



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA HEMIJU



**Jelena M. Mrmošanin**

**Analiza katehina, procijanidina, makro i  
mikroelemenata u crnoj, mlečnoj, i belo  
čokoladi i kakaou u prahu i njihov  
antioksidativni potencijal**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2019



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



**Jelena M. Mrmošanin**

**Analysis of catechins, procyanidins, macro, and  
microelements in dark, milk and white  
chocolate and cocoa powder and their  
antioxidant potential**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

***Mentor:***

**dr Aleksandra N. Pavlović,**

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu

***Članovi komisije:***

**dr Snežana S. Mitić,**

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu

**dr Biljana M. Kaličanin,**

redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu

**dr Snežana B. Tošić,**

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu

**dr Milan N. Mitić,**

vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Александра Павловић, редовни професор Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу

Наслов: Анализа катехина, процијанидина, макро и микроелемената у црној, млечној, и белој чоколади и какаоу у праху и њихов антиоксидативни потенцијал

Резиме: Циљ ове докторке дисертације је одређивање хемијског састава, као и испитивање антиоксидативне активности узорака беле, млечне, црне чоколаде и какаоа у праху. Саржај укупних полифенола, флавоноида, као и укупних и мономерних антоцијана одређен је применом UV/Vis спектрофотометрије. За испитивање антиоксидативне активности коришћене су спектрофотометријске методе (ABTS, DPPH, FRAP и PFRAP) и електрохемијска метода – циклична волтаметрија (CV). Циклични волтамограми су показали три анодна пика. Први и трећи пик потичу од оксидације катехин-тип флавоноида, док други пик потиче од оксидације фенолних киселина. Процијанидини нису дали видљиве таласе. Највећу антиоксидативну активност су показали узорци црне чоколаде и какаоа у праху, а затим узорци млечне и беле чоколаде. Ово је у сагласности и са укупним садржајем полифенола и флавоноида у истим узорцима. Идентификација и квантификација полифенолних једињења (протокатехинске киселине, (+)-катехина, (-)-епикатехина, процијанидина В1, В2, В3 и В4, цијанидин-3-О-галактозида и цијанидин-3-О-арабинозида) и алкалоида теобромина је извршена применом HPLC хроматографије. Такође је праћен утицај температуре чувања (4 °C – 35 °C) и загревања (95 °C – 125 °C) испитиваних узорака црне чоколаде и какаоа у праху на стабилност катехин-тип флавоноида, укупних флавоноида и антоцијана. Са повећањем температуре чувања и загревања, као и времена чувања, садржај флавоноида и антоцијана се смањује. У циљу одређивања макро и микроелемената, извршена је оптимизација и валидација ICP-OES метода. Од макроелемената највише има К и то у узорцима какаоа у праху, а затим следе узорци црне, млечне и беле чоколаде. Ово указује на то да је садржај К директно повезан са уделом какао делова. После К највише има Р, Са, На, Mg и то у белој, млечној, црној чоколади и какаоу у праху. Од микроелемената, најзаступљенији су Fe, Si и Zn. Садржај потенцијално токсичних метала, Pb и Cd, је испод максимално дозвољених вредности (МДК) прописаних националном и светском регулативом. У циљу диференцијације испитиваних узорака на основу садржаја метала и полифенолних једињења, као и на основу показане антиоксидативне активности, коришћене су анализа главних компонената (PCA) и кластер анализа (CA).

Научна област: Хемија

Научна  
дисциплина:

Аналитичка хемија

Кључне речи:

Какао у праху, црна чоколада, млечна чоколада, бела чоколада, полифеноли, метали, антиоксидативна активност, циклична волтаметрија, UV/Vis спектрофотометрија, HPLC, ICP-OES, анализа главних компонената, кластер анализа

УДК:

547.56:(577.118+663.91)  
542.943'78:(577.118+663.91)

CERIF  
класификација:

P 003 и P 300 Хемија и Аналитичка хемија

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

**CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Dissertation


Doctoral Supervisor: Aleksandra Pavlović, Ph.D., Full Professor, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš

Title: Analysis of catechins, procyanidins, macro and microelements in dark, milk and white chocolate and cocoa powder and their antioxidant potential

Abstract: The aim of this doctoral dissertation was to determine the chemical composition, as well as to investigate of the antioxidative activity of white, milk, dark chocolate and cocoa powder samples. The total polyphenols, flavonoids, as well as total and monomer anthocyanins, were determined using UV/Vis spectrophotometry. Spectrophotometric methods (ABTS, DPPH, FRAP, and PFRAP) and electrochemistry method – cyclic voltammetry (CV) were used to test antioxidant activity. There were three anode peaks on cyclic voltammograms. The first and the third anodic current peaks can be ascribed to the oxidation of catechin-type flavonoids, while the second peak can be ascribed to the oxidation of phenolic acids. Procyanidins did not show any visible waves. The highest antioxidant activity was present in dark chocolate and cocoa powder samples, followed by milk and white chocolate samples. This is in agreement with the total content of polyphenols and flavonoids in the tested samples. The identification and quantification of polyphenolic compounds (protocatechuic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidins B1, B2, B3 and B4, cyanidin-3-*O*-galactoside and cyanidin-3-*O*-arabinoside) and alkaloid theobromine were carried out using HPLC chromatography. The influence of storage temperature (4 °C – 35 °C) and thermal processing (95 °C – 125 °C) on the stability of catechin-type flavonoids, total flavonoids, and anthocyanins in dark chocolate and cocoa powder samples was also studied. During storage and heating, the cocoa powder and dark chocolate flavonoids and anthocyanins degraded more quickly with an increase in temperature. To determine macro and microelements, the ICP-OES methods were optimized and validated. Among macroelements, K is most abundant in the samples of cocoa powder, followed by samples of dark, milk and white chocolate. This suggests that the content of K is directly related to the contribution of cocoa parts. After K, the content of P, Ca, Na, Mg is highest in white chocolate, followed by the milk chocolate, dark chocolate, and cocoa powder samples. Among the microelements, the most abundant are Fe, Si, and Zn. The content of potentially toxic metals, Pb and Cd, is below the maximum permissible levels (MPL) prescribed by national and world regulations. The differentiation of the tested samples based on the content of metals and polyphenol compounds, as well as based on their antioxidative activity, was done using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA).

Scientific Chemistry

Field: Scientific Discipline:	Analytical Chemistry
Key Words:	Cocoa powder, dark chocolate, milk chocolate, white chocolate, polyphenols, metals, antioxidant activity, cyclic voltammetry, UV/Vis spectrophotometry, HPLC, ICP-OES, principal component analysis, cluster analysis
UDC:	547.56:(577.118+663.91) 542.943'78:(577.118+663.91)
CERIF Classification:	P 003 and P 300 Chemistry and Analytical chemistry
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>


	<b>ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ</b> <b>НИШ</b>
	<b>КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА</b>

Редни број, <b>РБР</b> :	
Идентификациони број, <b>ИБР</b> :	
Тип документације, <b>ТД</b> :	монографска
Тип записа, <b>ТЗ</b> :	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР</b> :	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ</b> :	Јелена М. Мрмошанин
Ментор, <b>МН</b> :	Александра Н. Павловић
Наслов рада, <b>НР</b> :	АНАЛИЗА КАТЕХИНА, ПРОЦИЈАНИДИНА, МАКРО И МИКРОЕЛЕМЕНАТА У ЦРНОЈ, МЛЕЧНОЈ, И БЕЛОЈ ЧОКОЛАДИ И КАКАОУ У ПРАХУ И ЊИХОВ АНТИОКСИДАТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛ
Језик публикације, <b>ЈП</b> :	српски
Језик извода, <b>ЈИ</b> :	енглески
Земља публикавања, <b>ЗП</b> :	Србија
Уже географско подручје, <b>УГП</b> :	Србија
Година, <b>ГО</b> :	2019.
Издавач, <b>ИЗ</b> :	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА</b> :	Ниш, Вишеградска 33
Физички опис рада, <b>ФО</b> : <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	10 поглавља, 306 страна, 354 цитата, 72 табела, 128 слика/графика
Научна област, <b>НО</b> :	Хемија
Научна дисциплина, <b>НД</b> :	Аналитичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО</b> :	Какао у праху, црна чоколада, млечна чоколада, бела чоколада, полифеноли, метали, антиоксидативна активност, циклична волтаметрија, UV/Vis спектрофотометрија, HPLC, ICP-OES, анализа главних компонената, кластер анализа
<b>УДК</b>	547.56:(577.118+663.91) 542.943`78:(577.118+663.91)
Чува се, <b>ЧУ</b> :	Библиотека



Важна напомена, <b>ВН:</b>	<p>Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројеката „Природни производи биљака и лишјајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена“, евиденциони број 172047 и „Развој нових и побољшање постојећих електрохемијских, спектроскопских и проточних (ФИА) метода за праћење квалитета животне средине“, евиденциони број 172051.</p> <p>Такође, истраживање у оквиру ове дисертације је финансирано и од средстава које је Министарство уплаћивало на име материјалних трошкова за покриће рада стипендисте Министарства на пројекту.</p>
Извод, <b>ИЗ:</b>	<p>У оквиру ове докторке дисертације одређен је хемијски састав, као и испитивање антиоксидативне активности узорака беле, млечне, црне чоколаде и какаоа у праху. Садржај укупних полифенола, флавоноида, као и укупних и мономерних антоцијана одређен је применом UV/Vis спектрофотометрије. За испитивање антиоксидативне активности коришћене су спектрофотометријске методе (ABTS, DPPH, FRAP i PFRAP) и електрохемијска метода – циклична волтаметрија (CV). Циклични волтамограми су показали три анодна пика. Први и трећи пик потичу од оксидације катехин-тип флавоноида, док други пик потиче од оксидације фенолних киселина. Процијанидини нису дали видљиве таласе. Највећу антиоксидативну активност су показали узорци црне чоколаде и какаоа у праху, а затим узорци млечне и беле чоколаде. Ово је у сагласности и са укупним садржајем полифенола и флавоноида у истим узорцима. Идентификација и квантификација полифенолних једињења (протокатехинске киселине, (+)-катехина, (-)-епикатехина, процијанидина В1, В2, В3 и В4, цијанидин-3-О-галактозида, цијанидин-3-О-арабинозида) и алкалоида (теобромина) је извршена применом HPLC хроматографије. Такође је праћен утицај температуре чувања (4 °C – 35 °C) и загревања (95 °C – 125 °C) испитиваних узорака црне чоколаде и какаоа у праху на стабилност катехин-тип флавоноида, укупних флавоноида и антоцијана. Са повећањем температуре чувања и загревања, као и времена чувања, садржај флавоноида и антоцијана се смањује. У циљу одређивања макро и микроелемената, извршена је оптимизација и валидација ICP-OES метода. Од макроелемената највише има К и то у узорцима какаоа у праху, а затим следе узорци црне, млечне и беле чоколаде. Ово указује на то да је садржај К директно повезан са уделом какао делова.</p>

	<p>После К највише има Р, Са, На, Mg и то у белој, млечној, црној чоколади и какаоу у праху. Од микроелемената, најзаступљенији су Fe, Si и Zn. Садржај токсичних метала, Pb и Cd, је испод МДК вредности прописаних националном и светском регулативом. У циљу диференцијације испитиваних узорака на основу садржаја метала и полифенолних једињења, као и на основу показане антиоксидативне активности, коришћене су анализа главних компонената (РСА) и кластер анализа (СА).</p>
<p>Датум прихватања теме, ДП:</p>	<p>10.3.2015.</p>
<p>Датум одбране, ДО:</p>	
<p>Чланови комисије,</p>	<p>Председник:          _____          Члан:          _____          Члан:          _____          Члан:          _____          Члан,          _____</p>

	<b>ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ</b> <b>НИШ</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	
Accession number, <b>ANO</b> :	
Identification number, <b>INO</b> :	
Document type, <b>DT</b> :	monograph
Type of record, <b>TR</b> :	textual / graphic
Contents code, <b>CC</b> :	doctoral dissertation
Author, <b>AU</b> :	Jelena M. Mrmošanin
Mentor, <b>MN</b> :	Aleksandra Pavlović
Title, <b>TI</b> :	ANALYSIS OF CATECHINS, PROCYANIDINS, MACRO AND MICROELEMENTS IN DARK, MILK AND WHITE CHOCOLATE AND COCOA POWDER AND THEIR ANTIOXIDANT POTENTIAL
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian
Language of abstract, <b>LA</b> :	English
Country of publication, <b>CP</b> :	Serbia
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia
Publication year, <b>PY</b> :	2019
Publisher, <b>PB</b> :	author's reprint
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, <b>PD</b> : <small>(chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)</small>	10 chapters, 306 pages, 354 references, 72 tables, 128 figures/graphs
Scientific field, <b>SF</b> :	Chemistry
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Analytical Chemistry
Subject/Key words, <b>S/KW</b> :	Cocoa powder, dark chocolate, milk chocolate, white chocolate, polyphenols, metals, antioxidant activity, cyclic voltammetry, UV/Vis spectrophotometry, HPLC, ICP-OES, principal component analysis, cluster analysis
<b>UC</b>	547.56:(577.118+663.91) 542.943'78:(577.118+663.91)
Holding data, <b>HD</b> :	Library

Note, <b>N</b> :	PhD research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the projects "Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application" (No. 172047) and „Development of new and improvement of the existing electrochemical, spectroscopic and flow injection analysis (FIA) methods for monitoring the quality of the environment" (No. 172051). Also, a part of the PhD research was funded by the Ministry within the student scholarship.
Abstract, <b>AB</b> :	The aim of this doctoral dissertation was a determination of the chemical composition, as well as to investigation of the antioxidative activity of white, milk, dark chocolate and cocoa powder samples. The total polyphenols, flavonoids, as well as total and monomer anthocyanins, were determined using UV/Vis spectrophotometry. Spectrophotometric methods (ABTS, DPPH, FRAP, and PFRAP) and electrochemistry method – cyclic voltammetry (CV) were used to test antioxidant activity. There was three anode peaks on cyclic voltammograms. The first and the third anodic current peaks can be ascribed to the oxidation of catechin-type flavonoids, while the second peak can be ascribed to the oxidation of phenolic acids. Procyanidins did not show any visible waves. The highest antioxidant activity was present in dark chocolate and cocoa powder samples, followed by milk and white chocolate samples. This is in agreement with the total content of polyphenols and flavonoids in the tested samples. The identification and quantification of polyphenolic compounds (protocatechuic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidins B1, B2, B3 and B4, cyanidin-3-O-galactoside and cyanidin-3-O-arabinoside) and alkaloid theobromine were carried out using HPLC chromatography. The influence of storage temperature (4 °C – 35 °C) and thermal processing (95 °C – 125 °C) on the stability of catechin-type flavonoids, total flavonoids and anthocyanins in dark chocolate and cocoa powder samples was also studied. During storage and heating, the cocoa powder and dark chocolate flavonoids and anthocyanins degraded more quickly with an increase in temperature. To determine macro and microelements, the ICP-OES methods were optimized and validated. Among macroelements, K is most abundant in the samples of cocoa powder, followed by the samples of dark, milk and white chocolate. This suggests that the content of K is directly related to the contribution of cocoa parts. After K, the content P, Ca, Na, Mg is highest in white chocolate, followed by the milk chocolate, dark chocolate, and cocoa powder samples. Among the microelements, the most abundant are Fe, Si, and Zn. The content of toxic metals, Pb and Cd, is below the maximum permissible levels (MPL) prescribed by national and world regulations. The differentiation of the tested samples based on the content of metals and polyphenol compounds, as well as based on their antioxidative activity, was done using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA).
Accepted by the Scientific Board on, <b>ASB</b> :	10.3.2015.

Defended on, <b>DE</b> :	
Defended Board, <b>DB</b> :	President:
	Member:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

*S ljubavlju bratu Igoru, za života pružanoj ljubavi i podršci i  
mojoj najvećoj radosti i ljubavi Maši*

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Katedre za analitičku i fizičku hemiju, na Departmanu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, evidencioni broj OI 172047.*

*Deo eksperimentalog rada vezan za cikličnu voltametriju je urađen u laboratoriji za Analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom se zahvaljujem dr Draganu Manojloviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i njegovom saradniku dr Daliboru Stankoviću.*

*Temu ove doktorske disertacije je predložila i radom rukovala dr Aleksandra Pavlović, redovni profesor PMF-a u Nišu. Ovom prilikom joj se zahvaljujem na savetima, sugestijama, pomoći pri izradi i pisanju disertacije. Takođe, najiskrenije se zahvaljujem na ukazanom poverenju i nesebičnom zalaganju, na prenošenju hemijskog i životnog znanja, na jednom predivnom iskustvu i podršci.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Snežani Tošić, redovnom profesoru PMF-a u Nišu na bezuslovnoj i meni neophodnoj podršci u lepim i onim manje lepim trenucima. Takođe se najiskrenije zahvaljujem i na sugestijama, savetima i smernicama pri pisanju disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i prof. dr Snežani Mitić, prof. dr Biljani Kaličanin i prof. dr Milanu Mitiću na pažljivom čitanju i sugestijama u završnoj fazi izrade ove doktorske disertacije.*

*Mojoj dragoj dr Jovani Krstić se zahvaljujem od srca na prelepom druženju, pomoći i podršci svih godina provedenih na osnovnim i doktorkim studijama.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem mojoj dragoj porodici, mami, suprugu, bratancu i ćerki na ogromnoj podršci, strpljenju i ljubavi koju mi svakodnevno pružaju.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. CILJEVI RADA.....	5
3. TEORIJSKE OSNOVE .....	7
3.1. Kakao u prahu i čokolada.....	8
3.1.1. Poreklo kakaoa i čokolade.....	8
3.1.2. Karakteristike biljke kakaovac.....	9
3.1.3. Poreklo i karakteristike triju vrsta kakao zrna .....	11
3.1.4. Karakteristike i uloga kakaoa u prahu .....	13
3.1.5. Osnovne osobine i podela čokolade.....	14
3.2. Biološka aktivnost, značaj i podela polifenolnih jedinjenja .....	18
3.2.1. Struktura, podela i značaj flavonoida .....	22
3.2.2. Fenolne kiseline .....	30
3.2.3. Struktura, uloga i karakteristike antocijana .....	32
3.2.4. Polimeri flavan-3-ola.....	35
3.3. Biološka aktivnost i značaj alkaloida.....	36
3.4. Faktori koji utiču na stabilnost katehin tip flavonoida i antocijana .....	37
3.4.1. Uticaj pH .....	38
3.4.2. Uticaj temperature.....	39
3.4.3. Uticaj skladištenja .....	40
3.5. Antioksidanti i njihova aktivnost.....	40
3.5.1. Definicija i podela slobodnih radikala.....	40
3.5.2. Antioksidativna zaštita i određivanje antioksidativnog potencijala .....	44
3.5.2.1. Antioksidativna ABTS metoda, radikalska aktivnost.....	47
3.5.2.2. Antioksidativna DPPH metoda, radikalska aktivnost.....	48
3.5.2.3. FRAP metoda .....	50
3.5.2.4. PFRAP metoda.....	52
3.6. Podela elemenata i putevi dospevanja u hranu .....	53
3.7. UV/Vis spektrofotometrija .....	54
3.7.1. Spektrofotometar.....	57
3.8. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) .....	59
3.9. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).....	63
3.9.1. Induktivno spregnuta plazma - pojam i izvor .....	64
3.9.2. Postupci za pripremu uzoraka.....	69



3.10. Elementi optimizacije i validacije ICP-OES metode .....	71
3.10.1. Optimizacija parametara ICP-OES instrumenta .....	71
3.10.2. Validacija ICP-OES metode .....	73
3.10.2.1. Linearnost.....	73
3.10.2.2. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	74
3.10.2.3. Preciznost, ponovljivost i reproduktivnost.....	74
3.10.2.4. Tačnost.....	75
3.10.2.5. Selektivnost i specifičnost.....	76
3.11. Elektrohemijske metode.....	77
3.11.1. Voltometrija .....	77
3.11.2. Ciklična voltometrija .....	78
3.11.2.1. Reverzibilni sistemi .....	81
3.11.2.2. Ireverzibilni i kvazi-reverzibilni sistemi .....	83
3.12. Statističke metode analize .....	85
3.12.1. Faktorska analiza i analiza glavnih komponenti .....	86
3.12.2. Klaster analiza.....	88
4. EKSPERIMENTALNI DEO .....	91
4.1. Materijal .....	92
4.2. Aparati i pribor .....	94
4.3. Reagensi .....	95
4.4. Priprema uzorka.....	96
4.4.1. Spektrofotometrijska i HPLC analiza.....	96
4.4.2. Ciklična voltometrija .....	97
4.4.3. Postupak mineralizacije čokolade i kakaoa u prahu.....	97
4.4.4. Proces zagrevanja i skladištenja uzoraka.....	97
4.5. Spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i ispitivanje antioksidativne aktivnosti .....	98
4.5.1. Ukupni polifenoli (UP).....	98
4.5.2. Ukupni flavonoidi (UF).....	100
4.5.3. ABTS metoda .....	102
4.5.4. DPPH metoda .....	104
4.5.5. FRAP metoda.....	106
4.5.6. PFRAP metoda .....	108
4.5.7. Određivanje sadržaja ukupnih i monomernih antocijana .....	109
4.5.8. Ciklična voltometrija u analizi polifenolnih jedinjenja .....	111
4.6. HPLC metoda .....	111

4.7. Statistička obrada podataka .....	115
5. REZULTATI I DISKUSIJA .....	116
5.1. Spektrofotometrijska analiza .....	117
5.1.1. Ukupni polifenoli i flavonoidi .....	117
5.1.2. Ukupni i monomerni antocijani .....	123
5.1.3. Antioksidativni kapacitet – ABTS, DPPH, FRAP i PFRAP .....	123
5.2. Antioksidativni kapacitet – ciklična voltometrija .....	129
5.3. Pojedinačna polifenolna jedinjenja .....	144
5.4. Kinetika degradacije flavan-3-ola, procijanidina i antocijana .....	174
5.5. Optimizacija i validacija ICP-OES metoda za određivanje makro i mikroelemenata .....	200
5.5.1. Optimizacija robusnosti indukovano kuplovane plazme ICP-OES metode .....	200
5.5.2. Uticaj koncentracije azotne kiseline .....	203
5.5.3. Izbor analitičkih linija .....	204
5.5.4. Tačnost i preciznost metoda .....	206
5.5.5. Određivanje sadržaja metala u uzorcima čokolade i kakaoa u prahu .....	208
6. IZVOD .....	259
7. SUMMARY .....	266
8. LITERATURA .....	274
9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM .....	296
10. PROPATNA DOKUMENTACIJA .....	303

# ***1. UVOD***

Smatra se da su još Olmeci koristili seme iz mahune kakaovca, za kuvanje smese slične čokoladi. Zahvaljujući toj činjenici, može se reći da je čokolada najstariji napitak. Čokolada je jedinstvena, to je namirnica koja je na sobnoj temperaturi čvrsta, a ipak se u ustima brzo i lako otopi. Može se reći da se to dešava zahvaljujući mastima (kakao buter ili maslac) u čokoladi, koje se u kontaktu sa pljuvačkom prevode u vodenu fazu i dolazi do rastvaranja šećera. Ove masti su, međutim, potpuno tečne na temperaturi tela. Zahvaljujući lipidima, čestice struje jedna preko druge, nastaje suspenzija čestica u kakao maslacu, zagrevajući se u ustima na temperaturi 37 °C (Beckett, 2008). Potpuna je misterija kako su prvobitna pića kakaoa i čokolade koja su bila masna, gorka i neprijatnog ukusa razvili u slatko savršenstvo.

Čokolade se danas klasifikuju u tri tipa: crnu, mlečnu i belu čokoladu (Apgar i Tarka, 1998; Vinson i sar., 1999). Crnu čokoladu karakteriše visok procenat kakao likera i odsustvo mleka. Mlečna čokolada sadrži kakao liker samo u manjem procentu u odnosu na crnu čokoladu i sadrži mleko, dok bela čokolada ne sadrži kakao liker već kakao buter, mleko i šećer (Afoakwa i sar., 2007). Flavonoidi iz različitih kakao prahova i različitih proizvoda od čokolade se klasifikuju kao glavne antioksidativne komponente (Baba i sar., 2000; Osakabe i sar., 1998). Crna čokolada i kakao prah imaju visok sadržaj polifenola i flavonoida, naročito katehina, epikatehina i njihovih oligomera - procijanidina (Bravo, 1998; Hollman i Katan, 1999; Hammerstone i sar., 2000). Procijanidini se mogu naći u čokoladi kao smeša dimera, trimera, tetramera i polimera do 10 jedinica. Najveći sadržaj procijanidina u čokoladi čine monomeri (Wollgast i Anklam, 2000a). Količina navedenih komponenata je različita i zavisi od sastava kakao zrna, načina pripreme, tehnološkog postupka i vrste čokolade. U poslednjih nekoliko godina, kakao i crna čokolada, kao i čaj i vino se sve više smatraju izvorom lekovitih komponenata, koje imaju potencijalno blagotvorne funkcionalne aktivnosti u organizmu (Dreosti, 2000; Wollgast i Anklam, 2000a; Visioli i sar. 2000; Kris-Etherton i Keen, 2002). Takođe, utvrđeno je da komercijalno dostupni čokoladni proizvodi smanjuju oksidaciju lipida kada se doda preparat lipoproteina niske gustine (LDL) *in vitro* (Waterhouse i Laurie, 2006; Osakabe i sar., 2001). Ustanovljeno je da su flavonoidi iz kakaoa i crne čokolade povezani sa smanjenjem kardiovaskularnih bolesti (Ding i sar., 2006; Steinberg i sar., 2003; Mehrinfar i Frishman, 2008). Nekoliko studija iz epidemiologije pokazuju da prisustvo antioksidanata u kakaou i čokoladi obezbeđuje zdravstvene beneficije (Hertog i sar., 1995; Lee i Paffenbarger, 1998).

Čokolada i proizvodi koji sadrže čokoladu se obično termički obrađuju pre korišćenja (*Wollgast i Anklam, 2000b*). Na žalost, flavonoidi (katehini i procijanidini) su osetljivi na toplotu i može doći do hemijske degradacije tokom prerade ili u toku skladištenja (*Wollgast i Anklam, 2000b; Zhu i sar., 1997; Yilmaz, 2006; Friedman i sar., 2009; Bazinet i sar., 2010; Waterhouse i Laurie, 2006; García-Falcón i sar., 2007; Castillo-Sánchez i sar., 2008*).

Sveže kakao zrno sadrži ljubičaste pigmente antocijanidina, cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid. Tokom fermentacije, ovi pigmenti se hidrolizuju glikozidazama, što dovodi do izbeljivanja kotiledona. Ovi enzimi hidrolitički kidaju šećerne grupe antocijanina koji se nalaze u semenu (*Afoakwa i sar., 2012*). Neki autori su opisali da je najveća destrukcija pigmenta na 45 °C i u opsegu pH 3,8 – 4,5 (*Biehl i sar., 1989*). Kasnije, u toku fermentacije, polifenol-oksidaža oksiduje slobodne antocijanidine do hinona koji mogu da formiraju komplekse sa aminokiselinama i proteinima, a mogu i da se polimerizuju sa drugim flavonoidima do tanina. Sa proteinima, tanini stvaraju vodonične veze i formiraju kompleks velike molekulske mase. Rezultat njihove reakcije jesu pigmenti koji su nerastvorni u vodi, braon boje, koji i daju tu karakterističnu boju kakaou i čokoladi (*Schwan i Wheals, 2004; Aroyeun i sar., 2006; Kratzer i sar., 2009; Rodriguez-Campos i sar., 2011*).

Čokolada i kakao sadrže metale u širokom opsegu koncentracija. Fiziološko dejstvo metala na ljudski organizam je predmet nekoliko studija (*Borchers i sar., 2000*). Neke od tih studija su se bavile određivanjem nekih esencijalnih elemenata, kao što su Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe i Cu (*Dos Santos i sar., 2005; Da Silva i sar., 2006; Güldaş, 2008; Leggli i sar., 2011*), dok su se druge studije bavile određivanjem potencijalno toksičnih i toksičnih elemenata: Al, Cd, Pd, Ni i As (*Lee i Low, 1985; Karadjova i sar., 2000; Sepe i sar., 2001, Dahyia i sar., 2005; Rankin i sar., 2005; Jalbani i sar., 2007; Güldaş, 2008; Jalbani i sar., 2009*). Pošto metali mogu da imaju i pozitivan i negativan uticaj na ljudsko zdravlje, veoma je važno identifikovati i kvantifikovati ih u namirnicama.

Ova doktorska disertacija je podeljena na: uvod, ciljevi rada, teorijske osnove, eksperimentalni deo, rezultati i diskusija, izvod, summary, literatura, biografija sa bibliografijom, i propratna dokumentacija.

U *Uvodu* su date osnovne karakteristike čokolade i kakao praha.

U delu *Ciljevi rada* je taksativno navedeno šta je rađeno u doktorskoj disertaciji.

U *Teorijskim osnovama* dat je pregled istorijskog porekla, kao i karakteristike kakao praha, crne, mlečne i bele čokolade. Zatim je data podela polifenolnih jedinjenja i elemenata

u tragovima, njihove karakteristike, kao i karakteristike alkaloida, objašnjen pojam antioksidanata i navedene metode za njihovo određivanje. Takođe, dati su faktori koji utiču na stabilnost polifenolnih jedinjenja. Navedene su instrumentalne tehnike korišćene u radu, kao i njihovi principi: UV/Vis spektrofotometrija, ciklična voltometrija (CV), tečna hromatografija visokih mogućnosti (HPLC) i optička-emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-OES), takođe su opisani. Takođe, navedene su osnove primenjenih statističkih metoda analize.

U *Eksperimentalnom delu* su dati podaci o korišćenim uzorcima i reagensima, opisan je način pripreme uzoraka za date metode analize, postupci primenjeni pri analizi uzoraka primenom UV/Vis spektrofotometrije, ciklične voltometrije, ICP-OES spektrometrije i HPLC hromatografije.

U delu *Rezultati i diskusija* prikazani su rezultati do kojih se došlo pri određivanju: antioksidativnog kapaciteta polifenola, pojedinačnog sadržaja polifenola i alkaloida, optimalnih uslova ICP-OES metoda, sadržaja makro i mikroelemenata, praćenja degradacije polifenola i flavonoida. Statistička obrada podataka je data u cilju razumevanja odnosa i diferenciranja ispitivanih uzoraka na osnovu sadržaja pojedinih i ukupnih polifenolnih jedinjenja i alkaloida, metala.

U poglavlju *Izvod i Summary* dat je kratak pregled dobijenih rezultata.

U poglavlju *Literatura* dat je spisak citiranih referenci.

U poglavlju *Biografija sa bibliografijom* su dati podaci o autoru kao i spisak publikacija.

U poglavlju *Prpratna dokumentacija* su date sve izjave autora.

## ***2. CILJEVI RADA***

Kako je čokolada omiljena poslastica, postavljeni su sledeći ciljevi:

- određivanje polifenolnog sastava i sadržaja alkaloida uzoraka crne, mlečne i bele čokolade i uzoraka kakaoa u prahu primenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC);
- određivanje antioksidativne aktivnosti navedenih uzoraka, kao i nalaženje korelacije između antioksidativne aktivnosti dobijene primenom ciklične voltometrije i antioksidativne aktivnosti dobijene primenom spektrofotometrijskih testova;
- validacija i optimizacija ICP-OES metoda u cilju određivanja sadržaja metala u navedenim uzorcima;
- ispitivanje uticaja temperature čuvanja i zagrevanja na sadržaj katehin tip flavonoida, ukupnih flavonoida i antocijana u uzorcima crne čokolade i kakaoa u prahu.

U skladu sa postavljenim ciljevima, definisani su sledeći zadaci:

*1. Hemijska analiza navedenih uzoraka:*

- ekstrakcija polifenolnih jedinjenja;
- identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima spektrofotometrijskim metodama i HPLC hromatografijom;
- određivanje mineralnog sastava metodom ICP-OES spektrometrije.

*2. Određivanje antioksidativne aktivnosti navedenih uzoraka primenom:*

- spektrofotometrijskih metoda: DPPH, ABTS, FRAP i PFRAP;
- ciklične voltometrije (CV).

*3. Praćenje uticaja temperature čuvanja i zagrevanja na degradaciju katehin tip flavonoida i antocijana;*

*4. Statistička obrada podataka:*

- pirsonova korelaciona analiza;
- analiza glavnih komponenti (PCA);
- klaster analiza (CA).



### ***3. TEORIJSKE OSNOVE***

## 3.1. Kakao u prahu i čokolada

### 3.1.1. Poreklo kakaoa i čokolade

Priču o kakaou i čokoladi su započeli Olmeci, prva visokorazvijena kultura Centralne Amerike, koji su živeli pre više od 3000 godina. Topla i vlažna klima je godila gajenju ovog drveta. Olmeci su kuvali smesu dobijenu iz biljke kakaovca, što sam kakao prah i toplu čokoladu svrstava u najstarije napitke. Visoko razvijena civilizacija Maje, koji su se nekoliko vekova nakon nestanka Olmeka naselili u tom regionu, današnjem Meksiku, priređivala je slavlja u čast boga kakaoa Ek Chuaha, tokom kog bi mu prinosili životinjske žrtve. U tim ritualima, u kojima su učestvovali sveštenici, kraljevi i ostalo plemstvo, pripremano je piće od kakaoa koje je bilo gorko i izuzetno začinjeno. Nakon misterioznog nestanka civilizacije Maja, pomenuto područje su naselili Tolteci. Nakon Tolteka, ovaj region su naselili i Asteci. Ove dve kulture su prihvatile tradicionalno sveto piće kakaoa, koje su nazvali Xocoatl (Xoco – gorak (eng. *bitter*) i atl – voda (eng. *water*). Oni su ga takođe konzumirali bez ikakvih zaslađivača, veoma začinjenog (vanila, čili...). Po verovanju Asteka ovaj napitak je bio izvor mudrosti, moći, energije, afrodisijak i umirujuć balzam, pa je redovno bio korišćen u religijskim ritualima. Ratnici su obavezno pre bitke pili ovo piće, kako bi im dalo božansku snagu i izdržljivost u borbi. Danas se zna da je za takvo verovanje zaslužan teobromin, koji se u visokim koncentracijama nalazi u kakao napitku. Običan narod je, u doba Asteka, kakao zrna koristio kao najvredniji novac (*Becket, 2008*). Novija istraživanja arheologa (2007. godine) su dokazala da je kakao drvo uzgajano u *Puerto Eskondido* u Hondurasu, i da je to bilo u periodu oko 1100 godina p.n.e. (*Henderson i sar., 2007*).

Prvi Evropljanin koji je došao u kontakt sa kakaom je bio slavni istraživač Kristofer Kolumbo. On je 1502. godine na svom četvrtom putovanju u Novi svet, po povratku na španski dvor doneo i seme kakaovca. Zainteresovanost je brzo nestala jer niko nije znao šta bi i kako od njega spremao (<http://www.chocolate.lindt.com/world-of-lindt/lindt-in-history/history-of-cocoa>).

U jednom od pohoda u Južnoj Americi, španskom osvajaču Hernandu Kortesu je ovo piće ponudio astečki vladar Montezuma, koji je ovo piće služio u zlatnim peharima (*Verna, 2013*). Svoje otkriće on je odlučio da podeli sa Starim kontinentom. Španci su dodali šećer i

druge sastojke, i tako dobijeno energetske piće nazvali čokoladom. Na španskom dvoru su ovo piće koristili skoro ceo vek.

Španska princeza Ana se 1615. godine udala za francuskog kralja Luja XIII i prvi put probala čokoladni napitak u Francuskoj. Odatle se ovaj napitak proširio na druge kraljevske dvorove i prefinjeno društvo u Evropi. Takođe se smatra da je italijan Antonio Karleti početkom 17. veka preneo čokoladni napitak u ostale delove Evrope.

Holandski hemičar Konrad J. van Houten je patentirao 1828. godine hidrauličnu presu za mrvljenje zrna kakaoa i dobijanje kakao praha.

Englezi su 1847. godine pomešali ovaj prah sa šećerom i rastopljenim kakaom maslacem, i to postaje prva čokolada za jelo. Švajcarac Daniel Peter je proizveo prvu mlečnu čokoladu 1875. godine.

Godine 1879. Rudolf Lindt napravio je prvu čokoladu koja se topila u ustima, poznatu i po nazivu *chocolat fondant* (Coe i Coe, 2013).

### 3.1.2. Karakteristike biljke kakaovac

Čokolada se pravi od visokokvalitetnih bioloških sirovina. Kvalitet svake čokolade zavisi od kvaliteta zrnevlja kakaovca, načina obrade, dodataka i svežine. Čokolada se dobija prženjem kakao zrna (slika 3.1.) koje u mahuni rastu na drvetu kakaovcu (slika 3.2.).



Slika 3.1. Plod i seme biljke kakaovac

Zvučno latinsko ime kakaovca *Theobroma cacao* je dao švedski naučnik Carl von Linnè. Biljka kakaovac pripada familiji *Malvaceae* i redu *Malvales* i jedna je od 22 vrste iz roda *Theobroma*. U Americi kakaovac raste od južnog Meksika do Brazila i Bolivije. Najveći uzgajivači kakaovca su tropske zemlje Afrike, Azije, Okeanije i Latinske Amerike. Nasuprot

tome, najveći proizvođači kakaoa su u Evropi i Severnoj Americi (*Ballesteros i sar.*, 2015). Drvo kakaovac najbolje raste na rastresitom zemljištu sa visokim sadržajem hranljivih i organskih materija na dubini od najmanje 1,5 metra. Najbolje zemljište za uzgoj sadrži oko 50% peska, 30 – 40% gline i 10 – 20% čestica prašine. Ova biljka nije otporna na sušu ali joj ne odgovara ni previše kiše, jer se onda razvijaju gljivice. Od hranljivih materija, biljci su najviše potrebni N, P, K a u manjoj meri Mg i Ca (*Ortiz*, 2016).



**Slika 3.2.** Drvo kakaovca (*Theobroma cacao*)

Cvetovi se na kakaovcu formiraju tokom cele godine i rastu jedan pored drugog na starijim granama ili samom stablu. Cvetovi su bele ili roze boje. Prema *World Cocoa Foundation* samo 3 – 10% cvetova uspeva da razvije mahunu i sazri. Prvi plodovi se dobijaju nakon 5 godina i drvo daje plodove do svoje 40-e godine. Period zrenja ploda je od 5 do 6 meseci. Obično su veličine od 20 cm do 35 cm. Plodovi su obično pegavi u žutoj, crvenoj, zelenoj ili ljubičastoj boji. Svaki plod ima od 20 do 60 zrna. Iz semena se proizvodi kakao maslac (*Ortiz*, 2016).

Tehnologija proizvodnje čokolade obuhvata sledeće tehnološke procese:

- preradu kakao zrna i dobijanje kakao mase;
- proizvodnju mase koja se koristi u proizvodnji čokolade;
- proizvodnju čokolade.

Veoma su bitni postupci čišćenja, termička obrada kojom se uništavaju mikroorganizmi, drobljenje i mlevenje. Kako je kakao izuzetno gorak, tretira se bazom kako bi se promenila boja i ukus kakao praha (*Hii i sar.*, 2009).

### 3.1.3. Poreklo i karakteristike triju vrsta kakao zrna

Postoje tri vrste kakao zrna koje se danas koriste u proizvodnji čokolade. To su plemenita vrsta *Kriolo*, zatim vrsta *Forastero* i hibrid između ove dve vrste *Trinitario*. Kriolo i Trinitario se nazivaju finim ili ukusnim kakao zrnom, dok Forastero predstavlja običnu vrstu koja služi za masovnu proizvodnju – preko 95% kakaoa ove vrste koriste svetski proizvođači čokolade (Guittard, 2009). U poređenju sa ovom vrstom kakao zrna, Kriolo čini svega 1% svetskih useva (Presilla, 2001; Guittard, 2009). Na slici 3.3. su prikazane sve tri vrste kakao zrna.



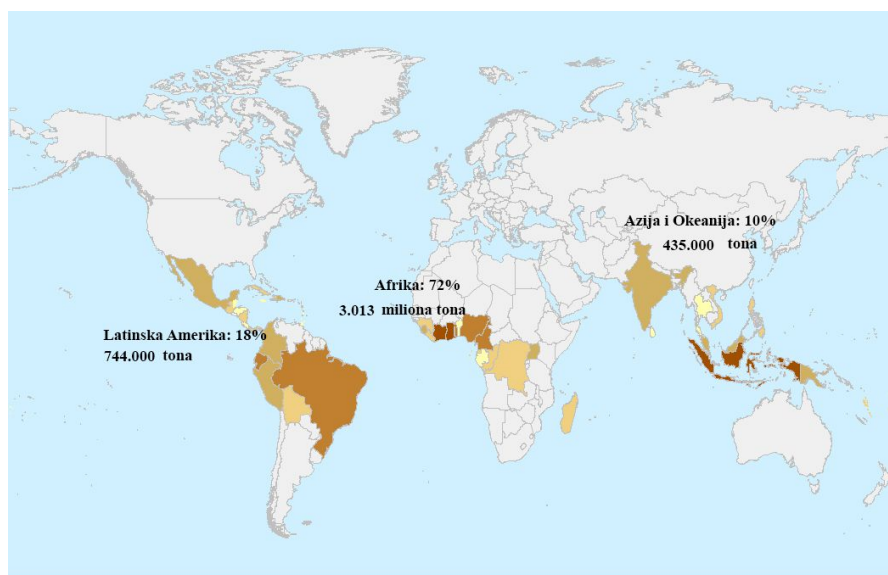
Slika 3.3. Vrste kakao zrna: Kriolo, Trinitario i Forastero

**Kriolo** – Maje su prvi put ovu vrstu uzgajili u Meksiku. Smatra se da su ovu vrstu sredinom 16. veka proširili na Karibe i Južnu Ameriku. Ova sorta daje slab prinos i izuzetno je osetljiva na bolesti i uticaj štetoina. Plodovi su obično oštri, boja zrelih plodova varira od žute do crvene. Međutim, Kriolo je prepoznatljiva po svom glatkom, manje gorkom i aromatičnom ukusu i ima veliku tržišnu cenu (Yang i sar., 2013). Predstavlja najbolju vrstu

kakao zrna, jer zahteva manje vreme fermentacije i manje toplote za dobijanje bogate arome. Samo 5 – 10% kakao zrna ove sorte se koristi u proizvodnji čokolade (*Paoletti i sar.*, 2012). Danas se često pod pojmom kriolo smatraju „moderne vrste” koje su nastale hibridizacijom sa drugim vrstama, koje su sve češće.

**Forastero** – ova vrsta kakao zrna, uzgajana u Amazoniji, je mnogo otpornija na bolesti, lakša za uzgajanje i veoma plodna, zbog čega se i najviše koristi u proizvodnji. Oblik ploda je različit, jer u okviru ove vrste se razlikuju tri sorte. Zreli plodovi su od zelene do žute boje. Forastero zahteva mnogo višu temperaturu topljenja i duži period fermentacije od Kriolo vrste. U proizvodnji čokolade se koristi oko 80%, iako je njegov ukus jak i gorak. Zemlje, koje proizvode kvalitetni Forastero su Afrika, Brazil i Ekvador (*Paoletti i sar.*, 2012).

**Trinitario** – je hibrid prethodnih dveju vrsta, nastao u Trinidadu pre skoro 300 godina (*Paoletti i sar.*, 2012). Posедуje dobar, aromatičan ukus i drveće je naročito pogodno za kultivaciju, jer je izuzetno otporno na uticaj štetočina. Zbog ukrštanja, oblik plodova je različit. Mogu biti zaobljeni ili šiljasti, veoma slični plodu vrste Kriolo. Zahteva srednju temperaturu obrade. Po ukusu je mnogo bliža Kriolo vrsti nego Forasteru i najčešće se može naći u crnoj čokoladi. Na slici 3.4. je prikazan porast svetske proizvodnje kakaoa 2014/15 (*ICCO*, 2014/15).



Slika 3.4. Porast proizvodnje kakaoa 2014/15.

Nakon mnogo godina uzgajanja i hiljade unakrsnih oprašivanja između sorti, danas se retko nalazi čist kakao. Prema podacima Međunarodne organizacije kakaoa (*International*

*Cocoa Organization – ICCO*), 2006/07. godine je proizvedeno 3,4 miliona tona kakaoa. Većina je proizvedena u zapadnoj Africi (70,4%), posebno u Obali Slonovače (38%) i Gani (18%) (*ICCO*, 2006/07). Za sezonu 2013/14. je proizvedeno 4,131 miliona tona, a uočen je i porast u proizvodnji kakaoa u Aziji i Africi, izjednačujući se tako sa onom u Americi. Takođe, prema *ICCO* statistici, u Aziji je zabeležen porast konzumiranja kakaoa od 51% u periodu od 2008/09. do 2013/14., dok je u Africi i Latinskoj Americi za isti period zabeležen porast od 28% (*ICCO*, 2013/14).

### 3.1.4. Karakteristike i uloga kakaoa u prahu

Široka primena kakao praha je opravdana njegovom ulogom u sledećim sistemima u organizmu:

- kardiovaskularni;
- nervni;
- endokrini;
- limfni i imuni;
- dermatološki;
- respiratorni;
- reproduktivni.

U kakao maslacu su prisutne zasićene masne kiseline (palmitinska i stearinska) i mononezasićena kiselina (oleinska). Prisustvo zasićenih masnih kiselina u organizmu povećava rizik od koronarnih bolesti. Međutim, više od 1/3 je upravo stearinska kiselina, koja za razliku od ostali masnih kiselina je neaterogena i ne dovodi do porasta holesterola kod ljudi. Vlakna, koja sadrži kakao prah (2 g po kašičici) i proizvodi (crna čokolada 1,7 g i mlečna 0,6 g na 100 kcal), takođe smanjuje nivo serumskog holesterola. Od minerala neophodnih za vaskularnu funkciju, kakao prah sadrži magnezijum, bakar, kalijum i kalcijum, koji smanjuju rizik od hipertenzije i arteroskleroze (*Katz i sar.*, 2011). Sprovedene *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale da kakao ima pozitivno dejstvo na imuni sistem, tj. da izolovani flavanoli i frakcije procijanidina iz kakaoa ublažavaju oslobađanje inflamatornih citokina i stimulišu proizvodnju anti-inflamatornih citokina. Takođe, mnogobrojna istraživanja su pokazala da čokolada nema nikakvog uticaja na pojavu akni. U istraživanjima

novijeg datuma navodi se da je zapravo obrano mleko odgovorno za nastanak akni, jer sadrži neke komponente koje utiču na endogene hormone. Uticaj na respiratorni sistem nije poznat u potpunosti. Samo je u jednoj studiji na miševima pokazano da procijanidini iz kakao sprečavaju oštećenje pluća izazvano izduvnim gasovima. Veoma zanimljiva činjenica je da ekstrakti polifenola iz kakao imaju antiproliferativne efekte na rast ćelija raka prostate. Pored navedenih sistema, kakao prah ima pozitivan efekat na oralnu higijenu. Nekoliko studija je pokazalo sposobnost kakao da smanji rizik od nastanka karijesa i da spreči paradentozu (*De Araujo i sar.*, 2016).

Prema *United States Department of Agriculture*, u 100 g suvog kakao praha sadržano je: 228 kcal; 57,9 g ugljenih hidrata; 13,7 g masti; 0 mg holesterola; 3 g vode; 0,078 mg vitamina B1; 0,241 mg vitamina B2; 2,185 mg vitamina B3; 0,254 mg vitamina B5; 0,118 mg vitamina B6; 0,10 mg vitamin E; 2,5 µg vitamina K; 128 mg kalcijuma; 3,788 mg bakra; 13,86 mg gvožđa; 499 mg magnezijuma; 734 mg fosfora; 1524 mg kalijuma; 21 mg natrijuma; 6,81 mg cinka; 3,837 mg mangana; 14,3 µg selenita itd (*USDA*, 2018).

### 3.1.5. Osnovne osobine i podela čokolade

Na osnovu sirovinskog sastava i tehnološkog postupka proizvodnje (*Gavrilović*, 2003) može se odrediti vrsta čokolade (mlečna čokolada, čokolada sa visokim sadržajem mleka, čokolada za jelo i kuvanje i drugo). Iako je *Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za kakao-proizvode, čokoladne proizvode, proizvode slične čokoladnim i krem-proizvode* („*Službeni list SCG*”, br.1/2005) definisan veliki broj vrsta čokolade, u prometu se nalaze najčešće tri vrste, a to su: crna, mlečna i bela čokolada, koje se razlikuju po sadržaju čvrstih nemasnih kakao čestica, kakao maslaca i mleka.

**Crna čokolada** – ima minimum 35% kakao delova, međutim, što je veći procenat kakao delova, to je ona kvalitetnija. Od 35% kakao delova, ne manje od 18% je kakao maslac i ne manje od 14% je suv, nemasni kakao (*Glicerina i sar.*, 2016). Danas se na tržištu najčešće nalazi crna čokolada, koja sadrži 53% kakao delova i smatra se izuzetno kvalitetnom čokoladom. „Luksuzna” crna čokolada, koja je danas i najpopularnija, obično sadrži 70 – 85% kakao delova. U skladu sa tim, crna čokolada sadrži: ugljene hidrate 45,9%; masti 42,63%; proteine 7,79%; mali procenat šećera (*USDA*, 2018a). Na slici 3.5. je prikazana crna čokolada, koja inače ne sadrži mleko u prahu.





Slika 3.5. Crna čokolada

**Mlečna čokolada** – ima minimum 25% kakaoo delova. Ova čokolada je proizvod kakaoo, šećera i mleka ili mlečnih proizvoda. Ona ne sme da sadrži manje od 14% suvih mlečnih materija, 2,5% suvih nemasnih kakaoo supstanci, 3,5% mlečne masti, 25% ukupnih masnoća (kakaoo maslac i mlečne masti) (*Glicerina i sar.*, 2016). „Luksuzna” mlečna čokolada sadrži oko 32% kakaoo delova. Ova čokolada sadrži: ugljene hidrate 55,26%; masti 34,21%; proteine 7,89% (*USDA*, 2018b). Mleko u prahu se dodaje u procesu proizvodnje (slika 3.6.).



Slika 3.6. Mlečna čokolada

**Bela čokolada** – proizvod, koji je dobijen od kakaoo maslaca, mleka ili mlečnih proizvoda i šećera (slika 3.7.). Ona ne sme da sadrži manje od 20% kakaoo maslaca, 14%

mlečne materije od kojih je najmanje 3,5% mečne masti (*Glicerina i sar.*, 2016). U procesu proizvodnje se ne dodaje kakao prah. Iako ne sadrži kakao, treba imati na umu obilje kakao butera i mleka u prahu koje sadrži ova čokolada. Bela čokolada sadrži i ugljene hidrate 59,52%, masti 30,95% i proteine 7,14% (*USDA*, 2018c).



**Slika 3.7.** Bela čokolada

U tabeli 3.1. je dat sadržaj komponenata u kakao zrnu, kakao prahu i crnoj čokoladi. U kakao zrnu 54% čine masnoće, 17,5% ugljeni hidrati i 11,5% proteini. U kakao prahu i čokoladi najzastupljeniji su ugljeni hidrati sa 43,6% i 51%, zatim, masnoće sa 24,5% i 32% i proteini sa 19,8% i 5%. Ovakav redosled u kakao prahu i čokoladi je očekivan zbog načina obrade kakao zrna.

**Tabela 3.1.** Sadržaj komponenata u kakao zrnu, kakao prahu i crnoj čokoladi izražen u procentima (*Liebere i sar.*, 1976; *Nevo-table*, 1986)

Komponenta	Kakao zrno (%)	Kakao prah (%)	Čokolada (crna) (%)
Voda	5	5,6	-
Proteini	11,5	19,8	5
Masnoća	54	24,5	32
Ugljeni hidrati	17,5	43,6	51
Minerali	2,6	6,5	0,6
Teobromin	1,2	2,3	0,8

Kakao maslac je osnova mnogih krema, tako da ima veliku primenu i u kozmetici i farmaceutskoj industriji.

Više od 95% kiselina u kakao maslacu čine masne kiseline, i to oleinska kiselina (35%), stearinska kiselina (34%) i palmitinska kiselina (34%) (*Beckett, 2002*). Pored masnih kiselina, prisutni su antioksidanti i trigliceridi, koji daju stabilnost kakao maslacu. Pored masnih kiselina, sadrži aromatična jedinjenja: tiazoli, piridini, pirazini, oksazoli. Takođe, prisutni su fosfolipidi i glikoproteini, steroli, tokoferoli, fASFatidi, vitamin A, vitamin D (*Laličić-Petronijević, 2012*).

Bez obzira na visok sadržaj lipida i šećera, korišćenje ove poslastice pozitivno utiče na zdravlje ljudi zbog prisustva antioksidanata, uglavnom polifenola i flavonoida (epikatehin i katehin). Utvrđeno je da visoke koncentracije antioksidanata značajno doprinose smanjenju rizika od raznih bolesti. Rizik nastanka krvnih ugrušaka i srčanog napada znatno smanjuje prisustvo flavonoida. Koncentracija flavonoida i alkaloida zavisi od sorte kakao zrna, korišćenog načina obrade i tehnološkog procesa proizvodnje kakao proizvoda i čokolade. Istraživanja *Steinberg-a i saradnika* (2003) su pokazala da bela čokolada nema polifenola, dok je njihov sadržaj veći u crnoj čokoladi u odnosu na mlečnu čokoladu, s obzirom na procenat kakao delova. Dodatne zdravstvene benefite daju procijanidini. Poznato je da oni štite od koronarnih srčanih bolesti. Istraživačka ekipa Dereka Schramm-a sa kalifornijskog univerziteta *Davis* (*Schramm i sar., 2001*) je davala čokoladu grupi dobrovoljaca kako bi proverili teoriju po kojoj procijanidini doprinose zdravlju kardiovaskularnog sistema (*Mladenović, 2014*). U ovoj studiji, čokolade različitog sadržaja procijanidina, je konzumiralo 10 dobrovoljaca. Oni koji su konzumirali čokoladu bogatu procijanidinima, nakon 2 sata su u plazmi imali 20 puta veću koncentraciju procijanidinskih metabolita. Kod njih je uočeno i smanjenje nivoa leukotriena, koji inače podstiču trombocite na povezivanje. Do istih rezultata su istraživači došli, kada su ćelije uzete iz aorte izložili dejstvu procijanidina (*Schramm i sar., 2001*).

Teobromin pozitivno deluje na rad srca. Stimulativno dejstvo proizvoda koji sadrže kakao, kao što je čokoladno mleko i čokolada, je niska zbog prisustva drugih komponenata kao što su šećer i mleko (*Catsberg i Kempen-Van Dommelen, 1990*). Čokolada koja ima 60% kakao delova ima 0,9% teobromina a mlečna čokolada ima od 0,15 do 0,20% teobromina (*Gavrilović, 2003*).

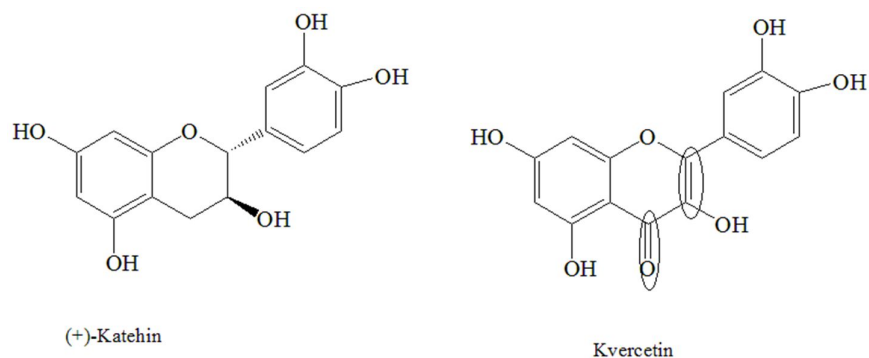
U 100 g čokolade koja sadrži 45 – 59% kakao delova, sadržano je: 4,85 g proteina; 31,28 g masnoća; 61,17 g ugljenih hidrata; 559 mg kalijuma; 146 mg magnezijuma; 206 mg

fosfora; 56 mg kalcijuma; 24 mg natrijuma; 8,02 mg gvožđa i 493 mg teobromina (USDA, 2018d).

### 3.2. Biološka aktivnost, značaj i podela polifenolnih jedinjenja

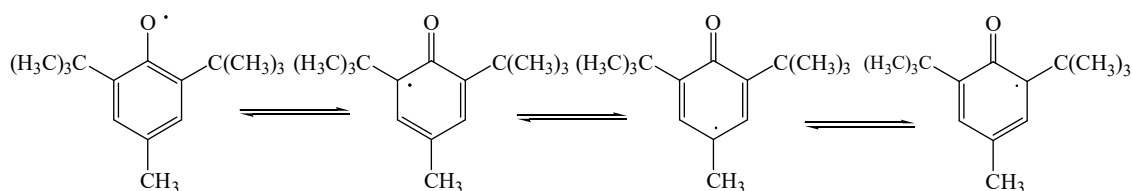
Fenolna jedinjenja predstavljaju glavnu klasu sekundarnih metabolita u biljkama i dele se na fenolne kiseline i polifenole. Ova jedinjenja su najčešće u biljkama kombinovana sa mono i polisaharidima, povezana sa jednom ili više funkcionalnih grupa ili se mogu pojaviti u obliku derivata, kao što su estri ili metil-estri. Mnoge studije su pokazale jaku i pozitivnu korelaciju ( $p \leq 0,05$ ) između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta voća i povrća. Uloga ovih antioksidanata, pored očuvanja kvaliteta hrane, je i u smanjenju lipidne oksidacije u biljnim i životinjskim tkivima, kao i u smanjenju rizika nastanka mnogih bolesti. Istraživanja su pokazala da kod ljudi, koji su držali dijetu bogatu voćem i povrćem, je smanjen rizik od upalnih procesa i nekih hroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, arteroskleroza, rak, dijabetes, katarakta, poremećaji kognitivnih funkcija i neurološka oboljenja (Muñoz-Cazares i sar., 2017).

Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja se pripisuje sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, doniranju atoma vodonika, elektrona ili helatnih katjona. Struktura molekula, položaj i broj hidroksilnih grupa i priroda supstitucije na aromatičnim prstenovima, daju fenolnim jedinjenjima sposobnost inaktivacije slobodnih radikala. Vodonikovi atomi susednih hidroksilnih grupa (*o*-difenol), koje se nalaze na različitim položajima prstena A, B i C, dvostruke veze benzenovog prstena i karbonilne grupe (-C=O) čine polifenole dobrim antioksidatima. Na slici 3.8. su prikazane strukture katehina i kvercetina (Muñoz-Cazares i sar., 2017). Iako oba jedinjenja imaju isti broj i položaj hidroksilnih grupa, kvercetin ima dvostruku vezu u položaj 2,3 C prstena i karbonilnu grupu u položaj 4 što ga čini reaktivnijim i daje veću vrednost TEAC (troloks ekvivalent antioksidativnog kapaciteta).



**Slika 3.8.** Razlika u strukturi katehina i kvercetina

Polifenolna jedinjenja su prvenstveno donori vodonika slobodnim radikalima. Kako se energija vodonika kod skvendžer slobodnih radikala smanjuje, taj proces prenosa vodonika je energetski povoljan i veoma brz. Polifenolna jedinjenja moraju imati niži redoks potencijal od slobodnih radikala, kako bi bili donori vodonika. Stabilnost fenoksil radikala je data na slici 3.9. (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).



**Slika 3.9.** Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala

Stabilizacija ovog radikala moguća je i njegovim kuplovanjem sa slobodnoradikaliskim vrstama karakterističnim za reakcije oksidacije lipida, pri čemu nastaju relativno stabilne neradikalne vrste (Duh i sar., 1999). Dokazano je da su vicinalne diolne funkcije značajne za kapacitet hvatanja radikala, kao i da metoksilacije ili glikolizacije *o*-hidroksi grupa kumarina i esterifikacija fenolnih kiselina smanjuju antioksidativnu aktivnost ovih jedinjenja.

Polifenolna jedinjenja deluju kao redukujući agensi, skvendžeri singeltnog kiseonika, antioksidanti donori vodonika, a imaju i osobine heliranja metala (Rice-Evans i sar., 1995).

Aglikonski deo polifenolnih jedinjenja je odgovoran za biološku aktivnost. U ćelijskom zidu se nalaze nerastvorna polifenolna jedinjenja, a u unutrašnjosti vakuole su rastvorna polifenolna jedinjenja. Istraživanja su pokazala da se koncentracija polifenola

smanjuje kako se zrelost ploda povećava, izuzetak su samo crveni plodovi gde se njihova koncentracija povećava zrenjem (Britton, 1983; Macheix i sar., 1990). Veoma je bitno razumeti modifikacije polifenolnih jedinjenja nakon prerade hrane, kao i njihovu biodostupnost. Takođe, treba imati na umu modifikaciju ovih jedinjenja nakon samih tehnika prerade hrane, da bi se mogli doneti zaključci o njihovoj biodostupnosti u namirnicama. Blanširanje i termička obrada namirnica prevodi polifenole u sekundarna jedinjenja. Pored modifikacije u samom molekulu, može doći do metabolizma ovih jedinjenja enzimskim i neenzimskim reakcijama, kada dolazi do reakcije konjugacije. Kod starih Japanaca, dnevno konzumiranje polifenolnih jedinjenja se kretalo od 183 mg/dan do 4854 mg/dan. Kafa i zeleni čaj su bili najveći izvor ovih jedinjenja. Od ukupno unesenih fenola, fenolne kiseline čine 1/3 dok su flavonoidi preostale 2/3 (Muñoz-Cazares i sar., 2017).

Zbog svojih antibakterijskih svojstva koriste se kao sredstva za dezinfekciju, kao i sirovina za proizvodnju lekova. Neka polifenolna jedinjenja se koriste i u kozmetici u proizvodnji krema za sunčanje. Klasifikacija ovih jedinjenja je data u tabeli 3.2.

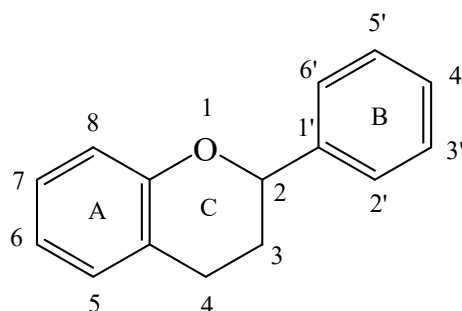
**Tabela 3.2.** Klasifikacija polifenolnih jedinjenja (*Shahidi i Ambigaipalan, 2015*)

Polifenolni antioksidanti						
Sintetički	Prirodni*					
butilovani hidroksitoluen (BHT)	Fenolne kiseline		Stilbeni	Tanini		Flavonoidi
butilovani hidroksianizol (BHA)	derivati hidroksibenzoeve kiseline	derivati hidroksicimne kiseline	resveratrol	hidrolizabilni tanini	kondenzovani tanini (proantocijanidini)	flavonoli (kvercetin, kamferol, izoramnetin)
terc-butilhidrohinon (TBHQ)	galna	p-kumarna		elagitanin	monomerni	flavononi
propil galat (PG)	p-hidroksibenzoeva	kafena		galotanim	dimeri	flavoni (apigenin, kristin, luteolin, rutin)
	vanilinska	ferulna			trimeri	flavonoli ((+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-epigalokatehin-3-galat, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin, (-)-epigalokatehin-3-galat)
	siringinska	sinapinska			4 – 6 meri	flavonoli (naringenin, morin)
	protokatehinska	hlorogenska			7 – 10 meri	antocijanidini (cianidin, leukocijanidin, delphinidin, prodelphinidin, leukodelphinidin, propelargonidin)
	elaginska				polimeri	izoflavonoidi (genistein, daizdein, glicitein, formononetin)

\*kumarini i lignani spadaju u prirodna polifenolna jedinjenja i ne podležu daljoj klasifikaciji

### 3.2.1. Struktura, podela i značaj flavonoida

Flavonoidi su biološki aktivni sekundarni metaboliti biljaka, male molekulske mase. Sekundarni proizvodi su biološki aktivni, a utvrđeno je više od 10000 strukturno različitih flavonoida. Zahvaljujući fizičkim i biohemijskim osobinama, flavonoidi mogu da stupe u interakciju sa mnogim ciljnim targetima u subcelularnim mestima i da se aktiviraju u mikroorganizmima, biljkama i životinjama (*Weston i Mathesius*, 2013). Osnovni strukturni skelet flavonoida čine 15 atoma ugljenika u osnovnoj strukturi (C6-C3-C6), od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A, kondenzovan sa piranskim prstenom C) (*Cook i Samman*, 1996). Ostalih šest C-atoma čine benzenski prsten (B) povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva (flavoni, dihidroflavoni, flavonoli, katehini, flavani i antocijanidini), tri (izoflavonoidi) i četiri (4-fenil-kumarini) (slika 3.10.).

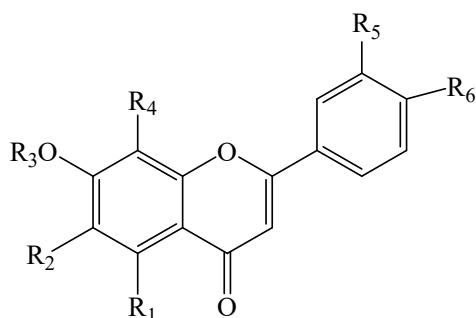


**Slika 3.10.** Opšta strukturna formula flavonoida

Flavonoidi poseduju antibakterijsku, antifungicidnu, antivirusnu i antitumorsku aktivnost (*Weston i Mathesius*, 2013). Flavonoidi smanjuju proizvodnju i eliminišu reaktivne vrste kiseonika (ROS): suzbijanjem singletnog kiseonika, inhibicijom enzima koji generišu ROS (ciklooksigenaza, lipoksigenaza, monooksidgenaza, ksantin oksidaza), heliranjem jona prelaznih metala (slika 3.13.), koji katalizuju proizvodnju ROS-a, gašenjem kaskadnih reakcija slobodnih radikala u lipidnoj peroksidaciji (*Counet i Collin*, 2003). Zbog malih vrednosti redoks potencijala, flavonoidi redukuju jake slobodne radikale (superoksidi, alkalni radikali, hidroksil radikali) (*Mierziak i sar.*, 2014). Hemijska struktura različitih klasa flavonoida prikazana je na slici 3.11.

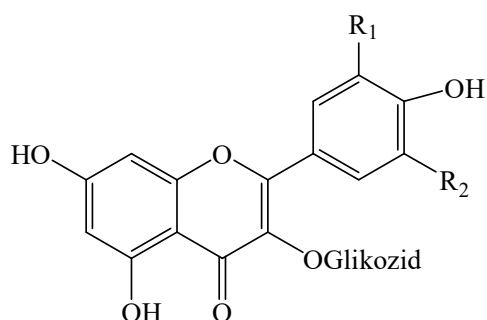


### Flavoni



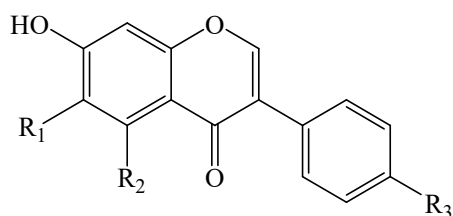
Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
baikalin	OH	OH	glukuronil	H	H	H
apigenin	OH	H	H	H	H	OH
luteolin	OH	H	H	H	OH	OH
krizin	OH	H	H	H	H	H
vogonin	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H

### Flavonoli



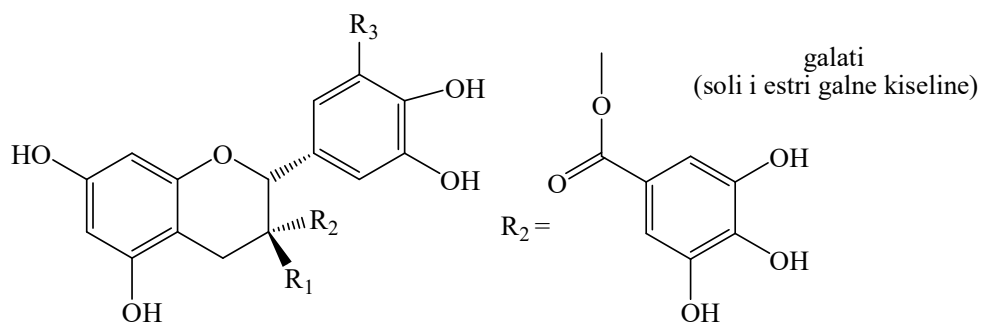
Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
kamferol	H	H
kvercetin	OH	H
mircetin	OH	OH
rutin	H	OH

### Izoflavoni



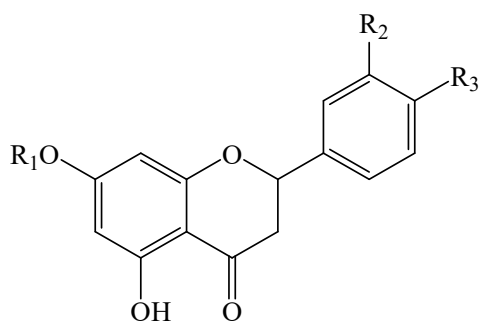
Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
daidzein	H	H	OH
genistein	H	OH	OH
glicitein	OCH <sub>3</sub>	H	OH
formononetin	H	H	OCH <sub>3</sub>
biohanin A	H	OH	OCH <sub>3</sub>

### Flavanoli



Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(+)-katehin	OH	H	H
(-)-epikatehin	H	OH	H
(+)-galokatehin	OH	H	OH
(-)-epigalokatehin	H	OH	OH
(-)-epigalokatehin galat	H	galat	OH

### Flavanoni



Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
naringin	glukoza	H	OH
naringenin	H	H	OH
eriodiktiol	H	OH	OH
hesperetin	H	OH	OCH <sub>3</sub>
taksifolin 7-OH	H	OH	OH
isosakuranetin	H	H	OCH <sub>3</sub>

Slika 3.11. Hemijska struktura i klasifikacija flavonoida

Nalaženje pojedinih klasa flavonoida u namirnicama je dato u tabeli 3.3.

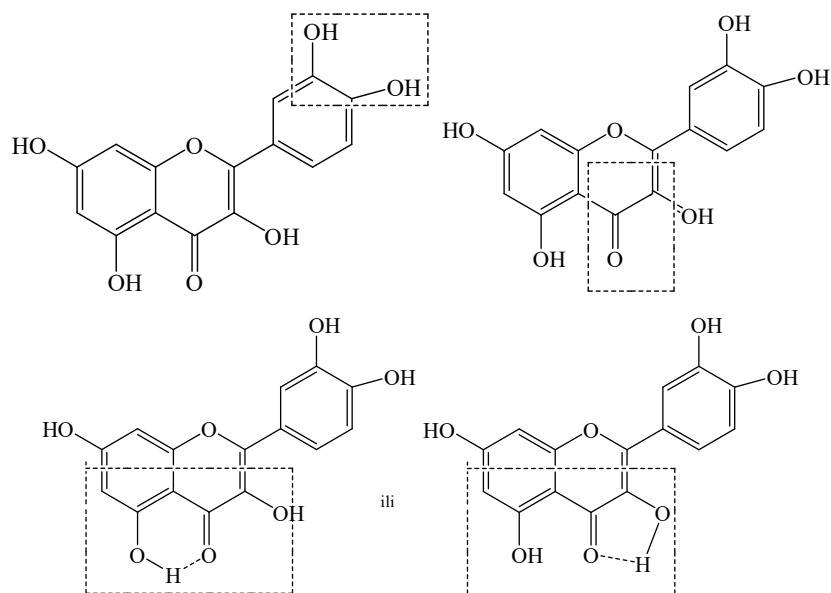
**Tabela 3.3.** Namirnice bogate flavonoidima (*Gharras, 2009*)

Klasa jedinjenja	Nalaženje u namirnicama	Sadržaj flavonoida (mg/kg ili mg/l)
<b>Flavonoli</b>	luk	350 – 1200
kvercetin	kelj	300 – 600
kamferol	praziluk	30 – 225
mircetin	čeri paradajz	15 – 200
	brokoli	40 – 100
	borovnica	30 – 160
	crna ribizla	30 – 70
	kajsija	25 – 50
	jabuka	20 – 40
	pasulj	10 – 50
	crno grožđe	15 – 40
	paradajz	2 – 15
	crni čaj	30 – 45
	zeleni čaj	20 – 35
crveno vino	2 – 30	
<b>Flavoni</b>	peršun	240 – 1850
apigenin	celer	20 – 140
luteolin	paprika	5 – 10
<b>Flavanoni</b>	sok od pomorandže	215 – 685
hesperetin	sok od grejfruta	100 – 650
naringenin	sok od limuna	50 – 300
<b>Izoflavoni</b>	sojino brašno	800 – 1800
daidzein	soja, kuvana	200 – 900
genistein	miso (japanski začín)	250 – 900
glicitein	tofu	80 – 700
	tempeh	430 – 530
	sojino mleko	30 – 175
<b>Monomerni flavanoli</b>	čokolada	460 – 610
katehin	mahunarke	350 – 550

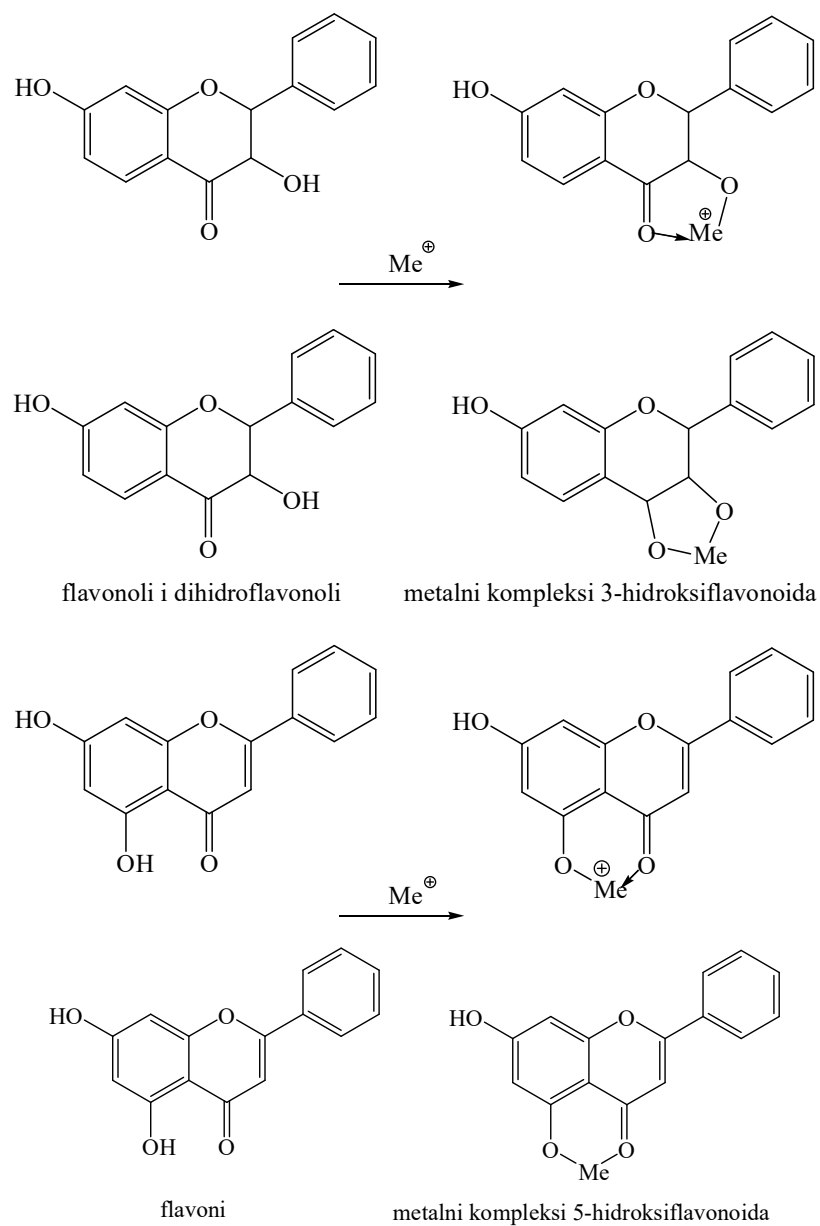
**Tabela 3.3.** Nastavak

epikatehin	kajsija	100 – 250
	višnja	50 – 220
	grožđe	30 – 175
	breskva	50 – 140
	borovnica	130
	jabuka	20 – 120
	zeleni čaj	100 – 800
	zrni čaj	60 – 500
	crveno vino	80 – 300
	fermentisani alkoholni sok (eng. <i>Cider</i> )	40

Flavonoidi, koji se nalaze u hrani i piću i imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Tri osnovne karakteristike, koje flavonoidi ispunjavaju i zbog kojih pokazuju antioksidativnu aktivnost su: 3' i 4' hidroksilne grupe, katehol struktura u prstenu B koja je pogodna za delokalizaciju elektrona (prva struktura na slici 3.12.), nezasićena dvostruka veza u položaju 2 – 3 u konjugaciji sa 4 – keto grupom omogućava delokalizaciju elektrona iz B prstena (druga struktura na slici 3.12.) i hidroksilne grupe na položaju 3 i 5 koje formiraju intramolekulsku vodoničnu vezu sa keto grupom prstena C (treća i četvrta struktura na slici 3.12.) (*Santos i sar.*, 2017).

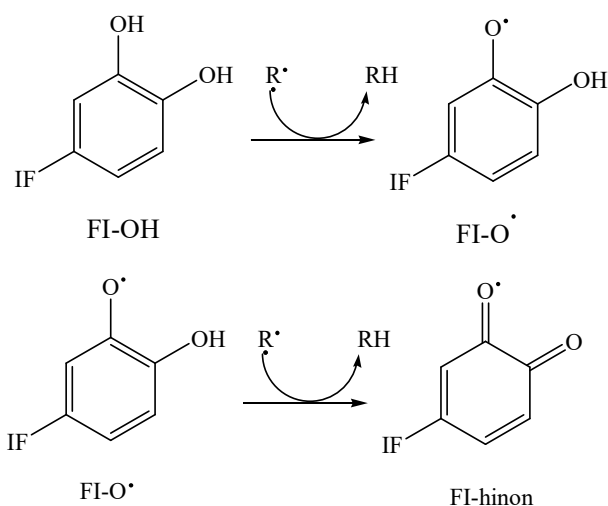


**Slika 3.12.** Funkcionalne grupe značajne za hvatanje slobodnih radikala



**Slika 3.13.** Helatirajući mehanizam flavonoida

Svoju antioksidativnu aktivnost, flavonoidi pokazuju i u lipofilnim i u hidrofilnim sistemima. Zbog niže vrednosti redoks potencijala (od 0,23 V do 0,75 V), flavonoidi pokazuju sposobnost redukcije radikala sa većim vrednostima redoks potencijala, kao što su superoksid anjon radikali, alkoksil radikali. Nastali alkoksil radikal (slika 3.14.), dalje može reagovati sa drugim radikalima pri čemu nastaje hinonska struktura, koja je stabilna (Pietta, 2000).

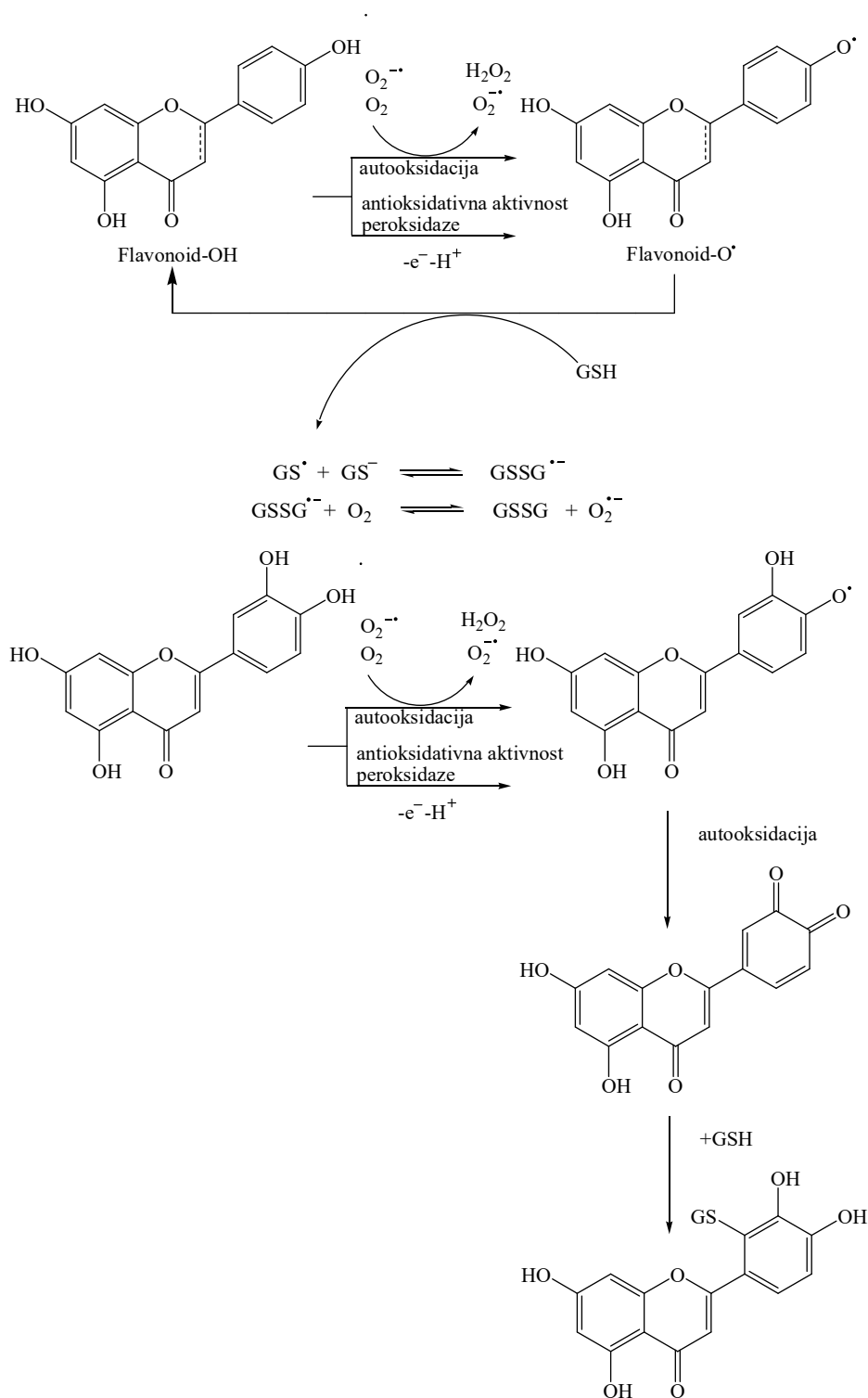


**Slika 3.14.** Mehanizam odavanja atoma vodonika flavonoida

Flavonoidi su pak pokazali, da umesto „hvatanja” slobodnih radikala, u uslovima oksidativnog stresa, dolazi do prooksidativnog delovanja, kada flavonoidi daju slobodne radikale. Sam mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida i katehol-tipa flavonoida dat je na slici 3.15.

Kako flavonoidi obuhvataju veliki broj jedinjenja, nisu podjednako zastupljeni u biljnom svetu. Najviše su flavoni i flavonoli odgovorni za zaštitu biljaka od UV radijacije. Takođe, pri obradi namirnica treba voditi računa o promeni boje i tamnjenju namirnica usled oksidacije katalizovane polifenoloksidazama.

Kvercetin sprečava oštećenje membrane eritrocita, koju bi izazvala oksidaciona sredstva, kao što su akrolein i fenilhidrazin, čime bi se oslobodilo gvožđe u svom aktivnom obliku. Katehol grupa na B prstenu, učestvuje u procesu heliranja Cu(II). Kvercetin je poznat kao dobro sredstvo za heliranje i stabilizaciju Fe(II), dok morin i kvercetin grade komplekse sa Cd(II). Sulfonski derivati kvercetina, koji se dobro rastvaraju u vodi i pokazuju malu toksičnost, se mogu koristiti kao antidoti u trovanju kadmijumom (*Rupesh i sar., 2014*).

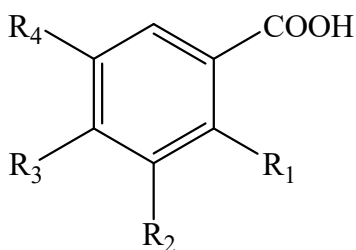


Slika 3.15. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida i katehol-tipa flavonoida

### 3.2.2. Fenolne kiseline

Osnovni skelet fenolnih kiselina čini fenolno jezgro i bočni niz, koji sadrži jedan ugljenikov atom (derivati benzoeeve kiseline) ili tri ugljenikova atoma (derivati cimetine kiseline) (Tumbas, 2010). U biljkama, fenolne kiseline nastaju u obliku glikozida i estara sa drugim prirodnim jedinjenjima, kao što su steroli, alkoholi, glukozidi i hidroksi masne kiseline. Njihova uloga u biljkama nije potpuno proučena, ali se zna da su neophodne za unos hranljivih materija, sintezu proteina, enzimsku aktivnost, fotosintezu. Utvrđeno je, pak, da prisustvo ferulne i galne kiseline inhibira klijanje semena i rast korena (Goleniowski i sar., 2013).

Struktura derivata hidroksibenzoeeve kiseline je C<sub>6</sub> – C<sub>1</sub>. Oni nastaju od benzoeeve kiseline i to su *p*-hidroksibenzoeva kiselina (R<sub>3</sub> grupa je OH, ostale grupe R su atomi H), salicilna kiselina, siringinska kiselina (R<sub>2</sub> i R<sub>4</sub> grupe su OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> grupa je OH i R<sub>1</sub> je H atom), 2,3-dihidroksibenzoeva kiselina (R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> grupe su OH, ostale grupe R su atomi H), 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina (R<sub>1</sub> i R<sub>4</sub> grupe su OH, ostale grupe R su atomi H), 3,4-dihidroksibenzoeva kiselina (R<sub>2</sub> i R<sub>3</sub> grupe su OH, ostale grupe R su atomi H), 3,5-dihidroksibenzoeva kiselina (R<sub>2</sub> i R<sub>4</sub> grupe su OH, ostale grupe R su atomi H), galna kiselina (R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> i R<sub>4</sub> grupe su OH grupe, a R<sub>1</sub> grupa je H atom), vanilinska kiselina (R<sub>2</sub> grupa je OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> grupa je OH, ostale grupe R su atomi H) i protokatehinska kiselina (R<sub>2</sub> i R<sub>3</sub> grupe su OH, ostale grupe R su atomi H). Na slici 3.16. prikazana je opšta formula hidroksibenzoeeve kiseline. Sve kiseline su nastale procesima hidroksilacije ili metilacije aromatičnog prstena (Goleniowski i sar., 2013).

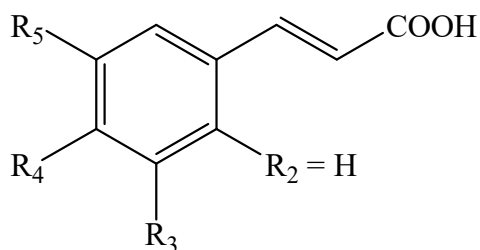


**Slika 3.16.** Opšta strukturna formula derivata hidroksibenzoeeve kiseline

Struktura derivata hidroksicimetine kiseline je C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub>. Ovde spadaju *p*-kumarinska kiselina (R<sub>3</sub> grupa je OH, ostale grupe R su atomi H), kafena kiselina (R<sub>2</sub> i R<sub>3</sub> grupe su OH,

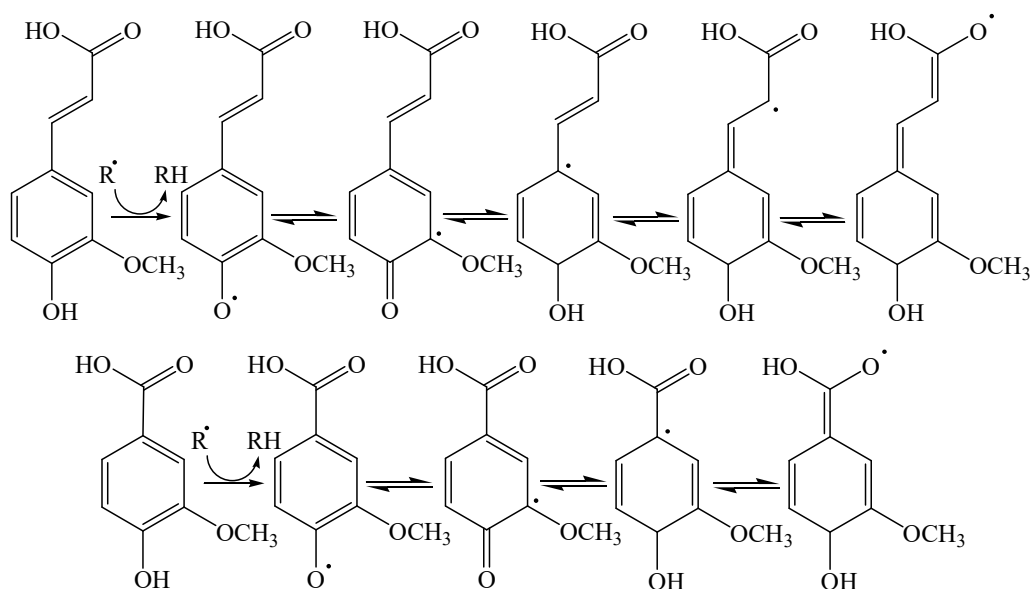


ostale grupe R su atomi H), ferulna kiselina ( $R_2$  grupa je  $OCH_3$ ,  $R_3$  grupa je OH, ostale grupe R su atomi H), sinapinska kiselina ( $R_2$  i  $R_4$  grupe su  $OCH_3$ ,  $R_3$  grupa je OH,  $R_1$  grupa je atom H), i njihovi esterifikovani/eterifikovani konjugati kao što je hlorogenska kiselina (kafena kiselina esterifikovana hinoidnom kiselinom). U namirnicama se nalaze kao monomeri, dimeri i vezani u obliku estara sa hidroksi kiselinama, mono ili disaharidima i polimerima. Takođe se mogu naći i kao amidi, sa aminokiselinama i aminima, naročito u kafi i kakaou (Goleniowski i sar., 2013). Na slici 3.17. je prikazana opšta formula hidroksicimetne kiseline.



Slika 3.17. Opšta struktura derivata hidroksicimetne kiseline

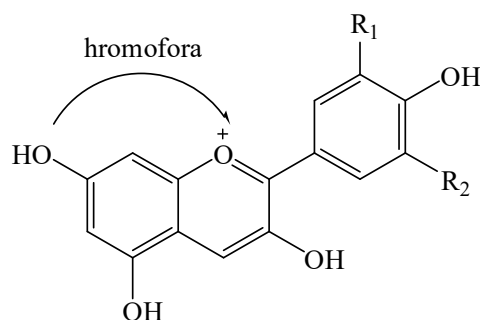
Utvrđeno je da porastom broja hidroksilnih grupa fenolnih kiselina, takođe, raste i njihova antioksidativna aktivnost. Mehanizam antioksidativnog delovanja derivata benzoeve i cimetine kiseline prikazan je na slici 3.18. (Zhou i sar., 2006).



Slika 3.18. Nastajanje i formiranje mogućih rezonantnih struktura fenoksi radikala derivata cimetine i benzoeve kiseline

### 3.2.3. Struktura, uloga i karakteristike antocijana

Antocijani su u obliku glikozida, dok antocijanidini predstavljaju aglikonsku strukturu. Antocijanidini se dele na 3-hidroksiantocijanidine, 3-deoksiantocijanidine i *o*-metilovane antocijanidine, dok se antocijani u zavisnosti od oblika dele na antocijanidin glikozid i acilovane antocijane. Najčešći antocijanidini su cijanidin, delphinidin, pelargonidin, i antocijanidini nastali metilovanjem njihovih hidroksilnih grupa, kao što su peonidin, petunidin i malvidin. Acilovani antocijani su detektovani u biljkama. Više od 65% antocijana je acilovano, pri čemu se ta šećerna jedinica antocijana aciluje alifatičnim (malonska, sirćetna, oksalna i dr. kiseline) ili aromatičnim acil grupama (*p*-kumarna, kafena, ferulna, galna i dr. kiseline). Šećeri, koji učestvuju u građenju glikozida su glukoza, ramnoza, galaktoza ili arabinoza (Mateus i de Freitas, 2009). Izolovano je ukupno 539 antocijana, od čega je 277 izolovano 1992. godine i kasnije, što upućuje na veliko interesovanje za antocijanima u poslednje vreme (Ćujić i sar., 2013). Samo je u prethodnoj deceniji izolovano novih 7 dezoksiantocijanidina, a otkrivena je i nova klasa antocijanidina – piranoantocijanidini (Beliz i sar., 2004). Osnovna struktura antocijana se naziva flavilijum katjon. Na slici 3.19. data je struktura antocijana i talasne dužine maksimuma apsorpcije (Giusti i Wrolstad, 2003).



Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	λ <sub>max</sub> (nm)
pelargonidin	H	H	494
cijanidin	OH	H	506
peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	506
delphinidin	OH	OH	508
petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	508
malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510

Slika 3.19. Osnovna struktura antocijana

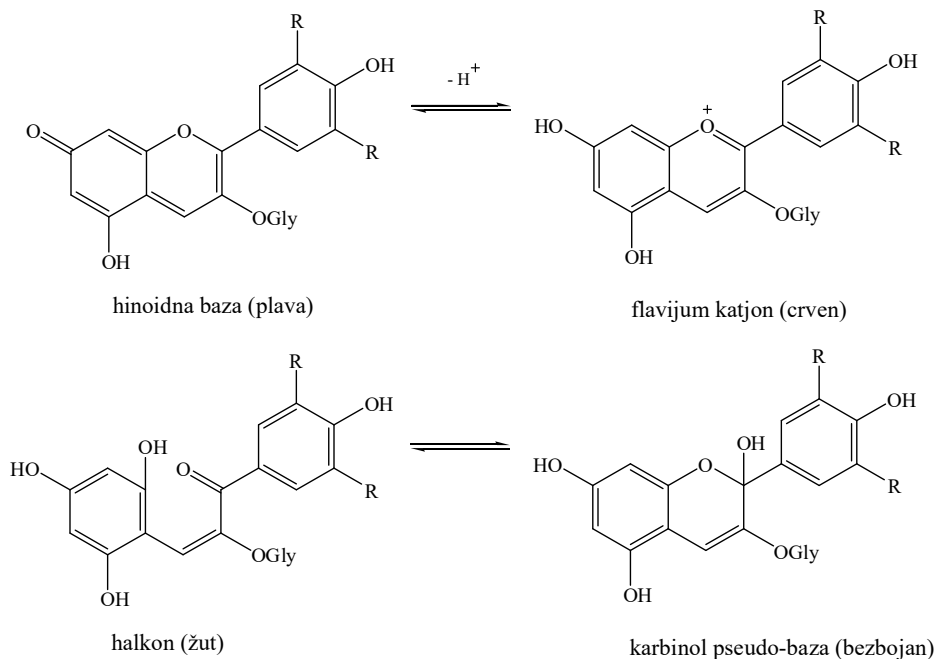
Danas je sve veće interesovanje za antocijane, jer oni predstavljaju prirodne obojene pigmente koji se ekstrakcijom mogu izolovati iz biljaka. Ovi pigmenti su crvene, plave ili ljubičaste boje, sa niskom toksičnošću ili uopšte ne pokazuju toksičnost. Najčešće se dodaju namirnicama kao prirodne boje, ali i zbog svojih antioksidativnih, nutritivnih i antimikrobnih osobina (Tumbas, 2010; Khoo i sar., 2017). Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority, EFSA) je sve derivate antocijana, kao prirodne pigmente klasifikovala kao E163 aditivi (Wrolstad, 2000) i ADI (eng. *Acceptable Daily Intake*) vrednost za antocijane iz kožice grožđa je 2,5 mg/kg dnevno (EFSA, 2013). Prema *Pravilniku o prehranbenim aditivima* (2018), u Srbiji su dozvoljeni aditivi E163.

Stabilnost antocijana zavisi od tipa samog pigmenta antocijanina, kopigmenta, svetlosti, temperature, pH, metalnih jona, enzima, kiseonika i antioksidanata. Stabilnost antocijanidina zavisi od broja hidroksilnih i metoksilnih grupa prstena B. Utvrđeno je da prisustvo ovih grupa smanjuje stabilnost antocijanidina u rastvoru. Kako su antocijanidini nestabilna jedinjenja, razlog glikozidacije, najčešće u položaju C3, je upravo povećanje stabilnosti i rastvorljivosti ovih jedinjenja u vodi. Takođe, neki antocijanini grade kompleks sa metalima npr. Fe, Al i Mg (Wrolstad, 2000; Jackman i Smith, 1992). Većina antocijana ima visoku stabilnost u kiseloj sredini, dok u baznoj sredini dolazi do njihove degradacije. Cijanidin i delfinidin su stabilni u kiselom obliku. Petunidin je pak stabilan pri višim pH vrednostima, pa se često koristi kao boja za pića na bazi bilja (Khoo i sar., 2017).

Antioksidativna aktivnost antocijana, zavisi od strukture samog jedinjenja, jer upravo orijentacija funkcionalnih grupa na prstenu određuje kojom lakoćom će donirati atom H iz hidroksilnih grupa slobodnim radikalima, kao i mogućnost rezonantne stabilizacije nesparenog elektrona. Efikasnost uklanjanja različitih ROS-a se razlikuje od jednog antocijana do drugog, pa je tako delfinidin najaktivniji protiv superoksidnog anjona (slede cijanidin i pelargonidin) dok je pelargonidin najefikasniji protiv hidroksil radikala. Generalno, njihova aktivnost zavisi od broja slobodnih hidroksilnih grupa piranskog prstena. Antocijani sa hidroksilnim grupama 3' i 4' brzo heliraju jone metala i formiraju stabilne komplekse. Takođe, njihova stabilnost i reaktivnost, a time i antioksidativna aktivnost, zavisi i od broja i položaja metil grupa. Na primer, manju antioksidativnu aktivnost su pokazali malvidin-3-glukozid i petunidin-3-glukozid u odnosu na cijanidin-3-rutinozid i delfinidin-3-glukozid (Miguel, 2011).

U kom obliku i u kojoj boji će se antocijani naći, zavisi od pH sredine. Pri niskim pH vrednostima (1 – 3) nalaze se u obliku flavonijum katjona (crvene boje), dok se pri većim pH

vrednostima (7 – 8) nalaze kao konjugovana baza hinonidalne strukture (ljubičaste boje) ili u poluacetalnom obliku, koji dalje hidrolizom daje halkone (žute boje). Na slici 3.20. prikazana je dinamička ravnoteža i promene u boji antocijana pri promeni pH.



**Slika 3.20.** Dinamička ravnoteža molekulskih oblika antocijana

Pored gore navedenog, smatra se da antocijani imaju pozitivno dejstvo u lečenju upalnih procesa, tumora, dijabetesa, edema, bakterija, virusnih influenci, herpesa, i da imaju efekat i na permeabilnost kapilara i dr. (*Bridle i Timberlake, 1997; Kong i sar., 2003.; De Pascual i Sanchez, 2008; Croizer i sar., 2010*).

Takođe se smatraju vrlo delotvornim kod kardiovaskularnih oboljenja i Alchajmerove bolesti. Zbog svog pozitivnog efekta na zdravlje, kao i ostali flavonoidi, i oni se smatraju važnim (*Croizer i sar., 2010*).

