

UNIVERZITET U BEOGRADU

TEHNOLOŠKO-
METALURŠKI FAKULTET



Marija Ranić

**ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA
KAFE I OTPADNE KAFE I NJIHOV UTICAJ NA
AKTIVACIJU TROMBOCITA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY
AND METALLURGY



Marija Ranić

COFFEE AND SPENT COFFEE EXTRACTS
ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND INFLUENCE
ON BLOOD PLATELETS ACTIVATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

MENTOR:

Dr Suzana Dimitrijević –Branković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Marija Glibetić, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Dušan Antonović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Želela bih da izrazim svoju zahvalnost svima koji su doprineli da ova disertacija ugleda svetlo dana i da njena izrada bude nezamenljivo iskustvo.

Doktorska disertacija je nastala u saradnji Tehnološko-metalurškog fakulteta i Instituta za medicinska istraživanja. Rađena je u laboratorijama Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, TMF-a kao i Centa izuzetne vrednosti za istraživanje ishrane i metabolizma, IMI-ja. Iskreno se nadam se da će se uspešna saradnja između ove dve institucije nastaviti i u budućnosti.

Radom je rukovala dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor TMF-a u Beogradu kojoj se ovim putem toplo zahvaljujem na bezrezervnoj pomoći, idejama i sugestijama u toku izrade i pisanja rada.

Posebnu zahvalnost dugujem komentoru dr Mariji Glibetić, naučnom savetniku Instituta za medicinska istraživanja, na stručnoj pomoći, ali i na velikoj iskrenoj i ljudskoj podršci da istrajem i privedem disertaciju kraju.

Od srca se zahvaljujem svojoj kolegici dr Aleksandri Konić Ristić na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela i završne faze rada na prenetom znanju, prijateljstvu, posvećenom vremenu i istraživačkom entuzijazmu.

Zahvaljujem se članovima komisije, prof. dr Slavici Šiler-Marinković i prof. dr Dušanu Antonoviću za vredne stručne savete i sugestije.

Takođe se zahvaljujem svojim kolegama iz Centra izuzetne vrednosti za istraživanje ishrane i metabolizma, Instituta za medicinska istraživanja, na korisnim savetima, saradnji i razumevanju.

Zahvalnost dugujem i Institutu za javno zdravlje, Požarevac, za deo eksperimentalnog rada urađenog u laboratorijama ovog Instituta.

Hvala mojim dragim prijateljima koji su imali reči podrške za moj rad, naročito u završnim fazama izrade disertacije. Znam da će se oni sami prepoznati.

Mojoj porodici, roditeljima, na pruženoj ljubavi i podršci da učim i radim ono što želim i na svemu što su učinili da danas budem to što jesam i da veruju u mene u najdelikatnijim trenucima, možda i više od mene same.

Dini, Feđi i Predragu.

HVALA!

Marija

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA KAFE I OTPADNE KAFE I NJIHOV UTICAJ NA AKTIVACIJU TROMBOCITA

Rezime

Kafa, kao jedno od najpopularnijih i najčešće konzumiranih pića danas, jedan je od prehrambenih proizvoda kojim se najviše trguje u svetu. Kao rezultat procesuiranja i pripreme kafe, ogromne količine otpadne kafe se generišu kao čvrsti ostatak. Iako je pokazano da je otpad od pripremanja kafe jako bogat bioaktivnim komponentama od interesa za industriju, pomenuti otpad se još uvek ne koristi kao potencijalni izvor bioaktivnih komponenti sa izrazitim antioksidativnim potencijalom, u cilju proizvodnje obogaćene hrane ili dodataka ishrani. Otpad koji se dobija prilikom proizvodnje konzumne kafe predstavlja ujedno i veliki ekološki problem.

Imajući u vidu navedeno, predmet ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije je sprovođenje detaljnih ispitivanja mogućeg ponovnog iskorišćenja polifenola iz otpadne kafe koji imaju važnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti kafe, uz sagledavanje svih aspekata koji ukazuju na značaj, ekonomičnost i potencijalne zdravstvene efekte.

