

# Promjena koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti kakao praha s dodatkom meda i zobi tijekom tri mjeseca skladištenja

---

Ribarić, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:227331>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Vedran Ribarić

**PROMJENA KONCENTRACIJE  
UKUPNIH POLIFENOLA I  
ANTIOKSIDACIJSKE  
AKTIVNOSTI KAKAO PRAHA S  
DODATKOM MEDA I ZOBİ  
TIJEKOM TRI MJESECA  
SKLADIŠTENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenja, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Davora Valingera.

## **ZAHVALA**

Zahvalan sam svome mentoru izv. prof. dr. sc. Davoru Valingeru na iskazanom trudu, razumijevanju i pristupačnosti koju mi je ukazao tijekom izrade diplomskog rada. Također, hvala svim djelatnicima Laboratorija za mjerenja, regulaciju i automatizaciju, na uslužnosti i uloženom vremenu tijekom izrade ovog rada. Posebna zahvala svim prijateljima, a najviše mojoj obitelji koji su me uvijek podržavali tijekom studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za procesno inženjerstvo

Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## PROMJENA KONCENTRACIJE UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI KAKAO PRAHA S DODATKOM MEDA I ZOBİ TIJEKOM TRI MJESECA SKLADIŠTENJA

*Vedran Ribarić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212486*

**Sažetak:** Ovaj rad istražuje promjene koncentracije ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima dobivenim iz mješavina kakao praha, meda i zobi. Cilj istraživanja bio je istražiti kako različiti omjeri ova dva ključna sastojka pripremljena u devet različitih omjera utječu na njihova fitokemijska svojstva i stabilnost kada se čuvaju tijekom razdoblja od 4, 5 i 6 mjeseci. Rezultati otkrivaju vezu između koncentracija kakaa, meda, zobi i promatranih razina ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti; uzorci s većim koncentracijama svih sastojka pokazali su povećane vrijednosti ovih mjera. Međutim, koncentracija ukupnih polifenola pokazala je smanjenje tijekom vremena skladištenja, dok je antioksidativna aktivnost ostala stabilna ili čak blago porasla. Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju sinergijskih učinaka kakao praha i meda u mješovitim formulacijama i nudi vrijedne uvide za primjene u prehrambenoj industriji gdje su dugoročno skladištenje i nutritivne prednosti od interesa.

**Ključne riječi:** kakao, med, zob, ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 41 stranica, 10 slika, 9 tablica, 70 literaturnih navoda

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr .sc. Davor Valinger

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (član)
4. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (zamjenski član)

**Datum obrane:** 17. studenog 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Process engineering**

**Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

CHANGE IN THE CONCENTRATION OF TOTAL POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT  
ACTIVITY OF COCOA POWDER WITH THE ADDITION OF HONEY AND OATS DURING  
THREE MONTHS OF STORAGE

*Vedran Ribarić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212486*

**Abstract:** This paper investigates changes in the concentration of total polyphenols and antioxidant activity in extracts obtained from mixtures of cocoa powder, oats and honey. This study investigates how different ratios of these three ingredients prepared in nine different ratios affect their phytochemical properties and stability when stored over a period of 4, 5 and 6 months. The results reveal a relationship between cocoa, oat and honey concentrations and the observed levels of total polyphenols and antioxidant activity; samples with higher concentrations of both ingredients showed increased values of these measures. However, the concentration of total polyphenols decreased during the storage period, while the antioxidant activity remained stable or even slightly increased. This research contributes to the understanding of the synergistic effects of cocoa powder honey, and oats in mixed formulations and offers valuable insights for applications in the food industry where long-term storage and nutritional benefits are of interest.

**Keywords:** cocoa, honey, oats, antioxidant activity, total polyphenols

**Thesis contains:** 41 pages, 10 pictures, 9 tables, 70 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD Davor Valinger, Associate professor

**Reviewers:**

1. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (president)
2. Davor Valinger, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (member)
4. Maja Benković, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** November 17<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. KAKAO I KAKAO PRAH.....	3
2.2. MED .....	4
2.3. ZOB .....	6
2.4. SINERGIJSKO DJELOVANJE KAKAO PRAHA, MEDA I ZOB I .....	7
2.5. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI U BILJNIM EKSTRAKTIMA .....	8
2.5.1. Fenolni spojevi .....	8
2.5.2. Antioksidativna uloga fenolnih spojeva .....	8
2.6. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI .....	9
2.6.1. Folin-Ciocalteu metoda određivanja koncentracije ukupnih polifenola .....	9
2.6.2. DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti .....	10
2.6.3. FRAP metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti .....	11
2.7. BLISKO- INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA.....	12
2.8. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA .....	13
2.9. MODELI UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Sirovina .....	16
3.1.2. Aparatura i pribor.....	16
3.1.3. Kemikalije: .....	17
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Kemijske analize.....	18
3.2.1.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....	18
3.2.1.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	19
3.2.1.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom .....	21
3.2.1.4. Blisko infracrvena spektroskopija.....	22
3.2.2. Analiza glavnih komponenata i umjetne neuronske mreže .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23
4.1. KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA .....	23
4.1.1. Promjena koncentracije ukupnih polifenola.....	23



4.1.2. Promjena antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom .....	25
4.1.3. Promjena antioksidacijske aktivnosti izmjerene FRAP metodom.....	26
4.1.4. Korelacijske matrice .....	28
4.2. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA I RAZVOJ MODELA UMJETNE NEURONSKE MREŽE NA TEMELJU NIR SPEKTARA .....	30
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	36
<b>6. LITERATURA</b> .....	37

# 1. UVOD

U posljednjim godinama sve je veći interes za hranom bogatom biološki aktivnim spojevima poput polifenola, koji imaju značajnu ulogu u promicanju zdravlja. Polifenoli, koji su raznolika skupina sekundarnih metabolita prisutnih u namirnicama biljnog podrijetla, temeljito su istraživani zbog njihovog potencijala za pozitivan utjecaj na zdravlje, uključujući antioksidativno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje (de la Rosa i sur., 2019). Među izvorima tih vrijednih spojeva, kakao prah, med i zob ističu se kao ključni kandidati zbog njihove široke konzumacije i dokazanih antioksidativnih svojstava.

Kakao prah, dobiven iz zrna *Theobroma cacao*, poznat je po visokom udjelu polifenola, pretežito flavonoida i fenolnih kiselina (Ackar i sur., 2013). S druge strane, med, prirodni zaslađivač proizveden od cvjetnog nektara pčela, također sadrži niz polifenola koji doprinose njegovom antioksidativnom potencijalu (Saxena i sur., 2010). Zob se ističe u prehrambenom sektoru zbog svojeg prehrambenog profila bogatog sadržajem prehrambenih vlakana, fitokemikalija, vitamina i minerala (Rasane i sur., 2013) i fenolnih spojeva, s avenantramidima koji se ističu kao jedinstveni antioksidansi svojstveni zobi. Međutim, stabilnost polifenola te njen utjecaj na antioksidativnu aktivnost u prehrambenim matricama tijekom produljenog razdoblja skladištenja područje je koje zahtijeva sveobuhvatno istraživanje.

Ovaj rad ima za cilj istražiti promjene ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti smjese kakao praha, meda i zobi nakon produljenog skladištenja tijekom 4, 5 i 6 mjeseci. Istraživanje će obuhvatiti primjenu metode Folin-Ciocalteu za kvantificiranje ukupnog sadržaja polifenola, te korištenje DPPH i FRAP metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti smjese u svakom razdoblju skladištenja. Usporedbom ovih izmjerenih vrijednosti i interpretacijom rezultata, ovo istraživanje ima za cilj analizirati potencijalne promjene u biološki aktivnim komponentama smjese kakao praha i meda uslijed produljenog skladištenja.

Blisko-infracrvena spektroskopija (engl. Near-Infrared Spectroscopy, NIRs) korištena je za analizu apsorbancije elektromagnetske energije uzorka unutar spektralnog opsega valnih duljina između 800 i 2500 nm. Podatci prikupljeni putem NIR spektroskopije korišteni su statističku obradu metodom analize glavnih komponenata. Analiza glavnih komponenata (PCA) odigrala je ključnu ulogu u istraživanju ovih spojeva, pružajući mogućnost da se identificiraju osnovni obrasci i odnosi među mjerenim varijablama. Osim toga, primjena umjetnih neuronskih mreža (ANN) omogućila je precizno predviđanje fizikalnih značajki ovih

komponenti, uključujući ukupne polifenole i antioksidativnu aktivnost tijekom različitih razdoblja skladištenja.

Razumijevanje učinaka trajanja skladištenja na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost smjese kakao praha, meda i zobi ima praktičan značaj kako za potrošače tako i za prehrambenu industriju. Pronalasci bi mogli pružiti uvid u stabilnost i funkcionalna svojstva ovih spojeva u prerađenoj hrani, nudeći vrijedne informacije za održavanje nutritivne kvalitete proizvoda tijekom vremena. Dodatno, rasvjetljavanje promjena u sadržaju polifenola i antioksidativnoj aktivnosti moglo bi doprinijeti napredovanju našeg razumijevanja složenih interakcija unutar prehrambenih matrica, pridonoseći razvoju strategija za očuvanje ili poboljšanje zdravstvenih prednosti povezanih s ovim prehrambenim komponentama.

## 2. TEORETSKI DIO

### 2.1. KAKAO I KAKAO PRAH

Kakao, poznat i kao "hrana bogova," potječe iz sjemenki kakaovca (*Theobroma cacao*) i ima dugu povijest kao središnja komponenta za izradu čokolade i drugih proizvoda (Coe i Coe, 2013). Za dobivanje kakao praha, postupak uključuje nekoliko ključnih koraka. Prvo, zrele kakaove mahune se beru, nakon čega se sjemenke izvađene iz mahuna fermentiraju kako bi se razvile arome i razgradili nepoželjni spojevi (Camu i sur. 2008). Nakon fermentacije, sjemenke se suše i prže kako bi se razvile složene okuse i aromatični profil (Beckett i sur., 2017). Sljedeće, sjemenke se lome i melju kako bi se dobila tekuća masa, poznata kao kakaova pasta. Ta masa se tada podvrgava prešanju kako bi se odvojili čvrsti dijelovi (kakao čvrsti dijelovi) od maslaca (kakao maslac). Čvrsti dijelovi kakaa se dalje melju kako bi se dobivenim procesom dobio fini kakao prah (Beckett i sur., 2017).

Kakao prah je iznimno bogat hranjivim tvarima. Sadrži značajne količine antioksidansa, kao što su flavonoidi, koji igraju ključnu ulogu u neutraliziranju slobodnih radikala i zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Osim toga, kakao prah je dobar izvor esencijalnih minerala poput magnezija, željeza, fosfora i cinka te vlakana, koja podržavaju probavu i opće zdravlje crijeva (Andujar i sur., 2012).

Kakao zrna su bogat izvor polifenola, koji su klasa spojeva poznatih po svojim antioksidativnim svojstvima. Glavni polifenolni spojevi koji se nalaze u kakau uključuju flavanole (katehine i epikatehine), antocijane i proantocijanidine (Andujar i sur., 2012). Ovi spojevi igraju ključnu ulogu u pružanju zdravstvenih prednosti povezanih s konzumacijom kakaa, kao što su zaštita kardiovaskularnog sustava, protuupalni učinci i neuroprotekcija (Albertini i sur., 2015). Antioksidativne aktivnosti ovih polifenola pripisuju se njihovoj sposobnosti da hvataju slobodne radikale i kelatiraju metalne ione, smanjujući oksidativni stres u tijelu (Abbe Maleyki i Ismail, 2010).

Međutim, na sadržaj i antioksidativnu aktivnost polifenola u kakau mogu značajno utjecati postupci nakon berbe, konkretno fermentacija i sušenje. Fermentacija je nužan korak u obradi kakaa koji uključuje mikrobne i enzimske aktivnosti, što dovodi do smanjenja sadržaja jednostavnih polifenola, poput katehina, ali može povećati formiranje složenijih polifenolnih spojeva (Albertini i sur., 2015). Sušenje, s druge strane, može dodatno smanjiti sadržaj polifenola zbog degradacije uzrokovane visokim temperaturama i dugotrajnom izloženošću zraku (Andujar i sur., 2012). Bitno je optimirati ove procese kako bi se očuvali korisni

polifenolni spojevi u kakau i održavala njihova svojstva koja promiču zdravlje (Abbe Maleyki i Ismail, 2010).

Osim polifenola dva zanimljiva spoja koja nalazimo u kakau su teobromin i kofein. Teobromin, poznat kao 3,7-dimetilksantin, derivat je kofeina i pojavljuje se u proizvodima od kakaovca u koncentracijama usporedivim s procijanidinima. Intrigantno, nakon konzumacije kakaovca, bioraspoloživost teobromina u ljudskoj plazmi je izrazito visoka, nadmašujući čak i kofein, epikatehin, katehin i procijanidine. On je bronhodilatator i uzrokuje opuštanje glatkih mišića krvnih žila, a i neke studije pokazuju njegovu sposobnost da inhibira angiogenezu koju pokreću specifične stanice raka (Kim i sur., 2014). S druge strane, kofein, ili 1,3,7-trimetilksantin, nije samo vitalna komponenta kakaovca, već također pokazuje brojne učinke koji se protežu od njegove potencijalne zaštitne uloge protiv demencije i Alzheimerove bolesti do njegovog utjecaja na puteve stanične proliferacije u određenim stanicama raka. Dublje proučavanje višestruke prirode kofeina otkriva njegovu sposobnost reguliranja metabolizma lipida u određenim prehranbenim uvjetima i njegovu interakciju s faktorima rasta u hipoksičnim stanicama raka (Kim i sur., 2014).

Značajno je napomenuti da je konzumacija kakaovca povezana s nizom potencijalnih zdravstvenih koristi. Brojne studije su istaknule da flavonoidi prisutni u kakau mogu doprinijeti smanjenju rizika od srčanih bolesti. Ti spojevi mogu poboljšati funkciju krvnih žila, smanjiti upalne procese i pozitivno utjecati na krvni tlak (Grassi i sur., 2015; Corti i sur., 2009). Osim toga, kakao prah je povezan s poboljšanjem kognitivne funkcije i raspoloženja, vjerojatno zbog prisutnosti psihoaktivnih tvari poput teobromina i feniletilamina (Sokolov i sur., 2013; Pase i sur., 2013).

Međutim, važno je naglasiti da se potencijalne zdravstvene koristi kakaovca najviše iskazuju kada se konzumira u obliku neslađenih i minimalno prerađenih proizvoda. Visoko prerađeni proizvodi, poput komercijalnih čokolada s visokim udjelom šećera i masti, mogu umanjiti ove pozitivne učinke. Stoga, umjerena konzumacija kvalitetnog kakaovca ili kakao praha kao dijela uravnotežene prehrane može donijeti raznovrsne koristi za zdravlje.

## **2.2. MED**

Med, prirodni zaslađivač proizveden od pčela iz nektara cvjetova, konzumira se već stoljećima i nije poznat samo po svom ugodnom okusu, već i po svojim potencijalnim zdravstvenim blagodatima. Bogat raznolikim prirodnim spojevima, uključujući šećere, enzime, aminokiseline, vitamine, minerale i antioksidanse, med je prava hranjiva bomba (Saxena i sur.,

2010). Jedinствena kombinacija fruktoze i glukoze u medu pruža brz i dugotrajan izvor energije, što ga čini preferiranim izborom za sportaše i osobe koje traže prirodni energetski poticaj (Ilija i sur., 2021). Osim toga, med posjeduje antimikrobna svojstva zbog niskog sadržaja vode i kiselosti koja može inhibirati rast određenih bakterija (Mandal i Mandal, 2011).

Brojna istraživanja su istaknula potencijalne zdravstvene koristi meda. Njegov antioksidacijski sadržaj, posebno fenolnih spojeva, doprinosi njegovoj sposobnosti borbe protiv oksidativnog stresa, smanjenju upale i zaštiti od kroničnih bolesti (Gheldof i Engeseth, 2002). Polifenoli, glavni fitonutrijenti u medu, privukli su značajnu pažnju zbog svojih potencijalnih terapijskih koristi. Ovi spojevi, koje je moguće identificirati tehnikama kao što su visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) ili tekućinska kromatografija-masena spektrometrija (LC-MS), pokazuju složene strukture uglavnom sastavljene od flavonoida i fenolnih kiselina (Jibril i sur., 2019). Specifični flavonoidi identificirani u medu uključuju krisin, kaempferol i kvercetin. Njihova inherentna svojstva pružaju niz zdravstvenih prednosti, posebno njihove antivirusne, protuupalne, antineoplastične i antiulkusne učinke. Takva svojstva ističu njihov potencijal u upravljanju kroničnim bolestima poput kardiovaskularnih bolesti. Međutim, razumijevanje polifenola u medu nije jednostavno; raznolika priroda i varijabilnost ovih spojeva u različitim vrstama meda povijesno su predstavljale istraživačke izazove (Jibril i sur., 2019; Hossen i sur., 2017).

Također je istraživana za potencijalnu ulogu u zacjeljivanju rana zbog svojih antibakterijskih svojstava i sposobnosti poticanja regeneracije tkiva (Molan, 2001). Nadalje, istraživanja sugeriraju da med može imati pozitivan utjecaj na gastrointestinalno zdravlje poticanjem rasta korisnih bakterija u crijevima i olakšavanjem probave (Eteraf-Oskouei i Najafi, 2013).

Važno je napomenuti da iako med nudi brojne potencijalne zdravstvene koristi, umjerenost je ključna zbog visokog sadržaja šećera. Međutim, osobe koje boluju od dijabetesa trebaju biti oprezne pri uključivanju meda u prehranu, budući da i dalje može povećati razinu šećera u krvi. Sveukupno, uključivanje visokokvalitetnog meda kao dijela uravnotežene prehrane može pružiti prirodni zaslađivač i izvor potencijalnih zdravstvenih prednosti.

Uključivanje meda kao dodatka u kakao prah može ponuditi skladan spoj okusa, istovremeno pružajući potencijalne zdravstvene prednosti. Prirodna slatkoća meda može upotpuniti bogat i blago gorak okus kakaa, poboljšavajući ukupni profil okusa i čineći ga privlačnijim za one koji preferiraju okus slatkoće. Osim toga, jedinstvena kompozicija meda,

uključujući njegove antioksidanse i biološki aktivne spojeve, može potencijalno sinergijski djelovati sa svojstvima kakaa koja promiču zdravlje, doprinoseći proizvodu ne samo na senzorskim obilježjima, već i s pozitivnim fiziološkim učincima. Istraživanja su ukazala da antioksidacijska sposobnost i sadržaj fenola u medu mogu doprinijeti smanjenju oksidativnog stresa i modulaciji upale, što su također karakteristike povezane s kakaom (Corti i sur., 2009; Gheldof i Engeseth, 2002). Dodatno, med je istraživani zbog svojih potencijalnih prebiotskih učinaka na zdravlje crijeva, potičući rast korisnih bakterija u crijevima, karakteristika koja bi se mogla nadopunjavati s potencijalno pozitivnim utjecajem kakaa na mikrobiotu crijeva (Eteraf-Oskouei i Najafi, 2013). Pažljivim uključivanjem meda u kakao prah može se kreirati proizvod s punijim okusom i potencijalno blagotvornim učincima na zdravlje, privlačeći istovremeno konzumente koji cijene okus i brigu o zdravlju.

### **2.3. ZOB**

Zob (*Avena sativa L.*) se dugo smatrala prehranbenom snagom i cijenjenom prehranbenom osnovom koja je konzumirana globalno (Paudel i sur., 2021). Njezina istaknutost u prehranbenom sektoru proizlazi iz impresivnog prehranbenog profila, karakteriziranog bogatim sadržajem prehranbenih vlakana, fitokemikalija, vitamina i minerala (Rasane i sur., 2013). Dublje proučavanje njezinog biološkog značaja dovodi do blagotvornog djelovanja fenolnih spojeva, s avenantramidima, polifenolnim alkaloidima, koji se ističu kao jedinstveni antioksidansi svojstveni zobi (Liu i sur., 2004). Ovi spojevi, posebno avenantramidi A, B i C, imaju ključnu ulogu u topljivom antioksidativnom fenolnom sadržaju zobi, dodatno dopunjenom prisutnošću drugih fenola poput vanilina, ferulinske kiseline i *p*-kumarinske kiseline (Chen i sur., 2018; Varga i sur., 2018).

Implikacije ovih prehranbenih sastojaka su vrlo značajne. Avenantramidi, na primjer, povezani su s potencijalnim antiaterogenim svojstvima, sugerirajući njihovu potencijalnu ulogu u ublažavanju rizika od ateroskleroze (Liu i sur., 2004). Štoviše, sveobuhvatna antioksidativna aktivnost zobi, koja proizlazi iz njezinog fenolnog sadržaja, naglašava njenu važnost u prevenciji bolesti i promociji cjelokupnog zdravlja (Chen i sur., 2018). Osim tih prednosti, zob je prepoznata po svojim hipokolesterolemičkim svojstvima, potencijalnim antikancerogenim učincima i čak se smatra prikladnom prehranbenom namirnicom za ljude oboljele od celijakije jer ne sadrži gluten (Rasane i sur., 2013).

Nedavna istraživanja također su uputila na dodanu vrijednost zobi u različitim prehranbenim proizvodima, od kruha, konditorskih proizvoda, pa do probiotičkih napitaka i

dječje hrane (Rasane i sur., 2013). Takva diverzifikacija ne samo da poboljšava senzorska svojstva i prihvaćanje zobi od strane potrošača, već i iskorištava njezine prehrambene prednosti u različitim prehrambenim oblicima. Osim toga, studije poput onih koje se fokusiraju na fenolni sastav na temelju boje ljuske nagovještavaju složen biološki potencijal zobi te se predlažu specijalizirane sorte zobi kako bi se maksimizirale zdravstvene koristi (Varga i sur., 2018). S njihovim bogatim povijesnim značajem, značajnim prehrambenim atributima i napretkom znanosti i tehnologije, zob nedvojbeno učvršćuje svoj položaj kao prehrambena osnova i središnja točka prehrambenog istraživanja.

#### **2.4. SINERGIJSKO DJELOVANJE KAKAO PRAHA, MEDA I ZOBİ**

Kombinacija meda i kakao praha može ponuditi bogat izvor korisnih polifenola i antioksidansa koji doprinose zdravlju na više načina. Kakao prah je poznat po visokim razinama flavonoida, za koje je pokazano da pozitivno utječu na zdravlje srca, smanjuje upalu i nude antioksidativnu zaštitu (Corti i sur., 2009). S druge strane, med, posebno tamnije vrste, također je bogat fenolnim spojevima i ima snažna antioksidativna svojstva (Alvarez-Suarez i sur., 2010). Kada se konzumiraju zajedno, oni sinergijski djeluju pružajući pojačani antioksidativni učinak. Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale u tijelu, čime potencijalno smanjuju oksidativni stres i smanjuju rizik od kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i raka (Corti i sur., 2009). Stoga, miješanje meda s kakao prahom ne samo da poboljšava okus, već i povećava nutritivni profil, nudeći jednostavan, ali učinkovit način za povećanje unosa polifenola i antioksidativnih razina u prehrani.

Osim meda i kakao praha, zob bi mogla biti izvrsna dopuna ovoj kombinaciji zbog svojih nutritivnih i zdravstvenih prednosti. Zob je bogata dijetalnim vlaknima, posebno beta-glukanima, koji su pokazali da smanjuju razinu kolesterola u krvi, potiču zdravlje probavnog sustava i poboljšavaju osjećaj sitosti (Rasane i sur., 2013). Kada se kombinira s antioksidativnim svojstvima kakao praha i meda, zob dodatno pojačava zdravstvene koristi smjese. Avenantramidi, jedinstveni antioksidansi prisutni u zobi, pružaju dodatnu zaštitu od slobodnih radikala, potencijalno doprinoseći smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti (Liu i sur., 2004). Također, zob dodaje teksturu i nutritivnu vrijednost smjesi, čineći je idealnom za pripremu zdravih grickalica ili doručka. Dakle, kombinacija meda, kakao praha i zobi ne samo da pruža ukusan obrok ili međuobrok, već i stvara nutritivno bogatu mješavinu koja može pridonijeti boljem općem zdravlju.



## 2.5. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI U BILJNIM EKSTRAKTIMA

### 2.5.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi, raznolika skupina sekundarnih metabolita kojih ima u izobilju u biljkama, igraju ključnu ulogu u raznim biološkim i ekološkim procesima. Ove spojeve karakterizira benzenski prsten koji nosi jednu ili više hidroksilnih skupina, što dovodi do širokog raspona kemijskih struktura i svojstava (Dixon i Paiva, 1995.). Fenolni spojevi značajno pridonose obrambenim mehanizmima biljaka, djelujući kao snažni antioksidansi i zaštitni agensi protiv stresora iz okoliša kao što su UV zračenje, patogeni i biljojedi (Maffei, 2010). Nadalje, njihova se uloga proteže izvan zaštite bilja, budući da pridonose boji, okusu i aromi voća, povrća i pića, utječući na preferencije potrošača (Zeb, 2020). U ljudskom zdravlju, fenolni spojevi su privukli pozornost zbog svojih potencijalnih dobrobiti, uključujući protuupalna, antikancerogena i kardiovaskularna zaštitna svojstva, koja se pripisuju njihovim antioksidativnim aktivnostima i aktivnostima hvatanja slobodnih radikala (Ozcan i sur., 2014). Složena biokemija fenolnih spojeva uključuje biosintezu kroz različite putove, kao što su fenilpropanoidni i šikiminski putevi, što rezultira proizvodnjom širokog spektra fenolnih derivata poput flavonoida, lignana i tanina (Vogt, 2010). Proučavanje fenolnih spojeva obuhvaća brojne znanstvene discipline, uključujući fitokemiju, biokemiju, farmakologiju i prehranu, ističući njihovo značenje u ekološkom i ljudskom kontekstu.

### 2.5.2. Antioksidativna uloga fenolnih spojeva

Antioksidacijska uloga fenolnih spojeva prvenstveno se pripisuje njihovoj sposobnosti da doniraju vodikove atome ili elektrone, čime neutraliziraju štetne slobodne radikale i reaktivne kisikove vrste (ROS) koji mogu dovesti do oštećenja stanica i raznih kroničnih bolesti (Foti, 2007). Kroz svoje aktivnosti čišćenja, fenolni spojevi pomažu u održavanju delikatne ravnoteže između oksidativnog stresa i antioksidativne obrane, igrajući ključnu ulogu u staničnoj homeostazi (Gulcin, 2012).

Flavonoidi, istaknuta podskupina fenolnih spojeva, opsežno su proučavani zbog svog antioksidativnog potencijala. Kvercetin, resveratrol i katehin, između ostalih, pokazali su snažnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala i sposobnost inhibicije peroksidacije lipida, procesa koji je povezan s brojnim degenerativnim poremećajima (Nijveldt i sur., 2001). Nadalje, fenolni spojevi često sinergiraju s drugim antioksidansima, kao što su vitamini C i E, poboljšavajući ukupni antioksidativni obrambeni sustav (Bolling i sur., 2013).

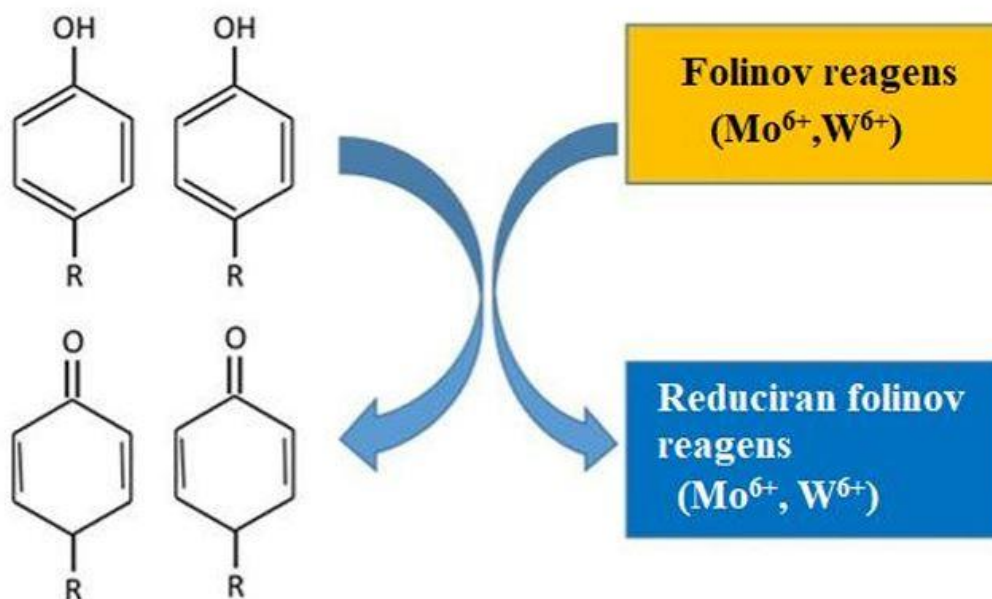
Antioksidativna svojstva fenolnih spojeva nisu samo bitna zbog njihovog utjecaja na ljudsko zdravlje. U biljkama ti spojevi djeluju kao prva linija obrane od okolišnih stresora, uključujući UV zračenje i patogene, čuvajući stanični integritet i osiguravajući optimalan rast i razvoj (Grace i Logan, 1996). U području znanosti o hrani, fenolni spojevi igraju dvostruku ulogu: očuvanje kvalitete hrane sprječavanjem propadanja izazvanog oksidacijom i pridonoseњem senzorskim svojstvima kao što su boja, okus i aroma (Pérez-Jiménez et al., 2008).

U zaključku, fenolni spojevi pojavljuju se kao ključne molekule u borbi protiv oksidativnog stresa, ispoljavajući antioksidativne učinke koji imaju dalekosežne implikacije na ljudsko zdravlje, otpornost biljaka i očuvanje hrane. Višestrani doprinosi fenolnih spojeva naglašavaju njihov značaj u biološkim sustavima i raznim znanstvenim disciplinama, potičući stalna istraživanja kako bi se iskoristio njihov potencijal za poboljšanje zdravlja i dobrobiti.

## **2.6. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI**

### **2.6.1. Folin-Ciocalteu metoda određivanja koncentracije ukupnih polifenola**

Folin-Ciocalteu metoda, koju su predstavili Otto Folin i Vintilă Ciocalteu, klasična je i široko korištena tehnika za kvantificiranje ukupnog sadržaja fenolnih spojeva u različitim uzorcima. Ovaj kolorimetrijski test temelji se na redoks reakciji između fenolnih spojeva i Folin-Ciocalteu reagenta, što rezultira stvaranjem plavo obojenog kompleksa s maksimalnom apsorpcijom oko 765 nm (Singleton i Rossi, 1965) (slika 1). Test uključuje dodavanje Folin-Ciocalteu reagenta u uzorak, a zatim dodavanje natrijeva karbonata kako bi se stvorilo alkalno okruženje, što poboljšava razvoj boje. Intenzitet boje je izravno proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva prisutnih u uzorku. Folin-Ciocalteu metoda široko se primjenjuje za procjenu fenolnog sadržaja različitih prirodnih proizvoda, uključujući voće, povrće, napitke i ekstrakte biljaka (Dorman i sur., 2003). Unatoč svojoj popularnosti, važno je napomenuti da Folin-Ciocalteu metoda ne može odrediti pojedine klase fenolnih spojeva te ponekad može precijeniti ukupni fenolni sadržaj zato što Folin-Ciocalteu reagens može reagirati i nekim drugim supstratima (Ainsworth i Gillespie, 2007). Stoga rezultate dobivene ovom metodom treba tumačiti s oprezom, posebno prilikom uspoređivanja uzoraka s različitim profilima fenola.



**Slika 1.** Prikaz redukcije Folinovog reagensa (prema Lujanac, 2021)

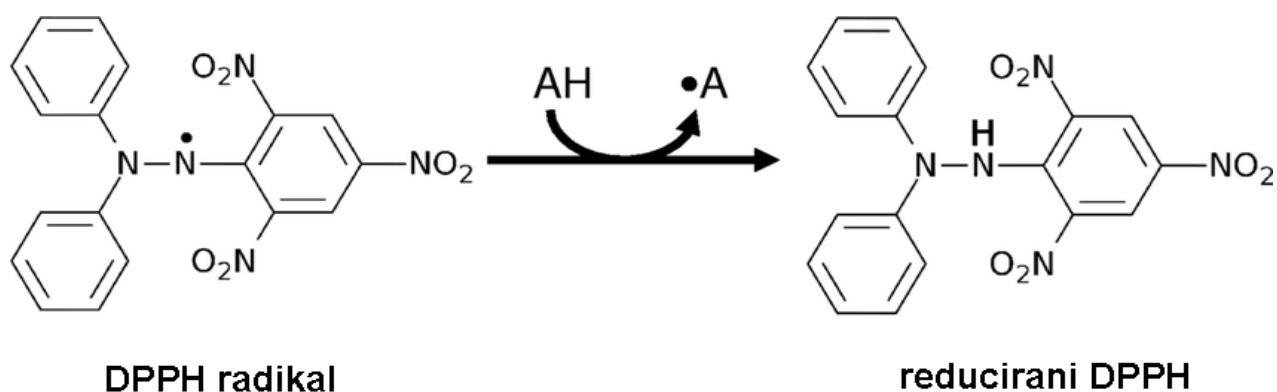
#### 2.6.2. DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda je široko korištena metoda za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva. Ova metoda temelji se na redukciji stabilnog slobodnog radikala DPPH antioksidansima, što rezultira vidljivom promjenom boje iz ljubičaste u žutu, koja se može kvantificirati spektrofotometrijski (Brand-Williams i sur., 1995) (slika 2). DPPH, stabilni slobodni radikal, priprema se kao otopina u prikladnom otapalu, obično etanolu. Otopina DPPH je tamnoljubičaste boje zbog nesparenih elektrona u molekuli DPPH. Uzorak koji sadrži antioksidanse pomiješa se s otopinom DPPH te se reakcijska smjesa zatim inkubira pod određenim uvjetima, obično u mraku kako bi se spriječile fotokemijske reakcije. Antioksidansi prisutni u uzorku doniraju atome vodika ili elektrone DPPH radikal, a ova donacija dovodi do redukcije DPPH, što rezultira promjenom boje iz tamnoljubičaste u svijetložutu. Smanjenje apsorbancije DPPH otopine mjeri se pomoću spektrofotometra na specifičnoj valnoj duljini, često oko 517 nm. Što je veće smanjenje apsorbancije, veća je antioksidativna aktivnost uzorka (Kedare i Singh, 2011).

Metoda je jednostavna i brza, omogućuje kvantitativno mjerenje antioksidativne aktivnosti, može se primijeniti na različite vrste uzoraka, uključujući biljne ekstrakte, prirodne proizvode i sintetske spojeve. Također može pomoći u traženju i usporedbi antioksidativnog potencijala različitih tvari. DPPH test može detektirati antioksidanse topive u vodi i topive u

lipidima, što omogućuje sveobuhvatnu procjenu ukupnog antioksidativnog kapaciteta uzorka (Kedare i Singh, 2011).

Međutim, postoje ograničenja koja treba uzeti u obzir. DPPH metoda primarno mjeri antioksidacijsku aktivnost temeljenu na transferu elektrona i možda ne odražava u potpunosti složene mehanizme antioksidativnog djelovanja koji se odvijaju u biološkim sustavima. Također, osjetljivost metode može varirati ovisno o čimbenicima poput pH vrijednosti i izbora otapala, što može dovesti do varijabilnosti u rezultatima (Prior i sur., 2005).



**Slika 2.** Reakcija DPPH radikala i antioksidansa (Murakami i Yoshino, 2020)

### 2.6.3. FRAP metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti

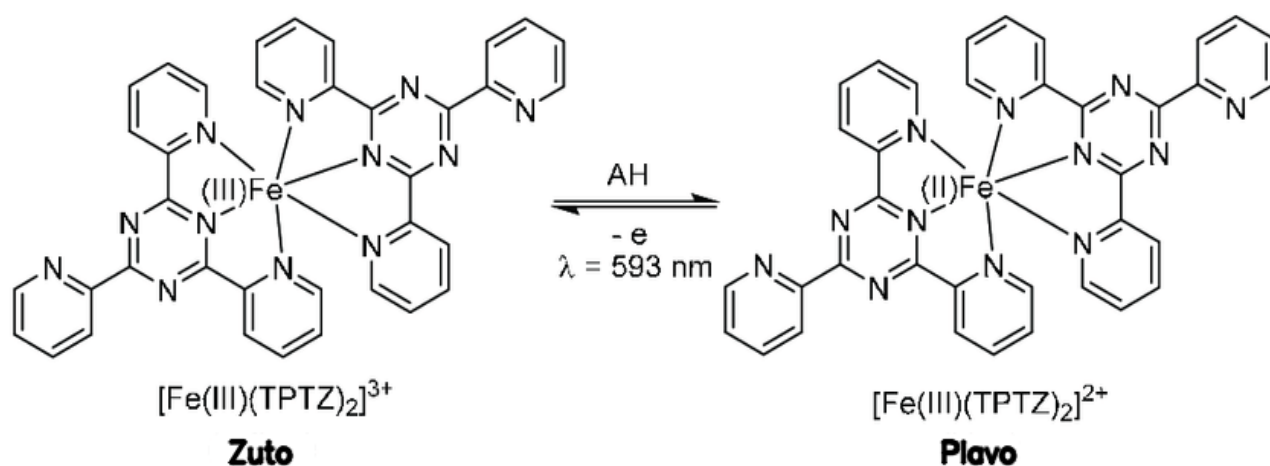
FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je metoda koja se koristi za ispitivanje antioksidacijske sposobnosti različitih uzoraka temeljem njihove sposobnosti da reduciraju  $\text{Fe}^{3+}$  ione u  $\text{Fe}^{2+}$  ione. Ova metoda, koju su uveli Benzie i Strain 1996. godine, uključuje redukciju kompleksa željeza(III)-trifiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) do njegove željezne(II) forme uz djelovanje antioksidansa prisutnih u uzorku. Redukcija rezultira stvaranjem plavo obojenog kompleksa željeza(II)-trifiridiltriazina, čija se apsorbancija može odrediti spektrofotometrijski (Benzie i Strain, 1996) (slika 3).

FRAP reagens se sastoji od otopine koja sadrži poznatu koncentraciju feritripiridiltriazin kompleksa ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ kompleks) otopljenog u kiselom puferu. Kiseli pufer se priprema zbog održavanja odgovarajućeg pH za reakciju. Uzorak koji sadrži antioksidanse pomiješa se s FRAP reagensom i puferskom otopinom. Reakcijska smjesa se zatim inkubira pod određenim uvjetima, obično na kontroliranoj temperaturi. Antioksidansi prisutni u uzorku doniraju elektrone ionima željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u FRAP reagensu. Ovaj prijenos elektrona dovodi do redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Ioni željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) proizvedeni tijekom ovog procesa tvore plavo obojeni

kompleks s TPTZ reagensom. Intenzitet plave boje izravno je proporcionalan koncentraciji antioksidansa u uzorku (Antolovich i sur., 2002).

Apsorpcija obojenog kompleksa mjeri se pomoću spektrofotometra na određenoj valnoj duljini, obično oko 593 nm. Što je apsorpcija veća, to je veći antioksidacijski kapacitet uzorka. Antioksidacijski kapacitet uzorka određuje se usporedbom njegove apsorbancije s onom standardne krivulje dobivene korištenjem poznatih koncentracija redukcijskog sredstva, obično željezovog sulfata. Rezultati se mogu izraziti kao mikromolarni  $\text{Fe}^{2+}$  ekvivalenti ili u odnosu na standard antioksidansa (Antolovich i sur., 2002).

FRAP metoda nudi nekoliko prednosti. Ona je ekonomična, zahtijeva minimalnu specijaliziranu opremu i pruža brze rezultate, što je čini osobito prikladnom za brza ispitivanja antioksidansa (Prior i sur., 2005).



Slika 3. Redukcija FRAP reagensa (Santos i Silva, 2020)

## 2.7. BLISKO- INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Blisko infracrvena (NIR) spektroskopija postala je snažan analitički alat koji se ističe svojom sposobnošću snimanja spektara kako za čvrste tako i za tekuće uzorke bez prethodne manipulacije uzorcima (Blanco i Villarroya, 2002). Ova tehnika djeluje detektirajući apsorpciju elektromagnetskog zračenja unutar valne duljine od 780 do 2500 nm (Osborne, 2006). Svestranost NIR spektroskopije dodatno je naglašena napretkom u instrumentaciji, uključujući razvoj spektrofotometara brzog odziva koji se mogu učinkovito koristiti u različitim okruženjima - od laboratorija do lokacija na licu mjesta, čak i na proizvodnim linijama (Blanco i Villarroya, 2002).

Osim svojih tehničkih atributa, stvarna primjenjivost NIR spektroskopije, posebno u području analize hrane, zaista je značajna. Igra ključnu ulogu u procjeni žitarica, mliječnih proizvoda, mesa, ribe, voća, povrća i čak pića. Takve analize su ključne ne samo za određivanje nutritivnog profila već i za provjeru autentičnosti prehrambenih proizvoda, osiguravajući da potrošači dobivaju autentične i nekontaminirane proizvode (Osborne, 2006). Štoviše, u kontekstu prehrambene industrije, NIR se kombinira s tehnologijom procesne analitičke tehnologije, optimizirajući proizvodne procese i osiguravajući dosljednu kvalitetu proizvoda (Grassi i Alamprese, 2018). S obzirom na njenu brzinu, ne-destruktivnu prirodu i širinu primjena, NIR spektroskopija nedvojbeno stoji kao neprocjenjiva imovina u modernoj analitičkoj i prehrambenoj znanosti.

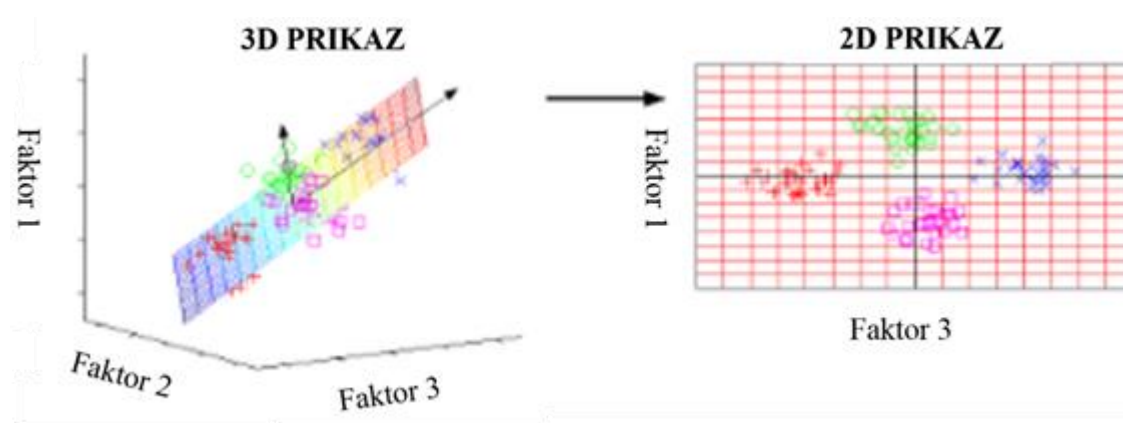
## **2.8. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA**

Analiza glavnih komponenata (engl. *Principal component analysis, PCA*) predstavlja temelj u svijetu analize podataka, posebno u svojoj sposobnosti da transformira skup podataka koji su moguće korelirani u skup linearno nekoreliranih varijabli poznatih kao glavne komponente (Karamizadeh i sur., 2013). Utemeljena na svojoj matematičkoj osnovi, PCA služi za dvije glavne svrhe: pojednostavljenje podataka i izdvajanje relevantnih informacija. Sama metoda omogućuje grafički prikaz odnosa uzoraka, gdje će se uzorci koji su međusobno slični grupirati zajedno, dok će se udaljenost uzoraka odnosno objekata povećavati s njihovom različitosti. Grafički prikaz predstavlja pozicioniranje uzoraka u kvadrante ili u 3D prostoru (slika 4). Njena primjena proteže se kroz mnoštvo polja, s naglaskom na kemometriji. Bro i Smilde (2014) pružili su praktičan primjer gdje je PCA korištena za analizu skupa podataka crvenih vina, pokazujući njenu sposobnost da otkrije osnovne uzorke i odnose među mjerenim varijablama, koji bi inače mogli biti skriveni u višedimenzionalnom prostoru izvornog skupa podataka.

Iznad same transformacije podataka, snaga PCA u smanjenju dimenzionalnosti je neosporna. Hvatajući varijancu izvornih podataka u manje dimenzija, PCA osigurava da se većina bitnih informacija zadrži, dok se značajno smanjuje složenost skupa podataka (Karamizadeh i sur., 2013). Ova značajka je posebno neprocjenjiva u eri velikih podataka, gdje skupovi podataka često imaju veliki broj varijabli, što čini tradicionalne metode analize nespretnima.

Povijesna pozadina PCA, kako ju je objasnio Wold i sur. (1987), oslikava tehniku koja se s vremenom razvijala kako bi se suočila s izazovima analize multivarijantnih podataka. Od

njezinih geometrijskih interpretacija do njenih statističkih osnova, PCA je bila predmet opsežnih istraživanja. Štoviše, njene primjene nisu ograničene samo na transformaciju i smanjenje podataka; također se koristi u modelima sličnosti, predobradi podataka, pa čak i u naprednim temama poput regresije i mnogostrukih tablica (Wold i sur. 1987). Ova trajna relevantnost i prilagodljivost PCA u različitim poljima naglašava njen značaj u evoluirajućem krajoliku znanosti o podacima i analitici.



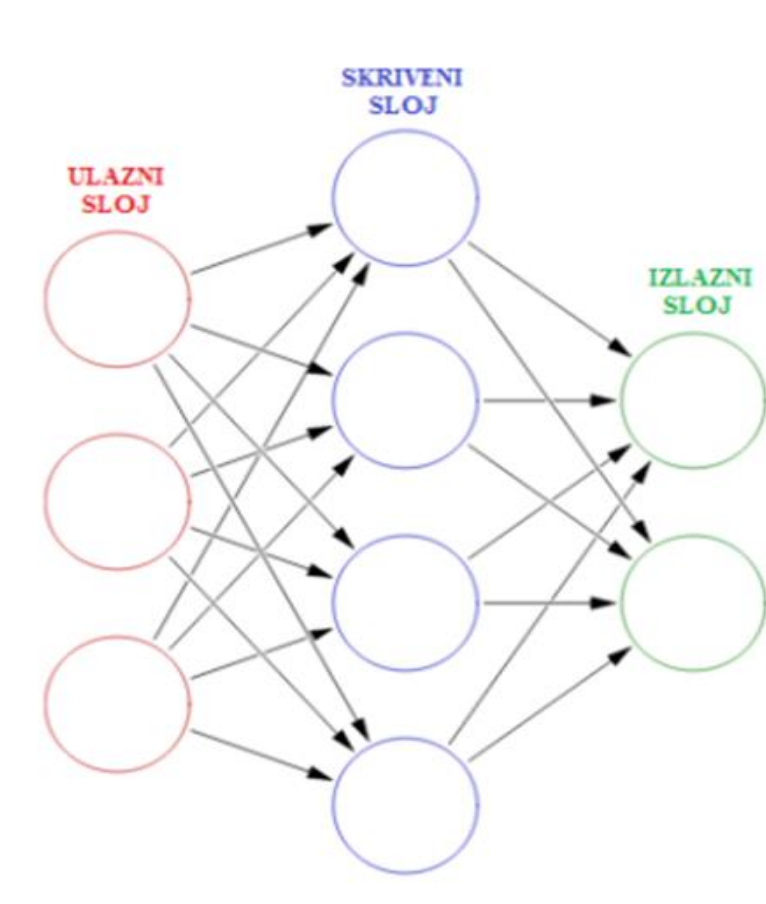
**Slika 4.** Primjer prikaza rezultata dobivenih PCA u 3D i 2D obliku (Scholz, 2006)

## 2.9. MODELI UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA

Umjetne neuronske mreže (engl. *Artificial neural networks*, ANN) su sofisticirani računalni modeli inspirirani arhitekturom ljudskog mozga. Ove mreže široko se primjenjuju u različitim područjima, svaka koristeći njihovu prilagodljivost i sposobnosti učenja. Arhitektura umjetne neuronske mreže sastoji se od neurona, odnosno čvorova. Čvorove dijelimo u tri sloja, "ulazni sloj", "skriveni sloj" i "izlazni sloj" (slika 5). U prehrambenoj znanosti, ANN su stekle značajnu pažnju zbog svoje svestranosti u rješavanju složenih izazova. Koriste se za modeliranje uzoraka rasta mikroorganizama, čime se predviđa sigurnost hrane i pomažu stručnjacima da unaprijed riješe potencijalne probleme (Goyal, 2013). ANN su također ključne za interpretaciju spektroskopskih podataka, važnog aspekta razumijevanja različitih svojstava hrane, posebno tijekom faza obrade i distribucije. Ova sposobnost predviđanja fizičkih, kemijskih, funkcionalnih i senzornih svojstava prehrambenih proizvoda neprocjenjiva je za održavanje konzistentnih standarda kvalitete (Huang i sur., 2007).

Osim ovih specifičnih primjena, temeljne metodologije i najbolje prakse za izgradnju i obuku ANN su evoluirale. Ova evolucija istaknuta je raspravama o smjernicama, odabiru ulaznih varijabli i dizajnu arhitekture, osiguravajući razvoj robustnih i preciznih modela (Walczak i Cerpa, 2001). Spajanje ovih metodologija s primjenama prehrambene znanosti

označava progresivni pomak prema odlučivanju temeljenom na podacima u industriji. Kako se ANN i dalje usavršavaju i prilagođavaju, njihova integracija u prehrambenu znanost ističe obećavajuću putanju za poboljšanje sigurnosti hrane, kontrole kvalitete i opće industrijske inovacije.



**Slika 5.** Pojednostavljeni prikaz umjetne neuronske mreže (prema Anonymous, 2023)



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Sirovine

Uzorci korišteni u ovome radu bili su ekstrakti mješavina kakao praha (Kraš d.d., Zagreb, Hrvatska), meda (Bio&bio, Zagreb, Hrvatska) i zobi (Bio&bio, Zagreb, Hrvatska) u različitim omjerima kao što je prikazano u tablici 1. Mješavine su sušene pri 60 °C i skladištene na sobnoj temperaturi 4, 5 i 6 mjeseci nakon čega su napravljeni ekstrakti.

**Tablica 1.** Omjeri komponenti smjese uzoraka

Uzorak	Med / g	Zob / g	Kakao / g
1	50	50	6,25
2	60	40	7,5
3	40	60	5
4	40	60	7,5
5	60	40	6,25
6	50	50	5
7	60	40	5
8	40	60	6,25
9	50	50	7,5

Uzroci 2 , 4 i 9 imaju isti i najviši udio kakaa, a od njih uzorak 2 ima najveći udio meda i najmanji udio zobi zatim slijedi uzorak 9 sa jednakim omjerima zobi i meda pa uzorak 4 sa najmanjim udjelom meda i najvećim udjelom zobi.

Uzorci 3,6 i 7 imaju isti, ali i najmanji udio kakaa. Uzorak 7 ima najveći udio meda i najmanji zobi zatim slijedi uzorak 6 sa jednakim omjerima meda i zobi pa uzorak 3 sa najmanjim udjelom meda i najvećim zobi.

Uzorci 1,5 i 8 imaju udio kakaa koji je po vrijednosti između uzoraka 2,4,9 i uzoraka 3,6,7. Uzorak 5 ima najveći udio meda i najmanji zobi, uzorak 1 ima jednaki omjer zobi i kakaa pa uzorak 8 sa najmanje meda i najviše zobi.

##### 3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius TE214S, Göttingen, Njemačka)
- Magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- Vorteks (Biosan V-1 plus, Riga, Latvija)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- NIR spektrometar (NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  Control Development inc., Philadelphia, SAD)

#### Pribor:

- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Falcon kivete
- Eppendorf kivete
- Laboratorijske čaše
- Štoperica
- Staklene pipete volumena 5 i 10 mL
- Mikropipete volumena 100  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$

#### 3.1.3. Kemikalije:

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, 98% (AcrosOrganics, SAD)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Amsterdam, Nizozemska)
- Trolox (Fluka, Švicarska)
- Natrijev acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezo(II)-sulfat-heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezo(III)-klorid-heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Kefo d.o.o., Slovenija)

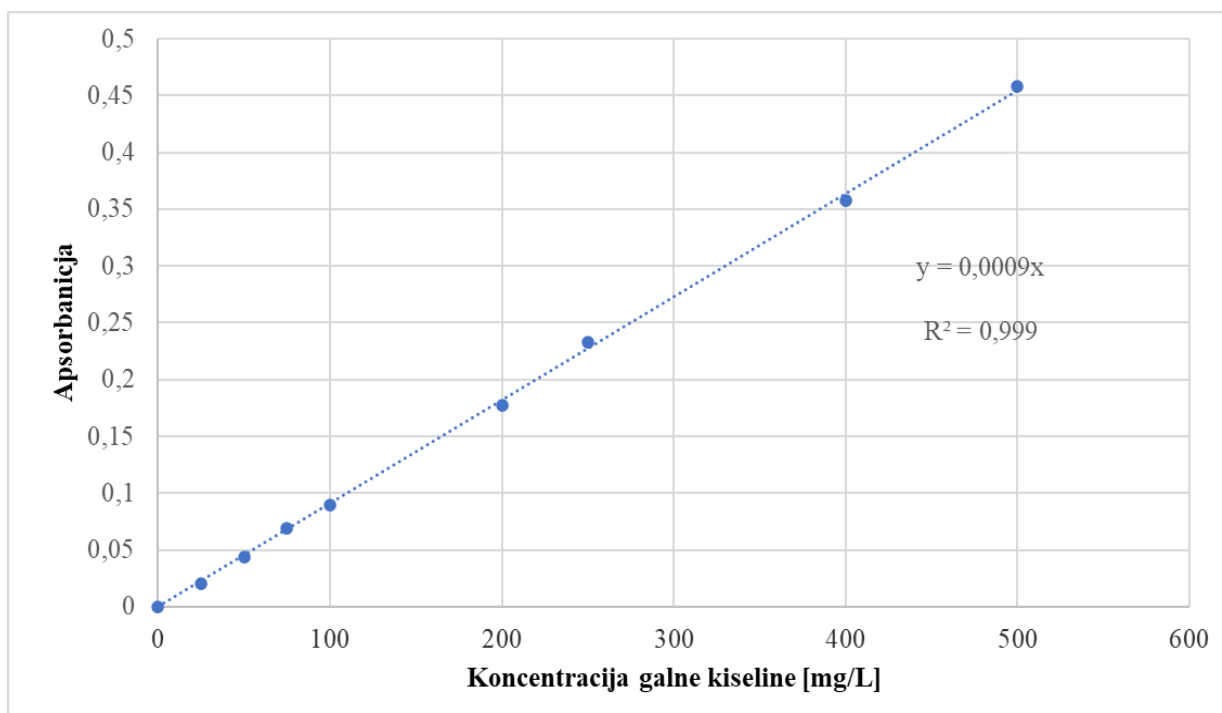
## 3.2. METODE

### 3.2.1. Kemijske analize

#### 3.2.1.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 765$  nm i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Pinelo i sur., 2005).

U epruvetu se otpipetira  $V = 7,9$  mL destilirane vode,  $V = 100$   $\mu$ L uzorka,  $V = 500$   $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i  $V = 1,5$  mL 20%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon dodatka 20%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija te uzorci stoje 2h na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na  $\lambda = 765$  nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži  $V = 100$   $\mu$ L destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Sadržaj ukupnih polifenola u pojedinim uzorcima određen je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ( $\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 500$  mg/L) (slika 6), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 6.** Baždarni pravac za određivanje ukupnih polifenola

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0009 x \quad [1]$$

Gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

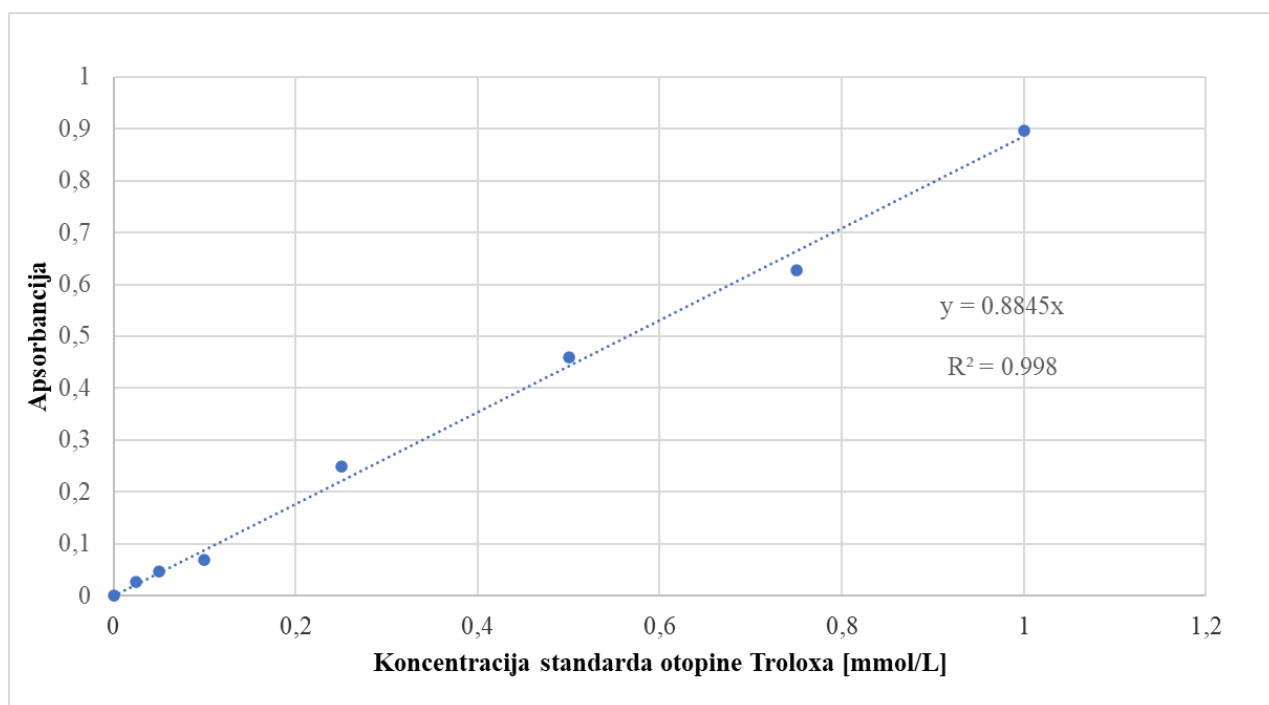
x – koncentracija galne kiseline [mg/L]

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije

### 3.2.1.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

Pripremi se otopina DPPH radikala u metanolu koncentracije  $c = 0,094 \text{ mmol/L}$ . U epruvetu se otpipetira  $V = 100 \text{ }\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka te se zatim doda  $V = 3,9 \text{ mL}$  pripremljene otopine DPPH radikala u metanolu. Sve zajedno se dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri  $\lambda = 515 \text{ nm}$  u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija Trolox-a ( $c_{\text{Trolox}} = 0 - 1 \text{ mmol/L}$ ) (slika 7), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 7.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti (DPPH)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,8845 x \quad [2]$$

Gdje je:

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije [nm]

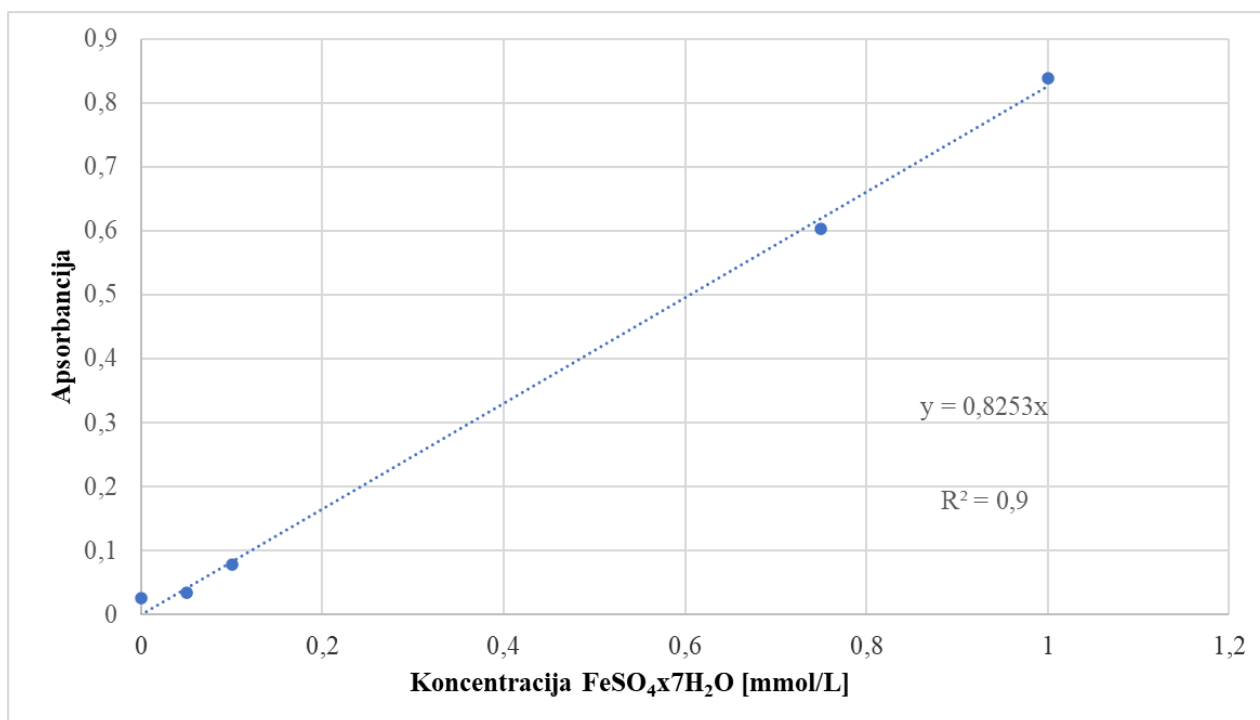
x - koncentracija standarda otopine Trolox-a [mmol/L]

$R^2$  – koeficijent determinacije

### 3.2.1.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) u fero formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri  $\lambda = 593 \text{ nm}$ .

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije  $c = 300 \text{ mmol/L}$ , otopinu TPTZ-a koncentracije  $c = 10 \text{ mmol/L}$  te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata koncentracije  $c = 20 \text{ mmol/L}$ . FRAP reagens priprema se miješanjem  $V = 25 \text{ mL}$  acetatnog pufera,  $V = 2,5 \text{ mL}$  TPTZ-a i  $V = 2,5 \text{ mL}$  željezo(III)-klorida-heksahidrata. U epruvetu se doda  $V = 50 \mu\text{L}$  ispitivanog uzorka i  $V = 950 \mu\text{L}$  FRAP reagensa te se izmjeri apsorbancija reakcijske smijese nakon  $t = 4 \text{ minute}$ . Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaku količinu FRAP reagensa. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $c_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0 - 1 \text{ mmol/L}$ ) (slika 8), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao  $\text{mmol}$  ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  po gramu suhe tvari uzorka.



**Slika 8.** Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti (FRAP)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,8253 x$$

[3]

Gdje je:

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije [nm]

x - koncentracija  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  [mmol/L]

$R^2$  – koeficijent determinacije

#### 3.2.1.4. Blisko infracrvena spektroskopija

Blisko-infracrvena spektroskopija (engl. *Near-Infrared Spectroscopy*, NIRs) analizira apsorbanciju elektromagnetske energije uzorka unutar spektralnog opsega valnih duljina između 800 i 2500 nm. Takva apsorbancija nastaje zbog vibracija O—H, C—H, i N—H kemijskih veza (Osborne, 2006). Za snimanje NIR spektara koristi se NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$ . Uzorci se stavljaju u kvarcne kivete i podvrgavaju se 5 paralelnih mjerenja. Nakon toga, rezultirajući spektralni podaci analiziraju se digitalno koristeći PCA analizu i umjetne neuronske mreže unutar softverskog alata *Statistica 13* (TIBCO Software, Palo Alto, SAD).

#### 3.2.2. Analiza glavnih komponenta i umjetne neuronske mreže

Statistička obrada podataka prikupljenih putem NIR spektroskopije provedena je korištenjem metoda analize glavnih komponenta (engl. *Principal component analysis*, PCA) i umjetnih neuronskih mreža (engl. *Artificial neural networks*, ANN). U ovom istraživanju, PCA metoda koristila se za kondenzaciju obilnih podataka o fizikalnim i kemijskim značajkama, smanjujući ih na deset ključnih komponenti ili faktora. Ovi faktori omogućuju vizualnu reprezentaciju raznolikosti uzoraka temeljenu na brojnim mjerenjima, a također služe kao temelj za izradu ANN modela. Deset glavnih komponenti, koje predstavljaju čak 99,99 % varijabilnosti, odabrano je kao ulazne varijable za neuronsku mrežu. Kao izlazne varijable u ANN modelu definirani su rezultati mjerenja fizikalnih karakteristika, uključujući ukupne polifenole, antioksidacijsku aktivnost (određenu FRAP i DPPH metodama) te trajanje skladištenja. Podjela podataka za treniranje, testiranje i validaciju ANN modela bila je 50:30:20. Korišteni ANN modeli imali su zadatak predvidjeti fizikalne značajke ekstrakata kombinacije kakao praha, meda i zobi: ukupne polifenole, antioksidacijsku aktivnost (prema FRAP i DPPH metodama) te vremensko razdoblje skladištenja. Za izradu i analizu ANN modela upotrijebljen je softver *Statistica 13* (TIBCO Software, SAD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je analiza kemijskih svojstava ekstrakta devet uzoraka smjesa kakaa, meda i zobi u različitim omjerima, sušenih na 60 °C te skladištenih 4, 5 i 6 mjeseci. U zadanom vremenu skladištenja pratili smo koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidativnu aktivnost izmjerenu DPPH i FRAP metodom. Također smo pratili kako omjer kakao praha, meda i zobi utječe na ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost tijekom skladištenja. Za bolje uočavanje razlika uzoraka tijekom vremena skladištenja provedena je i analiza glavnih komponenata koja je nužna za kreiranje adekvatne umjetne neuronske mreže koju smo primijenili kao alat za predviđanje vremena skladištenja, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti.

Vrijednosti ukupnih polifenola za svih devet uzoraka izmjerene nakon 4, 5 i 6 mjeseci prikazane su u tablici 2.

Antioksidativna aktivnost svih devet uzoraka izmjerena DPPH metodom nakon 4, 5 i 6 mjeseci prikazana je u tablici 3.

Vrijednosti antioksidativne aktivnosti za sve uzorke izmjerene FRAP metodom prikazane su u tablici 4.

### 4.1. KEMIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA

#### 4.1.1. Promjena koncentracije ukupnih polifenola

Kakao zrna (*Theobroma cacao*) i kakao proizvodi poput kakao praha bogat su izvor polifenola, doprinoseći otprilike 10 % suhe težine cijelog zrna, a njihovi proizvodi se smatraju jednim od glavnih doprinositelja antioksidansa prehrani zajedno s voćem i povrćem. Polifenoli kakaa, koji uključuju fenolne kiseline i flavonoide, uglavnom se sastoje od katehina, flavonol glikozida, antocijana i procijanidina (Ali i sur., 2013). Crozier i sur. (2011) u svom istraživanju su odredili vrijednost ukupnih polifenola u kakao prahu od  $48,2 \pm 2,1$  mg/g, dok je vrijednost ukupnih polifenola u ovom radu izražena u  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$  i prikazana je u tablici 1 za svih devet uzoraka.

Polifenoli koji se nalaze u medu uglavnom su flavonoidi, fenolne kiseline i njihovi derivati. Glavni polifenoli su flavonoidi i njihov sadržaj može varirati između 60 i 460 mg/100 g meda, a ukupni sadržaj polifenola u medu iznosi približno 56-500 mg/kg (Hossen i sur., 2017).



**Tablica 2.** Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima

TPC (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.tv</sub> )			
Uzorak	60 °C - 4. mj.	60 °C - 5. mj.	60 °C - 6. mj.
1	8,624±0,820	8,467±0,099	7,681±0,224
2	10,752±0,279	9,926±0,330	10,645±0,939
3	11,273±0,444	6,606±0,157	9,817±0,939
4	9,001±0,651	9,816±0,251	9,341±1,780
5	9,077±0,451	7,748±0,777	8,883±0,426
6	7,632±0,104	6,514±0,890	7,820±0,367
7	6,945±0,026	8,789±0,443	6,345±0,184
8	9,107±0,678	9,844±0,504	9,348±0,404
9	10,915±0,126	8,272±0,861	9,239±0,405

Iz vrijednosti u tablici 2 možemo vidjeti da uzorci 2, 4 i 9 s najvišim udjelom kakaa imaju i najviše vrijednosti ukupnih polifenola nakon 4 mjeseca. Također možemo uočiti da uzorak 2 koji ima najveći udio meda i najmanji udio zobi nakon 6 mjeseci zadržava visoku koncentraciju ukupnih polifenola. Ostalim uzorcima koncentracije polifenola se očekivano blago smanjuju, ali također nakon 6 mjeseci imaju visoke konačne vrijednosti.

Uzorci 3, 6 i 7 koji imaju najmanje udjele kakaa također imaju i najmanje koncentracije ukupnih polifenola nakon 4 mjeseca, osim uzorka 3 koji ima neuobičajeno visoke vrijednosti, čemu uzrok može biti greška pri mjerenju ili kontaminacija uzorka. Koncentracije nakon 5 i 6 mjeseci i kod ovih uzoraka blago padaju ili su slične vrijednostima nakon 4 mjeseca. Uzrok najmanjim koncentracijama polifenola možemo pripisati najmanjim koncentracijama kakaa u tim uzorcima koji najviše doprinosi ukupnoj vrijednosti polifenola.

Uzorci 1, 5 i 8 imaju udio kakaa koji je po vrijednosti između ostalih uzoraka te ujedno i pokazuje takve vrijednosti ukupnih polifenola. Njihova koncentracija također pada ili ostaje približno ista sa vremenom.

Hurst i sur. (2009) su u istraživanju stabilnosti polifenola kakao praha i proizvoda od kakaa tijekom skladištenja došli do zaključka da razine polifenola ostaju uglavnom iste tijekom vremena. Njihovi rezultati pokazuju da su polifenoli (npr. epikatehin, oligomeri procijanidina i polimeri procijanidina) vrlo stabilni u uvjetima skladištenja pri sobnoj temperaturi u proučavanim čokoladama, kakaovom prahu i znu kakaovca. Međutim Šarić i sur. (2012) u svom istraživanju u kojem su pratili koncentraciju polifenola u više vrsta meda tijekom

skladištenja pokazali su da se ukupni sadržaj fenola i flavonoida u medu značajno smanjuje tijekom jedne godine skladištenja. Prema istraživanju Rakić i sur. (2014) koji su pratili vrijednosti ukupnih polifenola u zobi tijekom više mjeseci skladištenja došlo je do zaključka da se koncentracija ukupnih fenola postepeno smanjivala tijekom prvih 12 mjeseci skladištenja, ali se zatim značajno smanjila tijekom sljedećeg razdoblja.

Rezultati navedenih studija pokazuju da vrijednosti ukupnih polifenola tijekom vremena skladištenja kod kakaa ostaju stabilne, dok se kod meda i zobi značajno smanjuju. Stoga možemo reći da odgovaraju našim rezultatima jer u našoj smjesi kakao praha, zobi i meda koncentracija ukupnih polifenola dvije od tri komponente smanjuje se s vremenom pa se može i očekivati pad koncentracije ukupnih polifenola cijele smjese tijekom skladištenja.

#### 4.1.2. Promjena antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom

DPPH metodom mjerena je antioksidacijska aktivnost svih uzoraka i vrijednosti su iskazane u mmol ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka. Vrijednosti za svih devet uzoraka nakon 4, 5 i 6 mjeseci prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom

DPPH (mmol <sub>TE</sub> /g <sub>s.tv.</sub> )			
Uzorak	60 °C - 4. mj.	60 °C - 5. mj.	60 °C - 6. mj.
1	0,0177±0,0005	0,0186±0,0006	0,0164±0,0011
2	0,0183±0,0025	0,0236±0,0029	0,0232±0,0005
3	0,0186±0,0003	0,0152±0,0015	0,0183±0,0024
4	0,0173±0,0005	0,0230±0,0002	0,0186±0,0006
5	0,0169±0,0009	0,0188±0,0017	0,0197±0,0003
6	0,0147±0,0000	0,0159±0,0008	0,0162±0,0003
7	0,0141±0,0001	0,0176±0,0008	0,0140±0,0002
8	0,0182±0,0002	0,0223±0,0000	0,0229±0,0022
9	0,0239±0,0002	0,0221±0,0013	0,0233±0,0002

Iz tablice 3 se može vidjeti da uzorci 2, 4 i 9 sa najvišim udjelom kakaa imaju visoke vrijednosti antioksidacijske aktivnosti koje sa vremenom rastu ili su približno iste. Također se može primijetiti da uzorak 4 sa najmanjim udjelom meda i najvišim udjelom zobi ima najnižu početnu vrijednost kada bi ga usporedili sa uzorcima 2 i 9.

Uzorci sa najmanjim udjelima kakaa 6 i 7 imaju i najniže početne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, osim uzorka 3, koji kao i kod ukupnih polifenola pokazuje

neuobičajeno visoke vrijednosti. Vrijednosti uzoraka 6 i 7 nakon 5 i 6 mjeseci blago rastu ili zadržavaju vrijednosti kao nakon 4 mjeseca.

Uzorci 1, 5 i 8 sa srednjim vrijednostima udjela kakaa pokazuju vrijednosti antioksidacijske aktivnosti veće od uzoraka sa najmanjim udjelom kakaa ali i manje od uzoraka sa najvećim udjelima. Vrijednosti uzoraka 5 i 8 pokazuju blagi rast nakon 6 mjeseci u usporedbi sa antioksidacijskom aktivnosti nakon 4 mjeseca dok vrijednost uzorka 1 pokazuje blagi pad.

Hurst i sur. (2009) u svojem su istraživanju pratili i antioksidativnu aktivnost te njihovi rezultati pokazuju da nema značajne promjene vrijednosti tijekom skladištenja. Iz njihovog istraživanja se vidi da je antioksidativna aktivnost kakaovog praha konstantna tijekom razdoblja dužeg od 800 dana. Međutim Endraiyan i sur. (2016) u istraživanju u kojem su mjerili antioksidativnu aktivnost u pulpi kakaa dolaze do zaključka da se antioksidacijska aktivnost pulpe kakaovca povećala nakon jednostruke i dvostruke pasterizacije, a tijekom studije skladištenja u trajanju od 8 tjedana, jednostruka i dvostruko pasterizirana kaša pokazala je vrlo male promjene u vrijednostima antioksidacijske aktivnosti kada se skladištila na 4 °C i 25 °C .

U svom istraživanju Šarić i sur. (2012) također su mjerili antioksidativnu aktivnost pomoću DPPH metode na nekoliko vrsta meda tijekom skladištenja te su zaključili da antioksidativna aktivnost opada tijekom jedne godine skladištenja. Rakić i sur. (2014) koji su u svom istraživanju pratili antioksidativnu aktivnost zobi mjerenu DPPH metodom dolaze do sličnog zaključka da se antioksidacijska aktivnost polako smanjivala tijekom prvih 12 mjeseci, a taj pad bio je izraženiji tijekom sljedećih 12 mjeseci.

#### 4.1.3. Promjena antioksidacijske aktivnosti izmjerene FRAP metodom

FRAP metodom mjerena je antioksidacijska aktivnost svih uzoraka i vrijednosti su iskazane u mmol ekvivalenta  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  po gramu suhe tvari uzorka. Vrijednosti za svih devet uzoraka nakon 4, 5 i 6 mjeseci prikazane su u tablici 4.

**Tablica 4.** Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene FRAP metodom

FRAP (mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ /g s.tv.)			
Uzorak	60 °C - 4. mj.	60 °C - 5. mj.	60 °C - 6. mj.
1	0,0525±0,0073	0,0590±0,0040	0,0521±0,0004
2	0,0691±0,0002	0,0684±0,0011	0,0709±0,0008
3	0,0537±0,0104	0,0477±0,0018	0,0594±0,0005
4	0,0575±0,0011	0,0540±0,0014	0,0589±0,0001
5	0,0597±0,0092	0,0562±0,0015	0,0650±0,0010
6	0,0490±0,0007	0,0486±0,0007	0,0491±0,0043
7	0,0427±0,0003	0,0550±0,0024	0,0484±0,0003
8	0,0587±0,0050	0,0519±0,0029	0,0669±0,0008
9	0,0619±0,0015	0,0537±0,0009	0,0642±0,0054

Antioksidacijske aktivnosti uzoraka 2, 4 i 9 s najvišim udjelom kakaa su među najvećima od svih uzoraka što je i za očekivati s obzirom na udio kakaa. Usporedbom vrijednosti nakon 4, 5 i 6 mjeseci možemo vidjeti blagi rast kod sva tri uzorka. Također možemo primijetiti da uzorak 2 sa najvećim udjelom meda i najmanjim udjelom zobi ima najvišu antioksidacijsku aktivnost nakon 4, 5 i 6 mjeseci.

Najmanje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti nakon 4 mjeseca pokazuju uzorci sa najmanjim udjelom kakaa 3, 6 i 7. promatrajući rezultate nakon 4, 5 i 6 mjeseci možemo vidjeti blagi rast kod sva tri uzorka.

Uzorci 1, 5 i 8 sa udjelima kakaa između najvišeg i najnižeg udjela pokazuju i antioksidacijsku aktivnost koja je između aktivnosti uzoraka sa najvišim i najnižim udjelima kakaa. Uzorci 5 i 8 pokazuju blagi rast u usporedbi rezultata nakon 4 i 6 mjeseci dok uzorak 1 ima skoro pa istu vrijednost nakon 4 i 6 mjeseci.

Proučavajući rezultate istraživanja Rakić i sur. (2014) na zobi i Šarić i sur. (2012) na medu možemo vidjeti da se antioksidativna aktivnost mjerena FRAP metodom na medu i zobi smanjuje tijekom skladištenja kao i antioksidativna aktivnost mjerena DPPH metodom.

#### 4.1.4. Korelacijske matrice

U namjeri da analiziraju odnosi fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih ekstrakata smjesa kaka, meda i zobi napravljene su korelacijske matrice fizikalno-kemijskih karakteristika za sve mjesece skladištenja. Korelacijska matrica je statistička tehnika koja se koristi za procjenu odnosa između dviju varijabli u skupu podataka. Matrica je tablica u kojoj svaka ćelija sadrži korelacijski koeficijent, gdje se 1 smatra jakim odnosom između varijabli, 0 neutralnim odnosom, a -1 slabim odnosom. U tablicama 5,6 i 7 možemo vidjeti vrijednosti koeficijenata korelacije komponenata naših smjesa od kojih su napravljeni ekstrakti i ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH i FRAP metodom.

U tablici 5. prikazani su korelacijski koeficijenti između kaka, meda, zobi, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti za ekstrakte dobivene iz smjese koja je skladištena 4 mjeseca. Svi statistički značajni koeficijenti korelacije su podebljani u tablici. Iz tablice možemo vidjeti da ukupni polifenoli pozitivno koreliraju sa svim varijablama osim meda, a istu situaciju možemo vidjeti kod antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH metodom. Zanimljivo je da kod antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP metodom nema statistički značajne korelacije sa medom i zobi nego samo sa ukupnim polifenolima i antioksidativnom aktivnosti mjernom DPPH metodom. Također važno je za primijetiti da kakao pozitivno korelira sa svim kemijskim svojstvima ekstrakata.

**Tablica 5.** Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata nakon 4 mjeseca skladištenja (statistički značajni koeficijenti korelacije su podebljani)

Varijable	Kakao	Med	Zob	Ukupni polifenoli – 4 mj.	DPPH – 4 mj.	FRAP – 4 mj.
Kakao	<b>1</b>	0	0	<b>0,469</b>	<b>0,624</b>	<b>0,809</b>
Med	0	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>-0,254</b>	<b>-0,248</b>	0,030
Zob	0	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>0,254</b>	<b>0,248</b>	-0,030
Ukupni polifenoli - 4 mj.	<b>0,469</b>	<b>-0,254</b>	<b>0,254</b>	<b>1</b>	<b>0,795</b>	<b>0,742</b>
DPPH - 4 mj.	<b>0,624</b>	<b>-0,248</b>	<b>0,248</b>	<b>0,795</b>	<b>1</b>	<b>0,633</b>
FRAP - 4 mj.	<b>0,809</b>	0,030	-0,030	<b>0,742</b>	<b>0,633</b>	<b>1</b>

U tablici 6 prikazani su korelacijski koeficijenti između kakaa, meda, zobi, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti za ekstrakte dobivene iz smjese koja je skladištena 5 mjeseci. Iz tablice možemo ponovo vidjeti pozitivnu korelaciju kakaa sa ukupnim polifenolima i antioksidativnom aktivnosti, ali i izostanak korelacije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom sa medom i zobi. Također možemo primijetiti pozitivnu korelaciju antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP metodom sa svim varijablama osim zobi.

**Tablica 6.** Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata nakon 5 mjeseci skladištenja (statistički značajni koeficijenti korelacije su podebljani)

Varijable	Kakao	Med	Zob	Ukupni polifenoli - 5 mj.	DPPH - 5 mj.	FRAP - 5 mj.
Kakao	<b>1</b>	0	0	<b>0,672</b>	<b>0,914</b>	<b>0,581</b>
Med	0	<b>1</b>	<b>-1</b>	0,022	-0,023	<b>0,609</b>
Zob	0	<b>-1</b>	<b>1</b>	-0,022	0,023	<b>-0,609</b>
Ukupni polifenoli - 5 mj.	<b>0,672</b>	0,022	-0,022	<b>1</b>	<b>0,876</b>	<b>0,609</b>
DPPH - 5 mj.	<b>0,914</b>	-0,023	0,023	<b>0,876</b>	<b>1</b>	<b>0,575</b>
FRAP - 5 mj.	<b>0,581</b>	<b>0,609</b>	<b>-0,609</b>	<b>0,609</b>	<b>0,575</b>	<b>1</b>

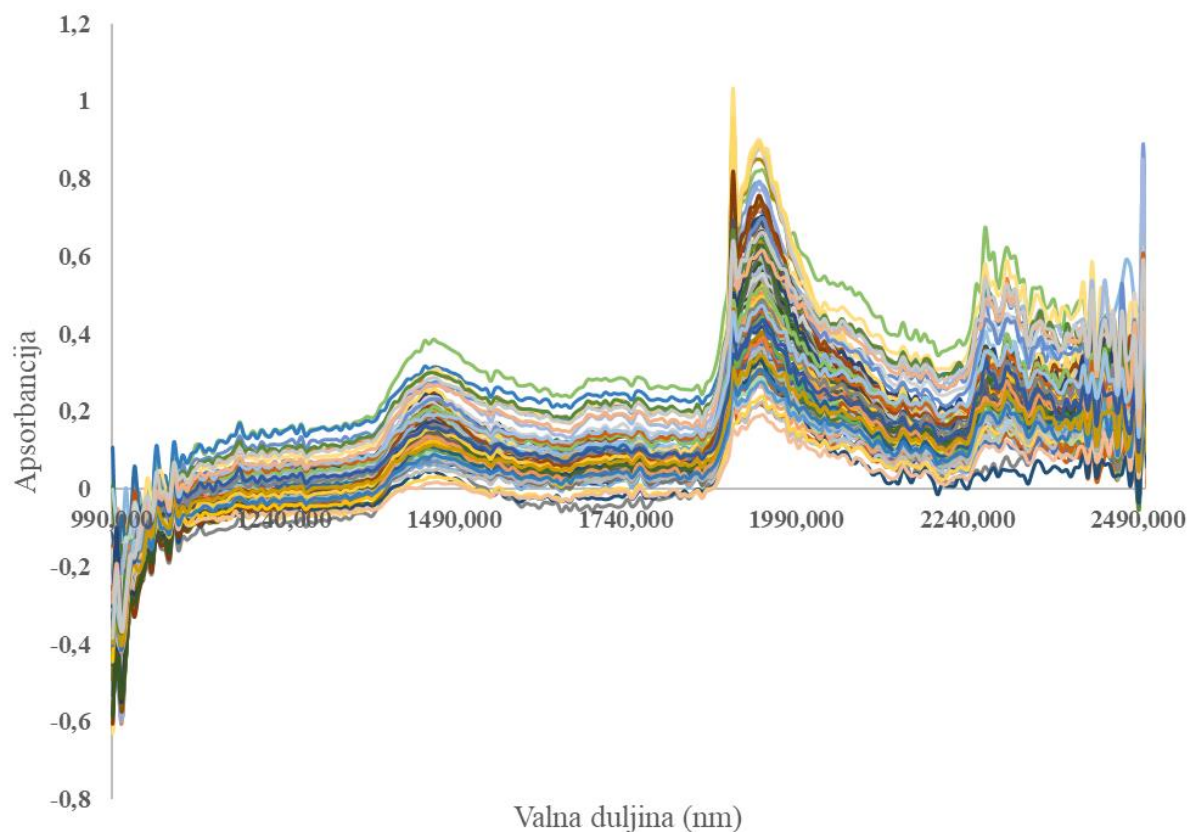
U tablici 7 prikazani su korelacijski koeficijenti između kakaa, meda, zobi, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti za ekstrakte dobivene iz smjese koja je skladištena 6 mjeseci. U ovoj tablici opet možemo vidjeti pozitivnu korelaciju kakaa sa ukupnim polifenolima i antioksidativnom aktivnošću. Med nakon 6 mjeseci skladištenja pokazuje negativnu korelaciju sa ukupnim polifenolima i antioksidativnom aktivnosti mjerenom DPPH metodom dok sa aktivnosti mjerenom FRAP metodom nema statistički značajnu korelaciju. Također u tablici vidimo pozitivnu korelaciju ukupnih polifenola sa svim varijablama osim meda. Med nakon 6 mjeseci skladištenja pokazuje negativnu korelaciju sa ukupnim polifenolima i antioksidativnom aktivnosti mjerenom DPPH metodom dok sa aktivnosti mjerenom FRAP metodom nema statistički značajnu korelaciju.

**Tablica 7.** Korelacijska matrica fizikalno-kemijskih karakteristika ekstrakata nakon 6 mjeseci skladištenja (statistički značajni koeficijenti korelacije su podebljani)

Varijable	Kakao	Med	Zob	Ukupni polifenoli - 6 mj.	DPPH - 6 mj.	FRAP - 6 mj.
Kakao	<b>1</b>	0	0	<b>0,583</b>	<b>0,707</b>	<b>0,662</b>
Med	0	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>-0,293</b>	<b>-0,124</b>	-0,016
Zob	0	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>0,293</b>	<b>0,124</b>	0,016
Ukupni polifenoli - 6 mj.	<b>0,583</b>	<b>-0,293</b>	<b>0,293</b>	<b>1</b>	<b>0,820</b>	<b>0,868</b>
DPPH - 6 mj.	<b>0,707</b>	<b>-0,124</b>	<b>0,124</b>	<b>0,820</b>	<b>1</b>	<b>0,935</b>
FRAP - 6 mj.	<b>0,662</b>	-0,016	0,016	<b>0,868</b>	<b>0,935</b>	<b>1</b>

#### **4.2. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA I RAZVOJ MODELA UMJETNE NEURONSKE MREŽE NA TEMELJU NIR SPEKTARA**

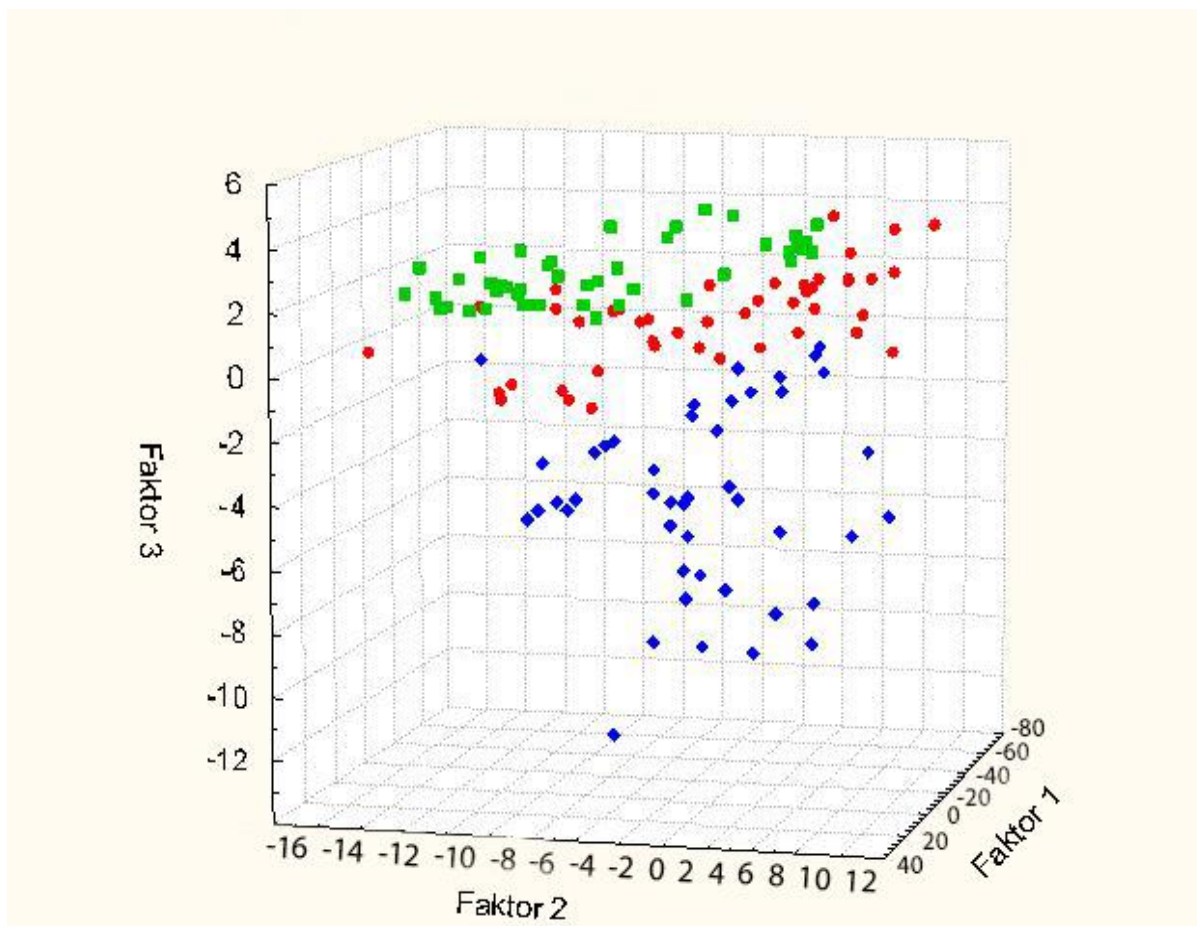
Statistička obrada podataka prikupljenih putem NIR spektroskopije provedena je korištenjem metoda analize glavnih komponentata (engl. *Principal component analysis*, PCA) i umjetnih neuronskih mreža (engl. *Artificial neural networks*, ANN). Za istraživanje korišten je NIR uređaj (NIR-128-1.7-USB/6.25/50), a u programu Statistica v13 prikazani su rezultati u obliku grafa sa slike 10. Preklapajući spektri na slici 9 nam pokazuju da se glavna razlika u spektrima može se naći u području od 1490 nm do 2490 nm. Ovo područje odgovara vibracijama istezanja i deformacije skupina –CH, –NH i –OH (Osborne, 2006). Također je primijećeno da spektri pokazuju značajno preklapanje i veliku sličnost u obliku i intenzitetu. Kako bi se pronašle sličnosti i razlike između uzoraka u ovom dijelu spektra, daljnja analiza glavnih komponenti može se provesti bez prethodne obrade NIR spektra korištenjem PCA metode.



**Slika 9.** NIR spektri svih ekstrakta smjese kakao praha, meda i zobi

Svrha PCA analize je pojednostavljenje i reduciranje dimenzija podataka kako bi se bolje razumjele sličnosti i razlike među uzorcima. Slika 10 prikazuje 3D grafički prikaz PCA analize prva tri faktora dobivenih snimanjem NIR spektara uzoraka dobivenih iz smjese kakao praha, meda i zobi. Tri glavne komponente čine 96,285 % ukupne varijance, što je prilično visoko. To znači da grafikon bilježi značajan dio informacija i razlika između uzoraka. Na slici možemo vidjeti vrijednosti uzoraka nakon 4 mjeseca skladištenja (crveno), 5 mjeseci skladištenja (zeleno) i 6 mjeseci skladištenja (plavo). U dvodimenzionalnom prikazu dolazilo do preklapanja podataka za različite mjesece pa je bilo potrebno rezultate prikazati u trodimenzionalnom obliku.





**Slika 10.** 3D prikaz PCA analize prva tri faktora dobiveni snimanjem uzoraka NIR spektroskopijom (crvene točke - 4 mjeseca, zelene točke - 5 mjeseci, plave točke - 6 mjeseci)

U opsežnoj PCA analizi ekstrakata dobivenih iz mješavine zobi, meda i kakao praha, grafički prikaz jasno pokazuje vremensku evoluciju svojstava mješavine u rasponu od tri vremenske točke: 4, 5 i 6 mjeseci. Podatkovne točke su jasno grupirane na temelju trajanja skladištenja uzoraka. Ovo sugerira da skladištenje ima značajan učinak na karakteristike ekstrakata, koje su obuhvaćene PCA analizom. Razdvojenost između skupina (crvena, zelena i plava) ukazuje na jasne razlike u svojstvima ekstrakata tijekom tri vremenske točke. To može biti posljedica čimbenika kao što su razgradnja, sazrijevanje ili druge kemijske promjene tijekom vremena. Prva glavna komponenta, koja obuhvaća značajnih 75,348 % ukupne varijance, služi kao jasan pokazatelj najizraženijih varijacija mješavine. To je vidljivo u obrascima grupiranja gdje uzorci nakon 4 mjeseca (prikazani crvenom bojom) pretežno popunjavaju sredinu grafikona. Kako vrijeme starenja napreduje do 5 mjeseci, uzorci (predstavljeni zelenom bojom) prelaze iznad uzoraka nakon 4 mjeseca, a 6-mjesečni uzorci se nalaze (plavi) ispod svih. Ovaj prostorni raspored na grafikonu sugerira uzastopnu i kontinuiranu promjenu karakteristika smjese tijekom testiranog razdoblja. Značajno, dok je

razdvajanje između 5-mjesečnih i 6-mjesečnih uzoraka prilično jasno, što ukazuje na značajan pomak u svojstvima smjese tijekom ovog vremenskog okvira, preklapajuća područja između 4-mjesečnih i 5-mjesečnih klastera pokazuju manje promjena u ovoj fazi. Ovaj PCA vizualni prikaz, koji bilježi kumulativnih 96,285 % varijance s uključivanjem prve tri komponente, nudi dubok uvid u dinamičku prirodu svojstava mješavine tijekom vremena, posebno ističući prijelaz između 5. i 6. mjeseca.

U tablici 8 možemo vidjeti pet modela umjetnih neuronskih mreža koje su pokazivale najbolje rezultate od tisuću razvijenih modela pomoću mjerenja NIR spektroskopijom. Za ulaz u neuronske mreže korišteno je deset glavnih komponenti koje sadrže 99,9 % objašnjenih fizikalnih i kemijskih svojstava. Sve varijable koje su mjerene tijekom istraživanja korištene su kao izlazi ANN, a to su 4 varijable: ukupni polifenoli, antioksidativna aktivnost dobivena pomoću DPPH i FRAP metode i vrijeme skladištenja. Isprobane su različite raspodjele podataka kao što su 70:15:15 i 60:20:20, ali su se najbolje pokazale neuronske mreže sa raspodjelom podataka 50:30:20 (50 % podataka je korišten za učenje, 30 % za testiranje i 20 % za validaciju). Za optimalnu performansu mreže, ključno je razmatrati odnos između preciznosti učenja, testiranja i validacije te njihovih povezanih pogrešaka. Idealno, preciznost učenja trebala bi biti najviša, slijedi preciznost testiranja, dok bi preciznost validacije trebala biti najniža. Suprotno tome, kada govorimo o pogreškama, validacija bi trebala imati najveću pogrešku, dok bi učenje trebalo rezultirati najmanjom pogreškom. U tablici 8 zelenom bojom je označena neuronska mreža za koju smo zaključili da je najbolja od svih 5 zbog najvećih  $R^2$  vrijednosti i najmanjih pogrešaka.

**Tablica 8.** Modeli odabranih ANN razvijeni u svrhu predviđanja ukupnih polifenola, DPPH i FRAP vrijednosti i vrijeme skladištenja pomoću mjerenja NIR spektroskopijom

NAZIV MREŽE	PRECIZNOST UČENJA	PRECIZNOST TESTIRANJA	PRECIZNOST VALIDACIJE	POGREŠKA UČENJA	POGREŠKA TESTIRANJA	POGREŠKA VALIDACIJE	SKRIVENA AKTIVAC. FUNKCIJA	IZLAZNA AKTIVAC. FUNKCIJA
MLP-10-12-4	0,7644	0,5695	0,5340	0,0607	0,1279	0,1522	Tanh	Identitet
MLP – 10-8-4	0,7363	0,5862	0,5557	0,0658	0,1245	0,1475	Tanh	Identitet
MLP – 10-6-4	0,6464	0,5144	0,5024	0,0851	0,1393	0,1787	Eksponecialna	Eksponecialna
MLP – 10-5-4	0,7760	0,5410	0,5172	0,0583	0,1447	0,1673	Tanh	Tanh
MLP – 10-13-4	0,7548	0,5540	0,5520	0,0648	0,1367	0,1417	Tanh	Identitet

Iz tablice 9 možemo vidjeti koliko dobro odabrana neuronska mreža može predvidjeti vrijednosti ukupnih polifenola, antioksidativnu aktivnost i vrijeme skladištenja. Glavna prednost ovog modela bila je njegova iznimna preciznost u predviđanju mjeseci skladištenja. Na skupu podataka za trening postigao je odličnu vrijednost od 0,9214. Nadalje, ova se izvrsnost održala na testnim i validacijskim skupovima podataka, bilježeći metrike performansi od 0,9012 odnosno 0,8257. Takva dosljednost ukazuje na robusnost modela i njegovu potencijalnu primjenjivost u scenarijima industrijskog praćenja stabilnosti proizvoda.

**Tablica 9.** Analiza rezultata ANN za predviđanje vrijednosti ukupnih polifenola, antioksidativne aktivnosti dobivene DPPH i FRAP metodom i vremena skladištenja

ANN 10-8-4			
VARIJABLA	PRECIZNOST UČENJA	PRECIZNOST TESTIRANJA	PRECIZNOST VALIDACIJE
POLIFENOLI	0,6751	0,5456	0,5893
DPPH	0,7090	0,4429	0,2773
FRAP	0,6397	0,4551	0,5306
MJESEC	0,9214	0,9012	0,8257

Međutim, iako je model pokazao svoju sposobnost u predviđanju trajanja skladištenja, izazovi su se pojavili pri predviđanju drugih parametara. Na primjer, u slučaju polifenola, izvedba modela na setu za učenje bila je obećavajućih 0,6751. Ali primijećen je pad kod preciznosti testiranja (0,5456) i preciznosti validacije (0,5893). Sličan trend bio je uočljiv u predviđanjima vrijednosti DPPH i FRAP. Predviđanja za DPPH odražavala su najznačajnije razlike između vrijednosti preciznosti učenja i preciznosti validacije.

Valinger i sur. (2018) u svome istraživanju koristili su umjetne neuronske mreže kako bi predvidjeli sadržaj bioaktivnih spojeva u lišću masline. U tom istraživanju njihovi modeli neuronskih mreža koji su trenirani na 27 uzoraka pokazali su zadovoljavajuću sposobnost predviđanja količine polifenola u ekstraktima lista masline. Iz toga se može pretpostaviti da uz veću količinu podataka za svaki uzorak modeli neuronskih mreža u našem istraživanju imali bi veću sposobnost predviđanja količine ukupnih polifenola.

U drugom istraživanju koji su proveli Sofu i Ekinci (2007) gdje su koristili umjetne neuronske mreže za predviđanje vremena skladištenja jogurta došli su do zaključka da kombinacija neuronskih mreža s objektivnim očitanjima može rezultirati snažnim kvalitetnim predviđanjima. Rezultati modeliranja pokazali su da postoji izvrsno slaganje između eksperimentalnih podataka i predviđenih vrijednosti, s visokim koeficijentom determinacije ( $R^2 = 0,9996$ ) koji pokazuje da razvijeni model može analizirati nelinearne multivarijantne podatke s vrlo dobrom izvedbom i manje parametara.

Iz podataka u tablicama 8 i 9 možemo zaključiti da se NIR spektroskopija uz korištenje PCA analize pokazala vrlo efikasnom za kreiranje dobrog modela umjetnih neuronskih mreža koji može biti dobar alat predviđanja mjeseci skladištenja.

## 5. ZAKLJUČCI

Provedenim eksperimentom i analizom rezultata došli smo do slijedećih zaključaka:

1. Udio kakaã ima veliki utjecaj na vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidativnu aktivnost nakon 4, 5 i 6 mjeseci skladištenja.
2. Udio meda i zobi ima manji utjecaj na ukupne polifenole i antioksidativnu aktivnost od udjela kakaã.
3. Koncentracija ukupnih polifenola usko je povezana sa antioksidativnom aktivnosti uzoraka nakon 4, 5 i 6 mjeseci skladištenja
4. Kod uzoraka sa istim udjelima kakaã vrijednost ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost raste sa udjelom meda.
5. Vrijednosti ukupnih polifenola kod svih uzoraka padaju proporcionalno sa proteklom vremenom skladištenja.
6. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ostaju iste ili blago rastu u usporedbi rezultata nakon 4, 5 i 6 mjeseci.
7. Analize glavnih komponenata NIR spektara uzoraka ekstrakta uspješno je razdvojila uzorke ekstrakta smjese kakao praha, meda i zobi nakon 4, 5 i 6 mjeseci skladištenja.
8. Razvijeni model umjetne neuronske mreže može poslužiti kao baza za statistički zadovoljavajuće predviđanje mjeseca skladištenja smjese kako praha, meda i zobi.

## 6. LITERATURA

- Abbe Maleyki MJ, Ismail A (2010) Antioxidant Properties Of Cocoa Powder. *J Food Biochem* **34**, 111-128. doi: 10.1111/j.1745-4514.2009.00268.x
- Ackar D, Valek-Lendić K, Valek M, Šubarić D, Miličević B, Babić J, Nedić I (2013) Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food? *J Chem-Ny* **2013**, 1-7. doi:10.1155/2013/289392
- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* **2**, 875-877. doi: 10.1038/nprot.2007.102
- Albertini B, Schoubben A, Guarnaccia D, Pinelli F, Della Vecchia M, Ricci M, Di Renzo GC, Blasi P (2015) Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. *J Agric Food Chem* **63**, 9948–9953. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01062>
- Ali F, Ranneh Y, Isamil A, Esa NM (2013) Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using the HPLC-UV-ESI—MS/MS and probing their antioxidant properties. *J Food Sci Technol* **52**, 2103-2111. doi:10.1007/s13197-013-1187-4
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Bompadre S, Battino M (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol* **48**, 2490-2499. doi: 10.1016/j.fct.2010.06.021
- Andujar I, Recio MC, Giner RM, Ríos JL (2012) Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2012**, 1-23. doi: 10.1155/2012/906252
- Anonymous (2023) Artificial neural network. [https://en.wikipedia.org/wiki/Artificial\\_neural\\_network](https://en.wikipedia.org/wiki/Artificial_neural_network). Pristupljeno 25. listopada 2023.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**, 183-198. doi: 10.1039/b009171p
- Beckett ST, Fowler MS, Ziegler GR (2017) Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use, 5. izd. John Wiley & Sons, Chichester
- Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292
- Blanco M, Villarroya I (2002) NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trac-Trend Anal Chem* **21**, 240-250 [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)
- Bolling BW, Chen YY, Chen O (2013.) Contributions of phenolics and added vitamin C to the antioxidant capacity of pomegranate and grape juices: synergism and antagonism among constituents. *Int J Food Sci Tech* **48**, 2650-2658. doi:10.1111/ijfs.12261
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* **28**, 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Bro R, Smilde AK (2014) Principal component analysis. *Anal. Methods* **6**, 2812-2831. doi: 10.1039/c3ay41907j

- Camu N, De Winter T, Addo SK, Takrama JS, Bernaert H, De Vuyst L (2008) Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J Sci Food Agr* **88**, 2288-2297. doi:10.1002/jsfa.3349
- Chen C, Wang L, Wang R, Luo X, Li Y, Li J, Li Ya, Chen Z (2018) Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. *Food Chem* **39**, 260–267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.104>
- Coe SD, Coe MD (2013). *The True History of Chocolate*, 3. izd., Thames & Hudson, London
- Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Luscher TF (2009) Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation* **119**, 1433–1441. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827022
- Crozier SJ, Preston AG, Hurst JW, Payne MJ, Mann J, Hainly L, Miller DL (2011) Cacao seeds are a “Super Fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chem Cent J* **5** doi: 10.1186/1752-153X-5-5
- de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, García JR , Parrilla EA (2019) Phenolic Compounds. U: Yahia EM, Carrillo-López A (ured.) *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Woodhead Publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington str. 253-271
- Dixon, RA, Paiva, NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085–1097. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ (2003) Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem* **83**, 255-262. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00088-8
- Endraiyani V, Ludescher RD, Di R, Karwe MV (2017) Total Phenolics and Antioxidant Capacity of Cocoa Pulp: Processing and Storage Study. *J Food Process Pres* **41**. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13029>
- Eteraf-Oskouei T, Najafi M. (2013) Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran J Basic Med Sci* **16** , 731-742.
- Foti MC (2007) Antioxidant properties of phenols. *J Pharm Pharmacol* **59**, 1673-1685. doi:10.1211/jpp.59.12.0010
- Gheldof N, Engeseth NJ (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* **50**, 3050-3055. doi: 10.1021/jf0114637
- Goyal S (2013) Artificial neural networks (ANNs) in food science – A review. *Int. J. Sci. World* **1**, 19-28 DOI:10.14419/ijsw.v1i2.1151
- Grace SC, Logan BA (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaf evergreen species. *Plant Cell Environ* **112**, 1631-1640. doi: 10.1104/pp.112.4.1631
- Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Ferri C. (2008) Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J Nutr* **138**, 1671-1676. doi: 10.1093/jn/138.9.1671

- Grassi S, Alamprese C (2018) Advances in NIR spectroscopy applied to process analytical technology in food industries. *Curr. Opin. Food Sci* **22**, 17-21 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.008>
- Gulcin İ (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* **86**, 345-391. doi: 10.1007/s00204-011-0774-2
- Hossen S, Ali Y, Jahurul MHA, Abdel-Daim MM, Hua Gan S, Khalil I (2017) Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. *Pharmacol Rep* **69**, 1194-1205. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.07.002>.
- Huang Y, Kangas LJ, Rasco BA (2007) Applications of Artificial Neural Networks (ANNs) in Food Science. *Crit Rev Food Sci* **47**, 113-126. doi: 10.1080/10408390600626453
- Hurst WJ, Payne MJ, Miller KB, Stuart DA (2009) Stability of Cocoa Antioxidants and Flavan-3-ols over Time. *J Agric Food Chem* **57**, 9547–9550 DOI:10.1021/jf901457s
- Ilija G, Simulescu V, Merghes P, Varan N (2021) The health benefits of honey as an energy source with antioxidant, antibacterial and antiseptic effects. *Sci Sport* **36**, 272. doi:10.1016/j.scispo.2020.10.005
- Jibril FI, Hilmi ABM, Manivannan, L (2019) Isolation and characterization of polyphenols in natural honey for the treatment of human diseases. *Bull Natl Res Cent* **43** <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0044-7>
- Karamizadeh S, Abdullah S, Manaf A, Zamani M, Hooman A (2013) An Overview of Principal Component Analysis. *Journal of Signal and Information Processing* **4**, 173-175. doi: 10.4236/jsip.2013.43B031
- Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**, 412-422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
- Kim J, Kim J, Shim J, Lee CY, Lee KW, Lee HJ (2014) Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 1458-1472. doi: 10.1080/10408398.2011.641041.
- Liu L, Zubik L, Collins FW, Marko M, Meydani M (2004) The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis* **175**, 39–49. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.044
- Lujanac A (2021) Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja imele (*Viscum Album*) (Diplomski rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek
- Maffei ME (2010) Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *S Afr J Bot* **93**, 76– 86. doi:10.1016/j.sajb.2010.03.003
- Mandal MD, Mandal S (2011) Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* **1**, 154-160. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60016-6
- Moharram HA, Youssef MM (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex J Fd Sci Technol* **11**, 31-42.
- Molan PC (2001) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol* **2**, 13-19. doi: 10.2165/00128071-200102010-00003
- Murakami K, Yoshino M (2022) Prooxidant activity of aminophenol compounds: copper-dependent generation of reactive oxygen species. *BioMetals* **35**, 1-6. doi:10.1007/s10534-022-00367-8



- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**, 418-425. doi: 10.1093/ajcn/74.4.418
- Osborne BG (2006) Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. U: Meyers RA, McGorin RJ (ured.) Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey str. 1-14. doi: 10.1002/9780470027318.a1018
- Ozcan T, Akpınar-Bayizit A, Yilmaz-Ersan L., Delikanlı B (2014) Phenolics in Human Health. *Int J Chem Eng* **5**, 393-396. doi: 10.7763/IJCEA.2014.V5.416
- Pase MP, Scholey AB, Pipingas A, Kras M, Nolidin K, Gibbs A, Wesnes K, Stough C (2013) Cocoa polyphenols enhance positive mood states but not cognitive performance: A randomized, placebo-controlled trial. *J Psychopharmacol* **27**, 451-458. doi: 10.1177/0269881112473791
- Paudel D, Dhungana B, Caffè M, Krishnan PA (2021) Review of Health-Beneficial Properties of Oats. *Foods* **10**, 2591. <https://doi.org/10.3390/foods10112591>
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* **41**, 274-285. doi:10.1016/j.foodres.2007.12.004
- Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC (2005) Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem* **92**, 109-117. doi:10.1016/j.foodchem.2004.07.015
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290-4302. doi: 10.1021/jf0502698
- Rakić S, Janković S, Marčetić M, Živković D, Kuzevski J (2014) The impact of storage on the primary and secondary metabolites, antioxidant activity and digestibility of oat grains (*Avena sativa*). *J Funct Foods* **7**, 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.022>.
- Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A, Unnikrishnan VS (2013) Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J Food Sci Technol* **52**, 662-675. doi: 10.1007/s13197-013-1072-1
- Santos C, Silva A (2020) The Antioxidant Activity of Prenylflavonoids. *Molecules* **25**, 696. doi:10.3390/molecules25030696
- Saxena S, Gautam S, Sharma A. (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem* **118**, 391-397. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.001
- Scholz M (2006) Approaches to analyse and interpret biological profile data. (doktorski rad), Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, University of Potsdam, Germany.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158. doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144
- Sofu A, Ekinçi FY (2007) Estimation of Storage Time of Yogurt with Artificial Neural Network Modeling. *J Dairy Sci* **90**, 3118-3125. doi:10.3168/jds.2006-591

Sokolov AN, Pavlova MA, Klosterhalfen S, Enck P (2013) Chocolate and the brain: Neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **37**, 2445–2453. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.06.013

Šarić G, Marković K, Major N, Krpan M, Uršulin-Trstenjak N, Hruškar M, Vahčić N (2012) Changes of Antioxidant Activity and Phenolic Content in Acacia and Multifloral Honey During Storage. *Food Technol Biotechnol* **50**, 434–441. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/94500> (Datum pristupa: 01.11.2023.)

Valinger D, Kušen M, Jurinjak Tušek A, Panić M, Jurina T, Benković M i sur. (2018) Development of Near Infrared Spectroscopy Models for Quantitative Prediction of the Content of Bioactive Compounds in Olive Leaves. *Chem. Biochem. Eng Q* **32**, 535-543. doi: 10.15255/CABEQ.2018.1396

Varga M, Jójárt R, Fónad P, Mihály R, Palágyi A (2018) Phenolic composition and antioxidant activity of colored oats. *Food Chem* **268**, 153-161 doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.035>

Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol Plant* **3**, 2–20. doi: 10.1093/mp/ssp106

Walczak S, Cerpa N (2001) Artificial Neural Networks. U: Meyers RA (ured.) *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3 izd. Academic Press, San Diego, str. 631-645.

Wold S, Esbensen K, Geladi P (1987) Principal Component Analysis. *Chemometr Intell Lab* **2**, 37-52. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)

Zeb A (2020) Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem* **44**, 1-22. doi:10.1111/jfbc.133

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja VEDRAN RIBARIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vedran Ribarić

Vedran Ribarić