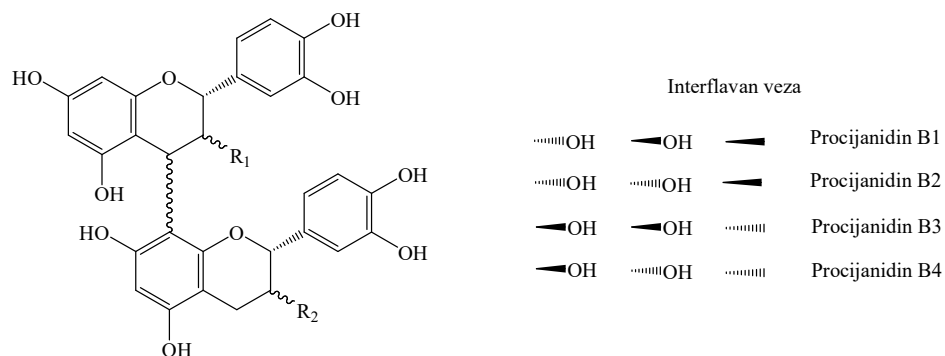
U toku procesa prerade kacao zrna, naročito u procesu fermentacije, dolazi do smanjenja koncentracije antocijanina, koji se hidrolizuju do antocijanidina, a oni se dalje polimerizuju sa flavan-3-olima do tanina. U istraživanjima *Wollgast-a i Anklam-a* (2000b), od antocijanina su identifikovani cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-galaktozid.

### 3.2.4. Polimeri flavan-3-ola

Grativne jedinice kondenzovanih tanina su flavan-3-oli, dok sami tanini predstavljaju polikondenzovana jedinjenja velikih molekulskih masa, oporog ukusa. Na osnovu gradivnih jedinica oni se mogu podeliti na hidrolizujuće i kondenzovane tanine.

Hidrolizirajući tanini predstavljaju poliestre galne kiseline ili njenih derivata i centralnog molekula šećera. Kondenzovani tanini (proantocijanidoli ili proantocijanidini) su grupa polimera flavan-3-ola, koji se sintetišu putem flavonoida u mnogim biljkama, kao što je grožđe, kakao, jabuka i hmelj. U grožđu su prisutni u kožici zrna, u semenu, tkivu stabljike i u pulpi i predstavljaju mešavinu monomera, oligomera i polimera. Polimeri se sastoje iz dve ili više različito vezanih jedinica flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola. Procijanidini se obično sastoje od (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epigalokatehina i (-)-epikatehin-3-*O*-galata povezanih interflavonoidnim vezama C4 – C6 ili C4 – C8, nastali oksidativnom kondenzacijom (*Li i sar.*, 2014).

Na slici 3.21. je data hemijska struktura procijanidina B1 – B4 koji se inače nalaze u kakao zrnu. Procijanidin B1 je dimer (-)-epikatehina i (+)-katehina, procijanidin B2 je dimer dva (-)-epikatehina, procijanidin B3 je dimer dva (+)-katehina i procijanidin B4 je dimer (+)-katehina i (-)-epikatehina.



Slika 3.21. Struktura procijanidina B-tipa

U zavisnosti od ostvarene veze između monomernih jedinica, dimeri i trimeri proantocijanidola se mogu grupisati u sledeće grupe:

- procijanidini B-tipa, koji nastaju kondenzovanjem dveju jedinica flavan-3-ola, vezivanjem na C4 – C8 (B1 – B5), a tokom formiranja interflavan veze od 2,3 cis prelaze u 3,4 trans,

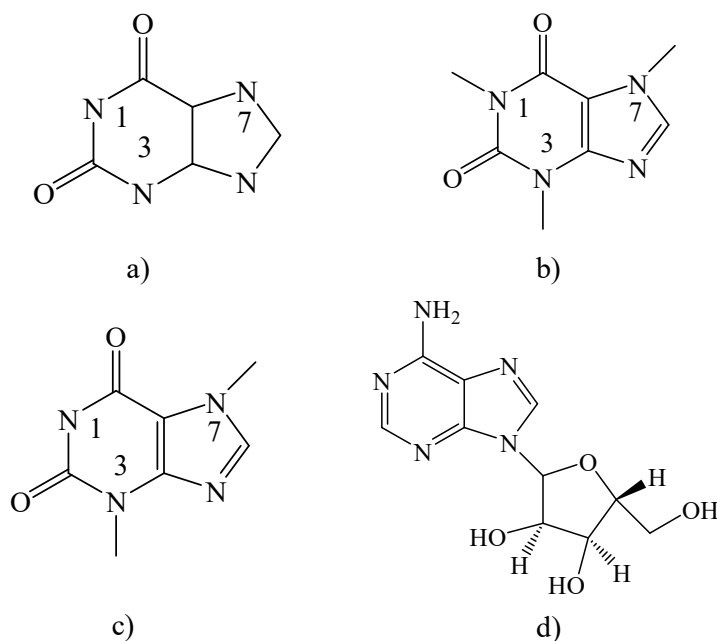
- proantocijanidini A-tipa, koji osim gore pomenutih veza, sadrže i epoksidnu vezu između C5 ili C7 gornjeg dela i C2 donjeg dela flavan-3-ola (A1 i A2),
- proantocijanidini trimeri C-tipa, koji sadrže tri flavanola sa dve C4-C8 interflavan veze (C1).

Na koncentraciju flavan-3-ola i procijanidina mogu uticati različiti biološki faktori i uslovi obrade. Fermentacija svežih zrna kakaoa, iako je od ključne važnosti za njegov ukus, takođe dovodi do smanjenja sadržaja flavan-3-ola. Prženje kakaoo zrna i tretiranje praha kakaoo alkalijama, takođe, utiče na konačan sadržaj flavan-3-ola i procijanidina (*Miller i sar.*, 2006).

### 3.3. Biološka aktivnost i značaj alkaloida

Alkaloidi predstavljaju organske molekule sa baznim atomom azota u bilo kom položaju u molekulu, ali ne uključuju azot u amidnoj ili peptidnoj vezi (*Bribi*, 2018). Ne postoji jednostavna i precizna definicija alkaloida, a ponekad je teško razlikovati alkaloidne od drugih metabolita koji sadrže azot. Alkaloidi predstavljaju grupu strukturno različitih molekula. Mnoga od ovih jedinjenja imaju moćne efekte (*Bribi*, 2018). Dobro poznati alkaloidi, koji imaju narkotičke efekte su morfin i kodein. Derivat morfina je apomorfina, koji se koristi u lečenju Parkinsonove bolesti. Papaverin se koristi za relaksaciju mišića, dok su sangvinarin i berberin antimikrobni agensi (*Bribi*, 2018). Farmaceut Meisner je predložio početkom 19. veka ovaj naziv, zbog njihovog baznog karaktera. Prvi alkaloid, morfijum, je izolovan iz cveta maka 1804. godine. Drugi poznati alkaloidi koji se često koriste u medicini su: kokain, pronađen 1860. godine, nikotin 1828. god. i kofein 1820. god. Strihnin i konin su alkaloidi ali i jaki otrovi. Nalaze su u mnogim biljkama i namirnicama, ređe u gljivama i algama. Značajni alkaloidi koji se svakodnevno koriste u ishrani su: kofein (kafa, koka kola, čaj), teobromin (kakaoo, čaj), teofilin (čaj), nikotin (duvan) i dr. Oko 30 alkaloida ima veliki komercijalni značaj, prvenstveno kao lekovi, arome ili otrovi (*Bribi*, 2018).

Teobromin je otkriven u kakaoo zrnu 1841. godine. Kofein (1,3,7-trimetilksantin) i teobromin (3,7-dimetilksantin) spadaju u grupu alkaloida – ksantina, a razlika je u broju metil grupa. Teobromin je strukturno sličan molekulu kofeina, dok se mehanizam njihovog delovanja zasniva na blokadi receptora adenozina i inhibiciji fosfodiesteraze (*Martinez-Pinilla i sar.*, 2015) (slika 3.22.).



Slika 3.22. Struktura: a) ksantin, b) kofein, c) teobromin, d) adenzin

Teobromin, u manjem obimu, stimuliše centralni nervni sistem u odnosu na druge metilksantine. Pozitivni zdravstveni efekti teobromina su: zaštita zubne gleđi, supresija kašlja, snižavanje krvnog pritiska usled širenja krvnih sudova, opuštanje bronhijalnih mišića u plućima, kardiovaskularna zaštita povećanjem HDL holesterola i smanjenjem LDL holesterola (*Rodriguez i sar.*, 2015).

### 3.4. Faktori koji utiču na stabilnost katehin tip flavonoida i antocijana

Profil polifenolnih komponenti u kakao zrnu, a samim tim i u proizvodima koji sadrže kakao, zavisi od brojnih faktora kao što su genotip, klimatski i agronomski uslovi, postupak obrade nakon berbe. Zbog pozitivnog efekta na zdravlje, ova jedinjenja su privukla veliku pažnju. Izuzetno je važno održati, što je to više moguće, koncentraciju polifenolnih jedinjenja u gotovim proizvodima kakao praha. Pored samog načina prerade kakao zrna i tehnologije dobijanja čokolade, veoma je bitno i pravilno odabrati uslove čuvanja i skladištenja tih proizvoda (pH, temperatura, vlažnost). U svojim istraživanjima *Zeng i saradnici* (2017)

navode da povećanje temperature, pH ili koncentracije kiseonika dovodi do brže degradacije polifenola u čajevima, pri čemu najveći uticaj ima pH. Takođe, njihova istraživanja su pokazala da koncentracija proteina, antioksidanata i metalnih jona najviše utiče na stabilnost (-)-epigalokatehin galata.

Antocijani sa flavonoidima grade glikozide (*Clifford, 2000*) i spadaju u grupu nestabilnih jedinjenja. Njihova stabilnost se menja sa promenom temperature i pH, a takođe zavisi i od prisustva kiseonika, askorbinske kiseline, šećera i jona metala. Enzimi koji su uključeni u degradaciju antocijana su polifenoloksidaze, peroksidaze i  $\beta$ -glukozidaze (*Mazza i Miniati, 1993*). Primarna degradacija antocijana je pri termalnoj degradaciji, kada dolazi do oksidacije ili kidanja kovalentnih veza. Sami mehanizmi procesa degradacije, kao i značaj nastalih proizvoda u ishrani nisu poznati. Na stabilnost antocijana utiče i prisustvo jona metala koji sa taninima formiraju komplekse i smanjuju redoks potencijal ovih jedinjenja (*Su i sar., 2003; Wang i Helliwell, 2000*).

### 3.4.1. Uticaj pH

Polifenoli su izuzetno nestabilni u neutralnoj i alkalnoj sredini gde se razlažu za samo par minuta, dok su izuzetno stabilni u kiseloj sredini pri  $\text{pH} < 4$  (*Zeng i sar., 2017; Komatsu i sar., 1993; Zimeri i Tong, 1999; Chen i sar., 2001; Su i sar., 2003*). U alkalnoj sredini veoma brzo dolazi do degradacije polifenola usled autooksidacije i otvaranja fenolnog prstena (*Cilliers i Singleton, 1990*). Katehini prisutni u čaju su nestabilni u fosfatnom puferu ( $\text{pH } 7,4$ ), u kome se za 3h razloži oko 80%, dok je taj gubitak 40% kada su katehini 3h u ključaloj vodi. Takođe, utvrđeno je da katehini prisutni u alkoholnom piću se degradiraju 50% u toku prvog meseca skladištenja (*Zeng i sar., 2017*). *Kumamoto i saradnici* (2001) su ispitivali četiri flavonoida katehin tipa i uočili su da oni pokazuju malu antioksidativnu aktivnost na  $\text{pH } 1 - 5$ , veliku aktivnost pri  $\text{pH } 6 - 12$ , a da aktivnost znatno opada pri  $\text{pH}$  vrednostima većim od 12. Takođe su došli do zaključka da katehini sa manjom  $\text{pK}_{a1}$  pokazuju veću antioksidativnu aktivnost. Katehin tip flavonoidi svoju antioksidativnu aktivnost pokazuju pri  $\text{pH}$  vrednostima nižim od  $\text{pK}_{a1}$  vrednosti, kada su potpuno protonovani. Još jedan faktor, koji utiče na antioksidativnu aktivnost je formiranje stabilnih fenoksi i semihinoidnih radikala koji lako reaguju sa radikalima lipida i zbog toga se očekuje veća aktivnost na  $\text{pH} > 5$ . Kada je  $\text{pH} > 12$ , antioksidativna aktivnost se smanjuje jer nastaje katehinska kiselina.



Što se tiče uticaja pH na stabilnost antocijana, zna se da su pri  $\text{pH} \leq 3$  antocijani u obliku flavijum katjona narandžaste ili crvene boje. Pri povećanju pH vrednosti, dolazi do kinetičke i termičke konkurencije između reakcije hidratacije flavijum katjona i reakcije transfera protona kiseline hidroksilnoj grupi aglikona. Prva reakcija daje bezbojni karbinol pseudo-bazu, nakon čega može doći do otvaranja prstena i nastanka halkona pseudo-baze, i dalje do nastanka hinonoidalne baze. Dalja deprotonacija hinonoidne baze se dešava pri pH između 6 i 7, pri čemu nastaje rezonantno stabilan hinonoidalni anjon (*Roobha i sar.*, 2011).

### 3.4.2. Uticaj temperature

*Komatsu i saradnici* (1993) su pokazali da se na temperaturi od 82 °C odigravaju dve ili više paralelnih reakcija, kao što su termalna degradacija i epimerizacija. Mnogi autori su u svojim radovima uočili da se nakon termičke obrade analiziranih grupa kakaoa, sadržaj monomernih flavan-3-ola postepeno povećao (*Kothe i sar.*, 2013; *Jolic i sar.*, 2011). Povećanje sadržaja se najverovatnije javlja usled epimerizacije (-)-epikatehina (2R, 3R) u epimer (-)-katehin (2S, 3R) (*Kofink i sar.*, 2007). Takođe, povećanje sadržaja na visokim temperaturama se pripisuje i degradaciji procijanidina do slobodnih monomera, flavan-3-ola (*Harijono i sar.*, 2012). Vlažnost vazduha takođe utiče na povećanje sadržaja. Pri većoj vlažnosti vazduha, prilikom zagrevanja na temperaturama višim od 135 °C, koncentracija može da se poveća od 2 do 12 puta u odnosu na sirove uzorke (*Harijono i sar.*, 2012).

Termalna degradacija ovih jedinjenja prati kinetiku reakcije prvog reda, koja se može izraziti preko jednačina:

$$c_1 = c_0 \exp(-kt) \quad (3.1)$$

$$t_{1/2} = -\ln 0,5/k = 0,693/k \quad (3.2)$$

Razgradnja antocijana je praćena u uzorcima kakao zrna različitih sorti, a utvrđeno je da raste sa porastom temperature (*Oracz i sar.*, 2015a). Takođe je degradacija praćena i u soku od borovnice gde je zapaženo isto ponašanje antocijana (*Patras i sar.*, 2010). To je i očekivano s obzirom na to da antocijani predstavljaju pigmente koji su veoma nestabilni i lako podležu degradaciji pod uticajem temperature i pri povećanom izlaganju kiseoniku (*Sadilova i sar.*, 2006). Antocijani se na visokim temperaturama hidrolizuju do aglikona, koji se, zatim, transformišu do halkona. Spontanom degradacijom halkona fenolnim kiselinama ili

polimerizacijom sa drugim polifenolima, nastaju braon polimerni pigmenati (*Patras i sar.*, 2010; *Fracassetti i sar.*, 2013). Termička obrada ima veći uticaj na antocijane u onim uzorcima u kojima su prisutni u manjim koncentracijama (*Oracz i sar.*, 2015a).

### 3.4.3. Uticaj skladištenja

Uticaj skladištenja na očuvanje polifenola u različitim proizvodima od borovnice i u čajevima je takođe proučavan. *Friedman i saradnici* (2009) su uočili da se sadržaj katehin tip flavonoida smanjuje tokom skladištenja čajeva. Pri tome, sadržaj najzastupljenijeg (-)-epigalokatehin-3-galata (EGCG) se smanjio za 28%, a sadržaj (-)-epigalokatehina (ECG) se smanjio za 51%. Ovi rezultati ukazuju da je ECG osetljiviji od EGCG. Prosečan gubitak katehin tip flavonoida nakon 6 meseci je bio 32%.

Što se tiče sadržaja ukupnih antocijana tokom vremena čuvanja, prema literaturnim podacima, dolazi do smanjenja sadržaja (*Brownmiller i sar.*, 2008). Gubitak monomernih antocijana je u intervalu od 28% do 59%, dok se antioksidativni kapacitet smanjuje u opsegu od 53% do 73%. Najveći gubitak ukupnih antocijana u svim voćnim proizvodima je nakon šest meseci skladištenja i to za oko 60%. Procenat polimernih pigmenata je vrlo nizak u svežem voću, dok stajanjem značajno raste i to proporcionalno dužini stajanja. Gubitak ukupnih antocijana je praćen porastom polimerne boje, što ukazuje da se antocijani polimerizuju tokom čuvanja. Gubitak antocijana i porast polimerne boje mogu biti uzrokovani faktorima, kao što su rezidualna enzimska aktivnost i reakcije kondenzacije sa drugim polifenolnim jedinjenjima.

## 3.5. Antioksidanti i njihova aktivnost

### 3.5.1. Definicija i podela slobodnih radikala

Slobodni radikali su proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma. Slobodni radikali se mogu definisati kao atomi ili molekuli, koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj orbitali. Neparan broj elektrona čini slobodni radikal nestabilnim, kratkotrajnim i visoko reaktivnim. Tako reaktivni, vezuju elektron iz drugih jedinjenja da bi postali stabilni, a

to jedinjenje postaje slobodni radikal koji započinje kaskadne lančane reakcije koje oštećuju živu ćeliju (*Phaniendra i sar.*, 2014).

Nespareni elektron se može nalaziti na C atomu, kao kod alkil radikala ( $\cdot\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$ ), na O atomu, kao kod alkoksil, hidroksil, peroksil, superoksid anjon radikala ( $\text{RO}\cdot$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ ), ili na S atomu, kao kod tiil radikala ( $\text{n-C}_6\text{H}_9\text{S}\cdot$ ). Neretko, nesparen elektron mogu imati i atomi halogena ( $\text{Cl}\cdot$ ), alkalnih metala ( $\text{Na}\cdot$ ), ali i joni nekih drugih metala:  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ .

Reaktivne kiseonične vrste (eng. *Reactive Oxygen Species* – ROS) i reaktivne azotne vrste (eng. *Reactive Nitrogen Species* – RNS) su u niskim koncentracijama potrebne za fiziološke funkcije, funkcije imunog sistema (odbrana od patogenih mikroorganizma) i redoks regulaciju. Ukoliko se nalaze u većim koncentracijama toksične su za organizam jer dovode do oksidativnog i nitrozativnog stresa čime uzrokuju oštećenje biomolekula. Do ovih stresova dolazi ukoliko je povećana produkcija ROS-a/RNS-a ili postoji istovremeni nedostatak enzima i antioksidanata. Višak ROS-a može oštetiti integritet biomolekula (lipida, proteina i DNK) što dovodi do povećanog oksidativnog stresa kod različitih bolesti (dijabetes, neurodegenerativne bolesti, reumatoidni artritis, katarakta, kardiovaskularne bolesti, respiratorne bolesti). Inače, ROS i RNS se mogu podeliti u dve grupe jedinjenja: radikali i neradikali (tabela 3.4.). Radikali sadrže nespareni elektron, a neradikali, npr. kiseonik, sadrže dva nesparena elektrona i predstavljaju biradikal (*Phaniendra i sar.*, 2014). Dobijanje RNS-a je složen proces u kome učestvuju enzimi i kiseonik, pa će dalje u tekstu biti prikazan način dobijanja ROS-a.

**Tabela 3.4.** ROS/RNS vrste koje nastaju tokom metabolizma  
(*Phaniendra i sar.*, 2014)

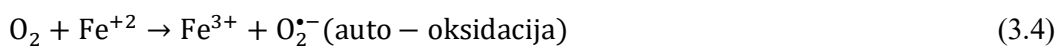
Slobodni radikal	Simbol	Poluvreme života
<b>reaktivne kiseonikove vrste (ROS)</b>		
<b>radikali</b>		
superoksid	$\text{O}_2\cdot^-$	$10^{-6}$ s
hidroksil	$\cdot\text{OH}$	$10^{-10}$ s
alkoksil radikal	$\text{RO}\cdot$	$10^{-6}$ s
peroksil radikal	$\text{ROO}\cdot$	17 s
<b>neradikali</b>		
vodonik-peroksid	$\text{H}_2\text{O}_2$	stabilan

**Tabela 3.4.** Nastavak

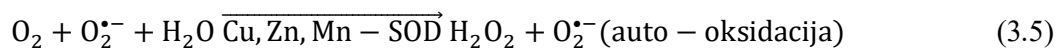
singletni kiseonik	$^1\text{O}_2$	$10^{-6}$ s
ozon	$\text{O}_3$	s
organski peroksidi	ROOH	stabilan
hipohlorna kiselina	HOCl	stabilan (min)
hipobromna kiselina	HOBr	stabilan (min)
<b>reaktivne azotne vrste (RNS)</b>		
<b>radikali</b>		
azot oksid	$\text{NO}^\bullet$	s <sup>a</sup>
azot dioksid	$\text{NO}_2^\bullet$	s
<b>neradikali</b>		
peroksinitrit	$\text{ONOO}^-$	$10^{-3}$ s
nitrozil katjon	$\text{NO}^+$	s
nitroksil anjon	$\text{NO}^-$	s
azot -trioksid	$\text{N}_2\text{O}_3$	s
azot-tetraoksid	$\text{N}_2\text{O}_4$	s
azotasta kiselina	$\text{HNO}_2$	s
peroksinitritna kiselina	$\text{ONOOH}$	dosta stabilna
nitril-hlorid	$\text{NO}_2\text{Cl}$	s

<sup>a</sup>vreme poluživota nekih radikala zavisi od sredine, pa za  $\text{NO}^\bullet$  u rastvoru zasićenom vazduhom, može biti nekoliko minuta

**Superoksid anjon radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )** - Superoksid anjon i vodonik-peroksid su glavne kiseonične vrste, koje dovode do oksidacije ćelija i tkiva (Stief, 2003; Harman, 2001). Ovaj radikal nastaje u toku enzimskih procesa, u reakciji autooksidacije i neenzimskim elektron transfer reakcijama kada se elektron prenosi na molekularni kiseonik (Phaniendra i sar., 2014). Pri nižim pH vrednostima, češće se nalazi u obliku hidro-peroksil radikala ( $\text{HO}_2$ ) (3.3-3.5):



U reakciji dismutacije, superoksid anjon radikal se oksiduje do kiseonika, dok se drugi redukuje do vodonik-peroksida.



**Hidroksil radikal** ( $\text{OH}^\bullet$ ), neutralni oblik hidroksilnog jona, je izuzetno raktivni slobodni radikal, koji može reagovati sa organskim i neorganskim molekulima u živim organizmima i izazvati ozbiljna oštećenja ćelije (Lee i sar., 2004; Ashok i Ali, 1999). Ovi radikali reaguju sa lipidima, polipeptidima, proteinima i DNK (Hawkins i sar., 2001; Ashok i Ali, 1999). Oni su dobri elektrofilni i mogu da izdvoje elektrone iz proteina i polinezasićenih masnih kiselina (Ashok i Ali, 1999; Juurlink i Paterson, 1998; Halliwell, 1996), formirajući ugljenikove slobodne radikale ( $\text{R}^\bullet$ ) (Phaniendra i sar., 2014). Fentonova (3.6) i Haber-Weiss-ova reakcija (3.7) su primer reakcija dobijanja hidroksil radikala.



**Vodonik-peroksid** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) može biti generisan u reakcijama dismutacije superoksid anjona. Jednom proizveden  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pod dejstvom katalaze ili glutation peroksidaze daje vodu i kiseonik (Evans i Halliwell, 1999; Mezzetti i sar., 1990). Iako nije slobodan radikal i nema direktan uticaj na DNK, može da ošteti DNK jer u Fentonovoj reakciji prelazi u hidroksil radikal (Hawkins i sar., 2001; Phaniendra i sar., 2014).

**Singletni kiseonik** je metastabilno stanje molekulskog kiseonika. Singletni kiseonik može da nastane iz  $\text{H}_2\text{O}_2$  tokom reakcije sa hipohloritom ( $\text{OCl}^-$ ) u ćelijama (jednačina 3.8) (Hawkins i sar., 2001; Stief, 2003). Nakon aktivacije, molekulski kiseonik se pobuđuje do prvog aktivacionog stanja  $^1\Delta_g$ , a zatim se pobuđuje do sledećeg višeg singletnog stanja  $^1\Sigma_g$  (Phaniendra i sar., 2014).



**Peroksil i alkoksil radikali** - Peroksil radikali ( $\text{ROO}^\bullet$ ) se formiraju direktnom reakcijom kiseonika sa alkil radikalima ( $\text{R}^\bullet$ ) kao na primer, reakcija između lipidnih radikala i kiseonika (Lee i sar., 2004; Knight, 2000). Raspadanje alkil peroksida ( $\text{ROOH}$ ), takođe, može da da peroksil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) i alkoksil radikale ( $\text{RO}^\bullet$ ) (Halliwell, 1991; Evans i Halliwell., 1999; Cross i sar., 1987; Halliwell, 1996; Halliwell, 1977). Peroksil i alkoksil radikali su uključeni u fazu propagacije lipidne peroksidacije.

### 3.5.2. Antioksidativna zaštita i određivanje antioksidativnog potencijala

Antioksidanti inhibiraju oksidaciju drugih molekula. Proizvodi oksidacionih reakcija su slobodni radikali, koji dovode do lančanih reakcija, a kada se ove reakcije dešavaju u ćeliji dovode do oštećenja ili smrti same ćelije. Antioksidanti zaustavljaju lančane reakcije uklanjanjem slobodnoradikalnih intermedijera i inhibicijom drugih oksidacionih reakcija. Antioksidanti su redukcionni agensi, kao što su tioli, askorbinska kiselina ili polifenoli. Termin antioksidant je definisan na više načina. Jedan od njih je: antioksidanti su supstance koje i u malim koncentracijama mogu sprečiti ili usporiti oksidaciju supstanci koje se lako oksiduju. U nauci o hrani, antioksidanti se definišu kao supstance koje se u namirnicama nalaze u koncentracijama nižim od koncentracije oksidanata i znatno smanjuju ili sprečavaju štetne efekte reaktivnih vrsta (kiseonik, azot) na normalne fiziološke funkcije ljudi. Antioksidanti su odgovorni za odbrambeni mehanizam organizma od patologija povezanih napadom slobodnih radikala, kao što su rak, Parkinsonova bolest, Alchajmer ili arteroskleroza. Faktori, koji utiču na efikasnost antioksidanata, su energija aktivacije antioksidanata, redoks potencijal, i stabilnost pri promeni pH tokom obrade namirnica (*Moharram i Youssef, 2014*).

Antioksidanti se dele prema funkciji na primarne i sekundarne, a prema prirodi na enzimске i neenzimске molekule. Primarni antioksidanti su oni koji reaguju sa lipidnim radikalima, zaustavljaju lančane reakcije a lipidne radikale prevode u stabilnije produkte. Sekundarni antioksidanti hvataju slobodne radikale i tako zaustavljaju lančane reakcije. Podela antioksidanata je data u tabeli 3.5. (*Moharram i Youssef, 2014*).

Antioksidativna aktivnost se određuje *in vitro* metodama. Sve analitičke metode se mogu podeliti u tri kategorije: spektrometrijske, elektrohemijske i hromatografske metode. Sve metode koje se koriste se svode na jedan od procesa: transfer elektrona, hvatanje slobodnih radikala i inhibicija lipidne peroksidacije. U principu, najbolje je za određivanje antioksidativne aktivnosti primeniti kombinaciju metoda (tabela 3.5.), koje se zasnivaju na različitim mehanizmima delovanja antioksidanata.

**Tabela 3.5.** Podela antioksidanata

Antioksidanti										
Enzimski		Neenzimski								
primarni	sekundarni	flavonoidi	organosumporne komponente	azotne neproteinske komponente	minerali	kofaktori	fenolne kiseline	krotenoidi	vitamini i derivati	
superoksid dismutaza	glutation reduktaza	flavonoli (kvercetin, kemferol)	alil sulfid	urinska kiselina	Zn	koenzim Q <sub>10</sub>	hidroksicimetne kiseline	β-karoten	A	
katalaza	glukoza-6- fosfat- dehidrogenaza	flavanoli (katehin, pelagonidin)					Se	hidroksibenzoewe kiseline	likopen	C
glutation peroksidaza		antocijanidini (cijanidin, pelagoridin)							lutein	E
		izoflavonoidi (genistein)							zeaksantin	
		flavanoni (hesperetin)								
		flavoni (krizin)								

**Tabela 3.6.** Kategorije metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti

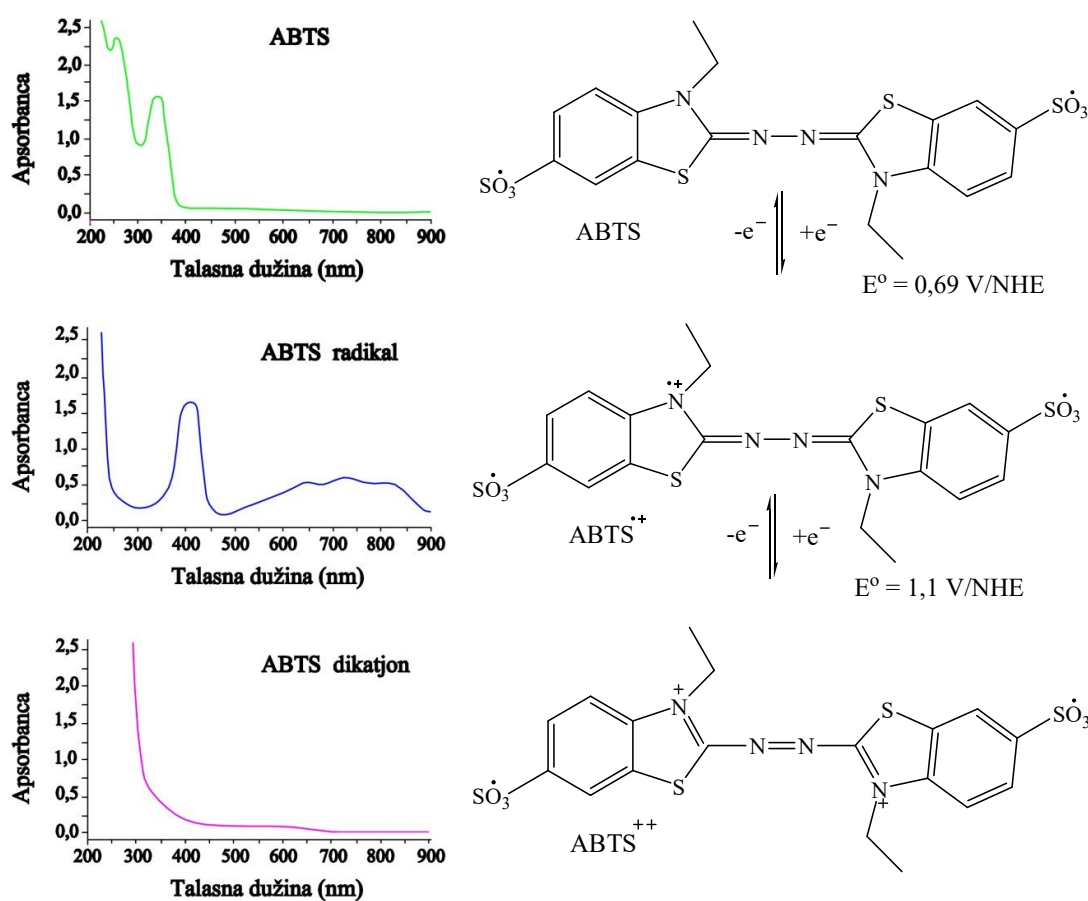
Metoda	Princip metode	Određivanje krajnjih proizvoda
<b>Spektrofotometrijske</b>		
<b>Metode transfera elektrona</b>		
TEAC	antioksidativna aktivnost koja se izražava kao ekvivalent troloksa	kolorimetrijski
FRAP	redukcija kompleksa Fe(III)-tripiridiltriazin antioksidantima do kompleksa Fe(II)-tripiridiltriazin	kolorimetrijski
PFRAP	redukcija $K_3[Fe(CN)_6]$ antioksidantima, reakcija $K_4[Fe(CN)_6]$ sa $Fe^{3+}$	kolorimetrijski
DPPH	antioksidativna reakcija sa organskim radikalima	kolorimetrijski
CUPRAC	redukcija Cu(II) do Cu(I)	kolorimetrijski
ukupni fenoli po Folinu-Ciocalteu	oksidacija fenolnih grupa do hinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa	kolorimetrijski
<b>Spektrofotometrijske</b>		
<b>Metode transfera atoma H</b>		
ORAC	antioksidativna reakcija sa peroksil radikalima, izazvana AAPH (2,2'-azinobis-2-amidin-propan)	gubitak fluorescencije
TRAP	antioksidativna metoda za hvatanje radikala luminola, nastalih razgradnjom AAPH	gašenje hemiluminiscencije
<b>Elektrohemijske tehnike</b>		
ciklična voltametrijia	potencijal radne elektrode se linearno menja od početne do konačne vrednosti i nazad, a snima se intenzitet reverzibilne struje	merenje intenziteta katodnog/anodnog pika
amperometrija	potencijal radne elektrode se postavlja na fiksnu vrednost u odnosu na referentnu elektrodu	merenje intenziteta struje generisane oksidacijom/redukcijom elektroaktivnog analita
biamperometrija	reakcija analita (antioksidanta) sa oksidacionim oblikom redoks para ( $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ , $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ , DPPH/DPPH, ABTS <sup>•+</sup> /ABTS)	merenje struje, koja teče između dve identične radne elektrode uz malu razliku potencijala i uronjenih u rastvor analita i reverzibilnog redoks para
<b>Homatografija</b>		
gasna hromatografija	razdvajanje komponenata smeše zasnovano na raspodeli između stacionarne i gasne mobilne faze	plamena jonizacija ili detekcija toplotne provodljivosti
hromatografija visokih performansi	razdvajanje komponenata smeše zasnovano na raspodeli između čvrste stacionarne i tečne mobilne faze, pod visokim pritiskom mobilne faze	UV/Vis detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrohemijska detekcija



### 3.5.2.1. Antioksidativna ABTS metoda, radikalska aktivnost

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) antioksidativna metoda se može koristiti za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta bioloških tečnosti, ćelija i tkiva. Takođe se može koristiti za ispitivanje antioksidativne aktivnosti prirodnih ili sintetičkih jedinjenja.

Redukcija polifenolnih jedinjenja se odvija u neutralnoj sredini, a sulfonilne grupe ABTS-a se deprotonuju (slika 3.23.) (Zuleta i sar., 2009).

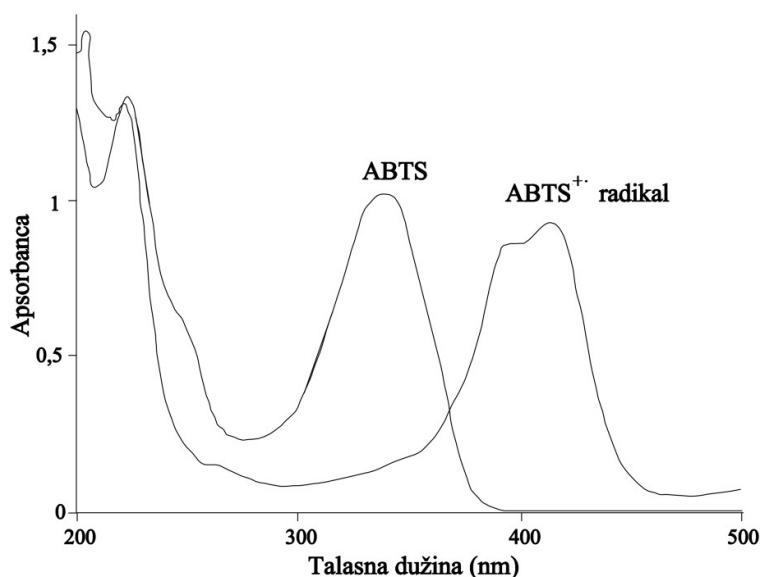


Slika 3.23. Nastajanje ABTS radikal katjona

Postupak zasnovan na inhibiciji produkta ABTS radikal katjona (Miller i Rice-Evans, 1996) ne uključuje supstrate. ABTS pokazuje apsorpcioni maksimum na 242 nm, ima visoku rastvoljivost u vodi i hemijsku stabilnost. To je supstrat peroksidaze koji, kada oksiduje u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generiše metastabilni radikal katjon (Miller, 1996; Arnao i sar., 1996), sa

karakterističnim apsorpcionim maksimumom i visokom molarnom apsorptivnošću na 414 nm. Na slici 3.24. su dati apsorpcioni maksimumi ABTS i ABTS radikal katjona (Cano, 1998). Međutim, postoje sekundarni apsorpcioni maksimumi na talasnim dužinama 645, 734 i 815 nm. Kao što su opisali Miller i Rice-Evans (1996), metoda se bazira na formiranju ferilmioglobin radikala (nastaje u reakciji metmioglobina sa vodonik-peroksidom), koji je slobodan da reaguje sa ABTS-om i daje ABTS radikal katjon. Porast koncentracije ABTS radikal katjona se može inhibirati u prisustvu nekog oksidanta u reakcionom medijumu. Relativna sposobnost antioksidanta donora vodonika, za redukciju i obezbojavanje ABTS radikal katjona nastalog u vodenoj fazi, se može meriti spektrofotometrijski na 734 nm, talasnoj dužini na kojoj su minimizirane smetnje drugih apsorpcionih komponenti u uzorku.

ABTS se dobro rastvara i u vodi i u organskim rastvaračima i veoma je reaktivan. Reaguje sa fenolima, tiolima, vitaminom C, troloksom, bilirubinom, mokraćnom kiselinom itd.

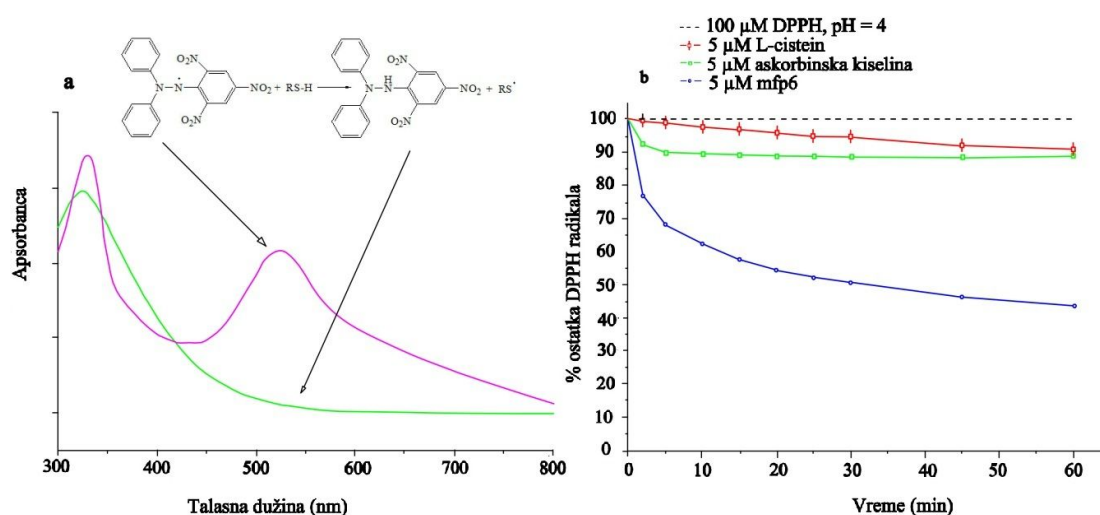


Slika 3.24. Apsorpcioni spektar ABTS radikal katjona

### 3.5.2.2. Antioksidativna DPPH metoda, radikalska aktivnost

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) metoda je veoma korišćena u studijama određivanja antioksidativne aktivnosti u prirodnim proizvodima. Razlog tome je što je ova metoda jednostavna i osetljiva. Prvi put ova metoda je opisana 1958. godine a kasnije je modifikovana od strane brojnih istraživača (Krishnaiah i sar., 2011). Nesparen elektron

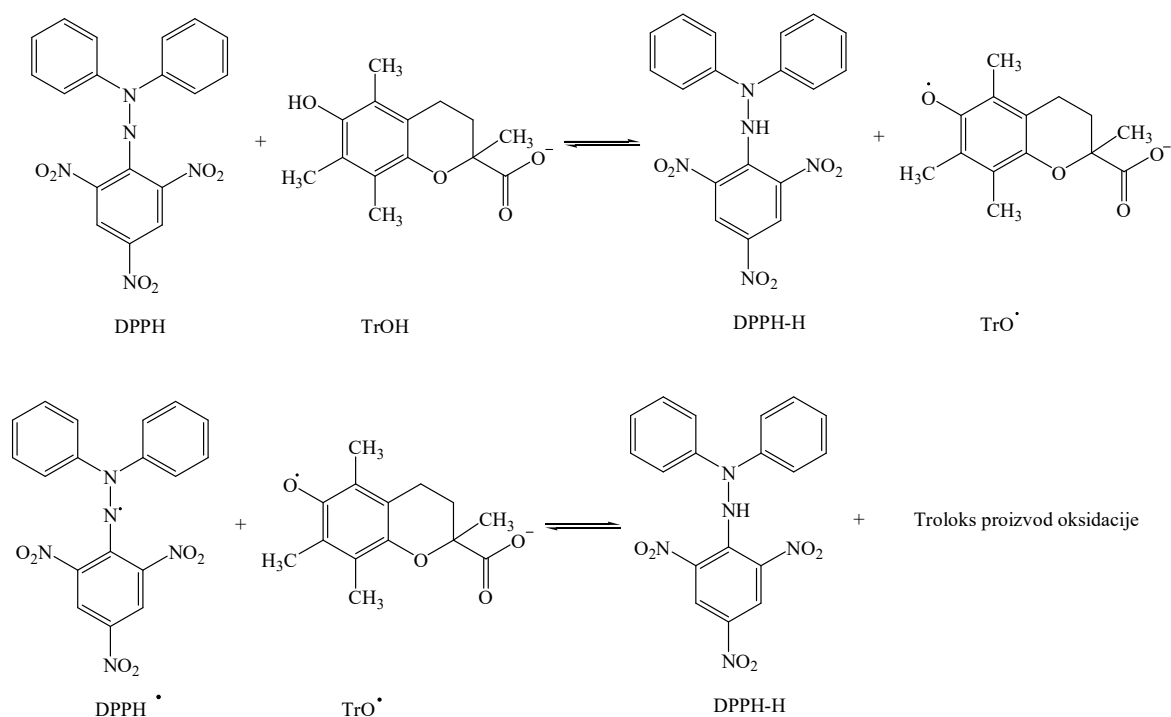
atoma azota iz DPPH se redukuje primanjem vodonikovog atoma od antioksidanta i formira odgovarajući hidrazin (*Contreras-Guzman i Strong, 1982*). Slobodni radikal DPPH<sup>•</sup> ima maksimum apsorpcije na 520 nm (ljubičasta boja). Kada antioksidant reaguje sa DPPH radikalom, u prisustvu vodonika kao donora elektrona, ovaj radikal se redukuje u DPPH i posledica toga je apsorpcija na manjim talasnim dužinama nego apsorpcija DPPH radikala (*Nicklisch i Waite, 2012*) (slika 3.25.). Pritom dolazi do obezbojavanja (žuta boja), što je proporcionalno prisutnim elektronima: veći stepen obezbojavanja označava veću redukcionu sposobnost.



**Slika 3.25.** ApSORPCIONI SPEKTAR DPPH I DPPH RADIKALA

Ovaj test je uspešno korišćen za ispitivanje antioksidativnih svojstava zrna pšenice, povrća, konjugovane linoleinske kiseline, bilja, jestivih ulja u različitim sistemima rastvarača, uključujući etanol, metanol, vodeni rastvor acetona, vodeni rastvor alkohola i benzena (*Yu, 2001; Parry i sar., 2005*). Ovo je pogodan test za određivanje antioksidativne aktivnosti cisteina, glutationa, askorbinske kiseline, tokoferola i polifenolnih aromatičnih jedinjenja (*Masahiro i sar., 2005*). DPPH metoda može da se koristi u vodi i nepolarnim organskim rastvaračima, tj. za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidanata (*Prior i sar., 2005*). Kada se rastvor DPPH pomeša sa supstancom, koja je donor vodonikovog atoma, povećava se količina redukovanog oblika (difenilpikrilhidrazil – nije radikal) i gubi se njegova ljubičasta boja (mada se očekuje da postoji preostala žuta boja koja potiče od pikril-grupe koja je još uvek prisutna) (*Patel i Patel, 2011*). Ova aktivnost se izražava kao efektivna koncentracija

(EC<sub>50</sub>) ili inhibitorna koncentracija (IC<sub>50</sub>) (Chougule i sar., 2012) – koncentracija jedinjenja, koja redukuje apsorpciju DPPH za 50% (Tirzitis i Bartosz, 2010). Na slici 3.26. je data reakcija troloksa i DPPH (Friaa i Brault, 2006).

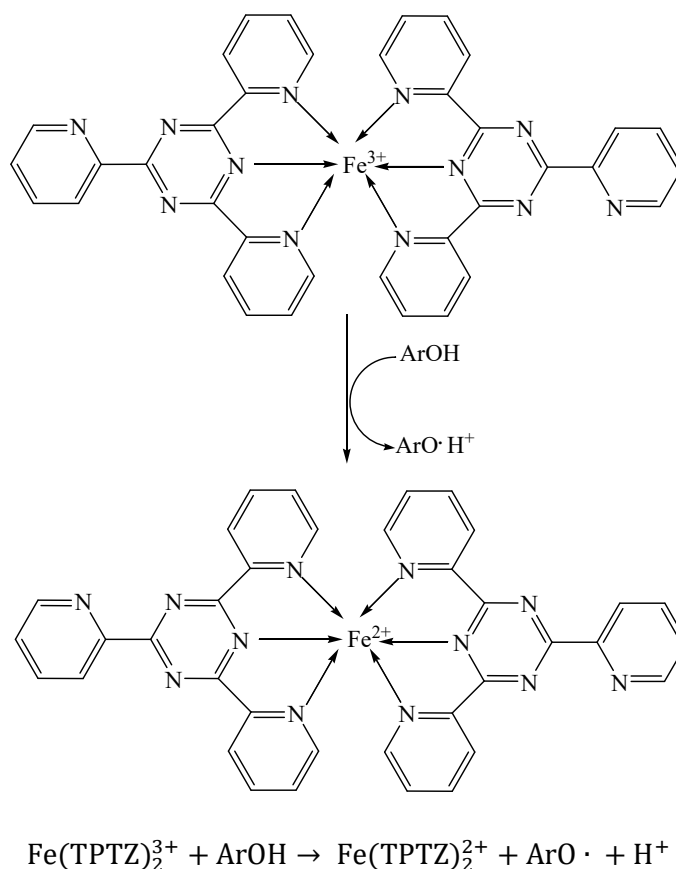


Slika 3.26. Reakcija DPPH i troloksa

### 3.5.2.3. FRAP metoda

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda se zasniva na merenju sposobnosti redukcije gvožđa (FRAP). Prednost ove metode je to što se koriste jeftini reagensi i oprema, reakcija je veoma brza i može da se koristi u širokom opsegu koncentracije. Pri niskim vrednostima pH, kompleks gvožđa(III) i tripiridiltriazina (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) se redukuje do kompleksa gvožđa(II) i tripiridiltriazina (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) intenzivno plave boje sa apsorpcionim maksimumom na 593 nm (Benzie i Strain, 1996; Liu i sar., 1982) (slika 3.27.). Reakcija je nespecifična, i bilo koja druga polureakcija, koja u datim uslovima ima manje pozitivan redoks potencijal od Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>-TPTZ polureakcije, dovodi do redukcije kompleksa Fe<sup>3+</sup>-TPTZ. U kiselijoj sredini se favorizuje redukcija kompleksa, a samim tim i razvoj boje, ukoliko je prisutno neko redukciono sredstvo (antioksidant). Kod FRAP metode

se koriste  $\text{Fe}^{3+}$  joni u višku, a ograničavajući faktor je brzina građenja kompleksa  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, a samim tim i pojava intenzivno plave boje (Benzie i Strain, 1996). Kao standard se koristi troloks (Pellegrini i sar., 2003) ili askorbinska kiselina (Gil i sar., 2002).



Slika 3.27. Reakcija redukcije kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ do  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ

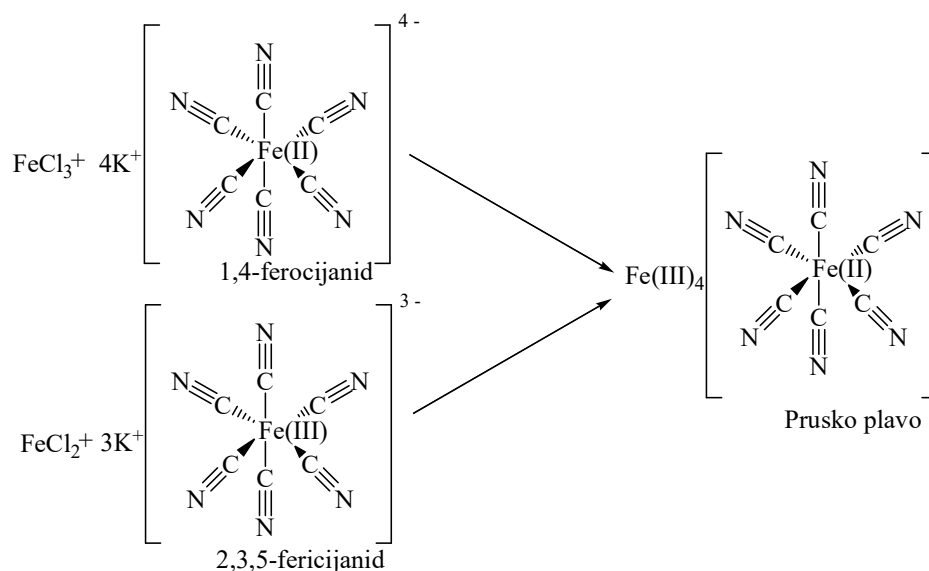
Reakcija redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ do  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ omogućava određivanje komponenti čiji je redoks potencijal manji od 0,7 V (redukциони potencijal kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) (Prior i sar., 2005). Redukciona moć je u vezi sa stepenom hidroksilacije i konjugacije polifenola (Pulido i sar., 2000). Ovom metodom se ne mogu odrediti jedinjenja koja deluju kao gasioci radikala (H transferi), posebno tioli i proteini (Ou i sar., 2002).

Postoje mnogi problemi zbog kojih ovaj test ima ograničenu primenu za ispitivanje ekstrakta i bioloških tečnosti. Kod TEAC (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) testova vreme trajanja reakcije je 6 minuta, a kod FRAP testa vreme trajanja je 4 minuta. To znači da se mogu odrediti samo polifenoli, koji brzo vezuju Fe. Pulido i saradnici (2000) su ispitivali primenu FRAP testa za polifenole u vodi i metanolu i uvideli su da se apsorbanca

kompleksa  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, nastalog od polifenola, kao što su kafena kiselina, ferulna kiselina, taninska kiselina i kvercetin, postepeno povećava i nakon 4 minuta, te se ova jedinjenja ne mogu odrediti. Redukciona sposobnost polifenola, određena FRAP metodom, verovatno zavisi od stepena hidroksilacije i konjugacije fenolnih komponenti.

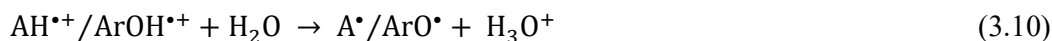
### 3.5.2.4. PFRAP metoda

PFRAP (eng. *Potassium Ferricyanide Reducing Antioxidant Power*) metoda se zasniva na merenju povećanja apsorbance koje može biti u korelaciji sa redukcijom sposobnošću antioksidanata odnosno ekstrakta antioksidanata. Jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću reaguju sa kalijum ferocijanidom i redukuju ga do kalijum ferocijanida. Ovaj kompleks, zatim, reaguje sa  $\text{FeCl}_3$  gradeći  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  kompleks intenzivno plave boje, sa maksimumom apsorbcije na 700 nm (*Pisoschi i Negulescu, 2011; Gupta, 2015*).



Slika 3.28. Nastanak kompleksa  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (Prusko plavo)

Stepen promene boje (povećanje ili smanjenje apsorbance na datoj talasnoj dužini) je u korelaciji sa koncentracijom antioksidanata u uzorku. Dok su ABTS i DPPH metode koje se zasnivaju na merenju smanjenja apsorbance, Folinova metoda za određivanje ukupnih polifenola i FRAP metoda se zasnivaju na merenju povećanja apsorbance na prethodno određenoj talasnoj dužini. Svi posmatrani testovi se zasnivaju na elektron transfer (ET) mehanizmu antioksidativne aktivnosti:



Gore navedene reakcije zavise od prirode rastvarača i od pH vrednosti (*Gupta, 2015*).

### 3.6. Podela elemenata i putevi dospevanja u hranu

Elementi u tragovima su oni koji se javljaju u niskim koncentracijama (manje od 0,01% mase organizma). Oni su potrebni za pravilan rast, razvoj, održavanje i oporavak organizma. Neki od njih su esencijalne komponente enzima, u kojima privlače molekule supstrata i olakšavaju njihovu konverziju u specifične krajnje proizvode. Neki elementi učestvuju u reakcijama redukcije kao donori, dok drugi učestvuju u reakcijama oksidacije kao akceptori elektrona, što dovodi do stvaranja i upotrebe metaboličke energije. Neki elementi u tragovima daju strukturnu stabilnost važnim biološkim molekulima, dok drugi kontrolišu važne biološke procese, kao što su olakšavanje vezivanja molekula za mesto receptora na ćelijskim membranama, promena strukture ili jonske prirode membrane kako bi molekuli ušli ili napustili ćeliju, zatim, indukuju ekspresiju gena, što dovodi do formiranja proteina, koji učestvuju u životnim procesima (*Aliasgharpour i Farzami, 2013*).

Homeostaza je sposobnost tela da održava sadržaj specifičnih supstanci (elementi u tragovima) u određenom rasponu, bez obzira na njihov unos. Homeostaza se sastoji iz procesa apsorpcije, skladištenja i izlučivanja. Ona reguliše elemente u tragovima, bilo da su kao katjoni (bakar, zink) ili kao anjoni (bor, selen). Način smanjenja koncentracije ovih elemenata je izlučivanje kroz urin, znoj, žuč, dah ili prevođenje u neaktivni oblik (*Aliasgharpour i Farzami, 2013*).

*Svetska zdravstvena organizacija* (1996) (eng. *Food and Agriculture Organization and World Health Organization – FAO/WHO*), je dala podelu elemenata u tragovima, i razvrstala ih u tri grupe prema njihovom značaju i ulozi u organizmu: 1) esencijalni elementi, 2) elementi koji su najverovatnije esencijalni i 3) potencijalno toksični elementi, koji nemaju nikakvu esencijalnu funkciju.

Prema koncentraciji, elementi se dele na:

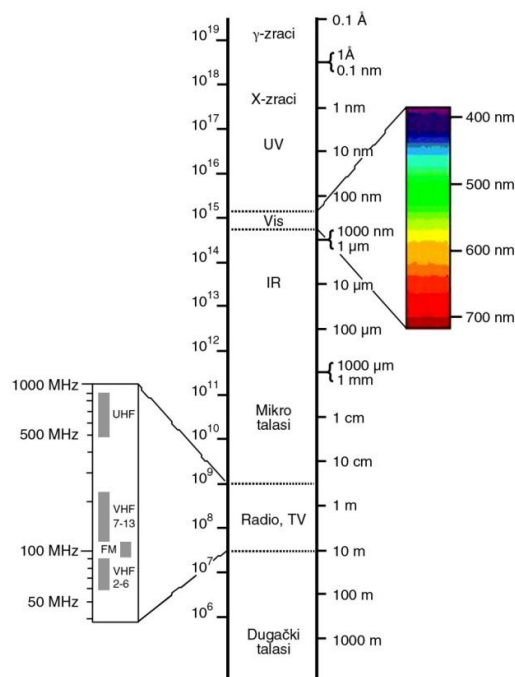
- makroelemente, to su elementi kojih ima u visokim koncentracijama i koje treba dnevno unositi preko 100 mg. Ovde spadaju natrijum, kalcijum, kalijum, magnezijum, fosfor;
- mikroelemente, to su elementi kojih ima u malim koncentracijama i koje treba unositi dnevno miligram ili par miligrama. Ovde spadaju mangan, hrom, nikl, bakar, cink, jod i td.

Koliki će biti neorganski sastav u biljkama zavisi od samog sastava zemljišta na kome je biljka gajena i da li je i čime đubreno zemljište. Sastav zemljišta se menja navodnjavanjem i biogenim procesima (McBride, 1994). Kontaminacija zemljišta teškim metalima je sve veći globalni problem koji predstavlja opasnost za životnu sredinu. Unos malih količina Cd ishranom je neizbežan. Kada su namirnice zagađene kadmijumom, njegova toksičnost predstavlja značajni zdravstveni rizik. Javljaju se grčevi u abdomenu, glavobolja, povraćanje i dijareja. Kod dugotrajne izloženosti, Cd izaziva oštećenje bubrega, ozbiljan gubitak minerala kostiju i bolne frakture. Od javnog značaja je sadržaj Cd u kakao zrnu, kakao prahu i kakao tečnosti, koje se koriste u proizvodnji čokolade. Sadržaj Cd je funkcija sadržaja kakao delova i smanjuje se sledećim redom: gorka čokolada (za kujanje), tamna čokolada, mlečna i bela čokolada. Stručnjaci tvrde da je sadržaj Cd u kakao zrnu posledica unosa ovog elementa biljke kakaovac iz tla pa tako zemljište vulkanskog porekla ima veći sadržaj Cd, koga biljka apsorbuje i distribuira do lišća, mahune i zrna (Ramtahal i sar., 2016).

### 3.7. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija spada u apsorpcione metode, kod koje obojeni rastvori apsorbuju elektromagnetno zračenje određene talasne dužine ( $\lambda$ ) (komplementarne boji rastvora), a apsorbanca (A) je linearna funkcija koncentracije ispitivane supstance (c). Deo spektra elektromagnetnog zračenja podeljen je na tri podoblasti: bliska ultraljubičasta oblast (eng. *Ultra Violet – UV*) (185 – 400 nm), vidljiva oblast (eng. *Visible – Vis*) (400 – 700 nm) i bliska infracrvena oblast (eng. *Infra Red – IR*) (700 – 1100 nm). Spektar koji obuhvata sve tri oblasti se naziva optička oblast jer za kolimaciju, razlaganje i fokusiranje zračenja koriste sočiva i prizme izrađene od standardnog optičkog materijala. U analitičkoj hemiji se koristi normalna spektrohemijska oblast od 200 – 1000 nm. Na slici 3.29. su date oblasti spektra elektromagnetnog zračenja (Pavlović i Rašić Mišić, 2017).



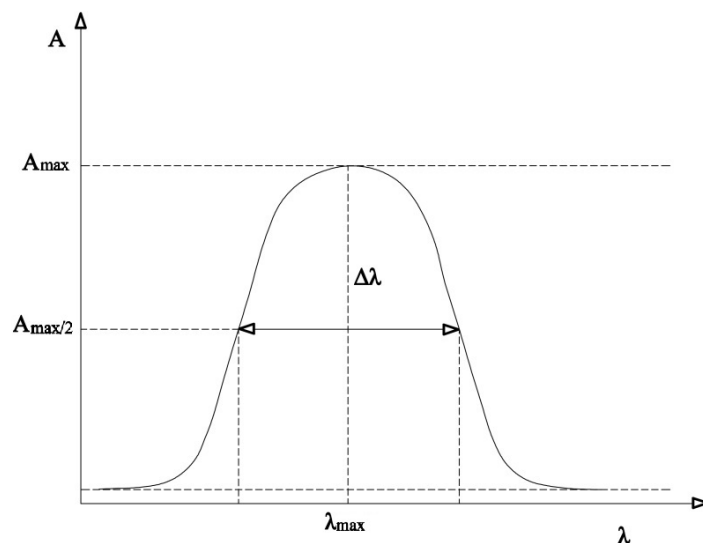


Slika 3.29. Oblasti spektra elektromagnetnog zračenja

Kada se propusti elektromagnetno zračenje kroz rastvor ispitivane supstance, ta supstanca će apsorbovati samo ono zračenje određene energije tj. frekvencije koje može dovesti do energetske promene u jonu, atomu ili molekulu date supstance. Kako se koristi oblast 200 – 1000 nm, spektrofotometrija ima ograničenu primenu u kvalitativnoj analizi organskih molekula, a široku primenu u kvantitativnoj analizi primenom Lambert–Beer–ovog zakona (*Todorović i sar.*, 1997).

Hromofore su funkcionalne grupe u organskim jedinjenjima, koje su odgovorne za apsorpciju UV/Vis zračenja i to mogu biti dvostruke i trostruke veze između atoma ugljenika ili atoma ugljenika i atoma nemetala (O, N...). Položaj i intenzitet apsorpcione trake, koja potiče od jedne hromofore je isti za bilo koji molekul koji sadrži datu hromoforu. Utvrđeno je da apsorpcione trake molekula sa izolovanim hromoforima, hromofore koje su razdvojene najmanje dvema prostim vezama, se poklapaju sa trakama samih tih hromofora. Ukoliko je pak sistem konjugovanih hromofora, apsorpcioni spektar je pomeren u pravcu većih talasnih dužina (batohromni efekat), što je praćeno povećanjem intenziteta (hiperhromni efekat) (*Medenica i Malešev*, 2002).

Svakom elektronskom prelazu odgovara pojava jedne apsorpcione trake u spektru (slika 3.30.). Molekuli sa više hromofora, sa više elektronskih prelaza, daju više apsorpcionih traka u spektru (*Todorović i sar.*, 1997).



**Slika 3.30.** Apсорpciona traka

Dobijeni UV/Vis spektar daje podatke o količini apsorbovanog zračenja, koja je funkcija talasne dužine. Dobijeni spektar je sastavljen od traka i može biti jednostavan (jedna ili nekoliko širokih traka, najčešće dobijen rastvaranjem čvrstog materijala) ili može da pokazuje „finu” strukturu (više dobro definisanih, uzanih traka, kao u slučaju spektara gasova). Sam apсорpcioni spektar zavisi od sastava i strukture molekula, pa se njegovom analizom mogu dobiti kvalitativni podaci. Osnovne karakteristike apсорpcione trake su položaj trake, na kojoj rastvor maksimalno apsorbuje ( $\lambda_{\max}$ ), odnosno talasna dužina, poluširina trake ( $\Delta\lambda$ ) i molarni apсорpcioni koeficijent ( $\epsilon_{\max}$ ), koji se izračunava iz Lambert-Beer-ovog zakona.

Apsorbanca ispitivanog rastvora je direktno proporcionalna koncentraciji apsorbujuće vrste i debljini sloja kroz koje zračenje prolazi i data je jednačinom 3.12:

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (3.12)$$

odakle sledi da je:

$$\epsilon_{\max} = A_{\max}/l \times c \quad (3.13)$$

gde je:

$\varepsilon$  – konstanta koja se naziva *molarni koeficijent apsorpcije* ili *molarni apsorptivitet* ( $\text{dm}^3/\text{mol cm}$ ),

$l$  – debljina sloja transparentne supstance kroz koji prolazi elektromagnetno zračenje (cm),

$c$  – koncentracija supstance koja apsorbuje zračenje ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ).

Izuzetno značajna osobina apsorbance jeste njena aditivnost, što omogućava analizu više komponenti u rastvoru, koje apsorbuju dato zračenje a pritom ne reaguju jedna sa drugom (*Todorović i sar.*, 1997).

### 3.7.1. Spektrofotometar

Spektrofotometar je optički instrument, koji se koristi za snimanje spektara u apsorpcionoj spektrofotometriji (slika 3.31.). Najčešće se koriste kivete debljine 1 cm; od kvarca su i koriste se za blisku UV oblast, ili su od stakla i koriste se za Vis oblast. Ukoliko je dvozračni spektrofotometar, u jednu kivetu se stavlja ispitivani rastvor, a u drugu referentni rastvor (ili rastvarač). Ukoliko je jednozračni spektrofotometar, prvo se u kivetu stavlja referentni rastvor pa tek onda ispitivani rastvor. Iako je ovo rutinska analiza, veoma je bitna rezolucija aparata zbog same kvantitativne analize (*Medenica i Malešev*, 2002).

Delovi spektrofotometra prikazanog na slici 3.31. su:

I – izvor kontinualnog zračenja (koristi se kombinacija volframove, za vidljivu oblast  $\lambda > 375 \text{ nm}$  i deuterijumske lampe, za blisku ultraljubičastu oblast),

S – kolimatorsko sočivo,

UR – ulazni razrez,

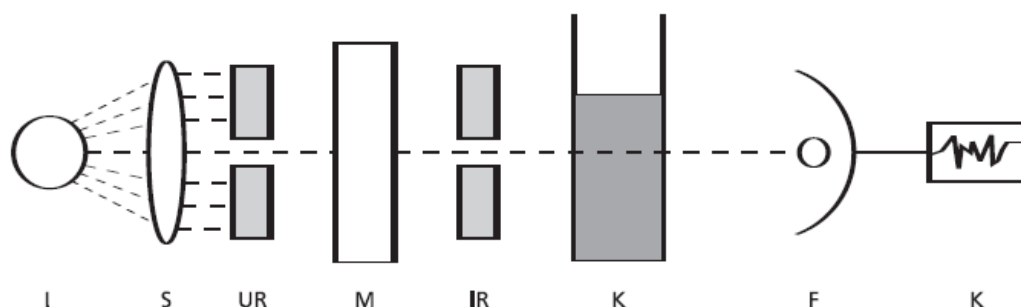
M – monohromator,

IR – izlazni razrez,

K – kiveta sa rastvorom,

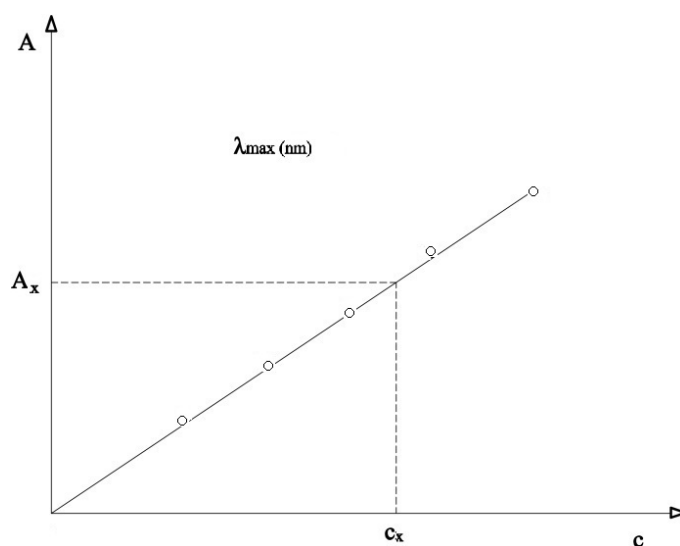
F – fotodetektor (najčešće fotomultiplikator),

K – kompjuter.



Slika 3.31. Šematski prikaz spektrofotometra

Koncentracija analiziranog rastvora se najčešće određuje iz kalibracione prave (slika 3.32.).



Slika 3.32. Kalibraciona prava

Spektrofotometrija je rutinska, brza metoda, ali je izuzetno osetljiva. Najbolja osetljivost ( $\Delta A/\Delta c$ ) se postiže odabirom talasne dužine na kojoj rastvor najviše apsorbuje. Pre početka analize, snimi se spektar zavisnosti apsorbance od talasne dužine (od 200 do 1000 nm), kako bi se odredila talasna dužina na kojoj komponenta maksimalno apsorbuje ( $\lambda_{\max}$ ). Zatim se napravi serija rastvora poznatih koncentracija čije se apsorbance izmere na talasnoj dužini  $\lambda_{\max}$  i konstruiše dijagram  $A = f(c)$ . Iz izmerene apsorbance  $A_x$  za rastvor nepoznate koncentracije, sa kalibracione krive se grafičkim putem ili iz jednačine prave odredi  $c_x$ , kako je označeno na slici 3.32.

Važan je i pravilni odabir rastvarača, jer od prirode rastvarača zavisi i položaj i intenzitet apsorpcionih traka, a samim tim i talasna dužina maksimuma apsorpcije. Polarnost rastvarača utiče na elektronski prelaz, koji menja raspored naelektrisanja jedinjenja u rastvoru. Uticaj na položaj maksimuma apsorpcije, koji se ostvaruje kada se promeni rastvarač, je vrlo važna indikacija za tip elektronskog prelaza koji postoji u uzorku. Kada je hromofora, koja je odgovorna za primećeni prelaz, polarnija u svom osnovnom stanju, nego kada je ekscitovana, tada će polarni rastvarač solvatacijom da stabilizuje molekul, pre nego što se desi apsorpcija fotona. Zbog toga će biti potrebno više energije da se izvrši elektronski prelaz o kome se radi ( $\lambda_{\max}$ ) se pomera ka manjim talasnim dužinama, u odnosu na ono što bi se dogodilo u nepolarnom rastvaraču.

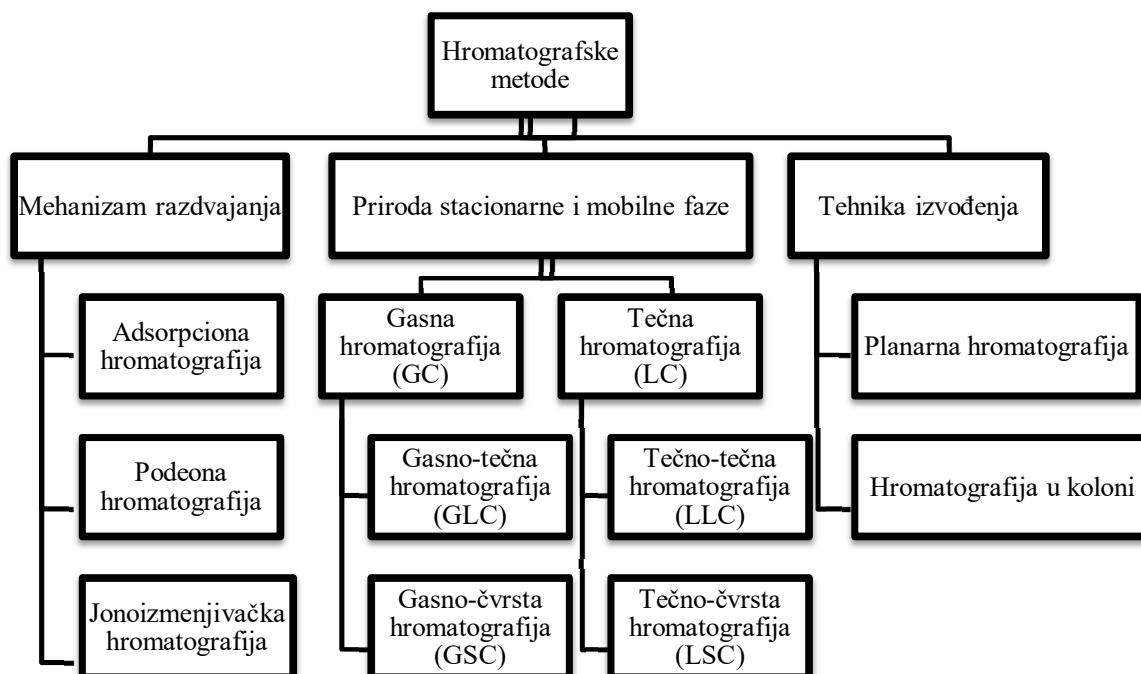
U slučaju kada je hromofora polarnija u ekscitovanom stanju, taj uticaj rastvarača je znatno manji. Međutim, ako dipolni momenat hromoforne grupe raste, kao rezultat elektronskog prelaza, konačno dobijeno stanje će biti solvatisano u većoj meri. Tako polarni rastvarač može da stabilizuje ekscitovanu formu, pri čemu dolazi do pomeranja  $\lambda_{\max}$  ka većim talasnim dužinama u odnosu na ono što se uočava u nepolarnom rastvaraču. Ovo predstavlja batohromno pomeranje.

Takođe, veoma je bitno voditi računa o promeni pH rastvora, jer promena pH može dovesti do promene boje rastvora.

### 3.8. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Hromatografija predstavlja skup preciznih analitičkih metoda, koje istovremeno daju mogućnost razdvajanja, izolovanja, kvalitativne i kvantitativne analize komponenata u smeši. To je moguće zahvaljujući procesima, koji se odigravaju na granici dveju faza, koje se ne mešaju. Prva faza je stacionarna i nju može da čini granulisan porozni materijal, tečnost, tanak sloj tečnosti adsorbovan na čvrstom telu ili jonoizmenjivač. Druga faza je mobilna i najčešće je tečna faza (rastvarač ili smeša rastvarača) koja omogućava kretanje komponenata ispitivane smeše. Mobilna faza se propušta kroz stacionarnu i dolazi do raspodele i odvajanja komponenata između dveju faza. Hromatografija je veoma primenjena analitička metoda zbog mogućnosti određivanja i razdvajanja jedinjenja veoma sličnih struktura i osobina. Sam proces razdvajanja se zasniva na fizičko-hemijskim procesima, kao što su adsorpcija na površini čvrste ili tečne faze, različita rastvorljivost komponenata između dveju tečnih faza i

reakcije jonske izmene (*Medenica i Malešev, 2002*). Na slici 3.33. je data šema podela hromatografskih metoda.



Slika 3.33. Šematski prikaz podele hromatografskih metoda

Dosta korišćena hromatografska metoda je tečna hromatografija visokih performansi ili tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC, eng. *High Performance/Pressure Liquid Chromatography*). Naziv je dobila zbog primene visokog pritiska, kome je izložena mobilna faza što omogućava kontinuirani protok mobilne faze. Pri tome se uspostavlja dinamička ravnoteža mobilne i stacionarne faze, koja daje dobro i brzo eluiranje, kao i dobru selektivnu raspodelu komponenti analiziranog uzorka. Osnovni delovi HPLC sistema (slika 3.34.) su (*Marjanović i Krstić, 1998*):

- R – rezervoar za rastvarač ili eluent (smeša rastvarača), rastvarači su visoke čistoće,
- F – filter koji omogućava uklanjanje prisutnih čvrstih čestica prečnika oko 10  $\mu\text{m}$ , ukoliko su ipak prisutne,
- PU – pumpa koja obezbeđuje ulazni pritisak mobilne faze,
- PO – prigušivač oscilacija, koji koristi pumpu sa naizmeničnim kretanjem klipa,
- M – manometar pomoću koga se meri ulazni pritisak,
- DR – ventil za ispuštanje nepotrebne tečnosti (eng. *drain*),

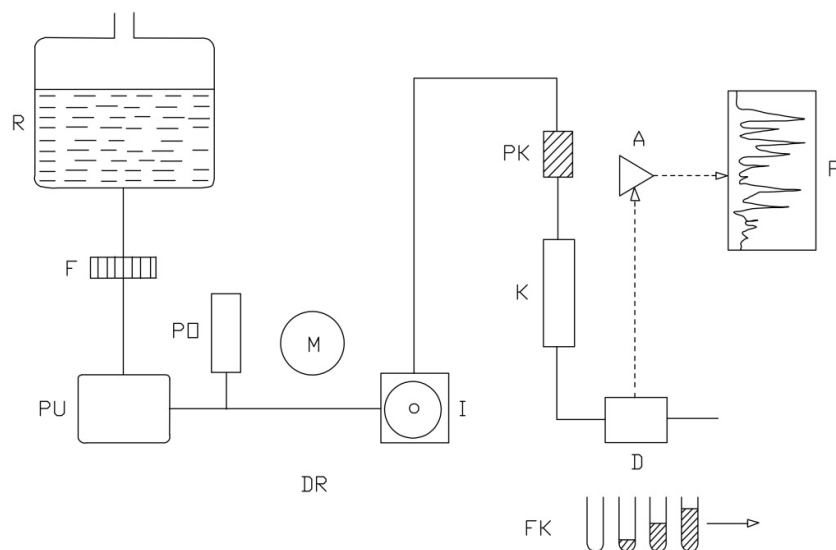
I – injektor koji omogućava unošenje uzoraka pri visokom pritisku bez promene režima strujanja. Obično su zapremine injektiranja 5, 10, 20  $\mu$ l,

PK – pretkolona,

K – kolona,

D – detektor koji se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu komponenti nakon eluiranja sa kolone. Detektor omogućava pretvaranje signala mase (koncentracije) u električni signal, koji se mora pojačati, modulirati i izmeriti. Tipovi detektora u HPLC-u su UV/Vis, fluorescentni i elektrohemijski detektor,

P – potenciometrijski kompenzacioni pisac, kojim se električni signal zapisuje ili se taj signal prevodi u digitalni hardverom i softverom računara.

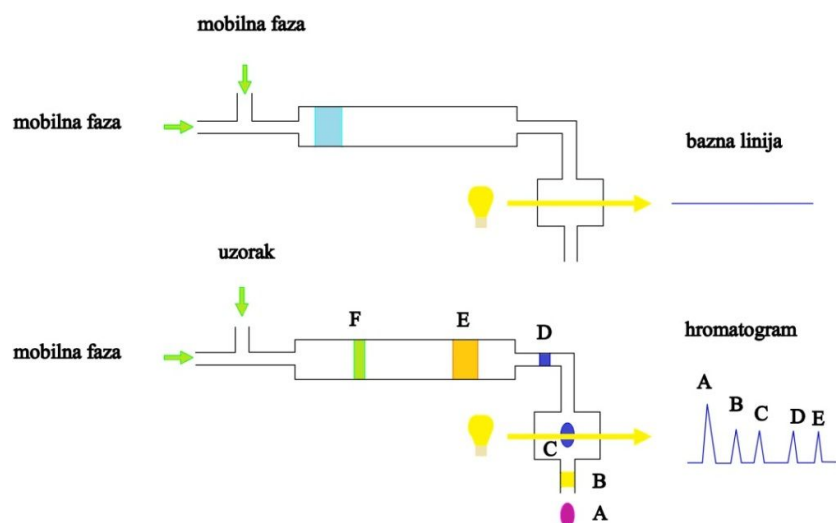


**Slika 3.34.** Šematski prikaz aparature za HPLC

Kao rastvarači za mobilnu fazu se koriste voda, metanol, acetonitril i mnogi drugi organski rastvarači. Kada se kao rastvarač koristi voda, često se dodaje kiselina ili neki puffer, kako bi se poboljšalo razdvajanje komponenti. Ekstrakcija pomoću smeše rastvarača aceton/voda pokazala se kao najbolja za određivanje procijanidina, naročito dimera, trimera i tetramera (*Wallace, 2010*). Danas se češće koristi gradijentno eluiranje, što znači da se sastav te mobilne faze menja u određenim intervalima i to se pokazalo kao najefikasniji način eluiranja i razdvajanja komponenti.

Kod HPLC metode se koriste dva tipa kolone. Kada se određuju polarne komponente, tada se koristi polarna stacionarna faza (kolona) i nepolarna mobilna faza i tada se ova metoda naziva hromatografija na normalnoj fazi. Kada se određuju nepolarne komponente,

tada se koristi nepolarna stacionarna a polarna mobilna faza i metoda se naziva hromatografija na reverznoj fazi. Jedinjenja se na koloni razdvajaju prema polarnosti, tj. jačini interakcija sa nosećom fazom i javljaju na različitim retencionim vremenima. Na slici 3.35. je dat postupak nastanka hromatograma.



**Slika 3.35.** Postupak nastanka hromatograma

Kao što je prikazano na slici 3.35., bazna linija predstavlja pravu liniju koja se dobija ispiranjem sistema pogodnim rastvaračem. Pri odabiru rastvarača treba voditi računa, jer dugotrajna upotreba neadekvatnog rastvarača može dovesti do trajnih oštećenja kolone. Takođe, na slici je dat primer nastalog hromatograma na kome su slovima označeni pikovi, koji predstavljaju razdvojene komponente i na osnovu koga se može odrediti broj tih komponenata ali ne i izvršiti njihova identifikacija. Stoga kvalitativna analiza podrazumeva identifikaciju poređenjem standarda sa nepoznatom komponentom ispitivanog uzorka. Retenciono vreme predstavlja ono vreme, od trenutka kada se uzorak/standard ubace u kolonu do njihovog izlaska iz kolone. To je vreme zadržavanja u koloni i zavisi od fizičko-hemijskih osobina samih jedinjenja. Kvantifikacija jedinjenja se vrši na osnovu površine pika, koja je proporcionalna koncentraciji tog jedinjenja. Metode koje se koriste za kvantifikaciju su metoda normalizacije pikova, metoda eksternog standarda i metoda internog standarda. Odabir metode zavisi od detektora korišćenog za dobijanje signala.



### 3.9. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)

Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (eng. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* – ICP-OES) je metoda kod koje se uzorak izlaže dovoljno visokoj temperaturi, koja ne dovodi samo do atomizacije, već dolazi do ekscitacije i jonizacije atoma. Atomi i joni, koji se nalaze u pobuđenom stanju mogu preći na niže stanje, pri čemu emituju energiju. U OES se meri intenzitet emitovane svetlosti na specifičnim talasnim dužinama, koje se koriste za određivanje koncentracije elemenata (*Boss i Fredeen, 1997*).

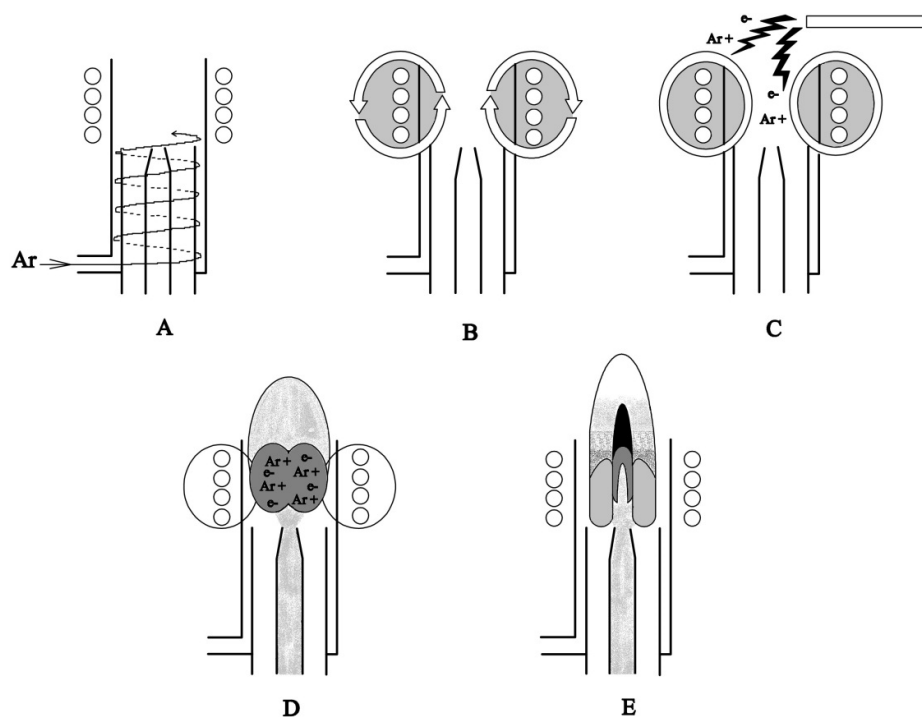
Prednost OES tehnike i jeste korišćenje izvora visoke temperature, koji omogućavaju pobuđivanje velikog broja elemenata periodnog sistema. Svi pobuđeni atomi i joni, zatim, mogu da emituju svoje karakteristično zračenje gotovo istovremeno. To omogućava fleksibilnost u izboru više različitih emisionih talasnih dužina za jedan element i mogućnost istovremenog merenja emisije više različitih elemenata. Međutim, nedostatak koji je povezan sa ovom osobinom jeste, da se sa porastom broja emisionih talasnih dužina takođe povećava verovatnoća spektralnih interferencija, tj. preklapanja spektralnih linija bliskih talasnih dužina.

ICP-OES metodom mogu se odrediti gotovo svi elementi periodnog sistema u koncentraciji manjoj i od 1 mg/l. Na slici 3.36. su prikazani elementi koji se mogu odrediti ovom tehnikom, kao i njihove granice detekcije u  $\mu\text{g/l}$  (*Boss i Fredeen, 1997*).

Većina elemenata, koji se mogu odrediti ICP-OES-om imaju nisku granicu detekcije. Takođe, trebalo bi spomenuti i elemente koji se ne mogu detektovati pomoću ICP-OES metode. Ti elementi se mogu podeliti u tri grupe. Prvu grupu čine oni elementi koji formiraju plazmu. Na primer, Ar se ne može određivati u uzorcima, ako je plazma argonska. Takođe, ukoliko je korišćena voda kao rastvarač, H i O se ne mogu odrediti, a ukoliko je korišćen organski rastvarač, ne može se odrediti C. Drugu grupu čine oni elementi čiji atomi zahtevaju veoma visoku energiju ekscitacije, kao što su halogeni elementi Cl, Br i I. Iako ovi elementi mogu da se odrede korišćenjem posebne optike, granice detekcije su mnogo lošije u poređenju sa granicama detekcije drugih elemenata. Treću grupu čine radioaktivni elementi pa se za njihovo određivanje preporučuje spektrometrija gama zracima (*Boss i Fredeen, 1997*).



formiranje plazme, obezbeđujući primarne elektrone i jone. Kroz unutrašnju cev se uvodi gas koji nosi uzorak.

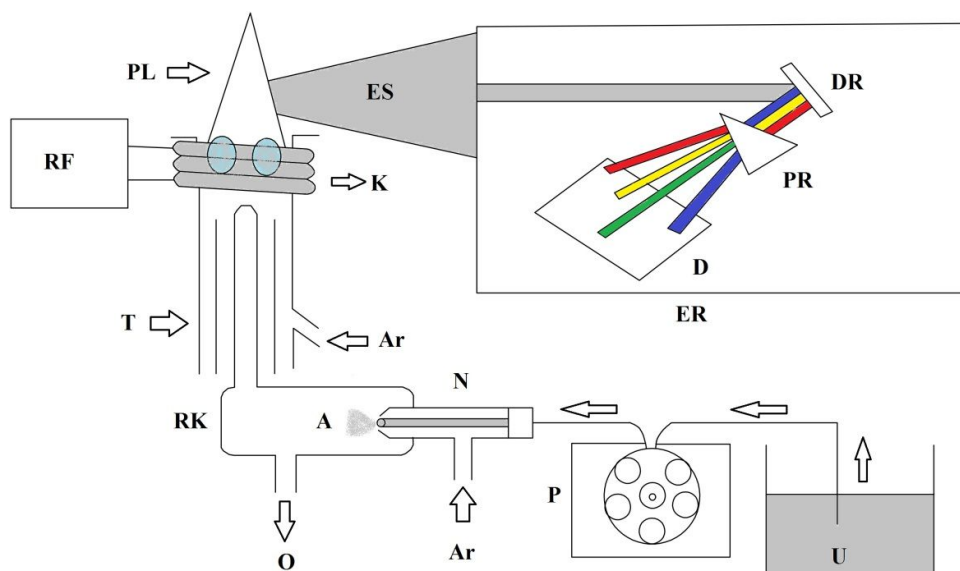


**Slika 3.37.** Formiranje induktivno spregnute plazme: A) tangencijalno uvođenje Ar za hlađenje; B) delovanje RF generatora na indukcioni kalem; C) jonizacija argona; D) slobodni elektroni se ubrzavaju vremenski promenljivim električnim poljem što dovodi do zagrevanja i dodatne jonizacije; E) uzorak u vidu aerosola se uvodi u plazmu

Oko spoljašnje kvarcne cevi obmotana su 3 – 4 navoja indukcionog kalema vezanog za radiofrekventni (RF) generator frekvencije 5 – 50 MHz i izlazne snage 1 – 5 kW. Visokofrekventna struja, koja protiče kroz indukcioni kalem, stvara oscilatorno magnetno polje (H) koje indukuje elektrone u gasu, koji protiče unutar kvarcne cevi. Elektroni se ubrzavaju vremenski promenljivim električnim poljem, što dovodi do zagrevanja i dodatne jonizacije. Šema aparata je data na slici 3.38., osnovni delovi aparata su:

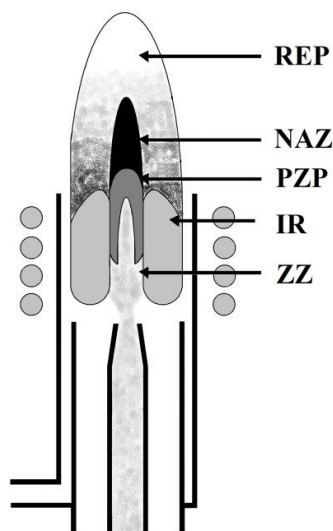
- U – uzorak,
- P – peristaltička pumpa,
- N – nebulajzer,
- A – aerosol,
- O – otpad,

- RK – raspršivačka komora,
- T – torč,
- K – RF indukcioni kalem,
- RF – generator,
- PL – plazma,
- ES – emitovana svetlost,
- ER – ešelna rešetka,
- DR – difrakciona rešetka,
- PR – prizma,
- D – detektor.



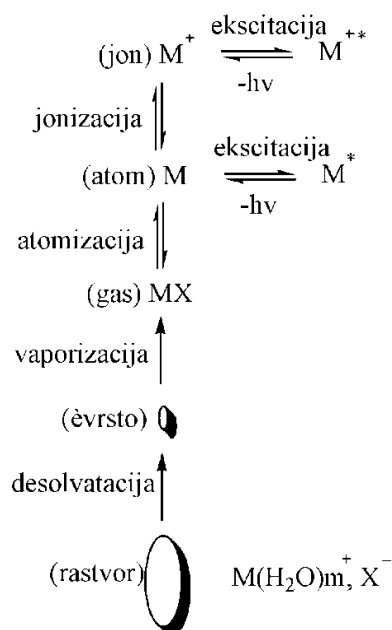
Slika 3.38. Šematski prikaz ICP-OES-a

ICP pražnjenje se javlja kao veoma intenzivno, blistavo belo jezgro prekriveno repom, i u obliku suze je. Na slici 3.39. je prikazan poprečni presek pražnjenja i odgovarajuće zone plazme (Koirtyohann i sar., 1981).



**Slika 3.39.** Zone ICP-a: ZZ – zona zagrevanja, IR – indukciona regija, PZP – početna zona pražnjenja, NAZ – normalna analitička zona

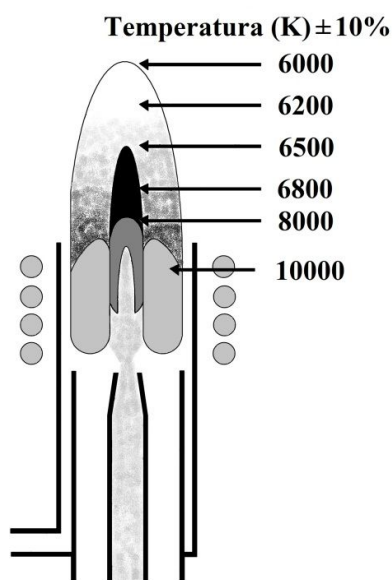
U osnovi, pražnjenje je toroidalno, jer raspršivač nosi uzorak koji prolazi kroz centar pražnjenja. Indukciona regija (IR) je regija u kojoj se transfer energije dešava u prostoru između kalema do plazme. To je oblast u kojoj se emituje većina bele svetlosti, nazvana i kontinuum argona. Mogućnost da se uzorak uvede kroz indukcionu region u centar plazme daje ICP-u mnoge analitičke prednosti. Uzorci, koji mogu biti u sva tri agregatna stanja, prevode se u rastvor koji se pomoću raspršivača prevodi u aerosol – veoma fina magla kapljica uzoraka, kako bi se uzorak uveo u ICP. Aerosol se prenosi u centar plazme unutrašnjim protokom argona. Na slici 3.40. su prikazani procesi koji se odvijaju kada se kapljice uzorka uvedu u ICP (Boss i Fredeen, 1997).



**Slika 3.40.** Procesi koji se odigravaju kada kapljice uzoraka uđu u ICP

Prva uloga visoke temperature plazme jeste da ukloni rastvarač, ostavljajući uzorak kao mikroskopske čestice soli. Naredni koraci uključuju vaporizaciju čestice soli u gas pojedinačnih molekula, koji zatim disosuju na atome (atomizacija). Ovi procesi se odvijaju u zoni zagrevanja (ZZ). Druga uloga plazme jeste pobuđivanje i jonizacija. Kako bi atom ili jon emitovao svoje karakteristično zračenje, jedan od njegovih elektrona mora da pređe na viši energetski nivo u procesu ekscitacije. Ovi procesi se odvijaju u početnoj zoni pražnjenja (PZP) i u normalnoj analitičkoj zoni (NAZ). Emisija analita se meri upravo u NAZ oblasti plazme. Oznakom M(II) se obeležavaju emisione jonske linije elementa (M), dok se oznakom M(I) obeležavaju emisione atomske linije elementa (M).

Jedan od razloga superiornosti ICP nad plamenom je upravo visoka temperatura u plazmi. Na slici 3.41. su prikazane približne temperature za različite zone ICP-a (*Boss i Fredeen, 1997*). Dok je gornja granica temperature za plamen oko 3300 K, temperatura gasa u centru ICP-a je oko 6800 K. Osim poboljšanja efikasnosti pobuđivanja i jonizacije, visoka temperatura ICP-a smanjuje ili eliminiše mnoge od hemijskih interferenci koje postoje u plamenu.



Slika 3.41. Temperaturne zone u ICP izvoru

### 3.9.2. Postupci za pripremu uzoraka

Najznačajniji korak u analitičkoj praksi je upravo priprema uzoraka. Za ICP-OES je veoma bitna priprema, tj. razlaganje organskih do neorganskih komponenti i potpuno rastvaranje neorganskih komponenti. Neophodno je dovesti energiju, i najčešće se koriste dve tehnike:

1. suva mineralizacija – ova tehnika je jeftinija, brža i sigurnija od mokre mineralizacije. Najčešće se koristi porcelansko posuđe. Ova metoda ne zahteva veliku količinu kiseline. Mnogi uzorci se mogu pripremiti bez ikakvih teškoća. Dobijeni pepeo se može rastvoriti u maloj količini kiseline, što dovodi do prekoncentrovanja uzorka i dobijanja boljih granica detekcije nego kod mokre mineralizacije. Vrlo je bitno pravilno odabrati režim temperature, kako bi se smanjio gubitak analita. Izbor temperature zavisi od vrste uzorka (Nollet, 2004). Za uklanjanje silicijuma koristi se HF. Utvrđeno je da uzorci koji sadrže silicijum, i u kojima nije korišćena HF daju niže vrednosti za Ca, Mg i K u odnosu na iste rezultate dobijene korišćenjem HF za pripremu istih uzoraka (Llimous i Fallavier, 2008);

2. mokra mineralizacija – kod ove tehnike se koriste teflonsko ili stakleno posuđe, u kome se uzorak zagreva ili pomoću rešoa ili peščanog kupatila. Za mineralizaciju se koristi azotna kiselina ili se ona kombinuje sa drugim kiselinama ( $\text{HClO}_4$ , HF,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a ponekad i sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao oksidacionim sredstvom. Nedostatak ove tehnike je potencijalna opasnost od eksplozije, kada se koristi perhlorna kiselina, korozija uređaja i kontaminacija elementima koji se mogu naći u kiselinama (Nollet, 2004).

Otvoreni sistem spada u najstarije tehnike. To je jeftina, veoma jednostavna, rutinska metoda koja se primenjuje na atmosferskom pritisku. U nedostatke ove metode spada sama temperatura mineralizacije, temperatura ključanja kiselina korišćenih za mineralizaciju, veliki gubici mikroelemenata, moguća kontaminacija, kao i upotreba većih količina reagenasa.

Konvencionalno zagrevanje se dosta koristi. Za zagrevanje se koristi plamenik, rešo ili peščano kupatilo. Najčešće se izvodi na konstantnoj temperaturi, a ređe se može menjati temperatura po nekom unapred utvrđenom programu. Za kiselu digestiju ovog tipa, koriste se sudovi od kvarca ili politetrafluoroetilena. Nadostatak ove tehnike je što se na ovaj način ne mogu odrediti elementi u tragovima i podložna je kontaminaciji. Uprkos nedostacima ima široku primenu za pripremu uzoraka površinskih voda, otpadnih voda, bioloških uzoraka, kliničkih uzoraka, uzoraka hrane, uzoraka zemljišta i dr.

Mikrotalasno zagrevanje je najčešće korišćena tehnika zbog mnogih prednosti u odnosu na prethodno opisane tehnike. Kivete su najčešće od teflona, koji propušta mikrotalasne zrake. Ove zrake apsorbuje samo tečna faza, dok ih para ne apsorbuje. Za mineralizaciju se najčešće koriste azotna i/ili hlorovodonična kiselina. Prednosti ove nad ostalim tehnikama mineralizacije su: manja količina rastvarača, kraće vreme mineralizacije, manja količina uzorka za analizu, manja kontaminacija i gubitak analita, mnogo efikasnije i brže zagrevanje unutar uzorka od konvencionalnog zagrevanja, efikasnija za uzorke koji se teško solubilizuju. Sve navedeno omogućava smanjenje granica detekcije i veću tačnost metode (Ražić, 2011).



### 3.10. Elementi optimizacije i validacije ICP-OES metode

#### 3.10.1. Optimizacija parametara ICP-OES instrumenta

U cilju postizanja najboljih analitičkih signala pa samim tim i što nižih granica detekcije, bolje tačnosti i preciznosti merenja, neophodna je optimizacija radnih parametara ICP-OES instrumenta. Od radnih parametara, kao što su snaga radiofrekventnog generatora (RF), protok gasa za raspršivanje, protok gasa za hlađenje, brzina uvođenja uzoraka, brzina ispiranja i protok pomoćnog gasa, prva dva parametra imaju najveći uticaj na analitičke karakteristike generisane plazme (*Todoli i sar.*, 2002). Izborom optimalnih uslova instrumenta moguće je dobiti operativne uslove, pri kojima se uspešno smanjuje devijacija analitičkog signala izazvana uticajem matriksa uzorka. Plazma koja se generiše pri takvim uslovima se naziva robusna plazma (*Mermet*, 1991; *Todoli i sar.*, 2002). Pod robusnim uslovima, plazma je znatno stabilnija pri bilo kakvim promenama ICP operativnih uslova, tj. robusni uslovi predstavljaju reproduktivne ICP uslove (*Mermet*, 1991; *Mermet*, 1998; *Brenner i Zander*, 2000; *Dennuad i sar.*, 2001). U tu svrhu se prate odnosi intenziteta emisionih linija nekih elemenata pri variranju onih parametara instrumenta koje je u datom tipu ICP-OES spektrometra moguće menjati i pri aksijalnom i pri radijalnom posmatranju plazme. Najčešće se u praksi prati odnos intenziteta različitih emisionih linija sledećih elemenata: Mg(II)/Mg(I), Cr(II)/Cr(I), Cd(II)/Cd(I), Fe(II)/Fe(I), Ni(II)/Ni(I). Pokazalo se da je odnos intenziteta linija Mg(II) 280,270 nm/Mg(I) 285,213 nm najbolji za praćenje postizanja robusne plazme. Razlog ovome je činjenica da su energije ekscitacije atomske i jonske forme istog reda (*Mermet*, 1991). Takođe, odnos intenziteta je nezavistan i od tipa detektora, što znači da se vrednosti odnosa intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) mogu koristiti za praćenje robusnosti plazme različitih ICP sistema (*Velitchkova i sar.*, 2017). U zavisnosti od optičkog sistema instrumenta, linije Mg(II) 280,270 nm i Mg(I) 285,213 nm mogu da pripadaju različitim redovima ili da se nađu na različitim mestima unutar istog reda. Zato se prilikom računanja faktora korekcije, polazi od pretpostavke da kontinuum ima konstantnu vrednost od 280 nm do 285 nm. Tada je dovoljno da se izmeri pozadinska emisija na 280,2 nm i 285,2 nm (*Velitchkova i sar.*, 2017).

RF snaga generatora predstavlja energiju koja se praktično daje plazmi. U zavisnosti od tipa uređaja kreće se u opsegu od 750 do 1500 W. Niska snaga RF generatora daje bolji

odnos signal-pozadina (eng. *Signal to Background Ration – SBR*), jer je pozadina mala u ovom slučaju. Kada je visoka RF snaga osetljivost je smanjena, ali je bolji transfer energije. Uticaj RF snage na osetljivost je manja u odnosu na uticaj nebulajzera i brzine protoka gasa. Odabir optimalne RF snage generatora zavisi i od prirode uzorka pa je bolje primeniti veću RF snagu kada je u pitanju složen matriks ili kada se radi sa organskim rastvaračima (*Guimarães-Silva i sar.*, 2012). Istraživanja nekih autora su pokazala da se optimalna snaga RF generatora postiže u intervalu od 750 W do 1350 W (*Mermert*, 1991; *Mermert*, 1998; *Silva*, 2002; *Mermert*, 2005; *Velimirović*, 2013).

Nebulajzer i brzina protoka gasa kontrolišu količinu uzorka uvedenu u plazmu, kao i brzinu uvođenja uzorka, a time i vreme zadržavanja uzorka u plazmi. Prilikom porasta brzine protoka gasa za raspršivanje skraćuje se vreme zadržavanja analita u plazmi, a time se smanjuje i energija koja se predaje analitu, tako da se javljaju samo neki ekscitacioni prelazi (*Mermert*, 1991).

*Sengoku i Wagatsuma* (2006) su u svom radu ispitivali uticaj temperature ekscitacije pri RF snazi od 1150 W, za aksijalno i radijalno posmatranje plazme za atomske linije Fe(I) i Cr(I) i jonske linije Cr(II). Temperatura ekscitacije je bila viša za jonske linije Cr(II) u odnosu na atomske linije Cr(I) i Fe(I). Kada su primenili radijalni mod, uslovi lokalne termodinamičke ravnoteže (eng. *Local Thermodynamic Equilibrium – LTE*) su bili postignuti za pobuđene energetske nivoe u širokom opsegu energija ekscitacije, jer je temperatura pobuđivanja izračunata za atomske linije Cr(I) bila slična onoj izračunatoj za jonske linije Cr(II). Kada su primenili aksijalni mod, javila se velika razlika u temperaturi ekscitacije za jonske linije Cr(II) i atomske linije Cr(I) (*Sengoku i Wagatsuma*, 2006).

Budući da su jonske linije osetljivije na promenu uslova atomizacije i jonizacije, nego atomske linije, odnos intenziteta linija je praktični kriterijum za procenu robusnosti plazme i analitičkih performansi. Robusno stanje se može postići pri višim vrednostima RF snage ( $\geq 1200$  W) kombinovanim sa nižim brzinama protoka gasa ( $\leq 0,6$  l/min). Ovaj uslov je okarakterisan visokim odnosom intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) sa vrednostima iznad 8,22 (*Guimarães-Silva i sar.*, 2012).

### 3.10.2. Validacija ICP-OES metode

Validacija analitičkih metoda je postupak obavljanja brojnih procena kako bi se utvrdilo da li je ta analitička metoda pogodna za dobijanje korisnih i dobrih analitičkih podataka.

Kako bi se procenilo da li je analitička metoda validna za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata u uzorcima, uzimaju se u obzir sledeći parametri:

- linearnost,
- granica detekcije,
- granica kvantifikacije,
- preciznost,
- ponovljivost,
- reproduktivnost,
- tačnost,
- selektivnost,
- specifičnost

#### 3.10.2.1. Linearnost

Pod pojmom linearnost analitičke metode se podrazumeva da su dobijeni rezultati analize direktno proporcionalni koncentraciji (količini) analita u uzorku. U tom slučaju se konstruiše kalibraciona prava pripremanjem serije standardnih rastvora bilo razblaživanjem osnovnog (multistandardnog) rastvora ili pravljenjem osnovnog rastvora od standardnih rastvora pojedinačnih komponenti. Najmanji broj standardnih rastvora u seriji je 3, mada se preporučuje 5 do 6 standardnih rastvora (*Kotte i sar.*, 2012). Na osnovu jednačine prave ( $y = ax \pm b$ ) dobijene kalibracione prave se iz dobijenog signala ( $y$ ) a na osnovu odsečka ( $b$ ) i nagiba ( $a$ ), izračunava koncentracija analita ( $x$ ). Dobijena prava treba da ima odsečak koji se značajno ne razlikuje od 0. Ukoliko se vrednost odsečka značajno razlikuje od nule, metoda se može primeniti uz eksperimentalnu potvrdu da ta činjenica ne utiče na tačnost metode. Nagib dobijene prave je tzv. analitička osetljivost metode i što je nagib veći to je veća i osetljivost metode. Linearnost se izražava preko koeficijenta korelacije ( $r$ ) ili koeficijenta determinacije ( $r^2$ ), i bolja je što je ovaj koeficijent bliži 1.

### 3.10.2.2. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (eng. *Limit Of Detection – LOD*) nekog analitičkog postupka je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može detektovati, ali ne i kvantifikovati sa prihvatljivom nesigurnošću. Granica kvantifikacije (eng. *Limit Of Quantification – LOQ*) nekog analitičkog postupka je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može kvantifikovati. Granica detekcije i granica kvantifikacije su izvedene iz najmanje koncentracije  $x_L$  koja se datom procedurom može detektovati sa određenom sigurnošću. Vrednost  $x_L$  je data jednačinom:

$$x_L = \bar{x}_{bl} + ks_{bl} \quad (3.14)$$

gde je:

$\bar{x}_{bl}$  – srednja vrednost rezultata dobijenih merenjem slepe probe,

$s_{bl}$  – standardna devijacija merenja slepe probe,

$k$  – numerički faktor izabran u skladu sa potrebnim nivoom poverenja.

LOD i LOQ se izračunavaju prema jednačinama:

$$LOD = 3 \times s_{bl} \quad (3.15)$$

$$LOQ = 10 \times s_{bl} \quad (3.16)$$

Takođe, LOD i LOQ se mogu odrediti preko odnosa signala i šuma:

$$LOD = 3 \times \text{odnos signala i šuma} \quad (3.17)$$

$$LOQ = 10 \times \text{odnos signala i šuma} \quad (3.18)$$

Granica detekcije je naročito važna za određivanje elemenata u tragovima, kako bi se utvrdilo da li je koncentracija ispod ili iznad granice detekcije (*Prichard i Barwick, 2007*).

### 3.10.2.3. Preciznost, ponovljivost i reproduktivnost

Preciznost, kao mera varijabilnosti predstavlja bliskost dobijenih rezultata merenja više proba dobijenih pri definisanim uslovima pri kojima onda preciznost zavisi samo od raspodele slučajnih grešaka. Pet faktora doprinose ovoj varijabilnosti: analitičar, instrument, kalibracija instrumenta, radni uslovi (temperatura, vlažnost, pritisak...) i vremenski interval između merenja. Za izražavanje preciznosti najčešće se koriste standardna devijacija  $s$  (eng.

*Standard Deviation – SD*) i relativna standardna devijacija RSD (eng. *Relative Standard Deviation*). U numeričkom smislu, što je vrednost standardne devijacije i relativne standardne devijacije veća to je preciznost manja. Mogu se definisati tri nivoa preciznosti i to ponovljivost, reproduktivnost i srednja preciznost (*Prichard i Barwick, 2007; McAlinden i sar., 2015*).

Ponovljivost predstavlja varijabilnost između rezultata merenja dobijenih istom metodom, istim instrumentom, na istom ispitivanom materijalu, pod istim uslovima od strane istog analitičara. Obično se koristi verovatnoća od 95%.

Reproduktivnost predstavlja varijabilnost između rezultata merenja, kada se jedan ili više od pomenutih faktora menja (analitičar, instrument, uslovi rada i dr.). Ponovljivost i reproduktivnost predstavljaju dve krajnosti preciznosti. Ponovljivost predstavlja minimum, a reproduktivnost maksimum varijabilnosti rezultata (*Prichard i Barwick, 2007; McAlinden i sar., 2015*).

Srednja preciznost je relevantniji način izražavanja preciznosti i predstavlja laboratorijske varijacije ili laboratorijsku reproduktivnost. Ona predstavlja varijabilnost između rezultata merenja dobijenih u datoj laboratoriji istom metodom na istom ispitivanom materijalu, ali različitog dana merenja, na različitoj opremi od različitog analitičara (*Prichard i Barwick, 2007*).

#### 3.10.2.4. Tačnost

Tačnost se određuje upoređivanjem izmerene koncentracije sa sertifikovanom vrednošću (eng. *Certificate Reference Material – CRM*) i izražava se kao procenat „recovery” R (*Voica i sar., 2012*). Smatra se da su prihvatljive vrednosti za „recovery” od 80% do 120% (*Veeramachaneni i Jayavarapu, 2013*).

Tačnost metode se prikazuje u %, a računa se po formuli:

$$\left(1 - \frac{(\text{nađena vrednost} - \text{sertifikovana vrednost})}{\text{sertifikovana vrednost}}\right) \times 100\% \quad (3.19)$$

Netačnost metode se prikazuje u %, a računa se po formuli:

$$\frac{(\text{nađena vrednost} - \text{sertifikovana vrednost})}{\text{sertifikovana vrednost}} \times 100\% \quad (3.20)$$

Tačnost, koja je istog reda veličine kao RSD, ne bi trebalo da pređe 10%.

*Larrea-Marín i saradnici (2010)* su kao kriterijum procene tačnosti metode koristili pravila po kojima srednja vrednost tačnosti ne prelazi  $\pm 10\%$ , a tačnost 75% uzoraka ne prelazi  $\pm 15\%$  (*ICH, International Conference of Harmonization, 1996*).

### 3.10.2.5. Selektivnost i specifičnost

Selektivnost se odnosi na stepen primene date metode za određivanje nekog analita u manje ili više složenom uzorku u smislu do kog odnosa analita i interferenta, interferent ne ometa određivanje analita. U postupku razvoja, validacije i primene neke analitičke metode mora se pažljivo ispitati efekat drugih prisutnih supstanci na određivanje analita najčešće postupkom dodavanja potencijalnih interferenata. U literaturi i pri praktičnom radu se nekad koristi termin selektivnost, a nekad termin specifičnost, što može da izazove zabunu. Naime, selektivnost je izraz, koji se preporučuje za korišćenje u analitičkoj hemiji, kako bi se izrazila gornja granica odnosa koncentracija analita i interferenata do koje se može koristiti data metoda za određivanje analita u datim uslovima kada su prisutne druge komponente sličnog ponašanja. Specifičnost je izraz, koji se koristi za određivanje analita u prisustvu drugih (ometajućih) supstanci.

Ukoliko se koristi već poznata metoda, potrebno je ispitati selektivnost metode za njenu primenu na date uzoraka. U tom slučaju se ispituju čisti standardi spajkovani sa potencijalnim interferentnim komponentama, kao i smeše koje odgovaraju sastavu realnog uzorka. Često se metoda proverava korišćenjem referentnog materijala najsličnijeg po sastavu uzorku koji se analizira. Ukoliko su složeni uzorci i nema adekvatnog referentnog materijala, tada se uzorak proverava alternativnom validiranom metodom (*Prichard i Barwick, 2007*).

Selektivnost se računa po formuli:

$$\text{selektivnost} = r_a/r_{uk} \quad (3.21)$$

gde je:

$r_a$  – signal, koji potiče od analita,

$r_{uk}$  – signal, koji potiče od analita i matriksa.

### 3.11. Elektrohemijske metode

Hemijske reakcije, u kojima učestvuje elektron kao osnovna čestica elektriciteta i električne struje predstavljaju osnovu elektrohemije. Interakcija elektrona i molekula, ili elektrona i jona dovodi do redukcije (reakcija u kojoj supstanca prima elektron) odnosno oksidacije (reakcija u kojoj supstanca odaje elektron). Kod elektrohemijskih metoda, do reakcija dolazi na graničnoj površini same elektrode i elektrolita (*Despić, 2005*).

Osnovna podela elektroanalitičkih metoda, koja je opšte prihvaćena, je na faradejske i nefaradejske metode. U faradejske metode spadaju: elektrogravimetrija, kulometrija i voltometrija, dok u nefaradejske metode spadaju: konduktometrija, potenciometrija i elektroforeza.

Između elektroaktivne vrste i elektrode dolazi do direktne razmene elektrona, pa se kod faradejskih metoda govori o radnim elektrodama. Kako između elektroaktivne vrste i elektrode nema direktne razmene elektrona, već dolazi do akumulacije električnog naboja na elektrodi, kao i u rastvoru u blizini elektrode, kod nefaradejskih metoda se govori o indikatorskim elektrodama (*Despić, 2005*).

#### 3.11.1. Voltometrija

Voltometrijske tehnike (eng. *Voltametric Techniques*) su analitičke metode, koje je iz polarografije 1922. godine razvio češki hemičar Jaroslav Hejrovski (Jaroslav Heyrovsky) i za to je 1959. godine dobio Nobelovu nagradu. Kod voltometrijskih tehnika koristi se elektrohemijska ćelija, koja sadrži tri elektrode: radnu, referentnu i pomoćnu elektrodu. Karakteristika svih voltometrijskih tehnika je merenje nastale struje koja teče kroz elektrohemijsku ćeliju, i koja zavisi od primenjenog napona (*Brett i Brett, 1993*). Odnosno, menja se potencijal (ekscitacioni signal) u toku vremena i prati se promena struje (faradejska struja) tokom perioda  $t$ , koja potiče od promene koncentracije elektroanalitičkih vrsta na površini radne elektrode elektrohemijskim procesima oksidacije ili redukcije (*Skoog i sar., 1991*). Struju koja teče kroz radnu elektrodu, pored faradejske struje, čini i nefaradejska struja, koja nastaje usled pražnjenja elektrohemijskog dvojnog sloja na površini radne elektrode (*Skoog i sar., 1991*).

Rana voltametrijska metoda nije predstavljala jednostavnu, rutinsku analizu, pa je metoda modifikovana 1960-ih i 1970-ih godina i u teorijskom, metodološkom i instrumentalnom pogledu. Time je postala selektivnija i osetljivija metoda. Postoje sledeće vrste voltametrije: voltametrija sa linearnom promenom potencijala, ciklična voltametrija, „Stripping” voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija i normalna pulsna voltametrija, „Square wave” voltametrija – voltametrija sa pravougaonim impulsima.

Analitička prednost voltametrijskih metoda je visoka osetljivost u širokom opsegu koncentracija i za neorganske i za organske vrste ( $10^{-12}$  do  $10^{-1}$  mol/l). Mogu da se koriste brojni rastvarači i elektroliti. Metode su brze (vreme analize je u sekundama), mogu da se primene u širokom opsegu temperatura, pružaju mogućnost simultanog određivanje nekoliko analita, a moguće je određivanje i kinetičkih parametara reakcije. Danas se ove metode koriste za praćenje oksidacionih i redukcionih procesa u različitim sredinama, procesa adsorpcije na površini, transfera elektrona, mehanizma reakcije, kinetičkih procesa i td.

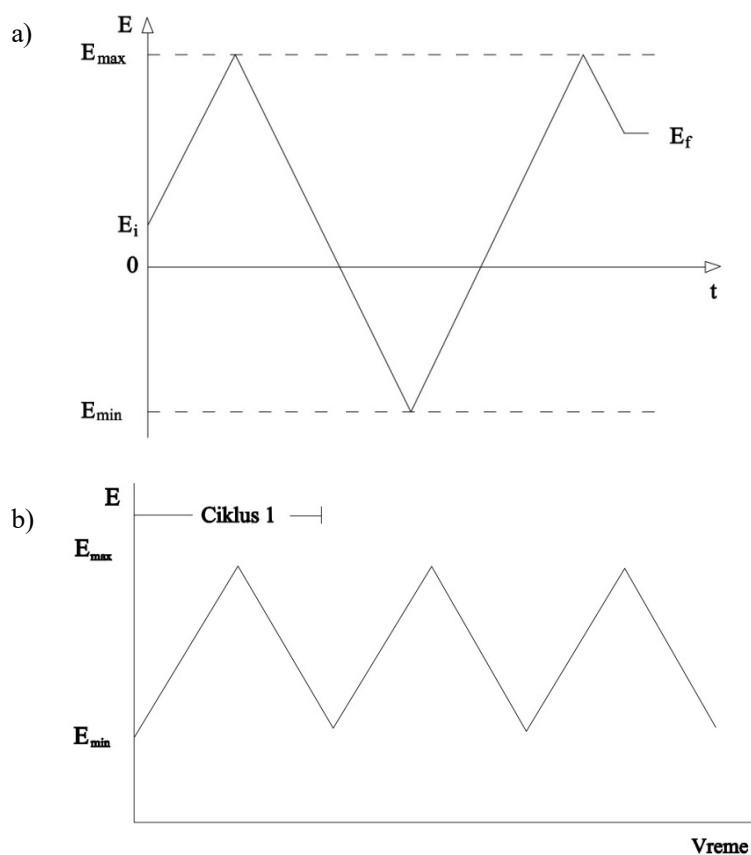
### 3.11.2. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija (eng. *Cyclic Voltammetry – CV*) je tehnika, koja se najčešće koristi za dobijanje kvalitativnih podataka o elektrohemijskim reakcijama. Široka primena ove metode je zbog mogućnosti brzog dobijanja značajnih termodinamičkih podataka redoks procesa i kinetike heterogenih reakcija prenosa elektrona, kako kod povezanih hemijskih reakcija, tako i kod procesa adsorpcije (Wang, 2000). Metoda se zasniva na povratnoj linearnoj promeni elektrodnog potencijala stacionarne radne elektrode (u ispitivanom rastvoru), od početne do vrednosti za krajnji potencijal gašenja, pri čemu vrednost potencijala gašenja ne mora biti identična početnom potencijalu, što je i prikazano na slici 3.42. a) (Ristivojević, 2014; Brett i Brett, 1993). Na slici je prikazan jedan ciklus, a u zavisnosti od tražene informacije, može se primeniti i nekoliko ciklusa (slika 3.42. b) (Wang, 2000). Na ovaj način je moguće određivanje potencijala karakterističnih za polifenolna jedinjenja. Ciklična voltametrija se može koristiti za raznovrsna istraživanja, uključujući određivanje:

- Nernstovog (reverzibilnog) ili ne-Nernstovog (ireverzibilnog) ponašanja redoks para,
- broja elektrona prenesenih u oksidaciji ili redukciji,
- formalnog potencijala,

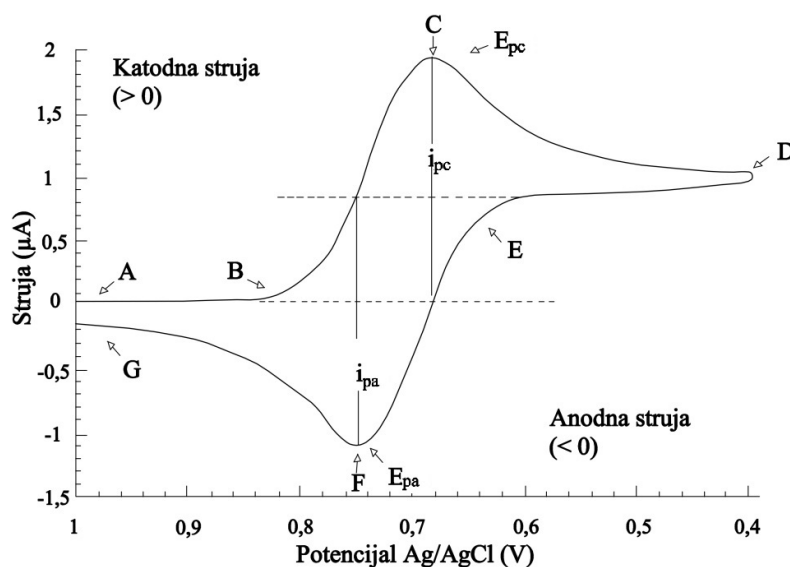


- reakcionog mehanizma,
- difuzionog koeficijenta.



**Slika 3.42.** Promena potencijala sa vremenom kod ciklične voltametrije

Početni oksidacioni potencijal je potencijal elektrode na kome se ne odigrava oksidacioni proces, a u toku snimanja potencijal elektrode se pomera ka pozitivnijim vrednostima. Početni redukcionni potencijal je takođe potencijal elektrode, na kome se ne odigrava redukcija, a u toku snimanja potencijal elektrode se pomera ka negativnijim vrednostima. Kada se postigne konačna vrednost elektrodnog potencijala, elektrodni potencijal se vraća do potencijala gašenja (*Ristivojević, 2014*). Na slici 3.43. je dat izgled cikličnog voltamograma jednog redoks para (*Ristivojević, 2014*). Kako je reakcija reverzibilna, deo molekula se ponovo vraća u oksidovani oblik pa se otuda javlja anodni pik.



Slika 3.43. Tipični ciklični voltamogram za reverzibilni redoks proces

Elektrode, koje se koriste u cikličnoj voltametriji su najčešće od platine, ugljenika (grafitne), srebra a ređe i zlata. Same elektrode su male, prečnika nekoliko milimetara.

Najširu primenu u određivanju antioksidativnog kapaciteta, od elektrometoda je našla upravo ciklična voltametrija. Najvažniji parametri pri određivanju ovog kapaciteta su: intenzitet anodne struje ( $I_a$ ), čija vrednost zavisi od koncentracije antioksidanata u uzorku, oksidacioni potencijal ( $E_{pa}$ ), kao i površina anodnog talasa ( $Q$ ). Umesto intenziteta anodne struje, danas se češće za određivanje antioksidativnog kapaciteta koristi površina anodnog talasa. Neki autori preporučuju i upotrebu odnosa parametara ( $E_{pa}/Q$ ) za određivanje kapaciteta antioksidanata. Oba ova parametra ( $I_a$  i  $Q$ ) se odnose na količinu prenesenog naelektrisanja, dok  $E_{pa}$  daje podatke o redoks kapacitetu antioksidanata u uzorku (Ristivojević, 2014; Kilmartin, 2003).

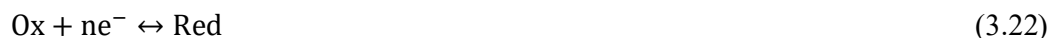
U slučajevima, kada nema povratnog katodnog potencijala, preporučuje se korišćenje srednjeg potencijal ( $E_{sred}$ ), koji predstavlja potencijal između anode i katode, kao i polutalasnog potencijala ( $E_{p/2}$ ) (Kilmartin, 2003).

Danas je ova metoda, kombinovana sa drugim metodama određivanja antioksidativnog kapaciteta (aktivnosti), našla široku primenu u analizi namirnica.

### 3.11.2.1. Reverzibilni sistemi

Kod reverzibilnih procesa, vrednost konstante brzine je dovoljna da se nakon promene potencijala uspostavi ravnoteža u prielektrodnom sloju, u kome koncentracije oksidovanog i redukovano oblika zavise od difuzije. Tada se smatra da broj razmenjenih elektrona, u svakom elementarnom stupnju elektrohemijskog procesa određuje rastojanje između anodnog i katodnog pika (*Despić, 2005*).

Reverzibilna reakcija redukcije oksidovanog oblika Ox u redukovani oblik Red, može se predstaviti jednačinom:



Ako se pođe od Fikovog zakona difuzije, rešavanjem diferencijalnih jednačina za oksidovani Ox i redukovani Red oblik, dobija se izraz  $i = f(E)$  za krivu:

$$\frac{\partial c_{\text{Ox}}}{\partial t} = D_{\text{Ox}} \frac{\partial^2 c_{\text{Ox}}}{\partial x^2} \quad (3.23)$$

$$\frac{\partial c_{\text{Red}}}{\partial t} = D_{\text{Red}} \frac{\partial^2 c_{\text{Red}}}{\partial x^2} \quad (3.24)$$

gde je:

$c_{\text{Ox}}$  i  $c_{\text{Red}}$  – koncentracije oksidovanog i redukovano oblika,

$D_{\text{Ox}}$  i  $D_{\text{Red}}$  – difuzioni koeficijenti oksidovanog i redukovano oblika,

$x$  – udaljenost od površine elektrode,

$t$  – vreme proteklo od početka elektroprocesa.

Na početku je  $t = 0$ ,  $x > 0$ ,  $c_{\text{Ox}} = c_0$  i  $c_{\text{Red}} = 0$ .

U nekom trenutku reakcije, kada je  $t > 0$  i kada je udaljenost od elektrode  $x \geq 0$ , koristi se Nernstov izraz za odnos koncentracija oksidovanog i redukovano oblika:

$$c_{\text{Ox}}/c_{\text{Red}} = \exp[nF/RT(E - E^0)] \quad (3.25)$$

Zamenom potencijala izrazom  $E = E_i - vt$ , kada je postignuta konačna vrednost potencijala, dobija se oblik:

$$c_{\text{Ox}}/c_{\text{Red}} = \exp [nF/RT(E_i - E^0)] \exp[nF/RT(-vt)] \quad (3.26)$$

Zbir promena koncentracije oksidovanog i redukovanog oblika na površini elektrode, kada je udaljenost od površine elektrode  $x = 0$ , jednak je nuli:

$$D \frac{\partial c_{Ox}}{\partial x} + D \frac{\partial c_{Red}}{\partial x} = 0 \quad (3.27)$$

Kao rešenje diferencijalne jednačine  $\frac{\partial c_{Ox}}{\partial t} = D_{ox} \frac{\partial^2 c_{Ox}}{\partial x^2}$ , pod pretpostavkom da je difuzija linearna, dobija se:

$$i_p = 0,4463nFA \left(\frac{nF}{RT}\right)^{\frac{1}{2}} D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} c_0 \quad (3.28)$$

Struja pika za dati revezibilni par je data Randles-Ševčikovom (*Randles-Sevcik*) jednačinom (na temperaturi od 25 °C):

$$i_p = 2,69 \times 10^5 An^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} c_0 \quad (3.29)$$

gde je:

$i_p$  – struja pika (A),

A – površina elektrode (cm<sup>2</sup>),

n – broj razmenjenih elektrona,

D – difuzioni koeficijent (cm<sup>2</sup>/s),

v – brzina promene potencijala (V/s),

$c_0$  – koncentracija oksidovanog oblika (mol/cm<sup>3</sup>) (*Skoog i sar.*, 1991; *Wang*, 2000; *Bard i Faulkner*, 2001).

Struja je direktno proporcionalna koncentraciji i raste sa kvadratnim korenom brzine polarizacije. Iz jednačine 3.29 može se zaključiti da struja pika zavisi od površine elektrode, broja razmenjenih elektrona, difuzionog koeficijenta, brzine promene potencijala i koncentracije oksidovanog oblika tj. elektroaktivne vrste.

Položaj pika na osi potencijala ( $E_p$ ) je povezan sa formalnim potencijalom redoks procesa. Formalni potencijal za redoks par je između  $E_{pa}$  i  $E_{pc}$ :

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (3.30)$$

gde je:

$E_{pa}$  – anodni potencijal pika (V),

$E_{pc}$  – katodni potencijal pika (V).

Razdvojenost između pikova potencijala (za reverzibilan par) je dat izrazom:

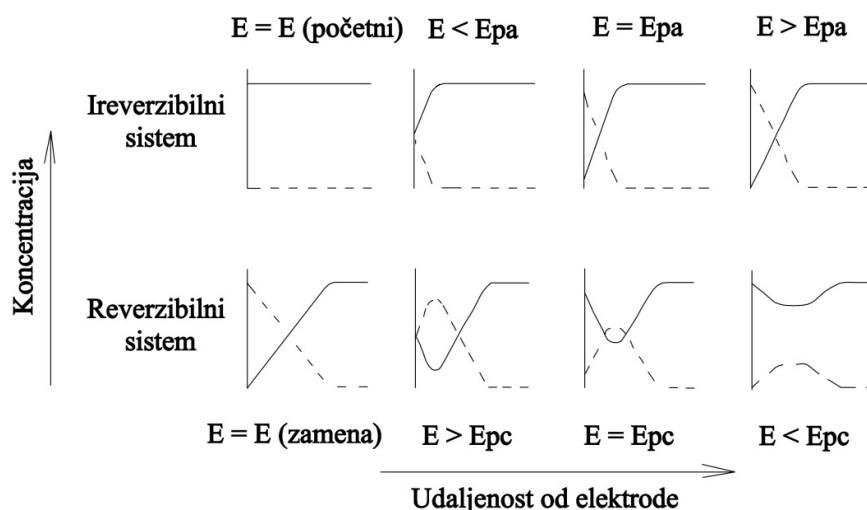
$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} V \quad (3.31)$$

Razdvojenost pika se može koristiti za određivanje broja razmenjenih elektrona, kao i kriterijum za Nernstovo ponašanje. Prema tome, brzi jednoelektronski procesi imaju  $\Delta E_p$  oko 59 mV. Katodni i anodni potencijal pika su nezavisni od brzine polarizacije. Moguće je povezati polupotencijal pika ( $E_{p/2}$ , struja je tada jednaka polovini struje pika) sa polarografskim polutalasnim potencijalom  $E_{1/2}$ :

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0,028}{n} V \quad (3.32)$$

gde je znak pozitivan za redukcionu proces, a negativan za oksidacioni proces.

Na slici 3.44. (Wang, 2000) prikazan je kvalitativni dijagram, koji pokazuje koncentraciju tj. profil udaljevanja u različitim fazama prikazanog cikličnog dijagrama.



Slika 3.44. Kvalitativni dijagram pune linije odgovaraju redukovanom obliku komponenti, a isprekidane linije odgovaraju oksidovanom obliku komponenti

### 3.11.2.2. Ireverzibilni i kvazi-reverzibilni sistemi

Kod ireverzibilnih i kvazi-reverzibilnih sistema brzina razmene elektrona nije dovoljna, i ne uspostavlja se površinska ravnoteža. Posledica toga je promena oblika

cikličnog voltamograma, koja je funkcija brzine polarizacije. Kako raste brzina polarizacije, tako raste i brzina transporta mase i dolazi do narušavanja ravnoteže na površini elektrode. Posledica ireverzibilnog procesa je da kako raste brzina polarizacije, tako raste razlika potencijala katodnog i anodnog pika (*Despić, 2005; Bagotsky, 2006*).

Za ireverzibilne procese (veoma spora razmena elektrona), pojedinačni pikovi su redukovani u veličini i veoma razdvojeni (slika 3.45. kriva A) (*Wang, 2000*). Potpuno ireverzibilni sistemi se karakterišu pomeranjem pika potencijala sa brzinom skeniranja:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[ 0,78 - \ln \frac{k^0}{D^2} + \ln \left( \frac{\alpha n_a F}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (3.33)$$

gde je:

$\alpha$  – koeficijent razmene,

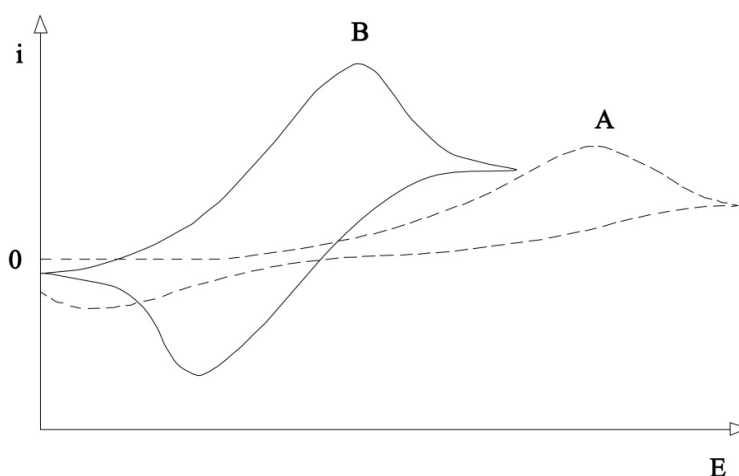
$n_a$  – broj razmenjenih elektrona.

$E_p$  se javlja na potencijalu većem od  $E^0$ , sa nadnaponom koji je povezan sa  $k^0$  i  $\alpha$ . Pomeranje pika se može kompenzovati odgovarajućom promenom brzine polarizacije. Potencijal pika i potencijal polu-pika se međusobno razlikuju za  $48/\alpha n$  mV. Dakle, voltamogrami postaju razvučeniji sa opadanjem  $\alpha n$ .

Struja pika je data jednačinom:

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (3.34)$$

i ona dalje proporcionalno raste sa koncentracijom, zavisno od vrednosti  $\alpha$ . Struja pika za ireverzibilni proces je oko 80% pika za reverzibilan proces.



**Slika 3.45.** Tipični ciklični voltamogrami za ireverzibilni (kriva A) i kvazi-reverzibilni (kriva B) redoks proces

Za kvazi-reverzibilne sisteme (sa  $10^{-1} > k^0 > 10^{-5}$  cm/s) struja je kontrolisana i prenosom naelektrisanja i transportom mase. Oblik cikličnog voltamograma je funkcija  $k^0/\sqrt{\pi a D}$  (gde je  $a = nFv/RT$ ). Ako  $k^0/\sqrt{\pi a D}$  raste, pri nižim brzinama promene potencijala, proces postaje reverzibilan. Za male vrednosti  $k^0/\sqrt{\pi a D}$  (npr., veoma brzo v), sistem se ponaša ireverzibilno. Između ta dva slučaja postoji oblast u kojoj se elektrohemijski proces odvija kao kvazi-reverzibilan (slika 3.45. kriva B). Kvazi-reverzibilni procesi se javljaju kada postoji ograničenje u brzini prenosa naelektrisanja. Najsigurnija identifikacija ireverzibilnosti nekog elektrohemijskog procesa je odsustvo reverzibilnog pika na cikličnom voltamogramu (Wang, 2000).

### 3.12. Statističke metode analize

Statističke metode analize se mogu podeliti u dve grupe. Prva grupa obuhvata proces prikupljanja, sređivanja i prikazivanja podataka i metode određivanja parametara i predstavlja domen deskriptivne statistike. Drugu grupu pak čine metode statističke analize čiji je zadatak objašnjenje varijabiliteta pomoću klasifikacionih, korelacionih i drugih statističkih pokazatelja, kao i statističko zaključivanje na osnovu uzorka i ona predstavlja analitičku statistiku.

Statističko istraživanje je proces, koji se može podeliti u tri etape:

- statističko posmatranje,

- sređivanje, grupisanje i obrada podataka,
- statistička analiza.

Primenom određenih statističkih metoda dobija se mnoštvo statističkih podataka, što predstavlja teškoću u pogledu dobijanja jasne, koncizne slike o pojavi koja se razmatra. Shodno tome, nastoji se da se ta serija podataka pojednostavi i zameni jednom ili određenim brojem numeričkih karakteristika.

Pokazatelji rasporeda frekvencija reprezentuju skup ili uzorak, odnosno pripisuju se skupu ili uzorku, u zavisnosti od toga da li se analizira raspored frekvencija skupa ili raspored frekvencija uzorka. Deskriptivne mere, koje se odnose na sve jedinice skupa, nazivaju se parametrima skupa, a deskriptivne mere, koje se odnose na uzorak su statistike uzorka (Manasijević, 2011).

Statističke metode se dele na (Pallant, 2009):

1. statističke metode za istraživanje veza između promenljivih, gde spadaju korelacija i delimična korelacija, višestruka i logistička regresija i faktorska analiza,
2. statističke metode poređenja grupa promenljivih, gde spadaju neparametrijske tehnike, t-test, jednofaktorska, dvofaktorska, kombinovana, multivarijaciona analiza varijanse i analiza kovarijanse.

### 3.12.1. Faktorska analiza i analiza glavnih komponenti

Opšte prihvaćena definicija faktorske analize glasi: „Faktorska analiza predstavlja skup statističko-matematičkih postupaka koji omogućavaju da se u većem broju promenljivih, među kojima postoji povezanost, utvrdi manji broj temeljnih promenljivih (faktora) koje objašnjavaju takvu međusobnu povezanost”. Ova statistička metoda daje mogućnost grupisanja varijabli, ali ne i razumevanje tog načina grupisanja tj. razliku među grupama (Pallant, 2009). Pored analize glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis – PCA*) koristi se i faktorska analiza (eng. *Factor Analysis – FA*). Metode su veoma slične, a konceptijski različite. Neki autori tvrde da je PCA u stvari oblik FA, u zavisnosti od toga, da li se u analizi rezultata koriste ukupne varijabilnosti ili samo varijabilnosti zajedničke svim



varijablama. U prvom slučaju je reč o PCA, dok u drugom slučaju je reč o FA (*Hair i sar.*, 1995).

FA je statistički baziran model, koji od velikog broja datih varijabli analiziranjem odnosa između samih varijabli daje mogućnost njihovog grupisanja definisanjem zajedničkih dimenzija tj. faktora. Nakon grupisanja sledi tumačenje dobijene grupacije, tj. objašnjava se koje varijable opisuju koji faktor.

PCA je tehnika, koja se koristi za redukovanje podataka samo ukoliko postoji korelacija između njih. Kao rezultat eliminacije nepotrebnih podataka daje nove varijable tzv. glavne komponente (eng. *Principal Components – PC*). PC se može definisati kao linearna kombinacija prvobitnih varijabli. Često se u radu dobije veći broj glavnih komponenti: PC1 je prva komponenta i ona predstavlja maksimalni udeo ukupnih varijabli; PC2 je druga i ona predstavlja maksimalni udeo rezidualnih varijabli i tako se formiraju ostale, dok se ne dobije 100% varijansi. *Matijević i saradnici* (2015) navode da nije neophodno uzimati sve glavne komponente, već samo nekoliko njih čiji zbir daje veliki procenat ukupne varijable (*Matijević i sar.*, 2015).

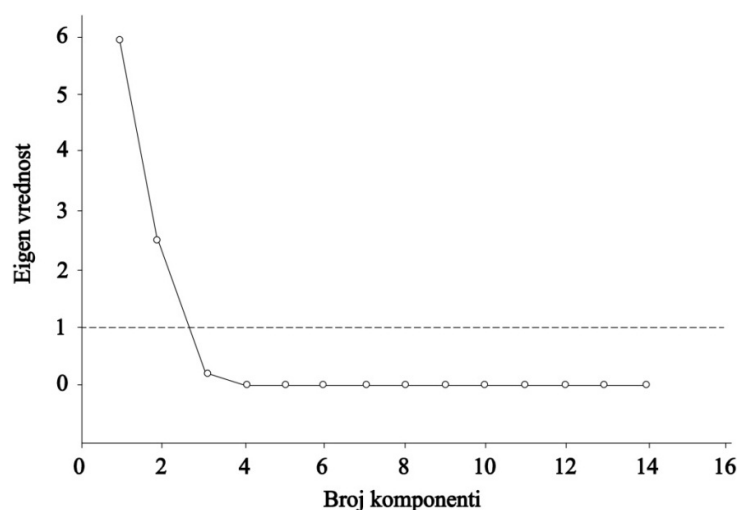
Ponekad se za PCA koristi korelaciona matrica, a ne matrica kovarijansi. Ova matrica se koristi da bi se standardizovale sve varijable i da bi varijansa bila 1. Za standardizovane podatke, svaka varijabla ima varijansu koja je 1, tako da je suma svojstvenih vrednosti jednaka broju varijabli. Standardizacija podataka je neophodna ukoliko jedna od varijabli ima znatno veću varijansu od ostalih, pa ta varijabla dominira u prvoj glavnoj komponenti. Upravo se standardizacijom to eliminiše i sve varijable se svode na podjednaku veličinu (*Miller i Miller*, 2005).

Kriterijum, koji se najčešće koristi u PCA je kriterijum latentnog korena (eng. *Latent Root Criterion*) ili Kajzerov kriterijum. Redukcija faktora kod ovog kriterijuma je na osnovu Eigen vrednosti (eng. *Eigen value*), pri čemu se zadržavaju faktori čija je vrednost veća od 1. Ovaj kriterijum je pogodan za varijable kada ih nema više od 50 a manje od 20. Potrebno je da broj odabranih faktora određuju veliki procenat varijansi. U prirodnim naukama se smatra da je to 95%.

Katelov kriterijum (kriterijum dijagrama prevoja) (*Catel*, 1996) je onaj, po kome treba nacrtati karakteristične vrednosti svih faktora (*Eigen values*) i na dijagramu tražiti tačku, u kojoj linija naglo menja pravac i prelazi u horizontalu (*Pallant*, 2009). Do te tačke se broje

varijable, koje će biti uključene u analizu. Poteškoću čini zadržavanje premalo faktora ili preblagi nagib krive.

Skri (eng. *Scree*) test spada u grafičku metodu, koja kao rezultat daje dvodimenzionalni grafik. Na skri grafiku se nalaze karakteristične vrednosti tj. faktori prema redosledu ekstrakcije (slika 3.46.). Na osnovu grafika, odabere se broj faktora Eigen vrednosti veće od 1. Deo grafika sa velikim nagibom predstavlja broj odabranih faktora, nakon čega sledi tačka prekida iza koje faktori nisu značajni.



Slika 3.46. Grafički prikaz skri testa

Sledeći korak bi bio tumačenje faktora. Ukoliko odabrani faktori opisuju manji procenat ukupnih varijansi, tada se vrši rotacija faktora (ortogonalna ili kosa) čime se ne menjaju rešenja, već samo struktura faktora.

### 3.12.2. Klaster analiza

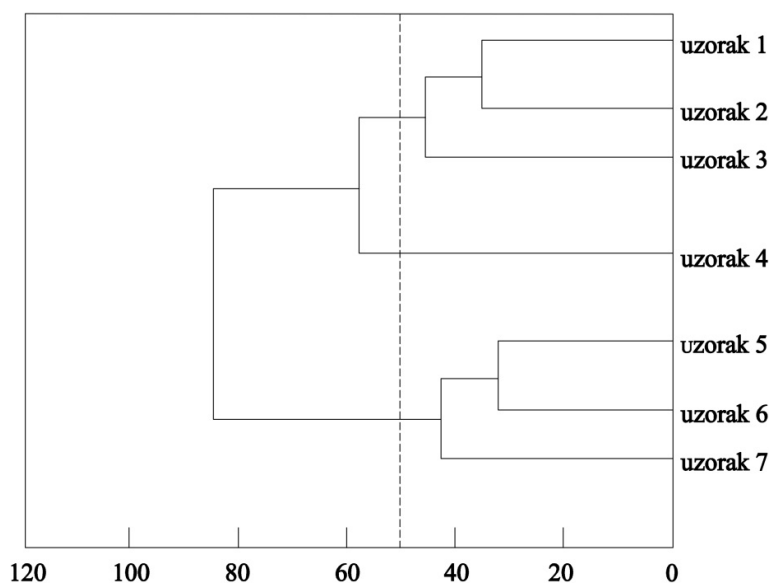
U klaster analizi (eng. *Cluster Analysis – CA*) traži se struktura podataka za grupisanje multivarijantnih opažanja u klaster. Cilj ove analize je upravo pronalaženje optimalnog načina grupisanja varijabli, tako da se slične jedinice ili objekti nađu u istom klasteru (*Bojović i Mitrović, 2010*). Ovo je vrsta analize u kojoj se ne može unapred govoriti o broju grupa, niti su one poznate, pa se od ove analize očekuje grupisanje smisljeno samom istraživaču. Klaster analiza se koristi za klasifikaciju, prepoznavanje strukture i numeričku taksonomiju.

Vrlo je bitno znati da što je više varijabli uključeno u analizu i što su one više međusobno nezavisne, teže je pronaći odgovarajući obrazac za grupisanje.

Od svih primenjenih algoritama, dva su dala najbolje rezultate i nazvani su hijerarhijska i nehijerarhijska metoda. Hijerarhijska metoda se zasniva na izračunavanju udaljenosti između objekata, nakon čega sledi tehnika spajanja tih objekata u grupe, pa zatim spajanje bliskih grupa dok se svi ne spoje u jednu veliku grupu koja se prikazuje grafički u obliku dendrograma (stabla). Svaki klaster se sastoji od određenog broja potklastera. Svaki pojedinačni objekat u pojedinačnom klasteru bi predstavljao lišće na stablu. Za izračunavanje rastojanja između dva klastera postoji mnogo metoda, a najčešće se koriste *Single linkage* i *Ward-ova* metoda. To rastojanje je veće što je veća razlika između datih objekata. Kao mera udaljenosti između vektora  $x = (x_1, x_2, \dots, x_p)'$  i  $y = (y_1, y_2, \dots, y_p)'$  se koristi Euklidova udaljenost, koja je definisana kao:

$$\text{rastojanje } (x, y) = \sqrt{(x - y)'(x - y)} = \sqrt{\sum_{i=1}^p (x_i - y_i)^2} \quad (3.35)$$

Rastojanje (eng. *linkage distance* – D) se prikazuje kao  $D_{\text{link}}/D_{\text{max}}$ , tj. količnik između rastojanja za konkretni slučaj podeljen sa maksimalnim rastojanjem. Na dendrogramu, što je i pokazano na slici 3.47., se sa horizontalne ose očitava rastojanje i formira onoliko klastera koji su na rastojanju  $< 50$  (Dimitrijevic i sar., 2016; Singh i sar., 2004; Varol, 2011).



Slika 3.47. Primer dendrograma i načina grupisanja uzoraka u klasteru

Nehijerarhijska metoda se zasniva na monotono rastućem rangiranju, pošto klasteri progresivno postaju članovi većih klastera. Kod ove metode se ne dobija struktura nalik drvetu, već se novi klasteri dobijaju sukcesivnim klasterovanjem ili spajanjem ili razdvajanjem klastera.

## ***4. EKSPERIMENTALNI DEO***

## 4.1. Materijal

Uzorke korišćene u ovom radu čine: 11 uzoraka bele čokolade, 19 uzoraka mlečne čokolade i 10 uzoraka crne čokolade različitog sastava i različitog udela kakaoo maslaca, kao i 8 uzoraka kakaoo u prahu (tabela 4.1.).

**Tabela 4.1.** Vrste uzoraka i sadržaj kakaoo maslaca (%)

Uzorak	Zemlja porekla	Oznaka uzorka	Sadržaj kakaoo butera (%)	Sadržaj kakaoo delova (%)
Bela čokolada	Švajcarska	BČ1	31	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ2	a	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ3	a	-
Bela čokolada	Nemačka	BČ4	17	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ5	29	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ6	31,4	-
Bela čokolada	Srbija	BČ7	a	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ8	a	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ9	a	-
Bela čokolada	Nemačka	BČ10	17	-
Bela čokolada	Švajcarska	BČ11	a	-
Mlečna čokolada	Srbija	MČ1	-	27
Mlečna čokolada	Švajcarska	MČ2	-	30
Mlečna čokolada	Srbija	MČ3	-	29
Mlečna čokolada	Srbija	MČ4	-	28
Mlečna čokolada	Srbija	MČ5	-	35
Mlečna čokolada	Nemačka	MČ6	-	30
Mlečna čokolada	Nemačka	MČ7	-	25
Mlečna čokolada	Hrvatska	MČ8	-	29
Mlečna čokolada	Hrvatska	MČ9	-	30
Mlečna čokolada	Srbija	MČ10	-	25
Mlečna čokolada	Španija	MČ11	-	31
Mlečna čokolada	Poljska	MČ12	-	25

**Tabela 4.1.** Nastavak

Mlečna čokolada	Hrvatska	MČ13	-	30
Mlečna čokolada	Poljska	MČ14	-	25
Mlečna čokolada	Srbija	MČ15	-	29
Mlečna čokolada	Bosna i Hercegovina	MČ16	-	29
Mlečna čokolada	Srbija	MČ17	-	35
Mlečna čokolada	Srbija	MČ18	-	25
Mlečna čokolada	Nemačka	MČ19	-	35
Crna čokolada	Srbija	CČ1	-	70
Crna čokolada	Srbija	CČ2	-	70
Crna čokolada	Srbija	CČ3	-	75
Crna čokolada	Srbija	CČ4	-	70
Crna čokolada	Srbija	CČ5	-	70
Crna čokolada	Nemačka	CČ6	-	70
Crna čokolada	Nemačka	CČ7	-	70
Crna čokolada	Švajcarska	CČ8	-	72
Crna čokolada	Švajcarska	CČ9	-	70
Crna čokolada	Švajcarska	CČ10	-	70
Kakao prah	Srbija	KP1	-	100
Kakao prah	Srbija	KP2	-	100
Kakao prah	Srbija	KP3	-	100
Kakao prah	Srbija	KP4	-	100
Kakao prah	Srbija	KP5	-	100
Kakao prah	Srbija	KP6	-	100
Kakao prah	Srbija	KP7	-	100
Kakao prah	Srbija	KP8	-	100

<sup>a</sup> podaci nisu dostupni

## 4.2. Aparati i pribor

Prilikom određivanja sadržaja ukupnih i pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, metala i ispitivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka kakaoa u prahu i čokolade, korišćena je sledeća oprema:

1. UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm;
2. Ciklični voltametar CHI760B (CH instruments, Inc., Austin, TX SAD). Čelija je opremljena elektrodom od staklastog ugljenika (Glass Carbon Electrode, CHI104, 2 mm) kao radnom elektrodom, zatim platinskom elektrodom (CHI221,  $r = 1$  mm,  $A = 3,14$  mm<sup>2</sup>) kao pomoćnom i srebro/srebrohloridnom elektrodom (Ag/AgCl) (CHI111) kao referentnom elektrodom;
3. ICP-OES spektrometar iCAP 6000 Series (Thermo Scientific, Cambridge, UK). Korišćena je ešelna rešetka (52,91 ureza /mm, 63,5° ugao plamena). Nebulajzer je ultrazvučni (Cetac U-6000 AT+);
4. HPLC aparat iz serije Agilent Technologies 1200 (Agilent Technologies, SAD) opremljen pumpom (G1354A), automatskim injektorom (G1329A), termostatiranim kolonskim delom (G1316A), UV/Vis detektorom (G1315D), i fluorescentnim detektorom (G1321A). Analitička kolona C<sub>18</sub> Zorbax ECLIPSE xdb-c18, 5 μmol/l, 4.6×150 mm;
5. Centrifuga Z306 (Hermle LaborTechnik GmbH, Nemačka);
6. Uljano kupatilo;
7. pH metar (Hanna Instruments, Smithfield, RI, SAD) sa staklenom elektrodom;
8. Mikrotalasna peć Milestone ETHOS one Advanced Microwave Digestion System (Milestone, Bergamo, Italija);
9. Dejonizator (MicroMed high purity water system) (TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka);
10. Termostat, Julabo MP 5A (JULABO, SAD);
11. Analitička vaga (Mettler Toledo AB-204204-S/A, Nemačka);
12. Automatske varijabilne pipete (Lab Mate<sup>+</sup> PZ HTL S.A., Warszawa, Poljska);
13. Ultrazvučno kupatilo (Bandelin SONOREX Digital 10 P, Sigma, SAD).



### 4.3. Reagensi

Za pripremanje rastvora korišćena je dejonizovana voda specifične provodljivosti 0,05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Svo posuđe je isprano rastvorom HCl (1:1 v/v), česmenskom, zatim, destilovanom i dejonizovanom vodom. U radu su korišćeni sledeći reagensi:

1. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (troloks, Acros Organics, Morris Plains, NJ, SAD);
2. 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
3. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
4. 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
5. vitamin E (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
6. galna kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
7. protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
8. (+)-katehin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
9. (-)-epikatehin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
10. procijanidin B2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
11. cijanidin-3-O-glukozid hlorid (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
12. teobromin (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
13. acetonitril (J. T. Baker, Deventer, Holandija);
14. sirćetna kiselina (J. T. Baker, Deventer, Holandija);
15. heksan (VWR International S.A.S, Belgija);
16. Folin-Ciocalteu reagens (FC, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
17.  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
18.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
19.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
20.  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Acros Organics, Morris Plains, NJ, SAD);
21. mravlja kiselina, metanol, aceton (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
22.  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
23. KCl (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
24. trihlorsirćetna kiselina (TCA, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
25. askorbinska kiselina (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);

26. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
27. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
28. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
29. HCl (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
30. etanol 96% i metanol (J.T. Baker, Deventer, Holandija);
31. NaNO<sub>2</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
32. AlCl<sub>3</sub> (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
33. NaOH (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
34. HNO<sub>3</sub> p.a. 65% (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Nemačka);
35. multielementni standard (Ultra scientific analytical solutions USA), (30 elemenata, 20,00 ± 0,10 ppm, osim P, K i Si koncentracije 100,0 ± 0,5 ppm i Ag koncentracije 5,000 ± 0,025 ppm, matriks je 2% HNO<sub>3</sub> i tragovi vinske kiseline);
36. CRM – sertifikovan referentni materijal (mleko u prahu, ERM<sup>®</sup> – BD150) (Institute for Reference Materials and Measurements, Retieseweg, Belgija);
37. CRM – sertifikovan referentni materijal (čokolada za kuvanje, 2384) (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD);
38. argon 5,0 (čistoće 99,999%);
39. dejonizovana voda ( $\chi = 0,05 \mu\text{S/cm}$ ).

## 4.4. Priprema uzorka

### 4.4.1. Spektrofotometrijska i HPLC analiza

Uzorci čokolade i kakaoa u prahu (oko 10 g) su odmašćeni 3 – 5 puta sa 10 ml heksana i ostatak je osušen. Za kvalitativno i kvantitativno određivanje flavan-3-ola i teobromina, odmašćeni materijal (oko 1 g) je ekstrahovan tri puta sa 10 ml smeše aceton – voda – sirćetna kiselina (70:29,5:0,5 v/v/v) ultrazvučno na 37 °C, 10 minuta. Nakon toga je rastvor centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja. Supernatant je odekantovan, pa proceden kroz mikrofiltre u normalni sud od 50 ml i dopunjen dejonizovanom vodom do crte (*Adamson i sar.*, 1999; *Wollgast i sar.*, 2001). Antocijani su najstabilniji pri pH vrednostima između 1 i 3, i tada imaju najveći apsorpcioni maksimum (*Giusti i Wrolstad*, 2003). Za kvalitativno i

kvantitativno određivanje antocijana, odmašćeni materijal (oko 5 g) je ekstrahovan tri puta sa 15 ml 80% metanol (HCl-om je podešena pH oko 1) ultrazvučno na 25 °C, 20 minuta, nakon toga je rastvor centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja (*Cabrira i sar.*, 2000).

#### 4.4.2. Ciklična voltometrija

Nakon odmašćivanja uzoraka, oko 1 g svakog uzorka je ekstrahovano tri puta sa po 10 ml smeše aceton – voda – sirćetna kiselina (50:49,5:0,5 v/v/v), ultrazvučno na 37 °C, 10 minuta (*Wollgast i sar.*, 2001). Supernatant je odekantovan, pa proceđen kroz mikrofiltre u normalni sud od 50 ml i dopunjen dejonizovanom vodom do crte.

#### 4.4.3. Postupak mineralizacije čokolade i kakaoa u prahu

Izmereno je oko 1 g uzoraka čokolade (prethodno fino usitnjenih) i kakaoa u prahu i preneto u porculanske lončice, koji su prethodno isprani kiselinom. Dodato je 3 ml koncentrovane HNO<sub>3</sub> i 1,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i uzorci su stavljeni u mikrotalasnu peć. Uslovi mikrotalasne digestije bili su: snaga od 900 W i pritisak od 40 bara. Digestija je vršena 5 minuta na 80 °C, nakon 5 min stajanja 3 minuta digestije na 150 °C i nakon 5 min stajanja 5 minuta digestije na 180 °C. Nakon mikrotalasne digestije uzorci su profiltrirani i dopunjeni 0,5% HNO<sub>3</sub> do 25 ml (*Peixoto i sar.*, 2012; *Jalbani i sar.*, 2009; *Güldaş i sar.*, 2008).

#### 4.4.4. Proces zagrevanja i skladištenja uzoraka

U cilju ispitivanja kinetike degradacije polifenolnih jedinjenja tokom zagrevanja, uzorci čokolade i kakaoa u prahu (oko 40 g) su stavljeni u odgovarajuće metalne kivete, koje su zatim termostatirane u uljanom kupatilu 25, 50, 70 i 100 minuta na 95 ± 1 °C, 100 ± 1 °C, 110 ± 1 °C i 125 ± 1 °C. Temperatura je kontrolisana korišćenjem laboratorijskog termometra (± 1 °C). Nakon postizanja izotermalnih uslova, uzorci su hlađeni u ledenoj vodi, kako bi se zaustavila dalja termička degradacija a nakon toga odmah pripremljeni za dalju analizu, po prethodno pomenutom modifikovanom postupku pripreme uzoraka za HPLC (*Adamson i sar.*, 1999).

U cilju praćenja kinetike degradacije polifenolnih jedinjenja tokom čuvanja, uzorci su čuvani na tamnom mestu na tri temperature (4 °C, 22 °C i 35 °C) 45 dana sa intervalima merenja 7, 15, 30 i 45 dana.

## 4.5. Spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i ispitivanje antioksidativne aktivnosti

### 4.5.1. Ukupni polifenoli (UP)

Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima čokolade i kakaou u prahu je određen metodom po Folin-Ciocalteu (*Prior i sar.*, 2005). Rastvor Folin-Ciocalteu čini smeša fosfovolframove ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) i fosfomolibdenske kiseline ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Metoda po Folin-Ciocalteu je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona čiji intenzitet je srazmeran količini polifenolnih jedinjenja ( $Fenol-MoW_{12}O_{40})^{4-}$ :



Nastali jon ima stabilnu boju čiji intenzitet se određuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 760 nm. Reakcija, na kojoj se zasniva određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih komponenata nije specifična, jer na isti način sa Folin-Ciocalteu reagensom mogu da reaguju još neka jedinjenja.

*Rastvori i reagensi:*

1.  $Na_2CO_3$  (20%, *m/v*),
2. Folin-Ciocalteu reagens,
3. osnovni rastvor galne kiseline (50 mg/ml) u smeši rastvarača etanol/voda (1:10 *v/v*),

*Postupak pripreme uzoraka*

0,5 ml odmašćenog i prethodno pripremljenog uzorka je pomešano sa 0,5 ml Folin-Ciocalteu i 2 ml 20% rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u normalni sud od 10 ml. Sud je dopunjen dejonizovanom vodom do crte i nakon termostatiranja rastvora 2 sata na  $20\text{ }^\circ\text{C}$  je merena apsorbancna na  $760\text{ nm}$ , u odnosu na dejonizovanu vodu kao referentni rastvor (*Singleton i sar.*, 1999; *Stratil i sar.*, 2006; *Huang i sar.*, 2005).

#### Kalibraciona prava

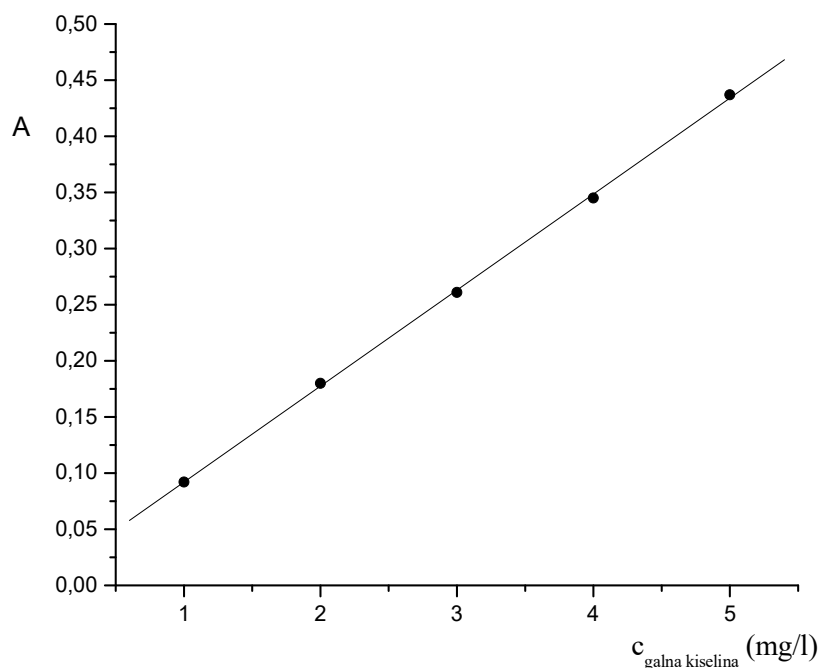
Dobijena kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracije  $1 - 5\text{ mg/l}$  i prikazana je na slici 4.1. Koncentracija polifenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima je određena na osnovu jednačine prave, i izražena je kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu uzorka ( $\text{mg GAE/g}$ ).

$$A = 0,0855 \times c_x + 0,0065; r^2 = 0,99943 \quad (4.3)$$

gde je:

$c_x$  – koncentracija galne kiseline izražena u  $\text{mg/l}$ ,

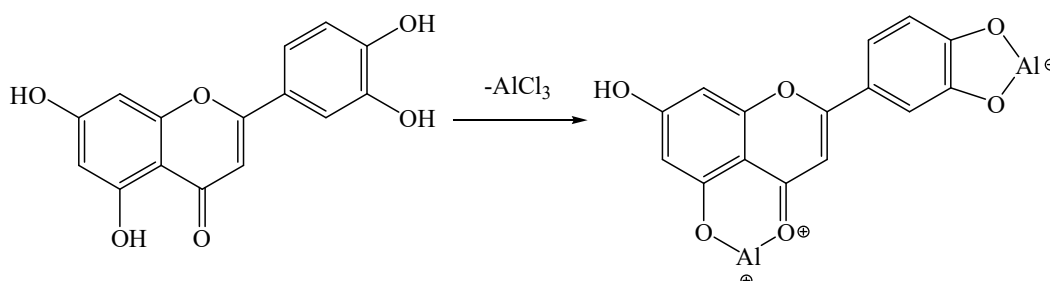
$r^2$  – koeficijent determinacije.



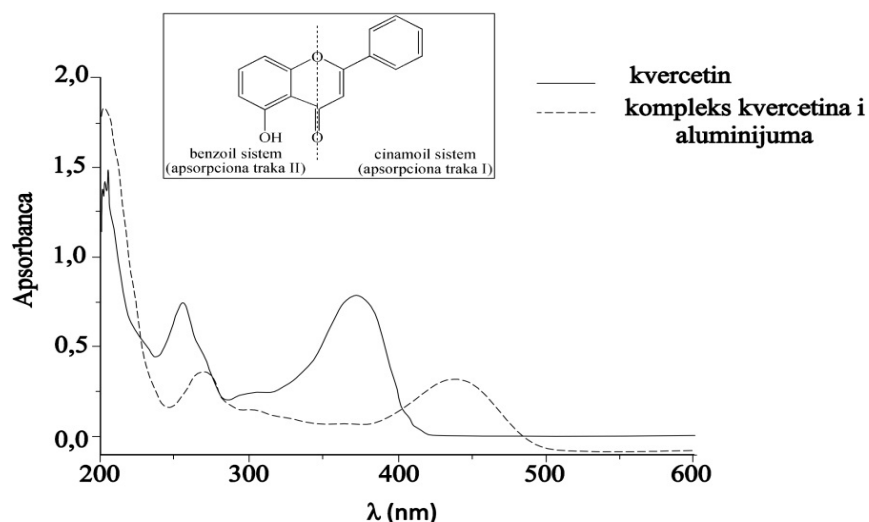
**Slika 4.1.** Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih polifenola (galna kiselina,  $\lambda = 760\text{ nm}$ )

### 4.5.2. Ukupni flavonoidi (UF)

U literaturi su opisani kompleksi pojedinih flavonoida i njihovih glikozida sa aluminijumom(III) (*Cornard i Merlin, 2002*), bakrom(II) (*Pereira i sar., 2007*) gvožđem(II), gvožđem(III) (*Kostyuk i sar., 2001*), platinom(II), paladijumom(II), cinkom(II) (*Malešev i Kuntić, 2007*) i sa drugim prelaznim metalima. Sa analitičkog aspekta važan je kompleks aluminijuma(III), koji je prvi put opisan 1962. (*Jurd, 1962*). Ovaj kompleks nastaje u reakciji kompleksiranja flavonoida sa aluminijumom kao centralnim jonom, i flavonoidom kao ligandom (slika 4.2.). Već tada je primećeno da nastali kompleks dovodi do batohromnog pomeranja obe apsorpcione trake. Na slici 4.3. se vidi da se prva apsorpciona traka javlja u oblasti od 320 nm do 385 nm i potiče od cinamoil sistema B prstena, dok se druga apsorpciona traka javlja u oblasti od 240 nm do 285 nm i potiče od benzoil sistema A prstena (*De Souza i de Giovani, 2005*).



Slika 4.2. Formiranje kompleksa flavonoida sa  $\text{AlCl}_3$



Slika 4.3. UV/Vis spektar kvercetina i kompleksa kvercetina i metala

*Rastvori i reagensi:*

1.  $\text{NaNO}_2$  (5%, *m/v*),
2.  $\text{AlCl}_3$  (1%, *m/v*),
3.  $\text{NaOH}$  (1 mol/l),
4. standardni rastvor (+)-katehina (0,5 mg/ml).

*Postupak pripreme uzoraka*

Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 0,25 ml uzorka, 3 ml dejonizovane vode i 0,3 ml 5%  $\text{NaNO}_2$ . Ovoj smeši je dodato 1,5 ml  $\text{AlCl}_3$  nakon 5 minuta, a zatim, nakon još 5 minuta 2 ml  $\text{NaOH}$  i dejonizovana voda do 10 ml. Apsorbanca rastvora je merena na 510 nm, u odnosu na dejonizovanu vodu kao referentni rastvor.

*Kalibraciona prava*

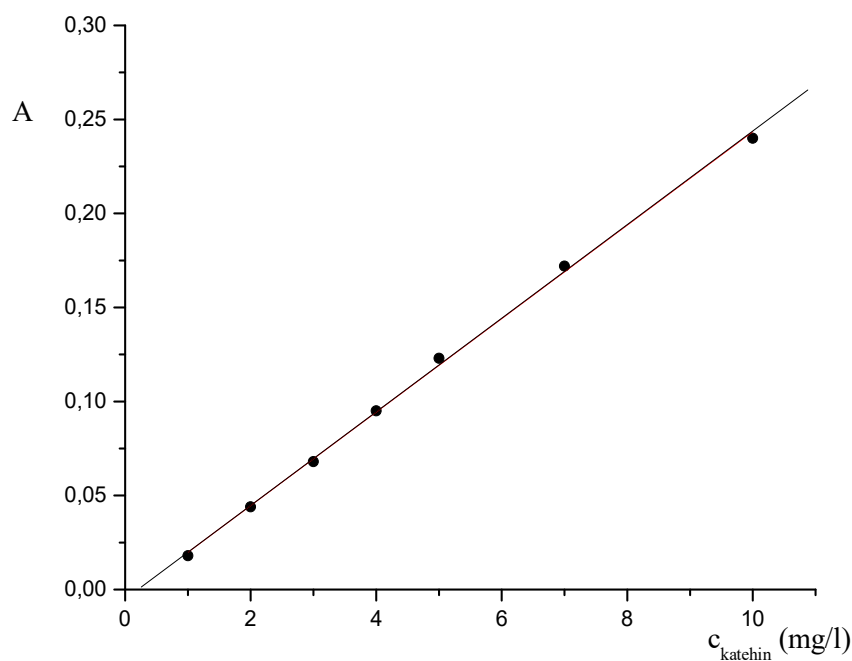
Od osnovnog rastvora katehina je pripremljena serija radnih rastvora, pomoću kojih je konstruisana kalibraciona prava, koja je linearna u opsegu koncentracije 1 – 10 mg/l (slika 4.4.). Na osnovu dobijene jednačine prave izračunat je sadržaj ukupnih flavonoida i izražen je kao milligram ekvivalenta katehina po gramu uzorka (mg CE/g).

$$A = 0,02486 \times c_x - 0,00507; r^2 = 0,9986 \quad (4.4)$$

gde je:

$c_x$  – koncentracija katehina izražena u mg/l,

$r^2$  – koeficijent determinacije.



**Slika 4.4.** Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (katehin,  $\lambda = 510$  nm)

### 4.5.3. ABTS metoda

ABTS metoda (*Re i sar.*, 1999; *Arts i sar.*, 2004) se zasniva na obezbojavanju plavo-zelenog ABTS radikal katjona koji nastaje hemijskom ili enzimskom oksidacijom rastvora ABTS-a, nekoliko časova pre analize. Nastali ABTS radikal katjon reaguje sa antioksidantima prisutnim u ispitivanim uzorcima, pri čemu je smanjenje intenziteta boje srazmerno koncentraciji prisutnih antioksidanata (*Prior i sar.*, 2005).

*Rastvori i reagensi:*

1. osnovni rastvor ABTS-a u metanolu ( $7 \times 10^{-3}$  mol/l),
2. osnovni rastvor  $K_2S_2O_8$  ( $2,4 \times 10^{-3}$  mol/l),
3. radni rastvor ABTS radikal katjona je dobijen mešanjem (1:1 v/v) prethodno navedenih osnovnih rastvora (stoji 12 – 16h). Radni rastvor ABTS radikal katjona je razblažen metanolom tako da apsorbancu bude  $A_{734 \text{ nm}} = 0,700 \pm 0,020$ ,



4. osnovni rastvor troloksa ( $4 \times 10^{-3}$  mol/l),

5. metanol.

#### *Postupak pripreme slepe probe*

Slepa proba je dobijena mešanjem 2 ml radnog rastvora ABTS radikal katjona ( $A \sim 0,7$ ) i 2 ml metanola u normalnom sudu od 10 ml. Rastvor je stajao 6 minuta na tamnom i apsorbancija je merena na 734 nm.

#### *Postupak pripreme uzoraka*

Uzorku zapremine 2 ml dodato je 2 ml radnog rastvora ABTS radikal katjona. Nakon stajanja rastvora na tamnom 6 minuta, apsorbancija je merena na 734 nm u odnosu na metanol kao referentni rastvor.

#### *Kalibraciona prava*

Od apsorbance slepe probe su oduzimate apsorbance serije standardnih rastvora. Grafička zavisnost je data:

$$\Delta A = A_0 - A_s = f(c_x) \quad (4.5)$$

gde je:

$A_0$  – apsorbancija slepe probe,

$A_s$  – srednja vrednost triju proba standardnog rastvora datih koncentracija.

Kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracija 0,5 – 8,5  $\mu\text{mol/l}$ . (slika 4.5.) i data je kao:

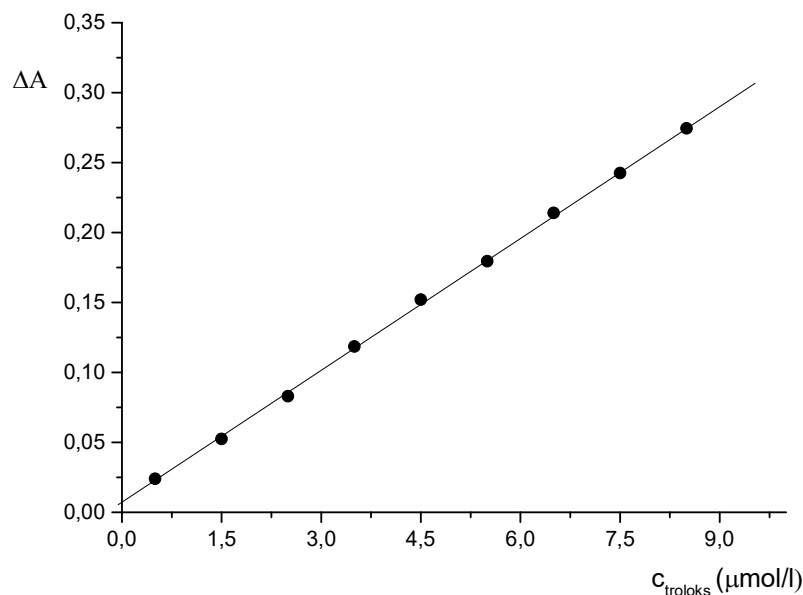
$$\Delta A = 0,0316 \times c_x + 0,0068; r^2 = 0,9997 \quad (4.6)$$

gde je:

$c_x$  – koncentracija ABTS radikal katjona izražena u  $\mu\text{mol/l}$ ,

$r^2$  – koeficijent determinacije.

Na osnovu dobijene jednačine prave, izračunata je antioksidativna aktivnost i izražena je kao mikromol troloks ekvivalenta po gramu uzorka ( $\mu\text{mol TE/g}$ ).



**Slika 4.5.** Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti, prema ABTS radikal katjonu (troloks,  $\lambda = 734 \text{ nm}$ )

#### 4.5.4. DPPH metoda

DPPH metoda (*Brand-Williams i sar.*, 1995; *Karori i sar.*, 2007) se zasniva na sličnom mehanizmu kao i ABTS metoda. Rastvor DPPH radikala, koji je ljubičaste boje, reaguje sa antioksidantima u ispitivanim uzorcima. Ovaj radikal se redukuje do žuto obojenog DPPH što je praćeno smanjenjem apsorbance na 515 nm.

*Reagensi i rastvori:*

1. osnovni rastvor DPPH radikala u metanolu ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ ),
2. radni rastvor DPPH radikala dobijen razblaživanjem osnovnog rastvora ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ ),
3. standardni rastvor troloksa ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ ),
4. metanol.

### *Postupak pripreme slepe probe*

Metanolu zapremine 5 ml dodato je 5 ml radnog rastvora DPPH radikala. Nakon 30 minuta stajanja na 20 °C, merena je apsorbanca rastvora na 520 nm.

### *Postupak pripreme uzoraka*

Uzorak zapremine 0,1 ml u normalnom sudu, pomešan je sa 5 ml radnog rastvora DPPH radikala i dopunjen metanolom do 10 ml. Nakon 6 minuta stajanja na 20 °C apsorbanca dobijenog rastvora je merena na 734 nm, u odnosu na metanol kao refereni rastvor.

### *Kalibraciona prava*

Seriya standardnih rastvora je pripremljena tako što je određenoj zapremini troloks-a dodato 5 ml DPPH i dopunjeno metanolom do 10 ml. Apsorbanca je merena nakon 30 minuta i data je kao srednja vrednost tri merenja. Od apsorbanca slepe probe su oduzimate apsorbanca serije standardnih rastvora. Grafička zavisnost je data:

$$\Delta A = A_0 - A_s = f(c_x) \quad (4.7)$$

gde je:

$A_0$  – apsorbanca slepe probe,

$A_s$  – srednja vrednost triju proba standardnog rastvora datih koncentracija.

Kalibraciona prava (slika 4.6.) je linearna u opsegu koncentracija 2 – 10  $\mu\text{mol/l}$  i data je kao:

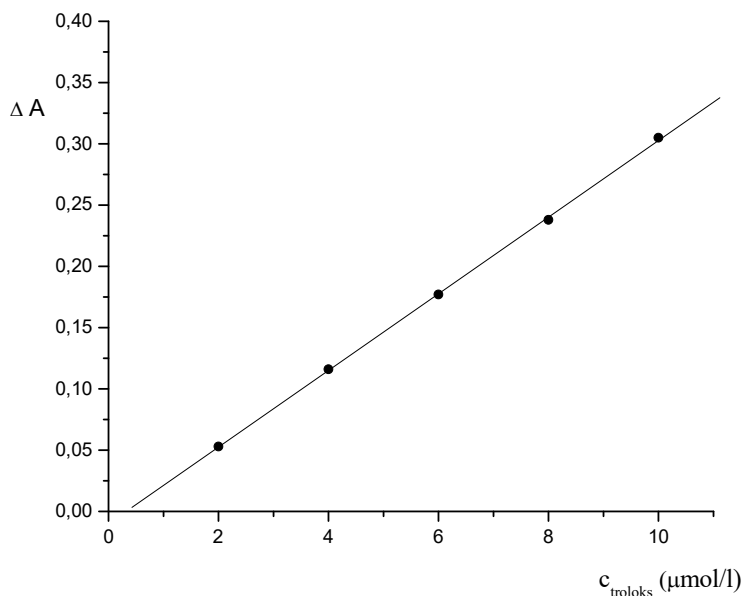
$$\Delta A = 0,0313 \times c_x - 0,01; r^2 = 0,9996 \quad (4.8)$$

gde je:

$c_x$  – koncentracija DPPH radikala izražena u  $\mu\text{mol/l}$ ,

$r^2$  – koeficijent determinacije.

Na osnovu dobijene jednačine prave, izračunata je antioksidativna aktivnost i izražena kao mikromolovi troloks ekvivalenta po gramu uzorka ( $\mu\text{mol TE/g}$ ).



**Slika 4.6.** Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu (Troloks,  $\lambda = 515 \text{ nm}$ )

#### 4.5.5. FRAP metoda

FRAP metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti se zasniva na sposobnosti redukcije kompleksa  $[\text{Fe(III)-TPTZ}_2]^{3+}$  do  $[\text{Fe(III)-TPTZ}_2]^{2+}$ . Ovu metodu su razvili *Benzie i Strain* (1996; 1999) i *Benzie i Szeto* (1999), a modifikovali *Vijayalakshmi i Ruckmani* (2016).

*Reagensi i rastvori:*

1. rastvor HCl-a (40 mmol/l),
2. acetatni pufer (0,3 mol/l; pH = 3,6),
3. rastvor  $\text{FeCl}_3$  (20 mmol/l),
4. rastvor TPTZ-a (10 mmol/l) u 40 mmol/l HCl,
5. standardni rastvor  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 mmol/l).

*Postupak pripreme uzoraka*

Ispitavani rastvor (20  $\mu$ l) je razblažen sa 0,38 ml dejonizovane vode i dodato je 3 ml FRAP reagensa (smeša acetatnog pufera, TPTZ-a i  $\text{FeCl}_3$  u odnosu 10:1:1 (v/v/v)). Nakon termostatiranja 5 minuta na 37 °C, merena je apsorbanca na 595 nm u odnosu na slepu probu. Slepoj probi je, umesto uzorka, dodat rastvarač.

#### *Kalibraciona prava*

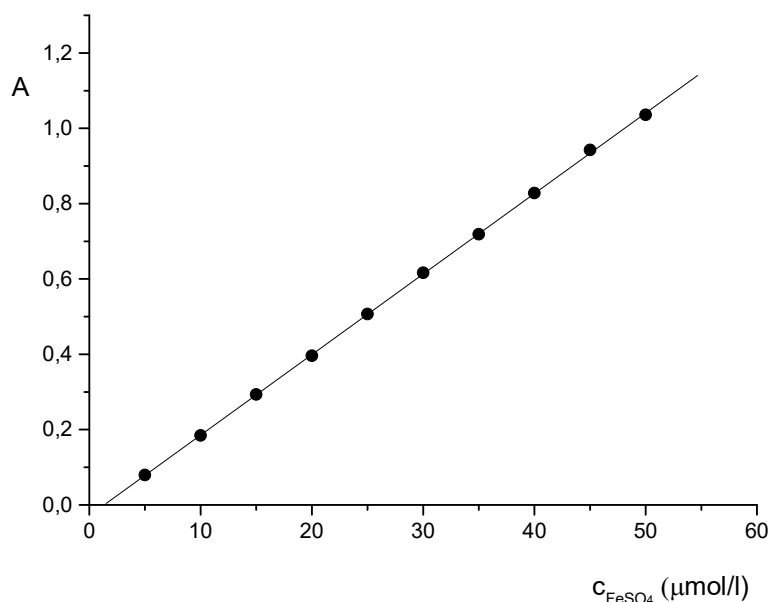
Za dobijanje kalibracione prave korišćena je serija standardnih rastvora  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracija 5 – 50  $\mu\text{mol/l}$  i prikazana je na slici 4.7. Na osnovu dobijene jednačine prave izračunata je antioksidativna (FRAP) aktivnost i izražena kao mikromolovi  $\text{Fe}^{2+}$  ekvivalenta po gramu uzorka ( $\mu\text{mol FE/g}$ ).

$$A = 0,02141 \times c_x - 0,0286; r^2 = 0,9999 \quad (4.9)$$

gde je:

$c_x$  – koncentracija  $\text{Fe}^{2+}$  jona izražena u  $\mu\text{mol/l}$ ,

$r^2$  – koeficijent determinacije.



**Slika 4.7.** Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti preko redukcije kompleksa  $[\text{Fe(III)-TPTZ}_2]^{3+}$  do  $[\text{Fe(III)-TPTZ}_2]^{2+}$  (FRAP,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\lambda = 595 \text{ nm}$ )

#### 4.5.6. PFRAP metoda

Sposobnost redukcije gvožđa predstavlja merilo antioksidativne sposobnosti određenog uzorka. Reakcija redukcije se prati merenjem promene apsorbance na 700 nm, tj. određuje se koncentracija berlinskog plavog (*Oyaizu*, 1986; *Ferreira i sar.*, 2007).

*Reagensi i rastvori:*

1. rastvor  $K_3[Fe(CN)_6]$  (1%, *m/v*),
2. pufer  $NaH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  (0,2 mol/l; pH = 6,6),
3.  $CCl_3COOH$  (10% (*m/v*)),
4.  $FeCl_3$  (0,1%, *m/v*),
5. standardni rastvor askorbinske kiseline (200  $\mu$ g/ml).

*Postupak pripreme uzoraka*

Rastvoru uzorka (0,1 ml) dodato je 1,5 ml fosfatnog pufera i 1,5 ml kalijum-heksacijanoferata(III). Nakon inkubacije 30 minuta na temperaturi od 50 °C, rastvoru je dodato 1,5 ml trihlorsirćetne kiseline. Nakon toga je 1,5 ml rastvora razblaženo sa 1,5 ml dejonizovane vode i dodato je 0,3 ml gvožđe(III)-hlorida. Apsorbanca tako dobijenog rastvora, merena je na 700 nm, u odnosu na slepu probu kao referentni rastvor.

*Kalibraciona prava*

Postupak pripreme je isti kao i za uzorke, s tim što je umesto uzorka odmeravana askorbinska kiselina. Kalibraciona prava (slika 4.8.) je linearna u opsegu koncentracija 11,2 – 93,8  $\mu$ mol/l.

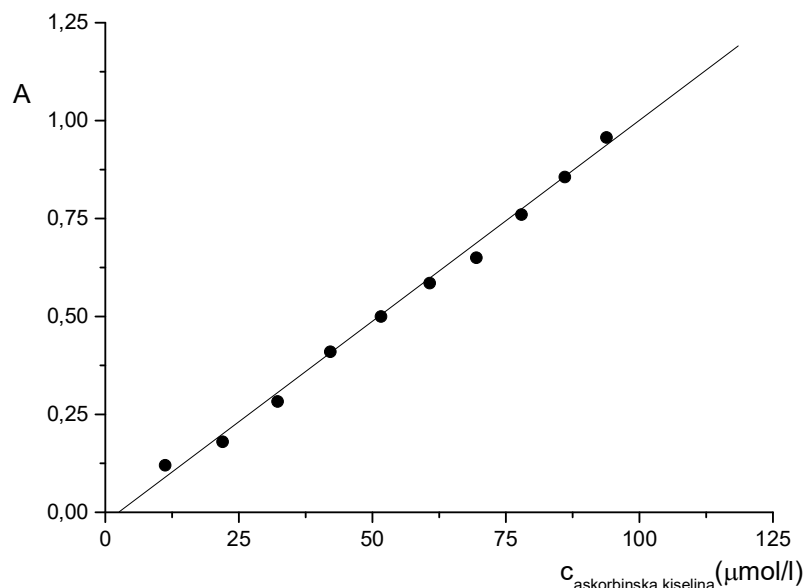
Na osnovu dobijene jednačine prave, izračunata je antioksidativna (PFRAP) aktivnost i izražena kao mikromolovi askorbinske kiseline ekvivalenta po gramu uzorka ( $\mu$ mol AAE/g).

$$A = 0,0102 \times c_x - 0,0281; r^2 = 0,9944 \quad (4.10)$$

gde je:

$c_x$  – koncentracija askorbinske kiseline izražena u  $\mu$ mol/l,

$r^2$  – koeficijent determinacije.

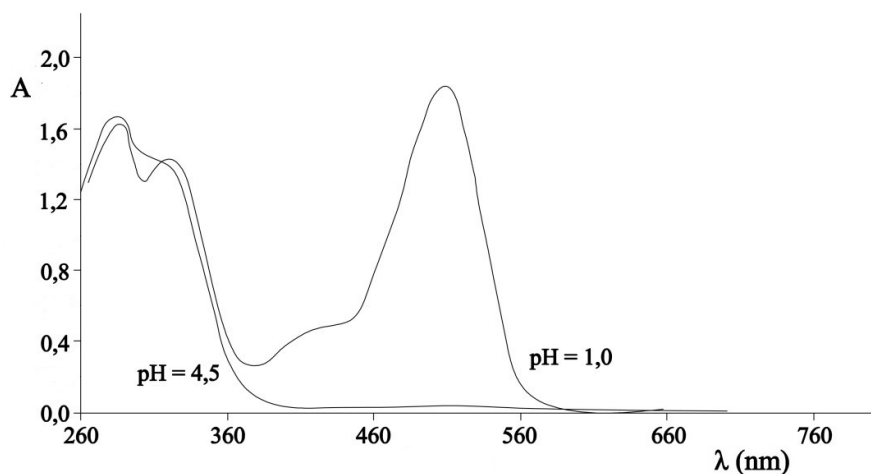


**Slika 4.8.** Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti preko redukcije Fe (Fe(III) u Fe(II) (PFRAP, askorbinska kiselina,  $\lambda = 700$  nm)

#### 4.5.7. Određivanje sadržaja ukupnih i monomernih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana je proporcionalan izmerenoj apsorbanci, pod uslovom da je pH rastvora 1. Sadržaj ukupnih antocijana određuje se „singl” metodom.

pH diferencijalna metoda se koristi za određivanje sadržaja monomernih antocijana. Ova metoda se zasniva na osobini monomernih antocijana, da su crvene boje pri pH 1,0 i u obliku oksonijum jona, a da su bezbojni pri pH 4,5 u poluketalnom obliku (slika 4.9.) (*Giusti i Wrolstad.*, 2003).



Slika 4.9. Apsorpcioni spektar antocijana

*Reagensi i rastvori:*

1. rastvor KCl (pH = 1,0),
2. rastvor CH<sub>3</sub>COONa (pH = 4,5).

*Postupak pripreme uzoraka*

Odmereno je po 0,5 ml uzorka u dva normalna suda od 10 ml i dodato je po 5 ml rastvora KCl (pH = 1,0), odnosno CH<sub>3</sub>COONa (pH = 4,5). Nakon 15 minuta stajanja rastvora na 20 °C, izmerena je apsorbancija oba rastvora na talasnim dužinama: λ = 520 nm i λ = 700 nm.

Sadržaj ukupnih antocijana u uzorku izračunat je kao ekvivalent cijanidin-3-O-glukozida prema formuli:

$$\text{mg (cy - 3 - glu)/l} = \frac{A_{\text{uk}} \times M_r \times D_f}{\epsilon \times l} \times 10^3 \quad (4.11)$$

gde je:

$$A_{\text{uk}} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=1,0}$$

Sadržaj monomernih antocijana izračunat je kao ekvivalent cijanidin-3-O-glukozida (mg(cy-3-gly)/l, mg CGE/l) prema formuli:

$$\text{mg (cy - 3 - glu)/l} = \frac{A_{\text{mon}} \times M_r \times D_f}{\epsilon \times l} \times 10^3 \quad (4.12)$$



gde je:

$$A_{\text{mon}} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}_1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}_{4,5}},$$

$$M(\text{cy} - 3 - \text{glu}) = 449,2 \text{ g/mol},$$

$\varepsilon = 26900 \text{ l/molcm}$ , molarni apsorpcioni koeficijent,

$l = 1 \text{ cm}$ , debljina kivete,

$D_f$  – faktor razblaženja.

Sadržaj je preračunat na 100 g uzorka (mg CGE/100g).

#### 4.5.8. Ciklična voltometrija u analizi polifenolnih jedinjenja

Standardna oprema, koja se koristi za cikličnu voltometriju je elektrohemijaska ćelija, koja se sastoji od staklene posude i tri elektrode: elektrode od staklastog ugljenika kao radne, platinske elektrode, kao pomoćne i srebro/srebrohloridne elektrode Ag/AgCl, kao referentne elektrode. Sva merenja su vršena na sobnoj temperaturi. Ciklični voltamogrami su snimljeni u opsegu potencijala od 0 mV do 800 mV, pri brzini snimanja od 100 mV/s. Takođe su snimljeni ciklični voltamogrami za standarde troloks i vitamin E, u opsegu koncentracija od 2  $\mu\text{mol/l}$  do 80  $\mu\text{mol/l}$  (*Piljac-Žegarac i sar.*, 2010; *Arteaga i sar.*, 2012).

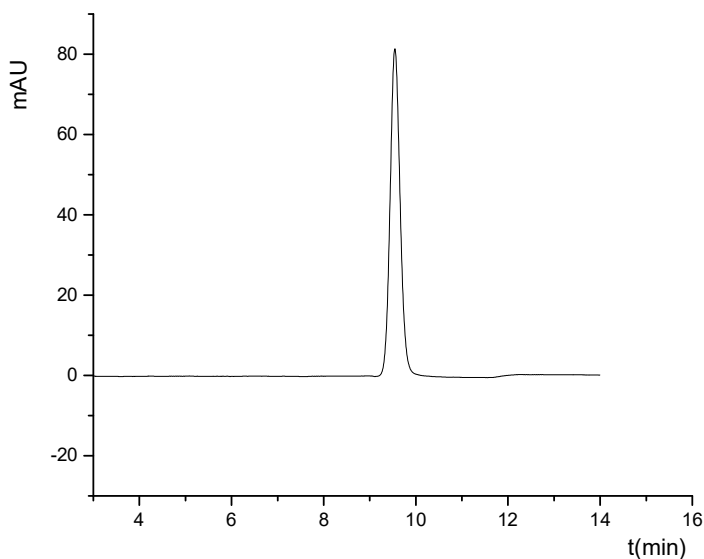
##### *Priprema elektrode*

Pre svakog merenja, površina elektrode od staklastog ugljenika je brušena aluminijumskim prahom (veličina čestice 1; 0,3 i 0,05  $\mu\text{m}$ ). Taj prah je prethodno odmašćen u etanolu (ultrazvučno kupatilo) i ispran destilovanom vodom.

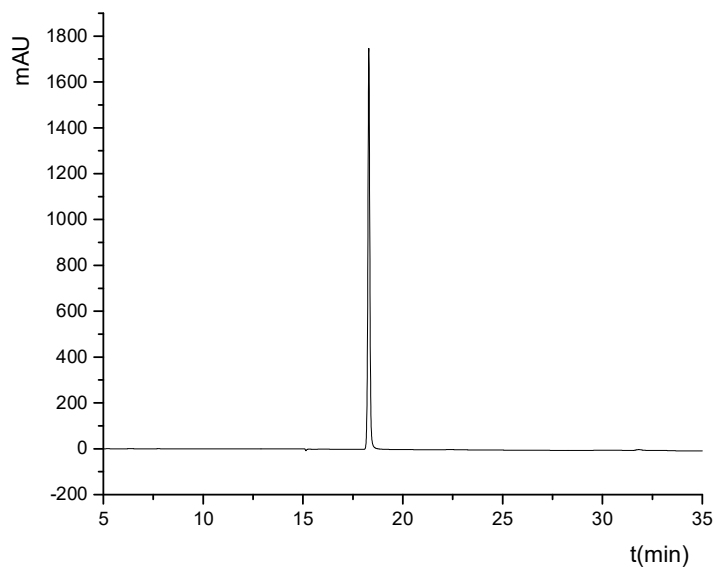
#### 4.6. HPLC metoda

Razdvajanje komponenata teobromina, flavan-3-ola i njihovih polimera je vršeno na ZORBAX Eclipse XDB-C18 koloni, koja je termostatirana na 30 °C, sa brzinom proticanja mobilne faze od 0,8 ml/min. Zapremina injektiranog uzorka je 20  $\mu\text{l}$ . Za dvadesetominutno razdvajanje komponenti je korišćen sistem rastvarača A (acetonitril) i B (0,1% mravlja

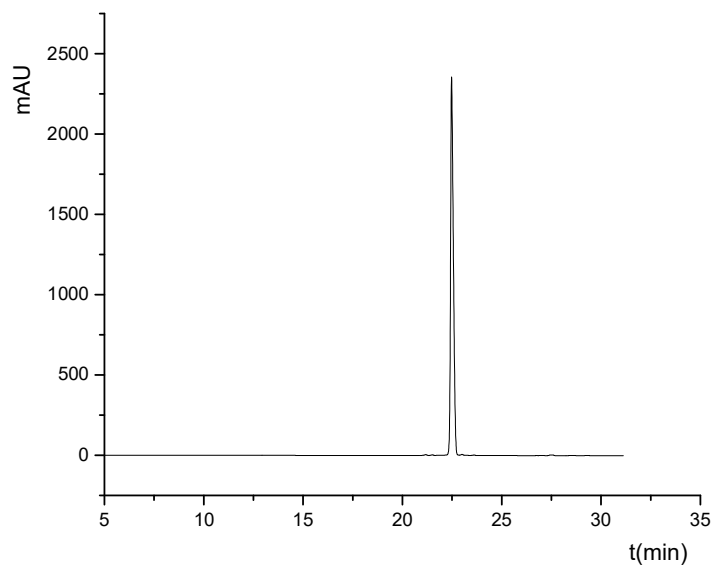
kiselina) (*Radulović i sar.*, 2012). Prema ovoj metodi nisu identifikovani antocijani, pa je za njihovu identifikaciju i kvantifikaciju korišćena metoda opisana u radu *Mitića i saradnika* (2012). U radu je korišćen sistem rastvarača A (5% rastvor mravlje kiseline) i B (80% acetonitril, 5% mravlje kiseline i 15% voda), sa sledećim gradijentom: 0% B od 0 do 10 minuta, od 0% do 25% B od 10 do 28 minuta, 25% B od 28 do 30 minuta i od 25% do 50% B od 30 do 35 minuta, od 50% do 80% B od 35 do 40 minuta. Zapremina injektiranja je bila 5  $\mu$ l (ZORBAX Eclipse XDB-C18). Takođe, u literaturi je za određivanje procijanidina i katehin tip flavonoida u uzorcima kakaoa i proizvoda od čokolade, korišćen sličan gradijent sa datim sistemom rastvarača (*Gu i sar.*, 2006; *Oracz i sar.*, 2015b). Na slikama 4.10.– 4.15. su prikazani HPLC hromatogrami standarda.



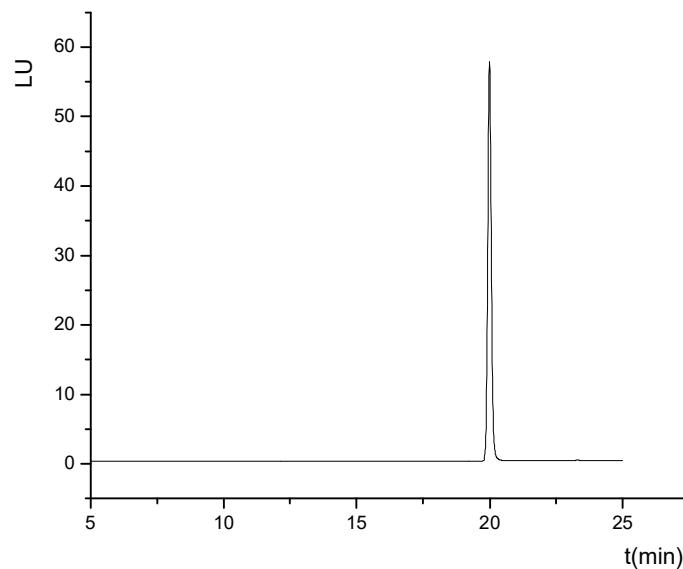
**Slika 4.10.** HPLC hromatogram standarda protokatehinske kiseline snimljen na 280 nm



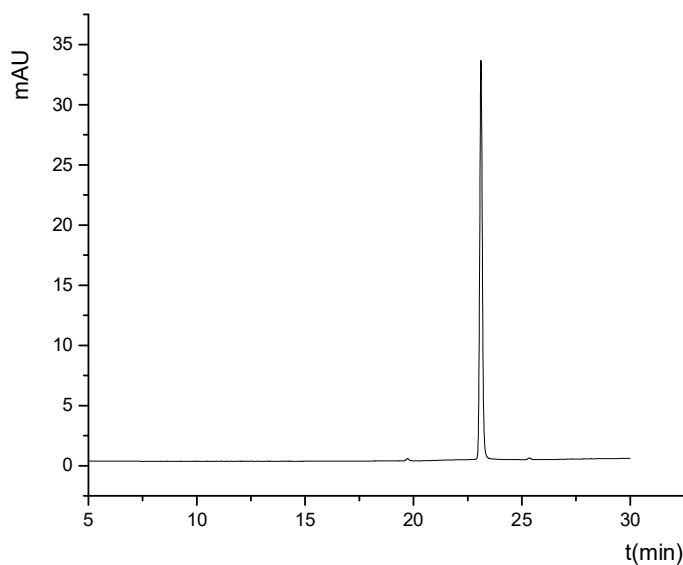
Slika 4.11. HPLC hromatogram standarda teobromina snimljen na 280 nm



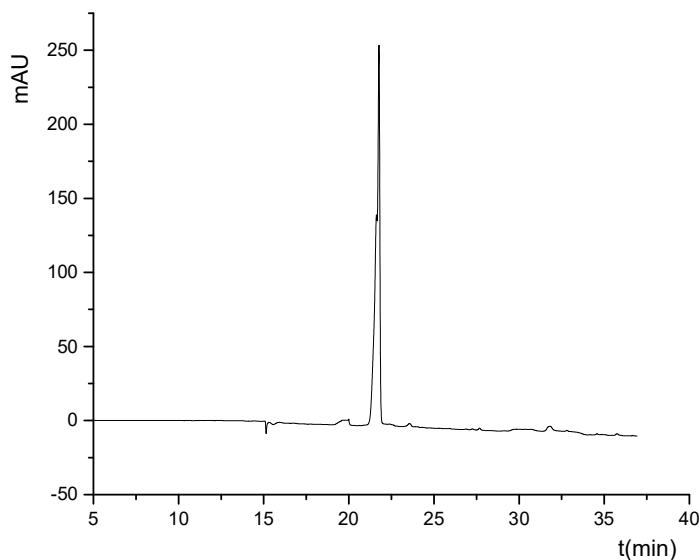
Slika 4.12. HPLC hromatogram standarda cijanidin-3-O-glukozid snimljen na 520 nm



**Slika 4.13.** HPLC hromatogram standarda (+)-katehina snimljen fluorescentnim detektorom sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm



**Slika 4.14.** HPLC hromatogram standarda (-)-epikatehina snimljen fluorescentnim detektorom sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm



**Slika 4.15.** HPLC hromatogram standarda procijanidina B2 snimljen fluorescentnim detektorom sa talasnom dužinom ekscitacije od 275 nm i talasnom dužinom detekcije od 322 nm

## 4.7. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost triju proba ( $c_{sr} \pm SD$ ). Interval poverenja je 95% (Miller i Miller, 2005). Kako bi se izvršilo diferenciranje ispitivanih uzoraka, na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja i metala kao i na osnovu antioksidativne aktivnosti izvršena je statistička obrada podataka primenom analize glavnih komponentata (PCA), klaster analize (CA) i korelacione analize. Za obradu podataka korišćen je statistički paket Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## ***5. REZULTATI I DISKUSIJA***

## 5.1. Spektrofotometrijska analiza

U ovom delu disertacije su dati i tumačeni rezultati određivanja sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida, ukupnih i monomernih antocijana, kao i rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka primenom četiri *in vitro* spektrofotometrijska testa.

### 5.1.1. Ukupni polifenoli i flavonoidi

Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida u ispitivanim uzorcima čokolade i kakaoa u prahu je dat kao srednja vrednost tri ponavljanja ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ) i prikazan je u tabelama 5.1. – 5.4.

**Tabela 5.1.** Sadržaj ukupnih polifenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF) u ispitivanim uzorcima bele čokolade

Uzorak	UP	RSD (%)	UF	RSD (%)
	$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	
BČ1	1,96 ± 0,04	2,04	1,91 ± 0,02	1,05
BČ2	0,61 ± 0,02	3,28	0,52 ± 0,03	5,77
BČ3	0,66 ± 0,02	0,55	0,59 ± 0,01	1,69
BČ4	0,48 ± 0,03	6,25	0,19 ± 0,00	0,00
BČ5	0,69 ± 0,01	1,45	0,42 ± 0,01	2,38
BČ6	0,57 ± 0,04	7,02	0,48 ± 0,02	4,17
BČ7	2,27 ± 0,10	4,41	1,77 ± 0,06	3,39
BČ8	0,47 ± 0,01	2,13	0,26 ± 0,01	3,85
BČ9	0,58 ± 0,02	3,45	0,26 ± 0,02	7,69
BČ10	1,70 ± 0,04	2,35	1,24 ± 0,02	1,61
BČ11	1,74 ± 0,04	2,30	1,56 ± 0,01	0,64

Sadržaj ukupnih polifenola (UP), u uzorcima bele čokolade, se kreće u granicama od 0,47 mg GAE/g do 2,27 mg GAE/g. Najveći sadržaj UP je u uzorku bele čokolade BČ7. Sadržaj ukupnih flavonoida (UF) u uzorcima bele čokolade je u intervalu od 0,19 mg CE/g do 1,91 mg CE/g, sa najvećim sadržajem u uzorku BČ1.

**Tabela 5.2.** Sadržaj ukupnih polifenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF) u ispitivanim uzorcima mlečne čokolade

Uzorak	UP $c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	UF $c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
MČ1	2,84 ± 0,04	1,41	1,73 ± 0,06	3,47
MČ2	4,28 ± 0,08	1,87	2,94 ± 0,06	2,04
MČ3	4,69 ± 0,04	0,85	3,3 ± 0,1	3,33
MČ4	3,22 ± 0,02	0,62	2,81 ± 0,08	2,85
MČ5	5,59 ± 0,08	1,43	3,7 ± 0,1	2,97
MČ6	4,05 ± 0,06	1,48	3,1 ± 0,1	3,50
MČ7	4,39 ± 0,02	0,45	2,11 ± 0,08	3,79
MČ8	2,94 ± 0,05	1,70	2,15 ± 0,06	2,79
MČ9	3,32 ± 0,02	0,60	2,62 ± 0,06	2,29
MČ10	3,93 ± 0,06	1,53	3,02 ± 0,06	1,99
MČ11	2,66 ± 0,02	0,75	1,15 ± 0,06	5,22
MČ12	2,71 ± 0,02	0,74	1,35 ± 0,03	2,22
MČ13	2,43 ± 0,06	2,50	1,47 ± 0,08	5,44
MČ14	1,70 ± 0,01	0,59	1,19 ± 0,03	2,52
MČ15	1,05 ± 0,03	2,86	1,09 ± 0,06	5,50
MČ16	4,18 ± 0,05	1,20	2,29 ± 0,00	0,00
MČ17	4,72 ± 0,04	0,85	2,53 ± 0,00	0,00
MČ18	1,71 ± 0,01	0,58	1,25 ± 0,06	4,80
MČ19	3,84 ± 0,06	1,56	2,5 ± 0,1	4,47

U uzorcima mlečne čokolade se sadržaj UP kreće od 1,05 mg GAE/g do 5,59 mg GAE/g. Najveći sadržaj UP je u uzorku mlečne čokolade MČ5. Sadržaj UF u uzorcima mlečne čokolade se kreće u intervalu od 1,09 mg CE/g do 3,70 mg CE/g i najveći je u uzorku MČ5.



**Tabela 5.3.** Sadržaj ukupnih polifenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF) u ispitivanim uzorcima crne čokolade

Uzorak	UP $c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	UF $c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
CČ1	13,6 ± 0,1	0,74	5,1 ± 0,2	3,92
CČ2	7,1 ± 0,1	1,41	4,99 ± 0,00	0,00
CČ3	8,7 ± 0,5	5,75	2,41 ± 0,04	1,66
CČ4	31,1 ± 0,2	0,64	11,8 ± 0,3	2,54
CČ5	9,3 ± 0,1	1,07	5,5 ± 0,1	1,82
CČ6	40,4 ± 0,4	0,99	30,4 ± 0,4	1,32
CČ7	31,5 ± 0,7	2,22	27,9 ± 0,2	0,72
CČ8	23,5 ± 0,7	2,98	21,7 ± 0,2	0,75
CČ9	30,1 ± 0,5	1,66	26,7 ± 0,2	0,75
CČ10	31,4 ± 0,4	1,27	22,4 ± 0,5	2,23

U uzorcima crne čokolade sadržaj UP se kreće u intervalu od 7,1 mg GAE/g do 40,4 mg GAE/g, dok je u uzorcima kakaoa u prahu u intervalu od 3,8 mg GAE/g do 36,9 mg GAE/g. Sadržaj UF u uzorcima crne čokolade je u intervalu od 2,41 mg CE/g do 30,4 mg CE/g i najveći je u uzorku CČ6. U uzorcima kakaoa u prahu sadržaj UF je u intervalu od 2,02 mg CE/g do 10,8 mg CE/g i najveći je u uzorku KP4.

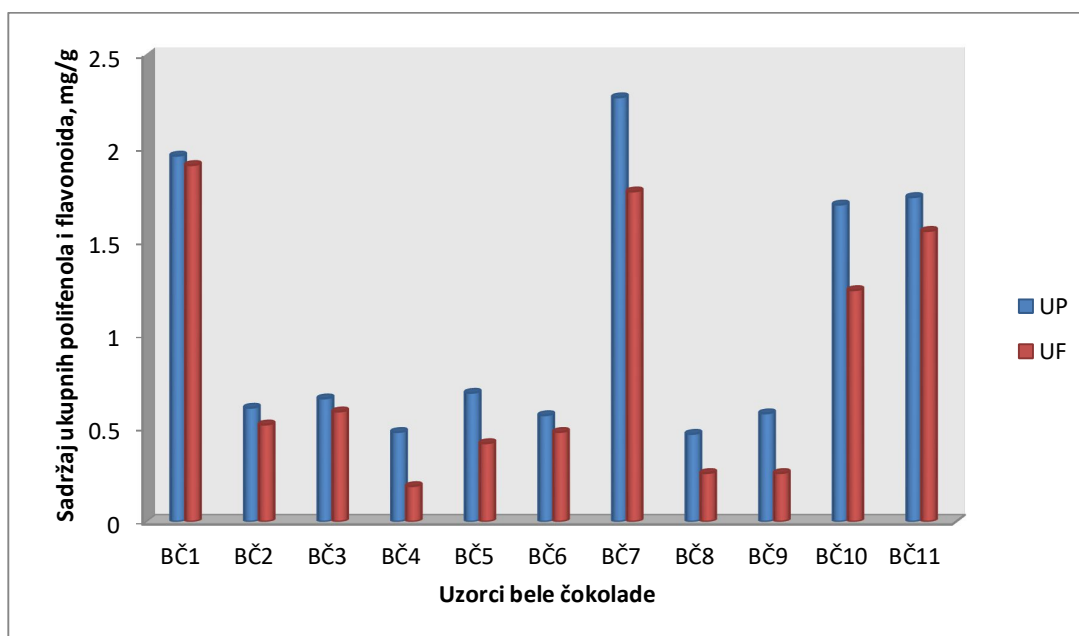
**Tabela 5.4.** Sadržaj ukupnih polifenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF) u ispitivanim uzorcima kakaoa u prahu

Uzorak	UP $c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	UF $c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
KP1	3,8 ± 0,1	2,63	2,02 ± 0,04	1,98
KP2	18,6 ± 0,1	0,54	5,3 ± 0,2	3,78
KP3	10,9 ± 0,2	1,83	4,7 ± 0,2	4,25
KP4	36,9 ± 0,3	0,81	10,8 ± 0,2	1,85
KP5	8,5 ± 0,3	3,53	2,50 ± 0,07	2,8
KP6	8,8 ± 0,4	4,55	7,2 ± 0,1	1,39
KP7	11,9 ± 0,2	1,68	6,9 ± 0,3	4,35
KP8	11,0 ± 0,1	0,91	6,5 ± 0,3	4,61

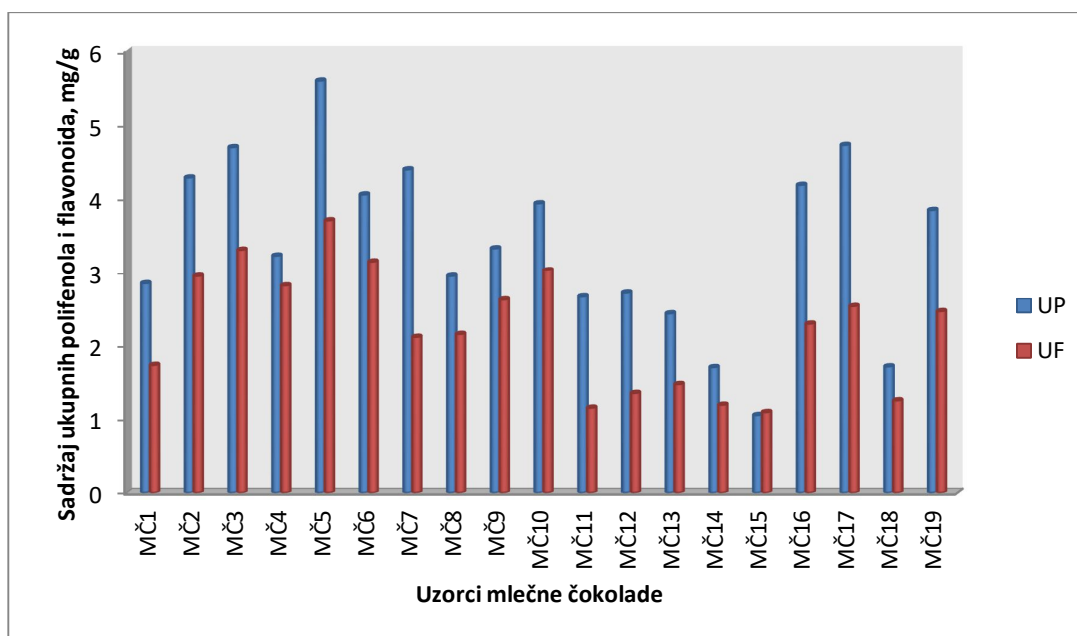
Najveći sadržaj UP je u u uzorku kakaoa u prahu KP4 i u uzorku crne čokolade CČ6. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je najveći sadržaj UP u uzorcima crne čokolade (prosečni sadržaj 22,7 mg GAE/g), a zatim, slede uzorci kakaoa u prahu (prosečni sadržaj 13,8 mg GAE/g), mlečne čokolade (prosečni sadržaj 3,4 mg GAE/g) i bele čokolade (prosečni sadržaj 1,1 mg GAE/g). Ovo je očekivano s obzirom na udeo kakao delova u datim vrstama čokolade. Najmanji sadržaj UP u uzorcima bele čokolade je posledica procesa alkalizacije kakaoa u prahu i uticaja dodatka lipida i komponenata bogatih lipidima (Todorović i sar., 2015).

Što se tiče sadržaja UF, redosled je isti kao i kod sadržaja UP. Najveći sadržaj UF je u uzorcima crne čokolade (prosečni sadržaj 15,9 mg CE/g), a zatim slede uzorci kakaoa u prahu (prosečni sadržaj 5,7 mg GAE/g), mlečne čokolade (prosečni sadržaj 2,2 mg GAE/g) i bele čokolade (prosečni sadržaj 0,8 mg GAE/g).

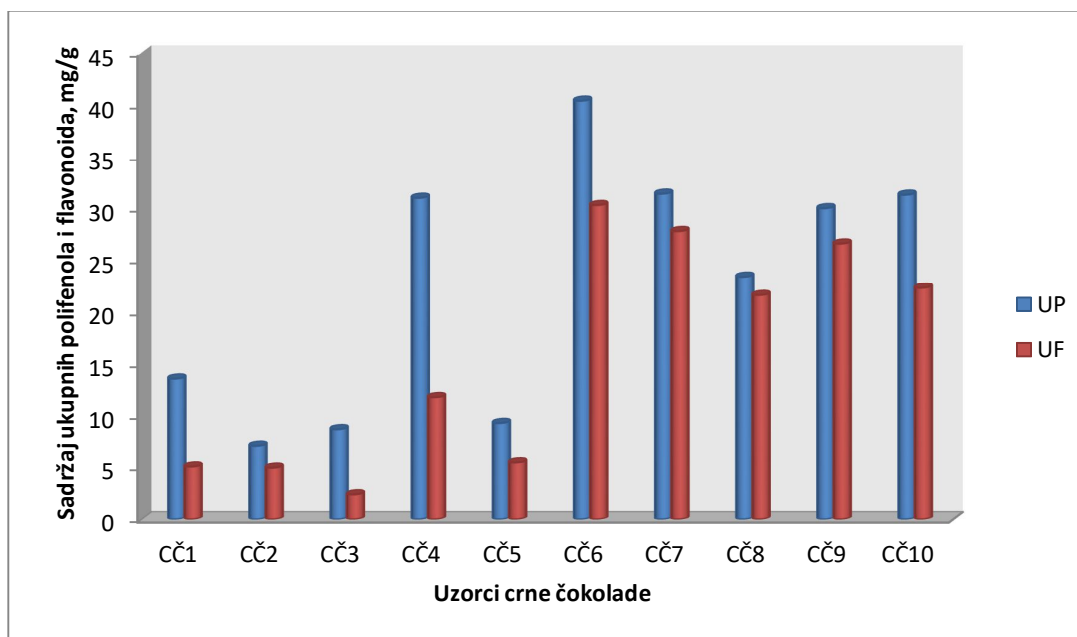
Grafički prikaz sadržaja UP i UF u ispitivanim uzorcima dat je na slikama 5.1. – 5.4.



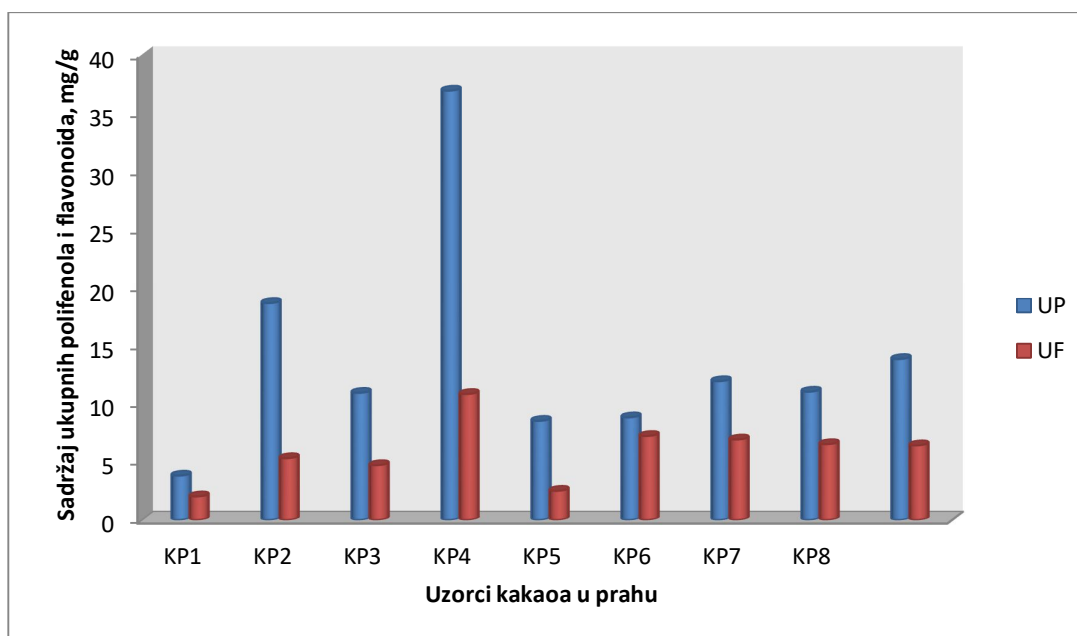
Slika 5.1. Sadržaj UP i UF u ispitivanim uzorcima bele čokolade



Slika 5.2. Sadržaj UP i UF u ispitivanim uzorcima mlečne čokolade



Slika 5.3. Sadržaj UP i UF u ispitivanim uzorcima crne čokolade



**Slika 5.4.** Sadržaj UP i UF u ispitivanim uzorcima kakaou u prahu

Upoređivanjem dobijenih rezultata sa literaturnim podacima (tabela 5.5.), može se zaključiti da su dobijeni rezultati u skladu sa rezultatima drugih autora, izuzev rezultata za sadržaj UP u uzorcima kakaou u prahu, koji pokazuju niži sadržaj UP u odnosu na literaturne podatke. Takođe, dobijeni rezultati za sadržaj UP u uzorcima kakaou u prahu su u skladu sa rezultatima *Todorovića i saradnika* (2015). Različiti sadržaj ukupnih polifenola je posledica različitog geografskog položaja, stepena zrelosti i sorte kakaou zrna (*Oracz i sar.*, 2015a).

**Tabela 5.5.** Poređenje dobijenih rezultata sa literaturnim podacima

Uzorak	UP (mg GAE/g)	UF (mg CE/g)	Referenca
MČ	2,0 - 3,0	1,3 - 1,8	Todorović i sar., 2015
MČ	3,5	1,2	Belščak i sar., 2009
MČ	3,2 - 5,4	-	Miller i sar., 2006
MČ	15,0	-	Vinson i sar., 1999
<b>MČ</b>	<b>1,1 - 5,6</b>	<b>1,1 - 3,7</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>
CČ	7,2 - 12,6	3,3 - 7,1	Todorović i sar., 2015
CČ	7,0 - 11,0	14,0 - 21,0	Belščak i sar., 2009
CČ	11,7 - 14,9	-	Miller i sar., 2006

**Tabela 5.5.** Nastavak

CČ	36,5	-	Vinson. i sar., 1999
<b>CČ</b>	<b>7,1 - 40,4</b>	<b>5,0 - 30,4</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>
KP	33,9 - 36,8	17,3 - 19,4	Todorović i sar., 2015
KP	9,0 - 10,0	15,0 - 17,0	Belščak i sar., 2009
KP	45,0 - 70,0	2,0 - 11,0	Carrillo i sar, 2014
KP	45,3 - 60,2	-	Miller. i sar., 2006
<b>KP</b>	<b>3,8 - 36,9</b>	<b>2,02 - 10,8</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>

### 5.1.2. Ukupni i monomerni antocijani

Rezultati određivanja ukupnih i monomernih antocijana su pokazali prisustvo antocijana samo u dva uzorka kakaoa u prahu (tabela 5.6.). Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta cijanidina-3-*O*-glukozida na 100 g uzorka kakaoa u prahu (mg CGE/100g) i dati kao srednja vrednost tri ponavljanja ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ).

**Tabela 5.6.** Sadržaj ukupnih (UA) i monomernih (MA) antocijana u uzorcima kakaoa u praha

Uzorak	UA $c_{sr} \pm SD$ (mg CGE/100g)	RSD (%)	MA $c_{sr} \pm SD$ (mg CGE/100g)	RSD (%)
KP1	16,86 ± 0,05	0,30	2,48 ± 0,01	0,40
KP4	12,34 ± 0,04	0,32	2,26 ± 0,01	0,44

Sadržaj monomernih i ukupnih antocijana je veći u uzorku KP1.

### 5.1.3. Antioksidativni kapacitet – ABTS, DPPH, FRAP i PFRAP

U zavisnosti od termodinamičkih uslova i reaktivnosti hidroksilnih grupa flavonoida, utvrđeno je da različiti oksidanti mogu da oksiduju flavonoide do različitih proizvoda. Zbog te činjenice, preporučuje se upotreba više testova za procenu antioksidativnog kapaciteta. Antioksidativni kapacitet ispitivanih uzoraka je određen primenom spektrofotometrijskih metoda: ABTS, DPPH, FRAP i PFRAP. Rezultati su dati kao srednja vrednost triju proba ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ) i prikazani su u tabelama 5.7. – 5.10.

ABTS test je veoma fleksibilan i može se koristiti pri različitim pH vrednostima, za razliku od DPPH koji je osetljiv u kiseloj sredini. To je veoma važno prilikom ispitivanja uticaja pH na antioksidativnu aktivnost različitih komponenata, kao i pri ispitivanju kiselih rastvora (*Emand i Sanaa*, 2012; *Ou i sar.*, 2002).

Mehanizam FRAP testa se u potpunosti zasniva na prenosu elektrona. Redoks potencijal kompleksa Fe(III)-TPTZ je sličan potencijalu ABTS<sup>•+</sup> (0,68 V). Iako ABTS i FRAP daju uporedive rezultate, nekada se razlika između rezultata za istu seriju antioksidanata javlja, jer se ABTS test sprovodi u neutralnoj sredini, dok se FRAP test izvodi u kiseloj sredini pri pH 3,6, da bi se održala dobra rastvorljivost gvožđa (*Pulido i sar.*, 2000; *Erel*, 2004).

**Tabela 5.7.** Poređenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka bele čokolade dobijene primenom različitih *in vitro* spektrofotometrijskih testova

Uzorak	DPPH $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	FRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol FE/g}$ )	RSD (%)	PFRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol AAE/g}$ )	RSD (%)
BČ1	0,53 ± 0,04	7,55	2,06 ± 0,06	2,91	64 ± 4	6,25
BČ2	1,02 ± 0,06	5,88	2,49 ± 0,06	2,41	74 ± 1	1,35
BČ3	1,28 ± 0,04	3,12	3,64 ± 0,06	1,65	57 ± 2	3,51
BČ4	0,99 ± 0,06	6,06	4,13 ± 0,06	1,45	58 ± 2	3,45
BČ5	0,80 ± 0,04	5,00	3,88 ± 0,06	1,55	91 ± 3	3,30
BČ6	1,18 ± 0,09	7,63	5,81 ± 0,09	1,55	88 ± 3	3,41
BČ7	0,45 ± 0,02	4,44	2,53 ± 0,09	3,56	23 ± 1	4,35
BČ8	0,73 ± 0,04	5,48	2,86 ± 0,09	3,15	56 ± 3	5,36
BČ9	1,04 ± 0,04	3,85	2,56 ± 0,09	3,52	5,8 ± 0,4	6,90
BČ10	1,50 ± 0,02	1,33	2,50 ± 0,04	1,60	20 ± 1	5,00
BČ11	0,86 ± 0,06	6,98	3,8 ± 0,1	2,90	65 ± 1	1,54

Uzorci bele čokolade nisu pokazali antioksidativnu aktivnost primenom ABTS testa, jer su vrednosti bile niže od granice detekcije metode. Vrednosti antioksidativne aktivnosti u ovim uzorcima prema DPPH radikalu se kreću u granicama od 0,45  $\mu\text{mol TE/g}$  do 1,50  $\mu\text{mol TE/g}$ . Dobijeni rezultati primenom FRAP i PFRAP testa su u intervalu od 2,06  $\mu\text{mol FE/g}$  do 5,81  $\mu\text{mol FE/g}$  i od 5,8  $\mu\text{mol AAE/g}$  do 91  $\mu\text{mol AAE/g}$ .

**Tabela 5.8.** Poređenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka mlečne čokolade primenom različitih *in vitro* spektrofotometrijskih testova

Uzorak	ABTS $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	DPPH $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	FRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol FE/g}$ )	RSD (%)	PFRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol AAE/g}$ )	RSD (%)
MČ1	0,63 ± 0,02	3,17	6,5 ± 0,4	6,15	9,7 ± 0,7	7,22	57 ± 3	5,26
MČ2	1,20 ± 0,02	1,67	11,5 ± 0,3	2,61	27,0 ± 0,4	1,48	118 ± 4	3,39
MČ3	1,42 ± 0,04	2,82	12,6 ± 0,8	6,35	28,5 ± 0,4	1,40	145 ± 3	2,07
MČ4	0,94 ± 0,04	4,25	7,9 ± 0,2	2,53	22,0 ± 0,6	2,73	81 ± 4	4,94
MČ5	1,45 ± 0,04	2,76	13,0 ± 0,6	4,61	30,3 ± 0,4	1,32	147 ± 3	2,04
MČ6	1,36 ± 0,02	1,47	11,7 ± 0,4	3,42	27,1 ± 0,6	2,21	140 ± 3	2,14
MČ7	0,60 ± 0,01	1,67	5,29 ± 0,04	0,76	31,9 ± 0,2	0,63	130 ± 2	1,54
MČ8	0,85 ± 0,04	4,71	7,7 ± 0,4	5,19	13,4 ± 0,3	2,24	70 ± 1	1,43
MČ9	1,04 ± 0,04	3,85	9,0 ± 0,4	4,44	23,9 ± 0,3	1,26	108 ± 1	0,92
MČ10	1,15 ± 0,02	1,74	9,5 ± 0,2	2,10	24,6 ± 0,5	2,03	104 ± 2	1,92
MČ11	0,60 ± 0,01	1,67	5,29 ± 0,02	0,38	13,8 ± 0,1	0,72	62 ± 2	3,22
MČ12	0,67 ± 0,01	1,49	5,33 ± 0,02	0,37	15,2 ± 0,2	1,32	40 ± 1	2,50
MČ13	0,61 ± 0,01	1,64	5,28 ± 0,00	0,00	18,2 ± 0,1	0,55	57 ± 3	5,26
MČ14	0,66 ± 0,01	1,51	5,29 ± 0,02	0,38	13,76 ± 0,03	0,22	57 ± 2	3,51
MČ15	0,54 ± 0,01	1,85	5,30 ± 0,02	0,38	9,4 ± 0,1	1,06	57 ± 2	3,51
MČ16	0,59 ± 0,01	1,69	5,13 ± 0,02	0,39	22,27 ± 0,06	0,27	125 ± 3	2,40
MČ17	0,59 ± 0,01	1,69	5,25 ± 0,00	0,00	23,38 ± 0,04	0,17	143 ± 1	0,70
MČ18	0,60 ± 0,01	1,67	5,32 ± 0,00	0,00	13,9 ± 0,1	0,72	25 ± 2	8,00

**Tabela 5.8.** Nastavak

MČ19	0,61 ± 0,01	1,64	5,15 ± 0,05	0,97	22,24 ± 0,08	0,36	129,1 ± 0,6	0,46
------	-------------	------	-------------	------	--------------	------	-------------	------

**Tabela 5.9.** Poređenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka crne čokolade primenom različitih *in vitro* spektrofotometrijskih testova

Uzorak	ABTS $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	DPPH $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	FRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol FE/g}$ )	RSD (%)	PFRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol AAE/g}$ )	RSD (%)
CČ1	1,51 ± 0,02	1,32	23,8 ± 0,1	0,42	77 ± 1	1,30	195 ± 1	0,51
CČ2	1,55 ± 0,02	1,29	21,4 ± 0,4	1,87	74 ± 1	1,35	292 ± 3	1,03
CČ3	1,64 ± 0,02	1,22	23,0 ± 0,3	1,30	126 ± 2	1,59	435 ± 2	0,46
CČ4	1,63 ± 0,03	1,84	24,8 ± 0,2	0,81	115 ± 2	1,74	496 ± 1	0,20
CČ5	1,71 ± 0,02	1,17	23,3 ± 0,4	1,72	94 ± 1	1,06	326 ± 3	0,92
CČ6	1,11 ± 0,05	4,50	33,7 ± 0,2	0,59	317 ± 1	0,32	253 ± 7	2,8
CČ7	1,11 ± 0,03	2,70	33,8 ± 0,1	0,30	316 ± 1	0,32	94 ± 1	1,06
CČ8	1,06 ± 0,05	4,72	33,8 ± 0,0	0,00	277 ± 2	0,72	229 ± 0	0,00
CČ9	1,08 ± 0,03	2,78	33,0 ± 0,1	0,30	308 ± 1	0,32	258 ± 2	0,77
CČ10	1,09 ± 0,03	2,75	34,0 ± 0,0	0,00	209 ± 1	0,48	170 ± 2	1,2



**Tabela 5.10.** Poređenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka kakaoa u prahu primenom različitih *in vitro* spektrofotometrijskih testova

Uzorak	ABTS $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	DPPH $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)	FRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol FE/g}$ )	RSD (%)	PFRAP $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol AAE/g}$ )	RSD (%)
KP1	$0,99 \pm 0,04$	4,04	$11,7 \pm 0,5$	4,27	$22,5 \pm 0,6$	2,67	$398 \pm 3$	0,75
KP2	$1,33 \pm 0,02$	1,51	$25,4 \pm 0,6$	2,36	$113 \pm 1$	0,88	$479 \pm 2$	0,42
KP3	$1,36 \pm 0,03$	2,21	$22,4 \pm 0,3$	1,34	$78 \pm 1$	1,28	$327 \pm 3$	0,92
KP4	$1,75 \pm 0,02$	1,14	$32,0 \pm 0,3$	0,94	$138 \pm 2$	1,45	$648 \pm 3$	0,46
KP5	$1,31 \pm 0,02$	1,53	$17,0 \pm 0,3$	1,76	$85,4 \pm 0,5$	0,58	$362 \pm 4$	1,10
KP6	$1,12 \pm 0,03$	2,73	$19,8 \pm 0,2$	1,01	$79 \pm 1$	1,27	$287 \pm 3$	1,04
KP7	$1,10 \pm 0,04$	3,64	$23,4 \pm 0,4$	1,71	$97 \pm 2$	2,06	$668 \pm 9$	1,35
KP8	$1,12 \pm 0,01$	0,89	$18,7 \pm 0,3$	1,60	$72 \pm 1$	1,39	$307 \pm 5$	1,63

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka mlečne čokolada prema ABTS radikal katjonu se kreću u granicama od 0,54  $\mu\text{mol TE/g}$  do 1,45  $\mu\text{mol TE/g}$ , dok se prema DPPH radikal u granicama od 5,13  $\mu\text{mol TE/g}$  do 13,0  $\mu\text{mol TE/g}$ . Vrednosti antioksidativne aktivnosti ovih uzoraka, izražene preko redukcionne moći u testovima FRAP i PFRAP, su u intervalu od 9,4  $\mu\text{mol FE/g}$  do 31,9  $\mu\text{mol FE/g}$  i od 25  $\mu\text{mol AAE/g}$  do 147  $\mu\text{mol AAE/g}$ .

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka crne čokolade prema ABTS radikal katjonu se kreću u granicama od 1,06  $\mu\text{mol TE/g}$  do 1,71  $\mu\text{mol TE/g}$ , dok se prema DPPH radikal u granicama od 21,4  $\mu\text{mol TE/g}$  do 34,0  $\mu\text{mol TE/g}$ . Vrednosti antioksidativne aktivnosti ovih uzoraka, izražene preko redukcionne moći u testovima FRAP i PFRAP, su u intervalu od 74  $\mu\text{mol FE/g}$  do 317  $\mu\text{mol FE/g}$  i od 94  $\mu\text{mol AAE/g}$  do 496  $\mu\text{mol AAE/g}$ .

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka kakaou u prahu prema ABTS radikal katjonu se kreću u granicama od 0,99  $\mu\text{mol TE/g}$  do 1,75  $\mu\text{mol TE/g}$ , dok se prema DPPH radikal u granicama od 11,7  $\mu\text{mol TE/g}$  do 32,0  $\mu\text{mol TE/g}$ . Vrednosti antioksidativne aktivnosti ovih uzoraka, izražene preko redukcionne moći u testovima FRAP i PFRAP, su u intervalu od 22,5  $\mu\text{mol FE/g}$  do 138  $\mu\text{mol FE/g}$  i od 287  $\mu\text{mol AAE/g}$  do 668  $\mu\text{mol AAE/g}$ .

Iako ABTS i DPPH test određuju antioksidativnu aktivnost, razlika u rezultatima ovih testova je zbog toga što ABTS radikal katjon redukuju polifenolna jedinjenja tj. kiseonična jedinjenja, dok DPPH radikal redukuju donori vodonika i slobodni radikali. Upravo je to i razlog što su rezultati dobijeni ABTS testom niži od rezultata dobijenih primenom DPPH testa (*Campos i Lissi*, 1997). Do istih zapažanja su došli i drugi autori određivanjem antioksidativne aktivnosti voća i povrća (*Pellegrini i sar.*, 2003; *Zhao i sar.*, 2008). Najveću aktivnost tj. najbolju sposobnost hvatanja ABTS radikal katjona, pokazuju uzorci crne čokolade (1,35  $\mu\text{mol TE/g}$ ) i kakaou u prahu (1,26  $\mu\text{mol TE/g}$ ), a zatim, slede uzorci mlečne čokolade (0,85  $\mu\text{mol TE/g}$ ). Najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala pokazuju uzorci crne čokolade (27,5  $\mu\text{mol TE/g}$ ), a zatim slede uzorci kakaou u prahu (21,3  $\mu\text{mol TE/g}$ ), mlečne čokolade (7,47  $\mu\text{mol TE/g}$ ) i bele čokolade (0,94  $\mu\text{mol TE/g}$ ).

FRAP i PFRAP su testovi koji se zasnivaju na mehanizmu prenosa elektrona i dobijene vrednosti za ova dva testa su veće od vrednosti dobijenih primenom ABTS i DPPH testa. Ukoliko se uporede rezultati dobijeni primenom FRAP testa, antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka opada sledećim redosledom: crna čokolada (191,3  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > kakaou u prahu (85,7  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > mlečna čokolada (20,5  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > bela čokolada (3,3  $\mu\text{mol FE/g}$ ). Kada se uporede rezultati dobijeni primenom PFRAP testa, antioksidativna aktivnost

opada u nizu: kakao u prahu (434,5  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > crna čokolada (274,8  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > mlečna čokolada (94,5  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > bela čokolada (54,7  $\mu\text{mol AAE/g}$ ).

U tabeli 5.11. je prikazano poređenje dobijenih rezultata sa rezultatima drugih autora. Što se tiče PFRAP metode, nema literaturnih podataka. Rezultati dobijeni primenom DPPH metode uglavnom su u skladu sa rezultatima drugih autora, izuzev rezultata *Todorovića i saradnika* (2015). Rezultati za FRAP metodu su, takođe, u skladu sa literaturnim podacima.

**Tabela 5.11.** Poređenje antioksidativnog kapaciteta ispitivanih uzoraka sa literaturnim podacima

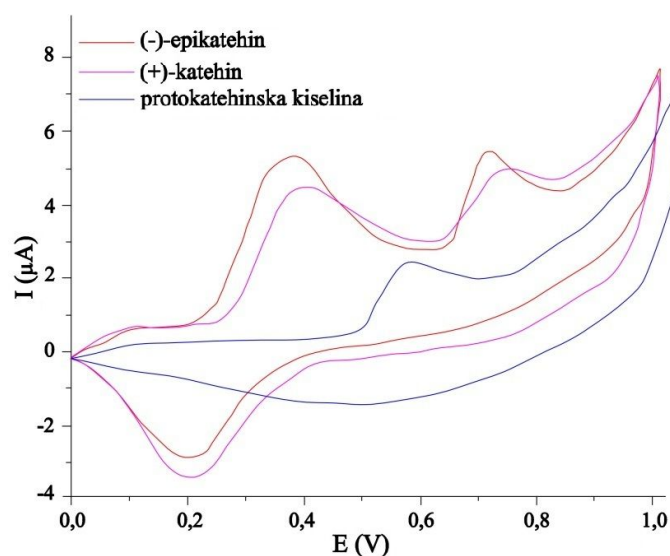
Uzorak	ABTS $\mu\text{mol TE/g}$	DPPH $\mu\text{mol TE/g}$	FRAP $\mu\text{mol FE/g}$	Referenca
MČ	14,7 - 24,2	12 - 14,9	31,8 - 53,0	Todorović i sar., 2015
MČ	4,9	8,5	3,3	Belščak i sar., 2009
MČ	27,1 - 42,7	17,3	61,5 - 84,3	Hii i sar., 2009
MČ	-	10,2	-	Hu i sar., 2016
<b>MČ</b>	<b>0,5 - 1,5</b>	<b>5,13 - 13,0</b>	<b>9,4 - 31,9</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>
CČ	63 - 92,2	54,7 - 90,9	130,3 - 151,4	Todorović i sar., 2015
CČ	11,4 - 11,8	10,3 - 11,4	10,3 - 17,0	Belščak i sar., 2009
CČ	78,8	17,1	149,9	Hii i sar., 2009
<b>CČ</b>	<b>1,1 - 1,7</b>	<b>21,4 - 34,0</b>	<b>74,0 - 317,0</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>
KP	241,1 - 252,3	236,5 - 242,3	434,3 - 439,4	Todorović i sar., 2015
KP	18,1 - 18,2	9,5 - 11,6	14,6 - 17,1	Belščak i sar., 2009
KP	22,3 - 42,4	13,2	51,8 - 71,8	Hii i sar., 2009
<b>KP</b>	<b>1,0 - 1,8</b>	<b>11,7 - 32,0</b>	<b>22,5 - 138,0</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>

## 5.2. Antioksidativni kapacitet – ciklična voltometrija

Pored spektrofotometrijskih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćena je i elektrohemijska metoda. Prednost ciklične voltetrije (CV) je ta, što je ona veoma brza, jednostavna, i jeftina elektrohemijska metoda. Takođe, ova metoda se uspešno koristi za određivanje antioksidativnog kapaciteta krvne plazme, kao i za određivanje aktivnosti antioksidanata u biljnim uljima, mleku, sokovima i vinu i pokazala je dobru korelaciju sa identifikovanim i kvantifikovanim polifenolnim jedinjenjima (*Jara-Palacios i sar.*, 2017).

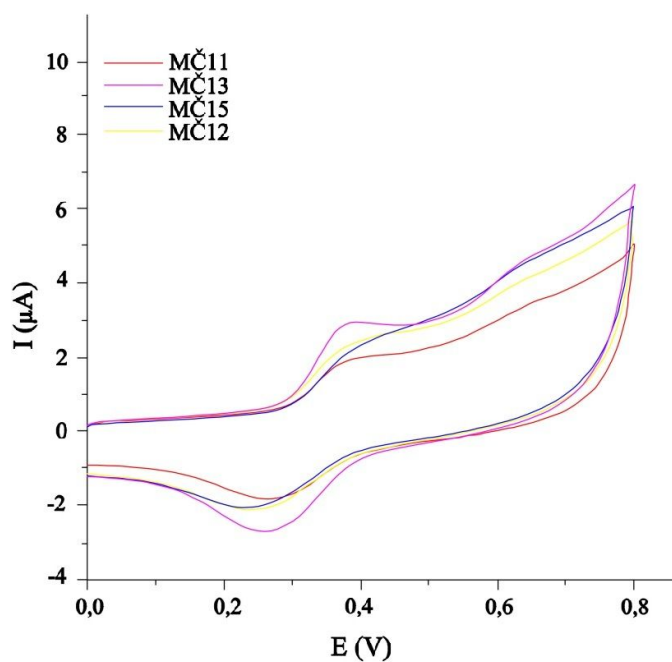
U cilju ispitivanja što većeg broja polifenolnih jedinjenja, koja pokazuju antioksidativnu aktivnost, ciklični voltamogrami su snimljeni u intervalu potencijala oksidacije od 0 mV do 800 mV i u acetatnom puferu (pH = 4). Brzina snimanja je bila 100 mV/s.

Takođe su snimljeni i ciklični voltamogrami (+)-katehina i (-)-epikatehina u acetatnom puferu (pH = 4) i isti su prikazani na slici 5.5. (+)-Katehin i (-)-epikatehin imaju slične anodne talase sa dva anodna pika na potencijalu oko 390 mV i oko 700 mV. Ova dva oksidaciona pika su povezana sa oksidacionim centrima u molekulima (*Martinez i sar.*, 2005; *Janeiro i Oliveira-Brett*, 2004). Anodni pik, koji se javlja na nižem potencijalu, odgovara oksidaciji katehol grupe prstena B. Pri višem potencijalu se javlja anodni pik, koji odgovara oksidaciji rezorcinol grupe prstena A. *Martinez i saradnici* (2005) su pokazali da se spontano deprotonovanje katehin-tip flavonoida ne dešava pri vrednostima pH nižim od 6, što znači da neutralni molekuli ovog tipa flavonoida učestvuju u elektrohemijskim procesima oksidacije i adsorpcije do pH = 6. Autori pretpostavljaju da se adsorpcija elektrona ili vodonika dešava pri većim pH vrednostima (oko fiziološke vrednosti pH). Što se tiče redukcionog talasa, (+)-katehin i (-)-epikatehin pokazuju jedan katodni pik na potencijalu oko 200 mV. Ovaj katodni pik odgovara redukciji proizvoda nastalog oksidacijom katehol grupe, dok proizvod nastao oksidacijom rezorcinol grupe ne podleže redukciji. Protokatehinska kiselina ima jedan anodni pik na potencijalu oko 580 mV, a nema redukcionni pik, što ukazuje na to da proizvod oksidacije ove kiseline odmah reaguje sa vodom i nestaje (*Chen i sar.*, 2002).

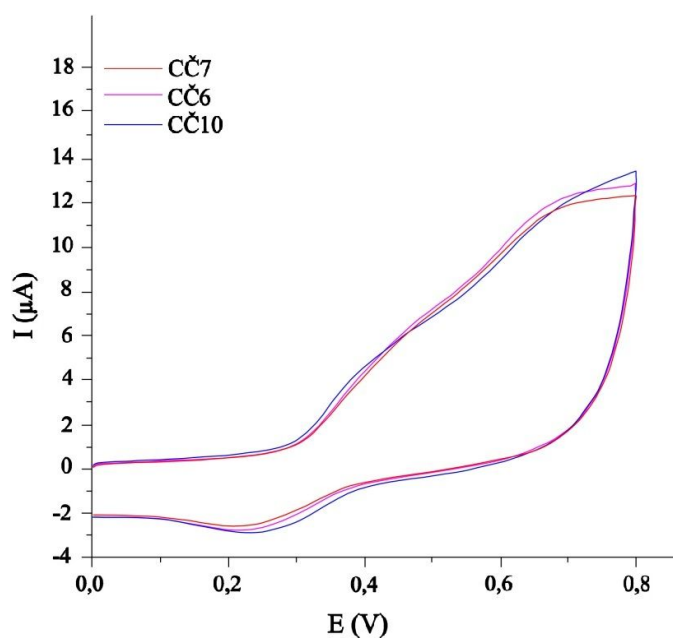


**Slika 5.5.** Ciklični voltamogrami standarda (+)-katehina, (-)-epikatehina i protokatehinske kiseline ( $c = 10^{-5}$  mol/l) u acetatnom puferu, pH = 4

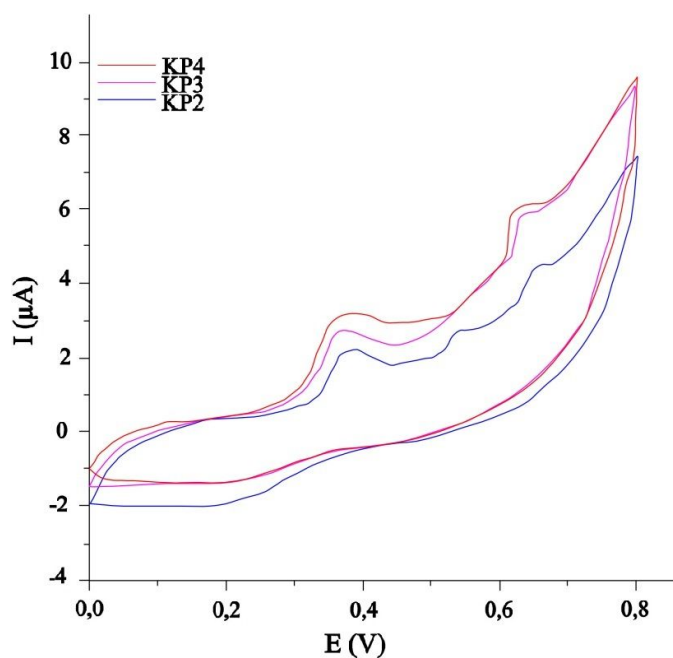
Ciklični voltamogrami uzoraka mlečne, crne čokolade i kakaou u prahu su prikazani na slikama 5.6. – 5.8. Uzorci bele čokolade su dali male vrednosti struje bez izraženih pikova i njihovi voltamogrami nisu prikazani.



**Slika 5.6.** Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka mlečne čokolade



Slika 5.7. Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka crne čokolade



Slika 5.8. Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka kakaou u prahu

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka čokolade i kakaou u prahu se može koristiti nekoliko parametara kao što su: intenzitet struje (I), elektrođni potencijal (E) i

površina ispod anodnog pika (Q) (Ristivojević, 2014). S obzirom na to da su ispitivani uzorci pokazali najveći anodni pik na potencijalu od 600 mV, promenljiva Q je imenovana kao Q<sub>600</sub>. U tabelama 5.12. – 5.15. su date vrednosti potencijala anodnog pika (E<sub>pa</sub>) i intenziteta struje anodnog pika (I<sub>pa</sub>) svih anodnih pikova, koji su određeni iz cikličnih voltamograma za ispitivane uzorke. Za izračunavanje antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) (Piljac-Žegarac i sar., 2010) korišćena je sledeća jednačina:

$$ACI = Q_{600}/Q_{600max} \times 100 \quad (5.1)$$

**Tabela 5.12.** Vrednosti potencijala i struje anodnog pika dobijene sa cikličnih voltamograma uzoraka bele čokolade

Uzorak	E <sub>pa</sub> (V)			I <sub>pa</sub> (μA)			Q <sub>600</sub> (μC)	ACI (%)
	1	2	3	1	2	3		
BČ1	0,47	-	0,69	1,19	-	1,54	0,018	2,0
BČ2	-	0,54	-	-	2,57	-	0,073	11,0
BČ3	-	-	0,65	-	-	2,34	0,023	4,0
BČ4	-	0,57	-	-	2,63	-	0,105	16,0
BČ5	-	0,56	0,66	-	1,54	2,05	0,029	5,0
BČ6	-	0,55	0,66	-	1,54	2,05	0,029	5,0
BČ7	0,46	-	0,65	1,80	-	2,94	0,010	2,0
BČ8	0,46	-	-	1,52	-	-	0,001	0,0
BČ9	0,46	-	0,65	1,09	-	1,52	0,011	2,0
BČ10	0,46	-	0,65	1,08	-	1,48	0,016	2,0
BČ11	-	-	0,65	-	-	2,34	0,023	4,0

**Tabela 5.13.** Vrednosti potencijala i struje anodnog pika dobijene sa cikličnih voltamograma uzoraka mlečne čokolade

Uzorak	E <sub>pa</sub> (V)			I <sub>pa</sub> (μA)			Q <sub>600</sub> (μC)	ACI (%)
	1	2	3	1	2	3		
MČ1	0,38	-	-	2,27	-	-	0,001	0,2
MČ2	0,38	0,56	0,68	1,26	3,30	4,05	0,047	7,3
MČ3	0,40	-	0,64	1,37	-	3,73	0,088	13,7
MČ4	0,40	-	-	1,78	-	-	0,021	3,3
MČ5	0,38	-	0,65	1,59	-	4,14	0,090	14,0
MČ6	0,40	-	0,64	1,57	-	4,80	0,052	8,1
MČ7	0,36	0,44	0,65	2,33	2,83	4,65	0,336	54,2

**Tabela 5.13.** Nastavak

MČ8	0,39	0,58	-	1,09	1,76	-	0,001	0,2
MČ9	0,37	0,54	-	1,00	2,42	-	0,042	6,5
MČ10	0,37	0,56	0,67	1,31	3,65	5,04	0,035	18,4
MČ11	0,35	1,88	0,43	2,27	0,64	3,67	0,268	1,1
MČ12	0,37	0,44	0,65	2,86	2,42	4,53	0,402	64,8
MČ13	0,34	0,42	0,64	3,17	2,63	5,01	0,620	100,0
MČ14	0,36	0,44	0,64	2,57	1,83	3,87	0,437	70,5
MČ15	0,37	0,45	0,64	2,99	2,19	4,95	0,310	50,0
MČ16	0,37	0,43	0,64	2,75	2,27	4,22	0,370	59,7
MČ17	0,38	0,44	0,65	2,78	2,29	4,32	0,329	53,1
MČ18	0,37	0,44	0,63	2,72	2,05	3,93	0,410	66,1
MČ19	0,37	0,45	0,64	3,28	2,59	4,88	0,560	90,3

**Tabela 5.14.** Vrednosti potencijala i struje anodnog pika dobijene sa cikličnih voltamograma uzoraka crne čokolade

Uzorak	E <sub>pa</sub> (V)			I <sub>pa</sub> (μA)			Q <sub>600</sub> (μC)	ACI
	1	2	3	1	2	3		
CČ1	0,38	0,55	0,68	2,05	5,05	7,00	0,207	32,2
CČ2	0,37	-	0,68	2,01	-	-	0,075	11,7
CČ3	0,38	-	0,66	1,59	-	4,31	0,080	12,4
CČ4	0,38	-	-	2,76	-	-	0,381	59,3
CČ5	0,39	-	0,69	2,94	-	8,80	0,124	19,3
CČ6	0,38	0,47	0,67	3,38	6,59	11,80	4,21	100,0
CČ7	0,37	-	0,67	3,18	-	11,45	4,14	98,3
CČ8	0,37	0,46	0,66	3,33	6,52	12,31	4,05	96,2
CČ9	0,39	-	0,68	3,29	-	10,99	2,89	68,6
CČ10	0,38	-	0,66	3,86	-	11,34	2,63	62,5



**Tabela 5.15.** Vrednosti potencijala i struje anodnog pika dobijene sa cikličnih voltamograma uzoraka kakaou u pahu

Uzorak	E <sub>pa</sub> (V)			I <sub>pa</sub> (μA)			Q <sub>600</sub> (μC)	ACI
	1	2	3	1	2	3		
KP1	0,38	-	-	2,89	-	-	0,262	40,7
KP2	0,36	-	0,67	3,00	-	11,26	0,558	86,8
KP3	0,37	0,55	0,67	3,00	6,57	10,01	0,365	56,8
KP4	0,37	-	0,69	3,58	-	12,64	0,643	100,0
KP5	0,37	-	0,68	1,19	-	8,70	0,281	43,7
KP6	0,37	-	0,68	3,19	-	10,04	2,170	51,5
KP7	0,36	-	0,67	2,64	-	10,01	2,091	49,6
KP8	0,36	-	0,67	2,85	-	10,04	2,680	64,7

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da se prvi pik javlja u opsegu potencijala od 370 mV do 460 mV i odgovara oksidaciji katehin-tip flavonoida. Ovi flavonoidi sadrže lako oksidujuću *o*-difetil grupu na B prstenu (*Kilmartin i sar.*, 2001; *Kilmartin i sar.*, 2002; *Gunckel i sar.*, 1998). Vrednosti date u tabelama 5.12. – 5.15. su u skladu sa literaturnim podacima, koji govore o uticaju pH na promenu potencijala i to za 59 mV po jedinici pH. Sa porastom pH, potencijal anodnog pika se pomera prema manje pozitivnim vrednostima. Istraživanja koja su vršena u intervalu pH od 3 do 7, potvrdila su promenu potencijala za 56 mV po jedinici pH za katehin (*Gunckel i sar.*, 1998; *Born i sar.*, 1996). Drugi anodni pik, koji se javlja na potencijalu oko 560 mV, odgovara oksidaciji monofenol grupe ili *m*-difenola na A prstenu fenolnih kiselina kao što su ferulna, vanilinska, protokatehinska, *p*-kumarna i sinapinska kiselina (*Kilmartin*, 2001; *Kilmartin i sar.*, 2001; *Kilmartin i sar.*, 2002). Treći anodni pik, koji se javlja na potencijalu oko 670 mV, odgovara sekundarnoj oksidaciji katehin-tip flavonoida, koji su u ispitivanim uzorcima prisutni u visokim koncentracijama. Za razliku od katehin-tip flavonoida, procijanidini B1, B2, B3 i B4 nisu pokazali nijedan anodni talas. Ovo je verovatno posledica prisustva velikog broja fenolnih grupa, koje se nalaze u različitim položajima (*Lunte i sar.*, 1988).

*Kilmartin i Hsu* (2003) su u svojim istraživanjima došli do zaključka da se fenolna jedinjenja mogu klasifikovati prema redukcionoj moći (bolji redukcionim agensima imaju veću antioksidativnu aktivnost), koja opada sledećim redom: jedinjenja koja sadrže tri hidroksilne grupe na B prstenu flavonoida > jedinjenja koja sadrže katehol ili galat grupu > jedinjenja koja sadrže jednu hidroksilnu grupu ili *m*-dihidroksifenol grupu. Antioksidativna aktivnost

ispitivanih uzoraka čokolade i kakaou u prahu, se može pripisati uglavnom jedinjenjima koja sadrže katehol ili galat grupu.

Određivanje površine ispod anodnog pika na 600 mV,  $Q_{600}$ , je korišćeno kao kvantitativna mera prisutnosti antioksidanata u ispitivanim uzorcima. U slučaju širih pikova i preklapanja pikova, može da se koristi i vrednost anodne struje (*Kilmartin i sar.*, 2001; *Chevion i sar.*, 2000). Vrednosti  $Q_{600}$  ( $\mu\text{C}$ ) analiziranih uzoraka su date u tabelama 5.12. – 5.15. Uzorci kakaou u prahu imaju najveće vrednosti  $Q_{600}$  i to u opsegu 0,262 – 2,680  $\mu\text{C}$ , nakon čega slede uzorci crne čokolade 0,075 – 4,21  $\mu\text{C}$ , mlečne čokolade 0,001 – 0,620  $\mu\text{C}$  i bele čokolade 0,001 – 0,105  $\mu\text{C}$ . Najveće vrednosti  $Q_{600}$  imaju uzorci crne čokolade CČ6, CČ7 i CČ8 (~4), kao i uzorci kakaou u prahu KP6, KP7 i KP8 (~2), dok najmanje vrednosti imaju uzorci mlečne čokolade MČ1 i MČ8 (0,001) i uzorak bele čokolade BČ8 (0,001). Najveće ACI vrednosti (100) imaju uzorci MČ13, CČ6 i KP4.

Rezultati dobijeni primenom CV su generalno u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola i flavonoida i sa antioksidativnom aktivnošću primenom spektrofotometrijskih testova DPPH, ABTS, FRAP i PFRAP.

Pojedinačni antioksidanti imaju različit doprinos ukupnom antioksidativnom kapacitetu, stoga pojedinačni testovi ne mogu da pruže pravu sliku o izvoru radikala ili antioksidanata u ispitivanim uzorcima. Shodno tome, neki autori preporučuju izračunavanje antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) (*Seeram i sar.*, 2008; *Piljac-Žegarac i sar.*, 2010). Vrednosti ACI su izračunate prema sledećoj jednačini:

$$ACI = \frac{(ABTS_{\text{indeks}} + DPPH_{\text{indeks}} + FRAP_{\text{indeks}} + PFRAP_{\text{indeks}} + Q_{600} \text{ indeks})}{5} \quad (5.2)$$

ACI vrednosti, kao i vrednosti  $ABTS_{\text{indeks}}$ ,  $DPPH_{\text{indeks}}$ ,  $FRAP_{\text{indeks}}$ ,  $PFRAP_{\text{indeks}}$ , su izražene u procentima i prikazane su u tabeli 5.16. Vrednosti  $ABTS_{\text{indeks}}$  su date kao količnik dobijene vrednosti za dati uzorak i najveće dobijene vrednosti tog testa, izraženog u procentima. Tako su izračunate i indeks vrednosti ostalih testova. Najveće ACI vrednosti pokazuju uzorci crne čokolade CČ6, CČ7, CČ8 i CČ9, što je u skladu sa ukupnim sadržajem polifenola i flavonoida. Od uzoraka kakaou u prahu se izdvaja KP4, a od mlečnih MČ5, što je takođe u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola i flavonoida. Što se tiče uzoraka mlečne čokolade, ACI vrednosti su manje od 5%.

**Tabela 5.16.** Antioksidativni kompozitni indeksi ispitivanih uzoraka

Uzorak	ABTS indeks	DPPH indeks	FRAP indeks	PFRAP indeks	Q <sub>600</sub> indeks	ACI
BČ1	0,00	1,56	0,65	9,58	0,43	2,44
BČ2	0,00	3,00	0,79	11,08	1,73	3,32
BČ3	0,00	3,76	1,15	8,53	0,55	2,80
BČ4	0,00	2,91	1,30	8,68	2,49	3,08
BČ5	0,00	2,35	1,22	13,62	0,69	3,58
BČ6	0,00	3,47	1,83	13,17	0,69	3,83
BČ7	0,00	1,32	0,80	3,44	0,24	1,16
BČ8	0,00	2,15	0,90	8,38	0,02	2,29
BČ9	0,00	3,06	0,81	0,87	0,26	1,00
BČ10	0,00	4,41	0,79	2,99	0,38	1,71
BČ11	0,00	2,53	1,20	9,73	0,55	2,80
MČ1	36,00	19,12	3,06	8,53	0,02	13,35
MČ2	68,57	33,82	8,52	17,66	1,12	25,94
MČ3	81,14	37,06	8,99	21,71	2,09	30,20
MČ4	53,71	23,24	6,94	12,13	0,50	19,30
MČ5	82,86	38,24	9,56	22,01	2,14	30,96
MČ6	77,71	34,41	8,55	20,96	1,23	28,57
MČ7	34,29	15,56	10,06	19,46	7,98	17,47
MČ8	48,57	22,65	4,23	10,48	0,02	17,19
MČ9	59,43	26,47	7,54	16,17	1,00	22,12
MČ10	65,71	27,94	7,76	15,57	0,83	23,56
MČ11	34,29	15,56	4,35	9,28	6,37	13,97
MČ12	38,29	15,68	4,79	5,99	9,55	14,86
MČ13	34,86	15,53	5,74	8,53	14,73	15,88
MČ14	37,71	15,56	4,34	8,53	10,38	15,30
MČ15	30,86	15,59	2,97	8,53	7,36	13,06
MČ16	33,71	15,09	7,03	18,71	8,79	16,67
MČ17	16,57	15,44	7,38	21,41	7,81	13,72
MČ18	34,29	15,65	4,38	3,74	9,74	13,56
MČ19	34,86	15,15	7,02	19,33	13,30	17,93
CČ1	86,29	70,00	24,29	29,19	4,92	42,94
CČ2	88,57	62,94	23,34	43,71	1,78	44,07
CČ3	93,71	67,65	39,75	65,12	1,90	53,63
CČ4	93,14	72,94	36,28	74,25	9,05	57,13
CČ5	97,71	68,53	29,65	48,80	2,94	49,53
CČ6	63,43	99,12	100,00	37,87	100	80,08
CČ7	63,43	99,41	99,68	14,07	98,34	74,99
CČ8	60,57	99,41	87,38	34,28	96,20	75,57

Tabela 5.16. Nastavak

CČ9	61,71	97,06	97,16	38,62	68,65	72,64
CČ10	62,29	100,00	65,93	25,45	62,47	63,23
KP1	56,57	34,41	7,10	59,58	6,22	32,78
KP2	76,00	74,71	35,65	71,71	13,25	54,26
KP3	77,71	65,88	24,61	48,95	8,67	45,16
KP4	100,00	94,12	43,53	97,01	15,27	69,98
KP5	74,86	50,00	26,94	54,19	6,67	42,53
KP6	64,00	58,24	24,92	42,96	51,54	48,33
KP7	62,86	68,82	30,60	100,00	49,67	62,39
KP8	64,00	55,00	22,71	45,96	63,66	50,26

Pirsonova korelaciona analiza između primenjenih metoda za antioksidativnu aktivnost pokazala je dobru korelaciju između ABTS i DPPH metode ( $R^2 = 0,7830$ ). Ovakva korelacija je i očekivana, s obzirom na slične mehanizme prenosa elektrona kako u neutralnoj, tako i u slabo kiselj sredini. FRAP metoda je pokazala bolju korelaciju sa DPPH ( $R^2 = 0,8921$ ) nego sa ABTS ( $R^2 = 0,4893$ ). Ovo je u skladu sa činjenicom da se reakcija redukcije kompleksa  $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  do kompleksa  $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  odvija u kiselj sredini (pH = 3,6), dok se kod ABTS metode transfer elektrona odvija u neutralj sredini.

PFRAP metoda je pokazala dobru i skoro podjednaku korelaciju sa ABTS ( $R^2 = 0,6814$ ) i DPPH metodom ( $R^2 = 0,6904$ ). Metoda ciklične voltametrije je pokazala dobru korelaciju sa FRAP ( $R^2 = 0,8688$ ) i DPPH metodom ( $R^2 = 0,7085$ ), što je posledica primene ovih metoda u kiselj sredini.

Sadržaj ukupnih polifenola dobro korelira sa svim spektrofotometrijskim metodama primenjenih za određivanje antioksidativne aktivnosti, kao i sa cikličnom voltametrijom. Najbolja korelacija je sa FRAP ( $R^2 = 0,9021$ ), a zatim slede DPPH ( $R^2 = 0,8939$ ), CV ( $R^2 = 0,7348$ ), PFRAP ( $R^2 = 0,5714$ ) i ABTS ( $R^2 = 0,5549$ ) metodom. Visok stepen korelacije potvrđuje vezu između koncentracije polifenolnih jedinjenja u uzorcima čokolade i kakaou u prahu, i njihove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i redukcione sposobnosti gvožđa.

**Tabela 5.17.** Matrica Pirsonovih koeficijenata korelacije ( $p < 0,05$ )

	ABTS	DPPH	FRAP	PFRAP	CV	UP	UF
ABTS	1,0000	<b>0,7830</b>	0,4893	<b>0,6814</b>	0,2523	<b>0,5549</b>	0,3852
DPPH		1,0000	<b>0,8921</b>	<b>0,6904</b>	<b>0,7085</b>	<b>0,8939</b>	<b>0,81900</b>
FRAP			1,0000	0,4335	<b>0,8688</b>	<b>0,9021</b>	<b>0,9642</b>
PFRAP				1,0000	0,2582	<b>0,5714</b>	0,2996
CV					1,0000	<b>0,7348</b>	<b>0,8923</b>
UP						1,0000	<b>0,9044</b>
UF							1,0000

Bolje razumevanje veze između antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka, dobijenih primenom različiti testova, kao i sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida, može se uočiti korišćenjem analize glavnih komponenata (PCA). U tu svrhu je formirana matrica podataka dimenzije  $7 \times 48$ . U kolonama (7) su bili rezultati za antioksidativnu aktivnost, sadržaj ukupih polifenola i flavonoida, a u redovima su bili uzorci čokolade i kakaou u prahu (48). Sve varijable su standardizovane. Na osnovu *Cattel*-ovog skri (*scree*) testa koji kao kriterijum daje tačku preloma, određen je broj optimalnih parametra, koji se nalaze pre ove prelomne tačke. Prema *Kaiser*-ovom (*Kaiser*, 1960) kriterijumu (Eigen vrednost  $> 1$ ), ekstrahovane su dve glavne komponente (PC). Ove vrednosti za PC1 i PC2 su 5,121 i 1,534, i ove dve komponente zajedno objašnjavaju oko 83% ukupnih varijabli.

U tabeli 5.18. su prikazani izračunati koeficijenti opterećenja po glavnim osama za svaku analiziranu komponentu. PC1 objašnjava 64,0%, a PC2 19,2% ukupnih varijabli. Negativno opterećenje PC1 pokazuju uzorci bele čokolade (oko -2), dok pozitivno opterećenje PC1 pokazuju uzorci crne čokolade CČ6 (5,980), CČ7 (5,201), CČ8 (4,548), CČ9 (4,895), CČ10 (4,046), i KP4 (4,089). Izuzetno visoko negativno opterećenje PC2 pokazuju uzorci CČ6 (-2,240), CČ7 (-2,602), CČ8 (-1,827), CČ9 (-1,658), CČ10 (-1,447), a pozitivno opterećenje PC2 pokazuju uzorci CČ2, CČ3, CČ4 i CČ5 (sledećim redom 0,992; 1,493; 1,208; 1,138) i kakaou u prahu KP1 i KP4 (4,249 i 4,059).

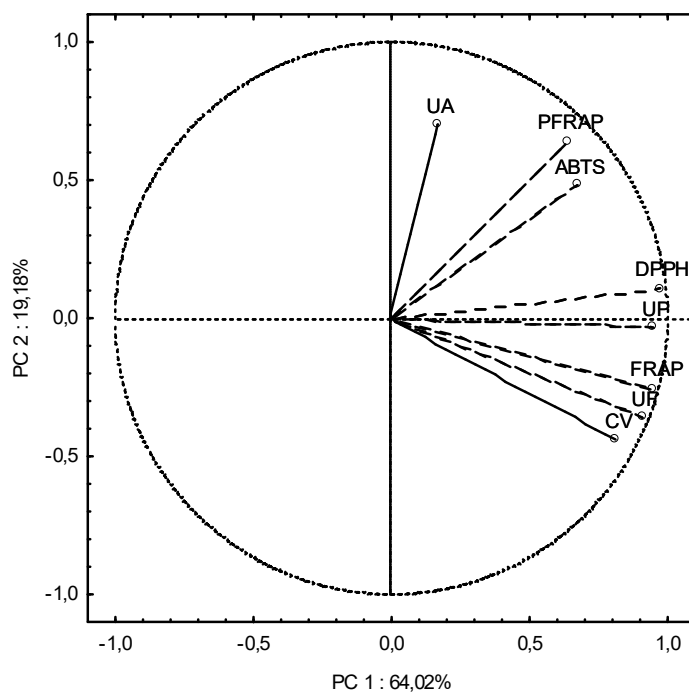
**Tabela 5.18.** Koeficijenti opterećenja analiziranih komponenti ispitivanjem antioksidativne aktivnosti u odnosu na dve ose glavnih komponenti

Uzorak	PC1 <sup>a</sup>	PC2 <sup>a</sup>	Test	PC1 <sup>a</sup>	PC2 <sup>a</sup>
BČ1	-2,060	-0,650	UP	0,948	-0,035
BČ2	-2,132	-0,573	UF	-0,908	-0,360
BČ3	-2,155	-0,616	ABTS	0,673	0,481
BČ4	-2,161	-0,636	DPPH	0,972	0,109
BČ5	-2,116	-0,517	FRAP	0,950	-0,253
BČ6	-2,102	-0,520	PFRAP	0,639	0,642
BČ7	-2,130	-0,774	CV	0,812	-0,439
BČ8	-2,211	-0,609			
BČ9	-2,279	-0,773			
BČ10	-2,137	-0,772			
BČ11	-2,061	-0,641			
MČ1	-1,453	-0,197			
MČ2	-0,634	0,324			
MČ3	-0,373	0,539			
MČ4	-1,055	0,026			
MČ5	-0,273	0,547			
MČ6	-0,500	0,497			
MČ7	-1,097	-0,168			
MČ8	-1,223	-0,020			
MČ9	-0,903	0,186			
MČ10	-0,786	0,236			
MČ11	-1,442	-0,280			
MČ12	-1,381	-0,353			
MČ13	-1,308	-0,418			
MČ14	-1,403	-0,305			
MČ15	-1,557	-0,333			
MČ16	-1,152	-0,186			
MČ17	-1,247	-0,336			
MČ18	-1,493	-0,442			
MČ19	-1,079	-0,223			
CČ1	0,911	0,606			
CČ2	0,692	0,992			
CČ3	1,229	1,493			
CČ4	2,814	1,208			
CČ5	1,135	1,138			
CČ6	5,980	-2,240			

**Tabela 5.18.** Nastavak

CČ7	5,201	-2,602
CČ8	4,548	-1,827
CČ9	4,895	-1,658
CČ10	4,046	-1,447
KP1	0,141	4,249
KP2	1,860	1,186
KP3	0,933	0,884
KP4	4,089	4,059
KP5	0,558	1,017
KP6	1,250	-0,073
KP7	2,208	1,140
KP8	1,414	-0,135
Eigen vrednost <sup>b</sup>	5,121	1,534
Varijabilitet (%)	64,016	19,176
Kumulativna vrednost	5,121	6,655
Ukupni varijabilitet (%)	64,016	93,192

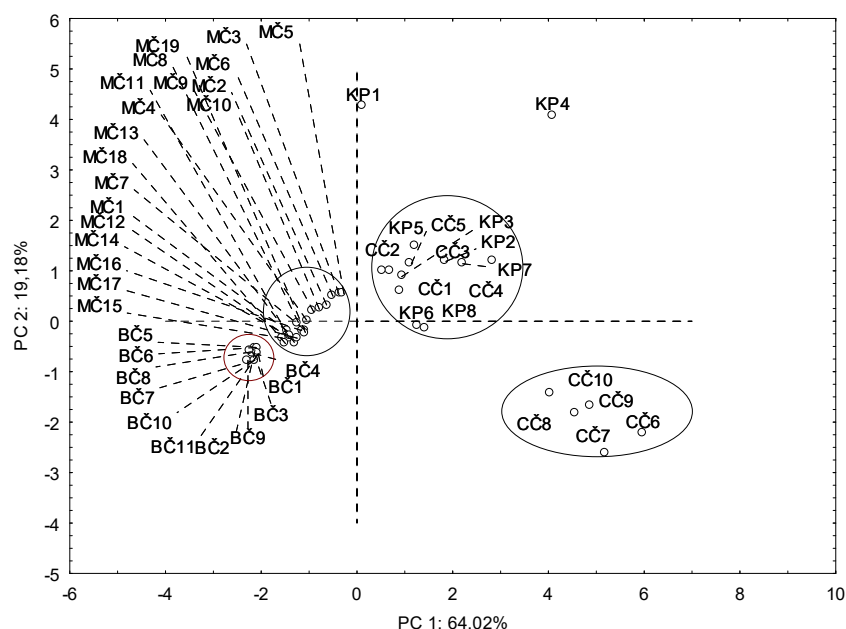
<sup>a</sup>PC – glavna komponenta; <sup>b</sup>Eigen vrednost – svoјstvena vrednost faktora



**Slika 5.9.** PCA dijagram sadržaja ukupnih polifenola (UP), flavonoida (UF), antocijana (UA) i antioksidativne aktivnosti primenom spektrofotometrijskih testova (ABTS, DPPH, FRAP, PFRAP i CV)

Na osnovu PCA analize (slika 5.9.) može se zaključiti da se primenjene metode za određivanje antioksidativne aktivnosti mogu klasifikovati u dve grupe. Prvu grupu čine ABTS, DPPH i PFRAP metoda što je i očekivano na osnovu sličnih mehanizama. Ovoj grupi pripada i metoda za određivanje ukupnih antocijana (UA). Iako se na osnovu mehanizma očekuje da je u ovoj grupi i FRAP metoda, često rezultati FRAP metode pokazuju slabu korelaciju sa drugim antioksidativnim metodama (*Prior i sar.*, 2005). FRAP metoda se zajedno sa CV metodom nalazi u drugoj grupi, kojoj pripadaju i metode za određivanje ukupnih polifenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF).

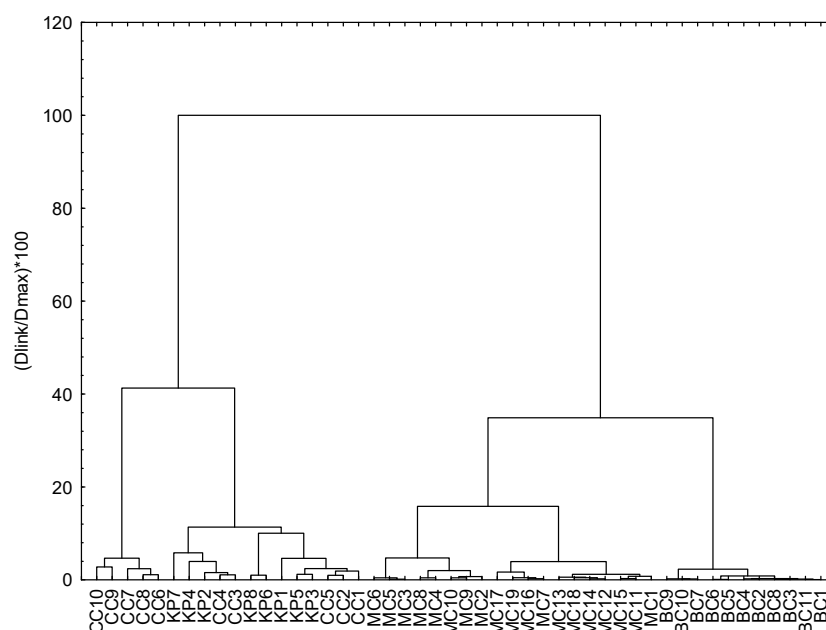




**Slika 5.10.** PCA dijagram uzoraka dobijen na osnovu rezultata ispitivanja antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana

Na osnovu dobijenog PCA dijagrama (slika 5.10.), mogu se izdvojiti četiri grupe uzoraka. Prvu grupu čine uzorci bele čokolade sa negativnim vrednostima prvog i drugog faktora. Drugu grupu čine uzorci mlečne čokolade sa negativnim vrednostima prvog faktora i vrednostima drugog faktora oko nule ili sa malim pozitivnim vrednostima. Treću grupu čine uzorci crne čokolade i kakaou u prahu sa pozitivnim vrednostima prvog i drugog faktora. Uzorci kakaou u prahu KP1 i KP4 ne pripadaju ovoj grupi, što je i očekivano jer se izdvajaju po sadržaju ukupnih antocijana. Četvrtu grupu čine uzorci crne čokolade CC6, CC7, CC8, CC9 i CC10 sa pozitivnim vrednostima prvog i negativnim vrednostima drugog faktora. Ova grupa se izdvaja zbog visokog sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida.

Primenom klaster analize dobija se slična klasifikacija uzoraka kao i primenom PCA analize. Primenom *Ward-ove* metode i *Euclid-ove* udaljenosti, kao procene stepena različitosti grupa, na osnovu rastojanja  $D_{link}/D_{max} < 50$ , dobijena su dva klastera (slika 5.11.). Prvi klaster se sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su se grupisali uzorci bele čokolade, a u drugom potklasteru su uzorci mlečne čokolade. Drugi klaster se sastoji, takođe, od dva potklastera. U jednom potklasteru su uzorci crne čokolade i kakaou u prahu, a u drugom potklasteru su se izdvojili uzorci crne čokolade sa visokim sadržajem ukupnih polifenola i flavonoida.

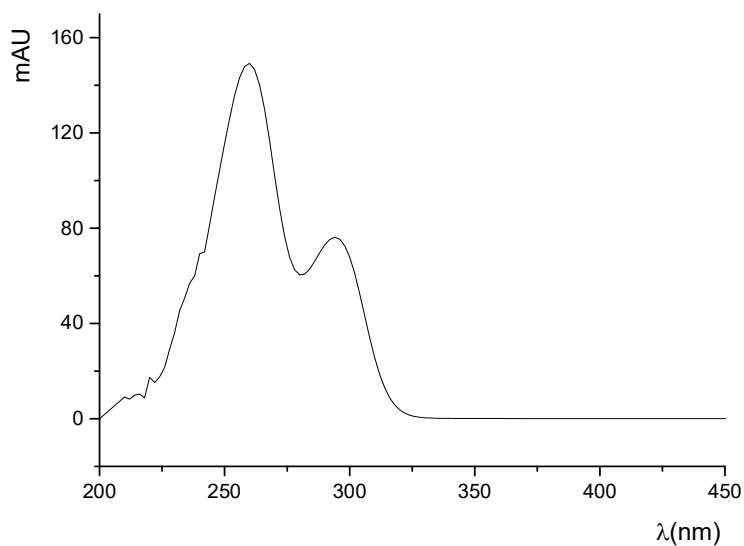


Slika 5.11. Dendrogram grupisanja uzoraka na osnovu njihove antioksidativne aktivnosti, sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana

### 5.3. Pojedinačna polifenolna jedinjenja

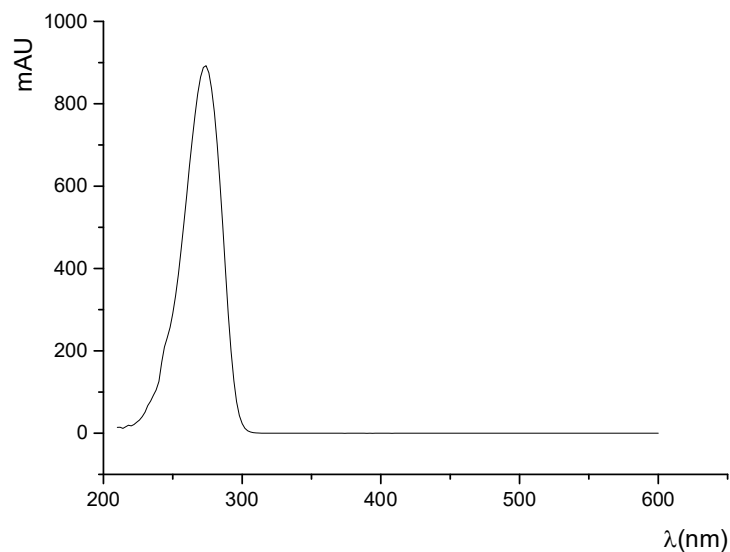
HPLC metodom su analizirani uzorci mlečne čokolade, crne čokolade i kakaou u prahu, jer su pokazali izraženu antioksidativnu aktivnost, za razliku od uzoraka bele čokolade, koji zbog slabe antioksidativne aktivnosti i samim tim niskih koncentracija polifenolnih jedinjenja, nije bilo moguće analizirati, što je u skladu sa literaturnim podacima (*Langer i sar.*, 2011). HPLC analizom su identifikovana sledeća jedinjenja: od fenolnih kiselina protokatehinska kiselina, od alkaloida teobromin, od flavan-3-ola (+)-katehin i (-)-epikatehin kao i njihovi polimeri procijanidini B1, B2, B3 i B4, od antocijana cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid. Identifikacija flavan-3-ola, teobromina, procijanidina B2 i protokatehinske kiseline vršena je poređenjem njihovih UV/Vis spektara i retencionih vremena sa standardima. Identifikacija procijanidina B1, B3 i B4 (*Sun i sar.*, 2007; *Kardel i sar.*, 2013), kao i antocijana cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid vršena je poređenjem retencionih vremena sa literaturnim podacima za antocijane u kakaou zrnju (*Pereira-Caro i sar.*, 2013). Kvantifikacija je izvršena na osnovu kalibracionih pravih za svaki standard u intervalu koncentracija od 0,1 mg/ml do 1 mg/ml.

Identifikacija i kvantifikacija protokatehinske kiseline je vršena na talasnoj dužini od 280 nm. Kao što se sa slike 5.12. može videti, spektar ove kiseline ima dva apsorpciona maksimuma, na 260 nm i na 295 nm.



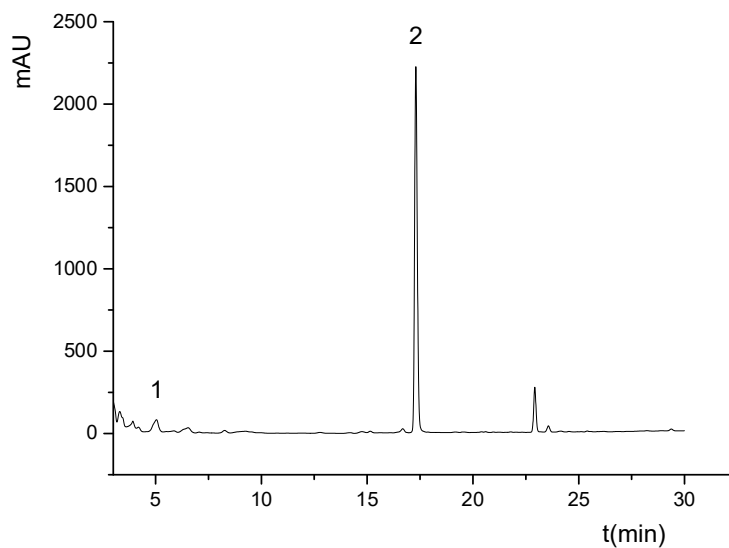
**Slika 5.12.** UV/Vis spektar standarda protokatehinske kiseline

Na slici 5.13. je prikazan UV/Vis spektar standarda teobromina. Apsorpcioni maksimum se javlja na 280 nm i na toj talasnoj dužini je vršena njegova identifikacija i kvantifikacija.



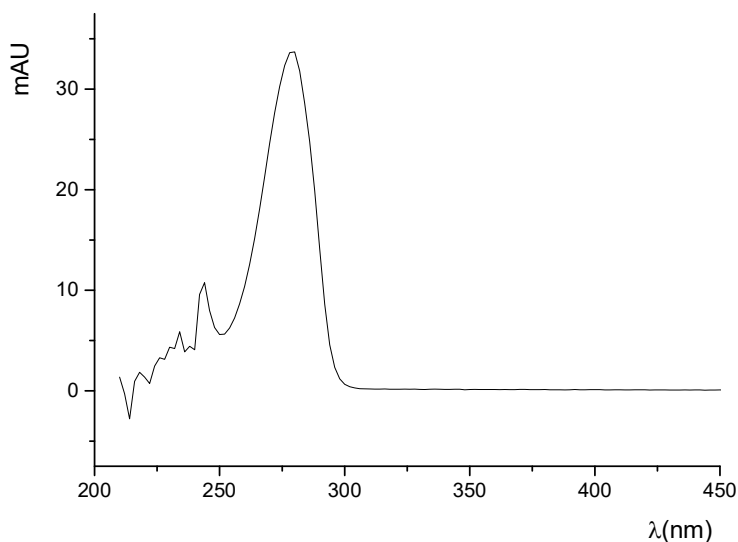
**Slika 5.13.** UV/Vis spektar standarda teobromina

Na slici 5.14. je prikazan HPLC hromatogram (280 nm) protokatehinske kiseline i teobromina u uzorku crne čokolade (CČ10).

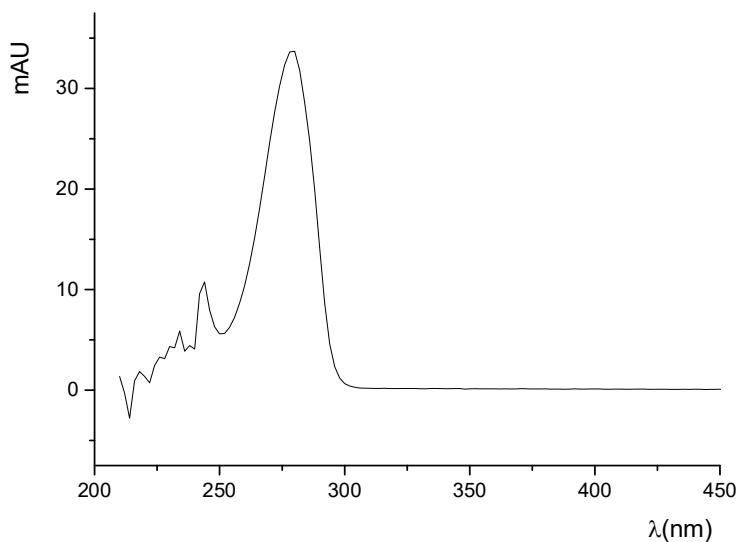


**Slika 5.14.** HPLC hromatogram uzorka kakaou u prahu (280 nm): 1 – protokatehinska kiselina, 2 – teobromin

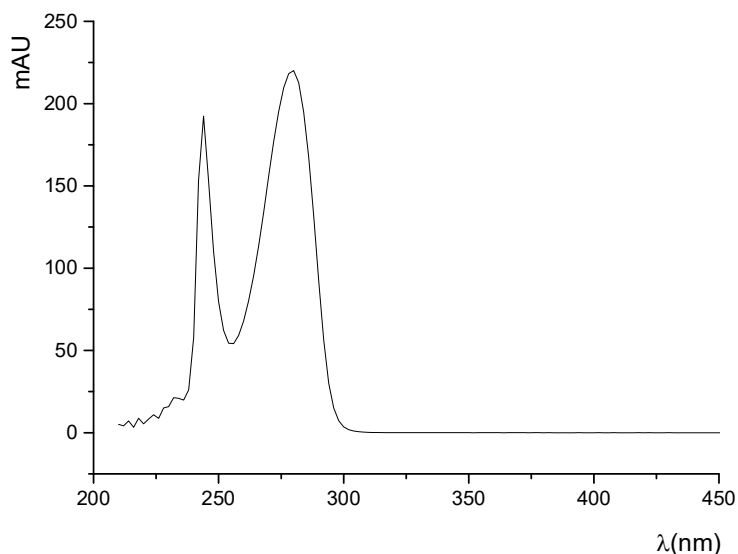
Na slikama 5.15. – 5.17. su dati spektri flavan-3-ola. Apsorpcioni maksimumi se javljaju na 237 nm i 280 nm. Na 280 nm je izvršena identifikacija. Za kvantifikacija flavan-3-ola je korišćen hromatogram snimljen na fluorescentnom detektoru (FLD). Ostali procijanidini (B1, B3 i B4) su izračunati kao ekvivalenti katehina.



Slika 5.15. UV/Vis spektar standarda (+)-katehina

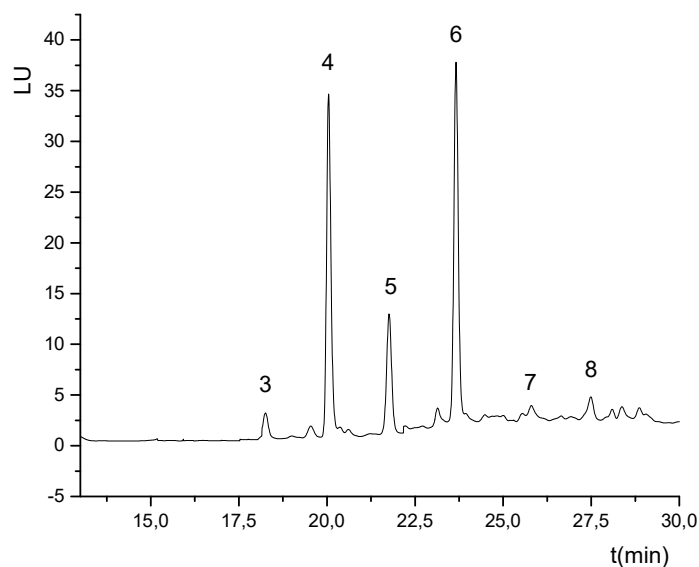


Slika 5.16. UV/Vis spektar standarda (-)-epikatehina



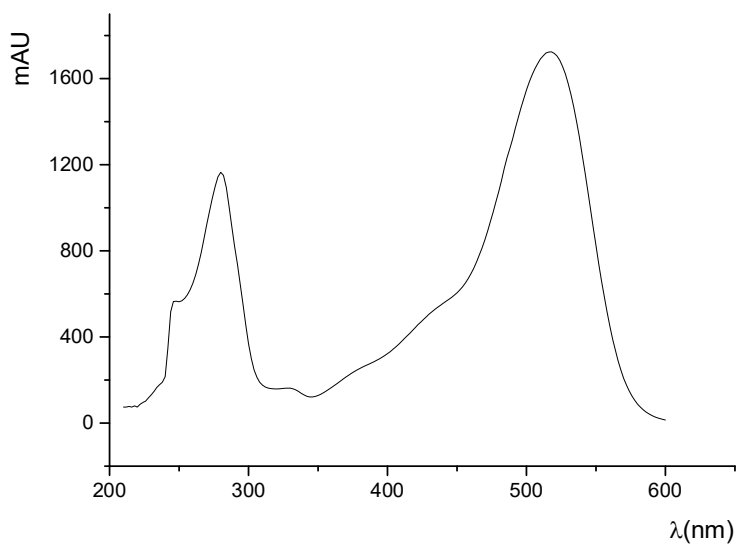
Slika 5.17. UV/Vis spektar standarda procijanidina B2

HPLC hromatogram uzorka crne čokolade (CČ10), snimljen na fluorescentnom detektoru (FLD), dat je na slici 5.18.



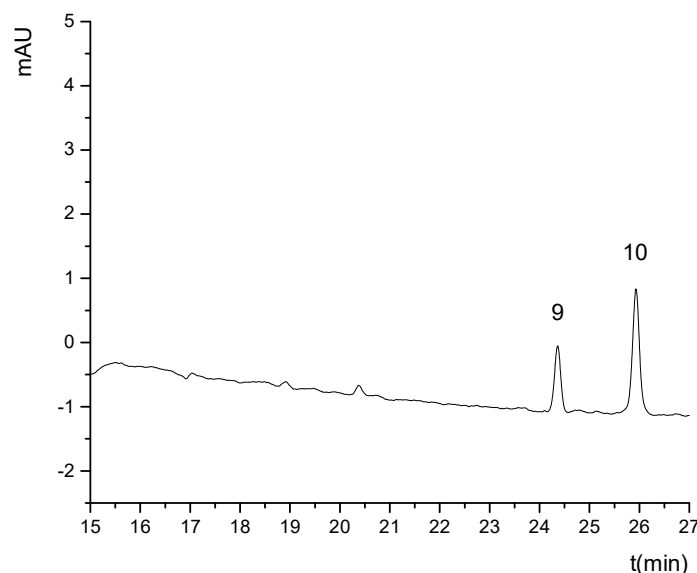
Slika 5.18. Hromatogram uzorka crne čokolade snimljen na FLD-u: 3 – procijanidin B1, 4 – (+)-katehin, 5 – procijanidin B2, 6 – (-)-epikatehin, 7 – procijanidin B3, 8 – procijanidin B4

Cijanidin-3-*O*-arabinozida i cijanidin-3-*O*-galaktozida, koji su detektovani u uzorcima kakaoa u prahu, izračunati su kao ekvivalenti cijanidina-3-*O*-glukozida (slika 5.19.). Na slici se mogu uočiti 3 apsorpciona maksimuma na: 234 nm, 279 nm i 516 nm. Identifikacija i kvantifikacija cijanidin-3-*O*-arabinozida i cijanidin-3-*O*-galaktozida je vršena na talasnoj dužini od 520 nm.



**Slika 5.19.** UV/Vis spektar standarda cijanidina-3-*O*-glukozida

Na slici 5.20. je prikazan HPLC hromatogram antocijana identifikovanih u ispitivanom uzorku kakaoa u prahu (KP1).



**Slika 5.20.** HPLC hromatogram uzorka kakaou u prahu (520 nm): 9 – cijanidin-3-*O*-galaktozid, 10 – cijanidin-3-*O*-arabinozid

Kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih jedinjenja izvršena je na osnovu kalibracionih pravih za svaki standard. Kalibracione prave su linearne u opsegu koncentracija 0,1 do 1 mg/ml. Sadržaj je dat kao srednja vrednost triju merenja ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ) i izražen je u miligramima po gramu uzorka (mg/g). Rezultati hromatografskog određivanja sadržaja pojedinačnih polifenola u uzorcima čokolade i kakaou u prahu, prikazani su u tabelama 5.19. – 5.27.

**Tabela 5.19.** Sadržaj protokatehinske kiseline i teobromina u uzorcima mlečne čokolade

Uzorak	Protokatehinska kiselina $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Teobromin $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
MČ1	$0,0140 \pm 0,0005$	3,57	$4,41 \pm 0,04$	0,91
MČ2	$0,0110 \pm 0,0004$	3,64	$7,89 \pm 0,07$	0,89
MČ3	$0,038 \pm 0,001$	2,63	$8,88 \pm 0,08$	0,90
MČ4	n.d. <sup>a</sup>	-	$7,24 \pm 0,07$	0,97
MČ5	n.d.	-	$8,90 \pm 0,08$	0,90
MČ6	n.d.	-	$8,36 \pm 0,08$	0,96



**Tabela 5.19.** Nastavak

MČ7	n.d.	-	5,98 ± 0,05	0,84
MČ8	0,0110 ± 0,0004	3,64	4,55 ± 0,04	0,88
MČ9	0,0170 ± 0,0006	3,53	7,64 ± 0,07	0,92
MČ10	0,0090 ± 0,0003	3,33	7,70 ± 0,07	0,91
MČ11	0,037 ± 0,001	2,70	5,98 ± 0,05	0,84
MČ12	0,0160 ± 0,0004	2,50	6,82 ± 0,06	0,88
MČ13	0,0210 ± 0,0006	2,86	6,35 ± 0,06	0,94
MČ14	n.d.	-	5,77 ± 0,05	0,87
MČ15	0,033 ± 0,001	3,03	6,53 ± 0,06	0,92
MČ16	0,0190 ± 0,0005	2,63	5,50 ± 0,05	0,91
MČ17	0,034 ± 0,001	2,94	5,77 ± 0,05	0,87
MČ18	n.d.	-	6,67 ± 0,06	0,90
MČ19	0,0150 ± 0,0005	3,33	6,21 ± 0,06	0,97

<sup>a</sup>n.d.– nije detektovan

**Tabela 5.20.** Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola i njihov ukupni sadržaj (USF) u uzorcima mlečne čokolade

Uzorak	(+)-katehin	RSD (%)	(-)-epikatehin	RSD (%)	USF	RSD (%)
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	
MČ1	0,021 ± 0,001	4,76	0,060 ± 0,003	5,00	0,081 ± 0,004	4,94
MČ2	0,055 ± 0,002	3,64	0,148 ± 0,007	4,73	0,203 ± 0,009	4,43
MČ3	0,052 ± 0,002	3,85	0,168 ± 0,008	4,76	0,22 ± 0,01	4,54
MČ4	0,026 ± 0,001	3,85	0,102 ± 0,005	4,90	0,128 ± 0,006	4,69
MČ5	0,049 ± 0,001	2,04	0,181 ± 0,009	4,97	0,23 ± 0,01	4,35
MČ6	0,044 ± 0,001	2,27	0,162 ± 0,008	4,94	0,206 ± 0,009	4,37
MČ7	0,049 ± 0,001	2,04	0,176 ± 0,005	2,87	0,225 ± 0,006	2,67
MČ8	0,024 ± 0,001	4,17	0,062 ± 0,003	4,84	0,086 ± 0,004	4,65
MČ9	0,033 ± 0,001	3,03	0,102 ± 0,005	4,90	0,135 ± 0,006	4,44
MČ10	0,038 ± 0,001	2,63	0,106 ± 0,005	4,72	0,144 ± 0,006	4,17
MČ11	0,094 ± 0,003	3,19	0,187 ± 0,006	3,21	0,281 ± 0,009	3,20
MČ12	0,049 ± 0,001	2,04	0,163 ± 0,008	4,91	0,212 ± 0,009	4,24
MČ13	0,055 ± 0,002	3,64	0,107 ± 0,003	2,80	0,162 ± 0,005	3,09
MČ14	0,029 ± 0,001	3,45	0,092 ± 0,004	4,35	0,121 ± 0,005	4,13
MČ15	0,053 ± 0,002	3,77	0,142 ± 0,004	2,82	0,192 ± 0,006	3,12
MČ16	0,046 ± 0,001	2,17	0,096 ± 0,003	3,12	0,142 ± 0,004	2,82
MČ17	0,049 ± 0,001	2,04	0,171 ± 0,005	2,92	0,220 ± 0,006	2,73
MČ18	0,051 ± 0,002	3,92	0,168 ± 0,005	2,98	0,219 ± 0,007	3,20
MČ19	0,042 ± 0,001	2,38	0,093 ± 0,002	2,15	0,135 ± 0,004	2,96

**Tabela 5.21.** Sadržaj pojedinačnih procijanidina i njihov ukupni sadržaj (USP) u uzorcima mlečne čokolade

Uzorak	Procijanidin B1 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Procijanidin B2 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Procijanidin B3 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Procijanidin B4 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	USP $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
MČ1	n.d. <sup>a</sup>	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MČ2	0,0207 ± 0,0009	4,35	0,049 ± 0,001	2,04	0,029 ± 0,002	6,89	0,0164 ± 0,0007	4,27	0,115 ± 0,005	4,35
MČ3	0,0229 ± 0,0009	3,93	0,065 ± 0,001	1,54	0,041 ± 0,001	2,44	0,0167 ± 0,0005	2,99	0,146 ± 0,003	2,05
MČ4	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MČ5	0,035 ± 0,001	2,86	0,078 ± 0,003	3,85	0,046 ± 0,002	4,35	0,0193 ± 0,0007	3,63	0,178 ± 0,007	3,93
MČ6	0,0192 ± 0,0006	3,12	0,056 ± 0,002	3,57	0,035 ± 0,002	5,71	0,0171 ± 0,0008	4,68	0,127 ± 0,005	3,94
MČ7	0,031 ± 0,001	3,23	0,067 ± 0,002	2,98	0,041 ± 0,002	4,88	0,0188 ± 0,0007	3,72	0,158 ± 0,006	3,80
MČ8	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MČ9	0,0097 ± 0,0005	5,15	0,036 ± 0,001	2,78	0,024 ± 0,001	4,17	0,0098 ± 0,0005	5,10	0,079 ± 0,003	3,80
MČ10	0,0110 ± 0,0005	4,54	0,052 ± 0,002	3,85	0,034 ± 0,002	5,88	0,0137 ± 0,0004	2,92	0,110 ± 0,005	4,54
MČ11	0,034 ± 0,002	5,88	0,071 ± 0,002	2,82	0,052 ± 0,002	3,85	0,0161 ± 0,0007	4,35	0,173 ± 0,007	4,05
MČ12	0,0213 ± 0,0009	4,22	0,055 ± 0,002	3,64	0,038 ± 0,001	2,63	0,0169 ± 0,0007	4,14	0,131 ± 0,005	3,82
MČ13	0,018 ± 0,001	5,56	0,048 ± 0,002	4,17	0,032 ± 0,002	6,25	0,0128 ± 0,0004	3,12	0,111 ± 0,005	4,50
MČ14	0,0140 ± 0,0005	3,57	0,034 ± 0,001	2,94	0,025 ± 0,001	4,00	0,0094 ± 0,0005	5,32	0,082 ± 0,004	4,88
MČ15	0,0214 ± 0,0009	4,21	0,048 ± 0,001	2,08	0,021 ± 0,001	4,76	0,0177 ± 0,0007	3,95	0,108 ± 0,005	4,63
MČ16	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MČ17	0,033 ± 0,001	3,03	0,069 ± 0,002	2,90	0,040 ± 0,002	5,00	0,0163 ± 0,0007	4,29	0,158 ± 0,006	3,80
MČ18	0,0211 ± 0,0009	4,26	0,061 ± 0,001	1,64	0,039 ± 0,001	2,56	0,0157 ± 0,0006	3,82	0,137 ± 0,004	2,92
MČ19	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

<sup>a</sup> n.d. – nije detektovan

**Tabela 5.22.** Sadržaj protokatehinske kiseline i teobromina u uzorcima crne čokolade

Uzorak	Protokatehinska	RSD (%)	Teobromin	RSD (%)
	kiselina $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	
CČ1	0,073 ± 0,002	2,74	11,1 ± 0,1	0,90
CČ2	0,075 ± 0,002	2,77	9,60 ± 0,09	0,94
CČ3	0,064 ± 0,002	3,12	11,4 ± 0,1	0,88
CČ4	0,061 ± 0,002	3,28	11,1 ± 0,1	0,90
CČ5	0,064 ± 0,002	3,12	12,0 ± 0,1	0,83
CČ6	0,103 ± 0,003	2,91	16,8 ± 0,2	1,19
CČ7	0,100 ± 0,003	3,00	18,0 ± 0,2	1,11
CČ8	0,083 ± 0,003	3,61	14,2 ± 0,1	0,70
CČ9	0,091 ± 0,003	3,30	16,4 ± 0,2	1,22
CČ10	0,062 ± 0,002	3,23	13,4 ± 0,2	1,50

**Tabela 5.23.** Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola i njihov ukupni sadržaj (USF) u uzorcima crne čokolade

Uzorak	(+)-katehin	RSD (%)	(-)-epikatehin	RSD (%)	USF	RSD (%)
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	
CČ1	0,167 ± 0,005	2,99	0,31 ± 0,01	3,23	0,48 ± 0,02	4,17
CČ2	0,043 ± 0,001	2,33	0,045 ± 0,002	4,44	0,088 ± 0,003	3,41
CČ3	0,081 ± 0,002	2,47	0,163 ± 0,008	4,91	0,24 ± 0,01	4,17
CČ4	0,182 ± 0,005	2,75	0,47 ± 0,02	4,25	0,65 ± 0,03	4,61
CČ5	0,089 ± 0,003	3,37	0,187 ± 0,009	4,81	0,28 ± 0,01	3,57
CČ6	0,42 ± 0,01	2,38	1,22 ± 0,06	4,92	1,64 ± 0,07	4,27
CČ7	0,50 ± 0,01	2,00	1,16 ± 0,06	5,17	1,66 ± 0,07	4,22
CČ8	0,278 ± 0,008	2,88	0,95 ± 0,05	5,26	1,23 ± 0,06	4,88
CČ9	0,35 ± 0,01	2,86	1,11 ± 0,05	4,50	1,46 ± 0,06	4,11
CČ10	0,237 ± 0,007	2,95	0,60 ± 0,03	5,00	0,84 ± 0,04	4,76

**Tabela 5.24.** Sadržaj pojedinačnih procijanidina i njihov ukupni sadržaj (USP) u uzorcima crne čokolade

Uzorak	Procijanidin B1		Procijanidin B2		Procijanidin B3		Procijanidin B4		USP	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
CČ1	$0,0199 \pm 0,0006$	3,01	$0,112 \pm 0,003$	2,68	$0,069 \pm 0,003$	4,35	$0,0169 \pm 0,0008$	4,73	$0,218 \pm 0,007$	3,21
CČ2	$0,0082 \pm 0,0004$	4,88	$0,067 \pm 0,002$	2,98	$0,043 \pm 0,002$	4,65	$0,0051 \pm 0,0003$	5,88	$0,123 \pm 0,005$	4,06
CČ3	$0,0207 \pm 0,0006$	2,90	$0,073 \pm 0,004$	5,48	$0,047 \pm 0,002$	4,25	$0,0158 \pm 0,0006$	3,80	$0,157 \pm 0,007$	4,46
CČ4	$0,041 \pm 0,001$	2,44	$0,194 \pm 0,006$	3,09	$0,116 \pm 0,004$	3,45	$0,039 \pm 0,001$	2,56	$0,390 \pm 0,001$	0,26
CČ5	$0,038 \pm 0,002$	5,26	$0,075 \pm 0,002$	2,67	$0,063 \pm 0,003$	4,76	$0,027 \pm 0,002$	7,41	$0,203 \pm 0,009$	4,43
CČ6	$0,074 \pm 0,002$	2,70	$0,283 \pm 0,009$	3,18	$0,166 \pm 0,005$	3,01	$0,053 \pm 0,002$	3,77	$0,58 \pm 0,02$	3,45
CČ7	$0,074 \pm 0,002$	2,70	$0,294 \pm 0,009$	3,06	$0,149 \pm 0,004$	2,68	$0,062 \pm 0,002$	3,23	$0,58 \pm 0,02$	3,45
CČ8	$0,087 \pm 0,003$	3,45	$0,245 \pm 0,007$	2,86	$0,153 \pm 0,005$	3,27	$0,038 \pm 0,001$	2,63	$0,52 \pm 0,02$	3,85
CČ9	$0,077 \pm 0,002$	2,60	$0,266 \pm 0,008$	3,01	$0,145 \pm 0,004$	2,76	$0,053 \pm 0,002$	3,77	$0,54 \pm 0,02$	3,70
CČ10	$0,036 \pm 0,001$	2,78	$0,197 \pm 0,006$	3,05	$0,052 \pm 0,002$	3,85	$0,0164 \pm 0,0004$	2,44	$0,301 \pm 0,009$	2,99

**Tabela 5.25.** Sadržaj protokatehinske kiseline i teobromina u uzorcima kakaou u prahu

Uzorak	Protokatehinska	RSD (%)	Teobromin	RSD (%)
	kiselina $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	
KP1	n.d. <sup>a</sup>	-	22,2 ± 0,2	0,90
KP2	0,175 ± 0,006	3,43	21,1 ± 0,2	0,95
KP3	0,102 ± 0,003	2,94	16,3 ± 0,1	0,61
KP4	0,114 ± 0,004	3,51	24,3 ± 0,2	0,82
KP5	0,252 ± 0,008	3,17	20,2 ± 0,2	0,99
KP6	0,132 ± 0,004	3,03	17,4 ± 0,2	1,15
KP7	0,130 ± 0,004	3,08	19,9 ± 0,2	1,01
KP8	0,219 ± 0,007	3,20	18,8 ± 0,2	1,06

<sup>a</sup>n.d.– nije detektovan

**Tabela 5.26.** Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola i njihov ukupni sadržaj (USF) u uzorcima kakaou u prahu

Uzorak	(+)-katehin	RSD	(-)-epikatehin	RSD	USF	RSD
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	(%)
KP1	0,033 ± 0,001	3,03	0,091 ± 0,004	4,40	0,124 ± 0,005	4,03
KP2	0,073 ± 0,002	2,74	0,092 ± 0,004	4,35	0,165 ± 0,006	3,64
KP3	0,056 ± 0,002	3,57	0,057 ± 0,003	5,26	0,113 ± 0,005	4,42
KP4	0,184 ± 0,006	3,26	0,142 ± 0,007	4,93	0,33 ± 0,01	3,03
KP5	0,049 ± 0,001	2,04	0,046 ± 0,002	4,35	0,095 ± 0,003	3,16
KP6	0,058 ± 0,002	3,45	0,066 ± 0,002	3,03	0,124 ± 0,004	3,23
KP7	0,079 ± 0,002	2,53	0,092 ± 0,002	2,17	0,171 ± 0,004	2,34
KP8	0,053 ± 0,002	3,77	0,062 ± 0,002	3,23	0,115 ± 0,004	3,48

**Tabela 5.27.** Sadržaj pojedinačnih procijanidina i njihov ukupni sadržaj (USP) u uzorcima kakaoa u prahu

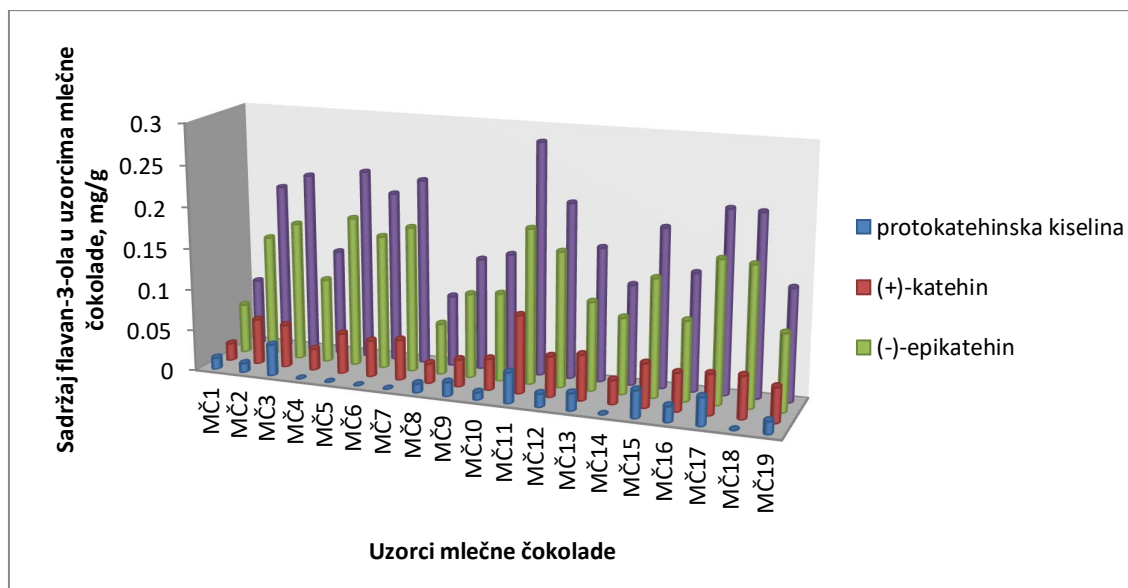
Uzorak	Procijanidin B1 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Procijanidin B2 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Procijanidin B3 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Procijanidin B4 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	USP $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
KP1	n.d. <sup>a</sup>	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
KP2	0,0287 ± 0,0009	3,14	0,097 ± 0,004	4,12	0,067 ± 0,003	4,48	0,0215 ± 0,0009	4,19	0,214 ± 0,009	4,21
KP3	0,0163 ± 0,0008	4,91	0,054 ± 0,002	3,70	0,034 ± 0,001	2,94	0,0122 ± 0,0005	4,10	0,116 ± 0,004	3,45
KP4	0,0365 ± 0,0008	2,19	0,148 ± 0,004	2,70	0,093 ± 0,005	5,38	0,0247 ± 0,0009	3,64	0,30 ± 0,01	3,33
KP5	0,0251 ± 0,0009	3,59	0,084 ± 0,004	4,76	0,052 ± 0,003	5,77	0,0145 ± 0,0007	4,83	0,176 ± 0,009	5,11
KP6	0,0181 ± 0,0006	3,31	0,057 ± 0,002	3,51	0,036 ± 0,001	2,78	0,0128 ± 0,0005	3,91	0,124 ± 0,004	3,23
KP7	0,0202 ± 0,0006	2,97	0,069 ± 0,002	2,90	0,042 ± 0,001	2,38	0,0134 ± 0,0004	2,98	0,145 ± 0,004	2,76
KP8	0,0158 ± 0,0005	3,16	0,060 ± 0,002	3,33	0,037 ± 0,001	2,70	0,0149 ± 0,0007	4,70	0,128 ± 0,004	3,12

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

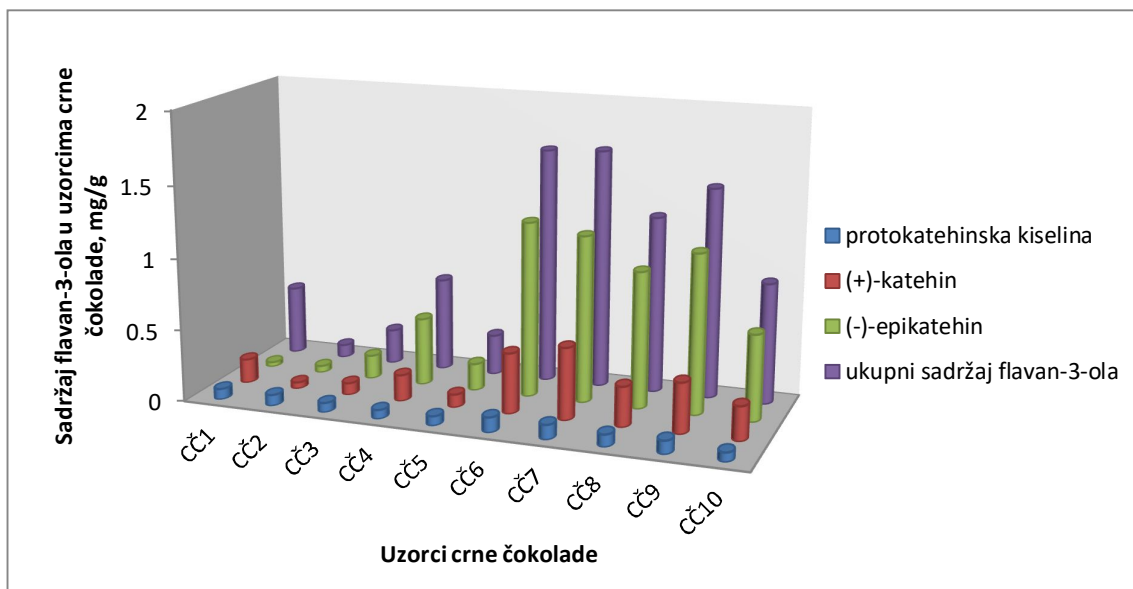
Kao što se može videti iz dobijenih rezultata, sadržaj (-)-epikatehina je veći od sadržaja (+)-katehina u uzorcima čokolade i kakaou u prahu, što je i u skladu sa literaturnim podacima (*Gottumukka i sar.*, 2014). Najveći sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina je u uzorcima crne čokolade, dok se od uzoraka kakao praha po sadržaju izdvaja uzorak KP4. Protokatehinska kiselina nije identifikovana u svim uzorcima čokolade i kakaou u prahu. Sadržaj protokatehinske kiseline, u uzorcima u kojima je identifikovana, se kreće u intervalu 0,009 – 0,038 mg/g za uzorke mlečne čokolade; 0,061 – 0,103 mg/g za uzorke crne čokolade i 0,102 – 0,252 mg/g za uzorke kakaou u prahu. Najveći sadržaj protokatehinske kiseline je u uzorcima kakaou u prahu, a zatim, slede uzorci crne čokolade i mlečne čokolade. Najzastupljeniji u ispitivanim uzorcima je teobromin, takođe, u uzorcima kakaou u prahu, a zatim u uzorcima crne i mlečne čokolade. Sadržaj teobromina se kreće u intervalu 4,41 – 8,90 mg/g za uzorke mlečne čokolade; 9,6 – 18,0 mg/g za uzorke crne čokolade i 16,3 – 24,3 mg/g za uzorke kakaou u prahu. Najveći sadržaj ovog jedinjenja je u uzorku kakao praha KP4, a najmanji u uzorku mlečne čokolade MČ1.

Takođe, na osnovu datih rezultata se može uočiti da je u ispitivanim uzorcima najveći sadržaj procijanidina B2, a zatim slede procijanidini B3, B1 i B4. Ukupni sadržaj procijanidina, u uzorcima u kojima su identifikovani, je u intervalu 0,079 – 0,178 mg/g za uzorke mlečne čokolade, 0,123 – 0,58 mg/g za uzorke crne čokolade i 0,116 – 0,30 mg/g za uzorke kakaou u prahu. Najveći sadržaj ukupnih procijanidina je u uzorku crne čokolade CČ7 i u uzorku kakaou u prahu KP4. Najmanji sadržaj procijanidina je u uzorku mlečne čokolade MČ2. U uzorcima mlečne čokolade je i očekivan najniži sadržaj procijanidina i katehina, jer ova čokolada sadrži najmanje likvora u odnosu na crnu čokoladu i kakao u prahu (*Wollgast i Anklam*, 2000b). Nađen niži sadržaj procijanidina u nekim uzorcima crne čokolade se objašnjava time, što se likvor, koji se koristi za pripremanje čokolade nekada delimično alkalizuje, što dovodi do hemijskih promena u sastavu polifenola.

Grafički prikaz sadržaja polifenolnih jedinjenja je dat na slikama 5.21. – 5.26.

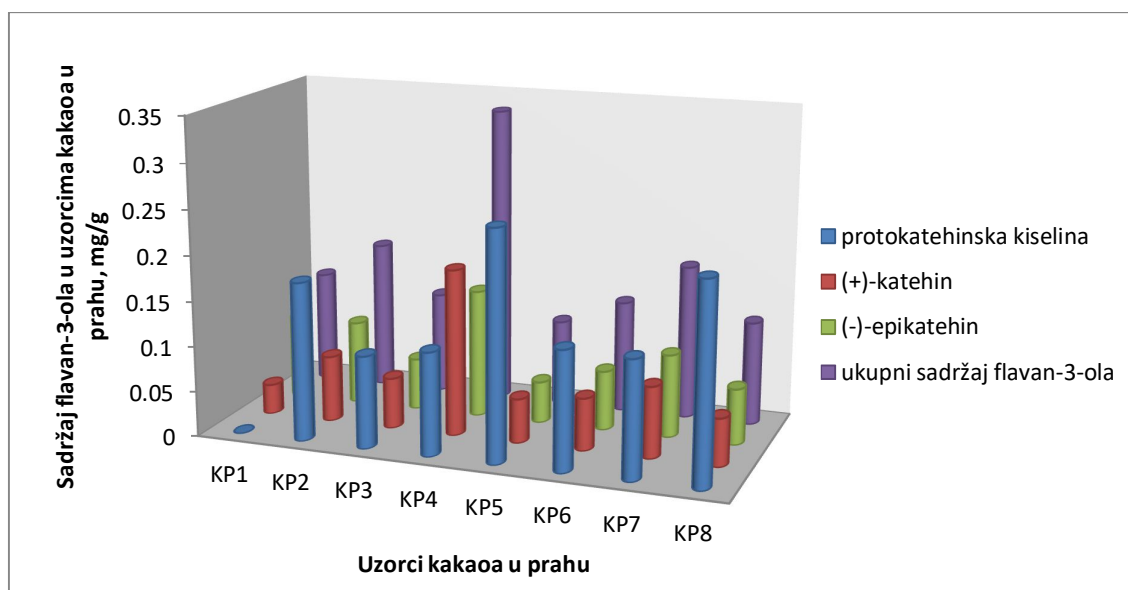


Slika 5.21. Pojedinačni i ukupni sadržaj flavan-3-ola u uzorcima mlečne čokolade

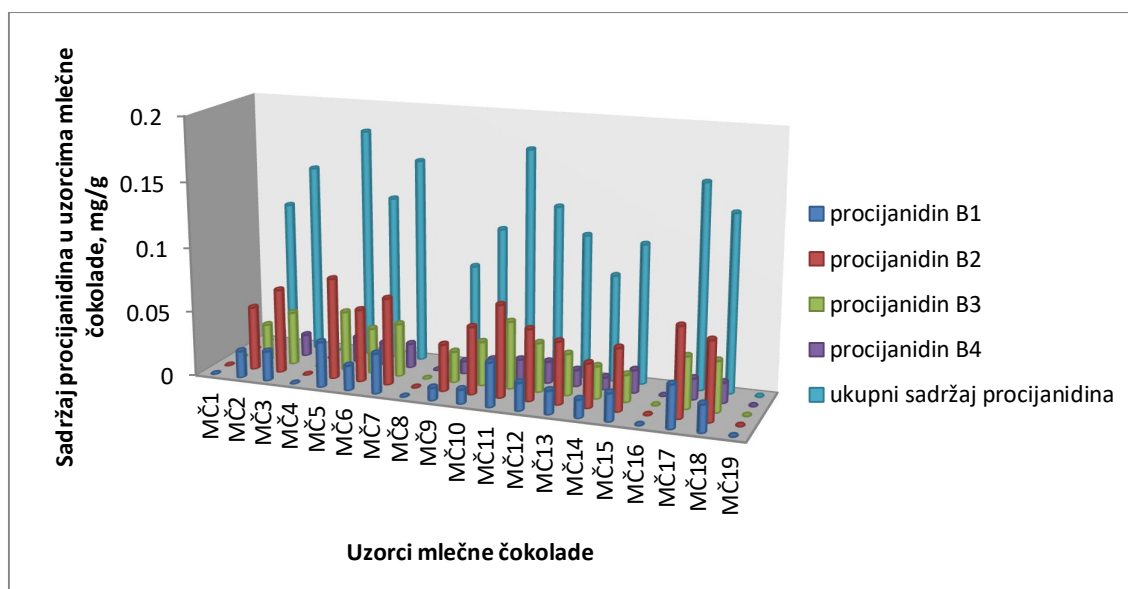


Slika 5.22. Pojedinačni i ukupni sadržaj flavan-3-ola u uzorcima crne čokolade

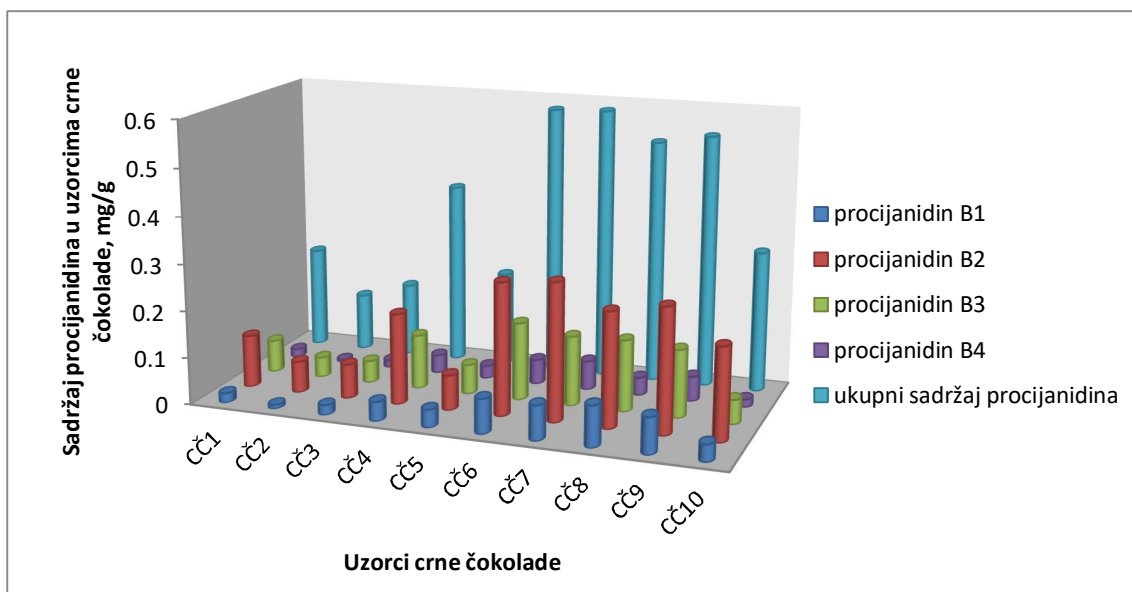




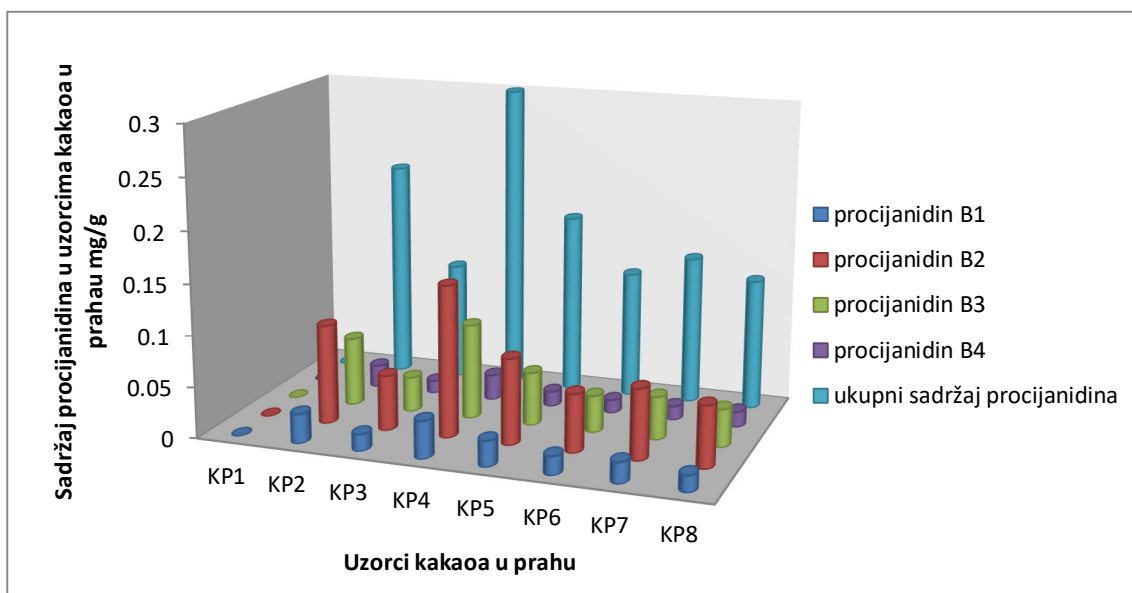
Slika 5.23. Pojedinačni i ukupni sadržaj flavan-3-ola u uzorcima kakaou u prahu



Slika 5.24. Pojedinačni i ukupni sadržaj procijanidina u uzorcima mlečne čokolade



Slika 5.25. Pojedinačni i ukupni sadržaj procijanidina u uzorcima crne čokolade

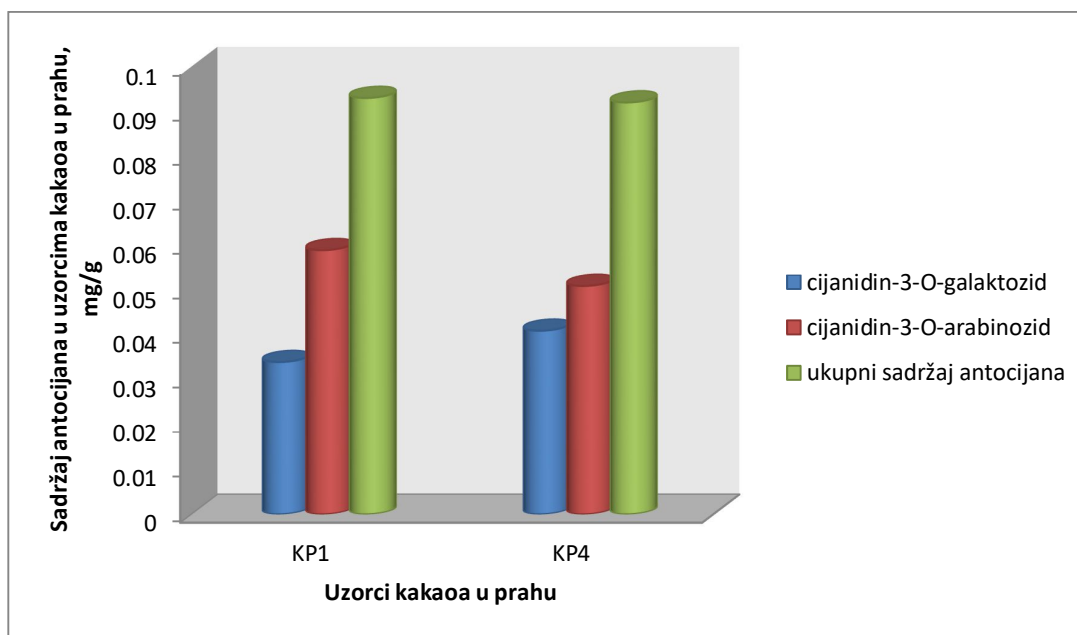


Slika 5.26. Pojedinačni i ukupni sadržaj procijanidina u uzorcima kakaosa u prahu

Antocijani su pronađeni samo u dva uzorka kakaosa u prahu i njihove koncentracije su slične u oba uzorka (tabela 5.28. i slika 5.27.). Sadržaj cijanidin-3-*O*-arabinozida je nešto veći od sadržaj cijanidina-3-*O*-galaktozida.

**Tabela 5.28.** Sadržaj pojedinačnih antocijana i njihov ukupni sadržaj (USA) u uzorcima kakaou u prahu

	Cijanidin-3- <i>O</i> - galaktozid $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Cijanidin-3- <i>O</i> - arabinozid $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	USA $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
KP1	0,034 ± 0,001	2,94	0,059 ± 0,002	3,63	0,093 ± 0,003	3,23
KP4	0,041 ± 0,001	2,44	0,051 ± 0,002	3,92	0,092 ± 0,003	3,26



**Slika 5.27.** Pojedinačni i ukupni sadržaj antocijana u uzorcima kakaou u prahu

Ukupan sadržaj flavan-3-ola varira u intervalu koncentracija od 0,081 mg/g do 0,281 mg/g u mlečnoj čokoladi, od 0,088 mg/g do 1,66 mg/g u crnoj čokoladi i od 0,095 mg/g do 0,33 mg/g u kakaou u prahu. Najveći sadržaj ukupnih flavan-3-ola je u uzorku crne čokolade CČ7 i u uzorku kakaou u prahu KP4, a najmanji u uzorku mlečne čokolade MČ1.

Ukupan sadržaj polifenola u uzorcima čokolade i kakaou u prahu je u intervalu koncentracija od 0,095 mg/g (MČ1) do 2,34 mg/g (CČ7) (tabela 5.29.). Kao što se iz tabelarnih podataka može videti, po ukupnom sadržaju polifenolnih jedinjenja, pored CČ7 se izdvajaju uzorci crne čokolade CČ6 (2,32 mg/g), CČ9 (2,09 mg/g) i CČ8 (1,83 mg/g). Redosled uzoraka po prosečnom sadržaju polifenolnih jedinjenja po uzorku je sledeći: crna

čokolada (1,248 mg/g); kakao u prahu (0,444 mg/g) i mlečna čokolada (0,285 mg/g). Na odstupanje od očekivanog redosleda (kakao prah > crna čokolada > mlečna čokolada) može da utiče: prvenstveno sam izbor sorte kakao zrna koja se koristi u proizvodnji, geografsko poreklo odabrane sorte, kao i način tretiranja kakao zrna. Međutim, kada bi se sadržaju polifenilnih jedinjenja dodao i sadržaj teobromina, kao glavne komponente kakao zrna, redosled bi bio sledeći: kakao u prahu (20,47 mg/g), crna čokolada (14,67 mg/g) i mlečna čokolada (6,98 mg/g).

**Tabela 5.29.** Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja u uzorcima čokolade i kakaou u prahu

Uzorak	Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
MČ1	0,095 ± 0,005	5,26
MČ2	0,33 ± 0,01	1,59
MČ3	0,40 ± 0,01	2,50
MČ4	0,13 ± 0,01	7,69
MČ5	0,41 ± 0,02	4,88
MČ6	0,33 ± 0,01	3,03
MČ7	0,38 ± 0,01	2,63
MČ8	0,097 ± 0,004	4,12
MČ9	0,23 ± 0,01	4,35
MČ10	0,26 ± 0,01	3,85
MČ11	0,49 ± 0,02	4,08
MČ12	0,36 ± 0,01	2,78
MČ13	0,29 ± 0,01	3,45
MČ14	0,20 ± 0,01	5,00
MČ15	0,34 ± 0,01	2,94
MČ16	0,161 ± 0,005	3,11
MČ17	0,41 ± 0,01	2,44
MČ18	0,36 ± 0,01	2,78
MČ19	0,150 ± 0,004	2,67
CČ1	0,49 ± 0,03	6,12
CČ2	0,29 ± 0,01	3,45
CČ3	0,46 ± 0,02	4,35
CČ4	1,10 ± 0,03	2,73
CČ5	0,54 ± 0,02	3,70
CČ6	2,32 ± 0,09	3,88

**Tabela 5.29.** Nastavak

CČ7	2,34 ± 0,09	3,85
CČ8	1,83 ± 0,08	4,37
CČ9	2,09 ± 0,08	3,83
CČ10	1,02 ± 0,05	4,90
KP1	0,12 ± 0,01	8,33
KP2	0,55 ± 0,02	3,64
KP3	0,33 ± 0,01	3,03
KP4	0,74 ± 0,02	2,70
KP5	0,52 ± 0,02	3,85
KP6	0,38 ± 0,01	2,63
KP7	0,45 ± 0,01	2,22
KP8	0,46 ± 0,02	4,35

Ako se pogleda procentualna zastupljenost datog polifenolnog jedinjenja izražena po pojedinačnom uzorku (tabela 5.30.), najzastupljeniji je (-)-epikatehin. Najveća zastupljenost u procentima u ukupnom sadržaju polifenola (-)-epikatehina je u uzorcima crne čokolade (4,68%), a zatim slede mlečne čokolade (2,41%) i kakaou u prahu (2,16%), dok je zastupljenost (+)-katehina najveća u uzorcima kakaou u prahu (1,95%), zatim, u uzorcima crne čokolade (1,85%) i mlečne čokolade (0,83%). Po procentualnoj zastupljenosti se od procijanidina izdvaja B2, a zatim slede B3, B1 i B4. Pored ovih rezultata, i sadržaj protokatehinske kiseline (KP (3,75%), CČ (0,61%) i MČ (0,27%)) je u saglasnosti sa literaturnim podacima za čokoladu sa evropskog tržišta (*Cooper i sar.*, 2007; *Gu i sar.*, 2006).

**Tabela 5.30.** Procentualna zastupljenost polifenolnih jedinjenja u uzorcima čokolade i kakaou u prahu

Uzorak	PK	K	EK	pB1	pB2	pB3	pB4	A
Mlečna čokolada	0,27	0,83	2,41	0,30	0,76	0,48	0,21	-
Crna čokolada	0,61	1,85	4,68	0,37	1,42	0,79	0,26	-
Kakao prah	3,75	1,95	2,16	0,54	1,90	1,20	0,38	0,62

PK – protokatehinska kiselina; K – (+)-katehin; EK – (-)-epikatehin; pB1 – procijanidin B1; pB2 – procijanidin B2; pB3 – procijanidin B3; pB4 – procijanidin B4; A – antocijani

Pirsonova korelaciona analiza (tabela 5.31.) je pokazala visok stepen korelacije između sadržaja (-)-epikatehin i (+)-katehina ( $R^2 = 0,9370$ ), procijanidina B2 ( $R^2 = 0,9102$ ), procijanidina B1 ( $R^2 = 0,8849$ ), procijanidina B4 i procijanidina B3 ( $R^2 = 0,8714$ ;  $R^2 = 0,8615$ ).

Sadržaj (+)-katehina, pored dobre korelacije sa (-)-epikatehinom, takođe, pokazuje visok stepen korelacije sa sadržajem procijanidina B2 ( $R^2 = 0,9584$ ), procijanidina B3 ( $R^2 = 0,8972$ ), procijanidinima B4 i B1 ( $R^2 = 0,8889$ ;  $R^2 = 0,8595$ ). Sadržaj protokatehinske kiseline, teobromina i antocijana pokazuje nizak stepen korelacije sa ostalim polifenolnim jedinjenjima.

Iako je i korelacija (-)-epikatehina sa procijanidinima visokog stepena, manja je u odnosu na korelaciju (+)-katehina sa procijanidinima. *Jalil i Ismail* (2008) u svom radu navode da u zavisnosti od stepena pečenja kakao zrna, značajno se povećava koncentracija (+)-katehina usled izomerizacije (-)-epikatehina. Fermentacija kakao zrna takođe dovodi do naglog smanjenja (-)-epikatehina, što ukazuje da jedan deo (-)-epikatehina gradi tanine, dok drugi deo u vidu tečnosti odlazi kao gubitak. Visoka temperatura i produžena obrada kakao zrna se izbegavaju jer smanjuju količinu (+)-katehina (*Jalil i Ismail*, 2008). Takođe, prema navodima autora, gorak ukus kakao zrna potiče od katehin tip flavonoida (katehina, epikatehina, procijanidina B2, B5 i C1). Proizvođači teže da eliminišu taj gorki ukus pravim odabirom vrste kakao zrna. Takođe, smatraju da je ukusnije kakao zrno iz Gane nego iz Indonezije i Dominikanske Republike. Proces fermentacije i alkalizacije smanjuje koncentraciju polifenola, pa proizvođači obično mešaju fermentisani kakao sa nefermentisanom kakao masom kako bi sačuvali ova jedinjenja.

**Tabela 5.31.** Matrica Pirsonovih koeficijenata korelacije ( $p < 0,05$ )

	T	PK	K	EK	pB1	pB2	pB3	pB4	C3G	C3A
T	1,0000	<b>0,7464</b>	0,4217	0,2726	0,3663	0,4557	0,4638	0,3880	0,4954	0,4920
PK		1,0000	0,2826	0,1415	0,2998	0,3680	0,3945	0,3107	-0,0121	-0,0228
K			1,0000	<b>0,9370</b>	<b>0,8595</b>	<b>0,9584</b>	<b>0,8972</b>	<b>0,8889</b>	0,0090	0,0012
EK				1,0000	<b>0,8849</b>	<b>0,9102</b>	<b>0,8615</b>	<b>0,8714</b>	-0,0963	-0,0970
pB1					1,0000	<b>0,9322</b>	<b>0,9460</b>	<b>0,9352</b>	-0,8648	-0,0961
pB2						1,0000	<b>0,9642</b>	<b>0,9304</b>	-0,0402	-0,0510
pB3							1,0000	<b>0,9472</b>	-0,0270	-0,0395
pB4								1,0000	-0,0938	-0,1035
C3g									1,0000	<b>0,9987</b>
C3a										1,0000

T – teobromin; PK – protokatehinska kiselina; K – (+)-katehin; EK – (-)-epikatehin; pB1 – procijanidin B1; pB2 – procijanidin B2; pB3 – procijanidin B3; pB4 – procijanidin B4; C3G – cijanidin-3-*O*-galaktozid; C3A – cijanidin-3-*O*-arabinozid

U tabeli 5.32. je dato poređenje sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja uzorka mlečne, crne čokolade i kakaou u prahu sa literaturnim podacima.

**Tabela 5.32.** Poređenje dobijenih sadržaja za pojedinačna polifenolna jedinjenja i teobromin sa literaturnim podacima

Uzorak	(+)-katehin (mg/g)	(-)-epikatehin (mg/g)	Teobromin (mg/g)	Ukupni procijanidini (mg/g)	Referenca
MČ	0,010 - 0,077	0,136 - 0,147	5,5 - 7,6	0,49 - 0,88	Todorović i sar., 2015
MČ	0,23 - 0,32	-	-	2,16 - 3,14	Gu i sar., 2006
MČ	0,15 - 0,16 <sup>a</sup>	-	-	0,43 - 0,90	Miller i sar., 2008
MČ	0,004 - 0,087	0,085 - 0,637	-	0,37 - 0,402 <sup>b</sup>	Alañón i sar., 2016
MČ	0,034	0,10	-	0,27	Langer i sar., 2011
MČ	0,15-0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	Wollgast i Anklam, 2000b
<b>MČ</b>	<b>0,021 - 0,094</b>	<b>0,060 - 0,187</b>	<b>4,41 - 8,90</b>	<b>0,079 - 0,178</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>
CČ	0,057 - 0,183	0,181 - 0,263	10,7 - 14,6	1,77 - 3,68	Todorović i sar., 2015
CČ	0,77 - 1,58	-	-	8,52 - 19,85	Gu i sar., 2006
CČ	0,48 - 1,37 <sup>a</sup>	-	-	2,78 - 4,10	Miller i sar., 2008
CČ	0,006 - 0,908	0,038 - 0,807	-	0,007 - 0,598 <sup>b</sup>	Alañón i sar., 2016
CČ	0,48 - 1,37 <sup>a</sup>	-	-	-	Wollgast i Anklam, 2000b
CČ	0,16 - 2,01	0,29 - 2,70	-	0,48 - 3,34	Langer i sar., 2011
<b>CČ</b>	<b>0,043 - 0,278</b>	<b>0,045 - 1,22</b>	<b>9,6 - 18,0</b>	<b>0,12 - 0,58</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>
KP	0,653 - 0,678	1,212 - 1,223	21,8 - 22,3	6,76 - 7,39	Todorović i sar., 2015
KP	-	-	19,6 - 29,4	-	Ramli i sar., 2001
KP	2,96 - 3,27 <sup>a</sup>	-	-	19,28 - 23,71	Miller i sar., 2008
<b>KP</b>	<b>0,033 - 0,184</b>	<b>0,046 - 0,142</b>	<b>16,3 - 24,3</b>	<b>0,116 - 0,300</b>	<b>Brcanović i sar., 2013</b>

<sup>a</sup> zbir sadržaja (+)-katehina i (-)-epikatehina; <sup>b</sup> sadržaj samo procijanidina B2

Dobijeni rezultati za sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina su u skladu sa rezultatima drugih autora za uzorke mlečne i crne čokolade, dok je za uzorke kakaou u prahu sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja niži u poređenju sa literaturnim podacima. Sadržaj teobromina je u skladu sa literaturnim podacima, dok sadržaj procijanidina nije u skladu sa literaturnim podacima. Ukupan sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost opadaju sa porastom pH vrednosti kakaou u prahu. Sadržaj flavonoida u prirodnom kakaou u prahu je od 22,86 mg/g do 40,25 mg/g. Nakon procesa slabe alkalizacije, sadržaj flavonoida se smanjuje i iznosi od 8,76 mg/g do 24,65 mg/g, dok se nakon procesa jake alkalizacije kakaou praha taj



sadržaj smanjuje čak do 1,33 – 6,05 mg/g. Može se zaključiti da se tokom obrade kakao praha sadržaj ukupnih flavonoida smanjuje 60%. Od ukupnih flavonoida, sadržaj (-)-epikatehina se smanjuje 67%, dok se sadržaj (+)-katehina smanjuje 38% (*Hii i sar.*, 2009). Neslaganje sa literaturnim podacima može biti posledica procesa alkalizacije, sorte kakao zrna i geografskog porekla.

Takođe, literaturni podaci govore o promeni sadržaja oligomernih proantocijanidina u toku obrade kakao zrna do čokolade, kao gotovog proizvoda. U sirovom zrnu kakaoa, njihova koncentracija se kreće u opsegu 0,27 – 5,28 mg/g, a nakon fermentisanja taj sadržaj se menja i iznosi 0 – 8,78 mg/g. Tokom pečenja se smanjuje i iznosi 0 – 4,21 mg/g, a 4h nakon končiranja se i dalje smanjuje njihova koncentracija i iznosi 0 – 2,70 mg/g, a u čokoladi je u intervalu 0,08 – 1,77 mg/g (*Pedan i sar.*, 2017).

Diferenciranje ispitivanih uzoraka, na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenola i alkaloida, je izvršeno primenom analize glavnih komponentata (PCA). U tu svrhu je formirana matrica podataka dimenzije 10×48 sa sadržajem polifenola i alkaloida u kolonama (10) i uzorcima čokolade i kakaoa u prahu u redovima (48). Broj optimalnih faktora izabran je na osnovu *Cattel*-ovog skri (*scree*) testa.

U tabeli 5.33. su prikazani izračunati koeficijenti opterećenja po glavnim osama za svaku analiziranu komponentu. Mogu se uočiti tri glavne komponente (PC), koje objašnjavaju oko 95% ukupne varijabilnosti. PC1 objašnjava oko 59%, PC2 objašnjava oko 24% i PC3 objašnjava oko 12% ukupnih varijabli. Pozitivno opterećenje PC1 pokazuju uzorci CČ6 (2,623) CČ7 (2,778), CČ8 (2,037) i CČ9 (2,361), koji se inače ističu po ukupnom sadržaju polifenolnih jedinjenja (tabela 5.29.). Negativno opterećenje ove glavne komponente pokazuju uzorci MČ1 (-1,105), MČ4 (-1,051), MČ8 (-1,101), MČ16 i MČ19 (-1,031) koji i imaju najniži sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja (tabela 5.29.) i ne sadrže procijanidine (tabela 5.21.). Negativno opterećenje PC2 pokazuju uzorci KP1 (-4,023) i KP4 (-3,776), koji se izdvajaju po sadržaju antocijana.

**Tabela 5.33.** Koeficijenti opterećenja analiziranih komponenti u ispitivanim uzorcima u odnosu na dve ose glavnih komponenti

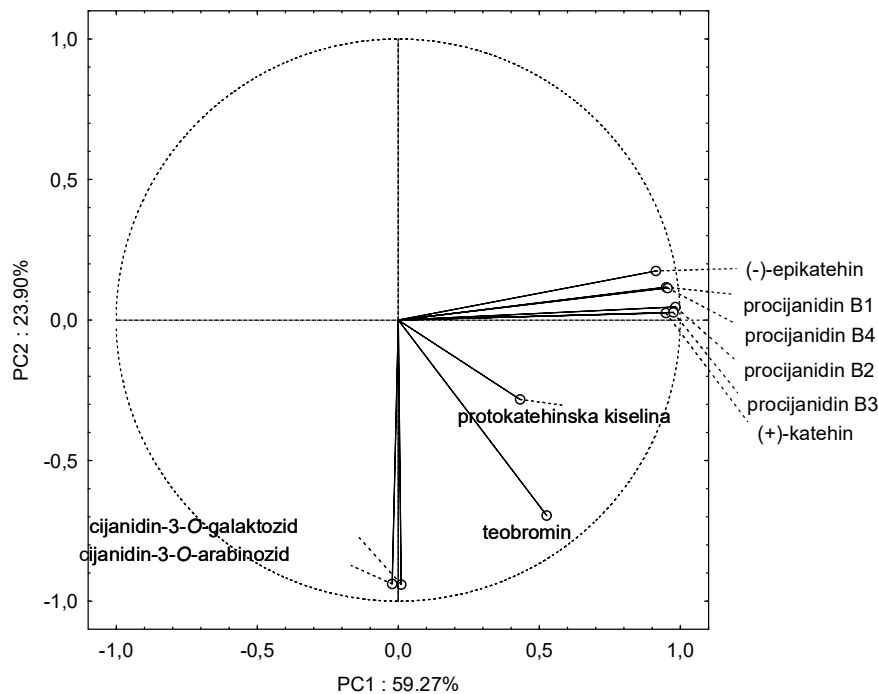
Uzorak	PC1 <sup>a</sup>	PC2 <sup>a</sup>	PC3 <sup>a</sup>	Komponenta	PC1 <sup>a</sup>	PC2 <sup>a</sup>	PC3 <sup>a</sup>
MČ1	-1,105	0,434	0,369	PK	0,431	-0,272	-0,848
MČ2	-0,425	0,397	0,458	T	0,522	-0,698	-0,444
MČ3	-0,276	0,314	0,131	K	0,948	0,017	0,151
MČ4	-1,051	0,326	0,378	E	0,914	0,160	0,254
MČ5	-0,156	0,422	0,616	PB1	0,950	0,112	0,095
MČ6	-0,406	0,397	0,551	PB2	0,983	0,042	0,053
MČ7	-0,279	0,554	0,771	PB3	0,975	0,025	0,023
MČ8	-1,101	0,433	0,398	PB4	0,955	0,109	0,075
MČ9	-0,673	0,340	0,279	C3G	-0,019	-0,945	0,317
MČ10	-0,550	0,373	0,405	C3A	-0,0279	-0,945	0,328
MČ11	-0,126	0,494	0,425				
MČ12	-0,381	0,451	0,484				
MČ13	-0,507	0,431	0,394				
MČ14	-0,705	0,470	0,585				
MČ15	-0,439	0,428	0,298				
MČ16	-1,031	0,379	0,295				
MČ17	-0,257	0,499	0,404				
MČ18	-0,395	0,486	0,673				
MČ19	-1,031	0,350	0,289				
CC1	0,076	0,130	-0,330				
CC2	-0,516	0,119	-0,509				
CC3	-0,157	0,137	-0,290				

**Tabela 5.33.** Nastavak

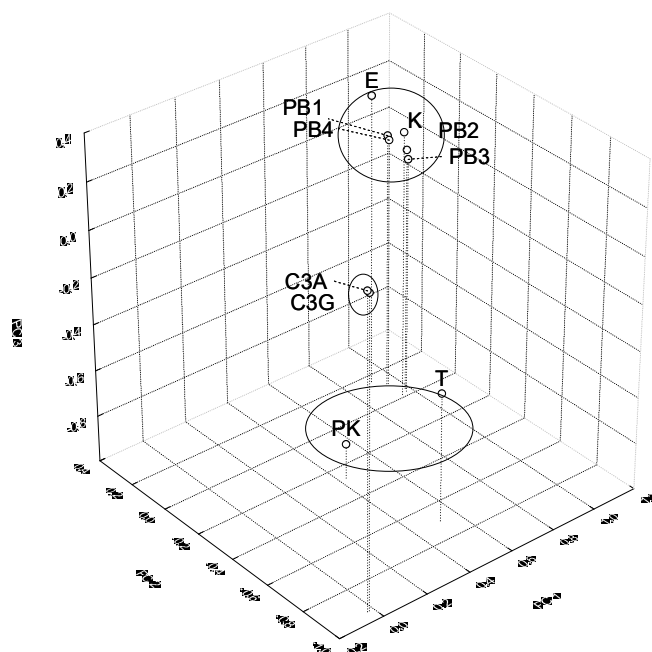
CC4	1,033	0,384	0,330
CC5	0,188	0,188	-0,188
CC6	2,623	0,335	0,488
CC7	2,778	0,300	0,531
CC8	2,037	0,407	0,504
CC9	2,361	0,347	0,493
CC10	0,690	0,202	0,178
KP1	-0,855	-4,023	1,827
KP2	0,320	-0,521	-2,101
KP3	-0,283	-0,228	-1,157
KP4	0,740	-3,776	0,766
KP5	0,155	-0,661	-3,005
KP6	-0,191	-0,329	-1,537
KP7	-0,044	-0,434	1,613
KP8	-0,061	-0,555	-2,589
EV <sup>b</sup>	5,927	2,400	1,226
Varijabilitet (%)	59,275	23,995	12,256
Kumulativna vrednost	5,927	8,327	9,553
Ukupni varijabilitet (%)	59,275	83,270	95,526

<sup>a</sup>PC – glavna komponenta; <sup>b</sup>Eigen vrednost – svojstvena vrednost faktora

Na osnovu dobijenog PCA dijagrama rasipanja u odnosu na prve dve ose glavnih komponenti (slika 5.28.), može se videti da su polifenolna jedinjenja razvrstana u tri grupe. Prvu grupu čine antocijani, koji se po drugoj osi izdvajaju i nalaze se u levom delu dijagrama, tj. sa negativnim vrednostima drugog faktora i vrednostima prvog faktora oko nule. Drugu grupu čine flavan-3-oli i njihovi polimeri, koji se izdvajaju sa pozitivnim vrednostima prvog faktora i vrednostima drugog faktora oko nule. Treću grupu čini protokatehinska kiselina i teobromin, sa pozitivnim vrednostima prvog faktora, a negativnim vrednostima drugog faktora. Identična klasifikacija je dobijena i na osnovu PCA dijagrama rasipanja u odnosu na sve tri glavne komponente (slika 5.29.).

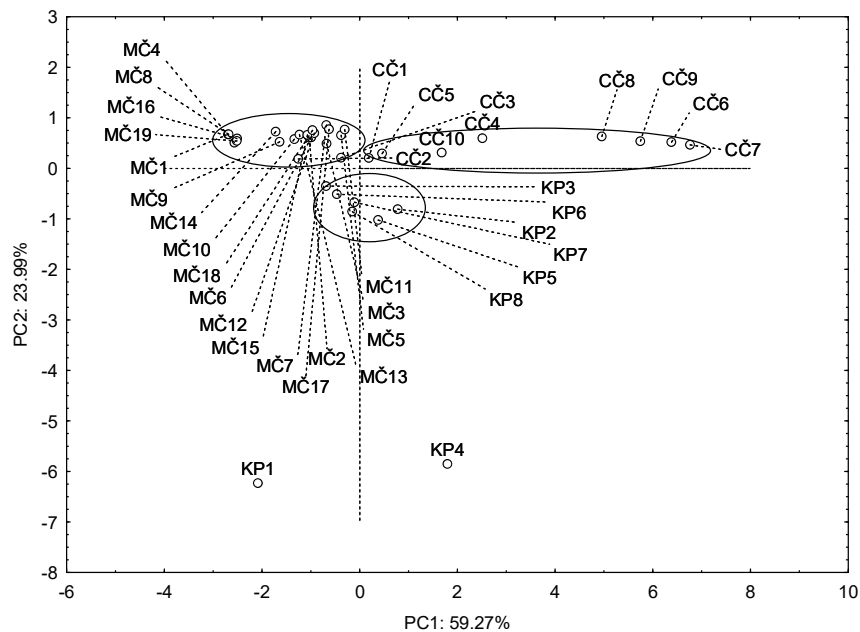


**Slika 5.28.** PC1 – PC2 dijagram identifikovanih jedinjenja dobijen na osnovu njihovog sadržaja u ispitivanim uzorcima

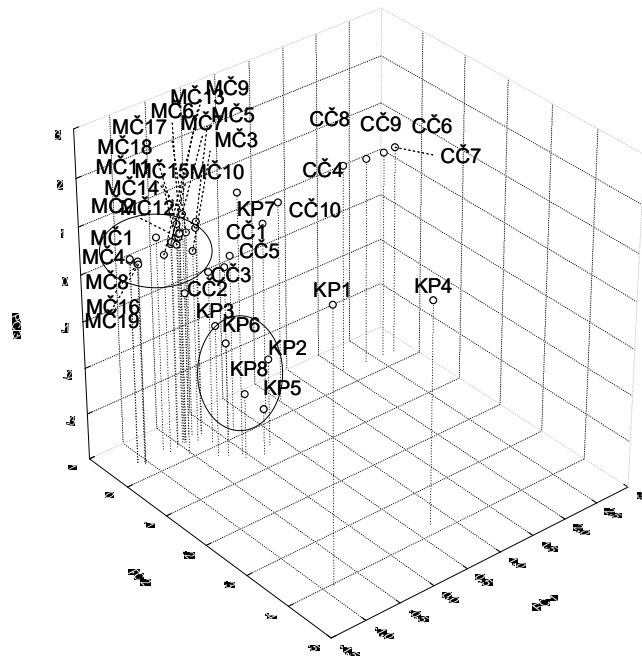


**Slika 5.29.** PC1 – PC2 – PC3 dijagram identifikovanih jedinjenja dobijen na osnovu njihovog sadržaja u ispitivanim uzorcima

Na osnovu dobijenog PCA dijagrama rasipanja u odnosu na prve dve ose glavnih komponenti, svi uzorci mogu da se svrstaju u tri grupe (slika 5.30.). Prvu grupu čine uzorci mlečne čokolade, koji se izdvajaju po negativnim vrednostima prvog faktora i pozitivnim vrednostima drugog faktora. Ako se pogledaju slike 5.28. i 5.29., može se zaključiti da je takav raspored na osnovu sadržaja flavan-3-ola i njihovih polimera. Unutar ove grupe se izdvajaju uzorci mlečne čokolade MČ1, MČ4, MČ8, MČ16 i MČ19, kod kojih nisu prisutni procijanidini. Drugu grupu čine uzorci crne čokolade sa pozitivnim vrednostima prvog faktora i sa vrednostima drugog faktora oko nule. Ovi uzorci se izdvajaju po sadržaju katehina i procijanidina B1 i B4. Treću grupu čine uzorci kakaou u prahu sa vrednostima prvog faktora oko nule i negativnim vrednostima drugog faktora. Uzorci kakao praha KP1 i KP4 su sa negativnim vrednostima oba faktora. To su jedini uzorci koji sadrže antocijane. Klasifikacija dobijena na osnovu dve ose glavnih komponenti potvrđena je dijagramom PC1–PC2 – PC3 (slika 5.31.).



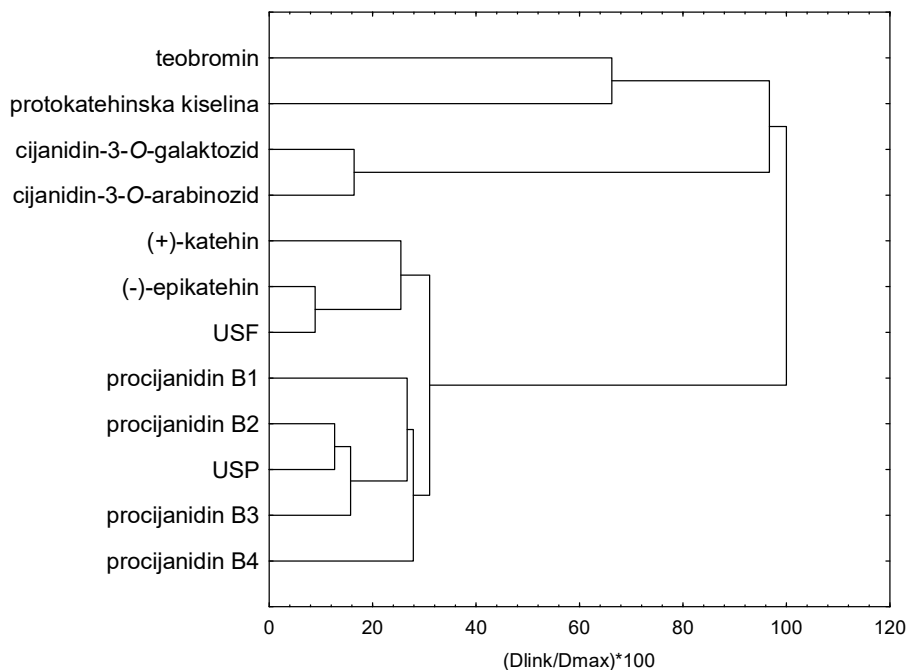
Slika 5.30. PC1 – PC2 dijagram rasporeda ispitivanih uzoraka



Slika 5.31. PC1 – PC2 – PC3 dijagram rasporeda ispitivanih uzoraka

Klaster analiza je takođe korišćenja u cilju diferenciranja uzoraka na osnovu sadržaja polifenolnih jedinjenja. Za određivanje udaljenosti između klastera korišćena je *Single*

*linkage* metoda. Na slici 5.32. je prikazan dendrogram na kome su polifenolna jedinjenja na osnovu rastojanja,  $D_{link}/D_{max} < 50$ , grupisana u četiri klastera.

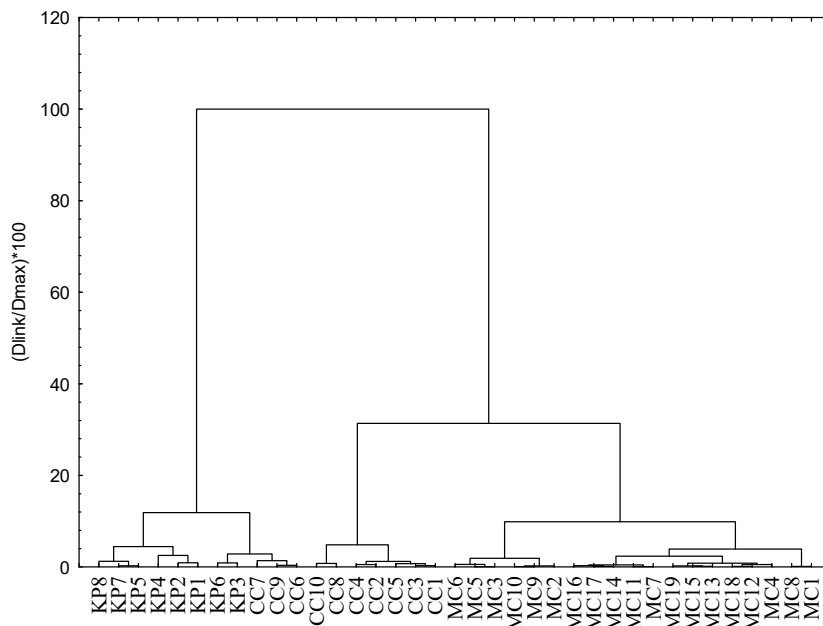


**Slika 5.32.** Dendrogram grupisanja polifenolnih jedinjenja i alkaloida na osnovu njihovog sadržaja u ispitivanim uzorcima (USF – ukupni sadržaj flavan-3-ola; USP – ukupni sadržaj procijanidina)

Prvi klaster se sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su procijanidini B1, B2, B3 i B4 i USP, što ukazuje na to da najveći doprinos u ukupnom sadržaju procijanidina (USP) potiče od procijanidina B2 (Euklidovo rastojanje = 2,22), zatim procijanidina B1 (Euklidovo rastojanje = 2,83), procijanidina B4 (Euklidovo rastojanje = 2,86) i procijanidina B3 (Euklidovo rastojanje = 2,92). Drugi potklaster čine USF, (+)-katehin i (-)-epikatehin, što pokazuje da ukupnom sadržaju flavan-3-ola (USF) najviše doprinosi (-)-epikatehin (Euklidovo rastojanje = 0,55), a zatim (+)-katehin (Euklidovo rastojanje = 1,58). U drugom klasteru su antocijani (Euklidovo rastojanje = 1,02). Protokatehinska kiselina (Euklidovo rastojanje = 6,01) je u trećem, a teobromin (Euklidovo rastojanje = 4,12) u četvrtom klasteru.

Na slici 5.33. je prikazan dendrogram grupisanja uzoraka. Za određivanje udaljenosti između klastera korišćena je *Ward-ova metoda*. Uzorci su grupisani u dva klastera. Prvi klaster se sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su uzorci mlečne čokolade, dok su

u drugom potklasteru uzorci crne čokolade. Drugi klaster čine takođe dva potklastera. U prvom su tri uzorka crne čokolade, koji su po sadržaju ukupnih polifenolnih jedinjenja bliski uzorcima kakaou u prahu, dok drugi potklaster čine uzorci kakaou u prahu.



Slika 5.33. Dendrogram grupisanja uzoraka na osnovu sadržaja polifenolnih jedinjenja

#### 5.4. Kinetika degradacije flavan-3-ola, procijanidina i antocijana

Rezultati sadržaja ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ) pojedinačnih flavonoida, u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja (7, 15 i 30 dana), prikazani su u tabelama 5.34. – 5.36, a određeni su prethodno validiranom HPLC metodom (Mitić i sar., 2012). Dobijeni rezultati su pokazali da sa povećanjem vremena čuvanja na datim temperaturama (4 °C, 22 °C i 35 °C) sadržaj katehina, procijanidina i antocijana se smanjuje. Kod skoro svih uzoraka na datim temperaturama i u datom vremenu određivanja, sadržaj (-)-epikatehina je bio veći od sadržaja (+)-katehina. Od procijanidina u uzorcima kakaou u prahu najviše ima B2, a zatim slede procijanidini B1, B3 i B4. Dobijeni sadržaj i zastupljenost pojedinačnih flavonoida je u skladu sa literaturnim podacima (Cooper i sar., 2007; Langer i sar., 2011).



**Tabela 5.34.** Sadržaj flavan-3-ola u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja na različitim temperaturama

Uzorak	Vreme (dan)	(+)-katehin $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)						(-)-epikatehin $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)					
		4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)
KP1	7	0,266 ± 0,005	1,88	0,262 ± 0,004	1,53	0,257 ± 0,004	1,56	0,266 ± 0,004	1,50	0,258 ± 0,004	1,55	0,243 ± 0,004	1,65
	15	0,258 ± 0,005	1,94	0,246 ± 0,004	1,63	0,225 ± 0,004	1,78	0,235 ± 0,003	1,28	0,225 ± 0,003	1,33	0,217 ± 0,003	1,38
	30	0,226 ± 0,004	1,77	0,213 ± 0,003	1,41	0,183 ± 0,003	1,67	0,195 ± 0,002	1,03	0,178 ± 0,002	1,12	0,178 ± 0,002	1,12
KP2	7	0,0086 ± 0,0002	2,33	0,0083 ± 0,0002	2,41	0,0079 ± 0,0001	1,27	0,412 ± 0,006	1,46	0,404 ± 0,006	1,49	0,389 ± 0,005	1,29
	15	0,0081 ± 0,0002	2,47	0,0077 ± 0,0002	2,60	0,0068 ± 0,0001	1,47	0,389 ± 0,005	1,29	0,376 ± 0,004	1,06	0,365 ± 0,005	1,37
	30	0,0075 ± 0,0001	1,33	0,0065 ± 0,0001	1,54	0,0055 ± 0,0001	1,82	0,351 ± 0,005	1,42	0,335 ± 0,004	1,19	0,329 ± 0,004	1,22
KP3	7	0,0099 ± 0,0004	4,04	0,0094 ± 0,0004	4,26	0,0091 ± 0,0003	3,30	0,208 ± 0,004	1,92	0,197 ± 0,003	1,52	0,174 ± 0,002	1,15
	15	0,0093 ± 0,0003	3,23	0,0085 ± 0,0006	7,06	0,0080 ± 0,0001	1,25	0,177 ± 0,003	1,69	0,165 ± 0,002	1,21	0,147 ± 0,002	1,36
	30	0,0085 ± 0,0002	2,35	0,0073 ± 0,0001	1,37	0,0067 ± 0,0001	1,49	0,145 ± 0,002	1,38	0,126 ± 0,002	1,59	0,104 ± 0,002	1,92
KP4	7	0,437 ± 0,005	1,14	0,431 ± 0,005	1,16	0,426 ± 0,005	1,17	0,467 ± 0,007	1,50	0,456 ± 0,006	1,32	0,433 ± 0,006	1,39
	15	0,424 ± 0,005	1,18	0,414 ± 0,005	1,21	0,398 ± 0,005	1,26	0,431 ± 0,006	1,39	0,426 ± 0,005	1,17	0,401 ± 0,005	1,25
	30	0,391 ± 0,005	1,28	0,383 ± 0,005	1,31	0,343 ± 0,005	1,46	0,396 ± 0,004	1,01	0,398 ± 0,004	1,01	0,365 ± 0,004	1,10
KP5	7	0,152 ± 0,002	1,32	0,147 ± 0,002	1,36	0,142 ± 0,002	1,41	0,286 ± 0,004	1,40	0,275 ± 0,004	1,45	0,251 ± 0,003	1,20
	15	0,145 ± 0,002	1,38	0,124 ± 0,002	1,61	0,116 ± 0,002	1,72	0,259 ± 0,003	1,16	0,233 ± 0,003	1,29	0,220 ± 0,003	1,36
	30	0,123 ± 0,002	1,63	0,089 ± 0,001	1,12	0,074 ± 0,001	1,35	0,246 ± 0,003	1,22	0,207 ± 0,003	1,45	0,182 ± 0,002	1,10
KP6	7	0,037 ± 0,001	2,70	0,035 ± 0,001	2,86	0,032 ± 0,001	3,13	0,262 ± 0,004	1,53	0,247 ± 0,004	1,62	0,222 ± 0,004	1,80
	15	0,034 ± 0,001	2,94	0,030 ± 0,001	3,33	0,026 ± 0,001	3,85	0,237 ± 0,003	1,27	0,206 ± 0,003	1,46	0,187 ± 0,003	1,60
	30	0,029 ± 0,001	3,45	0,023 ± 0,001	4,35	0,019 ± 0,001	5,26	0,196 ± 0,002	1,02	0,148 ± 0,002	1,35	0,126 ± 0,002	1,59
KP7	7	0,035 ± 0,001	2,86	0,033 ± 0,001	3,03	0,031 ± 0,001	3,23	0,194 ± 0,003	1,55	0,188 ± 0,003	1,60	0,167 ± 0,003	1,80

Tabela 5.34. Nastavak

	15	0,032 ± 0,001	3,13	0,029 ± 0,001	3,45	0,026 ± 0,001	3,85	0,178 ± 0,003	1,69	0,145 ± 0,003	2,07	0,136 ± 0,002	1,47
	30	0,027 ± 0,001	3,70	0,023 ± 0,001	4,35	0,019 ± 0,001	5,26	0,147 ± 0,002	1,36	0,096 ± 0,001	1,04	0,085 ± 0,001	1,18
	7	0,031 ± 0,001	3,23	0,028 ± 0,001	3,57	0,025 ± 0,001	4,00	0,193 ± 0,003	1,55	0,182 ± 0,003	1,65	0,164 ± 0,003	1,83
KP8	15	0,028 ± 0,001	3,57	0,024 ± 0,001	4,17	0,020 ± 0,001	5,00	0,185 ± 0,003	1,62	0,145 ± 0,002	1,38	0,136 ± 0,002	1,47
	30	0,024 ± 0,001	4,17	0,017 ± 0,001	5,88	0,016 ± 0,001	6,25	0,163 ± 0,002	1,23	0,118 ± 0,001	0,85	0,092 ± 0,001	1,09

Tabela 5.35. Sadržaj procijanidina u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja na različitim temperaturama

Uzorak	Vreme (dan)	procijanidin B1						procijanidin B2					
		4 °C		22 °C		35 °C		4 °C		22 °C		35 °C	
		$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)
KP1	7	0,029 ± 0,001	3,45	0,025 ± 0,001	4,00	0,023 ± 0,001	4,35	0,108 ± 0,003	2,78	0,105 ± 0,002	1,90	0,101 ± 0,002	1,98
	15	0,025 ± 0,001	4,00	0,021 ± 0,001	4,76	0,0169 ± 0,0004	2,37	0,086 ± 0,002	2,33	0,072 ± 0,001	1,39	0,052 ± 0,002	3,85
	30	0,0196 ± 0,0005	2,55	0,0188 ± 0,0004	2,13	0,0144 ± 0,0004	2,78	0,071 ± 0,002	2,82	0,052 ± 0,001	1,92	0,034 ± 0,001	2,94
KP2	7	0,027 ± 0,001	3,70	0,025 ± 0,001	4,00	0,023 ± 0,001	4,35	0,048 ± 0,002	4,17	0,046 ± 0,002	4,35	0,042 ± 0,002	4,76
	15	0,022 ± 0,001	4,55	0,0193 ± 0,0005	2,59	0,0136 ± 0,0003	2,21	0,041 ± 0,002	4,88	0,035 ± 0,002	5,71	0,029 ± 0,001	3,45
	30	0,0178 ± 0,0003	1,69	0,0156 ± 0,0004	2,56	0,0095 ± 0,0002	2,11	0,033 ± 0,001	3,03	0,029 ± 0,001	3,45	0,0187 ± 0,0004	2,14
KP3	7	0,039 ± 0,001	2,56	0,038 ± 0,001	2,63	0,035 ± 0,001	2,86	0,0191 ± 0,0003	1,57	0,0189 ± 0,0003	1,59	0,0185 ± 0,0003	1,62
	15	0,033 ± 0,001	3,03	0,031 ± 0,001	3,23	0,022 ± 0,001	4,55	0,0172 ± 0,0003	1,74	0,0167 ± 0,0002	1,20	0,0154 ± 0,0001	0,65
	30	0,025 ± 0,001	4,00	0,022 ± 0,001	4,55	0,0147 ± 0,0002	1,36	0,0149 ± 0,0002	1,34	0,0124 ± 0,0001	0,81	n.d. <sup>a</sup>	-
KP4	7	0,056 ± 0,001	1,79	0,054 ± 0,002	3,70	0,051 ± 0,002	3,92	0,067 ± 0,002	2,99	0,065 ± 0,003	4,62	0,060 ± 0,002	3,33
	15	0,049 ± 0,002	4,08	0,043 ± 0,002	4,65	0,039 ± 0,002	5,13	0,061 ± 0,002	3,28	0,053 ± 0,002	3,77	0,049 ± 0,002	4,08
	30	0,038 ± 0,001	2,63	0,032 ± 0,001	3,13	0,026 ± 0,001	3,85	0,053 ± 0,002	3,77	0,039 ± 0,001	2,56	0,031 ± 0,001	3,23
KP5	7	0,058 ± 0,002	3,45	0,056 ± 0,002	3,57	0,052 ± 0,002	3,85	0,058 ± 0,002	3,45	0,056 ± 0,002	3,57	0,054 ± 0,002	3,70

Tabela 5.35. Nastavak

	15	0,049 ± 0,001	2,04	0,043 ± 0,001	2,33	0,039 ± 0,001	2,56	0,051 ± 0,002	3,92	0,045 ± 0,002	4,44	0,039 ± 0,001	2,56
	30	0,038 ± 0,001	2,63	0,031 ± 0,001	3,23	0,026 ± 0,001	3,85	0,042 ± 0,002	4,76	0,032 ± 0,001	3,13	0,026 ± 0,001	3,85
	7	0,032 ± 0,001	3,13	0,029 ± 0,001	3,45	0,026 ± 0,001	3,85	0,0188 ± 0,0003	1,60	0,0186 ± 0,0003	1,61	0,0182 ± 0,0003	1,65
KP6	15	0,027 ± 0,001	3,70	0,021 ± 0,001	4,76	0,0193 ± 0,0005	2,59	0,0164 ± 0,0003	1,83	0,0143 ± 0,0002	1,40	0,0129 ± 0,0002	1,55
	30	0,0193 ± 0,0005	2,59	0,0168 ± 0,0004	2,38	n.d.	-	0,0135 ± 0,0002	1,48	0,0116 ± 0,0002	1,72	n.d.	-
	7	0,047 ± 0,002	4,26	0,044 ± 0,002	4,55	0,040 ± 0,002	5,00	0,0125 ± 0,0002	1,60	0,0123 ± 0,0002	1,63	0,0120 ± 0,0002	1,67
KP7	15	0,038 ± 0,001	2,63	0,032 ± 0,001	3,13	0,029 ± 0,001	3,45	0,0107 ± 0,0002	1,87	0,0098 ± 0,0001	1,02	0,0084 ± 0,0001	1,19
	30	0,029 ± 0,001	3,45	0,019 ± 0,001	5,26	0,0182 ± 0,0005	2,75	0,0093 ± 0,0001	1,08	0,0082 ± 0,0001	1,22	0,0059 ± 0,0001	1,69
	7	0,0188 ± 0,0002	1,06	0,0185 ± 0,0003	1,62	0,0182 ± 0,0004	1,65	0,0138 ± 0,0002	1,45	0,0135 ± 0,0002	1,48	0,0131 ± 0,0002	1,53
KP8	15	0,0179 ± 0,0001	0,56	0,0166 ± 0,0001	0,60	0,0149 ± 0,0003	2,01	0,0116 ± 0,0002	1,72	0,0107 ± 0,0001	0,93	0,0088 ± 0,0001	1,14
	30	0,0157 ± 0,0004	2,55	0,0145 ± 0,0001	0,69	0,0126 ± 0,0002	1,59	0,0095 ± 0,0001	2,11	0,0074 ± 0,0001	1,35	0,0056 ± 0,0001	1,79

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

Tabela 5.35. Nastavak

Uzorak	Vreme (dan)	procijanidin B3						procijanidin B4					
		4 °C		22 °C		35 °C		4 °C		22 °C		35 °C	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	
		RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
	7	0,0097 ± 0,0002	2,06	0,0094 ± 0,0002	2,13	0,0092 ± 0,0002	2,17	0,0089 ± 0,0001	1,12	0,0086 ± 0,0001	1,16	0,0082 ± 0,0001	1,22
KP1	15	0,0090 ± 0,0002	2,22	0,0082 ± 0,0002	2,44	0,0076 ± 0,0001	1,32	0,0081 ± 0,0001	1,23	0,0071 ± 0,0001	1,41	0,0066 ± 0,0001	1,52
	30	0,0079 ± 0,0001	1,27	0,0065 ± 0,0001	1,54	0,0053 ± 0,0001	1,89	0,0072 ± 0,0001	1,39	0,0049 ± 0,0001	2,04	n.d. <sup>a</sup>	-
KP2	7	0,0162 ± 0,0003	1,85	0,0160 ± 0,0002	1,25	0,0157 ± 0,0002	1,27	0,0073 ± 0,0002	2,74	0,0071 ± 0,0002	2,82	0,0068 ± 0,0002	2,94
	15	0,0155 ± 0,0002	1,29	0,0147 ± 0,0002	1,36	0,0132 ± 0,0002	1,52	0,0065 ± 0,0002	3,08	0,0059 ± 0,0001	1,69	0,0053 ± 0,0001	1,89

Tabela 5.35. Nastavak

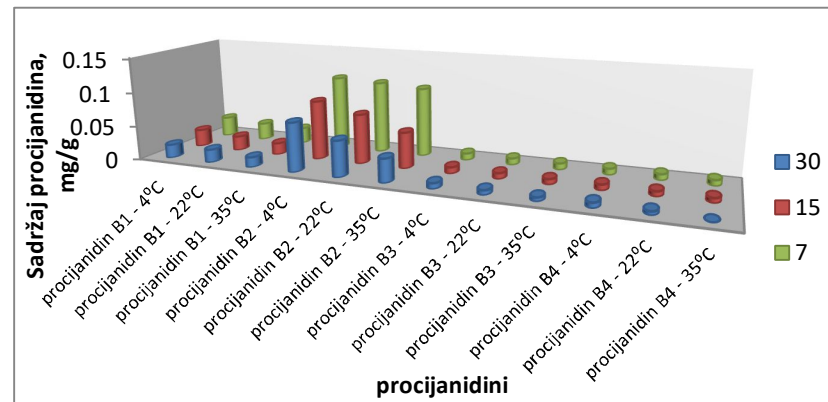
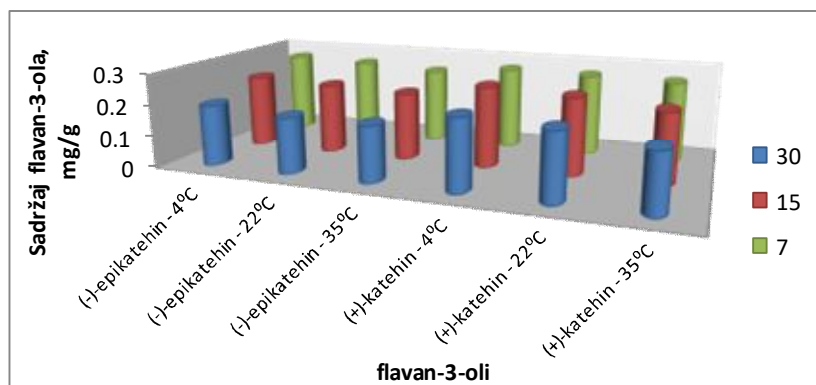
	30	0,0146 ± 0,0002	1,37	0,0116 ± 0,0002	1,72	0,0093 ± 0,0001	1,08	0,0054 ± 0,0001	1,85	0,0042 ± 0,0001	2,38	n.d.	-
	7	0,0114 ± 0,0002	1,75	0,0112 ± 0,0002	1,79	0,0109 ± 0,0002	1,83	0,0049 ± 0,0001	2,04	0,0046 ± 0,0001	2,17	0,0042 ± 0,0001	2,38
KP3	15	0,0107 ± 0,0002	1,87	0,0096 ± 0,0001	1,04	0,0091 ± 0,0001	1,10	0,0041 ± 0,0001	2,44	0,0034 ± 0,0001	2,94	0,0032 ± 0,0001	3,13
	30	0,0098 ± 0,0001	1,02	0,0073 ± 0,0001	1,37	n.d.	-	0,0032 ± 0,0001	3,13	0,0022 ± 0,0001	4,55	n.d.	-
	7	0,0235 ± 0,0003	1,28	0,0232 ± 0,0003	1,29	0,0229 ± 0,0003	1,31	0,0084 ± 0,0002	3,57	0,0082 ± 0,0002	2,44	0,0079 ± 0,0002	2,53
KP4	15	0,0228 ± 0,0003	1,32	0,0229 ± 0,0003	1,31	0,0195 ± 0,0003	1,54	0,0078 ± 0,0002	3,85	0,0069 ± 0,0001	1,45	0,0062 ± 0,0001	1,61
	30	0,0119 ± 0,0002	1,68	0,0178 ± 0,0002	1,12	0,0134 ± 0,0002	1,49	0,0067 ± 0,0001	1,49	0,0047 ± 0,0001	2,13	0,0041 ± 0,0001	2,44
	7	0,0161 ± 0,0003	1,86	0,0158 ± 0,0003	1,90	0,0155 ± 0,0003	1,94	0,0126 ± 0,0003	2,38	0,0124 ± 0,0003	2,42	0,0120 ± 0,0003	2,50
KP5	15	0,0154 ± 0,0002	1,30	0,0142 ± 0,0002	1,41	0,0139 ± 0,0002	1,44	0,0119 ± 0,0002	1,68	0,0093 ± 0,0002	2,15	0,0087 ± 0,0002	2,30
	30	0,0143 ± 0,0002	1,40	0,0129 ± 0,0002	1,55	0,0102 ± 0,0002	1,96	0,0108 ± 0,0002	1,85	0,0069 ± 0,0002	2,90	0,0061 ± 0,0002	3,28
	7	0,0121 ± 0,0003	2,48	0,0118 ± 0,0003	2,54	0,0114 ± 0,0002	1,75	0,0105 ± 0,0003	2,86	0,0101 ± 0,0002	1,98	0,0098 ± 0,0002	2,04
KP6	15	0,0116 ± 0,0002	1,72	0,0107 ± 0,0002	1,87	0,0099 ± 0,0001	1,01	0,0099 ± 0,0002	2,02	0,0087 ± 0,0002	2,30	0,0073 ± 0,0001	1,37
	30	0,0102 ± 0,0002	1,96	0,0082 ± 0,0001	1,22	0,0071 ± 0,0001	1,41	0,0089 ± 0,0001	1,12	0,0065 ± 0,0002	3,08	0,0051 ± 0,0001	1,96
	7	0,0067 ± 0,0002	2,99	0,0065 ± 0,0002	3,08	0,0062 ± 0,0002	3,23	0,0056 ± 0,0002	3,57	0,0052 ± 0,0002	3,85	0,0048 ± 0,0001	2,08
KP7	15	0,0061 ± 0,0002	3,28	0,0054 ± 0,0001	1,85	0,0048 ± 0,0001	2,08	0,0049 ± 0,0001	2,04	0,0041 ± 0,0001	2,44	n.d.	-
	30	0,0052 ± 0,0002	3,85	0,0041 ± 0,0001	2,44	0,0033 ± 0,0001	3,03	0,0040 ± 0,0001	2,50	0,0029 ± 0,0001	3,45	n.d.	-
	7	0,0125 ± 0,0003	2,40	0,0123 ± 0,0002	1,63	0,0120 ± 0,0002	1,67	0,0116 ± 0,0002	1,72	0,0113 ± 0,0003	2,65	0,0109 ± 0,0003	2,75
KP8	15	0,0119 ± 0,0002	1,68	0,0112 ± 0,0002	1,79	0,0104 ± 0,0002	1,92	0,0108 ± 0,0002	1,85	0,0094 ± 0,0002	2,13	0,0087 ± 0,0002	2,30
	30	0,0110 ± 0,0002	1,82	0,0086 ± 0,0001	2,33	0,0069 ± 0,0001	2,90	0,0097 ± 0,0001	2,06	0,0065 ± 0,0001	3,08	0,0056 ± 0,0001	3,57

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

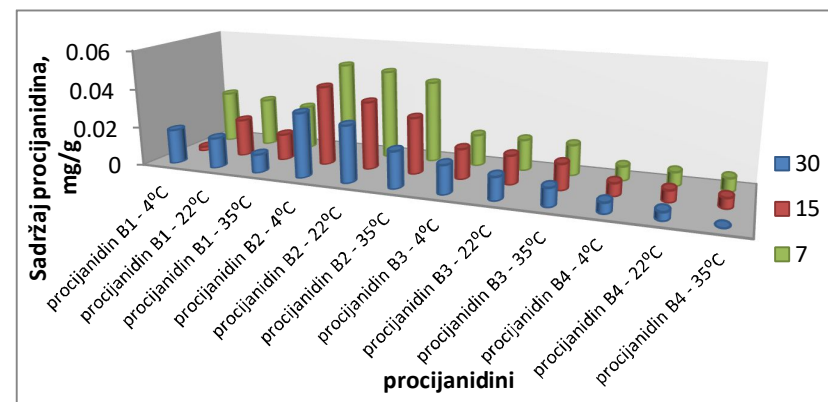
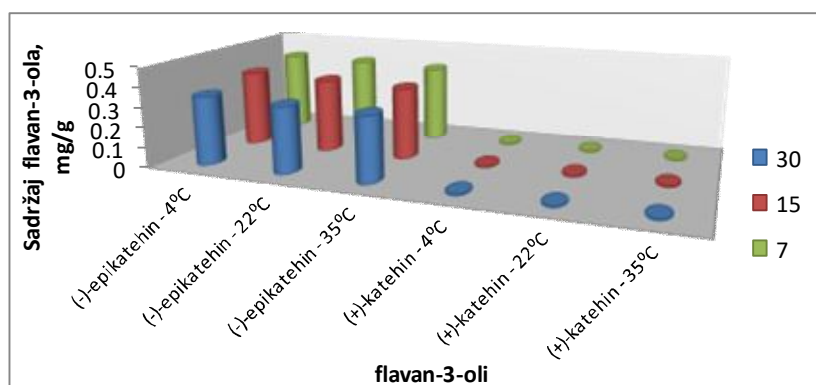
**Tabela 5.36.** Sadržaj antocijana u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja na različitim temperaturama

Uzorak	Vreme (dan)	Cijanidin-3-galaktozid $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)						Cijanidin-3-arabinozid $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)					
		4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)
KP1	7	0,032 ± 0,002	6,25	0,029 ± 0,001	3,45	0,020 ± 0,001	5,00	0,056 ± 0,001	1,79	0,037 ± 0,001	2,70	0,0250 ± 0,0005	2,00
	15	0,027 ± 0,001	3,70	0,021 ± 0,001	4,76	0,0170 ± 0,0006	3,53	0,0447 ± 0,001	2,24	0,031 ± 0,001	3,23	0,0210 ± 0,0002	0,95
	30	0,020 ± 0,001	5,00	0,0104 ± 0,0004	0,18	0,0075 ± 0,0003	4,00	0,0281 ± 0,001	3,56	0,0170 ± 0,0006	3,53	0,0111 ± 0,0002	1,80
KP4	7	0,039 ± 0,002	5,13	0,031 ± 0,002	6,45	0,027 ± 0,002	1,10	0,048 ± 0,001	2,08	0,039 ± 0,001	2,56	0,032 ± 0,001	3,12
	15	0,025 ± 0,001	4,00	0,023 ± 0,001	4,35	0,0179 ± 0,0005	2,79	0,036 ± 0,001	2,78	0,027 ± 0,001	3,70	0,021 ± 0,001	4,76
	30	0,0140 ± 0,0005	3,57	0,0121 ± 0,0004	3,31	0,0110 ± 0,0004	3,64	0,024 ± 0,001	4,17	0,020 ± 0,001	5,00	0,0151 ± 0,0004	2,65

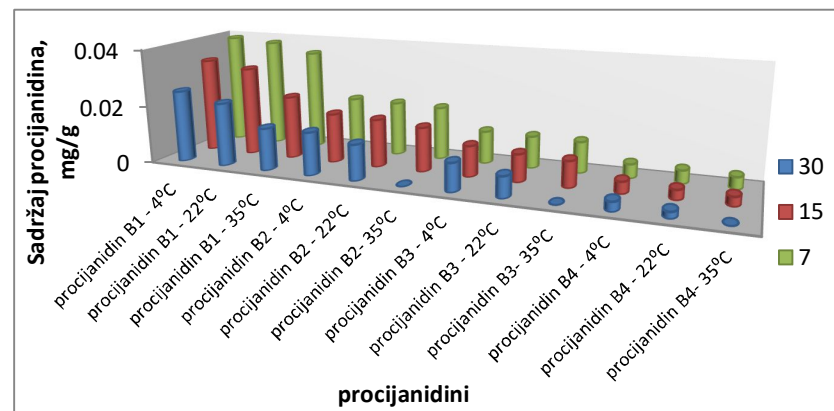
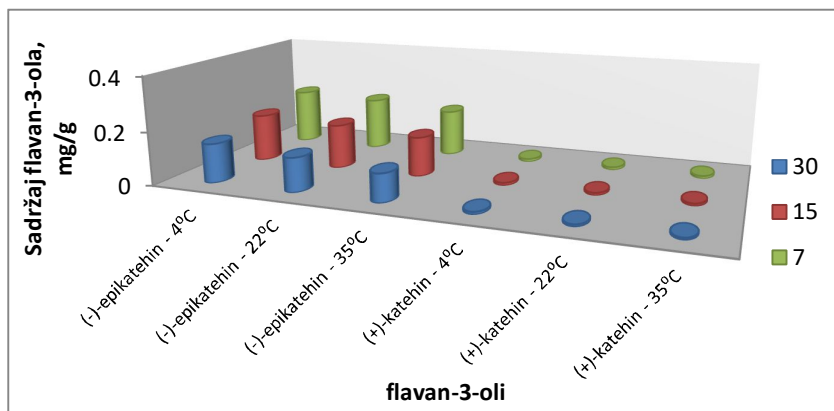
Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola i procijanidina tokom vremena čuvanja uzoraka na različitim temperaturama, prikazan je i grafički na slikama 5.34. – 5.41., dok je sadržaj antocijana grafički prikazan na slikama 5.42. i 5.43.



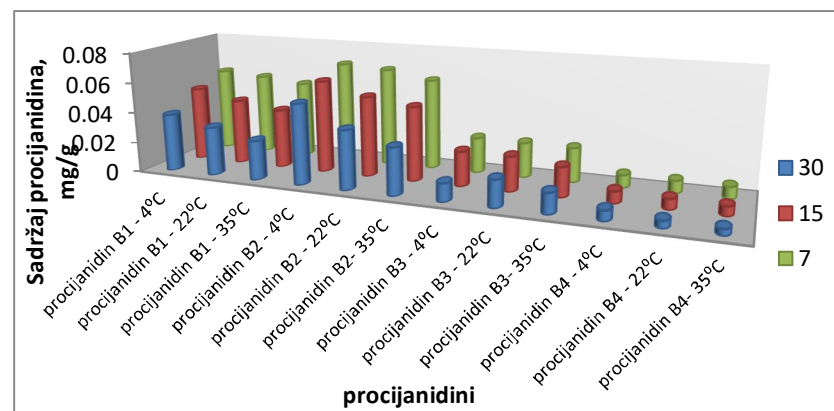
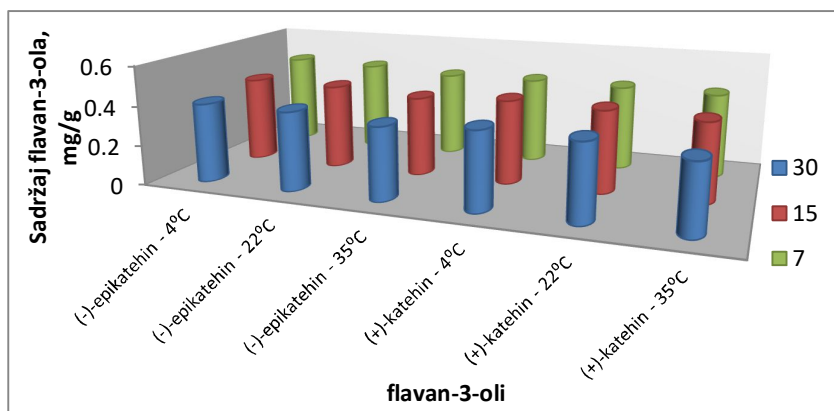
Slika 5.34. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaou u prahu KP1 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja



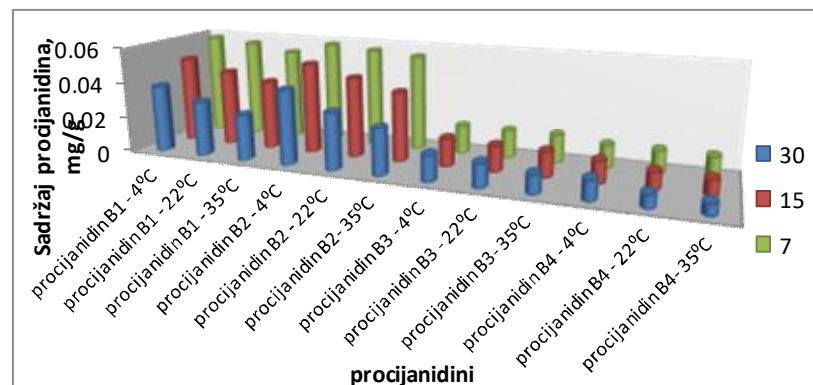
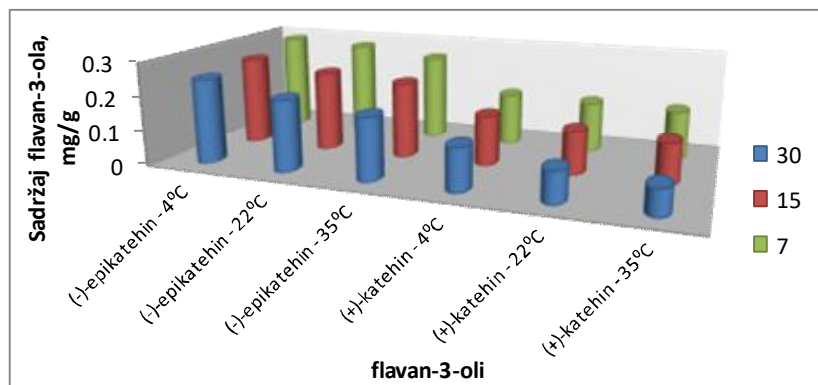
Slika 5.35. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaou u prahu KP2 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja



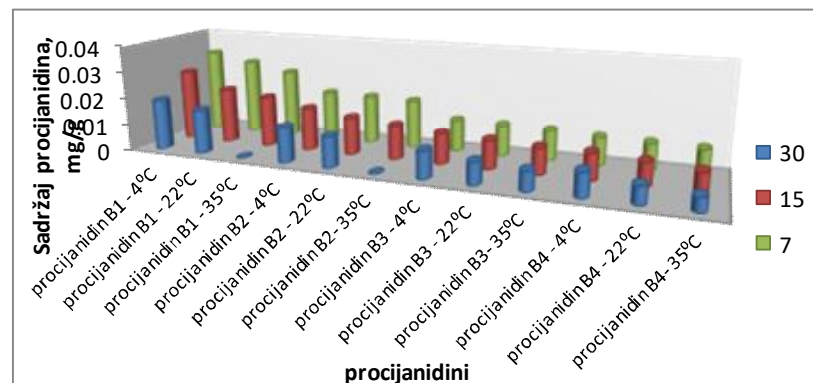
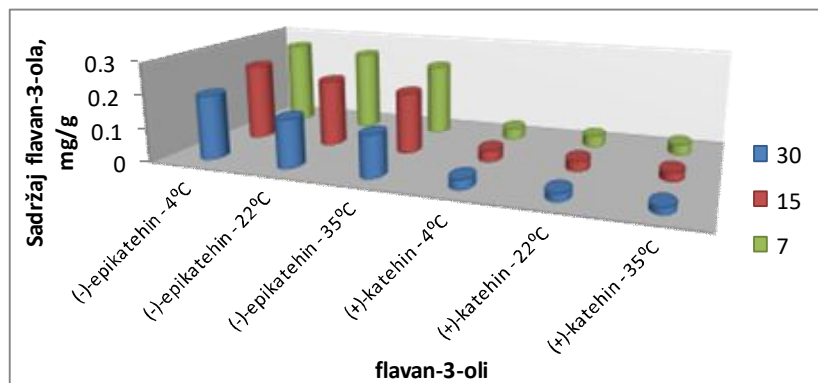
Slika 5.36. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaou u prahu KP3 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja



Slika 5.37. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaou u prahu KP4 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja

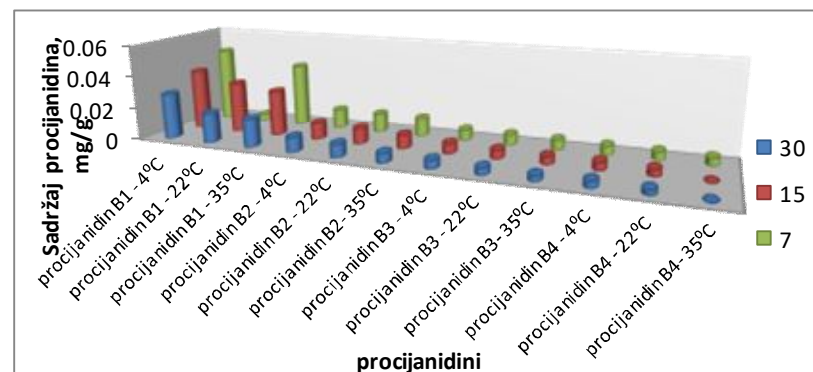
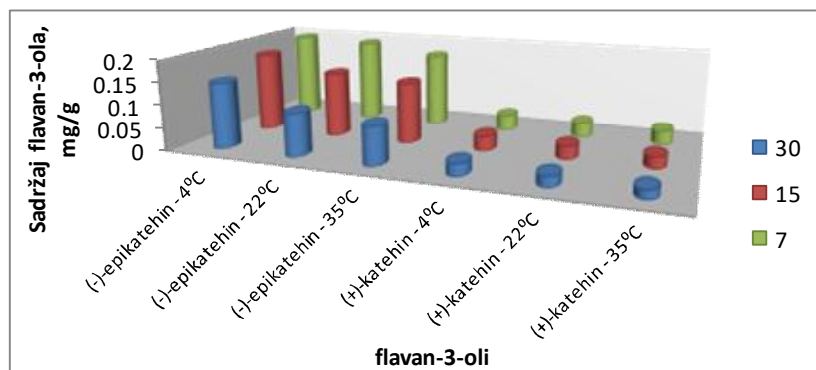


Slika 5.38. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaoa u prahu KP5 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja

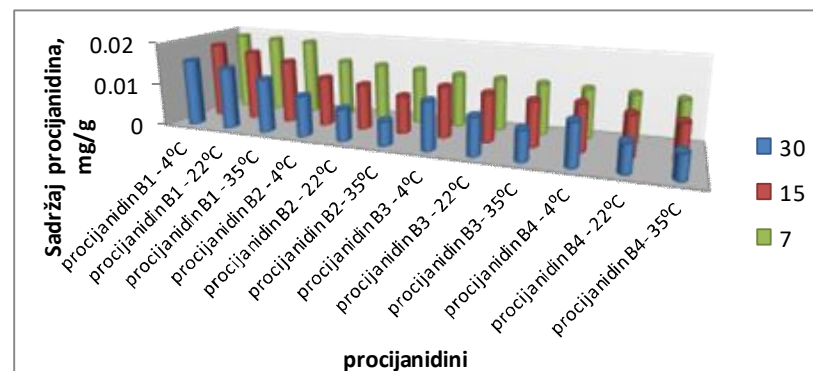
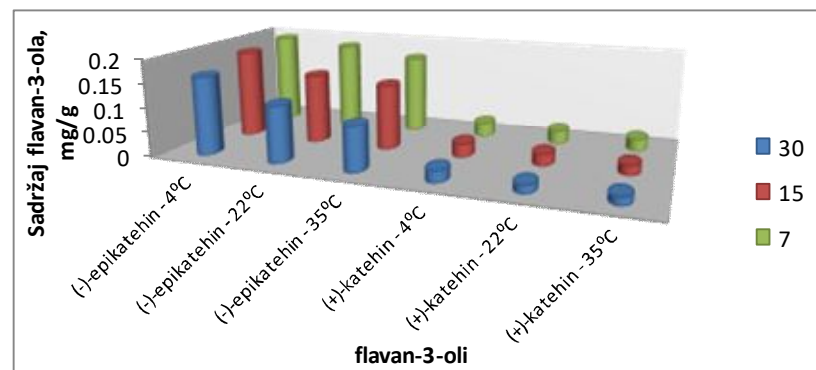


Slika 5.39. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaoa u prahu KP6 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja

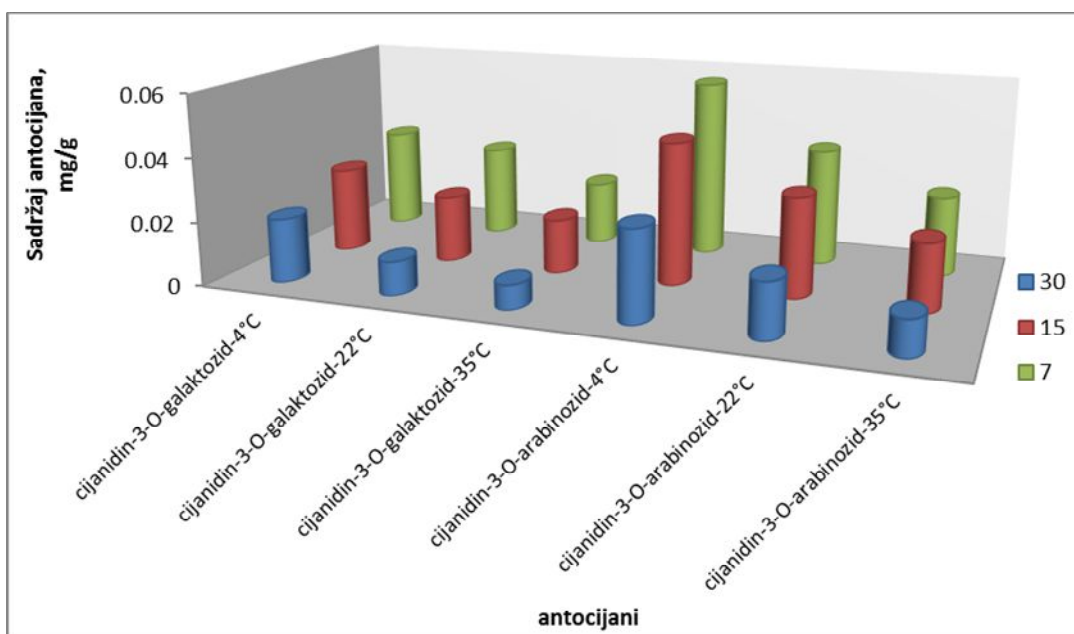




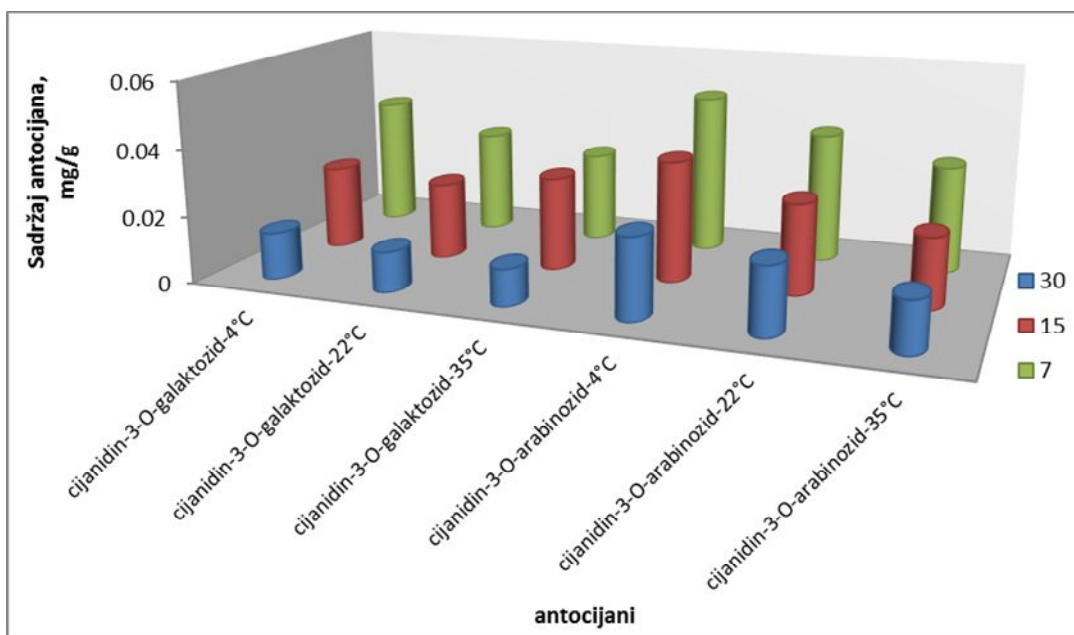
Slika 5.40. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaou u prahu KP7 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja



Slika 5.41. Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku kakaou u prahu KP8 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja



Slika 5.42. Sadržaj antocijana u uzorku kakaou u prahu KP1 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja



Slika 5.43. Sadržaj antocijana u uzorku kakaou u prahu KP4 nakon 7, 15 i 30 dana čuvanja

Linearna zavisnost koncentracije od vremena čuvanja potvrđuje, da degradacija pojedinačnih flavonoida (slike 5.44. i 5.45.) i ukupnih flavonoida u uzorcima kakaou u prahu, prati kinetiku reakcije prvog reda (slika 5.46.). Kinetička jednačina reakcije prvog reda je data sledećim izrazom (*Atkins i de Paula*, 2010; *Kirca i Cemeroglu*, 2003; *Harbourne i sar.*, 2008):

$$c = c_0 \exp(-kt) \quad (5.3)$$

gde je:

$c$  – koncentracija ukupnih flavonoida nakon vremena  $t$  (mg/g),

$c_0$  – početna koncentracija ukupnih flavonoida (mg/g),

$t$  – vreme trajanja reakcije (min),

$k$  – konstanta brzine reakcije prvog reda ( $\text{min}^{-1}$ ).