Takođe, imajući u vidu da konzumiranje kafe u Srbiji predstavlja tradicionalni deo svakodnevnice i sagledavajući potencijal iskorišćenja otpada koji pri tome nastaje, pri planiranju rada na ovoj tezi, postavljeni su sledeći ciljevi, podeljeni u tri segmenta. U prvom delu ispitan je prosečan nutritivni sastav kafe koja se najčešće konzumira u Srbiji kako bi se u Srpsku bazu podataka o sastavu namirnica (SBPSN) unele analitičke vrednosti harmonizovane sa standardima Evropske mreže za izvore informacija o hrani (EuroFIR). Na osnovu dobijenih vrednosti, izračunat je doprinos konzumiranja crne kafe dijetarnom unosu komponenti prisutnih u infuziji kafe (minerala, makronutrijenata, kofeina, hlorogenske kiseline i masnih kiselina). U drugom delu su definisani optimalni uslovi ekstrakcije polifenola iz otpadne kafe (espresso i crne) kao funkcionalnih komponenti i ispitan njihov antioksidativni potencijal. Potencijal iskorišćenja bioaktivnih komponenti otpadne kafe je ispitan korišćenjem ekstrakcije pomognute mikrotalasima, primenom

etanolnog rastvora kao rastvarača. Optimizacija procesa ekstrakcije je vršena primenom statističkih modela definisanih softverom Design Expert, (8.0), a procena antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata urađena je na osnovu praćenja sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, merenjem antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom. U trećem delu je ispitan uticaj ekstrakta kafe i otpadne kafe na funkciju trombocita, kao i potencijal prisutnih polifenola da inhibiraju agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima, u cilju pružanja racionalne osnove za njihovu upotrebu kao funkcionalnih sastojaka hrane u promociji zdravlja i prevenciji bolesti.

Dobijeni rezultati potvrđuju da je sadržaj makronutrijenata crne kafe koja se najviše konzumira na srpskom tržištu u saglasnosti sa podacima datim u drugim bazama podataka o sastavu namirnica i karakteriše ga niska energetska vrednost i umeren doprinos dijetarnom unosu makronutrijenata. Konzumiranje jake infuzije u frekvenciji od 200 ml (2 šolje) dnevno, može se smatrati značajnim za unos kalijuma sa doprinosom od 11 % dnevnom referentnom unosu. Sadržaj kofeina u slaboj i jakoj infuziji ukazuje na generalno visok dnevni unos glavnih biološki aktivnih ne-nutritivnih sastojaka crne kafe među srpskim stanovništvom. Dobijene analitičke vrednosti za crnu kafu koja se najviše konzumira u Srbiji (pržena, mlevena kafa i infuzije, slaba i jaka), unete su u SBPSN, što uključuje mogućnost razmene kroz EuroFIR FoodEXplorer, meta-pretraživač, koji omogućava istovremeno pretraživanje 27 nacionalnih baza podataka namirnica, povezanih sa EuroFIR-om, kao pomoć u definisanju nutritivnih preporuka i uspostavljanju zdravstvene politike na nacionalnom nivou.

Dobijeni rezultati optimizacije procesa ekstrakcije polifenola iz taloga otpadne kafe (espresso i crne) pokazali su da talog sadrži značajnu količinu polifenolnih jedinjenja sa visokom antioksidativnim kapacitetom. Ekstrakcija pomoću mikrotalasa zajedno sa metodom odzivnih površina su se pokazali efikasnim u proceni tri nezavisno promenljive (vreme ekstrakcije, odnos rastvarač – čvrsta faza i snaga mikrotalasa) na ekstrakciju polifenola iz otpadne kafe. Na sadržaj polifenola značajno utiču svi procesni parametri, a najveći prinos se postiže kombinacijom kraćeg vremena (od 40 s do 110 s) i odnosa tečno/čvrsto od 6-9 ml/g i 9-12 ml/g (espresso i crna kafa, respektivno), uz snagu mikrotalasnog zagrevanja oko 240 W. Predložen je model za ciklično ponovno iskorišćenje

otpadne espresso kafe kao značajan doprinos definisanju otpadne kafe kao novog, jeftinog prirodnog izvora antioksidanasa i zamene za sintetičke antioksidanse.

Dobijeni rezultati ispitivanja antitrombocitnog delovanja polifenola kafe u proceni optimizacije ekstrakcije biološki aktivnih komponenti, potvrđuju činjenicu da bioaktivne komponente kafe imaju potencijal da povoljno deluju na funkciju trombocita. Dodatno, izraženije delovanje ekstrakta taloga otpadne kafe, u odnosu na odgovarajuće napitke, ukazuje na povoljniji profil bioaktivnih komponenata ili odsustvo komponenata sa protrombocitnim delovanjem i time racionalizuje njihovu primenu kao funkcionalnih sastojaka.

Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u značajnom doprinosu održivosti sistema prerađivanja i potrošnje kafe koji može biti znatno poboljšan korišćenjem otpadne espresso i crne kafe, usvajanjem novih tehnologija koje maksimiziraju profitabilnost procesa. Takođe, pružena je racionalna osnova za primenu ekstrakata otpadne espresso i crne kafe kao funkcionalnih sastojaka hrane u promociji zdravlja. Analize i rezultati dobijeni u ovoj studiji mogu biti pouzdane smernice za buduću eksploataciju otpadne kafe kao dragocenog izvora prirodnog antioksidanasa u industrijskim razmerama.

Ključne reči: otpadna kafa, antioksidansi, ekstrakcija pomoću mikrotalasa, metodologija odzivne površine, polifenoli, baza podataka o sastavu namirnica, aktivacija trombocita

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 66.094.3.097.8:663.938:611.018.3

COFFEE AND SPENT COFFEE EXTRACTS ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND INFLUENCE ON BLOOD PLATELETS ACTIVATION

Summary

Coffee, as one of the most popular and consumed beverage today, is one of the world most traded commodity. As a result of processing and coffee preparation, a huge amount of solid residue known as spent coffee grounds is produced. Although it is shown that spent coffee is very rich with bioactive components with potential interest for industry, describing waste is still not in use as a potential source of bioactive components with outstanding anti-oxidative potential, with the aim of producing of fortifying food or dietary supplements. Waste emerged by coffee production is also a huge ecological problem.

Considering the above, the subject matter within this doctoral thesis is the implementation of detailed investigations of possible re-use of polyphenols from coffee waste, which plays an important role in the antioxidant activity of coffee, with consideration of all the aspects indicate the importance, effectiveness and potential health effects.

Bearing in mind that coffee drinking is an unavoidable everyday ritual of the Serbian people and perceiving potential utilization of coffee waste, the objective of this work was divided into three parts. In the first part, the average nutritive content of the most consumed coffee in Serbia is examined in order to provide reliable analytical data for inclusion in the Serbian food composition database (SFCDB), harmonized with the European Food Information Resource Network (EuroFIR) standards. Based on obtained results of black coffee infusion composition (minerals, macronutrients, caffeine, chlorogenic acids and fatty acids), the nutritional significance of black coffee consumption in Serbian population is given. In the second part, an optimal range of extraction conditions for polyphenols, as functional components, extraction from spent coffee (black and espresso) is defined, along with their anti-oxidative activity. Potential utilisation of spent coffee bioactive components is examined by employing microwave assisted extraction, by using ethanol solution as a solvent.

The extraction process optimisation is monitored by implementing Design Expert 8 software and the correlation between antioxidant activities and polyphenol content was studied by employing DPPH and FRAP assays, based on free radical scavenging capacities of obtained extracts. In the third part, effect of coffee and spent coffee extracts on platelet function is examined, and also potential of present polyphenols to inhibit aggregation between platelets and monocytes and neutrophils, in order to provide rationale for further use of spent coffee for producing of functional food ingredients in health promotion and disease prevention.

The macronutrient content of black coffee is in accordance with data from other FCDBs and determines low-energy value and modest contribution to the dietary intake of macronutrients. Consumption of a strong infusion in frequency of 200 ml (2 cups) per day could be considered significant in potassium with the contribution to Daily Reference Intakes of 11 %. The content of caffeine in weak and strong infusions indicates generally high daily consumption of major biologically active non-nutrient compounds of black coffee among the Serbian population.

Provided analytical data for black coffee, the most consumed brands in Serbia (roasted grounded coffee, weak and strong infusion) are included in the Serbian FCDB, which allow simultaneous access and interchange through 27 national FCDBs connected with EuroFIR, as a contribution to adequate nutritional recommendation and health policies at the national level.

The obtained results for the optimisation of polyphenol extraction from spent coffee grounds (espresso and black) have been shown that great amount of polyphenol compounds with high anti-oxidative properties are present in the coffee grounds. Microwave assisted extraction along with response surface method proved to be effective in estimating the effects of three independent variables (extraction time, liquid-to-solid ratio, and microwave power) on the polyphenols extraction from spent coffee. All process parameters have significant influence to extraction of polyphenols, and the results suggest that shorter extraction time (from 40 – 110 s), liquid-to-solid ratio from 6 to 9 ml/g and from 9 to 12 ml/g (espresso and black coffee, respectively), with the use of 240 W microwave power results in the highest content of polyphenols. The model for cyclic reuse of espresso coffee

waste is proposed as a contribution to coffee waste definition as a new and low-cost source of natural antioxidant and substitution for synthetic ones.

The obtained results for antiplatelet influence of coffee polyphenols, in estimation of biologically active components extraction optimisation, confirm the fact that bioactive components of coffee have beneficial effect on platelet function. In addition, the more prominent effect of spent coffee extracts, comparing to correspondent infusion, indicates a more favourable profile of bioactive compounds or absence of components with pro-platelet activity and thereby rationalize their use as functional ingredients.

The scientific contribution of this thesis is reflected in a significant contribution to the sustainability of processing and consumption of coffee that can be considerably improved by using waste espresso and black coffee, by the implementation of new technologies that maximize the profitability of the process. It also provided a rational basis for the use of extracts of waste espresso and black coffee as functional food ingredients for health promotion. Analysis of the results obtained in this study could be a reliable guidance for future exploitation of coffee waste as a valuable source of natural antioxidants on an industrial scale.

Keywords: spent coffee grounds, antioxidants, microvave assisted extraction, response surface method, polyphenols, food composition database, platelets activation

Scientific area: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDK number: 66.094.3.097.8:663.938:611.018.3

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DEO.....	4
2.1	Istorija kafe	4
2.2	Uzgoj kafe	5
2.3	Botanički opis.....	8
2.4	Proces industrijske prerade kafe – od plantaže do potrošača	10
2.5	Pečenje kafe - uticaj na fizičko-hemijske promene u zrnu kafe	12
2.6	Proizvodnja kafe u svetu.....	15
2.7	Potrošnja kafe u svetu	16
2.8	Kafa, sastojci kafe i efekti na zdravlje- pregled literature	17
2.8.1	Kofein	19
2.8.2	Hlorogenska kiselina	20
2.8.3	Masne kiseline	21
2.8.4	Minerali	22
2.9	Potrošnja kafe u Srbiji.....	23
2.9.1	Srpska baza podataka o sastavu namirnica – podaci o kafi	23
2.10	Biološka aktivnost sastojaka kafe.....	25
2.10.1	Antioksidativna aktivnost i slobodni radikali.....	25
2.10.1.1	Mehanizam štetnog dejstva slobodnih radikala	25
2.10.1.2	Prirodni antioksidansi u hrani.....	27
2.10.1.3	Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti.....	29
2.10.1.4	Polifenoli kao antioksidansi.....	31
2.10.1.5	Baze podataka sa dosadašnjim literaturnim podacima o sadržaju polifenola i ostalih bioaktivnih komponenata u hrani	32

2.10.2	Antioksidativna aktivnost kafe.....	35
2.10.2.1	Antioksidativna aktivnost otpadne kafe.....	36
2.10.3	Ekstrakcija polifenola.....	38
2.10.3.1	Ekstrakcija pomoću mikrotalasa - MAE.....	40
2.10.4	Primena eksperimentalnih modela u optimizaciji procesa ekstrakcije polifenola.....	41
2.10.4.1	Metoda odzivnih površina.....	41
2.11	Primena bioloških metoda za ispitivanje funkcionalnih svojstava polifenola.....	44
2.11.1	Aktivacija / agregacija trombocita.....	44
2.11.1.1	Protočna citometrija u ispitivanja funkcije trombocita.....	46
2.11.2	Uticao polifenola na funkciju trombocita.....	48
2.11.3	Uticao kafe na funkciju trombocita.....	49
3	CILJ RADA.....	51
4	EKSPERIMENTALNI DEO.....	52
4.1	Nutritivni sastav crne kafe u Srbiji: Dopuna podataka u Srpskoj bazi podataka o sastavu namirnica.....	52
4.1.1	Procena konzumiranja kafe u Srbiji (vrsta i trgovačka marka).....	52
4.1.2	Metodologija pripreme uzoraka kafe za određivanje prosečnog nutritivnog sastava.....	53
4.1.3	Priprema uzorka.....	54
4.1.4	Hemikalije i reagensi.....	54
4.1.5	Analitički metod.....	55
4.1.5.1	Makronutrijenti (proteini, ukupni lipidi, ugljeni hidrati, vlakna, voda i pepeo).....	56
4.1.5.2	Određivanje kofeina i hlorogenske kiseline.....	57

4.1.5.3	Određivanje masnih kiselina.....	57
4.1.5.4	Određivanje minerala	58
4.2	Optimizacija procesa mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne kafe (espresso i crna kafa).....	60
4.2.1	Uzorci	60
4.2.2	Pripremanje uzoraka otpadne espresso i crne kafe.....	60
4.2.3	Hemikalije i reagensi.....	61
4.2.4	Eksperimentalni dizajn optimizacije mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz taloga otpadne espresso i crne kafe	61
4.2.5	Analiza odgovora (TOK espresso i crne kafe)	66
4.2.5.1	Ukupni prinos ekstrakcije (PE).....	66
4.2.5.2	Sadržaj ukupnih polifenola (UP).....	66
4.2.5.3	Antioksidativna sposobnost DPPH• eseja.....	67
4.2.5.4	FRAP metoda	67
4.3	Ispitivanje uticaja napitaka i ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima <i>in vitro</i>	69
4.3.1	Priprema napitaka i ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe	69
4.3.2	Uzorkovanje krvi.....	69
4.3.3	Određivanje parametara aktivacije trombocita.....	70
4.3.4	Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima	73
5	REZULTATI I DISKUSIJA.....	76
5.1	Nutritivni i nenutritivni sastav crne kafe koja se najviše konzumira u Srbiji – podaci za unos u Srpsku bazu podataka namirnica	76
5.1.1	Kontrola i obezbeđenje kvaliteta analitičkih podataka	76
5.1.2	Procena vrsta kafe koja se najviše konzumira u Srbiji.....	78

5.1.3	Ispitivanje tržišta kafe u Srbiji.....	79
5.1.4	Hemijski sastav crne kafe	80
5.1.4.1	Makronutrijenti (proteini, ukupni lipidi, ugljeni hidrati, vlakna, voda, pepeo)	80
5.1.4.2	Kofein i hlorogenska kiselina.....	82
5.1.4.3	Masne kiseline	83
5.1.4.4	Minerali	86
5.2	Mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz taloga otpadne espresso kafe	88
5.2.1	Određivanje ukupnog prinosa ekstrakcije otpadne espresso kafe	88
5.2.2	Određivanje sadržaja ukupnih polifenola otpadne espresso kafe.....	93
5.2.3	Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga espresso kafe određena metodom inhibicije DPPH radikala	98
5.2.4	Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga espresso kafe određena FRAP metodom	104
5.3	Mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz taloga otpadne crne kafe	111
5.3.1	Određivanje ukupnog prinosa ekstrakcijetaloga crne kafe	111
5.3.2	Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu otpadne crne kafe	115
5.3.3	Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga crne kafe određena metodom inhibicije DPPH radikala.....	121
5.3.4	Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga crne kafe određena FRAP metodom	128
5.4	Uticaj napitaka i ekstrakata taloga otpadne espresso i crne kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima u <i>in vitro</i> eksperimentalnim uslovima	137
5.4.1	Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u uzorcima napitaka i ekstrakata taloga otpadne espresso i crne kafe	137

5.4.2	Uticaj napitaka crne i espresso kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima.....	138
5.4.3	Uticaj ekstrakata taloga otpadne espresso i crne kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima u <i>in vitro</i> eksperimentalnim uslovima	141
6	ZAKLJUČAK.....	144
6.1	Nutritivni sastav crne kafe u Srbiji - Srpska baza podataka o sastavu namirnica	144
6.2	Optimizacija procesa ekstrakcije jedinjenja polifenola iz taloga otpadne espresso i crne kafe.....	145
6.2.1	Espresso kafa.....	146
6.2.2	Crna kafa	147
6.3	Uticaj kafe i otpadne kafe na funkciju trombocita	147
7	LITERATURA.....	149
	PRILOG 1: Spisak skraćenica korišćenih u disertaciji	174
	PRILOG 2: Standardne krive.....	177
	PRILOG 3: Izgled Srpske baze podataka o sastavu namirnica – podaci za crnu kafu	182
	PRILOG 4: JOŠ NEKOLIKO REČI O KAFI	183
	Zanimljivosti o kafi	183
	Rekli su o kafi... ..	184
	Tradicionalna upotreba u medicini.....	185
	BIOGRAFIJA AUTORA.....	186
	IZJAVA O AUTORSTVU	190
	IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE	
	VERZIJE DOKTORSKOG RADA	191
	IZJAVA O KORIŠĆENJU	192

1 UVOD

Kafa, popularni napitak, drugi po količini potrošnje posle vode i jedan od prehrambenih proizvoda kojim se najviše trguje u svetu (Ludwig i sar., 2014), veoma je važna stavka u životu milijardama ljudi.

Pripremana kao crna, filter, espresso, instant, irska ili kapučino, dobija se od biljaka roda *Coffea*, iz obitelji *Rubicaceae*. Uglavnom se koriste zrna *Coffea arabica* (Typica i Bourbon) i *Coffea canephora* (Robusta); Arabika je poznata kao brazilska kafa, dok se Robusta uglavnom uzgaja u Africi. Kafa je složena hemijska mešavina koja sadrži stotine različitih supstanci, uključujući ugljene hidrate, lipide, jedinjenja azota, vitamina, minerala, alkaloida i fenolnih komponenti (Clarke i Vitzthum, 2001).

Danas se industrija kafe po profitu nalazi na drugom mestu, odmah posle naftne industrije. Postoji preko 25 miliona porodičnih plantaža u preko 80 zemalja širom sveta. Procenjuje se da je broj zasađenih stabljika kafe negde oko 15 milijardi, a da se dnevno popije oko 2.25 milijardi šolja kafe (Statista, 2014).

Iako je pokazano da je otpad od pripremanja kafe jako bogat komponentama od interesa za industriju kao što su ugljeni hidrati, proteini i fenolna jedinjenja (Mussatto i sar., 2011a), pomenuti otpad se još uvek ne koristi kao sirovi material za druge procese. Espresso kafa je koncentrisani napitak od kafe koja se priprema na način propuštanja vodene pare. U našim krajevima, područje Balkana, kao i u zemljama severne Afrike, Kavkaza, u Turskoj i zemljama Bliskog Istoka, još uvek je popularno pripremanje crne kafe (nazvana još i turska, srpska, grčka ili domaća). U oba slučaja, kao rezultat pripreme, ogromne količine otpadne kafe se generišu kao čvrsti ostatak tokom procesuiranja kafe vrelom vodom ili parom.

Polazeći od pretpostavke da bi do sada nedovoljno iskorišćeni otpad, nastao prilikom pripreme napitaka espresso i crne kafe, mogao biti potencijalni izvor bioaktivnih



komponenti, predmet ispitivanja u okviru ove doktorske teze je sprovođenje detaljnih ispitivanja mogućeg ponovnog iskorišćenja polifenola iz otpadne kafe uz sagledavanje svih aspekata koji ukazuju na značaj, ekonomičnost i potencijalne zdravstvene efekte.

Često se kritike epidemioloških studija koje se bave proučavanjem kafe odnose na preuveličavanje negativnog uticaja konzumiranja kafe na zdravlje ljudi usled neadekvatnog uzimanja u obzir dodatnih faktora rizika. Dosadašnje dovodjenje u vezu povećanog konzumiranja kafe isključivo sa nezdravim navikama kao što su cigarete i fizička neaktivnost, polako potiskuju najnovija istraživanja koja povezuju konzumiranje kafe sa mogućnošću smanjenja rizika od određenog broja hroničnih bolesti.

Procena značaja konzumiranja kafe u prevenciji bolesti i promociji zdravlja zasniva se na sadržaju nutritivnih i nenutritivnih sastojaka. U tom smislu, u okviru ove disertacije sprovedena je detaljna analiza sastojaka crne kafe (pržene mlevene kafe i infuzija kafe - slabe i jake), kao najviše konzumirane vrste kafe u Srbiji, zasnovana na međunarodno prihvaćenim kriterijumima kvaliteta. Dobijeni rezultati uneti su u Srpsku bazu podataka o sastavu namirnica. Primenjena metodologija koje se odnosi na način uzorkovanja, kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastojaka crne kafe i unošenje u bazu podataka, uključujući parametre kvaliteta, u saglasnosti je sa kriterijumima EuroFIR-a (eng: European Food Information Resource project) (EuroFIR, 2014), definisanim tehničkim aneksom, kao i važećim preporukama i standardima u oblasti analitike sastava namirnica (AOAC). Na taj način je omogućena razmena kroz EuroFIR FoodEXplorer (FoodEXplorer, 2013) meta-pretraživač, koji omogućava istovremeno pretraživanje 27 nacionalnih baza podataka namirnica, povezanih sa EuroFIR-om, kao pomoć u definisanju nutritivnih preporuka i uspostavljanju zdravstvene politike na nacionalnom nivou.

Potencijal iskorišćenja bioaktivnih komponenti ostataka iz konzumiranja kafe (espresso i crne) je ispitan korišćenjem ekstrakcije pomoću mikrotalasa, primenom etanolnog rastvora kao rastvarača. Optimizacija procesa ekstrakcije je vršena primenom statističkih modela definisanih softverom Design Expert, (8.0), a procena antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata urađena je na osnovu praćenja sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, metodom DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) i redukcije Fe³⁺ do Fe²⁺, FRAP metodom (eng: Ferric ion reducing antioxidant power).

Kao rezultat, predložen je model za ciklično, ponovno iskorišćenje otpadne espresso kafe kao značajan doprinos definisanju otpadne kafe kao novog, jeftinog, prirodnog izvora antioksidanasa i zamene za sintetičke antioksidanse.

U cilju doprinosa racionalnoj osnovi za dalju primenu ekstrakata dobijenih iz otpadne espresso i crne kafe, kao funkcionalnih sastojaka hrane u promociji zdravlja, urađeno je ispitivanje uticaja napitaka i ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima *in vitro*. Kao markeri aktivacije trombocita određivani su površinski antigeni P-selektin i GPIIb-IIIa, nakon *in vitro* delovanja adenozin difosfata (ADP), kao agoniste aktivacije trombocita. Agregati trombocita sa monocitima, u ukupnoj populaciji monocita i agregati trombocita sa neutrofilima, u ukupnoj populaciji neutrofila određivani su u bazalnim uslovima i nakon *in vitro* delovanja istog agonista.

2 TEORIJSKI DEO

2.1 Istorija kafe

Prapostojbina kafe nalazila se u Africi, a u Evropu i svet je krenula preko Arabije. Neki podaci govore da je kafa poreklom iz današnje jugozapadne etiopske provincije Kaffe, koja se nalazi jugozapadno od Adis Abebe. Odatle potiče legenda o čuvaru koza koji se zvao Kaldi, koji je primetio da kada koze jedu bobice i lišće sa jednog žbuna, postanu neobično razigrane i vesele. Znatiželja ga je naterala da i on proba ove bobice, posle čega se osećao mnogo veselije i živahnije. Priča o bobicama koje daju energiju se pročula kroz ceo region (Bond, 2012).



Tako su i monasi počeli da ih jedu, pošto su im se svidele počeli su da ih transportuju i u druge manastire. Da se ne bi pokvarile u transportu, monasi su ih sušili. Prvi napitak je napravljen kada su ih potopili u vodu, da bi povratili vlagu. Pravo uzgajanje kafe počinje tek u sedamnaestom veku. Kafa je prvi put ispečena, na otvorenoj vatri, u Turskoj. Prvi put stiže u Evropu 1615. godine, preko venecijanskih trgovaca. Lokali u kojima se služila samo kafa postali su mesta gde su se okupljali intelektualci i umetnici. Mnogi poznati evropski umovi su pili kafu da bi izoštrili svoje misli.

Jedan francuski kapetan je 1700. godine doneo kafu u Novi Svet, tačnije na Karipsko ostrvo Martinik. Odavde je biljka kafe našla put i u ostale tropske regione Južne i Centralne Amerike. Prototip espresso mašine napravljen je u Francuskoj 1822. godine, ali su je italijani usavršili i prvi počeli da proizvode. Tako se Italija i danas smatra pravim domom espresso kafe.

2.2 Uzgoj kafe

Kafa (*Coffea*) je rod niskih biljka (drvo ili grm) iz porodice broćeva (*Rubiaceae*) (slika 2.1). U rod kafe spada veliki broj raznih vrsta i podvrsta biljaka različitog sastava ploda. Biljke mogu da žive do 25 godina i rastu do visine od 6-15 metara. Kultivirana stabljika kafe je visoka 2 do 5 metara, a savijanjem i obrezivanjem mladog stabla proizvođači kafe nastoje ograničiti visinu stabla na 3 metra iz praktičnog razloga, radi lakše berbe. Klima u tropskim zemljama koje se nalaze u širem ekvatorijalnom pojasu pogoduje uzgoju stabljike kafe. Toplota i vlaga su glavni faktori u uzgoju stabla kafe. Spoljne temperature između 12° i 27°C, kao i velike količine kiše najviše pogoduju dobrom rodu kafe (Ukers, 1935).



Slika 2.1. Izgled biljke i ploda kafe

Klimatske promene, vrsta i sastav tla na kojem se biljka uzgaja, broj sunčanih dana, količina padavina i vlaga kao i nadmorska visina utiču na stabljiku i plod kafe. Zbog velikog broja vrsta i podvrsta postoje i razlike u listovima i cvetovima kafinog stabla. Listovi su zelene boje a oblik im je više ovalan, sa talasastim ivicama i rastu jedan nasuprot drugog sa

kratkim peteljnkama. Cvetovi su mali, beli, rastu u grozdovima duž grane i mirisni su. U početku procesa sazrevanja ploda, plod je zelene boje, menjajući boju u žutu da bi u fazi sazrevanja i ubiranja ploda dobili tamno crvenu boju. Unutar čvrstog omotača ploda nalaze se dva semena koja su svojim ravnim stranama okrenuta jedno prema drugom nalikujući tako na plod oraaha. Boja zrna varira od zelene do smeđe. Hemijski sastojci koji se nalaze u sirovoj kafi broje se na stotine što opet zavisi od vrste i podvrste kafe. Iz velikog broja vrsta i podvrsta kafe izdvajaju se dve vrste koje zajedno čine više od 90 % ukupne proizvodnje u svetu, kafa arabika i robusta. Od ostalih sorti kafe poznatije su još: liberica, excelsa, stenophylla, arabusta (kafa nastala ukrštanjem arabike i robuste). Na slici 2.2 su prikazane arabika i robusta vrsta kafe (Enciclopedia Britannica, 2014).



Slika 2.2. Izgled arabika i robusta zrna kafe

Arabika je veoma kvalitetna kafa, dobrih osobina. Na nju otpada 75-80 % ukupne svetske proizvodnje. Proizvodi se na terenima od 600 do 2000 m nadmorske visine. U prirodi rađa na drvetu koje može da poraste i do 6 metara, ali se stablo kafe na plantažama, radi lakšeg branja, skraćuje na visinu do 3 metra. Cveti posle 3 godine od trenutka sadnje, a naredne godine daje prvu berbu. Punu rodnost dostiže tek u šestoj godini. Sa jednog drveta se dobija od 1-3 kg kafe, a glavna berba u Brazilu je od maja do avgusta. Kod nas, kao i u svetu, najpoznatije vrste arabike su "minas" i "santos", što su imena izvedena iz oblasti Brazila u kojima se one uzgajaju. Pored ovih postoji i veliki broj drugih vrsta – "sigri" sa Nove Gvineje, potomak "plave planine" sa Jamajke; "maragogip" iz Meksika sa najvećim zrnima i najmanjim sadržajem kofeina; blaga "kostarika"; "moka harar" iz Etiopije sa

ukusom koji podseća na čokoladu; "AA džambo" iz Kenije je najbolja afrička arabika (Coffeeresearch, 2014).

Robusta kafa se gaji u tropskim predelima Afrike, Indije, Indonezije i Vijetnama i to na nižim terenima (do 600 m.n.v.). Ona je dominantna na afričkom kontinentu jer se lakše uzgaja, brže sazreva i otporna je na bolesti i štetočine. Na robustu u svakoj proizvodnji otpada 20-25 % i ona je znatno jeftinija. Razlikuje se od arabike po krupnoći i izgledu zrna koja su svetlo braon boje, okruglasta i nepravilnog oblika. U poređenju sa arabikom je sitnija i lošijeg izgleda jer se priprema po suvom postupku bez pranja i mehanički se odvaja od ljuske. Sadrži više otpadnih primesa i crnih zrna. Napitak od čiste robuste nije zadovoljavajućeg ukusa i ne može da se koristi za pripremu napitka kafe. Robusta je opora, gorka i nema izraženu aromu, pa se koristi u mešavinama jer svojim ekstraktom i visokim procentom kofeina (2.3-3.5 %) napitku daje bogat ukus. Robusta se koristi za spravljanje mešavina kafe sa arabikom, ali je njeno učešće manje. Ona napitku daje punoću, dok aroma crne kafe potiče od arabike. Velike količine robuste koriste se u proizvodnji ekstrakta kafe. Najveći proizvođači i izvoznici robuste su: Vijetnam, Indonezija, Uganda, Indija i Obala Slonovače (National Coffee Association USA, 2015).

2.3 Botanički opis

Sve biljke kafe su klasifikovane u velikoj porodici *Rubiaceae*.

carstvo: *Plantae*

razdeo: *Magnoliophyta*

klasa: *Magnoliopsida*

red: *Gentianales*

porodica: *Rubiaceae*

rod: *Coffea*



Slika 2.3. *Coffea arabica*

vrste: *Coffea arabica*–arabika, *Coffea benghalensis*–Bengalska kafa, *Coffea canephora*–robusta, *Coffea congensis*–kongoanska kafa, *Coffea excels*–liberijska kafa, *Coffea gallienii* – kafa sa kofeinom, *Coffea bonnierii*–kafa bez kofeina, *Coffea mogenetii*– kafa bez kofeina, *Coffea liberica*– kafa iz Liberije, *Coffea stenophylla* – kafa iz Sijera Leone.

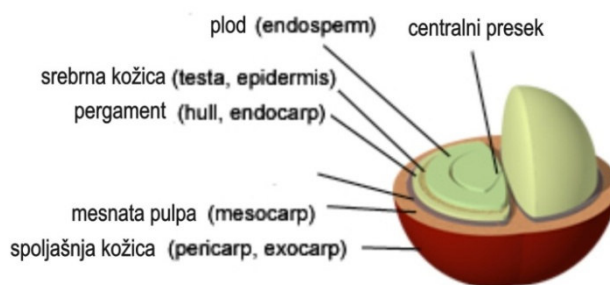
List se razvija od stabljike u parovima. Veličina zrelog lista npr. liberika kafe je oko 15-30 cm x 5-15 cm, sa 7-10 vena. Leđna površina je glatka i sjajna. Zreo list robusta kafe je slične veličine, osim što ima 8-13 vena, dok je dorzalna površina sjajna i talasasta. Drvo počinje cvetanje u uzrastu od 18-36 meseci. Bobice kafe su zelene kada su nezrele i prelaze u žuto i crveno, po sazrevanju. Obično, svaki plod sadrži dva kotiledona. Zrelost biljke se dostiže oko 8-13 meseci za liberika kafu i 9-10 meseci za robusta kafu. Plodovi su okrugli, 0.8-1.5 cm, (robusta) i 2-2.5 cm (liberika), bobice veličine 0.7-0.9cm, (robusta) i 1.3-1.5 cm (liberika) (Van Wyk & Wink, 2011).

Cvetovi kafe su sitni, beli (slika 2.4.), sa karakterističnim mirisom, koji podseća na kombinaciju jasminovog i narandžinog cveta. Cvetovi se razvijaju iz pazuha lista i rastu u grozdovima duž grane. U jednoj sezoni može biti nekoliko useva, u zavisnosti od uslova toplote i vlage koji preovlađuju.



Slika 2.4. