

Antioksidativna svojstva sušenih ekstrakata iz otpadne espreso kafe

Milica D. Milutinović, Slavica S. Šiler-Marinković, Dušan G. Antonović, Katarina R. Mihajlovski, Marija D. Pavlović, Suzana I. Dimitrijević-Branković

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

Izvod

U radu je određivan sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost osušenih ekstrakata otpadne espreso kafe dobijenih primenom različitih rastvarača. Kao rastvarači, u ekstrakcijama su korišćeni 70% rastvor metanola, 70% rastvor etanola i destilovana voda. Određen je ukupan sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost metodama inhibicije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala i FRAP (engl. *ferric reducing antioxidant power*). Inhibicija DPPH radikala je izražena preko IC_{50} vrednosti, a rezultati su poređeni sa rezultatima komercijalnih antioksidanata, askorbinskom kiselinom i BHT (butil-hidroksi-toluen). Obe metode su potvrdile da je redosled antioksidativne aktivnosti dobijenih suvih ekstrakata sledeći: vodeni ekstrakt < metanolni ekstrakt < etanolni ekstrakt. Poređenjem sa vrednostima IC_{50} za askorbinsku kiselinu i BHT može se zaključiti da ekstrakti otpadne kafe mogu biti dobar izvor prirodnih antioksidanata.

Ključne reči: polifenoli, antioksidativna aktivnost, DPPH, FRAP, otpadna espreso kafa.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Kafa je jedno od najpopularnijih i najčešće konzumiranih pića. Ova biljka pripada rodu *Coffea* i familiji *Rubiaceae*. Najznačajnije su dve vrste kafe, Arabika (*Coffea arabica*) i Robusta (*Coffea canephora*) [1]. Espresso kafa se dobija od ove dve vrste, a priprema se pomoću aparata kojim se, pod pritiskom od 9 bar, mala količina vrele vode propušta kroz gusto spakovani takozvani kolač mlevene, pržene kafe u trajanju od oko 30 s [2]. Kafa je poznata po svojim antioksidativnim sposobnostima, tako da ima značajan uticaj u prevenciji dijabetesa, ateroskleroze, kancera, a takođe pokazuje i antimutagenu aktivnost [3,4]. Izvori antioksidativne aktivnosti kafe su polifenoli, odnosno fenolne kiseline, naročito hlorogenska kiselina koja čini oko 56±11% ukupnih polifenola [5]. Osim hlorogenske, kafeinska, kumarinska i ferulinska kiselina, prisutne u manjim količinama u kafi, takođe pokazuju biološki aktivna svojstva. Pored polifenolnih kiselina, antioksidativnu aktivnost pokazuju i nefenolne komponente, kofein i trigonelin [6]. Iako se u toku pečenja kafe sadržaj polifenola smanjuje, nastaju novi proizvodi, melanoidini, koji su proizvodi Majlardove (Maillard) reakcije, a nastaju od šećera i aminokiselina. Melanoidini takođe pokazuju značajne antioksidativne sposobnosti i sprečavaju oksidaciju lipida [6–9].

Otpad koji se dobija prilikom proizvodnje konzumne kafe predstavlja veliki problem. Mnogi su pokušaji korišćenja otpadne kafe kao đubriva, hrane za životinje ili kao goriva [10,11].

Prepiska: S.I. Dimitrijević-Branković, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija.

E-pošta: suzana@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 10. april, 2012

Rad prihvaćen: 20. jun, 2012

NAUČNI RAD

UDK 66.061:641.87:547.565

Hem. Ind. 67 (2) 261–267 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120410074M

Otpadna kafa koja se dobija prilikom pripreme espreso kafe sadrži značajne količine biološki vrednih sastojaka kao što su antioksidanti, mada su količine polifenola manje u odnosu na polaznu kafu, jer u toku pripremanja dolazi do ekstrakcije većine rastvorljivih komponentata [12]. Iako su brojna istraživanja bila usmerena na mogućnosti iskorišćenja različitih tipova otpada iz proizvodnje i konzumiranja kafe [13], tek u skorije vreme se ispituju mogućnosti dobijanja biološki aktivnih preparata na bazi ekstrakata iz otpadne kafe [14,15]. U ovom radu je ispitivan uticaj različitih rastvarača na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata otpadne espreso kafe s ciljem utvrđivanja mogućnosti njihove potencijalne primene, kao prirodnih antioksidanasa, u industriji hrane.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal

Sve hemikalije korišćene u radu su čistoće p.a, dobavljača Sigma Chemical Co. (St. Luis, USA), Aldrich Chemical Co. (Steineheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) i Sineks laboratory, Srbija). Kao rastvarači korišćeni su metanol (70% rastvor), etanol (70% rastvor) i destilovana voda. U metodi određivanja ukupnog sadržaja polifenola korišćeni su Folin-Ciocalteus reagens i natrijum karbonat, a kao standard u toj metodi korišćena je galna kiselina. U metodi određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata otpadne kafe kao slobodan radikal korišćen je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Kao referentne supstance, u odnosu na koje se vršilo poređenje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala eksperimentalnih uzoraka, korišćene su askorbinska kiselina i butilhidroksi toluen (BHT).

Kao polazni materijal za ekstrakciju, korišćena je otpadna kafa iz pripreme espresso kafe „Cream caffe“ Italija. Otpadna kafa je sušena u termostatu na 44 °C, 48 h do sadržaja vlage od oko 10%.

Ekstrakcija polifenola i priprema uzoraka

Polifenoli su ekstrahovani po metodi Yen i sar. [12], sa manjim modifikacijama. 30 g otpadne kafe je rastvoreno sa 300 ml odgovarajućeg rastvarača. Ekstrakcija je izvođena na sobnoj temperaturi, tokom 2 h, uz konstantno mešanje. Nakon ekstrakcije izvršeno je razdvajanje ekstrakta od taloga (centrifugiranjem u toku 10 min, 4500 obrt/min, Sigma 2-16). Dobijeni supernatant je odvojen, a talog je korišćen za reekstrakciju sa 150 ml odgovarajućeg rastvarača, pod istim uslovima. Nakon reekstrakcije, ponovljen je postupak razdvajanja ekstrakta od taloga i dobijeni supernatant je dodat prethodnom. Dobijeni ekstrakti su zatim uparavani u vakuum uparivaču kako bi se uklonio etanol, dopunjeni do iste zapremine (200 ml), a nakon toga su sušeni u sprej sušnici (Büchi, Mini Spray Dryer B-290) pri inlet temperaturi od 170 °C (zadata) i outlet temperaturi (u uzorku) oko 80 °C. Na taj način su dobijeni metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti u prahu (vlaga ~4%) koji su dalje korišćeni za analizu.

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima u prahu je određen prema Folin-Ciocalteu metodi [16,17], sa manjim modifikacijama. Ekstrakti u prahu su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentraciji od 10 mg s.m./ml. U 100 µl rastvorenog ekstrakta je dodato 500 µl Folin–Ciocalteu reagensa i 6 ml destilovane vode. Nakon toga je dodato 2 ml 15% rastvora Na₂CO₃ i rastvor je dopunjen do 10 ml destilovanom vodom. Apsorbancija je merena nakon 2 h na 750 nm na spektrofotometru UV/Vis Ultrospec 3300 Pro (Amersham Bioscience). Kao standardna kriva, korišćen je rastvor galne kiseline, a rezultati su izraženi kao mg galne kiseline (GK) po g suve materije ekstrakta.

Određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanjem sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost neutralizacije DPPH radikala je određena po metodi Lee i saradnika [17]. Suvi ekstrakti su rastvoreni u destilovanoj vodi tako da su dobijene različite koncentracije, od 0,1 do 20 mg/ml. Po 50 µl rastvora ekstrakta je dopunjeno metanolom do 4 ml. Tom rastvoru je dodat 1 ml 0,2 mmol rastvora DPPH u metanolu. Na taj način su dobijeni rastvori koncentracije od 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 i 200 µg/ml. Sadržaj epruvete je snažno promućkan i ostavljen na sobnoj temperaturi, u mraku 30 min, a nakon toga je izmerena apsorbancija na 517 nm, uz čist metanol kao slepu probu. Kao kontrolni uzorak korišćena je destilovana voda (50 µl).

Rezultati su izraženi kao procenti inhibicije, odnosno neutralizacije slobodnih DPPH radikala u odnosu na kontrolu i računati su prema sledećoj jednačini:

$$\text{Inibicija} = 100(A_k - A_A)/A_k$$

gde su A_k – apsorbancija kontrole i A_A – apsorbancija uzorka.

Vrednosti IC_{50} (koncentracije uzoraka koje su potrebne za inhibiciju 50% početne količine DPPH radikala) izračunate su korišćenjem programa Origin Pro 7.

FRAP metoda

FRAP metoda se zasniva na sposobnosti fenolnih supstanci, rastvornih u vodi, da redukuju Fe³⁺ do Fe²⁺. Nastali Fe²⁺ sa TPTZ reagensom (2,4,6-tripiridil-s-triazin) stvara plavo obojeni kompleks čiji se apsorpcijski maksimum očitava na 593 nm. Reakcija se odigrava u kiselj sredini (pH 3,6). Metoda je izvedena prema standardnoj proceduri koju su opisali Benzie i Strain [18] uz manje modifikacije. Suvi ekstrakti su rastvoreni u vodi do koncentracije od 1 mg/ml. 150 µl rastvora je dodato u 4,5 ml radnog FRAP rastvora koji se sastoji od 25 ml acetatnog pufera (pH 3,6), 2,5 ml 10 mmol rastvora TPTZ u 40 mmol HCl i 2,5 ml 20 mmol rastvora FeCl₃·6H₂O. Za standardnu krivu je korišćen sveže pripremljen rastvor FeSO₄·7H₂O različitih koncentracija (200, 400, 600, 800 i 1000 µmol/l). Apsorbancija je merena nakon 5 min na 593 nm, a rezultati su izraženi kao mmol Fe²⁺/l.

Statistička analiza

Statistička analiza je izvedena u programu Origin Pro 7. Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna merenja. Podaci su analizirani pomoću analize varijanse (one-way ANOVA), a Tukey test je primenjen kao test za poređenje srednjih vrednosti sa nivoom značajnosti od 0,01.

REZULTATI I DISKUSIJA

Sadržaj polifenola

Za ekstrakciju polifenolnih komponenti iz otpadne kafe korišćeni su različiti rastvarači kako bi se odredio njihov uticaj na prinos, sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost dobijenih ekstrakata. Prinos ekstrakcije je izražen u procentima (g s.m. dobijenog ekstrakta na 100 g s.m. otpadne espresso kafe), a sadržaj ukupnih polifenola je izražen u mg galne kiseline/g s.m. uzorka. Rezultati ovih određivanja su sumirani u tabeli 1.

Prema dobijenim rezultatima, ukupna suva materija ekstrakta je veća kada se za ekstrakciju koristi destilovana voda (8,12%) u odnosu na rastvore metanola i etanola (<4,5%). Slični rezultati su dobijeni u radu Yen i saradnika [12] gde je ukupan prinos vodenog ekstrakta otpadne kafe bio 4,7 puta veći u odnosu na etanolni

Tabela 1. Prinos ekstrakcije, ukupan sadržaj polifenola, vrednosti IC₅₀ i FRAP vrednosti u dobijenim ekstraktima otpadne espreso kafe; vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b, c,...) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju (P = 0.01)

Table 1. Extraction yield, total polyphenol content, IC₅₀ and FRAP values of extracts obtained from spent espresso coffee

Uzorak	Ukupna suva materija ekstrakta %	Ukupan sadržaj polifenola mg GK/g s.m. uzorka	IC ₅₀ μg ml ⁻¹	FRAP vrednosti ^a mmol Fe ²⁺ /l
E1 (70% metanol)	1,42	256,2±1,0 ^a	5,87±0,07 ^a	2,1±0,10 ^a
E2 (70% etanol)	4,33	283,5±0,5 ^b	3,63±0,03 ^b	2,57±0,11 ^b
E3 (dH ₂ O)	8,12	100,8±0,6 ^c	24,91±0,10 ^c	0,98±0,02 ^c
Askorbinska kiselina	–	–	5,97±0,08 ^a	–
BHT	–	–	3,03±0,03 ^d	–

^aKoncentracija rastvorenog uzorka: 1 mg/ml

ekstrakt. Razlog tome je manja selektivnost vode kao rastvarača u kojoj se, pored polifenolnih komponenti, rastvaraju i druge komponente otpadne kafe kao što su proteini i ugljeni hidrati [19]. Međutim, sadržaj polifenola u suvom ekstraktu nije proporcionalan prinosu i raste ovim redosledom: voda < metanolni rastvor < etanolni rastvor.

Ekstrakcija je najvažnija faza u izolaciji polifenola. Rastvorljivost polifenola zavisi od stepena polimerizacije, interakcije sa drugim komponentama i polarnosti rastvarača [19]. Polifenoli su često rastvorljiviji u rastvaračima koji su manje polarni od vode. Efektivnost ekstrakcije zavisi od mnogih faktora poput selektivnosti rastvarača, pH i temperature [20,21]. Priroda materijala iz kojeg se izoluju polifenoli takođe utiče na efektivnost rastvarača [22]. Najčešće korišćeni rastvarači za ekstrakciju polifenolnih komponenti iz biljnih materijala su metanol, etanol, aceton, etilacetat. Veoma polarne fenolne kiseline (kao što su benzoeve i cinaminske kiseline) ne mogu se ekstrahovati čistim organskim rastvaračima pa se uglavnom koriste njihovi vodeni rastvori u različitim odnosima. Najveći prinosi se obično dobijaju korišćenjem rastvora metanola i etanola. Vodeni rastvor etanola je posebno pogodan zbog niske toksičnosti, visokih prinosa i ekonomičnosti [23]. U našem radu je najveći sadržaj ukupnih polifenola dobijen korišćenjem 70% rastvora etanola, zatim 70 % rastvora metanola, a voda se pokazala kao najmanje efikasna za ekstrakciju polifenolnih komponenti iz otpadne espreso kafe (tabela 1). Slične rezultate su dobili Bravo i saradnici [24] u analizi uticaja rastvarača na sadržaj polifenola i antioksidativna svojstva ekstrakta otpadne kafe. Prema njihovim rezultatima, najveći sadržaj polifenola u ekstraktima je ostvaren korišćenjem 60 i 20% rastvora etanola, dok je povećanje udela metanola u vodenom rastvoru dovelo do smanjenja sadržaja polifenola u ekstraktu. Franco i saradnici [25] ispitivali su uticaj rastvarača na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata iz semena različitih biljaka. Poredeći polarnost rastvarača i inhibiciju DPPH radikala, ustanovili su da je etanol, kao slabije polaran rastvarač od metanola i vode dao najbolji prinos ekstrakcije izražen preko inhibicije DPPH radikala. Spirad i saradnici

[26] ustanovili su da je vodeni rastvor etanola bio efikasniji u izdvajanju polifenolnih komponenti iz sunco-kretovog zrna u odnosu na vodeni rastvor metanola.

Voda kao rastvarač ima brojne prednosti u odnosu na organske rastvarače, pre svega zbog svojih neškodljivih efekata i ekonomičnosti. Međutim, vodeni ekstrakti, pored polifenola, obično sadrže veću količinu drugih komponenti, posebno ugljenih hidrata koji imaju veliki udeo u sastavu otpadne kafe [14]. Pored toga, pH vrednost vode kao rastvarača može znatno uticati na ekstrakciju pojedinih polifenolnih komponenti [20]. U našem radu, ekstrakcija destilovanom vodom je dala najveći ukupan prinos ekstrakcije ali najmanji sadržaj ukupnih polifenola u dobijenom ekstraktu (tabela 1). Pored toga, sadržaj ukupnih šećera u dobijenom vodenom ekstraktu je najveći (rezultati nisu prikazani). Treba napomenuti da je proces ekstrakcije u našem radu vođen na sobnoj temperaturi. U radu Upadhyay i saradnika [27], vodeni ekstrakt kafe dobijen primenom mikrotalasnog tretmana (temperatura 50 °C) sadržao je najveći procenat ukupne suve materije kao i najveći udeo hlorogenske kiseline i kofeina u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom čistog metanola i etanola kao rastvarača. U tom smislu, primena povišenih temperatura pri ekstrakciji otpadne espreso kafe vodom bi verovatno dala bolje rezultate.

Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom

Jedna od metoda za određivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata je metoda neutralizacije DPPH radikala. Princip ove metode je da antioksidanti reaguju sa slobodnim DPPH radikalom (ljubičasto obojen rastvor) i prevode ga u bezbojni DPPH-H (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin). Stepem obezbojavanja ukazuje na antioksidativni potencijal ekstrakata [3]. Antioksidansi reaguju sa slobodnim radikalom i na taj način prekidaju lančanu reakciju oksidacije donirajući vodonik iz hidroksilne grupe polifenola. Oni tako daju stabilan krajnji proizvod i zaustavljaju reakcije oksidacije lipida [5].

Rezultati prikazani u tabeli 2 pokazuju da najbolju antioksidativnu aktivnost poseduje etanolni ekstrakt. Pri koncentraciji od 100 μg/ml stepen neutralizacije DPPH radikala iznosi 98,39±0,20%, a za njim slede me-

Tabela 2. Inhibicija DPPH radikala kod dobijenih ekstrakta otpadne espresso kafe; vrednosti označene različitim slovnim oznakom (a, b, c,...) unutar pojedinih kolona se značajno razlikuju ($P = 0.01$)

Table 2. Inhibition of DPPH radicals of extracts obtained from spent espresso coffee

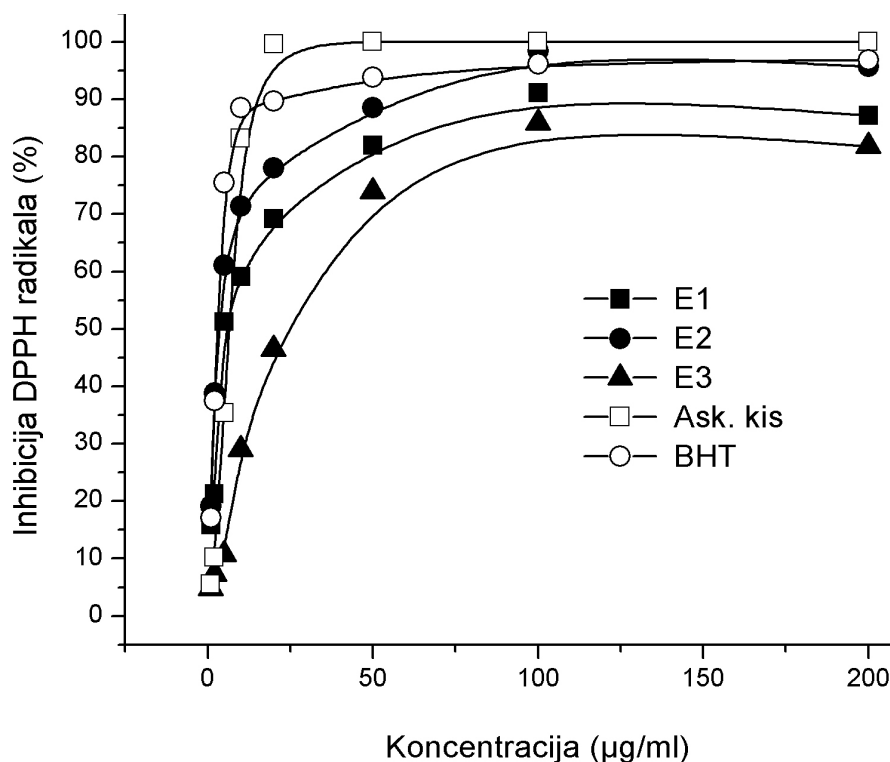
Uzorak	Koncentracija, $\mu\text{g/ml}$							
	1	2	5	10	20	50	100	200
E1	15,87 \pm 0,87 ^a	21,29 \pm 0,53 ^a	51,29 \pm 0,62 ^a	59,16 \pm 0,45 ^a	69,22 \pm 1,00 ^a	82,00 \pm 0,20 ^a	91,15 \pm 0,09 ^a	87,18 \pm 0,19 ^a
E2	19,16 \pm 1,00 ^b	38,82 \pm 0,72 ^b	61,08 \pm 0,82 ^b	71,40 \pm 0,55 ^b	78,06 \pm 1,00 ^b	88,54 \pm 0,40 ^b	98,39 \pm 0,20 ^b	95,75 \pm 0,21 ^b
E3	4,84 \pm 0,88 ^c	7,39 \pm 0,42 ^c	10,75 \pm 0,38 ^c	29,04 \pm 0,65 ^c	46,50 \pm 0,50 ^c	73,92 \pm 0,45 ^c	85,95 \pm 0,30 ^c	81,82 \pm 0,15 ^c

tanolni i vodeni ekstrakti, sa vrednostima 91,15 \pm 0,09 i 85,95 \pm 0,30%, redom. Yen i saradnici [12] ustanovili su da vodeni ekstrakt otpadne kafe pri koncentraciji od 200 $\mu\text{g/ml}$ pokazuje inhibitorni efekat DPPH radikala od 95,4%. Takođe su zaključili da se u otpadnoj kafi, osim polifenola nalaze i melanoidini, proizvodi Majlardove reakcije, koji nastaju u toku pečenja kafe i da su velikim delom oni zaslužni za antioksidativnu aktivnost otpadne kafe. U radu Murthy i Naidu [15], ekstrakt otpadne kafe, koncentracije 50 $\mu\text{g/ml}$, dobijen ekstrakcijom smešom izopropanol–voda (60:40), pokazuje inhibiciju DPPH radikala ispod 75%.

Veće koncentracije, od 200 $\mu\text{g/ml}$, koje su primenjene u ovom radu, pokazale su blago opadanje procenta inhibicije DPPH radikala, za sve ekstrakte (slika 1). To ukazuje na potencijalno prooksidativno dejstvo ekstrakta. Neke fenolne komponente manje molekulske

mase, kao što su kafeinska kiselina, taninske kiseline i galna kiselina [23,28] pod određenim uslovima, umesto da terminiraju lanac slobodnih radikala, reaguju sa kiseonikom i proizvode kinone ($P=O$) i superoksidne anjone (O_2^-). Uslovi koji iniciraju njihovu autooksidaciju su visoka vrednost pH sredine, tranzitni metalni joni i prisutni molekuli kiseonika [23]. *In vitro* ispitivanja na različitim tipovima tumorskih ćelija pokazuju da je prooksidativno svojstvo polifenola jedan od glavnih uzroka inhibicije umnožavanja tumorskih ćelija. Jedan od ustanovljenih mehanizama antiproliferativnog dejstva je oksidativno cepanje DNK lanaca tumorskih ćelija [23].

Procenat inhibicije i IC_{50} vrednosti (koncentracija antioksidansa koja obezbeđuje 50% inhibicije početne količine slobodnih radikala) često se koriste kao parametri za kvantifikaciju antioksidativnog svojstva. U našem radu, ustanovljene vrednosti IC_{50} za etanolni, me-



Slika 1. Grafički prikaz zavisnosti inhibicije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta otpadne espresso kafe, u poređenju sa komercijalnim antioksidansima, askorbinskom kiselinom i BHT (E1 – 70% metanol, E2 – 70% etanol, E3 – dH_2O).

Figure 1. Graphic of DPPH inhibition depending on the concentration of spent espresso coffee extracts, compared with commercial antioxidant ascorbic acid and BHT (E1 – 70% metanol, E2 – 70% etanol, E3 – dH_2O).

tanolni i vodeni ekstrakt iznose $3,63 \pm 0,03$, $5,87 \pm 0,07$ i $24,91 \pm 0,10$ $\mu\text{g/ml}$, redom. Ove vrednosti su upoređene sa dobijenim vrednostima IC_{50} za askorbinsku kiselinu i BHT (slika 1), koji se primenjuju kao komercijalni antioksidansi, a koje iznose $5,97 \pm 0,08$ i $3,03 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$, redom. Može se uočiti da je koncentracija etanolnog ekstrakta, potrebna za neutralizaciju 50% DPPH radikala malo viša od potrebne koncentracije BHT, dok je skoro upola niža od koncentracije askorbinske kiseline. Metanolni ekstrakt ima IC_{50} vrednosti koje su približne vrednosti za askorbinsku kiselinu. Vodeni ekstrakt je pokazao znatno više vrednosti IC_{50} u odnosu na komercijalne antioksidanse. Poredeći rezultate antioksidativne aktivnosti izražene preko IC_{50} vrednosti i rezultate određivanja sadržaja ukupnih polifenola (tabela 1), može se uočiti obrnuta linearna zavisnost. Drugim rečima, antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata zavisi od sadržaja polifenola, odnosno, viši sadržaj polifenola u ekstraktu daje nižu IC_{50} vrednost (slika 2).

Antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom

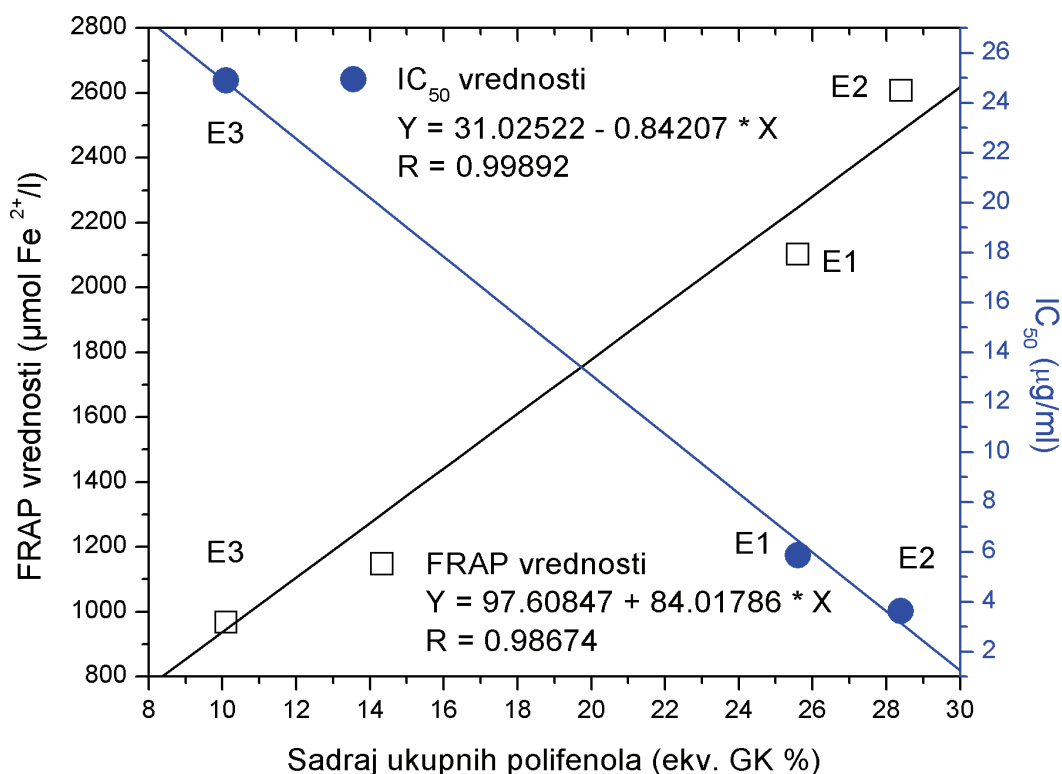
FRAP metoda pripada grupi metoda kojima se određuju antioksidativna svojstva koja se zasnivaju na transferu elektrona. Ove metode mere kapacitet antioksidansa da redukuju prisutnu oksidativnu komponentu uz promenu boje koja se određuje spektrofotometrijski. Stepenn promene boje je proporcionalan koncentraciji

antioksidansa. Za razliku od inhibicije DPPH radikala, koja je pogodna za antioksidanse rastvorne u organskim rastvaračima (etanolu, metanolu), FRAP metoda određuje antioksidativna svojstva antioksidanasa rastvornih u vodi [23]. U kompleksnim sistemima, kao što su prirodni ekstrakti sa različitim polifenolnim komponentama, korisno je izvršiti uporedno ispitivanje antioksidativne aktivnosti različitim metodama.

FRAP vrednosti u našem radu ukazuju na značajnu razliku u pogledu antioksidativnih svojstava dobijenih ekstrakata i u saglasnosti su sa dobijenim vrednostima za inhibiciju DPPH radikla. Dobijene FRAP vrednosti su iznosile $2,57 \pm 0,11$, $2,10 \pm 0,10$ i $0,98 \pm 0,02$ $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{l}$ za etanolni, metanolni i vodeni ekstrakt, redom. Poredeći rezultate antioksidativne aktivnosti izražene preko FRAP vrednosti i rezultate određivanja sadržaja ukupnih polifenola (tabela 1), može se uočiti direktna linearna zavisnost (slika 2), odnosno viši sadržaj polifenola u ekstraktu daje višu FRAP vrednost. Direktna zavisnost FRAP vrednosti i sadržaja polifenola je ustanovljena i u radu Sanchez-Gonzalez i saradnika [4].

ZAKLJUČAK

Otpadna kafa, zaostala nakon pripremanja napitka espresso kafe, svakodnevno se dobija u velikim količinama i odbacuje kao komunalni otpad. Međutim, no-



Slika 2. Grafički prikaz korelacije antioksidativne aktivnosti izražene preko IC_{50} i FRAP vrednosti i sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu (E1 – 70% metanol, E2 – 70% etanol, E3 – dH_2O).

Figure 2. Graphic of correlation of antioxidant activity expressed by IC_{50} and FRAP values and total polyphenols content in the extract (E1 – 70% methanol, E2 – 70% ethanol, E3 – dH_2O).

vija istraživanja ukazuju na veliki potencijal iskorišćenja otpadne kafe za dobijanje prirodnih antioksidanasa. Za potpuno iskorišćenje otpadne kafe mora se izvršiti optimizacija procesa ekstrakcije. U ovom radu je pokazano da ekstrakti otpadne espresso kafe pokazuju znatan antioksidativan potencijal, uporediv sa komercijalnim antioksidansima. Iako etanolni rastvor daje ekstrakt sa najvišom antioksidativnom aktivnošću, imajući u vidu ekonomičnost i smanjenje korišćenja organskih rastvarača u procesu, rezultati dobijeni primenom vodene ekstrakcije se mogu smatrati zadovoljavajućim. Vodeni ekstrakti, koji bi se mogli primeniti za dobijanje dijetetskih preparata, imaju prednost i sa aspekta bezbednosti hrane. Dalja optimizacija procesa ekstrakcije vodom bi mogla dovesti do razvoja novih preparata primenljivih u prehrambenoj industriji.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, projekat broj TR 31035.

LITERATURA

- [1] P. Parras, M. Martinez-Tome, A.M. Jimenez, M.A. Murcia, Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures, *Food Chem.* **102** (2007) 582–592.
- [2] M. Petracco, Our everyday cup of coffee: The chemistry behind its magic, *J. Chem. Edu.* **82** (2005) 1161–1167.
- [3] K. Ramalakshmi, J.L. Mohan Rao, Y. Takano-Ishikawa, M. Goto, Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems, *Food Chem.* **115** (2009) 79–85.
- [4] I. Sanchez-Gonzalez, A. Jimenez-Escrig, F. Saura-Calixto, In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter), *Food Chem.* **90** (2005) 133–139.
- [5] M.M. Naidu, G. Sulochanamma, S.R. Sampathy, P. Srinivas, Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee, *Food Chem.* **107** (2008) 377–384.
- [6] I. Lopez-Galilea, M. Paz de Pena, Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee, *Eur. Food Res. Tech.* **227** (2008) 141–149.
- [7] M. Daglia, M. Racchi, A. Papetti, C. Lanni, S. Gavoni, G. Gazzani, *In vitro* and *ex vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 1700–1704.
- [8] R.C. Borrelli, A. Visconti, C. Mennella, M. Anese, V. Fogliano, Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 6527–6533.
- [9] K. Yanagimoto, H. Ochi, K. Lee, T. Shibamoto, Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 592–596.
- [10] M. Saenger, E. Hartge, J. Werther, T. Ogada, Z. Siagi, Combustion of coffee husks, *Ren. Energy* **23** (2001) 103–121.
- [11] M.A. Silva, S.A. Nebra, M.J.M. Silva, C.G. Sanchez, The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry, *Biomass Bioen.* **14** (1998) 457–467.
- [12] W.J. Yen, B.S. Wang, L.W. Chang, P.D. Duh, Antioxidant properties of roasted coffee residue, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 2658–2663.
- [13] S.F. Adriana, S.O. Leandro, Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives, in: G.S. Ashworth, P. Azevedo, Eds. *Agricultural Wastes*, Nova Science Publishers, 2009.
- [14] S.I. Mussatto, E.M.S. Machado, S. Martins, J.A. Teixeira, Production, composition, and application of coffee and its industrial residues, *Food Bioproc. Technol.* **4** (2011) 661–672.
- [15] P.S. Murthy, M. Madhava Naidu, Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products, *Food Biopr. Tech.* **5** (2012) 897–903.
- [16] T.M. Đorđević, S.S. Šiler-Marinković, S.I. Dimitrijević-Branković, Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals, *Food Chem.* **119** (2009) 957–963.
- [17] S.K. Lee, Z.H. Mbwambo, H. Chung, L. Luyengi, E.J. Gamez, R.G. Mehta, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, Evaluation of the antioxidant potential of natural products, *Combi. Chem. High Throughput Screen.* **1** (1998) 35–46.
- [18] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70–76.
- [19] M.V. Mujica, M. Granito, N. Soto, Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L, *Interciencia* **34** (2009) 650–654.
- [20] M.T. Escribano-Balin, C. Santos-Buelga, Chapter 1: Polyphenol Extraction from Foods in: C. Santos-Buelga, G. Williamson, (Eds.), *Methods in Polyphenol Analysis*, Royal Society of Chemistry, 2003, p. 380.
- [21] C.D. Stalikas, Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.* **30** (2007) 3268–3295.
- [22] R.J. Robbins, Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), 2866–2887.
- [23] J. Dai, R.J. Mumper, Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules* **15** (2010) 7313–7352.
- [24] D. Franco, J. Sineiro, M. Rubilar, M. Sánchez, M. Jerez, M. Pinelo, N. Costoya, M. José Núñez, Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidative power, *El. J. Env. Agric. Food Chem.* **7** (2008) 3210–3216.
- [25] J. Bravo, C. Monente, I. Juániz, M. Paz De Peña, C. Cid, Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee, *Food Res. Int.* **50** (2013) 610–616.
- [26] G. Spirad, V. Prakash, M.S. Narasinga Rao, Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents, *J. Biosci.* **4** (1982) 145–152.

- [27] R. Upadhyay, K. Ramalakshmi, L. Jagan Mohan Rao, Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans, *Food Chem.* **130** (2012) 184–188.
- [28] O. Zitka, J. Sochor, O. Rop, S. Skalickova, P. Sobrova, J. Zehnalek, M. Beklova, B. Krska, V. Adam, R. Kizek, Comparison of various easy-to-use procedures for extraction of phenols from apricot fruits, *Molecules* **16** (2011) 2914–2936.

SUMMARY

THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DRIED EXTRACTS FROM SPENT ESPRESSO COFFEE

Milica D. Milutinović, Slavica S. Šiler-Marinković, Dušan G. Antonović, Katarina R. Mihajlovski, Marija D. Pavlović, Suzana I. Dimitrijević-Branković

University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

The importance of coffee waste utilization is based on the fact that it contains a large amount of biologically valuable components. Preparation of espresso coffee produces substantial quantities of polyphenolic acids that have a significant antioxidant activity. In this work, the contents of polyphenols and antioxidant activity of extracts obtained from spent espresso coffee were analyzed using different solvent systems. A 70% solution of methanol and a 70% solution of ethanol and distilled water were used as solvents. The total amounts of polyphenols were determined by the Folin–Ciocalteu method, while the antioxidant activities were determined by DPPH inhibition (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Both methods confirmed that the order of antioxidant activity of obtained dried extracts is as follows: water extract < methanol extract < ethanol extract, which was in accordance with their polyphenols content. Mild prooxidant activity was observed in the concentration of 200 µg/ml while investigating the DPPH inhibition. Prooxidant activity is a characteristic of some polyphenolic acids that is considered to be one of the mechanisms of anticancer activity. The inhibition of DPPH radical, expressed by IC_{50} values, was compared with the results of the commercial antioxidants such as ascorbic acid and BHT (butylated hydroxytoluene). Comparing the IC_{50} values of ascorbic acid and BHT with the IC_{50} values of tested extracts it can be concluded that waste coffee extracts could be a good source of natural antioxidants.

Keywords: Polyphenols • Antioxidant • DPPH • FRAP • Spent espresso coffee