Vreme koje je potrebno da se za polovinu smanji početna koncentracija flavonoida je vreme poluraspada ( $t_{1/2}$ ) i izračunato je prema jednačini (5.4) (*Atkins i de Paula*, 2010):

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k} = 0,693/k \quad (5.4)$$

Kao što se može videti iz izraza (5.4),  $t_{1/2}$  reakcije prvog reda nije funkcija koncentracije datih učesnika reakcije, već je obrnuto proporcionalno konstanti brzine reakcije  $k$ .

Konstanta brzine reakcije je funkcija temperature, što je dato Arenijusovom jednačinom (*Atkins i de Paula*, 2010; *Moldovan i sar.*, 2012):

$$k = A \times e^{-E_a/RT} \quad (5.5)$$

gde je:

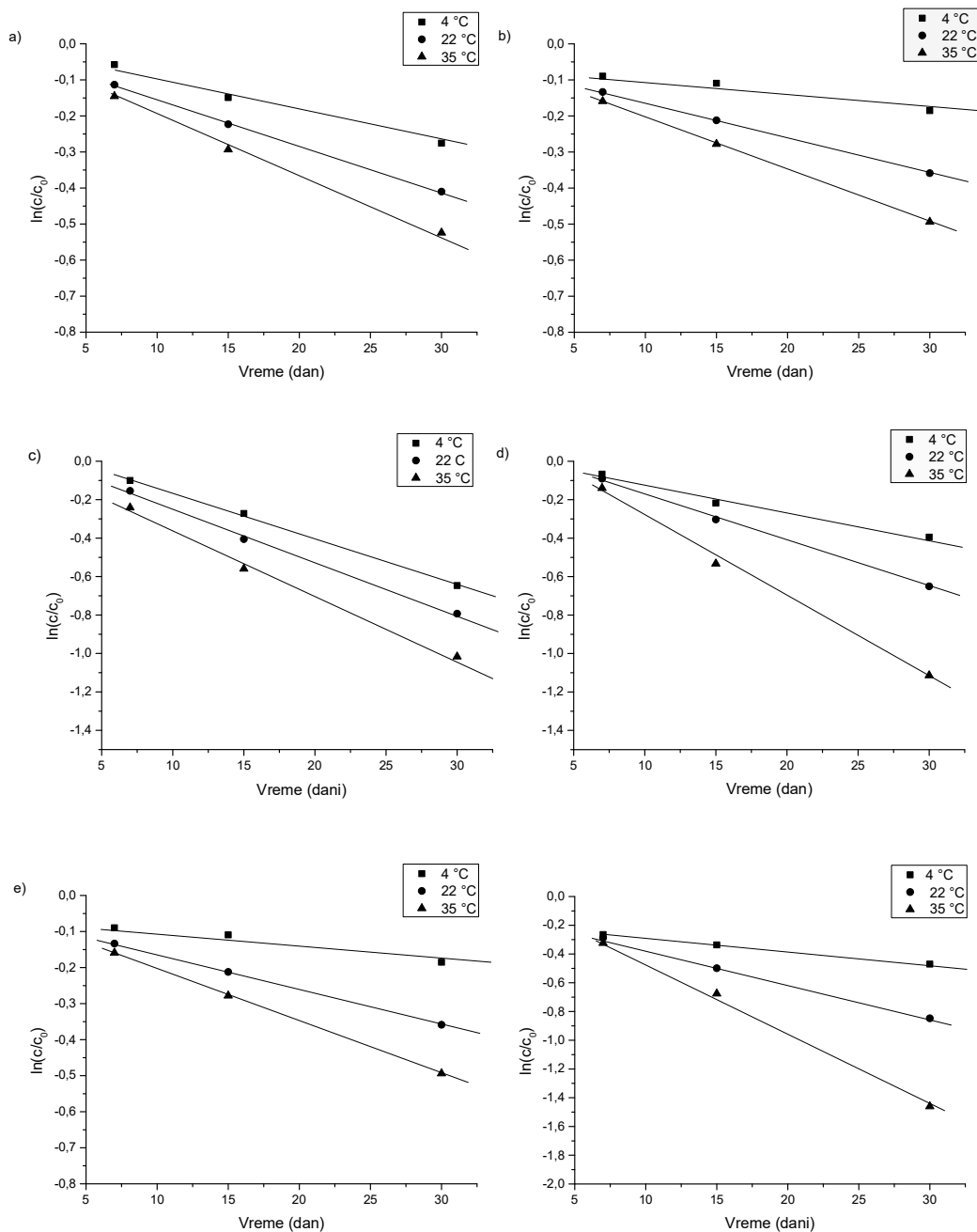
$A$  – predeksponencijalni faktor ( $\text{s}^{-1}$ ),

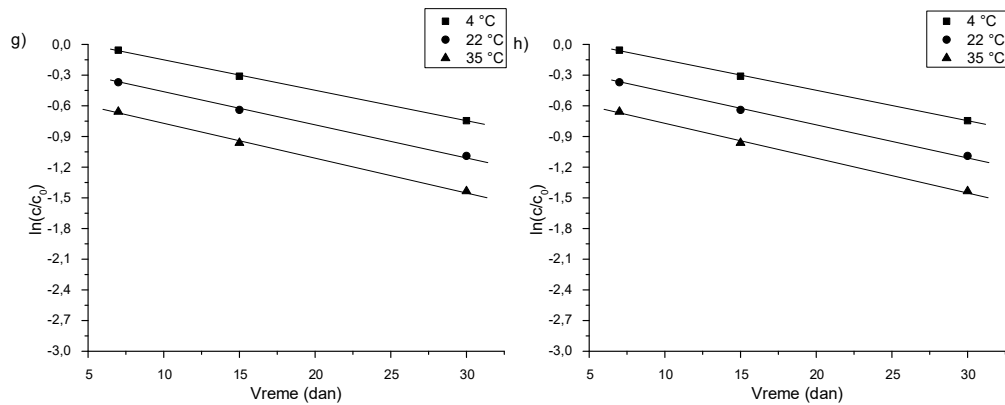
$E_a$  – energija aktivacije (kJ/mol),

$R$  – univerzalna gasna konstanta (8,314 J/molK),

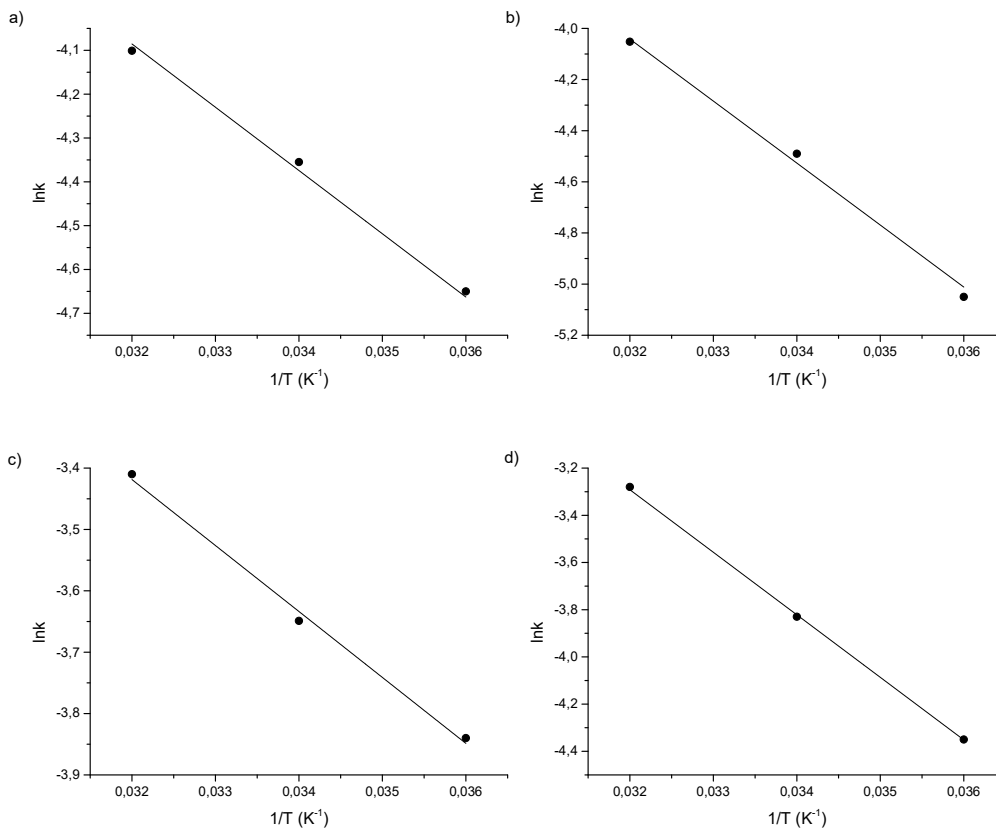
$T$  – apsolutna temperatura (K).

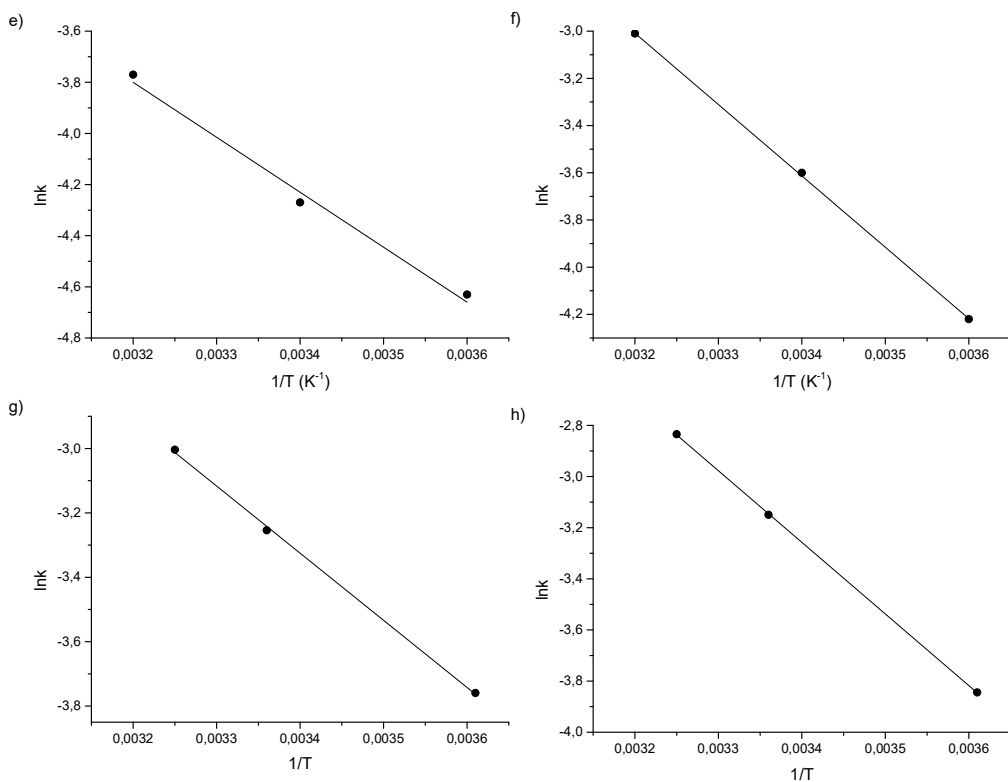
Iz grafičke zavisnosti  $\ln(c/c_0) = f(t)$ , na osnovu nagiba datih pravih (slika 5.44.), izračunate su konstante brzine reakcije degradacije. Iz logaritamskog oblika Arenijusove jednačine, na osnovu nagiba datih pravih (slika 5.45.), izračunate su vrednosti energije aktivacije za (+)-katehin (20,4 kJ/mol), (-)-epikatehin (12,5 kJ/mol) i procijanidine B1 (9,4 kJ/mol), B2 (21,6 kJ/mol), B3 (19,4 kJ/mol) i B4 (23,7 kJ/mol).



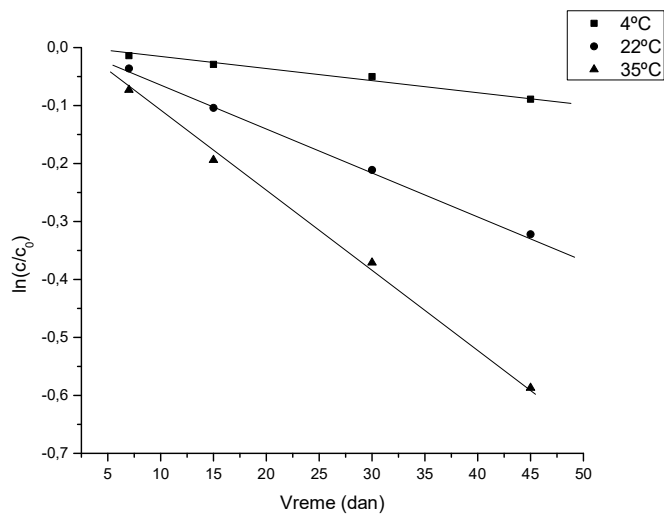


**Slika 5.44.** Degradacija katehina, procijanidina i antocijana u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja na različitim temperaturama: a) (-)-epikatehin, b) (+)-katehin, c) procijanidin B1, d) procijanidin B2, e) procijanidin B3, f) procijanidin B4, g) cijanidin-3-*O*-galaktozid, h) cijanidin-3-*O*-arabinozid





**Slika 5.45.** Grafička zavisnost logaritma konstante brzine reakcije degradacije u funkciji od recipročne vrednosti temperature čuvanja: a) (-)-epikatehin, b) (+)-katehin, c) procijanidin B1, d) procijanidin B2, e) procijanidin B3, f) procijanidin B4, g) cijanidin-3-*O*-galaktozid, h) cijanidin-3-*O*-arabinozid



**Slika 5.46.** Degradacija ukupnih flavonoida u ispitivanim uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja na različitim temperaturama

Rezultati HPLC analize (tabele 5.34. – 5.36.) su pokazali da je, nakon 30 dana čuvanja kakaou u prahu u temperaturnom opsegu od 4 °C do 35 °C, procenat gubitka (+)-katehina od 14,4% do 31,8%, (-)-epikatehina od 19,6% do 36,0%, procijanidina B1 od 34,1% do 60,5%, B2 od 28,7% do 64,8%, B3 od 21,5% – 48,9%, i B4 od 19,5% do 61,9%, cijanidina-3-*O*-galaktozida od 52,1% do 73,9% i cijanidina-3-*O*-arabinozida od 49,9% do 74,8%.

U tabeli 5.37. ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n=3$ ) je dat uticaj temperature čuvanja (4 °C, 22 °C i 35 °C) i zagrevanja (95 °C, 100 °C, 110 °C i 125 °C) na degradaciju ukupnih flavonoida u uzorcima kakaou u prahu.

**Tabela 5.37.** Koncentracija ukupnih flavonoida (UF) u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja i zagrevanja na različitim temperaturama

Temperatura čuvanja (°C)	Vreme (dan)	UF $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Temperatura zagrevanja (°C)	Vreme (dan)	UF $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)
4	7	14,0 ± 0,3	2,14	95	25	12,3 ± 0,1	0,82
	15	13,8 ± 0,3	2,17		50	11,6 ± 0,2	1,72
	30	13,5 ± 0,2	1,48		70	10,7 ± 0,1	0,99
	45	13,0 ± 0,2	1,54		100	10,1 ± 0,1	0,99
22	7	13,7 ± 0,3	2,19	100	25	11,9 ± 0,2	1,68
	15	12,8 ± 0,2	1,56		50	10,2 ± 0,1	0,98
	30	11,5 ± 0,2	1,74		70	9,6 ± 0,1	1,04
	45	10,3 ± 0,2	1,94		100	8,1 ± 0,1	1,23
35	7	13,2 ± 0,3	2,27	110	10	11,5 ± 0,2	1,73
	15	11,7 ± 0,2	1,71		20	10,9 ± 0,2	1,83
	30	9,8 ± 0,2	2,04		30	9,9 ± 0,1	1,01
	125	45	7,9 ± 0,1	1,27	40	8,9 ± 0,1	1,12
					5	11,4 ± 0,4	3,51
					10	10,5 ± 0,3	2,86
				15	9,5 ± 0,2	2,11	
				20	8,0 ± 0,2	2,51	

$c_0 = 14,2 \pm 0,3$  mg/g

Parametri kinetike degradacije ukupnih flavonoida dati su u tabeli 5.38.

**Tabela 5.38.** Konstanta brzine ( $k$ ), vreme poluraspada ( $t_{1/2}$ ) i energija aktivacije ( $E_a$ ) reakcije degradacije ukupnih flavonoida u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja i zagrevanja

Temperatura čuvanja (°C)	$k \times 10^3$ (dan <sup>-1</sup> )	$r^2$	$t_{1/2}$ (dan)	$E_a$ (kJ/mol)	$Q_{10}$ 4 – 22 °C	$Q_{10}$ 22 – 35 °C	
4	1,9 ± 0,1	0,9905	365				
22	6,9 ± 0,3	0,9961	100	121,3	2,2	1,5	
35	13,2 ± 0,4	0,9971	53				
T (°C)	$k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> )	$r^2$	$t_{1/2}$ (h)	$E_a$ (kJ/mol)	$Q_{10}$ 95 – 100 °C	$Q_{10}$ 100 – 110 °C	$Q_{10}$ 110 – 125 °C
95	3,4 ± 0,1	0,9899	3,4				
100	5,6 ± 0,2	0,9945	2,1	144,2	2,7	2,1	1,8
110	11,8 ± 0,4	0,9959	1,0				
125	29,1 ± 0,7	0,9847	0,4				

Iz grafičke zavisnosti  $\ln(c/c_0) = f(t)$  je određena brzina degradacije (slika 5.46.). Na brzinu i stepen degradacije ukupnih flavonoida utiče temperatura na kojoj se čuvaju uzorci. Utvrđeno je da je degradacija najbrža na 35 °C, a najsporija na 4 °C. Reakcija degradacije prati kinetiku reakcije prvog reda, što je u skladu sa literaturnim podacima (*Kyi i sar.*, 2005).

Vrednosti vremena poluraspada ( $t_{1/2}$ ) se kreću od 365 do 53 dana, za uzorke kakaou u prahu čuvane na 4 °C, 22 °C i 35 °C. Čuvanjem uzoraka na 4 °C, vreme poluraspada se više od 3 puta povećava u odnosu na vreme poluraspada uzoraka čuvanih na 22 °C (tabela 5.38.). Uzorci čuvani 45 dana na 4 °C, su i dalje imali preko 91% flavonoida, dok su uzorci čuvani na temperaturi od 22 °C imali oko 72% flavonoida.

Vrednost temperaturnog koeficijenta  $Q_{10}$  je izračunata iz Arenijusove jednačine (*Atkins i de Paula*, 2010; *Moldovan i David*, 2014):

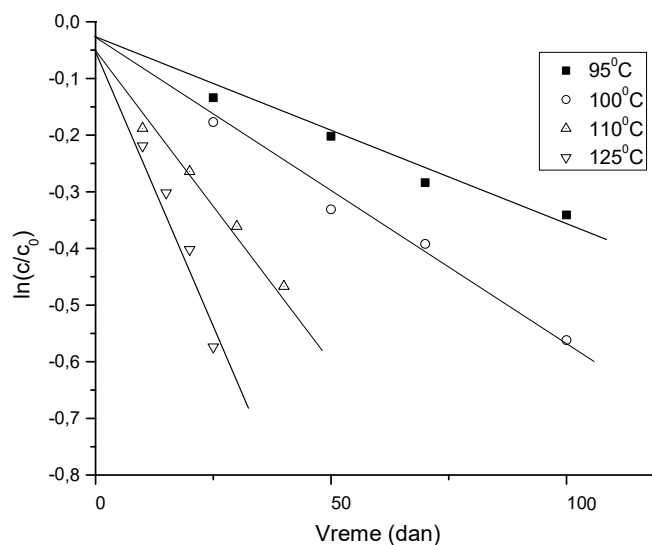
$$Q_{10} = (k_2/k_1)^{10/T_2-T_1} \quad (5.6)$$

Vrednost koeficijenta  $Q_{10}$  je 2,2 za interval temperature 4 – 22 °C i 1,5 za interval temperature 22 – 35 °C (tabela 5.38.). Viša vrednost koeficijenta  $Q_{10}$ , na temperaturi čuvanja od 4 °C do 22 °C, ukazuje da na nižim temperaturama čuvanja promena temperature dovodi



do brže degradacije flavonoida nego na višim temperaturama čuvanja (22 – 35 °C). Takođe, vrednosti koeficijenta  $Q_{10}$  opadaju sa povećanjem temperature zagrevanja.

Ispitivanje temperature zagrevanja je takođe pokazalo da reakcija degradacije prati kinetiku reakcije prvog reda (slika 5.47.). Potvrdu toga daju i visoke vrednosti za koeficijente determinacije ( $r^2$ ) (tabela 5.38.). Na osnovu slike 5.47. može se zaključiti da brzina reakcije degradacije raste sa povećanjem vremena zagrevanja i temperature zagrevanja. Procenat razlaganja flavonoida u prvih 20 – 25 minuta značajno zavisi od temperature i kreće se u intervalu od 13% na 95 °C do 44% na 125 °C. Vrednosti vremena poluraspada,  $t_{1/2}$ , variraju od 3,4 h do 0,4 h za uzorke kakaou u prahu, koji su zagrevani na 95 °C, 100 °C, 110 °C i 125 °C.



**Slika 5.47.** Degradacija flavonoida u zavisnosti od vremena zagrevanja na različitim temperaturama

Da temperatura čuvanja utiče na stabilnost antocijana i katehina potvrđeno je u istraživanjima, koja su se odnosila na sokove (*Buckow i sar.*, 2010; *Gancel i sar.*, 2011) i čajeve (*Bazinet i sar.*, 2010).

Vreme poluraspada flavonoida pokazuje da je degradacija katehina i procijanidina znatno osetljivija na visokim temperaturama tokom procesa zagrevanja, nego na temperaturama čuvanja uzoraka. Do istih rezultata za antocijane su došli i *Patras i saradnici* (2010). Takođe, na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da intenzitet i trajanje

zagrevanja ima veliki uticaj na stabilnost polifenolnih jedinjenja u namirnicama, što je, takođe, u skladu sa literaturnim podacima (*Wollgast i Anklam, 2000a; Patras i sar., 2010*).

Rezultati sadržaja ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ) pojedinačnih i ukupnih flavonoida u ispitivanom uzorku crne čokolade dat je u tabelama 5.39. i 5.40. Uzet je uzorak crne čokolade sa najvećim sadržajem ukupnih i pojedinačnih polifenola. Među flavan-3-olima, sadržaj (-)-epikatehina je veći od sadržaja (+)-katehina. Najzastupljeniji procijanidin je B2, a zatim slede procijanidini B3, B1 i B4.

Takođe, HPLC analiza je pokazala da je nakon 45 dana čuvanja crne čokolade u temperaturnom opsegu od 4 °C do 35 °C, procenat gubitka (+)-katehina od 16,8% do 33,1%, (-)-epikatehina od 10,3% do 25,8%, procijanidina B1 od 13,6% do 33,3%, B2 od 9,1% do 24,1%, B3 od 8,4% do 27,0% i B4 od 14,3% do 32,4% (tabele 5.39. i 5.40.).

**Tabela 5.39.** Sadržaj flavan-3-ola u uzorku crne čokolade tokom čuvanja na različitim temperaturama

Vreme (dan)	(+) -katehin $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)						(-) -epikatehin $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)					
	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)
7	0,185 ± 0,003	2,70	0,180 ± 0,005	2,78	0,172 ± 0,005	2,91	0,476 ± 0,009	1,89	0,469 ± 0,009	1,92	0,457 ± 0,008	1,75
15	0,178 ± 0,003	2,25	0,169 ± 0,003	1,78	0,158 ± 0,003	1,90	0,461 ± 0,009	1,95	0,445 ± 0,008	1,82	0,426 ± 0,008	1,88
30	0,169 ± 0,002	2,37	0,153 ± 0,003	1,96	0,135 ± 0,003	2,22	0,448 ± 0,008	1,79	0,418 ± 0,007	1,79	0,377 ± 0,007	1,86
45	0,154 ± 0,003	1,95	0,138 ± 0,002	1,45	0,115 ± 0,002	1,74	0,427 ± 0,008	1,87	0,391 ± 0,007	1,89	0,339 ± 0,007	2,06

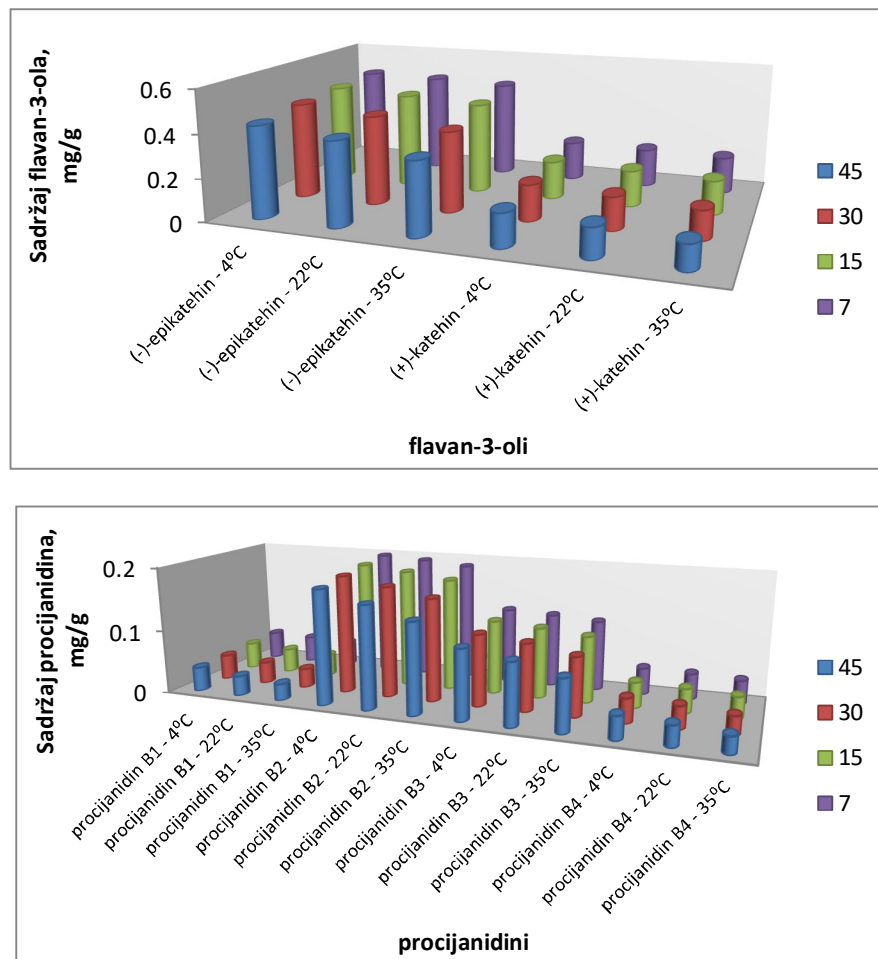
**Tabela 5.40.** Sadržaj procijanidina u uzorku crne čokolade tokom čuvanja na različitim temperaturama

Vreme (dan)	Procijanidin B1 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)						Procijanidin B2 $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)					
	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)
7	0,044 ± 0,001	2,27	0,042 ± 0,001	2,44	0,039 ± 0,001	2,56	0,197 ± 0,006	3,05	0,193 ± 0,006	3,11	0,187 ± 0,006	3,21
15	0,042 ± 0,001	2,38	0,038 ± 0,001	2,63	0,035 ± 0,001	2,86	0,192 ± 0,006	3,13	0,185 ± 0,006	3,24	0,176 ± 0,006	3,41
30	0,039 ± 0,001	2,56	0,034 ± 0,001	2,94	0,030 ± 0,001	3,33	0,186 ± 0,005	2,69	0,174 ± 0,005	2,87	0,161 ± 0,005	3,11
45	0,038 ± 0,001	2,63	0,031 ± 0,001	3,23	0,026 ± 0,001	3,03	0,179 ± 0,005	2,79	0,161 ± 0,005	3,11	0,142 ± 0,004	2,82

**Tabela 5.40.** Nastavak

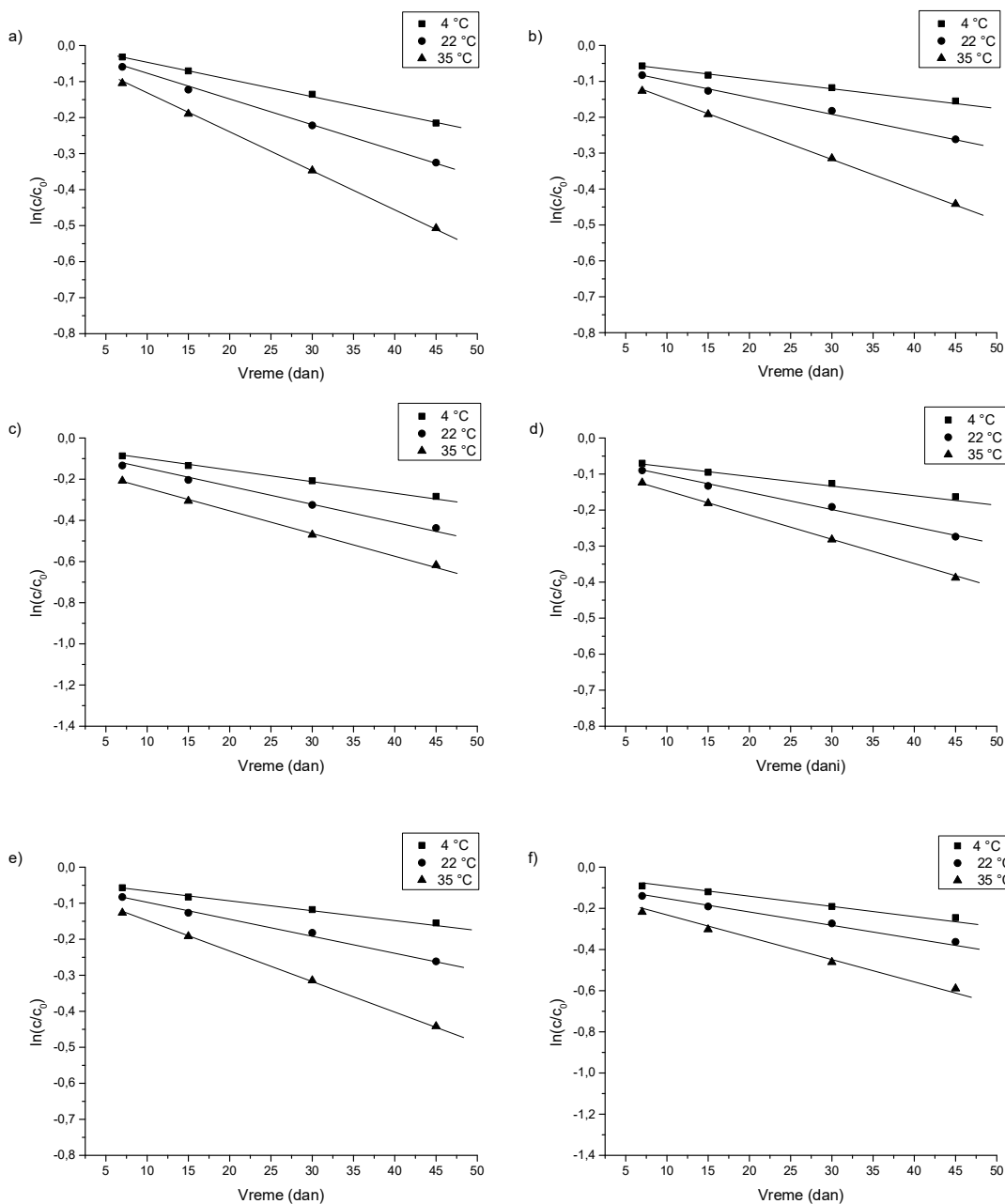
Vreme (dan)	Procijanidin B3						Procijanidin B4					
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)		$c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	
	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)	4 °C	RSD (%)	22 °C	RSD (%)	35 °C	RSD (%)
7	0,119 ± 0,003	2,52	0,116 ± 0,003	2,59	0,111 ± 0,003	2,70	0,042 ± 0,001	2,38	0,040 ± 0,001	2,50	0,037 ± 0,001	2,70
15	0,116 ± 0,003	2,59	0,111 ± 0,003	2,70	0,104 ± 0,002	1,92	0,040 ± 0,001	2,50	0,038 ± 0,001	2,63	0,034 ± 0,001	2,94
30	0,112 ± 0,003	2,68	0,105 ± 0,002	1,91	0,092 ± 0,002	2,17	0,038 ± 0,001	2,63	0,035 ± 0,001	2,86	0,029 ± 0,001	3,45
45	0,109 ± 0,003	2,75	0,097 ± 0,002	2,06	0,081 ± 0,002	2,47	0,036 ± 0,001	2,78	0,032 ± 0,001	3,13	0,026 ± 0,001	3,14

Sadržaj pojedinačnih flavan-3-ola i procijanidina tokom čuvanja na različitim temperaturama, prikazan je i grafički na slici 5.48.

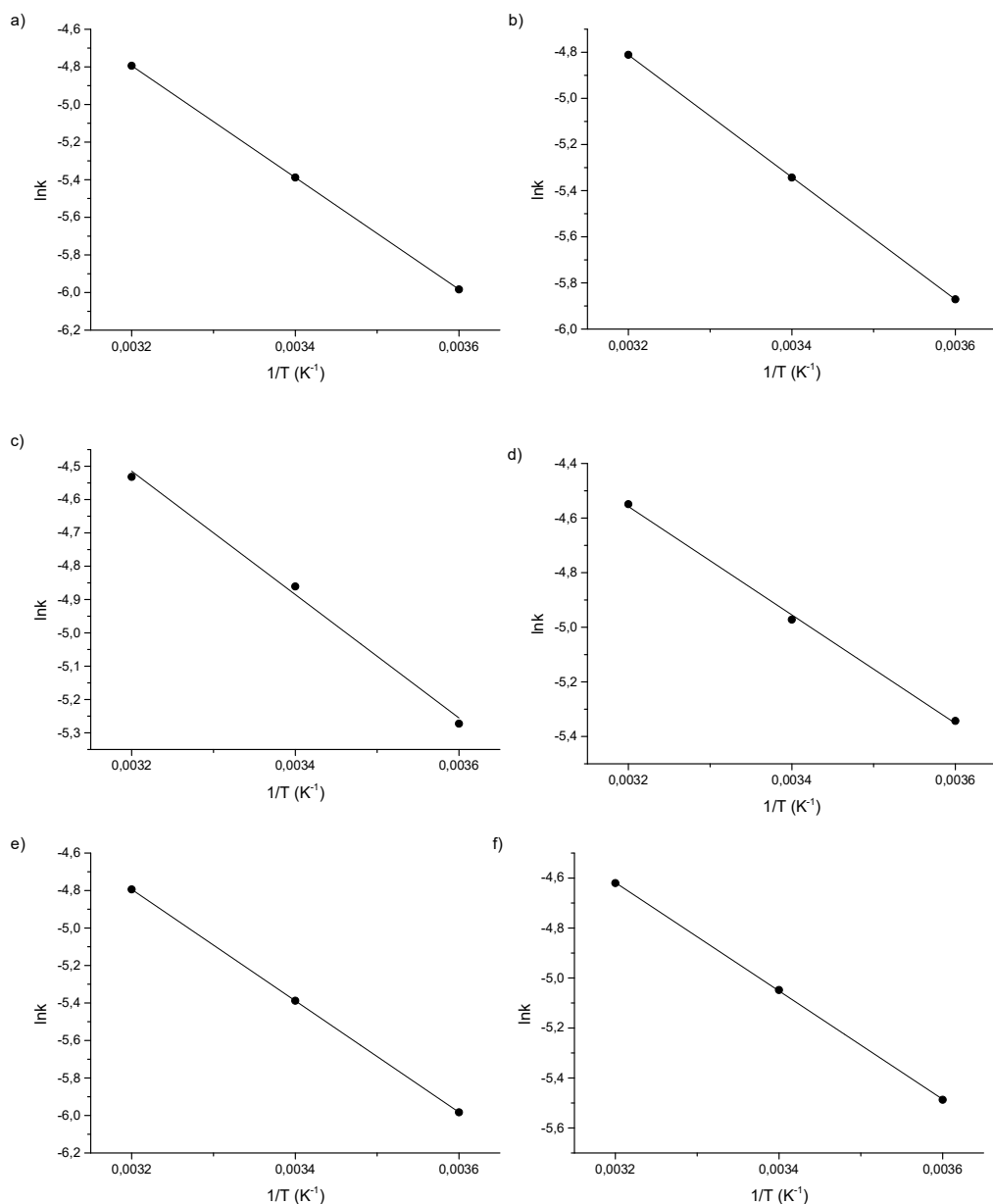


**Slika 5.48.** Sadržaj flavan-3-ola i procijanidina u uzorku crne čokolade tokom čuvanja na različitim temperaturama

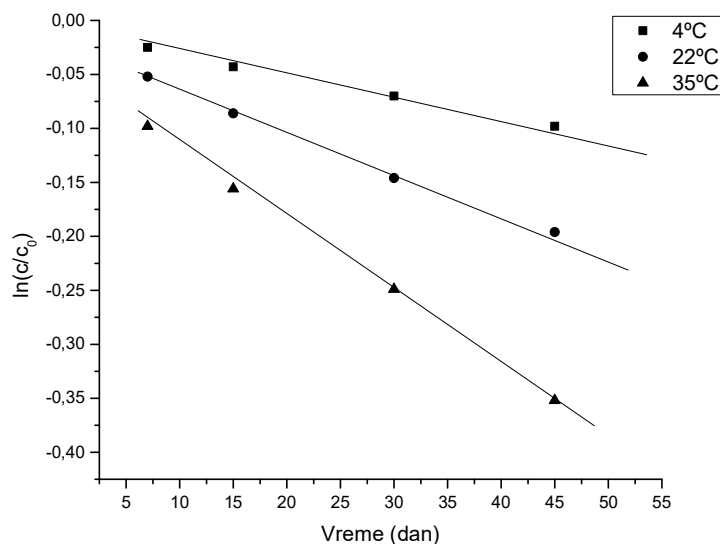
Kao i kod uzoraka kakaou u prahu, linearna zavisnost koncentracije od vremena čuvanja potvrđuje da degradacija pojedinačnih (slika 5.49.) i ukupnih flavonoida (slika 5.51.), prati kinetiku reakcije prvog reda. Iz grafičke zavisnosti  $\ln(c/c_0) = f(t)$ , a na osnovu nagiba datih pravi (slika 5.49.), izračunate su konstante brzine reakcije degradacije. Iz logaritamskog oblika Arenijusove jednačine, na osnovu nagiba datih pravi (slika 5.50.), izračunate su vrednosti energije aktivacije za (+)-katehin (24,7 kJ/mol), (-)-epikatehin (22,0 kJ/mol) i procijanidine B1 (15,4 kJ/mol), B2 (16,5 kJ/mol), B3 (23,5 kJ/mol) i B4 (18,0 kJ/mol).



**Slika 5.49.** Degradacija katehina i procijanidina u uzorcima kakaou u prahu tokom čuvanja na različitim temperaturama: a) (-)-epikatehin, b) (+)-katehin, c) procijanidin B1, d) procijanidin B2, e) procijanidin B3, f) procijanidin B4



**Slika 5.50.** Grafička zavisnost logaritma konstante brzine reakcije degradacije u funkciji od recipročne vrednosti temperature čuvanja na različitim temperaturama: a) (-)-epikatehin, b) (+)-katehin, c) procijanidin B1, d) procijanidin B2, e) procijanidin B3, f) procijanidina B4



**Slika 5.51.** Degradacija ukupnih flavonoida u uzorku crne čokolade tokom čuvanja

U tabeli 5.41. ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n=3$ ) je dat uticaj temperature čuvanja (4, 22, 35 °C) na degradaciju ukupnih flavonoida u uzorcima crne čokolade.

**Tabela 5.41.** Sadržaj ukupnih flavonoida (UF) i antioksidativna aktivnost crne čokolade tokom čuvanja

Temperatura čuvanja (°C)	Vreme (dan)	UF $c_{sr} \pm SD$ (mg/g)	RSD (%)	Temperatura čuvanja (°C)	Vreme (dan)	DPPH $c_{sr} \pm SD$ ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	RSD (%)
4	7	11,5 ± 0,3	2,61	4	7	24,9 ± 0,4	1,61
	15	11,3 ± 0,3	2,65		15	24,7 ± 0,4	1,62
	30	11,0 ± 0,2	1,82		30	24,4 ± 0,4	1,64
	45	10,7 ± 0,2	1,87		45	24,1 ± 0,4	1,66
22	7	11,2 ± 0,3	2,68	22	25	24,4 ± 0,4	1,64
	15	10,8 ± 0,2	1,85		50	24,1 ± 0,4	1,66
	30	10,2 ± 0,2	1,96		70	23,6 ± 0,4	1,69
	45	9,7 ± 0,2	2,06		100	23,0 ± 0,4	1,74
35	7	10,7 ± 0,2	1,87	35	10	23,9 ± 0,4	1,67
	15	10,1 ± 0,2	1,98		20	23,4 ± 0,4	1,71
	30	9,2 ± 0,2	2,17		30	22,5 ± 0,3	1,33
	45	8,3 ± 0,2	2,41		40	21,6 ± 0,3	1,39

$c_0 = 11,8 \pm 0,3 \text{ mg/g}$

$c_0 = 25,1 \pm 0,4 \mu\text{mol TE/g}$



Kinetički parametri reakcije degradacije flavonoida tokom vremena čuvanja dati su u tabeli 5.42.

**Tabela 5.42.** Konstante brzine ( $k$ ), vremena poluraspada ( $t_{1/2}$ ) i energije aktivacije ( $E_a$ ) degradacije ukupnih flavonoida u uzorku crne čokolade tokom čuvanja

Temperatura (°C)	$k \times 10^3$ (dan <sup>-1</sup> )	$r^2$	$t_{1/2}$ (dan)	$E_a$ (kJ/mol)	$Q_{10}$ 4 – 22 °C	$Q_{10}$ 22 – 35 °C
4	2,2 ± 0,1	0,9974	319			
22	5,4 ± 0,2	0,9911	159	61,2	1,7	1,3
35	7,8 ± 0,3	0,9965	89			

Stepen degradacije ukupnih flavonoida se povećava sa povećanjem vremena i temperature čuvanja, što se može i potvrditi na osnovu smanjenja vrednosti koeficijenta determinacije ( $r^2$ ) (tabela 5.42.). Čuvanje uzoraka na 35 °C pokazuje bržu degradaciju ukupnog sadržaja flavonoida u poređenju sa uzorcima čuvanim na 4 °C. Na primer, vrednost  $t_{1/2}$  za flavonoide u uzorku crne čokolade je 319 dana na 4 °C i 89 dana na 35°C (tabela 5.42.). Nakon 45 dana čuvanja uzoraka crne čokolade na 4 °C i dalje ostaje preko 93%, na 22 °C preko 86% i na 35 °C preko 77% flavonoida u uzorku.

Energija aktivacije reakcije degradacije ukupnih flavonoida je 61,2 kJ/mol. Dobijene vrednosti za koeficijent  $Q_{10}$  su 1,7 za temperaturni interval 4 – 22 °C i 1,3 za temperaturni interval 22 – 35 °C (tabela 5.42.). Viša vrednost koeficijenta  $Q_{10}$ , na temperaturi čuvanja od 4 °C do 22 °C, ukazuje da na nižim temperaturama čuvanja promena temperature dovodi do brže degradacije flavonoida nego na višim temperaturama čuvanja (22 – 35 °C).

Nekoliko studija, datih u revijalnom radu *Ioannau i saradnika* (2012), su određivali kinetiku degradacije flavonoida u hrani tokom vremena čuvanja. Prema tim istraživanjima, porast temperature čuvanja dovodi do brže degradacije flavonoida, kao i do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Na osnovu dobijenih rezultata za antioksidativnu aktivnost crne čokolade, može se zaključiti da se antioksidativna aktivnost takođe smanjuje. Nakon čuvanja uzoraka 45 dana na temperaturi od 4 °C, antioksidativna aktivnost se smanjila za oko 3%, na 22 °C za 6%, dok se na temperaturi od 35 °C smanjila za oko 9%. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji govore o promeni antioksidativne aktivnosti tokom čuvanja uzoraka jagoda (*Odriozola-Serrano i sar.*, 2009) i uzoraka soka od ananasa (*Zheng i Lu*, 2011).

## 5.5. Optimizacija i validacija ICP-OES metoda za određivanje makro i mikroelemenata

### 5.5.1. Optimizacija robusnosti indukovano kuplovane plazme ICP-OES metode

U cilju postizanja robusnih uslova plazme, snaga RF generatora je menjanja u intervalu od 750 W do 1350 W za po 200 W pri protoku gasa za raspršivanje od 0,5 l/min i vrednostima ostalih parametara instrumenta datih u tabeli 5.45., dok je protok argona za raspršivanje menjan u intervalu od 0,5 l/min do 1,5 l/min (tabela 5.44.) pri prethodno odabranoj snazi RF genaratora od 1150 W i vrednostima ostalih parametara instrumenta datih u tabeli 5.45. *Mermert* (1991) je u svom istraživanju pokazao da se najbolji operativni uslovi plazme postižu pri odnosu intenziteta emisionih linija Mg(II) (280,270 nm) i Mg(I) (285,213 nm) većim od 10. Ovo je potvrđeno i istraživanjima *Dennuad-a i saradnika* (2001). Pri ispitivanju uticaja ova dva parametra instrumenta primenjeno je i aksijalno i radijalno posmatranje plazme.

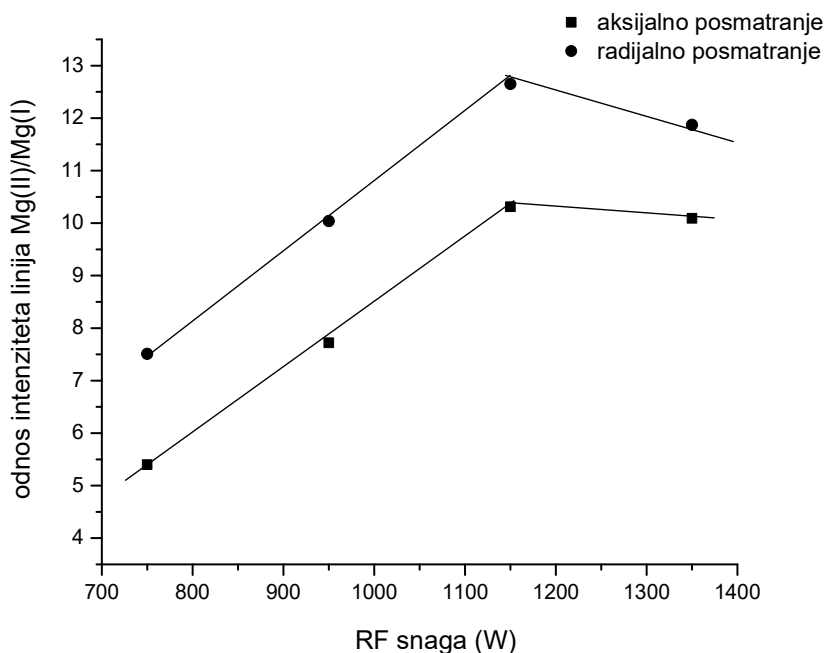
Uticaj ispitivanih parametara instrumenta na intenzitet emisionih linija Mg (relativni intenzitet emisije  $\pm$  standardna devijacija,  $n = 3$ ), RSD (%) kao i odnos intenziteta su dati u tabelama 5.43. i 5.44.

**Tabela 5.43.** Uticaj snage RF generatora na intenzitete emisionih linija magnezijuma

Način posmatranja	RF snaga (W)	Mg(II) 280,270 nm	RSD (%)	Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta
aksijalno	750	298915 $\pm$ 10647	3,56	55391 $\pm$ 1482	2,58	5,40
	950	676819 $\pm$ 6417	0,95	87645 $\pm$ 635	0,72	7,72
	1150	1058325 $\pm$ 6210	0,57	102650 $\pm$ 647	0,63	10,31
	1350	1354532 $\pm$ 10565	0,78	134245 $\pm$ 756	0,67	10,09
radijalno	750	17881 $\pm$ 284	1,59	2381 $\pm$ 29	1,22	7,51
	950	30592 $\pm$ 232	0,76	3047 $\pm$ 33	1,08	10,04
	1150	43792 $\pm$ 268	0,61	3462 $\pm$ 24	0,69	12,65
	1350	59053 $\pm$ 402	0,68	4975 $\pm$ 36	0,73	11,87

Na slici 5.52. je data grafička zavisnost odnosa relativnih intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) od RF snage generatora za aksijalno i radijalno posmatranje plazme. Zapaža se

da je odnos intenziteta ovih linija veći kod radijalnog posmatranja plazme. Sa porastom RF snage generatora do 1150 W, raste i odnos intenziteta linija magnezijuma (10,31 za aksijalno i 12,65 za radijalno posmatranje), nakon čega ovaj odnos opada. Takođe, najmanja relativna standardna devijacija merenja je pri vrednosti RF snage od 1150 W, tako da je za dalji rad korišćena RF snaga od 1150 W.

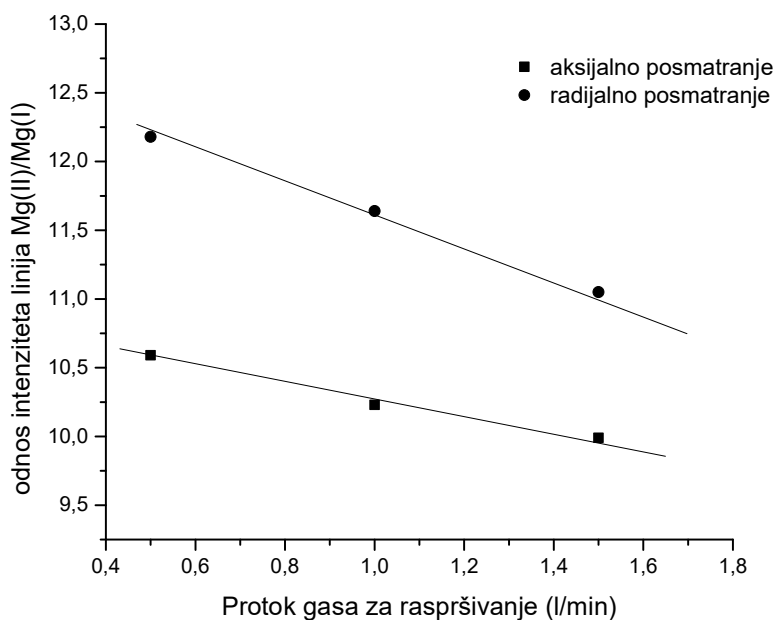


**Slika 5.52.** Uticaj RF snage na odnos relativnih intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) za aksijalno i radijalno posmatranje plazme

Nakon odabira odgovarajuće vrednosti RF snage generatora (1150 W), menjana je brzina protoka gasa za raspršivanje (tabela 5.44.) i dobijena zavisnost je grafički prikazana na slici 5.53. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se najveći odnos intenziteta linija magnezijuma postiže pri brzini proticanja gasa od 0,5 l/min. Ovaj odnos za aksijalno posmatranje je 10,59, dok je za radijalno posmatranje 12,18. Takođe, pri ovom protoku gasa za raspršivanje, relativna standardna devijacija merenja je najmanja.

**Tabela 5.44.** Uticaj protoka gasa za raspršivanje (PGR) na intenzitete emisionih linija magnezijuma

Način posmatranja	PGR (l/min)	Mg(II) 280,270 nm	RSD (%)	Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta
aksijalno	0,5	1036278 ± 6540	0,63	97864 ± 567	0,58	10,59
	1,0	925261 ± 6482	0,70	89956 ± 585	0,65	10,23
	1,5	536894 ± 6453	1,20	53742 ± 371	0,69	9,99
radijalno	0,5	42398 ± 310	0,73	3481 ± 29	0,82	12,18
	1,0	43581 ± 496	1,14	3745 ± 40	1,07	11,64
	1,5	39934 ± 591	1,48	3614 ± 51	1,41	11,05



**Slika 5.53.** Uticaj protoka gasa za raspršivanje na odnos relativnih intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) za aksijalno i radijalno posmatranje plazme pri snazi RF generatora od 1150 W

Nakon odabira optimalne RF snage generatora i brzine protoka gasa za raspršivanje, radni parametri ICP-OES instrumenta korišćeni u daljem radu su prikazani u tabeli 5.45.

**Tabela 5.45.** Radni parametri instrumenta

RF snaga generatora	1150 W
Brzina pumpe za ispiranje	50 rpm
Brzina pumpe za uzorke	50 rpm
Protok gasa za raspršivanje	0,5 l/min
Protok gasa za hlađenje	12 l/min
Protok pomoćnog gasa	0,5 l/min
Pravac posmatranja plazme	aksijalni/radijalni
Vreme ispiranja	30 s

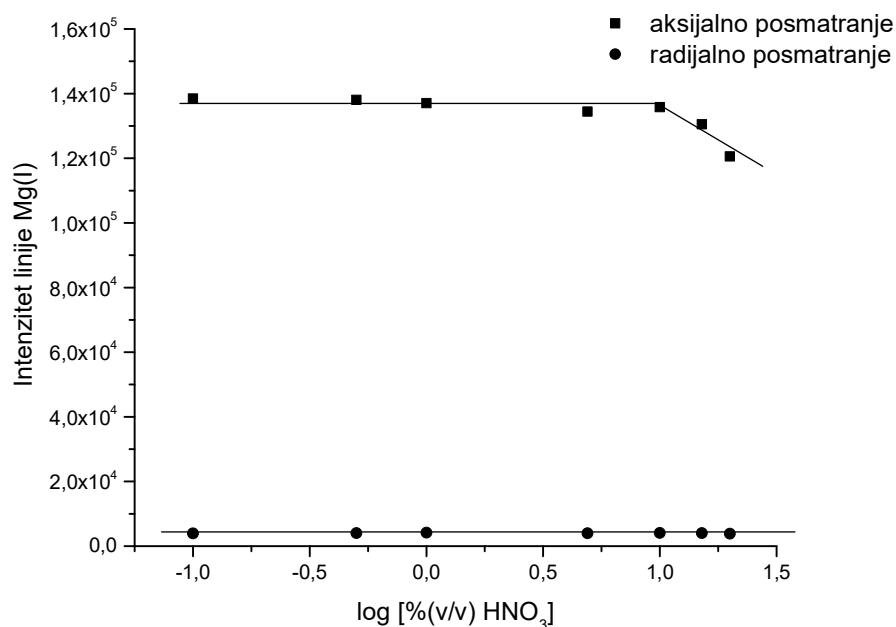
### 5.5.2. Uticaj koncentracije azotne kiseline

Nakon određivanja optimalnih parametara instrumenta, ispitivan je uticaj koncentracije HNO<sub>3</sub>, koja se koristi za pripremu uzoraka za ICP određivanje, na intenzitet Mg(I) linije (285,213 nm), za aksijalno i radijalno posmatranje plazme (relativni intenzitet ± standardna devijacija, n = 3) (tabela 5.46.).

**Tabela 5.46.** Uticaj koncentracije kiseline na intenzitet emisione linije Mg(I)

Način posmatranja	HNO <sub>3</sub> (%)	log HNO <sub>3</sub> (%)	Mg(I) 285,213 nm	RSD (%)
aksijalno	0,1	-1	138450 ± 430	0,31
	0,5	-0,3	138051 ± 343	0,25
	1	0	137067 ± 404	0,29
	5	0,70	132458 ± 353	0,27
	10	1	135833 ± 2656	1,96
	15	1,18	130496 ± 1058	0,81
	20	1,30	120533 ± 1457	1,21
radijalno	0,1	-1	3945 ± 11	0,28
	0,5	-0,3	4029 ± 10	0,25
	1	0	4174 ± 13	0,31
	5	0,70	3990 ± 15	0,38
	10	1	4058 ± 20	0,49
	15	1,18	4038 ± 25	0,62
	20	1,30	3833 ± 36	0,94

Na slici 5.54. je dat grafički prikaz uticaja koncentracije  $\text{HNO}_3$  (0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10%; 15% i 20% (v/v)). Sa slike se može videti da kod radijalnog posmatranja plazme nema promene intenziteta linije Mg(I), dok kod aksijalnog posmatranja plazme dolazi do promene intenziteta pri koncentracijama kiseline većim od 10%. Takođe, relativna standardna devijacija merenja je najmanja pri koncentraciji kiseline od 0,5%, i ova koncentracija kiseline je korišćena za dopunjavanje normalnog suda u postupku pripreme uzoraka čokolade i kakaou u prahu.



**Slika 5.54.** Uticaj koncentracije  $\text{HNO}_3$  na intenzitet Mg(I) linije pri optimalnim uslovima rada instrumenta

### 5.5.3. Izbor analitičkih linija

Za svaki ispitivani element su konstruisane kalibracione prave, na četiri izabrane talasne dužine sa najvećim relativnim intenzitetom emisije. Intenzitet emisionog signala mora da bude dovoljno veliki, kako bi se razlikovao signal ispitivanog elementa od signala pozadine. Sam intenzitet emisionog signala, koji svakako utiče na osetljivost metode, nije dovoljan parametar za odabir radne talasne dužine odnosno analitičke linije s obzirom na činjenicu da mogu biti prisutne spektralne interferencije kao i interferencije koje potiču od

matriksa uzorka. Kalibracione prave su dobijene korišćenjem referentnog multielementnog standarda od koga su napravljene rastvori koncentracije 2 ppm i 5 ppm svih ispitivanih elemenata, a treći je bila dejonizovana voda. Karakteristike kalibracionih pravih koje treba imati u vidu u postupku odabira radne talasne dužine su: relativni intenzitet emisije, standardna devijacija nagiba, standardna devijacija odsečka, koeficijent determinacije, interferencije levo i desno od odabrane talasne dužine. Jedan od postupaka koji obezbeđuje izbor talasne dužine sa minimumom efekta matriksa je postupak upoređivanja nagiba kalibracione prave dobijene iz standardnih rastvora i kalibracione prave kod koje su standardi „spajkovani” određenom zapreminom rastvora uzorka ( $n_{kal}/n_{uz}$ ). Što je dobijeni odnos bliži jedinici to je na toj talasnoj dužini najmanji uticaj matriksa. U cilju ispitivanja matriks efekta neki autori predlažu metodu unutrašnjeg standarda ili metodu standardnog dodatka (*Stepan i sar.*, 2001; *Todoli i sar.*, 2002). Kalibracione prave, za četiri izabrane talasne dužine ispitivanih elemenata, su „spajkovane” određenom zapreminom uzorka, tako da je nivo „spajkovanih” koncentracija za većinu elemenata bio 1 – 10 mg/l, osim za Pb, Se, Mo, Ni, Cd i Cr, za koje je nivo spajkovanja bio 0,1 – 1 mg/l (*U.S. Food and Drug Administration*, 2015; *Sharpless i sar.*, 2007). Matriks efekat (ME) je izračunat prema jednačini:

$$ME = \left( \frac{I_1}{I_2} - 1 \right) \times 100 \quad (5.7)$$

gde je:

$I_1$  – intenzitet svake od četiri izabrane linije;

$I_2$  – intenzitet svake od četiri izabrane linije nakon „spajkovanja” kalibracione prave za svaki element uzorkom.

U tabeli 5.47. su prikazane odabrane talasne dužine za svaki element, koeficijent determinacije ( $r^2$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ) i odnos nagiba kalibracione prave i kalibracione prave nakon „spajkovanja” uzorkom ( $n_{kal}/n_{uz}$ ) na odabranoj talasnoj dužini. Vrednosti matriks efekta odabranih talasnih dužina se kreću od -5,3% do 7,1%, što ukazuje na to da odabrane talasne dužine mogu da se koriste za dalja određivanja, odnosno da su na zadovoljavajućem nivou uticaja matriksa uzorka. Preliminarno određivanje je pokazalo da su makroelementi Na, K, Ca, Mg i P prisutni u velikim koncentracijama pa je za njihovo određivanje primenjen postupak radijalnog posmatranja plazme.

**Tabela 5.47.** Parametri odabranih emisionih linija

Element	Talasna dužina (nm)	r <sup>2</sup>	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Pravac posmatranja plazme	Odnos n <sub>kal</sub> /n <sub>uz</sub>	ME (%)
Al	396,152	0,9998	0,0351	0,1167	aksijalni	0,984	-1,6
B	249,773	1	0,0133	0,0045	aksijalni	1,013	1,3
Ba	455,403	1	0,0083	0,0301	aksijalni	0,981	-1,9
Ca	422,673	1	0,0017	0,0033	radijalni	a	a
Cd	228,802	1	0,0102	0,0351	aksijalni	1,008	0,8
Co	230,786	1	0,0033	0,0101	aksijalni	1,063	6,3
Cr	283,563	1	0,0051	0,0183	aksijalni	0,947	-5,3
Cu	324,754	1	0,0101	0,0317	aksijalni	1,025	2,5
Fe	259,940	1	0,0101	0,0317	aksijalni	1,007	0,7
K	769,896	1	0,0101	0,0317	radijalni	a	a
Li	670,784	0,9959	0,0733	0,2434	aksijalni	1,071	7,1
Mg	279,553	0,9961	0,0017	0,0501	radijalni	a	a
Mn	259,373	0,9996	0,0017	0,0101	aksijalni	0,981	-1,9
Mo	202,030	1	0,0017	0,0067	aksijalni	1,023	2,3
Na	589,592	1	0,0117	0,0383	radijalni	a	a
Ni	231,604	0,9955	0,0151	0,0433	aksijalni	0,989	-1,1
P	213,618	0,999	0,0083	0,0283	radijalni	a	a
Pb	220,353	1	0,0317	0,1067	aksijalni	0,971	-2,9
Sb	252,852	0,9999	0,0133	0,0433	aksijalni	1,013	1,3
Se	196,090	1	0,0401	0,1317	aksijalni	0,995	-0,5
Si	251,611	1	0,0233	0,0767	aksijalni	0,991	-0,9
Sn	283,999	1	0,1117	0,3701	aksijalni	1,007	0,7
Sr	407,771	0,9998	0,0017	0,0117	aksijalni	1,029	2,9
V	309,311	0,9985	0,0102	0,0317	aksijalni	0,964	-3,6
Zn	213,856	0,9992	0,0017	0,0067	aksijalni	0,986	-1,4

<sup>a</sup>nije ispitivan efekat matriksa za makro elemente zbog njihove visoke koncentracije u ispitivanim uzorcima

#### 5.5.4. Tačnost i preciznost metoda

Tačnost metoda je ispitivana primenom sertifikovanih referentnih materijala (CRM-ova) mleka u prahu (za uzorke bele čokolade i mlečne čokolade) i čokolade za kuvanje (za uzorke crne čokolade i kakaou u prahu), za koje je sertifikovan sadržaj 15 metala (Ca, K, Mg,



Na, P, Cl, Cu, Cd, Fe, Hg, I, Mn, Pb, Se i Zn). Rezultati su prikazani u tabeli 5.48. i 5.49., kao srednja vrednost tri ponavljanja ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Tačnost metode je izračunata prema jednačini:

$$(1 - (\text{nađena vrednost} - \text{sertifikovana vrednost}) / \text{sertifikovana vrednost}) \times 100\%.$$

Preciznost je data kao RSD:

$$RSD = (SD / c_{sr}) \times 100\% \quad (5.8)$$

**Tabela 5.48.** Tačnost i preciznost određivanja elemenata ICP-OES metodom (CRM – mleko u prahu)

Element	Sertifikovana vrednost (g/kg)	Nađena vrednost (g/kg)	Tačnost (%)	Preciznost RSD (%)
Ca	13,9 ± 0,8	14,3 ± 0,5	97,12	3,49
K	17,0 ± 0,7	18,1 ± 0,6	93,53	3,31
Mg	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	107,69	8,33
Na	4,2 ± 0,2	4,1 ± 0,2	102,38	4,87
Element	Sertifikovana vrednost (mg/kg)	Nađena vrednost (mg/kg)	Tačnost (%)	Preciznost RSD (%)
Cd	0,011 ± 0,003	0,010 ± 0,001	109,09	10,00
Cu	1,08 ± 0,06	1,04 ± 0,05	103,70	4,81
Fe	4,6 ± 0,5	4,9 ± 0,3	93,48	6,12
Mn	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,02	96,43	6,90
Pb	0,019 ± 0,004	0,017 ± 0,001	110,53	5,88
Se	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	94,74	5,26
Zn	44,8 ± 2,0	44,1 ± 1,7	101,56	3,85

**Tabela 5.49.** Tačnost i preciznost određivanja elemenata ICP-OES metodom (CRM – čokolada za kuvanje)

Element	Sertifikovana vrednost (mg/kg)	Nađena vrednost (mg/kg)	Tačnost (%)	Preciznost RSD (%)
Ca	840 ± 74	867 ± 61	96,79	7,04
Cu	23 ± 1	22 ± 1	104,35	4,54
Fe	132 ± 11	141 ± 7	93,18	5,67
Mg	2570 ± 150	2465 ± 141	104,09	5,72
Mn	20 ± 1	21 ± 2	94,78	7,98
P	3300 ± 210	3409 ± 222	96,67	6,51
K	8200 ± 500	7823 ± 467	104,59	5,97
Na	40 ± 2	38 ± 2	104,75	6,04
Zn	37 ± 2	38 ± 1	97,3	3,70

Preciznost ICP-OES metoda se kreće od 3,31% za K do 10,00% za Cd (CRM - mleko u prahu) i od 3,70% za Zn do 7,98% za Mn (CRM – čokolada za kuvanje). Tačnost ICP-OES metoda se kreće od 93,48% za Fe do 110,53% za Pb (CRM – mleko u prahu) i od 93,18% za Fe do 104,75% za Na (CRM – čokolada za kuvanje). Sve dobijene vrednosti, za tačnost i preciznost, su u skladu sa literaturnim podacima koji se odnose na validaciju metoda. Prema istraživanjima Horwitz-a i saradnika (*Horwitz, 1982; Wood, 1999; Thompson, 2004*) maksimalna vrednost RSD-a, koja je prihvatljiva za koncentraciju analita do 100 ppb, je 22,6%, za koncentraciju analita do 1 ppm je 16%, za koncentraciju analita do 10 ppm je 11,3% itd. Prema *Association of Official Agricultural Chemists Peer Verified Methods* programu (*AOAC, 2000; Gonzalez i Herrador, 2007*), maksimalna vrednost RSD-a, koja je prihvatljiva za koncentraciju analita do 100 ppb je 15%, za koncentraciju do 1 ppm je 11%, a za koncentraciju do 10 ppm je 7,3%.

### 5.5.5. Određivanje sadržaja metala u uzorcima čokolade i kakaoa u prahu

Nakon odabira radne talasne dužine za svaki element, svi uzorci bele, mlečne, crne čokolade i kakaoa u prahu su snimljeni i dobijeni rezultati ( $c_{sr} \pm SD$ ,  $n = 3$ ) su prikazani tabelarno (5.50. – 5.57.) i grafički (5.55. – 5.62).

Što se tiče makroelemenata, po zastupljenosti u uzorcima čokolade i kakaoa u prahu se ističe kalijum (tabele 5.50. – 5.53.) čija je koncentracija u opsegu od 1140 mg/kg do 5900

mg/kg u uzorcima bele čokolade, od 4270 mg/kg do 7900 mg/kg u uzorcima mlečne čokolade, od 4950 mg/kg do 12670 mg/kg u uzorcima crne čokolade i od 7870 mg/kg do 86900 mg/kg u uzorcima kakaoa u prahu. Pored natrijuma i hlora i kalijum je veoma važan elektrolit. Za razliku od pomenutih elektrolita, koji se uglavnom nalaze u tečnostima oko ćelije, više od 90% zaliha kalijuma se nalazi u tečnostima unutar same ćelije. Uloga kalijuma u organizmu je pored regulisanja nervnih funkcija, neutralizacija viška kiseline u organizmu. Značajna uloga kalijuma je u pretvaranju glukoze u glikogen, primarne hrane mišićima, pa tako utiče i na kontrakciju mišića. Za pravilan ritam srčanog mišića, veoma je bitno kontinuirano snabdevanje svim elektrolitima, pa tako i kalijumom. Takođe, kalijum ima ulogu i u eliminisanju ugljen-dioksida iz pluća. Ukoliko se telu pruže odgovarajuće količine kalijuma tokom života, sprečiće se slabljenje kostiju i razvoj osteoporoze. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2004*), preporučeni dnevni unos kalijuma kod odojčadi je 0,4 g, kod dece uzrasta od 4 do 8 godina je do 3,8 g i kod adolescenata, žena i muškaraca je do 4,7 g.

Fosfor je, zajedno sa kalcijumom, veoma važan makroelement. Najveća količina fosfora (oko 85%) se nalazi u zubima i kostima u obliku kalcijum-fosfata, a oko 15% se nalazi u krvi i drugim organima (srce, bubrezi, mozak i mišići). Njegova veoma važna uloga je u procesu proizvodnje kolagena. On je, takođe, bitan element za stvaranje adenozin-trifosfata (<http://www.zdravstveni.com/fosfor.php>). Koncentracija fosfora se kreće od 1360 mg/kg do 2345 mg/kg u uzorcima bele čokolade, od 1382 mg/kg do 2320 mg/kg u uzorcima mlečne čokolade, od 1560 mg/kg do 3040 mg/kg u uzorcima crne čokolade i od 2958 do 6130 mg/kg u uzorcima kakaoa u prahu. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 1997*), preporučeni dnevni unos fosfora kod odojčadi je do 100 mg, kod dece uzrasta od 4 do 8 godina je do 500 mg, kod adolescenata je do 1250 mg i kod muškaraca i žena je 700 mg.

Kalcijum omogućava normalni rad organizma zajedno sa magnezijumom, ali samo ako je koncentracija kalcijuma dva puta veća. Smatra se da više od 99% kalcijuma se nalazi u kostima i zubima, dok se manje od 1% nalazi u ekstracelularnom serumu, odakle se održava nivo Ca u krvnoj plazmi. Istraživanja su potvrdila da je kalcijum uključen u vaskularnu kontrakciju, vazodilataciju, mišićne funkcije, prenos nerava, intracelularnu signalizaciju i hormonsku sekreciju (*Beto, 2015*). Deficit kalcijuma može dovesti do nastanka osteoporoze, a utvrđeno je da u kombinaciji sa vitaminom D, može da smanji nastanak fraktura kod

pocijenata sa ovim oboljenjem. Sadržaj kalcijuma se kreće u sledećim intervalima u uzorcima bele, mlečne, crne čokolade i kakaou u prahu: 522 – 2089 mg/kg, 640 – 1864 mg/kg, 118 – 919 mg/kg i 1909 – 2671 mg/kg. Mlečna čokolada ima dva puta veći sadržaj kalcijuma od mleka i ostalih mlečnih proizvoda, i pet puta više kalcijuma od celog obroka hleba (*Sager i Hoesch, 2005; Spiegel i Sager, 2008; Sager i Werteker, 2010*). Oko 300 g mlečne čokolade zadovoljava dnevne potrebe za kalcijumom. Prema Institutu za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 1997*), preporučeni dnevni unos za Ca kod odojčadi je do 210 mg, kod dece uzrasta od 4 do 8 godina je do 800 mg, kod adolescenata je do 1300 mg i kod muškaraca i žena u zavisnosti od razdoblja je od 1000 mg do 1200 mg.

Ukoliko se uporedi odnos koncentracija Ca i Mg u uzorcima bele i mlečne čokolade, može se videti da je taj odnos u intervalu od 3 do 10, za razliku od uzoraka crne čokolade i kakaou u prahu, gde ima više magnezijuma u odnosu na kalcijum. U uzorcima bele i mlečne čokolade ovi elementi najverovatnije potiču iz mleka, dok kod crne čokolade i kakaou u prahu potiču od kakao delova tj. od biljke kakaovca.

Natrijum se u organizmu nalazi u katjonskom obliku. Oko 50% natrijuma je u ekstracelularnoj tečnosti. Deo te tečnosti je u krvi i pored kalijuma pomaže u održanju pH oko 7. Natrijum utiče na cirkulaciju i na krvni pritisak. Mnogi lekari smatraju da ljudi koji imaju problem sa visokim krvnim pritiskom ne treba da koriste natrijumovu so u ishrani. Više od 30% natrijuma je u kostima, a ostatak u intracelularnim tečnostima. Sadržaj Na se kreće u opsegu koncentracija od 504 mg/kg do 1529 mg/kg u uzorcima bele čokolade, od 172 mg/kg do 2104 mg/kg u uzorcima mlečne čokolade, od 43 mg/kg do 5585 mg/kg u uzorcima crne čokoladne i od 117 mg/kg do 4824 mg/kg u uzorcima kakaou u prahu. Prema Institutu za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2004*), preporučeni dnevni unos za Na kod odojčadi je do 0,12 g, kod dece uzrasta od 4 do 8 godina je do 1,2 mg, kod adolescenata, muškaraca i žena je do 1,5 g.

Magnezijum je mineral koji je neophodan za funkcionisanje organizma. Zbog svoje uloge u transportu jona K i Ca kroz ćelijske membrane, metabolizmu, radu više od 300 enzima, ovaj mineral reguliše proizvodnju energije, sprečava nastanak krvnih ugrušaka, štiti same krvne sudove i srce. Veoma važnu ulogu ima i u transportu nadražaja do mišića. Zbog toga je povećana potreba za ovim mineralom u svakodnevnoj ishrani, pa se često koristi u vidu šumećih tableta i magnezijum direkta. Sadržaj Mg se kreće u opsegu koncentracija od

72 mg/kg do 492 mg/kg u uzorcima bele čokolade, od 299 mg/kg do 608 mg/kg u uzorcima mlečne čokolade, od 855 mg/kg do 1608 mg/kg u uzorcima crne čokoladne i od 2537 mg/kg do 4816 mg/kg u uzorcima kakaoa u prahu. Kakao u prahu i čokolada su dobar izvor magnezijuma (srednja vrednost 1205 mg/kg, opseg 530 – 2521 mg/kg). Kakao sadrži 4 – 5 puta više Mg od graška, bele pšenice, kukuruza i pirinča (*Sager i Hoesch, 2005*). Prema Institutu za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 1997*), preporučeni dnevni unos za Mg kod odojčadi je do 30 mg, kod dece uzrasta od 4 do 8 godina je do 130 mg, kod adolescenata, muškaraca i žena je do 400 mg.

Ako se sastav makroelemenata izrazi u procentima (slike 5.55. – 5.58.), zapaža se da od makroelemenata najviše ima K sa zastupljenošću od 41,25% u uzorcima bele čokolade, 54,85% u uzorcima mlečne čokolade, 62,93% u uzorcima crne čokolade i 82,71% u uzorcima kakaoa u prahu. Biljke najlakše usvajaju K iz zemljišta, a glavni izvor kontaminacije zemljišta kalijumom je đubrivo (*Kastori i sar., 2003*). Posle K, izdvaja se P i to sa zastupljenošću od 23,42% u uzorcima bele čokolade, 17,85% u uzorcima mlečne čokolade, 15,82% u uzorcima crne čokolade i 6,57% u uzorcima kakaoa u prahu. U uzorcima bele i mlečne čokolade po zastupljenosti sledi Ca sa 20,42% i 12,73%, Na sa 12,25% i 10,39% i Mg sa 2,66% i 4,18%. U uzorcima crne čokolade i kakaoa u prahu Mg je zastupljen sa 9,29% i 5,46%, zatim Na sa 7,54% i 3,36% i Ca sa 4,43% i 1,9%. Ukoliko se uporedi zastupljenost Ca u ispitivanim uzorcima, može se videti da je ona veća u uzorcima mlečne i bele čokolade, nego u uzorcima crne čokolade i kakaoa u prahu. Ovo je očekivano obzirom na sadržaj mleka u istim.

Visok sadržaj makroelemenata je očekivan s obzirom na to da se fosfor, kalijum, kalcijum, natrijum i magnezijum ubrajaju u makroelemente koji predstavljaju biljnu hranu i ulaze u sastav svake biljke. Natrijum spada u korisne elemente, koji pri određenim koncentracijama pozitivno deluje na rast i razvoj biljaka. Kalijum i fosfor spadaju u elemente koji ograničavaju visinu prinosa i organsku proizvodnju. Kako se ovi elementi nalaze u površinskom sloju zemljišta, ali u oblicima nepristupačnim za biljke, često se nadoknađuju đubrivima. Oblik usvajanja ovih elemenata iz zemljišta je:  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (*Varga, 2015*).

**Table 5.50.** Sadržaj makroelemenata u uzorcima bele čokolade

Uzorci	Na		K		Ca		Mg		P	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
BČ1	651 ± 4	0,61	2600 ± 42	1,61	1709 ± 10	0,58	174 ± 2	1,15	1802 ± 48	2,66
BČ2	679 ± 4	0,59	2300 ± 28	1,22	1466 ± 17	1,16	152 ± 2	1,32	1360 ± 42	3,09
BČ3	899 ± 8	0,89	3050 ± 100	3,28	1890 ± 30	1,59	200 ± 1	0,50	1910 ± 21	1,10
BČ4	690 ± 2	0,29	3482 ± 93	2,67	1970 ± 7	0,35	492 ± 6	1,22	2345 ± 45	1,92
BČ5	803 ± 2	0,25	3180 ± 91	2,86	1772 ± 2	0,06	228 ± 3	1,32	1938 ± 9	0,46
BČ6	1098 ± 18	1,64	3860 ± 270	6,99	1275 ± 6	0,47	165 ± 2	1,21	2238 ± 64	2,86
BČ7	1529 ± 13	0,85	5900 ± 290	4,91	1852 ± 34	1,84	230 ± 1	0,43	1682 ± 21	1,25
BČ8	504 ± 2	0,40	1140 ± 14	1,23	522 ± 13	2,49	72 ± 2	2,78	1790 ± 28	1,56
BČ9	1527 ± 31	2,03	3230 ± 30	0,93	2089 ± 44	2,11	206 ± 3	1,46	1710 ± 38	2,22
BČ10	1058 ± 29	2,74	3190 ± 80	2,51	1570 ± 40	2,55	198 ± 6	3,03	1700 ± 71	4,18
BČ11	1037 ± 13	1,25	3330 ± 50	1,50	1341 ± 25	1,86	154 ± 3	1,95	1550 ± 69	4,45

**Table 5.51.** Sadržaj makroelemenata u uzorcima mlečne čokolade

Uzorci	Na		K		Ca		Mg		P	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
MČ1	1260 ± 5	0,40	6380 ± 90	1,41	1864 ± 21	1,13	519 ± 9	1,73	1800 ± 57	3,17
MČ2	1793 ± 18	1,00	7900 ± 290	3,67	1665 ± 15	0,90	522 ± 2	0,38	1785 ± 30	1,68
MČ3	1581 ± 32	2,02	6060 ± 30	0,49	1304 ± 20	1,53	504 ± 8	1,59	1488 ± 60	4,03
MČ4	1367 ± 27	1,97	6000 ± 141	2,35	1469 ± 28	1,91	366 ± 1	0,27	1603 ± 14	0,87
MČ5	1282 ± 17	1,33	5200 ± 71	1,36	1151 ± 13	1,13	353 ± 6	1,70	1400 ± 42	3,00
MČ6	664 ± 13	1,96	4270 ± 156	3,65	1105 ± 4	0,36	347 ± 4	1,15	1384 ± 66	4,77
MČ7	172 ± 1	0,58	7400 ± 141	1,90	640 ± 4	0,63	608 ± 9	1,48	2250 ± 42	1,87
MČ8	776 ± 18	2,32	4430 ± 141	3,18	1287 ± 9	0,70	350 ± 6	1,71	1732 ± 76	4,39
MČ9	804 ± 15	1,86	4960 ± 100	2,02	1340 ± 16	1,19	494 ± 4	0,81	2120 ± 85	4,01
MČ10	2104 ± 10	0,48	6820 ± 200	2,93	1692 ± 14	0,83	510 ± 1	0,20	2270 ± 113	4,98
MČ11	918 ± 16	1,74	4640 ± 80	1,72	1437 ± 15	0,97	299 ± 2	0,67	1890 ± 57	3,02
MČ12	1164 ± 25	2,15	6200 ± 100	1,61	929 ± 28	3,01	348 ± 4	1,15	1382 ± 20	1,45
MČ13	841 ± 2	0,24	5190 ± 50	0,96	1320 ± 5	0,38	453 ± 2	0,44	2170 ± 99	4,56
MČ14	748 ± 9	1,20	5040 ± 60	1,19	1068 ± 21	1,97	366 ± 3	0,82	1620 ± 14	0,86
MČ15	1075 ± 4	0,37	7020 ± 40	0,57	1520 ± 12	0,79	534 ± 9	1,68	2175 ± 3	0,14
MČ16	790 ± 16	2,02	4570 ± 30	0,66	1348 ± 17	1,26	363 ± 3	0,83	1970 ± 28	1,42
MČ17	1184 ± 13	1,10	5610 ± 90	1,60	991 ± 16	1,61	503 ± 7	1,39	1740 ± 14	0,80
MČ18	1227 ± 26	2,12	5640 ± 50	0,89	1617 ± 10	0,62	383 ± 6	1,57	2320 ± 13	0,56
MČ19	631 ± 5	0,79	4320 ± 40	0,93	1227 ± 7	0,57	389 ± 2	0,51	1932 ± 3	0,16

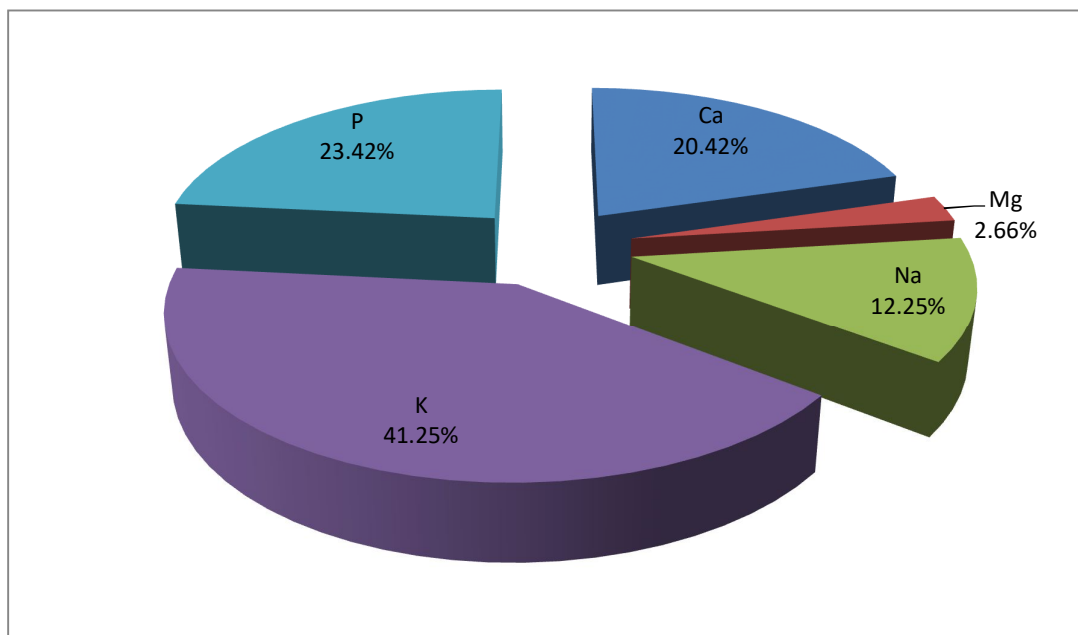
**Table 5.52.** Sadržaj makroelemenata u uzorcima crne čokolade

Uzorci	Na		K		Ca		Mg		P	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
CČ1	881 ± 18	2,04	11100 ± 100	0,90	779 ± 11	1,41	1438 ± 6	0,42	1880 ± 21	1,12
CČ2	5585 ± 7	0,12	12670 ± 20	0,16	118 ± 8	6,78	1246 ± 2	0,16	1770 ± 14	0,79
CČ3	183 ± 1	0,55	11050 ± 70	0,63	884 ± 9	1,02	1592 ± 3	0,19	2295 ± 2	0,09
CČ4	113 ± 2	1,77	4950 ± 100	2,02	549 ± 9	1,64	855 ± 4	0,47	1600 ± 14	0,87
CČ5	3859 ± 10	0,26	10710 ± 300	2,80	919 ± 12	1,31	1155 ± 5	0,43	1560 ± 10	0,64
CČ6	87 ± 2	2,30	10020 ± 400	3,99	755 ± 10	1,32	1608 ± 9	0,56	3040 ± 21	0,69
CČ7	59 ± 1	1,69	8900 ± 300	3,37	640 ± 13	2,03	1520 ± 32	2,10	2980 ± 10	0,34
CČ8	81 ± 2	2,47	8120 ± 170	2,09	660 ± 8	1,21	1418 ± 15	1,06	2640 ± 19	0,72
CČ9	43 ± 1	2,33	7200 ± 35	0,49	626 ± 3	0,48	1459 ± 5	0,34	2780 ± 14	0,50
CČ10	342 ± 7	2,05	9080 ± 70	0,77	669 ± 9	1,34	1553 ± 10	0,64	3030 ± 28	0,92

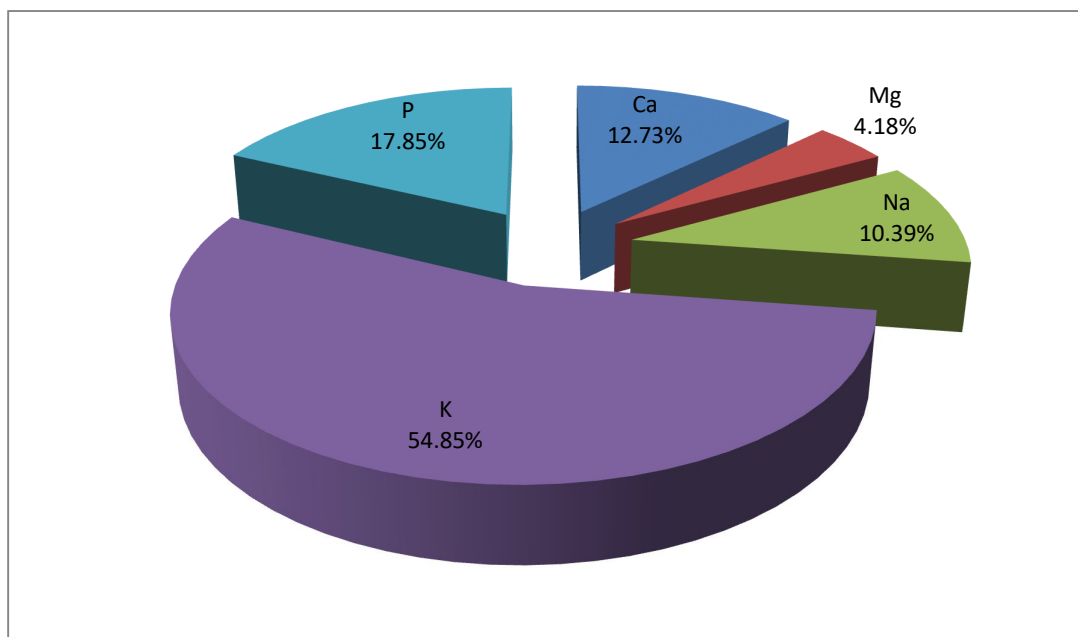


**Table 5.53.** Sadržaj makroelemenata u uzorcima kakaou u prahu

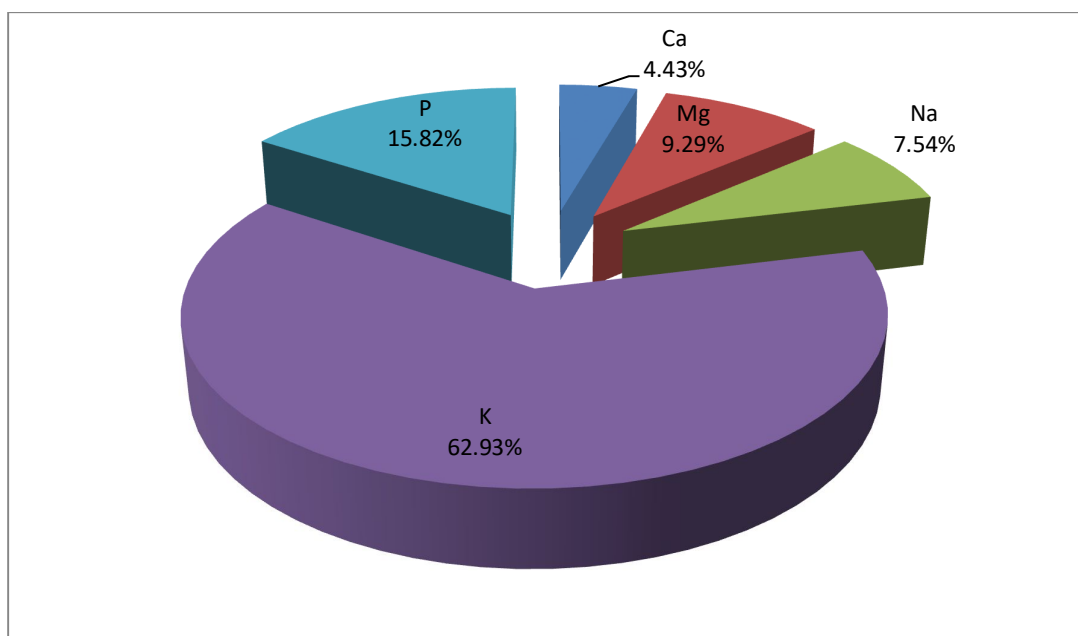
Uzorci	Na	RSD	K	RSD	Ca	RSD	Mg	RSD	P	RSD
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)
KP1	212 ± 4	1,89	53900 ± 1280	2,37	1909 ± 22	1,15	4816 ± 14	0,29	5838 ± 13	0,22
KP2	911 ± 6	0,66	19800 ± 700	3,53	2671 ± 19	0,71	2537 ± 26	1,02	2958 ± 16	0,54
KP3	245 ± 3	1,22	86900 ± 700	0,81	2378 ± 9	0,38	2663 ± 30	1,13	4714 ± 13	0,28
KP4	2852 ± 24	0,84	55500 ± 850	1,53	1969 ± 5	0,25	4037 ± 34	0,84	6130 ± 28	0,46
KP5	783 ± 10	1,28	7870 ± 500	6,35	2397 ± 32	1,33	4346 ± 14	0,32	4608 ± 41	0,89
KP6	117 ± 2	1,71	72900 ± 141	0,19	2363 ± 10	0,42	3808 ± 30	0,79	4160 ± 33	0,79
KP7	4824 ± 57	1,18	82300 ± 130	0,16	2379 ± 17	0,71	3779 ± 7	0,18	3700 ± 14	0,38
KP8	430 ± 5	1,16	71900 ± 850	1,18	2276 ± 14	0,61	3773 ± 14	0,37	3730 ± 8	0,21



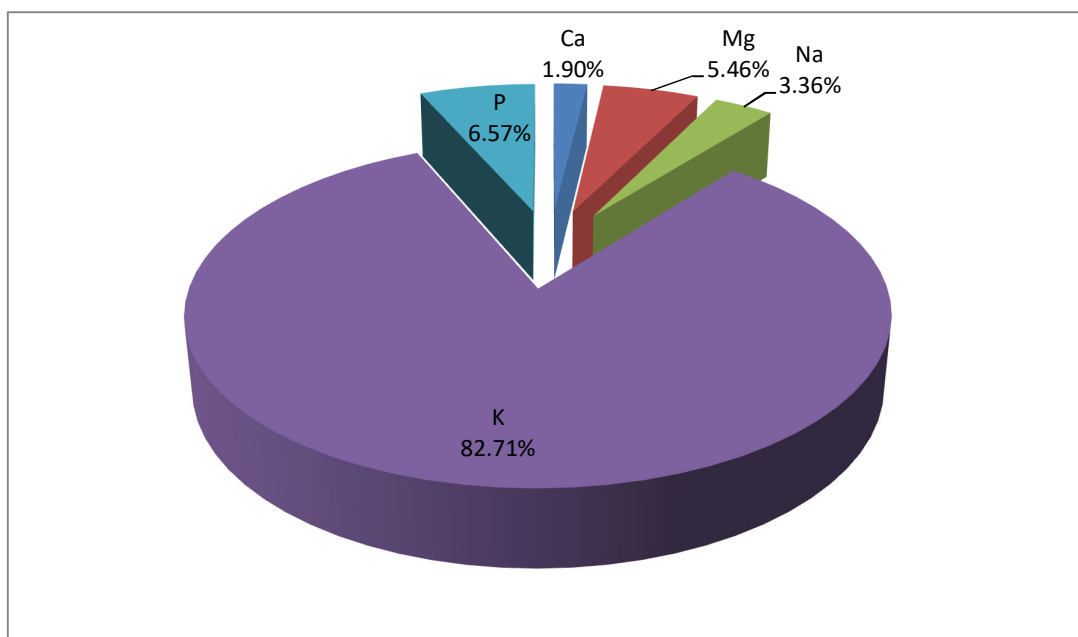
Slika 5.55. Zastupljenost makroelemenata (%) u uzorcima bele čokolade



Slika 5.56. Zastupljenost makroelemenata (%) u uzorcima mlečne čokolade



Slika 5.57. Zastupljenost makroelemenata (%) u uzorcima crne čokolade



Slika 5.58. Zastupljenost makroelemenata (%) u uzorcima kakaou u prahu

Mikroelementi u organizmu ulaze u sastav enzima ili su kofaktori enzima i proteina koji regulišu metaboličke procese. Gvožđe ulazi u sastav porfirina, koji se ugrađuje u strukturu hema. Takođe, ulazi u sastav enzima disanja citohroma, peroksidaza u kome je u trovalentnom stanju i katalaza u kome menja oksidaciono stanje iz +2 u +3 i obrnuto. Uloga

gvožđa je u prenosu kiseonika preko eritrocita hemoglobina iz pluća do ostalog tkiva. Takođe, gvožđe ulazi u sastav mnogih enzima i ima ulogu prenosioca elektrona u ćelijama. Od prisutne količine gvožđa u organizmu (3,5 do 5 g) oko 60% je u dvovalentnom stanju u hemoglobinu, < 10% ulazi u sastav mioglobina, a oko 16% se nalazi u slezini, jetri i koštanoj srži. Apsorpciju gvožđa u organizmu pored hlorovodonične kiseline, pomažu neki vitamini (C i grupe B – B2, B11 i B12) i elementi (Ca, Cu, Co, Mn, P). Do desorpcije gvožđa u organizmu dovode tanini, mioinozitol heksafosfat, oksalati, amino-salicilna kiselina, tetraciklini, antacidi, EDTA, Zn, MgO. Sadržaj Fe u uzorcima bele čokolade je u intervalu od 1,19 mg/kg do 6,39 mg/kg, uzorcima mlečne čokolade od 6 mg/kg do 37,9 mg/kg, uzorcima crne čokolade od 37,8 mg/kg do 211 mg/kg i u uzorcima kakaoa u prahu od 137 mg/kg do 461 mg/kg. Prema Institutu za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*), preporučeni dnevni unos za Fe kod odojčadi je do 0,27 mg, kod dece uzrasta od 4 do 8 godina je do 10 mg, kod adolescenata do 11 mg, kod muškaraca do 8 mg i kod žena do 18 mg. Maksimalni dnevni unos Fe koji nema neželjene efekte, u zavisnosti od uzrasta i pola, se kreće od 40 mg do 45 mg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

Cink je veoma rasprostranjen element u prirodi. Nalazi se u vazduhu, vodi i zemljištu. Veoma je značajan element u organizmu, s obzirom na to da ulazi u strukturu velikog broja enzima, koji učestvuju u proizvodnji telesnog tkiva, hormona i glavnih enzima koji bez dovoljno Zn ne mogu da regulišu telesne funkcije. Cink ima ulogu u ekspresiji gena, rastu ćelija i procesu replikacije ćelija. Koristan je za proizvodnju i izlučivanje insulina. Zajedno sa esencijalnim masnim kiselinama utiče na prostagladine, pa je Zn koristan u prevenciji raka prostate kod muškaraca. Cink ima ključnu ulogu u proizvodnji kolagena neophodnog za formiranje kostiju. Takođe se smatra da je slabljenje imuniteta povezano sa nedostatkom cinka. Sadržaj cinka u uzorcima bele čokolade je u intervalu od n.d. do 10,17 mg/kg, u uzorcima mlečne čokolade od 4,76 mg/kg do 21,4 mg/kg, u uzorcima crne čokolade od 16,3 mg/kg do 28,9 mg/kg i u uzorcima kakaoa u prahu od 45,9 mg/kg do 70,6 mg/kg. Prema Institutu za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*), preporučeni dnevni unos za Zn je do 2 mg za odojčad, do 5 mg za decu uzrasta od 4 do 8 godina, do 11 mg za adolescente i muškarce, i do 8 mg za žene. Maksimalni dnevni unos Zn koji nema neželjene efekte, za odojčad je 4 mg, za decu uzrasta od 4 do 8

godina je 12 mg, za adolescente, muškarce i žene je 40 mg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

Mangan je kofaktor enzima, koji učestvuju u hidrolizi, fosforilaciji, dekarboksilaciji i transaminaciji. Takođe, pomaže aktivnost transferaza kao što su glikoziltransferaza, glutamin sintetaza i superoksid dismutaza. Mangan pomaže u proizvodnji enzima koji učestvuju u metabolizmu proteina i masti, podržava imuni sistem, ravnotežu šećera u krvi, reprodukciju, rast kostiju i proizvodnju ćelijske energije. Sadržaj mangana u uzorcima bele čokolade je u intervalu od 0,070 mg/kg do 2,979 mg/kg, u uzorcima mlečne čokolade od 1,44 mg/kg do 15,26 mg/kg, u uzorcima crne čokolade od 7,90 mg/kg do 16,2 mg/kg i u uzorcima kakaoa u prahu od 37,1 mg/kg do 53,5 mg/kg. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*), dnevni unos za Mn se kreće do 0,003 mg za odojčad, do 1,5 mg za decu uzrasta od 4 do 8 godina, do 2,2 mg za adolescente, do 2,3 mg za muškarce i do 1,8 mg za žene. Maksimalni dnevni unos Mn koji nema neželjene efekte, za odojčad nije određen, dok je za decu uzrasta od 4 do 8 godina 3 mg, za adolescente, muškarce i žene je 11 mg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

Smatra se da hrom(III) ima ulogu aktivatora insulina, tj. da metabolizam glukoze zavisi od insulina. *Schwarz i Mertz* (1959) su u svojim istraživanjima pokazali da su pacijenti čija ishrana nije sadržala hrom, imali simptome dijabetesa, tj. da glukoza nije pravilno metabolisana. Kada je hrani dodat hrom(III), simptomi su nestali. Takođe, hrom sa vitaminom B3 i glutationom gradi organske komplekse, čime se održava koncentracija šećera u krvi. Sadržaj hroma u uzorcima bele čokolade je u intervalu od 0,12 mg/kg do 0,38 mg/kg, u uzorcima mlečnoj čokoladi od n.d. do 0,38 mg/kg, u uzorcima crne čokolade od 0,23 mg/kg do 1,69 mg/kg i u uzorcima kakaoa u prahu je od 0,56 mg/kg do 14,1 mg/kg. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*), dnevni unos za Cr se kreće do 0,2 µg za odojčad, do 15 µg za decu uzrasta od 4 do 8 godina, do 35 µg za adolescente i muškarce, i do 25 µg za žene. U trudnoći, preporučeni dnevni unos za Cr iznosi oko 30 µg. Maksimalni dnevni unos Cr koji nema neželjene efekte, nije određen (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

U biljkama je nikel sastavni deo enzima ureaze koji pomaže hidrolizi ureje. Ovaj enzim u biljkama utiče na put mikrobiološke digestije hrane. Nikel koji se unese u organizam putem hrane, uglavnom se distribuira u bubrege, kosti i pluća. Nikel se iz krvotoka izlučuje urinom.

Najveća koncentracija nikla je u nukleinskim kiselinama, posebno RNK. Značajna uloga Ni je u aktiviranju enzima za razgradnju i korišćenje glukoze, produkciji prolaktina, apsorpciji gvožđa, adrenalinu (Kumar i Trivedi, 2016). U literaturi se nalazi da je kontaminacija niklom karakteristična za čokoladu, zbog same sirovine kakao butera, procesa proizvodnje i skladištenja u kontejnerima od nikla (Melsallam, 1987; Selavpathy i Sarala Devi, 1995). Sadržaj nikla u uzorcima bele čokolade je u intervalu od n.d. do 1,237 mg/kg, u mlečnoj čokoladi od 0,626 do 6,244 mg/kg, u uzorcima crne čokolade od 1,90 mg/kg do 5,90 mg/kg i u uzorcima kakaou u prahu od 7,80 mg/kg do 10,60 mg/kg. Podataka o preporučenom dnevnom unosu za nikel nema (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001). Maksimalni dnevni unos Ni koji nema neželjene efekte, za odojčad nije određen, dok je za decu uzrasta od 4 do 8 godina 0,3 mg, za adolescente, muškarce i žene je 1 mg (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001).

Bakar se u organizmu nalazi kao  $\text{Cu}^{2+}$ . Njegova uloga je u oksido-redukcionim procesima i procesima uklanjanja radikala iz organizma. U organizmu čoveka ima oko 70 – 80 mg bakra. Ulazi u sastav enzima: citohrom c oksidaza, lizil oksidaza, amin oksidaza, tirozinaza, katehol oksidaza, feroksidaza, 2-furoat-CoA dehidrogenaza, dopamin beta-monooksidaza i mnogih drugih (Angelova i sar., 2011). Sadržaj bakra u uzorcima bele, mlečne i crne čokolade i kakaou u prahu se kreće u intervalu od n.d. do 1,37 mg/kg; od 1,64 mg/kg do 14,3 mg/kg; od 9,5 mg/kg do 17,7 mg/kg i od 25,5 mg/kg do 47,2 mg/kg. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke nacionalne akademije (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001), dnevni unos za Cu se kreće do 0,2 mg za odojčad, do 0,44 mg za decu uzrasta od 4 do 8 godina, do 0,89 mg za adolescente i do 0,90 mg za muškarce i žene. Maksimalni dnevni unos Cu, koji nema neželjene efekte, za odojčad nije određen, dok je za decu uzrasta od 4 do 8 godina 3 mg, za adolescente, muškarce i žene je 10 mg (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001).

Bor u biljkama ima ulogu u sintezi ugljenih hidrata, kao i transportnu ulogu istih od listova do plodova. Takođe, omogućava pravilno cvetanje i oplodnju. Bor je važan za održavanje zdravih kostiju i zglobova, doprinosi delovanju i resorpciji kalcijuma, magnezijuma i fosfora. Kada se bor unese u organizam, hidrolizuje u  $\text{B}(\text{OH})_3$ , koji se pasivnim procesima apsorbuje dalje (Da Silva i Williams, 2001). Bor se u krvi nalazi kao borna kiselina. Smatra se da bor ima važnu ulogu u metabolizmu steroidnih hormona i pretvaranju vitamina D u njegov aktivni oblik. Sadržaj B se u uzorcima bele, mlečne i crne

čokolade i kakaou u prahu kreće u intervalu od 0,45 mg/kg do 3,84 mg/kg, od 1,20 mg/kg do 6,13 mg/kg, od 4,50 mg/kg do 9,30 mg/kg i od 19,9 mg/kg do 34,3 mg/kg. Preporučeni dnevni unos za B nije određen (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2004*). Maksimalni dnevni unos B koji nema neželjene efekte, za odojčad nije određen, dok je za decu uzrasta od 4 do 8 godina 6 mg, za adolescente, muškarce i žene je 20 mg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

Kobalt, pored toga što je sastavni deo vitamina B12, takođe je kofaktor enzima, koji učestvuju u biosintezi DNK i u metabolizmu amino-kiselina. Tačnije, vitamin B12 učestvuje u metilaciji holina i tamina, koji su potrebni za sintezu DNK. DNK ima ulogu u regulaciji deljenja i rasta ćelija (*Soetan i sar., 2010*). Kobalt ima važnu ulogu u formiranju amino-kiseina i proteina koji izgrađuju mijelinsku ovojnicu u nervnim ćelijama. Takođe, stimuliše sintezu eritropoetina, koji pak aktivira formiranje eritrocita u koštanoj srži. Otuda se Co koristio u medicini za lečenje anemije i u sportu kao krvni doping. Utvrđeno je da su neorganski oblici ovog elementa, u jonskom obliku, toksični za ljudski organizam (*Czarnek i sar., 2015*). Preporučene dnevne potrebe za kobaltom iznose 0,2 g (*Jaredić i Vučetić, 1997*). Sadržaj Co u uzorcima bele čokolade nije detektovan, dok je u uzorcima mlečne čokolade u intervalu od n.d. do 0,224 mg/kg, u uzorcima crne čokolade i kakaou u prahu u intervalu od 0,047 mg/kg do 0,457 mg/kg i od 0,613 mg/kg do 2,43 mg/kg. Za Co nema podataka o preporučenom i maksimalnom dnevnom unosu.

Biodostupnost Se zavisi od hemijske forme u kojoj se nalazi u narminicama. U biljkama je Se identifikovan kao selenat, selenit, selenocistein, selenohomocistein, Se-metil, Se-metilselenocistein, selenocisteinska kiselina, Se-metilselenometionin i dr. Biodostupnija su organska jedinjenja Se nego neorganska. Na biodostupnost utiču i proteini, masnoća i teški metali. Selen može interagovati sa nekoliko elemenata u tragovima. Te interakcije su aditivne, antagonističke ili sinergističke. Selen smanjuje toksičnost Hg, kada su prisutna oba elementa. Neorganska jedinjenja Se su toksičnija za organizam. Ako je nizak sadržaj Se u organizmu, povećava se rizik od zaraznih i hroničnih bolesti, kao i smrtnost. Umerena koncentracija Se smanjuje rizik od kancera i neophodna je za sintezu selenoproteina glutation peroksidaze. U većoj koncentraciji, Se je toksičan (*Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008*). Sadržaj Se u uzorcima bele čokolade se kreće u intervalu od n.d. do 0,17 mg/kg, u uzorcima mlečne čokolade od n.d. do 0,23 mg/kg, dok je interval isti za uzorke crne čokolade i kakaou u prahu i on je od n.d. do 0,25 mg/kg. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke

nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*), dnevni unos za Se se kreće do 15 µg za odojčad, 30 µg za decu od 4 do 8 godina, 55 µg za adolescente, muškarce i žene. Maksimalni dnevni unos Se koji nema neželjene efekte, za odojčad je 45 µg, dok je za decu uzrasta od 4 do 8 godina 150 µg, za adolescente 280 µg i za muškarce i žene je 400 µg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

U ljudskom organizmu postoje četiri enzima, koja zavise od molibdena. U aktivnom obliku svaki od ovih enzima sadrži Mo-kofaktor na bazi pterina (Moco). Oni katalizuju redoks reakcije koristeći vodu kao akceptor ili donor kiseonika. Nedostatak Moco dovodi do teških urođenih grešaka u metabolizmu, koja često dovode do smrti u ranom detinjstvu. Simptomi, koje izaziva nedostatak Moco se uglavnom odnose na nedostatak aktivnosti sulfit oksidaze, enzima u katabolizmu cisteina. Mo-enzimi katalizuju reakciju redukcije nitrita u oksid azota (NO) (*Schwarz, 2016*). Sadržaj Mo u uzorcima bele, mlečne i crne čokolade kreće se u intervalu od n.d. do 0,170 mg/kg, od 0,112 mg/kg do 0,215 mg/kg, od 0,104 mg/kg do 1,21 mg/kg, a u uzorcima kakaoa u prahu od 0,160 mg/kg do 0,742 mg/kg. Prema preporuci Instituta za medicinu, Američke nacionalne akademije (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*), dnevni unos za Mo se kreće do 2 µg za odojčad, 22 µg za decu od 4 do 8 godina, 43 µg za adolescente i 45 µg za muškarce i žene. Maksimalni dnevni unos Mo koji nema neželjene efekte, za odojčad nije određen, dok je za decu uzrasta od 4 do 8 godina 600 µg, za adolescente 1700 µg i za muškarce i žene je 2000 µg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

Jedinjenja silicijuma iz hrane, u prisustvu HCl i drugih želudačnih kiselina, prelaze u ortosilikatnu kiselinu, koja lako difunduje kroz sluzokožu u sistem cirkulacije krvi. Bubrezi imaju ključnu ulogu u prometu silicijuma. Silicijum se lako filtrira preko bubrežnog glomerula jer ne stvara vezu sa proteinima plazme pa se 70 – 80% eliminiše 3 – 8 sati nakon unošenja Si obrokom (*Boguszewska-Czubara i Pasternak, 2011*). Preporučeni i maksimalni dnevni unos za Si nisu određeni (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*). Sadržaj Si u uzorcima bele, mlečne i crne čokolade se kreće u intervalu od 8,3 mg/kg do 93 mg/kg, od 6,75 mg/kg do 55,7 mg/kg i od 8,2 mg/kg do 219 mg/kg i u uzorcima kakaoa u prahu je u intervalu od 103 mg/kg do 618 mg/kg.

Vanadijum nije biološki značajan element. Kod sisara ima pozitivne efekte na zube i pomaže u hematopoezi. Takođe, smanjuje nivo holesterola i inhibira neke vrste raka. Jedinjenja su jako otrovna (*Aliasgharpou i Farzami, 2013*). Sadržaj V u uzorcima bele



čokolade je u intervalu od 0,082 mg/kg do 1,41 mg/kg, mlečne čokolade od n.d. do 12,31 mg/kg, crne čokolade i kakaou u prahu, od 3,50 mg/kg do 15,60 mg/kg i od 8,90 mg/kg do 17,50 mg/kg. Preporučeni i maksimalni dnevni unos za V (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*) nisu definisani, a MDK je propisana samo za odrasle i iznosi 1,8 mg (*U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001*).

Iako su elementi u tragovima dovoljni biljkama za pravilan razvoj i rast (Co, Se, Al, Si, V), njihov nedostatak može biti posledica nedostatka u samom zemljištu. Na njihovu biodostupnost utiče i pH zemljišta. Ukoliko je zemljište sa visokom pH vrednošću, tada biljci nisu dostupni Zn, Fe i Mn. Ukoliko je zemljište sa visokim sadržajem K i bogato glinom, ili je bogato sadržajem P, a voda korišćena za navodnjavanje sa većim sadržajem Na i bikarbonata, biljkama će nedostajati Fe (*Varga, 2015*).

Neki mikroelementi (Pb, Cd, As, Hg) pokazuju toksične osobine. Kada se određuje ispravnost namirnica, neophodno je odrediti koncentraciju tih elemenata i uporediti ih sa dozvoljenim koncentracijama. Ovi metali su toksični zbog vezivanja metabolički aktivnih grupa aminokiselina, polipeptida i proteina (*Mihaljev i sar., 2008*). *Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama* (Službeni glasnik Republike Srbije br. 25/2010 i 28/2011) reguliše sadržaj ovih elemenata za veliki broj namirnica. Istovremeno, sadržaj toksičnih metala u namirnicama regulisan je i u zemljama Evropske Unije *Direktivom br. 1881/2006 (Commission Regulation, Scientific Committee on Food)*. Prema *Pravilniku* (2010, 2011), dozvoljene koncentracije olova i kadmijuma u čokoladi su 1 mg/kg, odnosno 0,02 mg/kg. Maksimalno dozvoljene koncentracije ostalih ispitivanih metala nisu propisane. Svetska zdravstvena organizacija (FAO/WHO, 2001) je propisala MDK za Pb i Cd u čokoladi 1 mg/kg, odnosno 0,05 mg/kg. Prema FAO/WHO (2015), MDK za kadmijum za uzorke mlečne čokolade koje sadrže < 30% suve kakao mase je 0,20 mg/kg, za mlečne čokolade koje sadrže ≥ 30% suve kakao mase i čokolade (crna) koje sadrže < 50% suve kakao mase je 0,60 mg/kg, za čokolade sa sadržajem suve kakao mase ≥ 50% je 2,00 mg/kg i za kakao proizvode je 1,50 mg/kg.

Koncentracija olova u ispitivanim uzorcima bele čokolade je u intervalu od n.d. do 0,41 mg/kg tj. Pb je nađeno samo u jednom uzorku bele čokolade. Koncentracija kadmijuma se kreće u intervalu od 0,022 mg/kg do 1,19 mg/kg. U uzorcima mlečne i crne čokolade koncentracija olova je u intervalu od n.d. do 0,783 mg/kg i od 0,25 mg/kg do 0,86 mg/kg, dok

je koncentracija kadmijuma u intervalu od n.d. do 0,062 mg/kg i od 0,022 mg/kg do 0,242 mg/kg. U uzorcima kakaou u prahu, koncentracije olova i kadmijuma su u intervalu od n.d. do 0,97 mg/kg i od 0,082 mg/kg do 0,160 mg/kg. Dobijeni rezultati pokazuju da su koncentracije Pb i Cd ispod dozvoljenih vrednosti propisanih od strane Republike Srbije i Svetske zdravstvene organizacije. Pored zemljišta, koje se smatra glavnim izvorom elemenata, hemijska sredstva, koja se koriste u poljoprivredi, mogu biti izvori potencijalno toksičnih elemenata. Jedan od glavnih izvora Pb su izduvni gasovi motornih vozila. Istraživanja su pokazala da su biljke koje su rasle pored puta ili u blizini većih saobraćajnica imale povećan sadržaj Pb i Cd (*Khan i sar.*, 2011).

Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (*EFSA*, eng. *European Food Safety Authority*, 2009; 2010) Cd i Pb su detektovani u morskim plodovima, algama i čokoladi, a glavni izvori ovih elemenata su same polazne sirovine, način distribuiranja, skladištenje i način pripreme hrane (*Šarkanj i sar.*, 2010).

Novija istraživanja su pokazala da se aluminijum u obliku aluminijum hlorida vezuje za receptore estrogena i da utiče na razvoj kancera dojke. Najčešći izvori su posuđe, kao i ambalaža od aluminijuma koji se koristi za čuvanje namirnica. Svetska zdravstvena organizacija (*FAO/WHO*, 1989) je propisala maksimalni dnevni unos za Al od 1 mg/kg telesne mase. Sadržaj Al u uzorcima bele, mlečne i crne čokolade se kreće u intervalu od 1,51 mg/kg do 22,3 mg/kg, od 3,26 mg/kg do 20,1 mg/kg i od 7,2 mg/kg do 125 mg/kg, a u uzorcima kakaou u prahu u intervalu od 118 mg/kg do 1121 mg/kg.

Kalaj nema poznatu biohemijску funkciju. Međutim može imati funkciju u tercijalnoj strukturi proteina i drugih biosupstanci. U industriji se organska jedinjenja kalaja koriste kao katalizatori polimerizacije i transesterifikacije. Znaci hroničnog izlaganja neorganskom Sn su depresija rasta i anemija, kao i poremećaj metabolizma Zn, Cu i Ca. Organska jedinjenja Sn su toksična i napadaju centralni nervni sistem (*Aliasgharpou i Farzami*, 2013). Sadržaj Sn je u uzorcima bele, mlečne i crne čokolade u intervalu od n.d. do 1,03 mg/kg, od n.d. do 0,79 mg/kg i od 0,16 mg/kg do 2,13 mg/kg, i u uzorcima kakao praha je u intervalu od < LOD do 2,09 mg/kg. Nema podataka za preporučeni i maksimalni dnevni unos za Sn (*U.S. National Academies, Institute of Medicine*, 2001).

**Table 5.54.** Sadržaj mikroelemenata u uzorcima bele čokolade

Uzorci	Zn		Fe		Se		Cu		Mo	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
BČ1	$7,17 \pm 0,03$	0,42	$1,83 \pm 0,03$	1,64	n.d. <sup>a</sup>	-	$0,23 \pm 0,02$	4,35	n.d.	-
BČ2	$5,68 \pm 0,03$	0,53	$1,29 \pm 0,03$	2,33	$0,122 \pm 0,01$	8,20	$0,16 \pm 0,01$	6,25	$0,100 \pm 0,002$	2,00
BČ3	$7,15 \pm 0,05$	0,70	$1,48 \pm 0,01$	0,68	n.d.	-	$0,110 \pm 0,005$	4,54	$0,144 \pm 0,008$	5,56
BČ4	$10,17 \pm 0,02$	0,20	$6,39 \pm 0,01$	0,16	n.d.	-	$1,37 \pm 0,01$	0,73	$0,166 \pm 0,007$	4,22
BČ5	$6,43 \pm 0,03$	0,47	$2,30 \pm 0,01$	0,43	n.d.	-	$0,082 \pm 0,007$	8,54	$0,132 \pm 0,005$	3,79
BČ6	$6,26 \pm 0,03$	0,48	$4,63 \pm 0,04$	0,86	$0,17 \pm 0,01$	5,88	$0,77 \pm 0,02$	2,60	$0,146 \pm 0,003$	2,05
BČ7	n.d.	-	$5,26 \pm 0,05$	0,95	$0,14 \pm 0,01$	7,14	$0,60 \pm 0,02$	3,33	$0,170 \pm 0,003$	1,76
BČ8	$2,41 \pm 0,03$	1,24	$1,19 \pm 0,02$	1,68	n.d.	-	$0,012 \pm 0,001$	8,33	$0,058 \pm 0,005$	8,26
BČ9	$8,11 \pm 0,06$	0,74	$6,10 \pm 0,05$	0,82	n.d.	-	$0,220 \pm 0,005$	2,27	$0,123 \pm 0,005$	4,07
BČ10	$6,99 \pm 0,06$	0,86	$3,3 \pm 0,1$	3,03	$0,089 \pm 0,002$	2,25	$0,17 \pm 0,01$	5,88	$0,115 \pm 0,008$	6,96
BČ11	$7,29 \pm 0,06$	0,82	$2,80 \pm 0,01$	0,36	n.d.	-	n.d.	-	$0,118 \pm 0,003$	2,54

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

**Tabela 5.54.** Nastavak

Uzorci	Mn $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Ni $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	V $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Si $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Cr $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
BČ1	0,117 ± 0,002	0,42	n.d. <sup>a</sup>	-	0,360 ± 0,005	0,83	18,3 ± 0,4	0,55	0,127 ± 0,007	1,57
BČ2	0,070 ± 0,002	0,53	n.d.	-	0,312 ± 0,007	0,96	16,3 ± 0,1	0,61	0,132 ± 0,002	1,51
BČ3	0,089 ± 0,003	0,70	n.d.	-	0,42 ± 0,01	2,38	16,1 ± 0,1	0,62	0,12 ± 0,01	8,33
BČ4	2,979 ± 0,002	0,20	n.d.	-	1,143 ± 0,003	0,26	22,4 ± 0,1	0,45	0,199 ± 0,008	4,02
BČ5	0,770 ± 0,002	0,47	n.d.	-	0,448 ± 0,005	1,11	17,8 ± 0,1	0,56	0,19 ± 0,01	5,26
BČ6	0,272 ± 0,001	0,48	1,237 ± 0,007	0,57	0,085 ± 0,003	3,53	10,5 ± 0,1	0,95	0,143 ± 0,005	3,50
BČ7	0,433 ± 0,001	0,00	0,642 ± 0,008	1,25	0,082 ± 0,007	8,54	11,3 ± 0,1	0,88	0,120 ± 0,007	5,83
BČ8	0,076 ± 0,002	1,24	n.d.	-	1,41 ± 0,01	0,71	8,3 ± 0,2	2,41	0,24 ± 0,01	4,17
BČ9	0,263 ± 0,005	0,74	n.d.	-	0,47 ± 0,01	2,13	93 ± 2	2,15	0,37 ± 0,03	8,11
BČ10	0,184 ± 0,005	0,86	n.d.	-	0,43 ± 0,02	4,65	20,4 ± 0,5	2,45	0,38 ± 0,03	7,89
BČ11	0,219 ± 0,002	0,82	n.d.	-	0,43 ± 0,01	2,33	15,9 ± 0,1	0,63	0,37 ± 0,03	8,11

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

Tabela 5.54. Nastavak

Uzorci	Li $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sr $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Al $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sn $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Cd $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
BČ1	2,53 ± 0,03	1,19	0,943 ± 0,007	0,74	3,25 ± 0,03	0,92	0,25 ± 0,01	4,00	0,037 ± 0,003	8,11
BČ2	2,36 ± 0,03	1,27	0,680 ± 0,007	1,03	2,97 ± 0,04	1,35	n.d. <sup>a</sup>	-	0,027 ± 0,002	7,41
BČ3	3,29 ± 0,05	1,52	0,705 ± 0,005	0,71	2,86 ± 0,05	1,75	0,26 ± 0,01	3,85	0,040 ± 0,002	5,00
BČ4	0,665 ± 0,003	0,45	2,58 ± 0,01	0,39	3,21 ± 0,03	0,93	n.d.	-	0,030 ± 0,002	6,67
BČ5	2,98 ± 0,01	0,34	0,854 ± 0,007	0,82	2,63 ± 0,04	1,52	n.d.	-	0,038 ± 0,002	5,26
BČ6	1,26 ± 0,01	0,79	0,664 ± 0,007	1,05	2,99 ± 0,04	1,34	1,03 ± 0,01	0,97	0,026 ± 0,002	7,69
BČ7	1,23 ± 0,02	2,63	0,82 ± 0,01	1,22	2,88 ± 0,02	0,69	n.d.	-	0,022 ± 0,002	4,55
BČ8	0,43 ± 0,02	4,65	0,60 ± 0,02	3,33	1,51 ± 0,04	2,65	n.d.	-	0,032 ± 0,003	6,25
BČ9	0,33 ± 0,01	3,03	1,16 ± 0,02	1,72	22,3 ± 0,3	1,35	< LOD	-	0,028 ± 0,002	7,14
BČ10	1,14 ± 0,03	2,63	0,81 ± 0,02	2,47	5,0 ± 0,1	2,00	n.d.	-	0,125 ± 0,002	1,60
BČ11	1,87 ± 0,01	0,53	0,787 ± 0,005	0,64	2,69 ± 0,01	0,37	n.d.	-	0,19 ± 0,01	5,26

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

Tabela 5.54. Nastavak

Uzorci	Ba $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Pb $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sb $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Co $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	B $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
BČ1	0,323 ± 0,003	0,93	n.d. <sup>a</sup>	-	3,27 ± 0,05	1,53	n.d.	-	1,5 ± 0,1	6,67
BČ2	0,281 ± 0,005	1,78	n.d.	-	2,91 ± 0,02	0,69	n.d.	-	1,07 ± 0,08	7,48
BČ3	0,247 ± 0,002	0,81	n.d.	-	2,89 ± 0,02	0,69	n.d.	-	0,91 ± 0,04	4,40
BČ4	0,753 ± 0,003	0,40	n.d.	-	4,00 ± 0,03	0,75	n.d.	-	3,84 ± 0,01	0,26
BČ5	0,301 ± 0,002	0,66	n.d.	-	3,23 ± 0,01	0,31	n.d.	-	0,97 ± 0,01	1,03
BČ6	1,56 ± 0,01	0,64	0,41 ± 0,01	2,44	1,76 ± 0,01	0,57	n.d.	-	1,41 ± 0,02	1,42
BČ7	0,607 ± 0,007	1,15	n.d.	-	1,92 ± 0,02	1,04	n.d.	-	0,84 ± 0,02	2,38
BČ8	0,26 ± 0,01	3,85	n.d.	-	1,53 ± 0,02	1,31	n.d.	-	0,45 ± 0,03	6,67
BČ9	0,52 ± 0,01	1,92	n.d.	-	17,2 ± 0,1	0,58	n.d.	-	2,09 ± 0,04	1,91
BČ10	0,48 ± 0,01	2,08	n.d.	-	3,8 ± 0,1	2,63	n.d.	-	0,95 ± 0,03	3,16
BČ11	0,399 ± 0,003	0,75	n.d.	-	2,89 ± 0,03	1,04	n.d.	-	0,77 ± 0,01	1,30

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

**Table 5.55.** Sadržaj mikroelemenata u uzorcima mlečne čokolade

Uzorci	Zn		Fe		Se		Cu		Mo	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
MČ1	12,1 ± 0,1	0,83	37,9 ± 0,4	1,06	0,21 ± 0,02	9,52	3,2 ± 0,03	0,91	0,171 ± 0,008	4,68
MČ2	9,9 ± 0,1	1,01	16,6 ± 0,1	0,60	0,19 ± 0,01	5,26	3,29 ± 0,03	0,98	0,158 ± 0,003	1,90
MČ3	10,1 ± 0,1	0,99	20,5 ± 0,2	0,98	0,19 ± 0,01	5,26	4,09 ± 0,04	0,84	0,144 ± 0,003	2,08
MČ4	9,9 ± 0,1	1,01	23,9 ± 0,2	0,84	n.d. <sup>a</sup>	-	3,58 ± 0,03	0,97	0,215 ± 0,005	2,33
MČ5	8,9 ± 0,2	2,25	21,5 ± 0,2	0,93	0,19 ± 0,01	5,26	3,09 ± 0,03	1,96	0,117 ± 0,007	5,98
MČ6	8,3 ± 0,1	1,20	27,0 ± 0,4	1,48	n.d.	-	3,06 ± 0,06	0,70	0,16 ± 0,01	6,25
MČ7	21,4 ± 0,1	0,47	21,1 ± 0,1	0,47	0,21 ± 0,01	4,76	14,3 ± 0,1	0,34	0,179 ± 0,007	3,91
MČ8	10,3 ± 0,1	0,97	19,5 ± 0,2	1,03	0,18 ± 0,01	5,56	2,95 ± 0,01	0,57	0,12 ± 0,01	8,33
MČ9	9,22 ± 0,02	0,22	8,8 ± 0,1	1,14	0,17 ± 0,01	5,88	3,51 ± 0,02	0,29	0,117 ± 0,002	1,71
MČ10	10,5 ± 0,1	0,95	22,5 ± 0,1	0,44	0,18 ± 0,01	5,56	3,44 ± 0,01	1,83	0,112 ± 0,002	1,79
MČ11	8,3 ± 0,1	1,20	6,0 ± 0,1	1,67	0,20 ± 0,01	5,00	1,64 ± 0,03	1,29	0,132 ± 0,002	1,52
MČ12	4,76 ± 0,05	1,05	36,0 ± 0,3	0,83	0,16 ± 0,01	6,25	2,32 ± 0,03	0,57	0,159 ± 0,003	1,89
MČ13	9,63 ± 0,04	0,42	10,7 ± 0,1	0,93	0,17 ± 0,01	5,88	3,50 ± 0,02	0,77	0,130 ± 0,001	0,77
MČ14	6,45 ± 0,09	1,40	25,9 ± 0,1	0,39	0,22 ± 0,01	4,55	2,60 ± 0,02	0,51	0,128 ± 0,005	3,91
MČ15	11,5 ± 0,1	0,87	31,4 ± 0,1	0,32	0,15 ± 0,01	6,67	3,95 ± 0,02	1,12	0,164 ± 0,007	4,27
MČ16	9,9 ± 0,1	1,01	19,4 ± 0,2	1,03	0,18 ± 0,01	5,56	2,69 ± 0,03	0,96	0,130 ± 0,005	3,85
MČ17	6,5 ± 0,1	1,54	21,2 ± 0,3	1,42	0,18 ± 0,01	5,56	3,14 ± 0,03	1,93	0,148 ± 0,005	3,38
MČ18	13,1 ± 0,1	0,76	16,4 ± 0,2	1,22	0,23 ± 0,02	8,70	2,59 ± 0,05	1,32	0,13 ± 0,01	7,69
MČ19	10,2 ± 0,1	0,98	20,3 ± 0,1	0,49	0,20 ± 0,01	5,00	3,03 ± 0,04	0,91	0,124 ± 0,003	2,42

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

Tabela 5.55. Nastavak

Uzorci	Mn		Ni		V		Si		Cr	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
MČ1	3,24 ± 0,03	0,93	0,839 ± 0,007	0,83	n.d. <sup>a</sup>	-	18,6 ± 0,1	0,54	0,31 ± 0,01	3,23
MČ2	3,11 ± 0,02	0,64	1,19 ± 0,01	0,84	1,04 ± 0,04	3,85	16,6 ± 0,1	0,60	n.d.	-
MČ3	3,99 ± 0,04	1,00	0,89 ± 0,01	1,12	0,99 ± 0,03	3,03	15,6 ± 0,2	1,28	0,23 ± 0,01	4,35
MČ4	2,51 ± 0,03	1,20	2,385 ± 0,003	0,13	0,88 ± 0,03	3,41	17,0 ± 0,1	0,59	0,293 ± 0,007	2,39
MČ5	3,35 ± 0,02	0,60	1,369 ± 0,008	0,58	0,96 ± 0,03	3,13	11,6 ± 0,1	0,86	0,149 ± 0,002	1,34
MČ6	2,97 ± 0,04	1,35	1,089 ± 0,005	0,46	0,88 ± 0,03	3,41	18,9 ± 0,3	1,59	0,370 ± 0,005	1,35
MČ7	11,35 ± 0,07	0,62	3,80 ± 0,05	1,32	7,54 ± 0,02	0,27	13,3 ± 0,2	0,75	0,16 ± 0,01	6,25
MČ8	2,50 ± 0,01	0,40	1,442 ± 0,008	0,55	0,97 ± 0,03	3,09	7,4 ± 0,1	1,35	0,268 ± 0,002	0,75
MČ9	15,26 ± 0,04	0,26	0,80 ± 0,02	2,50	1,39 ± 0,03	2,16	39,9 ± 0,3	0,75	0,173 ± 0,002	1,16
MČ10	3,93 ± 0,03	0,76	0,837 ± 0,007	0,84	1,46 ± 0,05	3,42	12,3 ± 0,2	1,63	0,27 ± 0,01	3,70
MČ11	1,44 ± 0,02	1,39	6,244 ± 0,002	0,03	0,901 ± 0,005	0,55	6,75 ± 0,07	1,04	0,134 ± 0,008	5,97
MČ12	3,55 ± 0,02	0,56	0,895 ± 0,007	0,78	0,974 ± 0,005	0,51	55,7 ± 0,4	0,72	0,34 ± 0,01	2,94
MČ13	3,35 ± 0,04	1,19	0,827 ± 0,007	0,85	1,369 ± 0,06	4,38	41,6 ± 0,5	1,20	0,146 ± 0,007	4,79
MČ14	2,87 ± 0,02	0,70	0,797 ± 0,003	0,38	1,06 ± 0,07	6,60	16,8 ± 0,1	0,60	0,26 ± 0,01	3,85
MČ15	3,64 ± 0,01	0,27	0,826 ± 0,01	1,21	1,26 ± 0,07	5,56	21,1 ± 0,1	0,47	0,36 ± 0,01	2,78
MČ16	2,44 ± 0,03	1,23	0,626 ± 0,005	0,80	1,26 ± 0,02	1,59	8,60 ± 0,03	0,35	0,34 ± 0,01	2,94
MČ17	3,11 ± 0,03	0,96	0,91 ± 0,01	1,10	1,20 ± 0,01	0,83	30,9 ± 0,4	1,29	0,38 ± 0,01	2,63
MČ18	2,79 ± 0,03	1,08	0,61 ± 0,01	1,64	11,93 ± 0,04	0,34	11,9 ± 0,1	0,84	0,19 ± 0,007	3,68
MČ19	2,59 ± 0,01	0,39	0,686 ± 0,007	1,02	12,31 ± 0,02	0,16	9,1 ± 0,1	1,10	0,274 ± 0,003	1,09

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan



Tabela 5.55. Nastavak

Uzorci	Li $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sr $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Al $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sn $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Cd $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
MČ1	1,23 ± 0,01	0,81	2,23 ± 0,01	0,45	13,5 ± 0,1	0,74	0,79 ± 0,02	2,53	0,027 ± 0,002	7,41
MČ2	2,75 ± 0,03	1,09	1,66 ± 0,02	1,20	8,6 ± 0,1	1,16	0,33 ± 0,02	6,06	n.d. <sup>a</sup>	-
MČ3	1,42 ± 0,03	2,11	1,91 ± 0,02	1,05	10,8 ± 0,1	0,93	0,27 ± 0,01	3,70	0,031 ± 0,003	9,68
MČ4	1,54 ± 0,03	1,95	1,77 ± 0,01	0,56	10,1 ± 0,1	0,99	0,19 ± 0,01	5,26	0,031 ± 0,002	6,45
MČ5	1,31 ± 0,01	0,76	1,47 ± 0,01	0,68	7,5 ± 0,1	1,33	n.d. <sup>a</sup>	-	0,030 ± 0,002	6,67
MČ6	1,04 ± 0,01	0,96	1,73 ± 0,03	1,73	11,4 ± 0,2	1,75	0,50 ± 0,03	6,00	0,023 ± 0,002	8,70
MČ7	1,28 ± 0,01	0,63	5,39 ± 0,02	0,37	9,29 ± 0,04	0,43	0,61 ± 0,01	1,64	0,050 ± 0,002	4,00
MČ8	1,82 ± 0,02	1,10	1,62 ± 0,01	0,62	5,07 ± 0,02	0,39	0,13 ± 0,01	7,69	0,020 ± 0,001	5,00
MČ9	1,48 ± 0,04	2,70	2,00 ± 0,02	1,00	3,67 ± 0,02	0,54	0,15 ± 0,01	6,67	0,027 ± 0,001	3,70
MČ10	1,56 ± 0,02	1,28	2,07 ± 0,01	0,48	9,7 ± 0,1	1,03	< LOD <sup>b</sup>	-	0,018 ± 0,001	5,56
MČ11	1,50 ± 0,02	1,33	1,48 ± 0,02	1,35	3,26 ± 0,04	1,23	0,110 ± 0,007	6,36	0,020 ± 0,001	5,00
MČ12	2,79 ± 0,03	1,08	1,65 ± 0,01	0,61	20,1 ± 0,2	1,00	0,109 ± 0,003	2,75	0,028 ± 0,002	7,14
MČ13	1,91 ± 0,03	1,57	2,04 ± 0,02	0,98	4,25 ± 0,02	0,47	< LOD	-	0,024 ± 0,001	4,17
MČ14	1,27 ± 0,01	0,79	1,97 ± 0,01	0,51	12,88 ± 0,04	0,31	0,19 ± 0,01	5,26	0,021 ± 0,002	9,52
MČ15	1,87 ± 0,02	1,07	2,50 ± 0,01	0,40	18,7 ± 0,1	0,53	0,12 ± 0,01	8,33	0,045 ± 0,002	4,44
MČ16	3,67 ± 0,04	1,09	1,61 ± 0,02	1,24	4,8 ± 0,1	2,08	0,14 ± 0,01	7,14	0,0070 ± 0,0005	7,14
MČ17	2,61 ± 0,03	1,15	1,64 ± 0,02	1,22	10,7 ± 0,1	0,93	0,18 ± 0,01	5,56	0,028 ± 0,002	7,14
MČ18	1,24 ± 0,01	0,81	1,85 ± 0,02	1,08	7,3 ± 0,1	1,37	0,169 ± 0,003	1,78	0,027 ± 0,002	7,41
MČ19	1,23 ± 0,01	0,81	1,66 ± 0,01	0,60	8,1 ± 0,1	1,23	0,104 ± 0,008	7,69	0,062 ± 0,002	3,23

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan; <sup>b</sup><LOD – niža od granice detekcije

Tabela 5.55. Nastavak

Uzorci	Ba $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Pb $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sb $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Co $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	B $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
MČ1	1,12 ± 0,01	0,89	n.d. <sup>a</sup>	-	3,34 ± 0,02	0,60	0,062 ± 0,003	4,84	2,3 ± 0,1	4,35
MČ2	0,92 ± 0,01	1,09	n.d.	-	2,88 ± 0,03	1,04	0,045 ± 0,004	8,89	2,07 ± 0,04	1,93
MČ3	1,06 ± 0,01	0,94	0,12 ± 0,01	8,33	2,78 ± 0,03	1,08	0,027 ± 0,001	3,70	2,49 ± 0,04	1,61
MČ4	1,07 ± 0,01	0,93	n.d.	-	3,08 ± 0,03	0,97	0,050 ± 0,004	8,00	2,05 ± 0,02	0,98
MČ5	0,82 ± 0,01	1,22	n.d.	-	2,12 ± 0,02	0,94	n.d.	-	1,97 ± 0,02	1,02
MČ6	1,35 ± 0,01	0,74	n.d.	-	3,53 ± 0,02	0,57	n.d.	-	1,60 ± 0,04	2,50
MČ7	3,87 ± 0,01	0,26	0,26 ± 0,02	7,69	2,37 ± 0,01	0,42	0,224 ± 0,005	2,23	6,13 ± 0,02	0,33
MČ8	0,828 ± 0,003	0,36	n.d.	-	1,38 ± 0,02	1,45	0,026 ± 0,001	3,85	1,64 ± 0,02	1,22
MČ9	1,23 ± 0,02	1,63	0,783 ± 0,002	0,26	7,4 ± 0,2	2,70	0,033 ± 0,002	6,06	1,58 ± 0,02	1,27
MČ10	1,20 ± 0,02	1,67	0,087 ± 0,005	5,75	2,24 ± 0,04	1,79	0,045 ± 0,003	6,67	2,08 ± 0,02	0,96
MČ11	5,16 ± 0,01	0,19	0,085 ± 0,002	2,35	1,23 ± 0,01	0,81	n.d.	-	1,20 ± 0,01	0,08
MČ12	1,18 ± 0,01	0,85	0,15 ± 0,01	6,67	10,2 ± 0,1	0,98	0,042 ± 0,003	7,14	1,62 ± 0,01	0,62
MČ13	1,21 ± 0,02	1,65	0,068 ± 0,005	7,35	7,5 ± 0,1	1,33	0,028 ± 0,002	7,14	1,77 ± 0,04	2,26
MČ14	4,00 ± 0,05	1,25	0,19 ± 0,01	5,26	2,99 ± 0,05	1,67	0,045 ± 0,001	2,22	1,74 ± 0,03	1,72
MČ15	1,74 ± 0,02	1,15	0,21 ± 0,01	4,76	3,69 ± 0,05	1,36	0,037 ± 0,003	8,11	2,28 ± 0,01	0,44
MČ16	0,96 ± 0,01	1,04	0,077 ± 0,005	6,49	1,5 ± 0,03	2,00	0,032 ± 0,001	3,13	1,50 ± 0,01	0,67
MČ17	1,43 ± 0,01	0,70	0,064 ± 0,005	7,81	5,42 ± 0,01	0,18	0,035 ± 0,001	2,86	1,90 ± 0,02	1,05
MČ18	1,00 ± 0,08	8,00	0,12 ± 0,01	8,33	2,07 ± 0,02	0,97	0,018 ± 0,001	5,56	1,91 ± 0,03	1,57
MČ19	1,26 ± 0,01	0,79	0,20 ± 0,01	2,54	1,39 ± 0,03	2,16	0,035 ± 0,003	8,57	1,78 ± 0,02	1,12

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

**Table 5.56.** Sadržaj mikroelemenata u uzorcima crne čokolade

Uzorci	Zn		Fe		Se		Cu		Mo	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
CČ1	21,7 ± 0,1	0,46	127 ± 2	1,57	0,146 ± 0,003	2,05	13,9 ± 0,4	2,88	1,21 ± 0,02	1,65
CČ2	18,8 ± 0,1	0,53	211 ± 7	3,32	0,23 ± 0,01	4,35	12,2 ± 0,1	0,82	0,30 ± 0,01	3,33
CČ3	23,3 ± 0,3	1,29	137 ± 1	0,73	n.d. <sup>a</sup>	-	15,8 ± 0,1	0,63	0,316 ± 0,008	2,53
CČ4	16,3 ± 0,1	0,61	172 ± 3	1,74	0,16 ± 0,01	6,25	9,5 ± 0,1	1,05	0,104 ± 0,007	6,73
CČ5	20,1 ± 0,1	0,50	179 ± 4	2,23	0,25 ± 0,01	4,00	10,5 ± 0,3	2,86	0,158 ± 0,008	5,06
CČ6	27,0 ± 0,1	0,37	51,4 ± 0,3	0,58	0,19 ± 0,01	5,26	17,7 ± 0,1	0,56	0,194 ± 0,008	4,12
CČ7	26,5 ± 0,1	0,38	51,5 ± 0,7	1,36	0,17 ± 0,01	5,88	15,4 ± 0,2	1,30	0,18 ± 0,01	5,56
CČ8	23,9 ± 0,1	0,42	49,0 ± 0,4	0,82	n.d.	-	15,6 ± 0,1	0,64	0,111 ± 0,007	6,31
CČ9	26,8 ± 0,1	0,37	47,0 ± 0,2	0,43	n.d.	-	15,3 ± 0,1	0,65	0,17 ± 0,01	5,88
CČ10	28,9 ± 0,1	0,35	37,8 ± 0,2	0,53	n.d.	-	16,2 ± 0,2	1,23	0,135 ± 0,007	5,19

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

Tabela 5.56. Nastavak

Uzorci	Mn		Ni		V		Si		Cr	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
CČ1	14,50 ± 0,03	0,21	3,80 ± 0,01	0,26	8,30 ± 0,06	0,72	75,1 ± 0,3	0,40	1,17 ± 0,02	1,71
CČ2	15,00 ± 0,04	0,27	5,90 ± 0,03	0,51	15,60 ± 0,06	0,38	219 ± 1	0,46	1,69 ± 0,01	0,59
CČ3	16,2 ± 0,1	0,62	4,80 ± 0,03	0,63	3,50 ± 0,01	0,29	72 ± 1	1,39	1,56 ± 0,01	0,64
CČ4	7,90 ± 0,03	0,38	2,90 ± 0,01	0,34	6,30 ± 0,02	0,32	8,2 ± 0,1	1,22	0,23 ± 0,01	4,35
CČ5	13,60 ± 0,03	0,22	3,40 ± 0,01	0,29	7,30 ± 0,04	0,55	149 ± 1	0,67	1,36 ± 0,01	0,74
CČ6	14,17 ± 0,08	0,56	2,29 ± 0,02	0,87	4,40 ± 0,04	0,91	15,4 ± 0,2	1,30	0,86 ± 0,03	3,49
CČ7	13,1 ± 0,2	1,53	2,33 ± 0,01	0,43	4,02 ± 0,04	1,00	11,3 ± 0,1	0,88	0,74 ± 0,02	2,70
CČ8	13,16 ± 0,07	0,53	2,26 ± 0,01	0,44	3,81 ± 0,03	0,79	13,8 ± 0,3	2,17	0,55 ± 0,01	1,82
CČ9	10,97 ± 0,04	0,36	1,90 ± 0,01	0,53	3,84 ± 0,04	1,04	9,6 ± 0,1	1,04	0,81 ± 0,04	4,94
CČ10	14,9 ± 0,1	0,67	2,56 ± 0,02	0,78	4,15 ± 0,07	1,69	8,9 ± 0,1	1,12	0,70 ± 0,04	5,71

Tabela 5.56. Nastavak

Uzorci	Li $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sr $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Al $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Sn $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Cd $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
CČ1	8,19 ± 0,01	0,12	7,40 ± 0,01	0,14	71,3 ± 0,1	0,14	0,46 ± 0,03	6,52	0,030 ± 0,002	6,67
CČ2	2,02 ± 0,02	0,99	6,60 ± 0,05	0,76	112 ± 1	0,36	1,48 ± 0,04	2,70	0,025 ± 0,001	4,00
CČ3	1,45 ± 0,02	1,38	7,90 ± 0,05	0,63	68,7 ± 0,6	0,87	0,86 ± 0,01	1,16	0,047 ± 0,003	6,38
CČ4	0,392 ± 0,002	0,51	4,20 ± 0,01	0,24	7,2 ± 0,1	1,39	0,16 ± 0,01	6,25	0,044 ± 0,003	6,82
CČ5	1,58 ± 0,02	1,27	6,50 ± 0,06	0,92	97,6 ± 0,3	0,31	2,13 ± 0,07	3,29	0,022 ± 0,001	4,55
CČ6	n.d. <sup>a</sup>	-	7,11 ± 0,04	0,56	29,9 ± 0,2	0,67	0,42 ± 0,02	4,76	0,194 ± 0,003	1,55
CČ7	n.d.	-	5,90 ± 0,07	1,19	20,9 ± 0,3	1,44	0,47 ± 0,01	2,13	0,242 ± 0,003	1,24
CČ8	n.d.	-	6,01 ± 0,05	0,83	28,1 ± 0,2	0,71	0,30 ± 0,02	6,67	0,085 ± 0,005	5,88
CČ9	n.d.	-	7,04 ± 0,03	0,43	17,0 ± 0,1	0,59	0,37 ± 0,02	5,41	0,131 ± 0,002	1,53
CČ10	1,23 ± 0,02	1,63	6,48 ± 0,07	1,08	12,5 ± 0,1	0,80	0,46 ± 0,02	4,35	0,178 ± 0,003	1,69

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

Tabela 5.56. Nastavak

Uzorci	Ba		Pb		Sb		Co		B	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
CČ1	5,60 ± 0,04	0,71	0,60 ± 0,02	3,33	14,0 ± 0,2	1,43	0,288 ± 0,003	1,04	8,30 ± 0,01	0,12
CČ2	4,50 ± 0,03	0,67	0,86 ± 0,01	1,16	4,60 ± 0,04	0,87	0,302 ± 0,002	0,66	9,30 ± 0,04	0,43
CČ3	5,80 ± 0,05	0,86	0,25 ± 0,02	8,00	13,3 ± 0,2	1,50	0,457 ± 0,005	1,09	8,20 ± 0,08	0,98
CČ4	2,90 ± 0,01	0,34	0,30 ± 0,02	6,67	1,50 ± 0,02	1,33	0,154 ± 0,002	1,30	4,50 ± 0,01	0,22
CČ5	4,30 ± 0,04	0,93	0,46 ± 0,04	8,70	22,9 ± 0,2	0,87	0,047 ± 0,002	4,26	9,20 ± 0,02	0,22
CČ6	6,85 ± 0,07	1,02	0,61 ± 0,03	4,92	4,7 ± 0,1	2,13	0,307 ± 0,005	1,63	6,85 ± 0,07	1,02
CČ7	6,08 ± 0,09	1,48	0,60 ± 0,05	8,33	0,40 ± 0,02	5,00	0,339 ± 0,003	0,88	6,08 ± 0,09	1,48
CČ8	5,96 ± 0,04	0,67	0,46 ± 0,04	8,70	0,33 ± 0,01	3,03	0,256 ± 0,008	3,13	5,96 ± 0,04	0,67
CČ9	6,05 ± 0,04	0,66	0,60 ± 0,04	6,67	0,25 ± 0,02	8,00	0,273 ± 0,008	2,93	6,05 ± 0,04	0,66
CČ10	5,67 ± 0,03	0,53	0,61 ± 0,04	6,56	0,35 ± 0,01	2,86	0,276 ± 0,002	0,72	5,67 ± 0,03	0,53

**Table 5.57.** Sadržaj mikroelemenata u uzorcima kakaoa u prahu

Uzorci	Zn	RSD	Fe	RSD	Se	RSD	Cu	RSD	Mo	RSD
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	(%)
KP1	70,6 ± 0,1	0,14	137 ± 1	0,73	0,220 ± 0,003	1,36	47,2 ± 0,2	0,42	0,30 ± 0,01	3,33
KP2	63,2 ± 0,3	0,47	372 ± 2	0,54	n.d. <sup>a</sup>	-	34,5 ± 0,1	0,29	0,74 ± 0,01	1,35
KP3	54,6 ± 0,2	0,37	234 ± 1	0,43	0,150 ± 0,004	2,67	30,3 ± 0,2	0,66	0,29 ± 0,01	3,45
KP4	61,2 ± 0,5	0,82	461 ± 4	0,87	0,240 ± 0,004	2,50	42,0 ± 0,4	0,95	0,46 ± 0,01	2,17
KP5	51,1 ± 0,2	0,39	159 ± 2	1,26	0,220 ± 0,004	1,82	31,4 ± 0,3	0,96	0,193 ± 0,003	1,55
KP6	47,2 ± 0,3	0,64	186 ± 1	0,54	0,200 ± 0,005	1,20	27,3 ± 0,2	0,73	0,20 ± 0,01	5,00
KP7	48,8 ± 0,1	0,20	207 ± 2	0,97	0,250 ± 0,003	1,67	27,8 ± 0,2	0,72	0,24 ± 0,01	4,17
KP8	45,9 ± 0,2	0,44	149 ± 1	0,67	0,220 ± 0,003	1,36	25,5 ± 0,1	0,39	0,16 ± 0,01	4,38

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

**Tabela 5.57.** Nastavak

Uzorci	Mn $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Ni $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	V $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Si $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	Cr $c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
KP1	42,9 ± 0,1	0,23	10,00 ± 0,01	0,10	17,30 ± 0,07	0,40	103 ± 1	0,97	0,78 ± 0,01	1,28
KP2	53,5 ± 0,2	0,37	8,80 ± 0,05	0,57	8,90 ± 0,05	0,56	330 ± 2	0,61	2,03 ± 0,01	0,49
KP3	38,8 ± 0,3	0,77	8,20 ± 0,03	0,37	15,70 ± 0,02	0,13	340 ± 2	0,59	1,48 ± 0,01	0,68
KP4	47,0 ± 0,4	0,85	10,60 ± 0,05	0,47	17,50 ± 0,02	0,11	618 ± 5	0,81	10,9 ± 0,1	0,92
KP5	46,2 ± 0,3	0,65	9,10 ± 0,04	0,44	15,80 ± 0,05	0,32	221 ± 3	1,36	0,68 ± 0,01	1,47
KP6	39,7 ± 0,2	0,50	7,80 ± 0,04	0,51	14,50 ± 0,01	0,07	215 ± 2	0,93	0,56 ± 0,01	1,79
KP7	37,1 ± 0,3	0,81	7,80 ± 0,03	0,38	14,30 ± 0,01	0,07	300 ± 3	1,00	14,1 ± 0,1	0,71
KP8	38,6 ± 0,03	0,08	7,80 ± 0,02	0,26	14,30 ± 0,04	0,28	189 ± 1	0,53	0,62 ± 0,02	3,23



Tabela 5.57. Nastavak

Uzorci	Li		Sr		Al		Sn		Cd	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
KP1	2,62 ± 0,01	0,38	21,8 ± 0,2	0,92	118 ± 1	0,85	0,11 ± 0,01	9,09	0,130 ± 0,005	3,85
KP2	1,02 ± 0,01	0,98	24,2 ± 0,7	2,89	404 ± 3	0,74	0,51 ± 0,04	7,84	0,137 ± 0,004	1,26
KP3	4,61 ± 0,09	0,20	25,2 ± 0,1	0,40	421 ± 4	0,95	0,38 ± 0,03	7,89	0,096 ± 0,002	2,08
KP4	2,99 ± 0,01	0,33	20,1 ± 0,2	1,00	112 ± 1	0,89	1,71 ± 0,04	2,34	0,095 ± 0,003	3,16
KP5	5,62 ± 0,03	0,53	24,3 ± 0,2	0,82	275 ± 3	1,09	< LOD <sup>a</sup>	-	0,122 ± 0,002	1,64
KP6	0,94 ± 0,01	1,06	25,9 ± 0,2	0,77	260 ± 3	1,15	< LOD	-	0,160 ± 0,002	1,25
KP7	1,43 ± 0,01	0,70	27,7 ± 0,2	0,72	353 ± 4	1,13	2,09 ± 0,05	2,39	0,082 ± 0,002	2,44
KP8	0,579 ± 0,002	0,35	22,3 ± 0,4	1,79	238 ± 1	0,42	< LOD	-	0,106 ± 0,003	2,83

<sup>a</sup><LOD – niža od granice detekcije

Tabela 5.57. Nastavak

Uzorci	Ba		Pb		Sb		Co		B	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
KP1	14,9 ± 0,2	1,34	n.d. <sup>a</sup>	-	17,5 ± 0,1	0,57	0,756 ± 0,008	1,06	19,9 ± 0,1	0,50
KP2	17,7 ± 0,2	1,13	0,79 ± 0,03	3,80	59,4 ± 0,2	0,34	0,936 ± 0,002	0,21	34,0 ± 0,2	0,59
KP3	15,0 ± 0,1	0,67	0,61 ± 0,05	8,20	59,1 ± 0,7	1,18	0,613 ± 0,005	0,82	34,3 ± 0,2	0,58
KP4	13,7 ± 0,1	0,73	0,97 ± 0,01	1,03	10,3 ± 0,6	5,83	1,038 ± 0,005	0,48	22,7 ± 0,2	0,88
KP5	12,7 ± 0,1	0,79	0,33 ± 0,02	6,06	38,1 ± 0,3	0,79	0,81 ± 0,01	1,23	31,8 ± 0,1	0,31
KP6	12,9 ± 0,1	0,78	0,63 ± 0,03	4,76	37,6 ± 0,3	0,80	2,43 ± 0,01	0,41	31,4 ± 0,2	0,64
KP7	14,8 ± 0,2	1,35	0,42 ± 0,02	4,76	52,0 ± 0,5	0,96	1,723 ± 0,001	0,06	31,8 ± 0,3	0,94
KP8	10,6 ± 0,1	0,94	0,36 ± 0,02	5,56	17,5 ± 0,1	0,57	1,866 ± 0,005	0,11	30,2 ± 0,1	0,33

<sup>a</sup>n.d. – nije detektovan

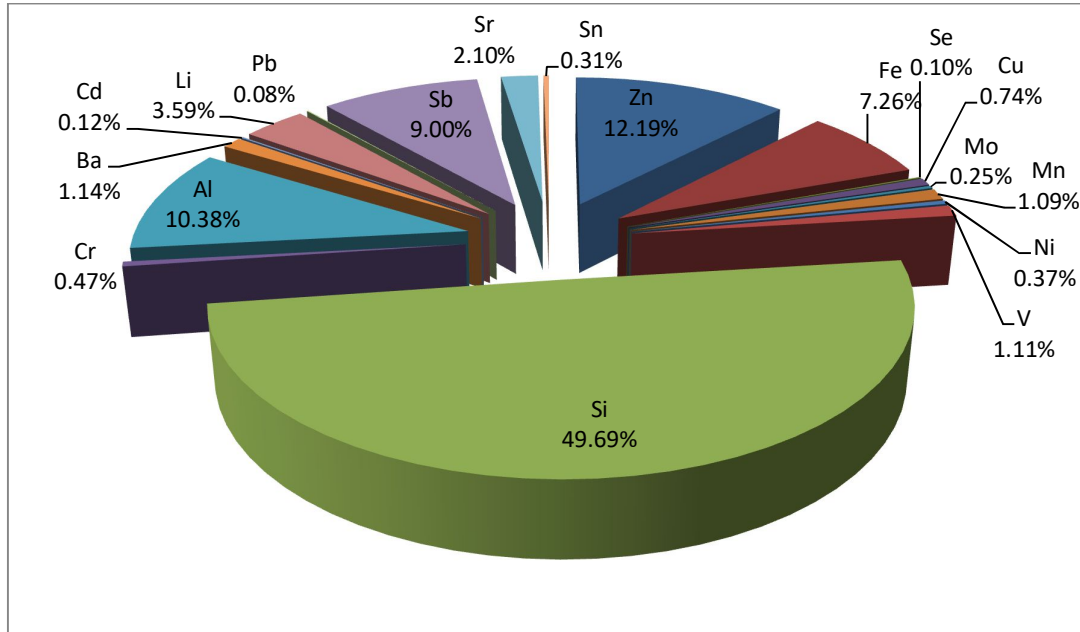
Ako se sadržaj mikroelemenata izrazi u procentima (slike 5.59. – 5.62.), zapaža se da od mikroelemenata, u uzorcima bele čokolade, najviše ima Si, Zn i Fe sa prosečnom zastupljenošću od 49,69%, 12,19% i 7,26%. U uzorcima mlečne čokolade najzastupljeniji mikroelementi su takođe Fe, Si i Zn sa prosečnom zastupljenošću od 43,40%, 23,78% i 9,53%. U uzorcima crne čokolade najzastupljeniji mikroelementi su takođe Si, Fe, Zn sa prosečnom zastupljenošću od 38,40%, 31,59% i 7,34%. Visoka zastupljenost Zn i Si može biti posledica korišćenja đubriva (grahatni prah je organsko đubrivo koje sadrži 67% Si, 3,5% K i 19 minerala u tragovima) i pesticida. Sledeći po zastupljenosti je Al. Uzorci kakaou u prahu se razlikuju od ostalih uzoraka po tome što je kod njih najzastupljeniji mikroelement Al i to sa 65,83%. Aluminijum je, inače, treći najrasprostranjeniji element u zemljinoj kori, tako da je veoma zastupljen u vodi za piće i u namirnicama (*Stahl i sar.*, 2011). Takođe, u ovoj studiji, u kojoj je ispitivana zastupljenost aluminijuma u određenim namirnicama, pokazano je da kakao i čokolade sa različitim procentom kakao delova imaju značajan sadržaj ovog elementa. Prisustvo ovog elementa autori su povezali sa zastupljenošću kakao delova u čokoladi. Takođe, isti autori smatraju da kontaminacija ovim elementom najverovatnije potiče od ambalaže.

Elementi čija je zastupljenost niža od 1% u uspitivanim uzorcima su: Cr, Sn, Se, Cu, Mo, Ni, Li, Ba.

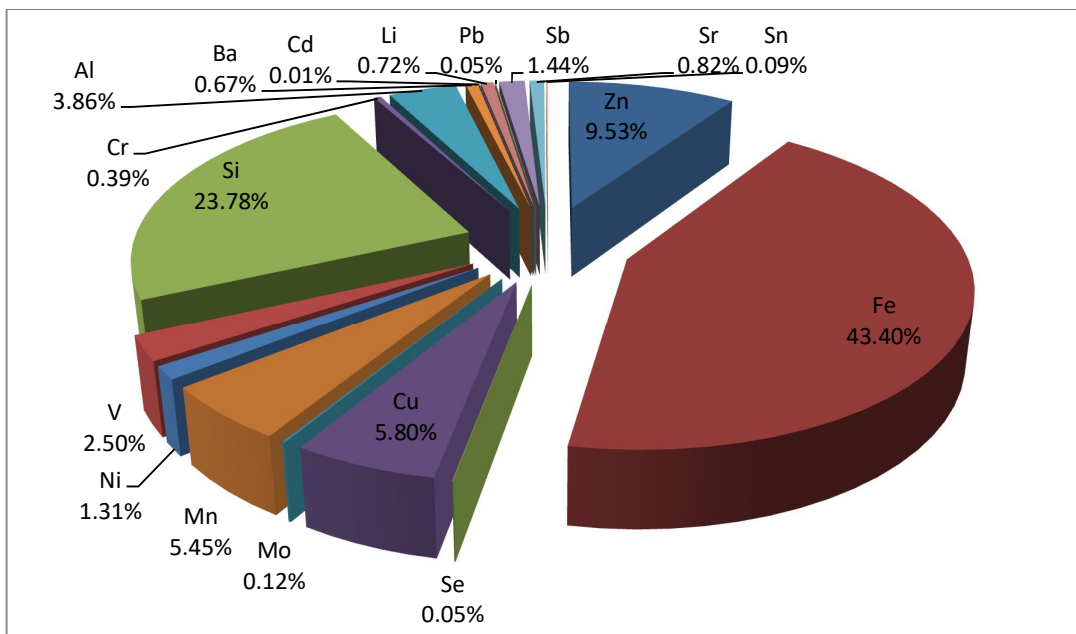
Cd i Pb su malo zastupljeni u uzorcima bele (0,12% i 0,08%), mlečne (0,01% i 0,05%), i crne (0,01% i 0,07%) čokolade, kao i u uzorcima kakaou u prahu (0,03% i 0,12%). Jedan od načina kontaminacije čokolade kadmijum može da bude u procesu alkalizacije, tj. faze u proizvodnji kakaou u prahu ili ukoliko je biljka gajena na zemljištu vulkanskog porekla. Do kontaminacije olovom može da dođe usled ispravanja olovnog benzina tokom sušenja kakao zrna, tokom transporta ili u toku prerade i proizvodnje kakao proizvoda (*Bertoldi i sar.*, 2016).

Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima autora iz Brazila, Austrije, Amerike, Poljske, Malezije i Izraela, može se videti da su dobijeni rezultati najviše u skladu sa rezultatima za čokolade iz Poljske i Austrije (tabela 5.58.). Jedino su vrednosti vanadijuma više od ostalih. Uzrok tome može da bude poreklo sirovina sa područja bogatih naftom. Takođe, na osnovu poređenja rezultata, dolazi se do zaključka da su čokolade i kakao u prahu, prisutni na tržištu Srbije i Švajcarske, bogati makro i mikroelementima, kao i do toga da je sadržaj određenih metala u čokoladi direktno povezan sa količinom kakao delova i da se

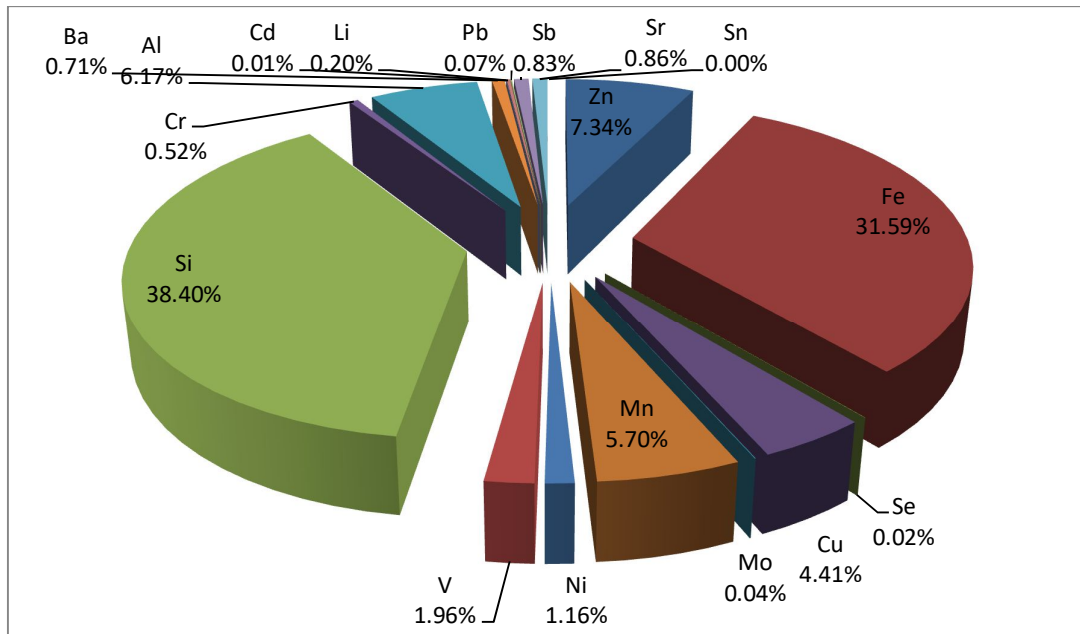
u zavisnosti od sorte kacao zrna, koje je upotrebljeno za proizvodnju čokolade, javljaju varijacije u sadržaju makro i mikroelemenata u gotovim proizvodima.



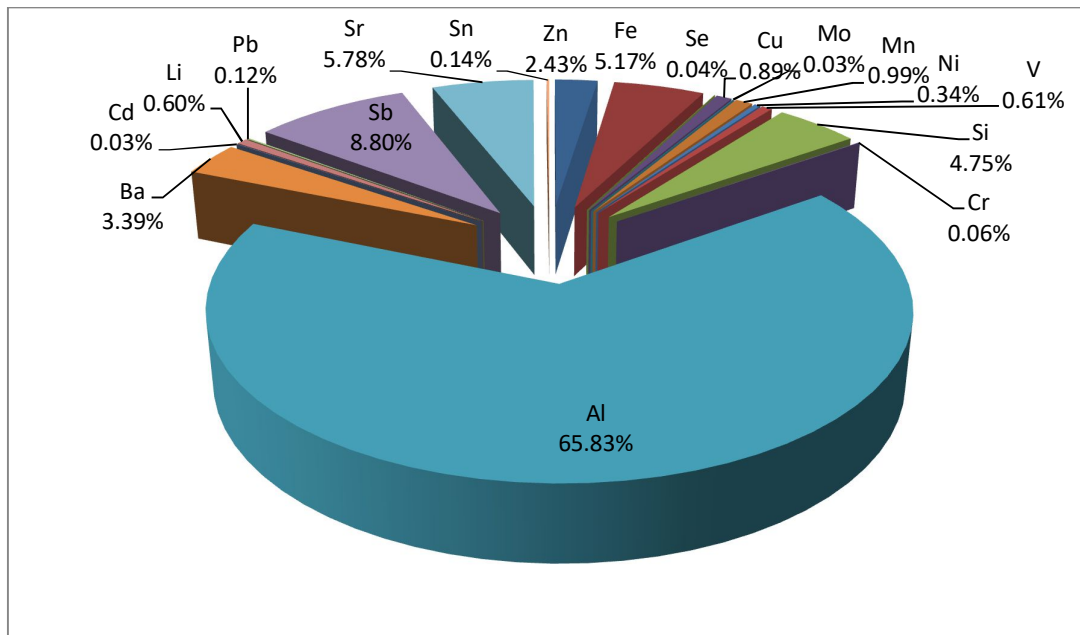
Slika 5.59. Zastupljenost mikroelemenata (%) u uzorcima bele čokolade



Slika 5.60. Zastupljenost mikroelemenata (%) u uzorcima mlečne čokolade



Slika 5.61. Zastupljenost mikroelemenata (%) u uzorcima crne čokolade



Slika 5.62. Zastupljenost mikroelemenata (%) u uzorcima kakaou u prahu

**Tabela 5.58.** Poređenje dobijenih koncentracija makro i mikroelemenata sa koncentracijama drugih autora

Vrsta uzorka, poreklo studije	K (mg/kg)		Ca (mg/kg)		Na (mg/kg)		Mg (mg/kg)		P (mg/kg)		Referenca
	Interval koncentracije	C <sub>Sr</sub>	Interval koncentracije	C <sub>Sr</sub>	Interval koncentracije	C <sub>Sr</sub>	Interval koncentracije	C <sub>Sr</sub>	Interval koncentracije	C <sub>Sr</sub>	
BČ – Brazil	2745 - 3952	3216	3203 - 4534	3845	921 - 1411	1085	325,7 - 496,8	385	-	-	Leggli i sar., 2011
<b>BČ – Srbija</b>	<b>1144 - 5900</b>	<b>3205</b>	<b>522 - 2089</b>	<b>1586</b>	<b>504 - 1529</b>	<b>952</b>	<b>72 - 492</b>	<b>206</b>	<b>1360 - 2345</b>	<b>1820</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
MČ – Brazil	2596 - 3672	3013	1546 - 2523	1985	450,1 - 932,2	664	528,6 - 867,2	696	-	-	Leggli i sar., 2011
MČ – Austrija	-	-	1422 - 2447	1945	634 - 1281	1135	460 - 693	651	1670 - 2423	2053	Sager, 2012
MČ – Poljska	3170 - 4570	3710	538 - 1680	1240	248 - 1060	701	453 - 785	572	930 - 3500	1690	Grembecka i Szefer, 2012
<b>MČ – Srbija</b>	<b>4270 - 7900</b>	<b>1072</b>	<b>640 - 1864</b>	<b>1314</b>	<b>172 - 2104</b>	<b>1072</b>	<b>299 - 608</b>	<b>432</b>	<b>1382 - 2320</b>	<b>1844</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
CČ – Brazil	3654 - 6361	4276	324,4 - 2069	810	59,8 - 509,8	273	997,3 - 1834	1322	-	-	Leggli i sar., 2011
CČ – Austrija	-	-	449 - 1421	601	45 - 435	54	1104 - 1457	1263	1546 - 2228	2055	Sager, 2012
CČ – Austrija	-	-	573 - 890	652	10 - 304	36	1467 - 2383	1810	1880 - 3392	2702	Sager, 2012
CČ – Amerika	5100 - 7400	6025	560 - 750	688	5,7 - 11,6	9	1620 - 2290	1873	2560 - 4340	3108	Bertoldi i sar., 2016
CČ – Poljska	3180 - 13240	7210	132 - 1310	528	267 - 2130	311	913 - 1550	1200	536 - 2360	1070	Grembecka i Szefer, 2012
<b>CČ – Srbija</b>	<b>4950 - 12670</b>	<b>9381</b>	<b>118 - 919</b>	<b>659</b>	<b>43 - 5585</b>	<b>1123</b>	<b>855 - 1608</b>	<b>1384</b>	<b>1560 - 3040</b>	<b>2358</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
KP – Austrija	-	-	1295 - 1741	1554	115 - 295	131	4968 - 5467	5443	6125 - 7148	6632	Sager, 2012
KP – Poljska	4450 - 45750	24590	152 - 1270	823	19,9 - 170	99	843 - 1740	1570	6050 - 10460	8630	Grembecka i Szefer, 2012
<b>KP – Srbija</b>	<b>7870 - 86900</b>	<b>65237</b>	<b>1909 - 2671</b>	<b>2292</b>	<b>117 - 4824</b>	<b>1296</b>	<b>2534 - 4816</b>	<b>3719</b>	<b>2958 - 6130</b>	<b>4480</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>

Tabela 5.58. Nastavak

Vrsta uzorka, poreklo studije	Fe (mg/kg)		Zn (mg/kg)		V (mg/kg)		Cu (mg/kg)		B (mg/kg)		Referenca
	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	
BČ – Brazil	1,2 - 3,0	1,9	10,3 - 13,5	12,3	-	-	-	-	-	-	Leggli i sar., 2011
<b>BČ – Srbija</b>	<b>1,2 - 6,4</b>	<b>3,3</b>	<b>n.d. - 10,2</b>	<b>6,15</b>	<b>0,08 - 1,41</b>	<b>0,51</b>	<b>n.d. - 1,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4 - 3,8</b>	<b>1,3</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
MČ – Brazil	14,7 - 27,4	20,6	7,5 - 10,7	8,9	-	-	-	-	-	-	Leggli i sar., 2011
MČ – Austrija	20,1 - 88,1	48,5	9,11 - 17,0	11,9	<0,03 - 0,17	0,07	3,1 - 6,1	4,3	1,1 - 3,4	2,2	Sager, 2012
MČ – Poljska	7,4 - 72,1	28,6	8,8 - 16,9	12,1	-	-	3,2 - 6,3	4,0	-	-	Grembecka i Szefer, 2012
<b>MČ – Srbija</b>	<b>6,0 - 37,9</b>	<b>21,4</b>	<b>4,8 - 21,4</b>	<b>10,0</b>	<b>n.d. - 12,31</b>	<b>2,55</b>	<b>1,6 - 14,3</b>	<b>3,7</b>	<b>1,2 - 6,3</b>	<b>2,7</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
CČ – Brazil	35,8 - 140,8	62,7	12,1 - 23,3	15,7	-	-	-	-	-	-	Leggli i sar., 2011
CČ – Austrija	86,6 - 150	91,5	18,5 - 25,9	22,6	0,04 - 0,15	0,10	8,5 - 15,1	10,3	4,1 - 11,4	6,6	Sager, 2012
CČ – Austrija	45,7 - 162	147	22,4 - 41,5	34,8	0,02 - 0,28	0,13	9,91 - 26,7	16,0	6,3 - 12,6	9,9	Sager, 2012
CČ – Amerika	35,8 - 72,1	51,7	17,3 - 25,9	20,4	-	-	10,4 - 11,9	11,7	7,2 - 8,8	7,9	Bertoldi i sar., 2016
CČ – Poljska	11,3 - 319	88,5	14,8 - 34,9	22,1	-	-	6,0 - 39,3	16,8	-	-	Grembecka i Szefer, 2012
<b>CČ – Srbija</b>	<b>37,8 - 211</b>	<b>106</b>	<b>16,3 - 28,9</b>	<b>23,3</b>	<b>3,50 - 15,60</b>	<b>6,12</b>	<b>9,5 - 17,7</b>	<b>14,2</b>	<b>4,5 - 9,3</b>	<b>7,0</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
KP – Austrija	111 - 450	167	75,6 - 82,0	78,8	0,04 - 0,46	0,19	44,7 - 56,2	55,9	22,4 - 27,2	26,8	Sager, 2012
KP – Poljska	235 - 519	435	9,0 - 40,2	35,3	-	-	6,0 - 53,9	43,7	-	-	Grembecka i Szefer, 2012
<b>KP – Srbija</b>	<b>137 - 461</b>	<b>238</b>	<b>45,9 - 70,6</b>	<b>55,6</b>	<b>8,90 - 17,50</b>	<b>14,79</b>	<b>25,5 - 47,2</b>	<b>33,2</b>	<b>19,9 - 34,3</b>	<b>29,9</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>

Tabela 5.58. Nastavak

Vrsta uzorka, poreklo studije	Cr (mg/kg)		Co (mg/kg)		Mn (mg/kg)		Mo (mg/kg)		Si (mg/kg)		Ni (mg/kg)		Referenca
	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	Interval koncentracije	c <sub>sr</sub>	
MČ – poljska	0,30 - 0,90	0,50	0,040 - 0,800	0,500	2,5 - 5,9	3,7	-	-	-	-	0,5 - 2,1	1,0	Grembecka i Szefer, 2012
<b>MČ – Srbija</b>	<b>n.d. - 0,38</b>	<b>0,24</b>	<b>n.d. - 0,224</b>	<b>0,041</b>	<b>1,4 - 15,3</b>	<b>4,1</b>	<b>0,112 – 0,215</b>	<b>0,144</b>	<b>6,7 - 55,7</b>	<b>19,6</b>	<b>0,6 - 6,2</b>	<b>1,4</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
CČ – Austrija	0,15 - 1,05	0,65	0,05 - 0,268	0,093	2,8 - 6,0	4,6	0,112 - 0,490	0,166	6,9 - 48	25,6	0,5 - 1,4	1,0	Sager, 2012
CČ – Austrija	0,72 - 2,27	1,03	0,194 - 0,316	0,244	10,2 - 15,3	11,6	0,111 - 0,195	0,152	30 - 72	59	2,6 - 4,9	3,1	Sager, 2012
CČ – Austrija	0,41 - 2,12	1,36	0,286 - 0,668	0,422	13,1 - 21,5	16,6	0,145 - 2,640	0,201	27 - 100	65	2,6 - 7,9	4,3	Sager, 2012
CČ – Izrael	0,48 - 2,43	1,44	0,339 - 0,524	0,433	14,6 - 20,2	17,5	0,153 - 0,305	0,213	-	-	-	-	Sager, 2012
CČ – Amerika	0,25 - 1,72	0,99	0,205 - 0,302	0,252	13,6 - 18,4	15,9	0,119 - 0,322	0,206	-	-	3,3 - 4,7	4,0	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
CČ – Poljska	0,61 - 3,01	1,20	0,300 - 1,100	0,700	6,4 - 27,1	13,3	-	-	-	-	1,9 - 7,9	3,1	Grembecka i Szefer, 2012
<b>CČ – Srbija</b>	<b>0,23 - 1,69</b>	<b>0,96</b>	<b>0,047 - 0,457</b>	<b>0,270</b>	<b>7,9 - 16,2</b>	<b>13,3</b>	<b>0,104 - 1,210</b>	<b>0,288</b>	<b>8,2 - 219</b>	<b>58,1</b>	<b>1,9 – 5,9</b>	<b>3,2</b>	Bertoldi, 2016
KP – Austrija	0,92 - 6,26	1,47	0,790 - 0,970	0,520	28,8 - 53,4	49,0	0,270 - 0,452	0,420	40 - 205	60	10,8 - 17,1	15,3	Sager, 2012
KP – Poljska	0,60 - 9,60	5,10	0,400 - 2,100	1,000	6,0 - 42,2	34,1	-	-	-	-	8,2 - 17,0	12,6	Grembecka i Szefer, 2012
<b>KP – Srbija</b>	<b>0,56 - 14,1</b>	<b>3,88</b>	<b>0,61 – 2,43</b>	<b>1,271</b>	<b>37,1 - 53,5</b>	<b>43,0</b>	<b>0,16 - 0,74</b>	<b>0,322</b>	<b>103 - 618</b>	<b>289</b>	<b>7,8 - 10,6</b>	<b>8,8</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>



Tabela 5.58. Nastavak

Vrsta uzorka, poreklo studije	Al (mg/kg)		Ba (mg/kg)		Cd (mg/kg)		Pb (mg/kg)		Sr (mg/kg)		Referenca
	Interval	c <sub>Sr</sub>	Interval	c <sub>Sr</sub>	Interval	c <sub>Sr</sub>	Interval	c <sub>Sr</sub>	Interval	c <sub>Sr</sub>	
	koncentracije		koncentracije		koncentracije		koncentracije		koncentracije		
MČ – Austrija	4,6 - 30,9	15,4	0,89 - 2,22	1,59	0,008 - 0,041	0,017	0,015 - 0,063	0,030	1,46 - 2,75	2,33	Sager, 2012
MČ – Malezija	-	-	-	-	0,260 - 0,420	0,320	1,100 - 1,940	1,430	-	-	Lee i Low,1985
MČ – Indija	-	-	-	-	0,010 - 0,852	0,071	0,234 - 2,620	0,613	-	-	Dahiya i sar., 2005
<b>MČ – Srbija</b>	<b>3,3 - 20,1</b>	<b>9,5</b>	<b>0,82 - 5,16</b>	<b>1,65</b>	<b>n.d. - 0,062</b>	<b>0,027</b>	<b>n.d. - 0,783</b>	<b>0,127</b>	<b>1,47 - 5,39</b>	<b>2,01</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
CC – Austrija	22,6 - 40,5	37,9	2,86 - 4,66	4,29	0,025 - 0,246	0,037	0,014 - 0,063	0,039	3,90 - 5,36	4,65	Sager, 2012
CC – Malezija	-	-	-	-	0,30 - 0,39	0,345	1,740 - 1,820	1,780	-	-	Lee i Low,1985
CC – Indija	-	-	-	-	0,010 - 2,730	0,244	0,236 - 8,040	1,915	-	-	Dahiya i sar., 2005
CC – Austrija	19,2 - 62,5	44,8	4,25 - 8,99	5,01	0,043 - 0,510	0,194	0,019 - 0,114	0,059	5,74 - 7,81	6,36	Sager, 2012
CC – Izrael	-	-	-	-	0,065 - 0,141	0,105	0,086 - 0,230	0,136	-	-	Yanus i sar., 2014
CC – Amerika	10,6 - 21,5	14,3	3,41 - 7,21	5,12	0,142 - 0,615	0,276	0,083 - 0,235	0,138	5,46 - 6,71	6,19	Bertoldi i sar., 2016
<b>CC – Srbija</b>	<b>7,2 - 112</b>	<b>46,5</b>	<b>2,90 - 6,85</b>	<b>5,37</b>	<b>0,022 - 0,242</b>	<b>0,104</b>	<b>0,250 - 0,860</b>	<b>0,604</b>	<b>4,20 - 7,90</b>	<b>6,51</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>
KP – Austrija	22,9 - 158	39,9	10,50 - 12,9	12,7	0,112 - 0,171	0,122	0,002 - 0,196	0,033	16,80 - 20,00	19,1	Sager, 2012
<b>KP – Srbija</b>	<b>118 - 421</b>	<b>272</b>	<b>10,60 - 17,70</b>	<b>14</b>	<b>0,082 - 0,160</b>	<b>0,116</b>	<b>n.d. - 0,970</b>	<b>0,612</b>	<b>20,1 - 27,7</b>	<b>23,9</b>	<b>Mrmošanin i sar., 2018</b>

Američka nacionalna akademija nauke (*U.S. National Academy of Sciences*) je dala preporučene dnevne potrebe (eng. *Recommended Dietary Allowances – RDAs*) (mg/dan) za neke makro i mikroelemente koje su prikazane u tabeli 5.59. (*U.S. National Academies, Institute of Medicine*, 1997, 2001, 2004, 2011). U tabeli su date preporučene dnevne potrebe muškaraca i žena, i to starosne dobi od 9 do 13 godina, od 14 do 18 godina, od 19 do 30 godina i od 31 do 50 godina.

Na osnovu dobijenih rezultata za ispitivane makro i mikroelemente, izračunato je koliko 100 g čokolade doprinose (%) dnevnim potrebama organizma, što je i prikazano u tabelama 5.60. – 5.62. U tabeli 5.63. je dato koliko 20 g kakaou u prahu doprinosi (%) dnevnim potrebama organizma. Najveći doprinos dnevnim potrebama od makroelemenata u uzorcima bele i mlečne čokolade ima P, dok u uzorcima crne čokolade i kakaou u prahu imaju Mg i K. Sa druge strane, doprinos Ca dnevnom unosu se smanjuje u uzorcima sa povećanim udelom kakaou delova. Doprinos Na se ne menja znatno i kreće se od 6,3% za uzorke bele čokolade do 7,5% za uzorke crne čokolade. Doprinos Na za uzorke kakaou praha je 1,7%. Doprinos K se kreće od 6,1% u uzorcima bele čokolade do 25,1% u uzorcima kakaou u prahu. Doprinos K i svih mikroelemenata se povećava sa povećanjem udela kakaou delova u ispitivanim uzorcima, što potvrđuje da je kakaou izvor ovih elemenata. Najveći doprinos među makro i mikroelemenata je pokazao Cr. Doprinos Cr je najmanji kod muškaraca i to od 62,1% za uzorke bele čokolade do 276% za uzorke crne čokolade, a najveći je kod žena i to od 103,5% za uzorke bele čokolade do 460% za uzorke crne čokolade. Doprinos mikroelemenata je sledeći:

- u uzorcima bele čokolade: Cr > Mo > Se > Zn > Cu > Fe > Mn;
- u uzorcima mlečne čokolade: Cr > Cu > Mo > Se > Fe > Mn > Zn;
- u uzorcima crne čokolade: Cr > Cu > Fe > Mo > Mn > Zn > Se;
- u uzorcima kakaou u prahu: Cr > Cu > Fe > Mn > Mo > Zn > Se.

Iz datih podataka se zapaža da je redosled mikroelemenata gotovo identičan za uzorke kakaou praha i crne čokolade, što je i očekivano s obzirom na to da crna čokolada ima oko 70% kakaou delova.

**Tabela 5.59.** Preporučene dnevne potrebe (mg/dan) za makro i mikroelemente

Element	Odrasli (9-13 god.)		Odrasli (14-18 god.)		Odrasli (19-30 god.)		Odrasli (31-50 god.)	
	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol
K	4500	4500	4700	4700	4700	4700	4700	4700
Na	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Ca	1300	1300	1300	1300	1000	1000	1000	1000
Cr	0,025	0,021	0,035	0,024	0,035	0,025	0,035	0,025
Cu	0,700	0,700	0,890	0,890	0,900	0,900	0,900	0,900
Fe	8	8	11	15	8	18	8	18
Mg	240	240	410	360	400	310	420	320
Mn	1,9	1,6	2,2	1,6	2,3	1,8	2,3	1,8
Mo	0,034	0,034	0,043	0,043	0,045	0,045	0,045	0,045
Se	0,040	0,040	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
P	1250	1250	1250	1250	700	700	700	700
Zn	8	8	11	9	11	8	11	8

**Tabela 5.60.** Doprinosi (%) makro i mikroelementa u beloј čokoladi dnevnim potrebama organizma

Element	Odrasli (9-13 god.)		Odrasli (14-18 god.)		Odrasli (19-30 god.)		Odrasli (31-50 god.)	
	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol
K	6,1	6,1	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Na	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
Ca	12,2	12,2	12,2	12,2	15,7	15,7	15,7	15,7
Cr	86,9	103,5	62,1	90,6	62,1	86,9	62,1	86,9
Cu	4,8	4,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
Fe	4,2	4,2	3,0	2,2	4,2	1,8	4,2	1,8
Mg	8,0	8,0	4,7	5,3	4,8	6,2	4,6	6,0
Mn	2,6	3,1	2,3	3,1	2,2	2,8	2,2	2,8
Mo	34,0	34,0	26,9	26,9	25,7	25,7	25,7	25,7
Se	11,8	11,8	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
P	14,6	14,6	14,6	14,6	26,0	26,0	26,0	26,0
Zn	7,7	7,7	5,6	6,8	5,6	7,7	5,6	7,7

**Tabela 5.61.** Doprinos (%) makro i mikroelemenata u mlečnoj čokoladi dnevnim potrebama organizma

Element	Odrasli (9-13 god.)		Odrasli (14-18 god.)		Odrasli (19-30 god.)		Odrasli (31-50 god.)	
	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol
K	12,6	12,6	12,0	12,0	12,05	12,05	12,05	12,05
Na	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
Ca	10,1	10,1	10,1	10,1	13,1	13,1	13,1	13,1
Cr	97,8	116,5	69,9	101,9	69,9	97,8	69,9	97,8
Cu	52,6	52,6	41,4	41,4	40,9	40,9	40,9	40,9
Fe	26,7	26,7	19,4	14,3	26,7	11,9	26,7	11,9
Mg	18,0	18,0	10,5	12,0	10,8	13,9	10,3	13,5
Mn	21,6	25,6	18,7	25,6	17,8	22,8	17,8	22,8
Mo	42,4	42,4	33,5	33,5	32,0	32,0	32,0	32,0
Se	42,2	42,2	30,7	30,7	30,7	30,7	30,7	30,7
P	14,7	14,7	14,7	14,7	26,3	26,3	26,3	26,3
Zn	12,6	12,6	9,1	11,2	9,1	12,6	9,1	12,6

**Tabela 5.62.** Doprinos (%) makro i mikroelemenata u crnoj čokoladi dnevnim potrebama organizma

Element	Odrasli (9-13 god.)		Odrasli (14-18 god.)		Odrasli (19-30 god.)		Odrasli (31-50 god.)	
	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol	Muški pol	Ženski pol
K	20,8	20,8	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Na	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Ca	5,1	5,1	5,1	5,1	6,6	6,6	6,6	6,6
Cr	387	460	276	403	276	387	276	387
Cu	203	203	160	160	158	158	158	158
Fe	133	133	97	70,8	133	59,0	133	59,0
Mg	57,7	57,7	33,8	38,4	34,6	44,7	33,0	43,3
Mn	70,3	83,4	60,7	83,4	58,0	74,2	58,0	74,2
Mo	84,6	84,6	66,9	66,9	64,0	64,0	64,0	64,0
Se	28,7	28,7	20,8	20,8	20,8	20,8	20,8	20,8
P	18,9	18,9	18,9	18,9	33,7	18,9	33,7	18,9
Zn	29,2	29,2	21,2	25,9	21,2	29,2	21,2	29,2

**Tabela 5.63.** Doprinos (%) makro i mikroelemenata u kakao prahu dnevnim potrebama organizma

Element	Odrasli (9-13 god.)		Odrasli (14-18 god.)		Odrasli (19-30 god.)		Odrasli (31-50 god.)	
	Muški	Ženski	Muški	Ženski	Muški	Ženski	Muški	Ženski
	pol	pol	pol	pol	pol	pol	pol	pol
K	25,1	25,1	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0
Na	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Ca	3,5	3,5	3,5	3,5	4,6	4,6	4,6	4,6
Cr	311,5	370,8	222,5	324,5	222,5	311,5	222,5	311,5
Cu	95,0	95,0	74,7	74,7	73,9	73,9	73,9	73,9
Fe	59,5	59,5	43,3	31,7	59,5	26,5	59,5	26,5
Mg	31,0	31,0	18,1	20,7	18,6	24,0	17,7	23,2
Mn	45,2	53,7	39,1	53,7	37,4	47,7	37,4	47,7
Mo	19,0	19,0	15,0	15,0	14,3	14,3	14,3	14,3
Se	9,4	9,4	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
P	7,2	7,2	7,2	7,2	12,8	12,8	12,8	12,8
Zn	13,8	13,8	10,1	12,3	10,1	13,8	10,1	13,8

U cilju diferenciranja uzoraka čokolade i kakaoa u prahu na osnovu sadržaja elemenata, korišćene su sledeće statističke metode: pirsonova korelaciona analiza, analiza glavnih komponentata i klaster analiza.

Pirsonova korelaciona analiza ( $r > 0,5$ ) (tabela 5.64.) je pokazala dobru korelaciju između makroelemenata K, Ca, Mg i P ( $R^2 > 0,7$ ). To može da bude posledica zajedničkog porekla ovih elemenata. Među mikroelemenatima je uglavnom dobra korelacija. Sa druge strane, ne postoji značajna korelacija Na, Se, Sn i Li sa ostalim elementima. Dobijeni rezultati pokazuju da su odnosi između elemenata daleko složeniji i teško ih je pojedinačno objasniti. Zbog toga su za dalje objašnjenje veza između elemenata korišćene PCA i CA. Analiza glavnih komponentata je jedna od najjednostavnijih metoda multivarijantne analize i može poslužiti u diferenciranju ispitivanih uzoraka, na osnovu sadržaja elemenata, na vrlo jednostavan i razumljiv način. PCA je veoma moćna redukciona tehnika, koja ima za cilj da identifikuje mali broj faktora, koji objašnjavaju većinu posmatranih varijabli (Anderson, 2003).

**Tabela 5.64.** Matrica Pirsonovih koeficijenata korelacije ( $p < 0,05$ )

	Na	K	Ca	Mg	P	Zn	Fe	Se	Cu	Mo	Cr	Mn	Ni	V	Si	Li	Sr	Al	Sn	Cd	Ba	Pb	Sb	Co	B
Na	1,000	0,167	0,071	0,067	-0,138	-0,0152	0,190	0,245	-0,032	0,018	0,347	0,058	0,127	0,215	0,236	0,015	0,136	0,049	<b>0,536</b>	-0,112	0,046	0,213	0,251	0,221	0,149
K		1,000	<b>0,779</b>	<b>0,895</b>	<b>0,825</b>	<b>0,828</b>	<b>0,652</b>	0,384	<b>0,801</b>	0,203	<b>0,531</b>	<b>0,854</b>	<b>0,827</b>	<b>0,799</b>	<b>0,743</b>	0,266	<b>0,932</b>	<b>0,683</b>	0,268	0,209	<b>0,836</b>	0,365	<b>0,708</b>	<b>0,848</b>	<b>0,917</b>
Ca			1,000	0,424	0,448	0,430	0,301	0,099	0,328	0,078	0,268	0,467	0,374	0,274	0,470	0,189	<b>0,530</b>	0,443	0,009	0,322	0,419	-0,120	0,454	0,475	<b>0,569</b>
Mg				1,000	<b>0,908</b>	<b>0,952</b>	<b>0,752</b>	0,324	<b>0,956</b>	0,351	<b>0,529</b>	<b>0,946</b>	<b>0,907</b>	<b>0,840</b>	<b>0,736</b>	0,185	<b>0,949</b>	<b>0,704</b>	0,291	0,399	<b>0,924</b>	0,500	<b>0,704</b>	<b>0,852</b>	<b>0,884</b>
P					1,000	<b>0,904</b>	<b>0,667</b>	0,269	<b>0,907</b>	0,243	0,496	<b>0,857</b>	<b>0,815</b>	<b>0,774</b>	<b>0,719</b>	0,169	<b>0,843</b>	<b>0,752</b>	0,195	0,378	<b>0,848</b>	0,500	<b>0,697</b>	<b>0,701</b>	<b>0,779</b>
Zn						1,000	<b>0,815</b>	0,232	<b>0,986</b>	0,428	<b>0,505</b>	<b>0,969</b>	<b>0,915</b>	<b>0,828</b>	<b>0,769</b>	0,155	<b>0,949</b>	<b>0,737</b>	0,278	<b>0,581</b>	<b>0,968</b>	<b>0,542</b>	<b>0,748</b>	<b>0,781</b>	<b>0,900</b>
Fe							1,000	0,195	<b>0,818</b>	<b>0,543</b>	<b>0,627</b>	<b>0,851</b>	<b>0,842</b>	<b>0,755</b>	<b>0,923</b>	0,193	<b>0,795</b>	<b>0,881</b>	0,490	<b>0,656</b>	<b>0,821</b>	<b>0,745</b>	<b>0,919</b>	<b>0,650</b>	<b>0,785</b>
Se								1,000	0,255	0,106	0,196	0,261	0,337	0,431	0,204	0,226	0,283	0,203	0,217	-0,163	0,248	0,173	0,189	0,313	0,276
Cu									1,000	0,443	<b>0,513</b>	<b>0,956</b>	<b>0,921</b>	<b>0,829</b>	<b>0,758</b>	0,163	<b>0,922</b>	<b>0,748</b>	0,290	<b>0,540</b>	<b>0,954</b>	<b>0,582</b>	<b>0,739</b>	<b>0,756</b>	<b>0,857</b>
Mo										1,000	0,258	0,446	0,445	0,363	0,425	<b>0,557</b>	0,384	0,391	0,130	0,464	0,456	0,429	0,443	0,258	0,376
Cr											1,000	<b>0,511</b>	<b>0,518</b>	0,481	<b>0,713</b>	0,072	<b>0,548</b>	<b>0,726</b>	<b>0,659</b>	0,286	<b>0,536</b>	0,488	<b>0,716</b>	<b>0,511</b>	0,492
Mn												1,000	<b>0,927</b>	<b>0,825</b>	<b>0,822</b>	0,191	<b>0,967</b>	<b>0,769</b>	0,289	<b>0,601</b>	<b>0,962</b>	<b>0,589</b>	<b>0,799</b>	<b>0,822</b>	<b>0,936</b>
Ni													1,000	<b>0,838</b>	<b>0,803</b>	0,227	<b>0,910</b>	<b>0,751</b>	0,329	0,476	<b>0,932</b>	<b>0,578</b>	<b>0,783</b>	<b>0,770</b>	<b>0,911</b>
V														1,000	<b>0,736</b>	0,234	<b>0,830</b>	<b>0,668</b>	0,326	0,303	<b>0,795</b>	<b>0,597</b>	<b>0,714</b>	<b>0,715</b>	<b>0,793</b>
Si															1,000	0,251	<b>0,794</b>	<b>0,960</b>	0,491	<b>0,558</b>	<b>0,777</b>	<b>0,706</b>	<b>0,993</b>	<b>0,662</b>	<b>0,798</b>
Li																1,000	0,187	0,223	0,004	-0,083	0,149	0,071	0,270	0,004	0,204
Sr																	1,000	<b>0,723</b>	0,300	0,490	<b>0,961</b>	0,485	<b>0,768</b>	<b>0,886</b>	<b>0,974</b>
Al																		1,000	0,437	<b>0,559</b>	<b>0,726</b>	<b>0,679</b>	<b>0,951</b>	<b>0,609</b>	<b>0,713</b>
Sn																			1,000	0,108	0,300	0,406	0,482	0,240	0,277
Cd																				1,000	0,456	<b>0,594</b>	<b>0,568</b>	0,358	0,503
Ba																					1,000	<b>0,557</b>	<b>0,760</b>	<b>0,802</b>	<b>0,942</b>
Pb																						1,000	<b>0,710</b>	0,427	0,468
Sb																							1,000	<b>0,618</b>	<b>0,771</b>
Co																								1,000	<b>0,849</b>
B																									1,000

Broj optimalnih faktora koji je korišćen u analizi izabran je na osnovu dijagrama rasipanja, tj. na osnovu *Cattel*-ovog skri (scree) dijagrama. To je dijagram koji povezuje tačke u ravni, čija je apcisa jednaka rednom broju karakteristične vrednosti, a ordinata njenoj veličini. Karakteristične vrednosti su varijable glavnih komponenata. Broj karakterističnih vrednosti u ovom slučaju je 25. Broj glavnih komponenata koje ostaju, određen je tačkom na pregibu, za koje su karakteristične vrednosti male i koje se značajno ne razlikuju (*Jolliffe*, 2002). U ovom slučaju su ekstrahovane dve glavne komponente. Matrica podataka (25×48) pokazuje da je prvim faktorom (PC1) objašnjeno 58,7% varijabiliteta, a drugim (PC2) 9,02%, odnosno prva dva faktora zajedno objašnjavaju 67,74% ukupne varijanse (tabela 5.65.).

