,59 ± 0,29	2,59 ± 0,32	0,14 ± 0,03
	c	8,28 ± 0,08	2,45 ± 0,47	15,71 ± 0,33	1,95 ± 0,35	420,11 ± 3,77	32,90 ± 0,44	2,71 ± 0,24	0,70 ± 0,48	0,26 ± 0,24
	d	4,85 ± 0,04	2,83 ± 0,25	10,25 ± 0,16	0,61 ± 0,26	197,01 ± 0,97	12,58 ± 0,25	1,34 ± 0,04	0,25 ± 0,07	0,05 ± 0,03

Tablica 6. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u ekstraktima pripremljenim UZV metodom.

Oznaka uzorka	3,4-dihidroksi- benzojeva kiselina	4-hidroksi- benzojeva kiselina	klorogenska kiselina	vanilnska kiselina	kava kiselina	p-kumarinska kiselina	t-ferulinska kiselina	o-kumarinska kiselina	cimetna kiselina	
1	a	80,82 ± 6,66	72,09 ± 0,57	559,50 ± 8,69	0,73 ± 0,23	290,75 ± 5,16	6,31 ± 2,62	5,28 ± 2,84	1,61 ± 0,60	0,38 ± 0,06
	b	256,09 ± 0,72	251,38 ± 0,05	2184,56 ± 14,26	2,14 ± 2,44	716,15 ± 18,39	20,24 ± 0,32	194,19 ± 0,89	45,17 ± 1,51	0,33 ± 0,01
	c	308,41 ± 5,57	302,13 ± 0,05	2717,53 ± 6,55	6,39 ± 1,01	974,31 ± 12,08	22,98 ± 2,86	307,14 ± 0,03	74,37 ± 1,84	1,60 ± 0,89
	d	316,09 ± 1,77	328,10 ± 2,40	2827,62 ± 44,55	7,44 ± 2,10	1278,11 ± 9,39	25,14 ± 0,08	355,21 ± 12,43	13,86 ± 0,96	3,06 ± 0,08
2	a	385,10 ± 4,36	336,67 ± 5,61	691,32 ± 7,57	2,71 ± 0,91	656,55 ± 1,16	2,02 ± 1,38	14,73 ± 4,54	2,60 ± 0,28	1,02 ± 0,45
	b	697,36 ± 0,47	643,58 ± 1,39	1356,00 ± 14,62	5,27 ± 2,63	1355,78 ± 7,89	13,20 ± 2,42	86,87 ± 6,01	6,29 ± 2,01	4,96 ± 4,27
	c	558,60 ± 13,27	478,53 ± 8,51	1045,42 ± 3,66	2,75 ± 0,74	1121,60 ± 7,60	10,81 ± 2,96	75,45 ± 5,22	7,52 ± 0,85	0,90 ± 0,49
	d	670,25 ± 39,20	606,24 ± 2,81	1298,31 ± 26,89	8,67 ± 0,23	1676,69 ± 4,18	16,43 ± 2,15	13,97 ± 2,26	1,60 ± 1,37	1,60 ± 0,30
3	a	252,22 ± 0,43	252,00 ± 5,85	454,38 ± 1,57	10,76 ± 3,97	738,05 ± 10,35	2,38 ± 2,47	3,53 ± 0,62	1,15 ± 1,15	2,80 ± 3,73
	b	484,08 ± 14,53	450,69 ± 4,98	836,48 ± 3,96	10,69 ± 6,89	1402,66 ± 14,88	13,39 ± 3,07	12,47 ± 0,70	4,65 ± 0,63	7,03 ± 1,11
	c	386,91 ± 11,02	349,26 ± 5,12	669,61 ± 12,13	2,48 ± 1,04	1263,98 ± 19,93	3,89 ± 0,13	7,96 ± 4,47	4,23 ± 4,61	0,45 ± 0,13
	d	370,97 ± 4,24	325,25 ± 14,36	613,44 ± 10,88	2,68 ± 1,49	1445,76 ± 26,73	11,25 ± 5,38	6,25 ± 1,41	2,62 ± 1,97	0,76 ± 0,74
4	a	2,97 ± 0,25	1,75 ± 0,32	15,26 ± 0,27	0,31 ± 0,21	175,16 ± 0,13	15,44 ± 3,17	0,75 ± 0,51	1,13 ± 0,76	0,85 ± 0,85
	b	4,57 ± 0,52	2,89 ± 0,04	18,54 ± 0,55	0,90 ± 0,31	282,57 ± 0,79	23,98 ± 0,77	1,70 ± 0,63	0,90 ± 0,54	1,09 ± 0,41
	c	5,21 ± 2,81	1,16 ± 0,21	8,84 ± 0,39	0,86 ± 0,39	107,97 ± 2,92	9,39 ± 0,66	0,87 ± 0,52	0,24 ± 0,12	0,23 ± 0,07
	d	14,47 ± 0,07	2,35 ± 0,13	12,43 ± 0,07	1,51 ± 0,06	264,19 ± 2,69	25,24 ± 3,71	1,16 ± 0,33	0,81 ± 0,62	0,27 ± 0,29

U ekstraktima pripremljenim UZV metodom najveća koncentracija najdominantnije klorogenske kiseline zabilježene je u uzorku 1d (80%-tni etanolni ekstrakt sirove kave) u iznosu od 2827,6 mg/L što je 1,6 puta više u odnosu na najbolji ekstrakt pripremljen metodom ASE. U odnosu na ASE metodu, kava kiselina ima nešto niže koncentracije dobivene UZV metodom. Koncentracije 3,4-dihidroksibenzojeve i 4-hidroksibenzojeve kiselinu bile su približno slične kao i kod uzoraka ekstrahiranih ASE metodom. I kod ove metode cimetna i vanilinska kiselina imaju najmanji udio, dok su koncentracija ferulinske, *o*-kumarinske i *p*-kumarinske bile različite u pojedinim uzorcima.

Uspoređujući ekstrakte sirove kave s ekstraktima pržene kave, uočava se smanjenje količine klorogenske kiseline ovisno o vrsti prženja. Primjerice, u rezultatima dobivenim UZV metodom, uzorak 1d (sirova kava) sadržavao je 2827,62 mg/L klorogenske kiseline, dok je u uzorku 2d i 3d (pržena kava) koncentracija ove kiseline bila dva odnosno pet puta niža (1298,31 mg/L i 613,44 mg/L redom). Ovaj trend pada koncentracije klorogenske kiseline tijekom prženja se uočava i kod uzorka ekstrahiranih metodom ASE. O smanjenju sadržaja klorogenske kiseline tijekom prženja govore i *Mehaya i Mohammad*³⁰. U svom radu ističući značajno smanjuje ove kiseline tijekom prženja, sa koncentracije od 34,18 mg/g koja je iznosila u sirovoj kavi do koncentracije 2,58 mg/g koja je zabilježena nakon prženja pri 220 °C u trajanju od 40 min. Autori ukazuju na povećanu razgradnju klorogenske kiseline pri visokim temperaturama što može imati utjecaja na povećanje kava i kininske kiseline dok se drugi spojevi poput kumarinske i cimetne kiseline postupno smanjuju tijekom prženja.

Kod obje metode udio klorogenske kiseline u ekstraktima nusproizvoda je gotovo zanemariv (oko 10 mg/L). Ovako niske koncentracije klorogenske kiseline su moguće zbog degradacije koja se odvija tijekom visokih temperatura prženja kave i odvajanja pokožice od zrna nakon prženja. Unatoč tome, kod uzoraka nusproizvoda uočava se veća koncentracija cimetne i *p*-kumarinske kiseline u odnosu na uzorke sirove kave. Npr. koncentracija *p*-kumarinske kiseline u uzorku sirove kave (uzorak 1a) pripremljenom metodom ASE iznosila je 21,18 mg/L, a u nusproizvodu (uzorak 4a) koncentracija je bila 37,85 mg/L (1,8 puta viša).

*Mariana de Oliviera Silva i sur*³² su iz pokožice kave metodom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom dobili veće količine klorogenske kiseline (16,64 – 337,07 mg/g) i niže koncentracije kava kiseline. Slične rezultate su dobili *Andrande i sur*³³ koji su iz ekstrakta pokožice kave i ostataka mljevene kave, dobili najveće količine klorogenske kiseline, dok su niže koncentracije bile galne kiseline, *p*-hidroksibenzojeve, protokatehinske, vanilinske i taninske kiseline.

4. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih eksperimentalnim radom, možemo izvesti nekoliko zaključaka:

- U ekstraktima pripremljenih ASE i UZV metodom količina ukupnih fenola je najveća u prženoj kavi, a najmanja u nusproizvodu kave
- Voda kao ekstrakcijsko otapalo postigla je najveći udio ukupnih fenola u uzorcima pripremljenim ASE metodom
- Kod UZV metode najveće količine ukupnih fenola dobivene su pomoću 20%-tnog etanola kod uzoraka pržene kave i nusproizvoda, dok je kod ekstrakta sirove kave to bio 80%-tni etanol
- Najveća količina klorogenske kiseline u uzorcima pripremljenim ASE metodom potvrđena je u ekstraktu sirove kave pripremljenom korištenjem destilirane vode
- Najveća količina klorogenske kiseline u uzorcima pripremljenim UZV metodom je potvrđena u uzorku sirove kave s 80%-tnim etanolom
- Kod obiju ekstrakcijskih metoda u testiranim uzorcima najmanji udio zabilježen je za cimetnu i vanilinsku kiselinu.
- Nusproizvod kave, u odnosu na uzorke sirove i pržene kave, ima najmanje koncentracije klorogenske i kava kiseline dok su koncentracije *p*-kumarinske i cimetine kiseline bile veće.

Na osnovu svega navedenog možemo zaključiti da je potrebno provesti dodatna istraživanja na ovim uzorcima, osobito nusproizvodima, kako bi se mogla opravdati njihova potencijalna primjene u prehrambenoj industriji.

5. LITERATURA

1. *Laura Bravo, Ph.D.*, Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, Vol. 56, No. 11 (1998) 317 – 333
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
2. *Chiara Di Lorenzo, Francesca Colombo, Simone Biella, Creina Stockley and Patrizia Restani*, Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability, *Nutrients* (2021) 13, 273., DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13010273>
3. *Maria de Lourdes Reis Giada*, Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/51687>
4. *Aline Felten Bondam, Daisele Diolinda da Silveira, Jessica Fernanda Hoffmann, Jaqueline Pozzada dos Santos*, Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries, *Trends in Food Science & Technology* (2022) 172 – 186
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.013>
5. *Ostilio R. Portillo, Ana C. Arévalo*, Coffee's Phenolic Compounds. A general overview of the coffee fruit's phenolic composition (2022)
DOI: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.03.31>
6. Slika1. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid# (31.7.2024.)
7. *Adriana Farah and Carmen Marino Donangelo*, Phenolic compounds in coffee, *Braz. J. Plant Physiol.*, (2006) 18(1):23-36
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>
8. *María Elena Cartea, Marta Francisco, Pilar Soengas and Pablo Velasco*, Phenolic Compounds in Brassica Vegetables, *Molecules* (2011) 16, 251-280
DOI: doi:10.3390/molecules16010251
9. *Wanessa Costa Silva Faria, Matheus Gabriel de Oliveira, Edemilson Cardoso da Conceição, Vinicius Barreto Silva, Natalie Veggi, Attilio Converti, Wander Miguel de Barros, Milena Fernandes da Silva, Neura Bragagnolo*, Antioxidant efficacy and in silico toxicity prediction of free and spray-dried extracts of green Arabica and Robusta coffee fruits and their application in edible oil, *Food Hydrocolloids* 108 (2020) 106004
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106004>

10. *Tugba Ozdal, Esra Capanoglu, Filiz Altay*, A review on protein–phenolic interactions and associated changes, *Food Research International* 51 (2013) 954–970, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
11. *Caio E.G. Reis, JoseG.Dorea, Teresa H.M. da Costa*, Effects of coffee consumption on glucose metabolism: A systematic review of clinical trials, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* xxx (2018) 1-8
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.01.001>
12. *Hanjing Wu, Jingyu Gu Hafiz A.R. Suleria, Amrit BK, Malik A. Nawaz, Colin J. Barrow, Frank R. Dunshea*, Effect of processing on bioaccessibility and bioavailability of bioactive compounds in coffee beans, *Food Bioscience* 46 (2022) 101373, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101373>
13. *Helena Drmić, Anet Režek Jambrak*, Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.* (2010) 2 (2) 22-33
14. *Monika Blekić, Anet Režek Jambrak, F. Chemat*, Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.* (2011) 3 (1) 32-47
15. *Palash Panja*, Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials, *COFS* (2017), DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.cofs.2017.11.012>
16. *Ceferino Carrera, Ana Ruiz-Rodríguez, Miguel Palma, Carmelo G. Barroso*, Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes, *Analytica Chimica Acta* 732 (2012) 100–104 , DOI: 10.1016/j.aca.2011.11.032
17. *Monalise Marcante Meregalli, Bruna Maria Saorin Puton, Fernanda Dal’Maso Camera, Alexandre Umpierrez Amaral, Jamile Zeni, Rogerio Luis Cansian, Marcelo Luis Mignoni, Geciane Toniazco Backes*, Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araca peel (*Psidium cattleianum* Sabine), *Arabian Journal of Chemistry* (2020) 13, 5800–5809, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.017>
18. *Farid Chemat, Zill-e-Huma, Muhammed Kamran Khan*, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonics Sonochemistry* 18 (2011) 813–835,
DOI: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023
19. Slika 2. URL: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-extraction-system-using-UAE-coupled-with-circuit-water-bath-cooler_fig1_366024504 (31.7.2024.)
20. *Hanna Giergielewicz-Możajska, Łukasz Dąbrowski and Jacek Namieśnik*, Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some

Aspects of Theory and Practice, Critical Reviews in Analytical Chemistry (2001) 31(3):149–165

DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/20014091076712>

21. *Hanwen Sun, Xusheng Ge, Yunkai Lv, Anbang Wang*, Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed, *Journal of Chromatography A*, 1237 (2012) 1– 23, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.003
22. *Rizwan Ahmad, Ali Bukhamseen, Niyaz Ahmad, Saad Abuthayn, Sadeq Alkhars, Ali Alkhars, Mohammed Aqeel, Mohammed Alyousif, Ahmed Aljamea*, Green accelerated solvent extraction (ASE) with solvent and temperature effect and green UHPLC-DAD analysis of phenolics in pepper fruit (*Capsicum annum L.*), *Journal of Food Composition and Analysis* 97 (2021) 103766
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103766>
23. Slika 3. URL: <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/743-Accelerated-Solvent-Extraction-With-Acid-Pretreatment-for-Improved-Laboratory-Productivity/> (31.7.2024.)
24. *Cecilia Sparr Eskilsson, Erland Bjorklund*, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 227–250
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
25. Slika 4. URL: https://www.researchgate.net/figure/A-flow-chart-showing-assembly-of-microwave-assisted-extraction-MAE_fig9_333647843 (31.7.2024.)
26. *Anabela S.G. Costa, Rita C. Alvesa, Ana F. Vinha, Sérgio V.P. Barreira, Maria A. Nunes, Luís M. Cunha, M. Beatriz P.P. Oliveira*, Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process, *Industrial Crops and Products*, 53 (2014) 350– 357
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.006>
27. *Yannick Patrice Didion, Tjalling Gijsbert Tjalsma, Ziran Su, Magdalena Malankowska, Manuel Pinelo*, What is next? the greener future of solid liquid extraction of biobased compounds: Novel techniques and solvents overpower traditional ones, *Separation and Purification Technology* 320 (2023) 124147
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124147>
28. *Singleton, V. L., & Rossi, J. A.*, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, (1965)16, 144–158.

29. *Solange I. Mussatto, Lina F. Ballesteros, Silvia Martins, José A. Teixeira*, Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds, *Separation and Purification Technology* 83 (2011) 173–179
DOI: 10.1016/j.seppur.2011.09.036
30. *Fathy M. Mehaya, Ayman A. Mohammad*, Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans, *Heliyon* 6 (2020) e05508
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05508>
31. *Jimena Bravo, Carmen Monente, Isabel Juániz, M. Paz De Peña, Concepción Cid*, Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee, *Food Research International* 50 (2013) 610–616
DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.026
32. *Mariana de Oliveira Silva, John Nonvignon Bossis Honfoga, Lorena Lucena de Medeiros, Marta Suely Madruga and Taliana Kênia Alencar Bezerra*, Obtaining Bioactive Compounds from the Coffee Husk (*Coffea arabica* L.) Using Different Extraction Methods, *Molecules* (2021) 26, 46.
DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/molecules26010046>
33. *Kátia S. Andrade, Ricardo T. Goncalvez, Marcelo Maraschin, Rosa Maria Ribeiro-do-Valle, Julian Martínez, Sandra R.S. Ferreira*, Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition, *Talanta* 88 (2012) 544– 552, DOI: 10.1016/j.talanta.2011.11.031

Prilog 1. Sažetak i potvrda o prihvaćanju posterske prezentacije rada

IMPACT OF EXTRACTION METHOD AND SOLVENT ON CAFFEIC AND CHLOROGENIC ACID CONTENT IN COFFEE BY-PRODUCT EXTRACTS

Danijela SKROZA^{1*}, Jelena PAPIĆ¹, Petra BRZOVIĆ¹, Barbara SOLDO², Vida ŠIMAT³

¹ *Department of Food Technology and Biotechnology, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, R. Boškovića 35, HR-21000 Split, Croatia*

² *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Split, R. Boškovića 33, HR-21000 Split, Croatia*

³ *University Department of Marine Studies, University of Split, HR-21000 Split, Croatia*
**danci@ktf-split.hr*

Coffee by-products such as pulp, husks and coffee grounds are rich in bioactive compounds, including phenolic acids. The efficiency of extraction of phenolic acids from these by-products can be significantly influenced by the extraction method and the choice of solvent. Current research focuses on green extraction principles. The aim of this study was to investigate the effects of ultrasound-assisted extraction (UAE) and accelerated solvent extraction (ASE) as well as different water and ethanol solvent ratios on the total phenolic content and the dominant phenolic acids, caffeic acid and chlorogenic acid, in coffee husks left after roasting. Total phenols (TP) were determined spectrophotometrically, while chlorogenic and caffeic acids were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The optimization of these parameters aimed to maximize the recovery of phenolic acids, improve the use of coffee by-products and promote sustainability in the coffee industry. The results showed a significant TP content in all samples (343.3-1126.7 mg GAE/L), with caffeic acid being more dominant than chlorogenic acid (11- to 26-fold). The differences in the results were significantly influenced by the solvent used and the extraction method. In ASE extracts, TP decreased with decreasing water content in the solvent mixture, a trend that was not observed in UAE extracts. The influence of the solvent was evident in the levels of caffeic and chlorogenic acid, with ASE extracts showing higher levels than UAE extracts. This study provides valuable insights for the development of efficient extraction processes to produce high-quality extracts that can potentially be used as natural additives in the food industry.

Keywords: coffee by-product, phenolic compounds, chlorogenic acid, caffeic acid

Acknowledgment: This research is supported by the PRIMA program under project AgriBioPack. The PRIMA program is supported by the European Union.



1st *International congress of sustainable ecosystems in Mediterranean area*

October 2-3, 2024.
Split, Croatia



STEcoMed2024

1st International congress of sustainable ecosystems of Mediterranean area

LETTER OF ACCEPTANCE

Dear Dr. Skroza,

On behalf of the STEcoMED 2024 team, it gives me great pleasure to inform you that your abstract titled: "IMPACT OF EXTRACTION METHOD AND SOLVENT ON CAFFEIC AND CHLOROGENIC ACID CONTENT IN COFFEE BY-PRODUCT EXTRACTS" has been accepted for POSTER presentation at the 1st International congress of sustainable ecosystems of Mediterranean area that will be held on October 2-3, 2024. in Split, Croatia.

Your participation and contribution will be a valuable asset to the success of the event.

Website: <https://stecommed2024.more.unist.hr/>

We are looking forward to hosting you in Split!

Best wishes,

The Scientific Committee of the STEcoMed2024