**Tabela 5.65.** Koeficijenti opterećenja analiziranih komponenti, dobijeni ispitivanjem sadržaja makro i mikroelemenata u analiziranim uzorcima, u odnosu na dve ose glavnih komponenti

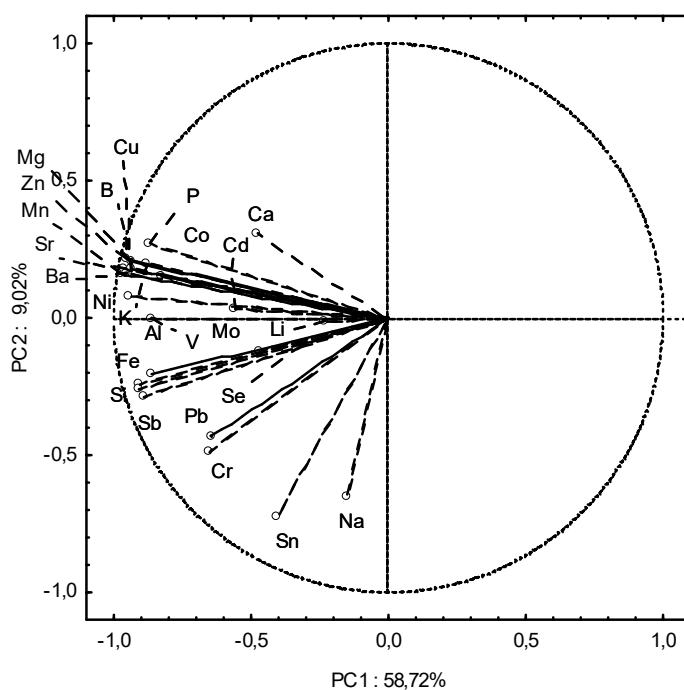
Uzorak	PC1 <sup>a</sup>	PC2 <sup>a</sup>	Element	PC1 <sup>a</sup>	PC2 <sup>a</sup>
BČ1	0,729	0,258	Mn	-0,969	0,152
BČ2	0,744	0,096	Sr	-0,961	0,123
BČ3	0,686	0,195	Ba	-0,954	0,169
BČ4	0,592	0,476	Zn	-0,953	0,209
BČ5	0,697	0,258	Cu	-0,941	0,162
BČ6	0,569	-0,652	B	-0,937	0,122
BČ7	0,688	-0,021	Ni	-0,937	0,012
BČ8	0,844	0,019	Mg	-0,933	0,111
BČ9	0,611	-0,059	Si	-0,905	-0,206
BČ10	0,693	0,062	Fe	-0,902	-0,142
BČ11	0,723	0,051	Sb	-0,886	-0,22
MČ1	0,501	-0,080	P	-0,868	0,185
MČ2	0,531	-0,104	Al	-0,861	-0,157
MČ3	0,558	-0,226	V	-0,859	-0,115
MČ4	0,575	0,025	K	-0,835	-0,054
MČ5	0,627	-0,075	Co	-0,834	0,068
MČ6	0,656	-0,013	Cr	-0,650	-0,450
MČ7	0,179	0,266	Pb	-0,646	-0,279
MČ8	0,608	0,111	Ca	-0,476	0,229
MČ9	0,415	-0,228	Mo	-0,466	-0,016
MČ10	0,506	-0,098	Li	-0,215	-0,167
MČ11	0,400	0,273	Na	-0,153	-0,678
MČ12	0,566	-0,360	Sn	-0,404	-0,661
MČ13	0,536	0,094	Cd	-0,441	0,489

**Tabela 5.65.** Nastavak

MČ14	0,559	-0,086	Se	-0,295	-0,454
MČ15	0,471	0,037			
MČ16	0,575	0,073			
MČ17	0,564	-0,192			
MČ18	0,419	0,050			
MČ19	0,462	0,049			
CČ1	-0,376	-0,655			
CČ2	-0,575	-3,040			
CČ3	-0,136	0,158			
CČ4	0,290	0,037			
CČ5	-0,268	-3,077			
CČ6	-0,063	0,382			
CČ7	0,012	0,353			
CČ8	0,155	0,506			
CČ9	0,113	0,420			
CČ10	0,044	0,427			
KP	-1,683	2,507			
KP2	-2,188	0,497			
KP3	-1,997	1,143			
KP4	-3,200	-2,301			
KP5	-1,809	1,764			
KP6	-1,847	1,076			
KP7	-2,254	-2,231			
KP8	-1,501	1,809			
Eigen vrednost <sup>b</sup>	15,266	2,346			
Varijabilitet (%)	58,717	9,022			
Kumulativna vrednost	58,717	67,739			

<sup>a</sup>PC – glavna komponenta; <sup>b</sup>EV – Eigen vrednost je svojstvena vrednost faktora





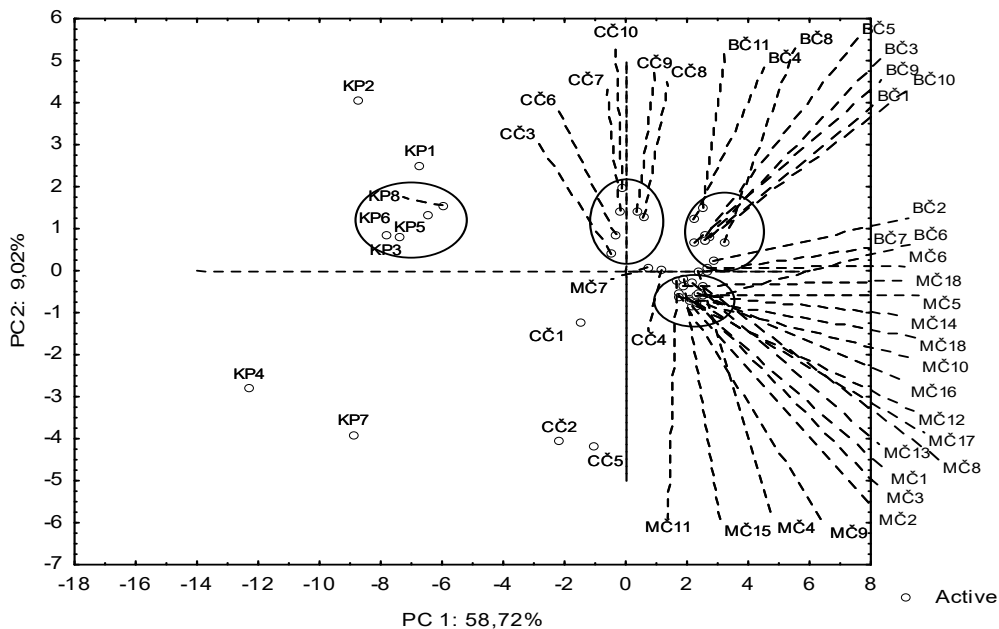
**Slika 5.63.** PCA dijagram makro i mikroelemenata dobijen na osnovu njihovog sadržaja u ispitivanim uzorcima

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 5.65., i na slici 5.63., može se zaključiti da prvu komponentu opisuju sledeći elementi sa visokim negativnim faktorskim zasićenjem: Mn, Sr, Ba, Zn, Cu, B, Ni, Mg, Si, Fe, Sb, P, Al, V, K i Co. Faktorska zasićenja za Cr (-0,650), Pb (-0,646), Ca (-0,476), Mo (-0,466) i Li (-0,215) su niža od ostalih elemenata u grupi. Drugu komponentu opisuju Cr, Pb, Cd, Mo i Ca, sa većim vrednostima faktorskih zasićenja.

Klasifikacija uzoraka čokolade i kakaou u prahu, na osnovu sadržaja metala, dobijena analizom glavnih komponenti, prikazana je na slici 5.64. Sa slike se može videti da se analizirani uzorci mogu klasifikovati u četiri grupe. U prvoj grupi nalaze se uzorci mlečne čokolade i mali broj uzoraka bele čokolade (BČ2, BČ3 i BČ7), sa pozitivnim vrednostima prvog faktora i negativnim vrednostima drugog faktora. Drugu grupu čine ostali uzorci bele čokolade sa pozitivnim vrednostima i prvog i drugog faktora. Treću grupu čine uzorci crne čokolade sa vrednostima prvog faktora oko nule i pozitivnim vrednostima drugog faktora. U četvrtoj grupi nalaze se uzorci kakaou u prahu, sa visokim negativnim vrednostima prvog faktora i pozitivnim vrednostima drugog faktora.

Prva (uzorci mlečne čokolade) i druga grupa (uzorci bele čokolade) imaju približno jednaka zasićenja prvog faktora (tabela 5.65.), što ukazuje na približne vrednosti koncentracija elemenata, koji objašnjavaju prvi faktor. Treća grupa (uzorci crne čokolade) ima nešto niža zasićenja prvog faktora u odnosu na prve dve grupe, što se objašnjava višim koncentracijama elemenata u uzorcima crne čokolade. Četvrta grupa (kakaou u prahu) je prilično odvojena od ostalih grupa (skor prvog faktora), jer su koncentracije elemenata koji opisuju prvi faktor najviše u ovim uzorcima. Takođe, na slici 5.64. se mogu videti izdvojeni uzorci kakaou u prahu KP4 i KP7, sa negativnim vrednostima prvog faktora. U ovim uzorcima, koncentracije elemenata koji opisuju prvi faktor su najveće. Izdvojeni uzorci crne čokolade CČ1, CČ2 i CČ5 su po vrednostima prvog faktora bliže prvoj, drugoj i trećoj grupi.

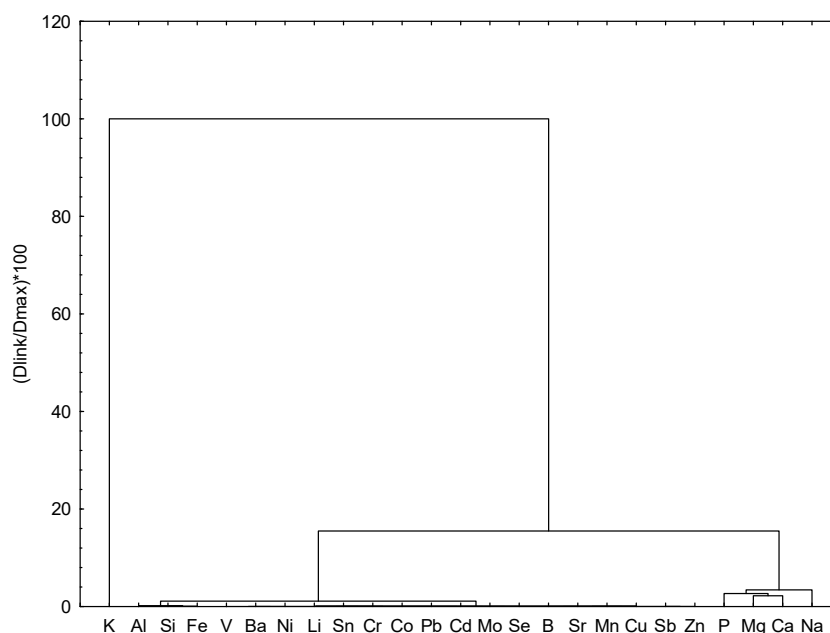
Što se tiče vrednosti drugog faktora, prva grupa ima najniža faktorska zasićenja za Pb, Mo i Li, zatim, slede zasićenja za Na, Sn i Se. To je u korelaciji sa koncentracijama za Pb, Mo i Li koje su najniže, a koncentracije Na, Sn i Se najveće u uzorcima prve grupe. Preostale tri grupe uzoraka imaju ujednačene vrednosti zasićenja drugog faktora, pa su i koncentracije Pb, Mo i Li veće nego u uzorcima prve grupe, a koncentracije Na, Sn i Se su niže nego u prvoj grupi. Izolovani uzorci kakaou u prahu KP4, KP7 i crne čokolade CČ2 i CČ5 imaju najniže vrednosti drugog faktora i samim tim veće koncentracije Na, Sn i Se i niže koncentracije Pb, Mo i Li.



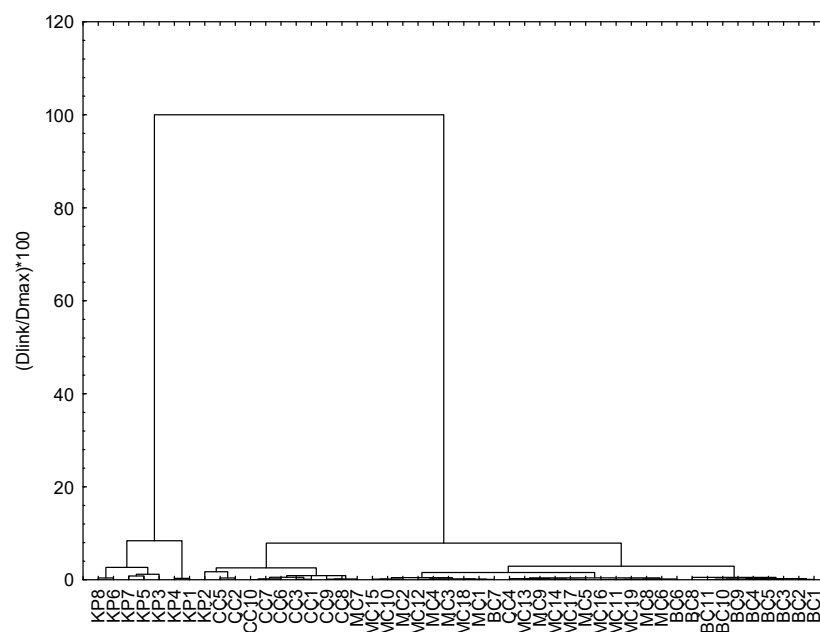
Slika 5.64. PCA dijagram ispitivanih uzoraka dobijen na osnovu sadržaja makro i mikroelemenata

Primenom klaster analize izvršeno je grupisanje elemenata (slika 5.65.) i uzoraka (slika 5.66.). Primenom *Ward*-ove metode (na osnovu Euklidove udaljenosti), kao procene stepena različitosti grupa, na osnovu rastojanja  $D_{link}/D_{max} < 50$  su dobijena dva klastera (slika 5.65.). Prvi klaster sa sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su grupisani makroelementi (Na, Ca, Mg i P), dok se K izdvojio u posebnom klasteru, kao metal sa najvećim sadržajem u svim ispitivanim uzorcima. Najmanje Euklidovo rastojanje (8227) je između Ca i Mg. Kalijum ima veliko Euklidovo rastojanje sa svim ostalim elementima i ono iznosi između 18000 i 19000. Drugi potklaster čine svi mikroelementi. Najmanje Euklidovo rastojanje je između Se i Mo i iznosi 1. Malo rastojanje je i između Cd i Pb (Euklidovo rastojanje = 3), kao i između Cd, Co i Se (Euklidovo rastojanje = 4). Ovo je u saglasnosti i sa rezultatima dobijenim PCA analizom, gde se ovi elementi nalaze u istom delu PCA dijagrama.

Na slici 5.66. je dat dendrogram na kome su, na osnovu rastojanja  $D_{link}/D_{max} < 50$ , uzorci grupisani u dva klastera, na osnovu sadržaja makro i mikroelemenata. Prvi klaster se sastoji od dva potklastera. Prvi potklaster čine uzorci bele i mlečne čokolade dok drugi potklaster čine uzorci crne čokolade. Drugi klaster čine uzorci kakaou u prahu. Klaster analiza je potvrdila grupisanje, koje je dobijeno PCA analizom.



**Slika 5.65.** Dendrogram grupisanja makro i mikroelemenata na osnovu njihovog sadržaja u ispitivanim uzorcima



Slika 5.66. Dendrogram grupisanja uzoraka na osnovu sadržaja elemenata

## ***6. IZVOD***

U okviru doktorske disertacije određen je hemijski sastav i ispitana antioksidativna aktivnost uzoraka bele, mlečne, crne čokolade i kakaoa u prahu. Primenom spektrofotometrijskih testova određen je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida, ukupnih i monomernih antocijana i ispitan je antioksidativni kapacitet analiziranih uzoraka. HPLC metodom su identifikovana i kvantifikovana pojedinačna polifenolna jedinjenja i teobromin. Makro i mikroelementi su određeni ICP-OES metodom, koja je prethodno optimizovana i validirana.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti sledeće:

- ❖ Najveći prosečni sadržaj ukupnih polifenola (UP) i ukupnih flavonida (UF) je u uzorcima crne čokolade (22,7 mg GAE/g i 15,9 mg CE/g), a zatim, u uzorcima kakaoa u prahu (13,8 mg GAE/g i 6,4 mg CE/g), mlečne čokolade (3,4 mg GAE/g i 2,2 mg CE/g) i bele čokolade (0,9 mg GAE/g i 1,0 mg CE/g). Mali sadržaj UP i UF u uzorcima mlečne čokolade je posledica procesa alkalizacije kakao praha i uticaja dodatka lipida i komponenata bogatih lipidima;
- ❖ Najbolju sposobnost hvatanja ABTS radikal katjona su pokazali uzorci crne čokolade (1,35  $\mu\text{mol TE/g}$ ) i kakaoa u prahu (1,26  $\mu\text{mol TE/g}$ ), a zatim, uzorci mlečne čokolade (0,85  $\mu\text{mol TE/g}$ ). Najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala su pokazali uzorci crne čokolade (28,5  $\mu\text{mol TE/g}$ ), a zatim uzorci kakaoa u prahu (21,3  $\mu\text{mol TE/g}$ ), mlečne čokolade (7,47  $\mu\text{mol TE/g}$ ) i bele čokolade (0,94  $\mu\text{mol TE/g}$ ). Iako ABTS i DPPH test izražavaju antioksidativnu aktivnost, razlika u rezultatima ovih testova je u tome što kod ABTS testa reaguju polifenolna jedinjenja tj. kiseonična jedinjenja, dok kod DPPH testa reaguju donori vodonika i slobodni radikali;
- ❖ FRAP i PFRAP su testovi koji se zasnivaju na mehanizmu prenosa elektrona i dobijene vrednosti za ova dva testa su veće od vrednosti dobijenih primenom ABTS i DPPH testa. Ukoliko se porede rezultati dobijeni primenom FRAP testa, antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka opada sledećim redosledom: crna čokolada (191,3  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > kakaou u prahu (85,7  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > mlečna čokolada (20,5  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > bela čokolada (3,3  $\mu\text{mol FE/g}$ ). Kada se porede rezultati dobijeni primenom PFRAP testa, antioksidativna

aktivnost opada u nizu: kakao u prahu (434,5  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > crna čokolada (274,8  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > mlečna čokolada (94,5  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > bela čokolada (54,7  $\mu\text{mol AAE/g}$ ),

- ❖ Ciklični voltagrami uzoraka čokolade i kakaoa u prahu imaju najmanje dva oksidaciona pika, koji odgovaraju oksidaciji hidroksilnih grupa u različitim položajima. Prvi pik se javlja u opsegu potencijala od 370 mV do 460 mV i odgovara oksidaciji katehin-tip flavonoida. Ovi flavonoidi sadrže lako oksidujuću *o*-difetil grupu na B prstenu. Drugi anodni pik, koji se javlja na potencijalu oko 560 mV odgovara oksidaciji monofenol grupe ili *m*-difenola na A-prstenu fenolnih kiselina kao što su ferulna, vanilinska, protokatehinska, *p*-kumarna i sinapinska kiselina. Treći anodni pik, koji se javlja na potencijalu oko 670 mV odgovara sekundarnoj oksidaciji katehina koji su u ispitivanim uzorcima prisutni u visokim koncentracijama. Za razliku od katehin-tip flavonoida, procijanidini B1, B2, B3 i B4 nisu dali anodni talas. Ovo je verovatno posledica prisustva velikog broja fenolnih grupa, koje se nalaze u različitim položajima;
- ❖ Najveće vrednosti  $Q_{600}$  imaju uzorci crne čokolade CČ6, CČ7 i CČ8 (~4) kao i uzorci kakaoa u prahu KP6, KP7 i KP8 (~2), dok najmanje vrednosti imaju uzorci mlečne čokolade MČ1 i MČ8 (0,001) i uzorak bele čokolade BČ8 (0,001);
- ❖ Korelaciona analiza između primenjenih metoda za antioksidativnu aktivnost pokazala je dobru korelaciju između ABTS i DPPH metode ( $R^2 = 0,7830$ ). Dobra korelacija je posledica sličnog mehanizma, koji se zasniva na prenosu elektrona u slabo kiseloj i neutralnoj sredini. FRAP metoda je pokazala bolju korelaciju sa DPPH ( $R^2 = 0,8921$ ) nego sa ABTS metodom ( $R^2 = 0,4893$ ). Ovo je u skladu sa činjenicom da se reakcija redukcije kompleksa  $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$  do kompleksa  $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$  odvija u kiseloj sredini, pri pH 3,6, dok se kod ABTS metode transfer elektrona odvija u neutralnoj sredini;
- ❖ Ukupni polifenoli dobro koreliraju sa rezultatima svih spektrofotometrijskih metoda za ispitivanje antioksidativne aktivnosti, kao i sa rezultatima ciklične

voltometrije. Najbolja korelacija je sa FRAP ( $R^2 = 0,9021$ ), DPPH ( $R^2 = 0,8939$ ), CV ( $R^2 = 0,7348$ ), PFRAP ( $R^2 = 0,5714$ ) i ABTS ( $R^2 = 0,5549$ ) metodom. Visok stepen korelacije potvrđuje vezu između koncentracije polifenolnih jedinjenja u uzorcima čokolade i kakaoa u prahu i njihove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i redukcione sposobnosti gvožđa;

- ❖ Na osnovu PCA analize, primenjene metode za određivanje antioksidativne aktivnosti su klasifikovane u dve grupe. Prvu grupu čine metode ABTS, DPPH i PFRAP, što je i očekivano na osnovu sličnih mehanizama. Iako se na osnovu mehanizma očekuje da je u ovoj grupi FRAP metoda, vrlo često rezultati FRAP metode pokazuju lošiju korelaciju sa drugim antioksidativnim metodama. Tako da se FRAP nalazi u drugoj grupi sa UP, UF i CV;
- ❖ Primenom PCA analize, uzorci su grupisani u četiri grupe na osnovu sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida, antocijana i antioksidativne aktivnosti. Prvu grupu čine uzorci bele čokolade, drugu grupu uzorci mlečne čokolade, treću grupu uzorci crne čokolade i kakaoa u prahu. Uzorci kakaoa u prahu KP1 i KP4 ne pripadaju ovoj grupi. Četvrtu grupu čine uzorci crne čokolade CČ6, CČ7, CČ8, CČ9 i CČ10. Ova grupa se izdvaja po visokom sadržaju ukupnih polifenola i flavonoida;
- ❖ Primenom klaster analize, uzorci su grupisani u dva klastera. Prvi klaster sa sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su uzorci bele čokolade, a u drugom potklasteru su uzorci mlečne čokolade. Drugi klaster se takođe sastoji od dva potklastera. U jednom potklasteru su uzorci crne čokolade i kakaoa u prahu, a u drugom potklasteru su uzorci crne čokolade sa visokim sadržajem ukupnih polifenola i flavonoida;
- ❖ HPLC metodom su identifikovana i kvantifikovana sledeća jedinjenja: alkaloid - teobromin; flavan-3-oli ((+)-katehin, (-)-epikatehin); procijanidini (B1, B2, B3 i B4); fenolna kiselina - protokatehinska kiselina; antocijani (cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid). Najzastupljenije jedinjenje u uzorcima čokolade i kakaoa u prahu je teobromin. Takođe, u analiziranim uzorcima sadržaj (-)-epikatehina je veći od sadržaja (+)-katehina.



Od procijanidina, najviše je zastupljen procijanidin B2, a zatim procijanidini B1, B3 i B4, što je u skladu sa literaturnim podacima;

- ❖ Korelaciona analiza je pokazala veći stepen korelacije između (+)-katehina i procijanidina, nego između (-)-epikatehina i procijanidina, što ukazuje da procijanidini sadrže veći broj jedinica (+)-katehina nego (-)-epikatehina;
- ❖ Primenom PCA analize, uzorci su grupisani u tri grupe, na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja i alkaloida. Prvu grupu čine uzoraka mlečne čokolade. Drugu grupu čine uzorci crne čokolade. U trećoj grupi su uzorci kakaoa u prahu. Uzorci kakao praha KP1 i KP4 se izdvajaju iz četvrte grupe, jer su to jedini uzorci koji sadrže antocijane;
- ❖ Primenom klaster analize, uzorci su grupisani u dva klastera, na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja i alkaloida. Prvi klaster se sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su se grupisali uzorci mlečne čokolade, a u drugom potklasteru uzorci crne čokolade. Drugi klaster čine, takođe, dva potklastera. U prvom su tri uzorka crne čokolade, koji su po sadržaju ukupnih polifenolnih jedinjenja bliski uzorcima kakaoa u prahu, a drugi potklaster čine uzorci kakaoa u prahu;
- ❖ Temperatura čuvanja značajno utiče na brzinu i stepen degradacije ukupnih flavonoida. Degradacija je brža na 35 °C nego na 4 °C. Vreme poluraspada ( $t_{1/2}$ ) se kreće od 365 do 53 dana (4 – 35 °C) za uzorke kakaoa u prahu i od 319 do 89 dana (4 – 35 °C) za uzorak crne čokolade. Čuvanjem uzoraka na 4 °C, vreme poluraspada se više od 3 puta povećava u odnosu na uzorke čuvane na sobnoj temperaturi. Nakon 45 dana čuvanja na temperaturi od 4 °C, uzorci kakaoa u prahu su i dalje imali preko 91% flavonoida, dok su uzorci čuvani i na sobnoj temperaturi imali oko 72% ukupnih flavonoida;
- ❖ HPLC analiza je pokazala da je nakon 30 dana čuvanja kakaoa u prahu, u temperaturnom opsegu od 4 °C do 35 °C, procenat gubitka (+)-katehina od 14,4% do 31,8%; (-)-epikatehina od 19,6% do 36,0%; procijanidina B1 od 34,1% do 60,5%; B2 od 28,7% do 64,8%; B3 od 21,5%-48,9% i B4 od 19,5%

do 61,9%; cijanidina-3-*O*-galaktozida od 52,1% do 73,9% i cijanidina-3-*O*-arabinozida od 49,9% do 74,8%,

- ❖ HPLC analiza je pokazala da je nakon 45 dana čuvanja crne čokolade u temperaturnom opsegu od 4 °C do 35 °C, procenat gubitka (+)-katehina od 16,8% do 33,1%; (-)-epikatehina od 10,3% do 25,8%; procijanidina B1 od 13,6% do 33,3%; B2 od 13,6% do 33,3%; B3 od 13,6% do 33,3% i B4 od 14,3% do 32,4%,
- ❖ Viša vrednost koeficijenta  $Q_{10}$ , na temperaturi čuvanja od 4 °C do 22 °C, ukazuje da na nižim temperaturama čuvanja promena temperature dovodi do brže degradacije flavonoida nego na višim temperaturama čuvanja (22 – 35 °C);
- ❖ U cilju ICP-OES određivanja makro i mikroelemenata urađena je optimizacija i validacija metoda. Robusnost plazme je postignuta pri RF snazi generatora od 1150 W i brzini protoka gasa za raspršivanje od 0,5 l/min;
- ❖ Ispitivanjem uticaja različitih koncentracija  $\text{HNO}_3$  (0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10%; 15% i 20% (v/v)) na intenzitet linije Mg(I) (285,213 nm), došlo se do zaključka da je najbolje koristiti 0,5% rastvor  $\text{HNO}_3$  za dopunjavanje normalnih sudova, u postupku pripreme uzoraka;
- ❖ Odabrane su radne talasne dužine sa minimumom efekta matriksa, upoređivanjem nagiba kalibracione prave dobijene iz standardnih rastvora i kalibracione prave kod koje su standardi „spajkovani” određenom zapreminom rastvora uzorka ( $n_{\text{kal}}/n_{\text{uz}}$ ). Što je dobijeni odnos bliži jedinici to je na toj talasnoj dužini najmanji uticaj matriksa.
- ❖ Tačnost i preciznost metoda su ispitani primenom sertifikovanih referentnih materijala (CRM) mleka u prahu (za uzorke bele čokolade i mlečne čokolade) i čokolade za kuvanje (za uzorke crne čokolade i kakaou u prahu), za koje su sertifikovane vrednosti za 15 metala (Ca, K, Mg, Na, P, Cl, Cu, Cd, Fe, Hg, I, Mn, Pb, Se i Zn). Poređenjem nađenih vrednosti sa sertifikovanim vrednostima tačnost ICP-OES metode se kreće od 93,48% za Fe do 110,53% za Pb (CRM – mleko u prahu) i od 93,18% za Fe do 104,75% za Na (CRM –

čokolada za kuvanje). Preciznost se kreće od 3,31% za K do 10,00% za Cd (CRM-mleko u prahu) i od 3,70% za Zn do 7,98% za Mn (CRM – čokolada za kuvanje), a;

- ❖ Od makroelemenata najviše ima K i to u uzorcima kakaou u prahu, a zatim slede uzorci crne, mlečne i bele čokolade. Ovo ukazuje na to da je sadržaj K direktno povezan sa udelom kakaou delova. Posle K, najviše ima P, Ca, Na i Mg i to u beloj, mlečnoj, crnoj čokoladi i kakaou u prahu. To je očekivano obzirom na udeo mleka u ispitivanim uzorcima. Od mikroelemenata najzastupljeniji su Si, Zn i Fe. Sadržaj potencijalno toksičnih metala, Pb i Cd, je ispod maksimalno dozvoljenih vrednosti (MDK) propisanih nacionalnom i svetskom regulativom;
- ❖ Korelaciona analiza je pokazala da postoji dobra korelacija između makroelemenata, a od mikroelemenata dobro koreliraju Ni, Pb, Cd i Cr;
- ❖ Primenom PCA analize, uzorci su klasifikovani u četiri grupe, na osnovu sadržaja makro i mikroelemenata. U prvoj grupi su uzorci mlečne čokolade i mali broj uzoraka bele čokolade (BČ2, BČ3 i BČ7). Drugu grupu čine ostali uzorci bele čokolade. U trećoj grupi su uzorci crne čokolade, a u četvrtoj su uzorci kakaou u prahu;
- ❖ Primenom klaster analize, uzorci su grupisani u dva klastera, na osnovu sadržaja makro i mikroelemenata. Prvi klaster se sastoji od dva potklastera. Prvi potklaster čine uzorci bele i mlečne čokolade, a drugi potklaster čine uzorci crne čokolade. Drugi klaster čine uzorci kakaou u prahu. Klaster analiza je potvrdila grupisanje, koje je dobijeno PCA analizom.

## ***7. SUMMARY***

Within this doctoral dissertation, the chemical composition and antioxidative activity of white, milk, dark chocolate and cocoa powder samples were determined. Spectrophotometric tests were used to determine the content of total polyphenols, flavonoids, total and monomer anthocyanins, as well as to investigate the antioxidative capacity of the analyzed samples. The identification and quantification of polyphenolic compounds and theobromine were carried out using HPLC chromatography. Macro and microelements were determined by the ICP-OES method that had previously been optimized and validated.

Based on the obtained results, the following can be concluded:

- ❖ The highest average content of total polyphenols (TP) and total flavonoids (TF) is in dark chocolate samples (22.7 mg GAE/g and 15.9 mg CE/g), following by cocoa powder samples (13.8 mg GAE/g and 6.4 mg CE/g), milk chocolate samples (3.4 mg GAE/g and 2.2 mg CE/g) and white chocolate samples (0.9 mg GAE/g and 1.0 mg CE/g). The small content of TP and TF in milk chocolate samples is due to the alkalization process of cocoa powder and due to the impact of adding the lipid and lipid-rich components.
- ❖ Dark chocolate samples have shown the highest ABTS antioxidant activity. Dark chocolate (28.5  $\mu\text{mol TE/g}$ ) samples have shown the highest DPPH antioxidant activity, followed by samples of cocoa powder (21.3  $\mu\text{mol TE/g}$ ), milk chocolate (7.47  $\mu\text{mol TE/g}$ ) and white chocolate (0.94  $\mu\text{mol TE/g}$ ). Although the ABTS and DPPH tests determine antioxidant activity, the difference in the results of these two tests is based on the fact that when the ABTS test is used, what reacts are polyphenolic compounds, while when the test is used, what reacts are the donors of hydrogen and free radicals.
- ❖ The FRAP and PFRAP tests are based on the electron transfer mechanism and the obtained values for these two tests are higher than those obtained using the ABTS and DPPH tests. Comparing the results obtained using the FRAP test, the antioxidant activity of the tested samples decreases in the following order: dark chocolate (191.3  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > cocoa powder (85.7  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > milk chocolate (20.5  $\mu\text{mol FE/g}$ ) > white chocolate (3.3  $\mu\text{mol FE/g}$ ). When comparing the results obtained using the PFRAP test, the antioxidant activity decreases in the following order: cocoa powder (434.5  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > dark

chocolate (274.8  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > milk chocolate (94.5  $\mu\text{mol AAE/g}$ ) > white chocolate (54.7  $\mu\text{mol AAE/g}$ ).

- ❖ The cyclic voltammograms of chocolate samples and cocoa powder have at least two oxidation peaks. The peaks correspond to the oxidation of hydroxyl groups in different positions. The first peak occurs in the potential range from 370 mV to 460 mV and corresponds to the oxidation of catechin-type flavonoids. These flavonoids contain an easily-oxidizing ortho-diphenyl group on the B-ring. The second anode peak, which occurs at a potential of about 560 mV, corresponds to the oxidation of the monophenol group or *m*-diphenol on the A-ring of phenolic acids such as ferulic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid, and sinapinic acid. The third anode peak, which occurs at a potential of about 670 mV, corresponds to the secondary oxidation of catechins that are present in high concentrations in the test samples. In contrast to catechin-type flavonoids, procyanidins B1, B2, B3, and B4 have not shown anode wave. This is probably due to the presence of a large number of phenolic groups in different positions.
- ❖ The samples of dark chocolate DC6, DC7 and DC8, as well as the samples of cocoa powder CP6, CP7 and CP8 have the highest values of the  $Q_{600}$  ( $\sim 4$  and  $\sim 2$  respectively), while the samples of milk chocolate MC1 and MC8 and the white chocolate sample WC8 have the smallest values of the  $Q_{600}$  (0.001).
- ❖ A correlation analysis among the applied methods for antioxidant activity has shown a good correlation between the ABTS and DPPH method ( $R^2 = 0.7830$ ). A good correlation is the result of a similar mechanism that is based on the transfer of electrons in a weakly acidic and neutral medium. The FRAP method has shown a better correlation with the DPPH ( $R^2 = 0.8921$ ) than with the ABTS method ( $R^2 = 0.4893$ ). This is consistent with the fact that the reduction reaction of the complex  $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  to the complex  $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  takes place in the acidic media at pH 3.6, while when the ABTS method is used the electron transfer takes place in a neutral medium.
- ❖ The total polyphenols correlate well with results of all spectrophotometric methods for testing antioxidant activity, as well as with results of cyclic

voltammetry. The best correlation is with the FRAP ( $R^2 = 0.9021$ ), DPPH ( $R^2 = 0.8939$ ), CV ( $R^2 = 0.7348$ ), PFRAP ( $R^2 = 0.5714$ ) and ABTS ( $R^2 = 0.5549$ ) method. A high degree of correlation confirms the relationship between the concentration of polyphenolic compounds in chocolate samples and cocoa powder and their ability to neutralize free radicals and the reduced ability of iron.

- ❖ Based on PCA analysis, the methods used to determine the antioxidant activity can be classified into two groups. The first group includes the ABTS, DPPH and PFRAP methods, which is also expected for similar mechanisms. Although it is expected for the FRAP method to be in this group as well, based on the mechanism, the results of the FRAP method very often have a poor relationship with other antioxidant methods. This is why FRAP is in the second group with TP, TF, and CV.
- ❖ According to the PCA analysis, the samples have been grouped into four groups based on total phenols, flavonoids, and anthocyanins as well as based on the investigation of antioxidative activity. White chocolate samples are in the first group, milk chocolate samples are in the second group, and dark chocolate and cocoa powder samples are in the third group. The samples of cocoa powder CP1 and CP4 do not belong to this group. The fourth group consists of dark chocolate samples DC6, DC7, DC8, DC9, and DC10. This group is distinguished because of its high content of total polyphenols and flavonoids.
- ❖ According to the cluster analysis, a classification of samples similar is to the PCA analysis classification has been obtained. The first cluster consists of two subclusters. White chocolate samples are grouped in the first subcluster, while milk chocolate samples are grouped in the second subcluster. The second cluster also consists of two subclusters. Dark chocolate and cocoa powder samples are in the first subcluster, whereas dark chocolate samples with a high content of total polyphenols and flavonoids are grouped in the second subcluster.

- ❖ The following compounds have been identified and quantified by the HPLC method: alkaloid - theobromine; flavan-3-ols ((+)-catechin, (-)-epicatechin); procyanidins (B1, B2, B3 and B4); phenolic acid - protocatechuic acid; anthocyanins (cyanidin-3-*O*-galactoside and cyanidin-3-*O*-arabinoside). The most abundant compound in chocolate samples and cocoa powder is theobromine. Also, in the analyzed samples, the content of (-)-epicatechin is higher than the content of (+)-catechin. Among procyanidins, procyanidin B2 is the most abundant, followed by procyanidins B1, B3 and B4, which is in accordance with literature data.
- ❖ A correlation analysis has shown a greater degree of correlation between catechins and procyanidins than between epicatechin and procyanidins, indicating that procyanidins contain a larger number of catechin than epicatechin units.
- ❖ Based on the PCA analysis, all samples have been grouped into three groups, based on individual polyphenol compounds. The first group consists the milk chocolate samples. The second group consists of dark chocolate samples. Samples of cocoa powder are in the third group. The samples of cocoa powder CP1 and CP4 are separated from the fourth group because these two samples contain anthocyanins.
- ❖ According to the cluster analysis, the samples have been grouped into two clusters. The first cluster consists of two subclusters. Milk chocolate samples are grouped in the first subcluster and dark chocolate samples in the second subcluster. The second cluster also consists of two subclusters. Three samples of dark chocolate (their content of total polyphenolic compounds is close to the content of cocoa powder samples) are in the first subcluster and cocoa powder samples are in the second subcluster.
- ❖ The storage temperature significantly affects the degradation rate of total flavonoids. The degradation is faster at 35 °C than at 4 °C. The half – life time ( $t_{1/2}$ ) ranges from 365 to 53 days (4 – 35 °C) for cocoa powder samples and from 319 to 89 days (4 – 35 °C) for a black chocolate sample. By storing the samples at 4 °C, the half – life time is increased more than 3 times in relation



to the samples stored at room temperature. After 45 days at a temperature of 4 °C, the cocoa powder samples were still contained over 91% flavonoids, while the samples kept at room temperature were contained about 72% of the total flavonoids.

- ❖ The HPLC analysis has shown that after 30 days of storing cocoa powder in the temperature range from 4 °C to 35 °C, the loss percentage of (+)-catechin ranges from 14.4% to 31.8%, of (-)-epicatechin from 19.6% to 36.0%, of procyanidin B1 is from 34.1% to 60.5%, of B2 is from 28.7% to 64.8%, of B3 from 21.5% -48.9%, of B4 from 19.5% to 61.9%, of cyanidin-3-*O*-galactoside from 52.1% to 73.9% and of cyanidin-3-*O*-arabinoside from 49.9% to 74.8%.
- ❖ The HPLC analysis has shown that after 45 days of storing dark chocolate in the temperature range from 4 °C to 35 °C, the loss percentage of (+)-catechin ranges from 16.8% to 33.1%; of (-)-epicatechin from 10.3% to 25.8%, of procyanidin B1 from 13.6% to 33.3%, of B2 from 13.6% to 33.3%, of B3 from 13.6% to 33, 3% and of B4 from 14.3% to 32.4%.
- ❖ A higher value of the  $Q_{10}$  coefficient at a storage temperature 4 – 22 °C indicates that at lower storage temperatures the temperature change leads to faster flavonoid degradation as compared to higher storage temperatures (22 – 35 °C).
- ❖ In the process of optimizing instrument parameters for the ICP-OES determination of macro- and microelements, the robustness of the plasma has been achieved at the RF power of the 1150 W and the flow rate of the nebulizer gas flow of 0.5 l/min.
- ❖ By testing the influence of different HNO<sub>3</sub> acid concentrations (0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15% and 20% (v/v)) on the intensity of the Mg(I) line (285.213 nm), it has been concluded that the concentration of 0.5% of HNO<sub>3</sub> is the optimal concentration for filling up vessels after sample preparation.
- ❖ Working wavelengths with a minimal matrix effect were chosen by comparing the slope of the calibration curve obtained from the standard solutions with the slope of the calibration curve where the standards were spiked with a specific

volume of sample solution ( $n_{ca}/n_s$ ). The closer the obtained ratio is to 1, the smaller the matrix effect is at that wavelength.

- ❖ The accuracy and precision of the ICP-OES method have been determined using certified referent material (CRM) of milk powder (for white chocolate and milk chocolate samples) and baking chocolate (for dark chocolate and cocoa powder samples), with certified values for the content of 15 metals (Ca, K, Mg, Na, P, Cl, Cu, Cd, Fe, Hg, I, Mn, Pb, Se and Zn). By comparing the obtained values with the certified CRM values, the precision has ranged from 3.31% for K to 10.00% for Cd (CRM – milk powder) and from 3.70% for Zn to 7.98% for Mn (CRM – baking chocolate) and the accuracy has ranged from 93.48% for Fe to 110.53% for Pb (CRM – milk powder) and from 93.18% for Fe to 104.75% for Na (CRM – baking chocolate).
- ❖ Among macroelements, K is most abundant in cocoa powder samples, followed by samples of dark, milk and white chocolate. This indicates that the content of K is directly related to the contribution of cocoa parts. After K, most abundant elements are P, Ca, Na and Mg in white, milk, dark chocolate and cocoa powder samples. This is expected due to the contribution of milk in the tested samples. Si, Zn and Fe are the most abundant among microelements. The content of potentially toxic metals, such as Pb and Cd, is below the maximum permissible levels (MPL) prescribed by national and international regulations.
- ❖ A correlation analysis has shown that there is a good correlation among macroelements, and that Ni, Pb, Cd and Cr correlate well among microelements.
- ❖ According to the PCA analysis, the samples have been classified into four groups based on the content of macro- and microelements. The first group contains milk chocolate samples and a small number of white chocolate samples (WC2, WC3 and WC7). The rest of white chocolate samples are in the second group. Dark chocolate samples are in the third and cocoa powder samples are in the fourth group.

- ❖ According to the cluster analysis, the samples have been grouped into two clusters based on the content of macro- and microelements. The first cluster consists of two subclusters. White and milk chocolate samples are in the first subcluster, while dark chocolate samples are in the second subcluster. Cocoa powder samples are in the second cluster. The cluster analysis has confirmed the grouping obtained by the PCA analysis.

## ***8. LITERATURA***

- Adamson G.E., Lazarus S.A., Mitchell A.E., Prior R.L., Cao G., Jacobs P.H., Kremers B.G., Hammerstone J.F., Rucker R.B., Ritter K.A., Schmitz H.H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**(10): 4184-4188.
- Afoakwa E.O., Paterson A., Fowler M., *Trends in Food Science & Technology*, 2007, **18**(6): 290-298.
- Afoakwa E.O., Quao J., Takrama F.S., Budu A.S., Saalia F.K., *International Food Research Journal*, 2012, **19**(3): 1071-1077.
- Alañón M.E., Castle S.M., Siswanto P.J., Cifuentes-Gómez T., Spencer J.P.E., *Food Chemistry*, 2016, **208**: 177-184.
- Aliasgharpour M., Farzami M., *International Journal of Medical Investigation*, 2013, **2**(3): 115-128.
- Anderson T.W., *An introduction to multivariate statistical analysis*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2003.
- Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Koleva-Kolarova R., *Trakia Journal of Sciences*, 2011, **9**(1): 88-98.
- AOAC International, *Method Validation Program (OMA/PVM Department), including Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*, AOAC International, Rockville, MD, 2000.
- Apgar J.L., Tarka S.M., *Methylxanthine composition and consumption patterns of cocoa and chocolate products* In Caffeine, Spiller G.A., CRC Press, Boca Raton, FL, 1998.
- Arnao M.B., Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., Acosta M., *Analytical Biochemistry*, 1996, **236**(2): 255-261.
- Aroyeun S.O., Ogunbayo J.O., Olaiya, A.O., *British Food Journal*, 2006, **108**(2): 141-151.
- Arteaga J.F., Ruiz-Montoya M., Palma A., Alonso-Garrido G., Pintado S., Rodriguez-Mellado J.M., *Molecules*, 2012, **17**(5): 5126-5138.
- Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.P., Bast A., *Food Chemistry and Toxicology*, 2004, **42**(1): 45-49.
- Ashok B.T., Ali R., *Experimental Gerontology*, 1999, **34**(3): 293-303.
- Atkins P., de Paula J., *Atkin's Physical Chemistry*, 9<sup>th</sup> Ed., Oxford Univeristy Press, Oxford, UK, 2010.
- Baba S., Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Takizawa T., Nakamura T., Terao J., *Free Radical Research*, 2000, **33**(5): 635-641.

- Bagotsky V.S., *Fundamentals of Electrochemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2006.
- Ballesteros W., Lagos T.C., Ferney H., *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 2015, **9**(2): 313-328.
- Bard A., Faulkner L., *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*, 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2001.
- Bazinet L., Araya-Farias M., Doyen A., Trudel D., Tetu B., *Food Research International*, 2010, **43**(6): 1692-1701.
- Beckett S.T., *The Science of Chocolate*, Department of Chemistry, University of Tennessee, Knoxville, 2002.
- Beckett S.T., *The Science of Chocolate*, 2<sup>nd</sup> Ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008.
- Beliz H.D., Grosch W., Scheberle P., *Food Chemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed., Springer – Verlag, Heidelberg, DE, 2004.
- Belščak A., Komes D., Horžić D., Kovačević Ganić K., Karlović D., *Food Research International*, 2009, **42**(5-6): 707-716.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., *Analytical Biochemistry*, 1996, **239**(1): 70-76.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., *Methods Enzymology*, 1999, **299**: 15-27.
- Benzie I.F.F., Szeto Y.T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**(2): 633-636.
- Bertoldi D., Barbeto A., Camin F., Caligiani A., Larcher R., *Food Control*, 2016, **65**: 46-53.
- Beto J.A., *Clinical Nutrition Research*, 2015, **4**(1): 1-8.
- Biehl B., Meyer B., Crone G., Pollmann L., Said M.B., *Journal of Science of Food and Agriculture*, 1989, **48**(2): 189-208.
- Boguszewska-Czubara A., Pasternak K., *Journal of Elementology*, 2011, **16**(3): 489-497.
- Bojović S., Mitrović S., *Biostatistika – primena statističkih metoda u biologiji*, Institut za šumarstvo, Beograd, 2010.
- Boss C.B., Fredeen K.J., *Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 2<sup>nd</sup> Ed., The Perkin-Elmer Corporation, Shelton, USA, 1997.
- Borchers A.T., Keen C.L., Hannum S.M., Gershwin M.E., *Journal of Medicinal Foods*, 2000, **3**(2): 77-105.

- Born M., Carrupt P.A., Zini R., Brée F., Tillement J.P., Hostettmann K., Testa B., *Helvetica Chimica Acta*, 1996, **79**(4): 1147-1158.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 1995, **28**(1): 25-30.
- Bravo L., *Nutrition Reviews*, 1998, **56**(11): 317-333.
- Brcanović J.M., Pavlović A.N., Mitić S.S., Stojanović G.S., Manojlović D.D., Kaličanin B.M., Veljković J.N., *Food Technology and Biotechnology*, 2013, **51**(4): 460-470.
- Brenner I.B., Zander A.T., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2000, **55**(8): 1195-1240.
- Brett C.M.A., Brett A.M.O., *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, 1<sup>st</sup> Ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1993.
- Bribi N., *Asian Journal of Botany*, 2018, **1**: 1-6.
- Bridle P., Timberlake C.F., *Food Chemistry*, 1997, **58**(1-2): 103-109.
- Britton G., *The Biochemistry of Natural Pigments*, 1<sup>st</sup> Ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1983.
- Brownmiller C., Howard L.R., Prior R.L., *Journal of Food Science*, 2008, **73**(5): H72-H79.
- Buckow R., Kastell A., Terefe N.S., Versteeg C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(18): 10076-10084.
- Cabrita L., Fossen T., Andersen Ø.M., *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section in Food Chemistry*, 2000, **68**(1): 101-107.
- Campos A.M., Lissi E.A., *International Journal of Chemical Kinetics*, 1997, **29**(3): 219-224.
- Cano A., *Phytochemical Analysis*, 1998, **9**(4): 196-202.
- Carrillo L.C., Londono J., Gil A., *Food Research International*, 2014, **60**: 273-280.
- Castillo-Sánchez J.X., García-Falcón M.S., Garridob J., Martínez-Carballo E., Martins-Dias L.R., Mejuto X.C., *Food Chemistry*, 2008, **106**(1): 18-26.
- Catell R.B., *Multivariate Behavioral Research*, 1996, **1**(2): 245-276.
- Catsberg C.M.E., Kempen-Van Dommelen G.J.M., *Cocoa and Chocolate*, 1<sup>st</sup> Ed., Food Handbook, AVI publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, USA, 1990.
- Chen J., Gordon L., Akesson B., *Analytica Chimica Acta*, 2002, **474**(1-2): 137-146.
- Chen Z.Y., Zhu Q.Y., Tsang D., Huang Y., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(1): 477-482.

- Chevion S., Robert M.A., Checion M., *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, **28**(6): 860-870.
- Chougule P., Pawar R., Limaye P., Joshi Y.M., Kadam V., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012, **2**(4): 106-110.
- Cilliers J.J.L., Singleton V.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, **38**(9): 1797-1798.
- Clifford M.N., *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 2000, **80**(7): 1063-1072.
- Coe S.D., Coe M.D., *The True History of Chocolate*, 3<sup>rd</sup> Ed., Thames and Hudson, New York, NY, 2013.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006, *Scientific Committee on Food*, 2006.
- Contreras-Guzman E.S., Strong F.C., *Journal of AOAC International*, 1982, **65**(5): 1215-1222.
- Cook N.C., Samman S., *Nutritional Biochemistry*, 1996, **7**(2): 66-76.
- Cooper K.A., Campos-Gimenez E., Alvarez D.J., Nagy K., Donovan J.L., Williamson G., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**(8): 2841-2847.
- Cornard J.P., Merlin J.C., *Polyhedron*, 2002, **21**(27-28): 2801-2810.
- Counet C., Collin S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**(23): 6816-6822.
- Croizer A., Del Rio D., Clifford M.N., *Molecular Aspects of Medicine*, 2010, **31**(6): 446-467.
- Cross C.E., Halliwell B., Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M., Harman D., *Annals of Internal Medicine*, 1987, **107**(4): 526-545.
- Czarnek K., Terpilowska S., Siwicki A.K., *Central European Journal of Immunology*, 2015, **40**(2): 236-242.
- Ćujić N., Kundaković T., Šavikin K., *Lekovite sirovine*, 2013, **33**: 19-37.
- Da Silva E.G.P., Santos A.C.N., Costa A.C.S., Fortunato D.M.N., Jose N.N., Korn M.G.A., dos Santos W.N.L., Ferreira S.L.C., *Microchemical Journal*, 2006, **82**(2): 159-162.
- Da Silva J.F., Williams R.J.P., *The biological chemistry of the elements: The Inorganic Chemistry of Life*, 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 2001.
- Dahyia S., Karpe R., Hegde A.G., Sharma R.M., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, **18**(6): 517-522.
- De Araujo Q.R., Gattward J., Almoosawi S., Silva M.D.G.P.C., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, **56**(1): 1-12.
- De Pascual T., Sanchez B.S., *Phytochemistry Review*, 2008, **7**(2): 281-299.



- De Souza R.F.V., de Giovanni W.F., *Spectrochimica Acta Part B*, 2005, **61**(A): 1985-1990.
- Dennuad J., Howes A., Poussel E., Mermet J.M., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001, **56**(1): 101-112.
- Despić A., *Elektrohemijske tehnike i tehnologije*, Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, RS, 2005.
- Dimitrijevic M.V., Mitić V.D., Cvetkovic J.S., Stankov-Jovanovic V.P., Mutic J.J., Nikolic Madic S.D., *European Food Research and Technology*, 2016, **242**(1): 1-10.
- Ding E.L., Hutfless S.M., Ding X., Girotra S., *Nutrition & Metabolism*, 2006, **3**(2): 1–12.
- Dos Santos W.N.L., da Silva E.G.P., Fernandes M.S., Araujo R.G.O., Costa A.C.S., Vale M.G.R., Ferreira S.L.C., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, **382**(4): 1099-1102.
- Dreosti I.E., *Nutrition*, 2000, **16**(7-8): 692–694.
- Duh P.D., Tu Y.Y., Yen G.C., *LWT – Food Science and Technology*, 1999, **32**(5): 269-277.
- Emand A.S., Sanaa M.M.S., *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2012, **42**(5): 556-564.
- Erel O., *Clinical Biochemistry*, 2004, **37**(4): 277-285.
- EFSA, European Food Safety Authority, Cadmium in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *The EFSA Journal*, 2009, **980**: 1-139.
- EFSA, European Food Safety Authority, Lead in Food - EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), *The EFSA Journal*, 2010, **8**(4): 1-147.
- EFSA, European Food Safety Authority, *Scientific Opinion on the Re-evaluation of Anthocyanins (E 163) as a Food Additive*, Parma, Italy, 2013.
- Evans P., Halliwell B., *Annals of the New York Academy of Science*, 1999, **884**: 19-40.
- FAO/WHO, *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*, Food Series UK, 1989.
- FAO/WHO, *Trace Elements in Human Nutrition and Health*, World Health Organization, Geneva, SCH, 1996.
- FAO/WHO, *Draft Standards for Chocolates and Chocolate products*. CODEX Committee on Cocoa Products and Cocoa Chocolates, World Health Organization, Fribourg, SCH, 19<sup>th</sup> session, 3–5 October 2001.
- FAO/WHO, *Proposed Draft Maximum Levels for Cadmium in Chocolate and Cocoa-derived Products*, World Health Organization, New Delhi, India, 9<sup>th</sup> session, 16-20 March 2015.

- Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L., *Food Chemistry*, 2007, **100**(4): 1511-1516.
- Fracassetti D., Del Bo C., Simonetti P., Gardana C., Klimis-Zacasm D., Ciappellano S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(12): 2999-3005.
- Friaa O., Brault D., *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2006, **4**(12): 2417-2423.
- Friedman M., Levin C.E., Lee S.U., Konzukue N., *Journal of Food Sciences*, 2009, **74**(2): H47-H51.
- Gancel A.L., Feneuil A., Acosta O., Perez A.M., Villant F., *Food Research International*, 2011, **44**(7): 2243-2251.
- García-Falcón M.S., Pérez-Lamela C., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., *Food Chemistry*, 2007, **105**(1): 248-259.
- Gavrilović M., *Tehnologija konditorskih proizvoda*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, RS, 2003.
- Gharras H.E., *International Journal of Food Science & Technology*, 2009, **44**(12): 2512-2518.
- Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Kader A.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(17): 4976-4982.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1<sup>st</sup> Ed., John Wiley & Sons, New York, USA, 2003, F1.2.1.-F1.2.13.
- Glicerina V., Balestra F., Rosa M.D., Romani S., *Journal of Food Engineering*, 2016, **169**: 165-171.
- Goleniowski M., Bonfill M., Cusido R.M., Palazon J., *Natural Products*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, DE, 2013.
- Gonzalez A.G., Herrador M.A., *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, **26**(3): 227-238.
- Gottumukkala R.V.S.S., Nadimpalli N., Sukala K., Subaraju G.V., *International Scholarly Research Notices*, 2014, **volume 2014**, Article ID 628196: 1-5.
- Grembecka M., Szefer P., *Food Analytical Methods*, 2012, **5**(2): 250-259.
- Gu L., House S.E., Wu X., Ou B., Prior R.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(11): 4057-4061.
- Guimarães-Silva A.K., de Lena J.C., Froes R.E.S., Costa L.M., Nascentes C.C., *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2012, **23**(4): 753-762

- Guittard G., *The Manufacturing Confectioner*, 2009, **89**(9): 77-80.
- Gunckel S., Santander P., Cordano G., Ferreira J., Munoz S., Nunez-Vergara L.J., Squella J.A., *Chemico-Biological Interaction*, 1998, **114**(1-2): 45-59.
- Gupta D., *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, **6**(2): 546-566.
- Güldaş M., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, **47**(2): 92-99.
- Güldaş M., Dagădelen A.F., Biricik G.F., *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2008 **6**(3-4): 90-94.
- Hair J.F.J., Anderson R.E., Tatham R.L., Black W.C., *Multivariate Data Analysis*, 4<sup>th</sup> Ed., Prentice-Hall International, New Jersey, USA, 1995.
- Halliwell B., *Biochemical Journal*, 1977, **163**(3): 441-448.
- Halliwell B., *The American Journal of Medicine*, 1991, **91**(3C): 14S-22S.
- Halliwell B., *Annual Review of Nutrition*, 1996, **16**: 33-50.
- Hammerstone J.F., Lazarus S.A., Schmitz H.H., *The Journal of Nutrition*, 2000, **130**(2000): 2086S-2092S.
- Harbourne N., Jacquier J.C., Morgan D.J., Lyng J.G., *Food Chemistry*, 2008, **111**(1): 204-208.
- Harman D., *Annals of the New York Academy of Science*, 2001, **928**(1): 1-21.
- Harijono T., Yuwono S.S., Estiasih T., Santoso U., *Journal of Food Science and Engineering*, 2012, **2**(11): 642-651.
- Hawkins C.L., Brown B.E., Davies M.J., *Archives of Biochemistry and biophysics*, 2001, **395**(2): 137-145.
- Henderson J., Joyce R.A., Hall G.R., Hurts W.J., McGovern P.E., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2007, **104**(48): 18937-18940.
- Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B.S., Toshima H., *Archives of Internal Medicine*, 1995, **155**(4): 381-386.
- Hii C.L., Law C.L., Suzannah S., Mishawi, Cloke M., *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2009, **2**(4): 702-722.
- Hollman P.C., Katan M.B., *Food and Chemical Toxicology*, 1999, **37**(9-10): 937-942.
- Horwitz W., *Analytical Chemistry*, 1982, **54**(1): 67A-76A.
- <http://www.chocolate.lindt.com/world-of-lindt/lindt-in-history/history-of-cocoa>

- [http://chocolatemaya.com/wp-content/gallery/bali/img\\_1522.jpg](http://chocolatemaya.com/wp-content/gallery/bali/img_1522.jpg) (Slika 3.2.)
- <https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-images-cocoa-pod-open-white-background-image31340379> (Slika 3.1.)
- [https://www.google.com/search?q=procyanidins+B1B4&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiSwZGIuubgAhVIpIsKHeMwC9gQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=625#imgrc=rXgT5e\\_H6t26hM](https://www.google.com/search?q=procyanidins+B1B4&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiSwZGIuubgAhVIpIsKHeMwC9gQ_AUIDigB&biw=1366&bih=625#imgrc=rXgT5e_H6t26hM) (Slika 3.21.)
- <http://www.simka.co.rs/stari/osimki.html> (Slika 3.1.)
- <http://www.rohs-cmet.in/content/icp-oes> (Slika 3.38.)
- <https://twitter.com/quararimx/status/916005050023071745> (Slika 3.3.)
- <http://www.zdravstveni.com/fosfor.php>
- Hu Y., Pan Z.J., Liao W., Li J., Gruget P., Kitts D.D., Lu X., *Food Chemistry*, 2016, **202**: 254-261.
- Huang D., Ou B., Prior R.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53** (6):1841-1856.
- ICH, In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Methodology*, ICH-Q2B, Geneva, 1996.
- ICCO, International Cocoa Organization, Annual Report, *ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, 2006/07, **XXXIII**(4).
- ICCO, International Cocoa Organization, *The World Cocoa Directory*, 2013/2014.
- ICCO, International Cocoa Organization, *The World Cocoa Directory*, 2014/2015.
- Ioannou I., Hafsal I., Hamdi S., Charbonnel C., Ghoul M., *Journal of Food Engineering*, 2012, **111**(2): 208-217.
- Jackman R.L., Smith J.L., *Anthocyanins and Betalains*, In: *Natural Food Colorants*, Hendry G.A.F., Houghton J.D. (eds), AVI, New York, USA, 1992.
- Jalbani N., Kazi T.G., Jamali M.K., Arain M.B., Afridi M.B., Sheerazi S.T., Ansari R., *Journal of AOAC International*, 2007, **90**(6): 1682-1688.
- Jalbani N., Kazi T.G., Afridi H.I., Arain M.B., *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 2009, **10**(1-2): 48-52.
- Jalil A.M., Ismail A., *Molecules*, 2008, **13**(9): 2190-2219.
- Janeiro P., Oliveira-Brett A.M., *Analytica Chimica Acta*, 2004, **518**(1-2): 109-115.

- Jara-Palacios M.J., Escudero-Gilete M.L., Hernández-Hierro J.M., Heredia F.J., Hernanz D., *Talanta*, 2017, **165**: 211-215.
- Jaredić M., Vučetić J.I., *Mikroelementi u biološkom materijalu*, Privredni pregled, Beograd, 1997.
- Jolic S.M., Redovnikovic I.R., Markovic K., Sipusic D.I., Delonga K., *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, **46**(9): 1793-1800.
- Jolliffe I.T., *Principal component analysis*, Springer – Verlag, New York, USA, 2002.
- Jurd L., *Spectral properties of flavonoid compound*, in: *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Pergamon Press, London, UK, 1962.
- Juurlink B.H., Paterson P.G., *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 1998, **21**(4): 309-334.
- Kaiser H.F., *Educational and Psychological Measurement*, 1960, **20**(1): 141-151.
- Karadjova I., Girousi S., Illiadou E., Stratis I., *Microchimica Acta*, 2000, **134**(3): 185-191.
- Kardel M., Taube F., Schulz H., Schütze W., Gierus M., *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2013, **86**: 154-166.
- Karori S.M., Wachira F.N., Wanyoko J.K., Ngure R.M., *African Journal of Biotechnology*, 2007, **6**(19): 2287-2296.
- Kastori R., Ilin Ž., Maksimović I., Putnik-Delić M., *Kalijum u ishrani biljaka*, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2003.
- Katz D.L., Doughty K., Ali A., *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, **15**(10): 2779-2811.
- Khan S., Khan M.A., Rehman S., *Pedosphere*, 2011, **21**(3): 351-357.
- Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M., *Food and Nutrition Research*, 2017, **61**(1): 1361779-21.
- Kilmartin P.A., *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001, **3**(6): 941-955.
- Kilmartin P.A., Hsu C.F., *Food Chemistry*, 2003, **82** (4): 501-512.
- Kilmartin P.A., Zou H., Waterhouse A.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(4): 1957-1965.
- Kilmartin P.A., Zou H., Waterhouse A.L., *American Journal of Enology and Viticulture*, 2002, **53**(4): 294-302.
- Kilmartin P.A., Hsu C.F., *Food Chemistry*, 2003, **82**(4): 501-512.
- Kirca A., Cemeroğlu B., *Food Chemistry*, 2003, **81**(4): 583-587.
- Knight J.A., *Advances in Clinical Chemistry*, 2000, **35**: 1-62.
- Kofink M., Papagiannopoulos M., Galensa R., *Molecules*, 2007, **12**(7): 1274-1288.

- Koirtiyohann S.R., Jones J.S., Jester C.P., Yates D.A., *Spectrochimica Acta Part B*, 1981, **36B**: 46-59.
- Komatsu Y., Suematsu S., Hisanobu Y., Saigo H., Matsuda R., Hara K., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, **53**(6): 907-910.
- Kong J.M., Chia L.S., Chia T.F., Goh N.K., Brouillard R., *Phytochemistry*, 2003, **64**(5): 923-933.
- Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Afanas'ev I.B., *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 2001, **385**(1): 129-137.
- Kothe L., Zimmermann B.F., Galensa R., *Food Chemistry*, 2013, **141**(4): 3656-3663.
- Kotte S.C.B., Dubey P.K., Panchapagesa M.M., *International Research Journal of Pharmacy*, 2012, **3**(5): 1-11.
- Kratzer U., Frank R., Kalbacher H., Biehl B., *Food Chemistry*, 2009, **113**(4): 903-913.
- Kris-Etherton P., Keen C.L., *Current Opinion in Lipidology*, 2002, **13**(1): 41-49.
- Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R., *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**(3): 217-233.
- Kumamoto M., Sonda T., Nagayama K., Tabata M., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, **65**(1): 126-132.
- Kumar S., Trivedi A.V., *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2016, **5**(3): 719-727.
- Kyi T.M., Daud W.R.W., Mohammad A.B., Samsudin M.W., Kadhum A.A.H., Talib M.Z.M., *International Journal of Food Science and Technology*, 2005, **40**(3): 323-331.
- Langer S., Marshall L.J., Day A.J., Morgan M.R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**(15): 8435-8441.
- Laličić-Petronijević J., *Senzorna, antioksidativna i reološka svojstva različitih vrsta čokolada sa probioticima*, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2012.
- Larrea-Marín M.T., Pomares-Alfonso M.S., Gómez-Juaristi M., Sánchez-Muniz F.J., Ródenas de la Rocha S., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, **23**: 814-820.
- Lee C.K., Low K.S., *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 1985, **8**(2): 243-248.
- Lee I.M., Paffenbarger, *The British Medical Journal*, 1998, **317**(7174): 1683-1684.

- Lee J., Koo N., Min D.B., *Comprehensive Reviews in Food Sciences and Food Safety*, 2004, **3**(1): 21-33.
- Legg C.V.S., Bohrer D., Do Nascimento P.C., De Carvalho L.M., Gobo L.A., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, **24**(3): 465-468.
- Li Q., Liu Y.X., Pan Q.H., Duan C.Q., Shi Y., *South African Journal for Enology and Viticulture*, 2014, **35**(1): 51-58.
- Lieber R., Franke W., Reisdorff C., *Nutzpflanzenkunde*, 1<sup>st</sup> Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, DE, 1976.
- Liu T.Z., Chin N., Kiser M.D., Bigler W.N., *Clinical Chemistry*, 1982, **28**(11): 2225-2228.
- Llimous G.H., Fallavier P., *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2008, **27**(5-8): 1623-1630.
- Lunte S.M., Blankenship K.D., Read S.A., *The Analyst*, 1988, **113**(1): 99-102.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J., *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1990.
- Malešev D., Kuntić V., *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2007, **72**(10): 921-939.
- Manasijević D., *Statistička analiza u SPSS programu*, Tehnički fakultet u Boru, Univerzitet u Beogradu, Bor, 2011.
- Marjanović N.J., Krstić B., *Instrumentalne metode u biološkim istraživanjima*, Tehnološki i Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1998.
- Martinez S., Valek Zulj L., Petrović Ž., Piljac Zegarac J., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005, **584**(2): 92-99.
- Martinez-Pinilla E., Onatibia-Astibia A., Franco R., *Frontiers in Pharmacology*, 2015, **30**(6): 1-5.
- Masahiro N., Masahiro K., Minemitsu N., Akio K., Yoshimi N., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, **53**(6): 714-716.
- Mateus N., de Freitas V., *Anthocyanins as Food Colorants*, In: *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications*, Gould K., Davies K., Winefield C. (eds), Springer Science+Business Media LLC, New York, USA, 282-298, 2009.
- Matijević B.M., Vaštag Đ.Đ., Bečelić-Tomin M.R., Dalmacija B.D., Apostolov S.Lj., *Hemjska Industrija*, 2015, **69**(1): 29-36.
- Mazza G., Miniati E., *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

- McAlinden C., Khadka J., Pesudovs K., *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 2015, **41**(12): 2598-2604.
- McBride M.B., *Environmental Chemistry of Soils*, Oxford university Press, New York, USA, 1994.
- Medenica M., Malešev D., *Eksperimentalna fizička hemija*, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2002.
- Mehrinfar R., Frishman W.H., *Cardiology in Review*, 2008, **16**(3): 109-115.
- Melsallam A.S., *Food Chemistry*, 1987, **26**(1): 47-58.
- Mermet J.M., *Analytica Chimica Acta*, 1991, **250**(C): 85-94.
- Mermet J.M., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, **13**(5): 419-422.
- Mermet J.M., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, **20**(1): 11-16.
- Mezzetti A., di Illo C., Calafiore A.M., Aceto A., Marzio L., Frederici G., Cuccurullo F., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1990, **22**(9): 935-938.
- Mierziak J., Kostyn K., Kulma A., *Molecules*, 2014, **19**(10): 16240-16265.
- Miguel M.G., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011, **1**(6): 07-15.
- Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Pavkov S., Stojanović D., *Contemporary Agriculture*, 2008, **57**: 35-38.
- Miller K.B., Stuart D.A., Smith N.L., Lee C.Y., McHale N.L., Flanagan J.A., Ou B., Hurst W.J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(11): 4062-4068.
- Miller K.B., Hurst W.J., Payne M.J., Stuart D.A., Apgar J., Sweigart D.S., Ou B., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(18): 8527-8533.
- Miller N.J., *The Relative Antioxidant Activities of Plant-derived Polyphenolic Flavonoids*. In: J.T. Kumpulainen, and J.T. Salonen (eds.), *Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., *Redox Report Communications in Free Radical Research*, 1996, **2**(3): 161-171.
- Miller N.J., Miller J.C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Pearson Education Limited, London, UK, 2005.
- Mitić M.N., Souquet J.M., Obradović M.V., Mitić S.S., *Food Science and Biotechnology*, 2012, **21**(6): 1619-1626.



- Mladenović K., *Uticaj temperature na stabilnost katehina i procijanidina u kakaoa prahu: kinetika degradacije*, Prirodno-matematički fakultet u Nišu, Univerzitet u Nišu, Niš, 2014.
- Moldovan B., David L., Chişbora C., Cimpoiu C., *Molecules*, 2012, **17**(10): 11655-11666.
- Moldovan B., David L., *Molecules*, 2014, **19**(10): 8177-8188.
- Moharram H.A., Youssef M.M., *Alexandria Journal of Food Sciences & Technology*, 2014, **11**(1): 31-42.
- Mrmošanin J.M., Pavlović A.N., Krstić J.N., Mitić S.S., Tošić S.B., Stojković M.B., Micić R.J., Đorđević M.S., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, **67**: 163-171.
- Muñoz-Cazares N., García-Contrares R., Pérez-López M., Castillo-Júarez I., *Biological Activity*, Chapter 8, *Phenolic compounds with anti-virulence properties*, 2017, 139-167.
- Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C., *Science of the Total Environment*, 2008, **400**(1-3): 115-141.
- NEVO-table: Dutch Food Composition Table: Nederlands voedingsstoffenbestand 1986-1987, Stichting Nederlands Voedingsstoffenbestand, 1986. Den Haag: Voorlichtingsbureau voor de Voeding.
- Nicklisch S.C.T., Waite J.H., *Biofouling*, 2012, **28**(8): 865-877.
- Nollet L.M.L., *Handbook of Food Analysis: Residues and other food component analysis*, CPC Press, New York, USA, 2004.
- Odrinozola-Serrano I., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O., *Journal of Food Science*, 2009, **74**(2): C184-191.
- Oracz J., Żyzelewicz D., Nebesky E., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015a, **55**(9): 1176-1192.
- Oracz J., Nebesny E., Zyzelewicz, *European Food Research and Technology*, 2015b, **241**(5): 663-681.
- Ortiz F., *Theobroma cacao L.*, Monografija, Colegio Bolivar, 2016.
- Osakabe N., Yamagishi M., Sanbongi C., Natsume M., Takizawa T., Osawa T., *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1998, **44**(2): 313-321.
- Osakabe N., Baba S., Yasuda A., Iwamoto T., Kamiyama M., Takizawa T., Itakura H., Kondo K., *Free Radical Research*, 2001, **34**(1): 93-99.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(11): 3122-3128.

- Oyaizu M., *The Japanese Journal of Nutrition*, 1986, **103**(2): 413-419.
- Pallant J., *SPSS priručnik za preživljavanje*, 3<sup>th</sup> Ed., Allen&Unwin, Mikro knjiga, 181-197, 2009.
- Paoletti R., Poli A., Conti A., Visioli F., *Chocolate and Health*, Springer-Verlag Italija, Milan, IT, 2012.
- Parry J., Su L., Luther M., Zhou K.Q., Yurawecz M.P., Whittaker P., Yu L.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(3): 566-573.
- Patel R.M., Patel N.J., *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2011, **1**: 52-68.
- Patras A., Brunton N.P., O'Donnell C., Tiwar B.K., *Trends in Food Science & Technology*, 2010, **21**(1): 3-11.
- Pavlović A., Rašić Mišić I., *Odabrana poglavlja optičkih metoda instrumentalne analize*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, 2017.
- Pedan V., Fischer N., Bernarth K., Hühn T., Rohn S., *Food Chemistry*, 2017, **214**: 523-532.
- Peixoto R.R.A., Oliveira A., Cadore S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**(33): 8117-8122.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F., *The Journal of Nutrition*, 2003, **133**(9): 2812-2819.
- Pereira R.M.S., Andrades N.E.D., Paulino N., Sawaya A.C.H.F., Eberlin M.N., Marcucci M.C., Favero G.M., Novak E.M., Bydlowski S.P., *Molecules*, 2007, **12**(7): 1352-1366.
- Pereira-Caro G., Borges G., Nagai C., Jackson M.C., Yokota T., Crozier A., Ashihara H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(2): 427-434.
- Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2014, **30**(1): 11-26.
- Pietta P.G., *Journal of Natural Products*, 2000, **63**(7): 1035-1042.
- Piljac-Žegarac J., Valek L., Stipčević T., Martinez S., *Food Chemistry*, 2010, **121**(3): 820-825.
- Pisoschi A.M., Negulescu G.P., *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2011, **1**(1): 106-115.
- Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, Službeni glasnik RS br. 25/2010 i 28/2011.

- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za kakao-proizvode, čokoladne proizvode, proizvode slične čokoladi i krem-proizvode, Službeni list SCG br.1/2005 i Službeni glasnik RS br. 43/2013.
- Presilla M.E., *The New Taste of Chocolate*, Ten Speed Press, California, SAD, 2001.
- Prichard E., Barwick V., *Quality assurance in analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Teddington, UK, 2007.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(10): 4290-4302.
- Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**(8): 3396-3402.
- Ramtahal G., Yen I.C., Bekele I., Bekele F., Wilson L., Maharaj K., Harrynanan L., *Food and Nutrition Sciences*, 2016, **7**(1): 37-43.
- Radulović N.S., Stojković M.B., Mitić S.S., Ranđelović P.J., Ilić I.R., Stojanović N.M., Stojanović-Radić Z.Z., *Natural Product Communications*, 2012, **7**(12): 1609-1614.
- Ramli N., Yatim A.M., Said M., Hok H.C., *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 2001, **7**(2): 377-386.
- Rankin C.W., Nriagu J.O., Aggarwal J.K., Arowolo T.A., Adebayo K., Flegal A.R., *Environmental Health Perspectives*, 2005, **113**(10): 1344-1348.
- Ražić S., *Realni uzorci; Analiza metala i metaloida metodama atomske apsorpcione i emisije spektrometrije*, Predavanja iz predmeta Analitička hemija u farmaceutskoj praksi, Beograd, 2011.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, **26**(9-10): 1231-1237.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B., *Free Radical Resesarch*, 1995, **22**(4): 375-383.
- Ristivojević P.M., *Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije*, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2014.
- Rodriguez-Campos J., Escalona-Buendía H.B., Orozco-Avila I., Lugo-Cervantes E., Jaramillo-Flores M.E., *Food Research International*, 2011, **44**(1): 250-258.
- Rodriguez A., Costa-Bauza A., Saez-Torres C., Rodrigo D., Grases F., *Clinical Biochemistry*, 2015, **48**(16-17): 1138-1143.

- Roobha J.J., Saravanakumar M., Aravindhana K.M., Devi P.S., *Research in Plant Biology*, 2011, **1**(5): 05-12.
- Rupesh K.M., Kavitha K., Dhanaraj S.A., *Journal of Applied Pharmacy*, 2014, **6**(2): 228-234.
- Sadilova E., Stintzing F.C., Carle R., *Journal of Food Science*, 2006, **7**(8): C504-C512.
- Sager M., Hoesch J., *Journal of Central European Agriculture*, 2005, **6**(4): 461-472.
- Sager M., Werteker M., *Ernährung/Nutrition*, 2010, **34**(9): 357-367.
- Sager M., *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2012, **2**(1): 1-10.
- Santos E.L., Maia B.H.L.N.S., Ferriani A.P., Teixeira S.D., *Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology*, Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health, IntechOpen, London, UK, 1-16, 2017.
- Schramm D., Wang J.F., Holt R.R., Ensunsa J.L., Gonsalves J.L., Lazarus S.A., Schmitz H.H., German J.B., Keen C.L., *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, **73**(1): 36-40.
- Schwarz G., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, **31**: 179-187.
- Schwarz K., Mertz W., *Archives of Biochemistry*, 1959, **85**: 292-295.
- Schwan R.F., Wheals A.E., *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 2004, **44**(4): 205-221.
- Seeram N.P., Aviram M., Zhang Y., Henning S.M., Feng L., Dreher D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(4): 1415-1422.
- Selavpathy P., Sarala Devi G., *Indian Journal of Environmental Health*, 1995, **37**(2): 123-125.
- Sengoku S., Wagatsuma K., *Analytical Sciences*, 2006, **22**(2): 245-248.
- Sepe A., Costantini S., Ciaralli L., Ciprotti M., Giordano R., *Food Additives and Contaminants*, 2001, **18**(9): 788-796.
- Shahidi F., Ambigaipalan P., *Journal of Functional Foods*, 2015, **18**(Part B): 820-897.
- Sharpless K.E., Thomas J.B., Christopher S.J., Greenberg R.R., Sander L.C., Schantz M.M., Welch M.J., Wisw S.A., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**(1): 171-178.
- Silva, F.V., Trevizan, L.C., Silva, C.S., Nogueira, A.R.A., Nobrega, J., *Spectrochimica Acta Part B*, 2002, **57**(12): 1905-1913.
- Singh K.P., Malik A., Mohan D., Sinha S., *Water Research*, 2004, **38**(18): 3980-3992.

- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventó R.M., *Methods in Enzymology*, 1999, **299C**(1): 152-178.
- Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders Collage Publishing, Philadelphia, USA, 1991.
- Soetan K.O., Olaiya C.O., Oyewole O.E., *African Journal of Food Science*, 2010, **4**(5): 200-222.
- Spiegel H., Sager M., *Ernährung/Nutrition*, 2008, **32**(7-8): 297-308.
- Stahl T., Taschan H., Brunn H., *Environmental Sciences Europe*, 2011, **23**(1): 37-48.
- Steinberg F.M., Bearden M.M., Keen C.L., *Journal of the American Dietetic Association*, 2003, **103**(3): 215-223.
- Stepan M., Musli P., Poussel E., Mermet J.M., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001, **56**(4): 443-453.
- Stief T.W., *Medical Hypotheses*, 2003, **60**(4): 567-572.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(3): 607-616.
- Su Y.L., Leung L.K., Huang Y., Chen Z.Y., *Food Chemistry*, 2003, **83**(2): 189-195.
- Sun J., Liang F., Bin Y., Li P., Duan C., *Molecules*, 2007, **12**(3): 679-693.
- Šarkanj B., Kipčić D., Vasić-Rački Đ., Delaš F., Galić K., Katalenić M., Dimitrov N., Klapac T., *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.
- Thompson M., *The amazing Horwitz function*, AMC Technical Brief No.17, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2004.
- Tirzitis G., Bartosz G., *Avta Biochemica Polonica*, 2010, **57**(1): 139-142.
- Todoli J.L., Gras L., Hernandis V., Mora J., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, **17**(2): 142-169.
- Todorović M., Đurđević P., Antonijević V., *Optičke metode instrumentalne analize*, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1997.
- Todorović V., Redovniković I.R., Todorović Z., Janković G., Dodevska M., Sobajić S., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, **41**: 137-143.
- Tumbas V., *Antiradikalska i antiproliferativna i aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familije Rosaceae i Ericaceae*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2010.

- USDA, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2018.  
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/06195>
- USDA, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2018a.  
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/19904>
- USDA, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2018b.  
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/334735>
- USDA, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2018c.  
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/45260217>
- USDA, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2018d  
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/19902>
- U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program*, USA, 2015.
- U.S. National Academies, Institute of Medicine, *Dietary reference intakes for calcium, phosphorous, magnesium, vitamin D, and fluoride*. The National Academies Press, Washington, USA, 1997.
- U.S. National Academies, Institute of Medicine, *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. The National Academies Press, Washington, USA, 2001.
- U.S. National Academies, Institute of Medicine, *Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulphate*. The National Academies Press, Washington, USA, 2004.
- U.S. National Academies, Institute of Medicine, *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. The National Academies Press, Washington, USA, 2011.
- Varga D., *Priručnik za đubrenje ratarskih i povrtarskih kultura*, Poljoprivredna stručna služba, PSS Subotica AD, Subotica, 2015.
- Varol M., *Journal of Hazardous Materials*, 2011, **195**: 355-364.
- Veeramachaneni M., Jayavarapu K.R., *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2013, **3**(4): 516-523.
- Velitchkova N.S., Velicgkov S.V., Karadjov M.G., Daskalova N.N., *Bulgarian Chemical Communications*, 2017, **49**(G): 152-159.

- Velimirović D., *Optimalizacija, validacija i primena ICP-OES metoda za određivanje sadržaja metala u realnim uzorcima*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, 2013.
- Verna R., *The Malaysian Journal of Pathology*, 2013, **35**(2): 111-121.
- Vinson J.A., Proch J., Zubik L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**(12): 4821-4824.
- Vijayalakshmi M., Ruckmani K., *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2016, **11**(3): 570-572.
- Visioli F., Borsani L., Galli C., *Cardiovascular Research*, 2000, **47**(3): 419-425.
- Voica C., Dehelean A., Iordache A., Geana I., *Romanian Reports in Physics*, 2012, **64**(1): 221-231.
- Wallace T.C., *Analysis of Procyanidins and Anthocyanins in Food Products using Chromatographic and Spectroscopic Techniques*, Phd Dissertation, The Ohio State University, Ohio, USA, 2010.
- Wang H., Helliwell K., *Food Chemistry*, 2000, **70**(3): 337-344.
- Wang J., *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons; Hoboken, NJ, 2000.
- Waterhouse A.L., Laurie V.F., *American Journal of Enology and Viticulture*, 2006, **57**(3): 306-313.
- Weston L.A., Mathesius U., *Journal of Chemical Ecology*, 2013, **39**: 283-297.
- Wollgast J., Anklam E., *Food Research International*, 2000a, **33**(6): 449-459.
- Wollgast J., Anklam E., *Food Research International*, 2000b, **33**(6): 423-447.
- Wollgast J., Pallaroni L., Agazzi M.E., Anklam E., *Journal of Chromatography A*, 2001, **926**(1): 211-220.
- Wood R., *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, **18**(9-10): 624-632.
- Wrolstad R.E., *Anthocyanins*. In: Lauro G.J., Francis F.J. (eds) *Natural food colorants*, Marcel Dekker, New York, USA, 237-252, 2000.
- Yang J.Y., Scascitelli M., Motilal L.A., Sveinsson S., Engels J.M., Kane N.C., Dempewolf H., Zhang D., Maharaj K., Cronk Q.C.B., *Tree Genetics & Genomes*, 2013, **9**: 829-840.
- Yanus R.L., Sela H., Borojovich E.J., Zakon Y., Saphier M., Nikolski A., Gutflais E., Lorber A., Karpas Z., *Talanta*, 2014, **119**: 1-4.
- Yilmaz Y., *Trends in Food Science & Technology*, 2006, **17**(2): 64-71.
- Yu L.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(7): 3452-3456.

- Zeng L., Ma M., Li C., Luo L., *International Journal of Food Properties*, 2017, **20**(1): 1-18.
- Zhao H., Fan W., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y., Kong W., *Food Chemistry*, 2008, **107**(1): 296-304.
- Zheng H., Lu H., *LWT – Food Science and Technology*, 2011, **44**(5): 1273-1281.
- Zhou K., Yin J.J. Yu L.L., *Food Chemistry*, 2006, **95**(3): 446-457.
- Zhu Q.Y., Zhang A., Tsang D., Huang Y., Chen Z.Y., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, **45**(12): 4624-4628.
- Zimeri J., Tong C.H., *Journal of Food Science*, 1999, **64**(5): 753-758.
- Zuleta A., Esteve M.J., Frígola A., *Food Chemistry*, 2009, **114**(1): 310-316.



## ***9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM***

Jelena Mrmošanin (rođ. Brčanović) je rođena 09.07.1986. godine u Nišu. Završila je osnovnu školu „Moša Pijade” kao nosilac diplome „Vuk Karađžić” i medicinsku školu „Dr Milenko Hađžić” u Nišu.

Osnovne studije na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, upisala je školske 2005/06. godine. U toku studija bila je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije i stipendista grada Niša za podsticanje razvoja talentovanih studenata školske 2009/10. godine. Dobitnica je priznanja gradske opštine Palilula za najboljeg studenta na Odseku za hemiju na PMF-u u Nišu za školsku 2008/09. i 2009/10. godinu. Diplomski rad pod nazivom „Uticaj pesticida alahlor a i trifluralina na raspodelu hroma (III) između zemljišta i tečne faze” odbranila je ocenom 10 i diplomirala 23.09.2011. godine sa prosečnom ocenom 9,52. Dobitnica je priznanja fonda „Ana Bjeletić i Ivan Marković” za najboljeg diplomiranog studenta i studenta generacije na Odseku za hemiju PMF-a u Nišu 2011. godine.

Doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu upisala je školske 2011/12. godine. Položila je sve ispite i odbranila je sve studijske istraživačke radove sa prosečnom ocenom 10. Bila je polaznik dve škole masene spektrometrije „The Mass Spectrometry in Environmental Pollutants Detection” koju su organizovali PMF u Nišu i Universite Pierre et Marie Curie u Parizu 2011. i 2012. godine. Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Od 2014. godine je istraživač-saradnik na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, bila je angažovana na naučno-istraživačkom projektu pod nazivom „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena” (evidencioni broj 172047) od 22.02.2012. godine. Školske 2012/13, 2013/14, 2014/15, 2016/17 i 2017/18. godine bila je angažovana u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta: *Instrumentalna analitička hemija* (osnovne akademske studije), *Odabrana poglavlja instrumentalne analize* (osnovne akademske studije), *Savremene optičke metode instrumentalne analize* (diplomske akademske studije), *Fizička hemija 1* (osnovne akademske studije) i *Fizička hemija 2* (osnovne akademske studije). Od 28.09.2018. godine je asistent na Departmanu za hemiju na Katedri za analitičku i fizičku hemiju. Na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih

i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine” (evidencioni broj 172051) je angažovana kao istraživač od 01.04.2019. godine.

Jelena Mrmošanin je koautor dva publikovana rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), dva publikovana rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), tri publikovana rada u međunarodnim časopisima (M23), jednog rada u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51) i dva rada u istaknutim časopisima nacionalnog značaja (M52). Takođe, koautor je 17 saopštenja štampanih u izvodu i 3 saopštenja štampanih u celini.

### **Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu, M21**

- Aleksandra N. Pavlović, Jelena M. Brčanović, Jovana N. Veljković, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Biljana M. Kaličanin, Danijela A. Kostić, Miodrag S. Đorđević, Dragan S. Velimirović, Characterization of commercially available products of aronia according to their metal content, *Fruits*, 2015, **70**(6): 385-393.  
<https://fruits.edpsciences.org/articles/fruits/pdf/2015/06/fruits150053.pdf>
- Jelena M. Mrmošanin, Aleksandra N. Pavlović, Jovana N. Krstić, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Milan B. Stojković, Ružica J. Micić, Miodrag S. Đorđević, Multielemental quantification in dark chocolate by ICP OES, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, **67**: 163-171.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.008>

### **Rad u istaknutom međunarodnom časopisu, M22**

- Jelena M. Brčanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Gordana S. Stojanović, Dragan D. Manojlović, Biljana M. Kaličanin, Jovana N. Veljković, Cyclic voltammetry determination of antioxidant capacity of cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate samples: Correlation with spectrophotometric assays and individual phenolic compounds, *Food Technology and Biotechnology*, 2013, **51**(4): 460-470.  
<http://www.ftb.com.hr/component/content/article/136-volume-51-issue-no-4/1162>
- Jovana N. Veljković, Aleksandra N. Pavlović, Jelena M. Brčanović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Milan N. Mitić, Differentiation of black, green, herbal and fruit tea infusions based on multi-element analysis using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Chemical Papers*, 2016, **70**(4): 488-494.

<http://link.springer.com/article/10.1515/chempap-2015-0215>

### Rad u međunarodnom časopisu, M23

- M. N. Mitić, M. V. Obradović, D. A. Kostić, A. N. Pavlović, J. M. Brčanović, Phenolic compounds and antioxidant capacities of dried raspberry from Serbia, extracted with different solvents, *Oxidation Communications*, 2012, **35**(3): 674-683.  
<https://www.researchgate.net/publication/261118974>
- Jovana N. Veljković, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Gordana S. Stojanović, Biljana M. Kaličanin, Dalibor M. Stanković, Milan B. Stojković, Milan N. Mitić, Jelena M. Brčanović, Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches, *Journal of Food Nutrition and Research*, 2013, **52**(1): 12-24.  
<http://ezproxy.nb.rs:2093/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=b69b65c1-71c4-441a-a8af-ce2f516250c2%40sessionmgr4006>
- Aleksandra N. Pavlović, Jelena M. Mrmošanin, Jovana N. Krstić, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Milan N. Mitić, Biljana B. Arsić, Ružica J. Micić, Effect of storage temperature on the decay of catechins and procyanidins in dark chocolate, *Czech Journal of Food Science*, 2017, **35**(4): 360-366.  
<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/223777.pdf>

### Rad u istaknutom nacionalnom časopisu, M52

- Jovana N. Veljković, Jelena M. Brčanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Biljana M. Kaličanin, Milan N. Mitić, Bagged *Aronia melanocarpa* tea: Phenolic profile and antioxidant activity, *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 2014, **31**(4): 245-252.  
<https://www.researchgate.net/publication/273303666>

### Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja, M51

- Jelena M. Brčanović, Aleksandra N. Pavlović, Jovana N. Veljković, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Milan N. Mitić, Effect of storage temperature and thermal processing on catechins, procyanidins and total flavonoids stability in commercially

available cocoa powders, *Facta Universitatis: Series Physics, Chemistry and Technology*, 2015, **12**(1): 39-49.

<http://casopisi.junis.ni.ac.rs/index.php/FUPhysChemTech/article/view/416>

- Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Emilija Pecev-Marinković, Jelena Mrmošanin, Thermal degradation kinetics of total polyphenols, flavonoids, anthocyanins and individual anthocyanins in two types of wild blackberry jams, *Advanced technologies*, 2018, **7**(1): 20-27.

<http://www.tf.ni.ac.rs/images/casopisi/71/c3.pdf>

#### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu, M34

- Jelena Brcanović, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Jovana Veljković, Milan Mitić, Total polyphenols, flavonoid content and antioxidant capacity of cocoa products, 22<sup>nd</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, 107, September 5-9, 2012, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Jovana Veljković, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Jelena Brcanović, Snežana Jovanović, Total polyphenols, flavonoid content and antioxidant capacity of commercially available fruit teas in Serbia, 22<sup>nd</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, 106, September 5-9, 2012, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Tamara J. Laketić, Aleksandra N. Pavlović, Milenko J. Savić, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Jelena M. Brcanović, Occurrence of arsenic in water from artesian wells in Semberija, III International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry, I-45, 328-334, March 4-6, 2013, Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
- Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Jovana N. Veljković, Snežana B. Tošić, Milan N. Mitić, Milan M. Stojković, Ružica J. Micić, HPLC method for the quantification of flavanols and procyanidins in milk chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity, 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, ICOSECS 8, Book of Abstract, F P07, 240, June 27-29, 2013, Belgrade, Serbia.

- Jovana Veljković, Aleksandra Pavlović, Jelena Brcanović, Snežana Mitić, Ružica Micić, Emilija Pecev, Tamara Laketić, Total polyphenol, flavonoid content and antioxidant capacity of commercially available black, green and herbal tea infusions, 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, ICOSECS 8, Book of Abstract, F P27, 260, June 27-29, 2013, Belgrade, Serbia.
- Jovana N. Veljković, Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Milan M. Stojković, Dušan Đ. Paunović, Branka T. Stojanović, Total Phenol, Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of Chokeberry, 15<sup>th</sup> JCF-Fruhjahrssymposium, Book of Abstracts, 296, March 6-9, 2013, Berlin, Germany.
- Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Jovana N. Veljković, Milan N. Mitić, Jovana Lj. Pavlović, Characterization Anthocyanin by UV/Vis Spectroscopy and HPLC Detection in Chokeberry, 15<sup>th</sup> JCF-Fruhjahrssymposium, Book of Abstracts, 284, March 6-9, 2013, Berlin, Germany.
- Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Jovana N. Krstić, Snežana S. Mitić, Emilija T. Pecev-Marinković, Determination of macro and microelements in dark chocolate using ICP-OES, 23<sup>rd</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, 68, October 8-11, 2014, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Jovana N. Krstić, Aleksandra N. Pavlović, Jelena M. Brcanović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Toxic elements content in herbal tea infusions, 23<sup>rd</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, 67, October 8-11, 2014, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Jovana N. Krstić, Jelena M. Mrmošanin, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Multi-element analysis of beaked *Aronia melanocarpa* teas using ICP-AES, 24<sup>th</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, 45, September 11-14, 2016, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Jovana N. Krstić, Jelena M. Mrmošanin, Aleksandra N. Pavlović, Milan N. Mitić, Effect of storage temperature and time on the stability of phenolic compounds in

cocoa powders, 24<sup>th</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, 99, September 11-14, 2016, Ohrid, Republic of Macedonia.

### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini, M63

- Milena Ivanović, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Emilija Pecev-Marinković, Jovana Krstić, Jelena Mrmošanin, Determination of total and individual anthocyanins in raspberries grown in South Serbia, XXI Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, Vol. 21. (23), 263-267, March 11-12, 2016, Čačak.
- M. Nikolić, A. Pavlović, S. Mitić, S. Tošić, M. Mitić, E. Pecev-Marinković, A. Miletić, J. Mrmošanin, Thermal degradation kinetics of total anthocyanins in two types of raspberry jams, 14<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry „Physical Chemistry 2018”, September 24-28, 2018, Beograd.
- Stefan Petrović, Miljana Dubovac, Jelena Mrmošanin, Aleksandra Pavlović, Snežana Tošić, Dried fruits as a source of antioxidants, XXIV Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova 2, 587-592, March 15-16, 2019, Čačak.

### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu, M64

- Jelena M. Brcanović, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Milan B. Stojković, Milan N. Mitić, Jovana N. Veljković, Cocoa phenolic profiles and the correlation of individual phenolic constituents, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Knjiga izvoda radova, XA PO6, 17, October 19-20, 2012, Beograd.
- Jovana N. Veljković, Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Milan B. Stojković, Jelena M. Brcanović, Correlations among different in vitro antioxidant assays and individual and total phenolic and flavonoid contents of fruit tea infusions, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Knjiga izvoda radova, XA P28, 39, 19-20. oktobar 2012., Beograd.
- Aleksandra N. Pavlović, Jelena M. Brcanović, Jovana N. Krstić, Snežana S. Mitić, Ružica J. Micić, Milan B. Stojković, Branka T. Stojanović, Korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih i pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u

- crnoj čokoladi (Correlation of antioxidative activity with total and individual polyphenolic compounds of dark chocolate), 51. Savetovanje srpskog hemijskog društva i 2. Konferencija mladih hemičara Srbije (51th Meeting of the Serbian Chemical Society and 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia), HTH O 01, 72, Niš, 5-7 juni (June 5-7), 2014.
- Aleksandra N. Pavlović, Jovana Veljković, Jelena M. Brcanović, Snežana S. Mitić, Snežana Tošić, Milan Mitić, Sadržaj toksičnih elemenata u voćnim infuz čajevima (Toxic elements content of fruit tea infusions), 51. Savetovanje srpskog hemijskog društva i 2. Konferencija mladih hemičara Srbije (51th Meeting of the Serbian Chemical Society and 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia), HTH P 03, 75, Niš, 5-7 juni (June 5-7), 2014.
  - Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Jovana Krstić, Jelena Mrmošanin, Determination of total phenolic, flavonoid and anthocyanin contents in different strawberry extracts, 12<sup>th</sup> Symposium „Novel Technologies and Economic Development”, Book of Abstract, BFT-13, 47, October 20-21, 2017, Leskovac, Serbia.
  - Jelena Mrmošanin, Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Determination of trace metal contents in cocoa powder samples using ICP-OES, 12<sup>th</sup> Symposium „Novel Technologies and Economic Development”, Book of Abstract, BFT-27, 61, October 20-21, 2017, Leskovac, Serbia.



## ***10. PROPATNA DOKUMENTACIJA***



Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

---

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**Анализа катехина, процијанидина, макро и микроелемената у црној, млечној, и белој чоколади и какаоа у праху и њихов антиоксидативни потенцијал**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су моје име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 28.05.2019.

Потпис аутора дисертације:

Јелена Мрмошанин

Јелена М. Мрмошанин



Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

---

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Анализа катехина, процијанидина, макро и микроелемената у црној, млечној, и  
белој чоколади и какаоа у праху и њихов антиоксидативни потенцијал**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 28.05.2019.

Потпис аутора дисертације:

Јелена Мрмошанин

Јелена М. Мрмошанин



Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**Анализа катехина, процијанидина, макро и микроелемената у црној, млечној, и белој чоколади и какаоа у праху и њихов антиоксидативни потенцијал**

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 28.05.2019.

Потпис аутора дисертације:

Јелена Мрмошанин

Јелена М. Мрмошанин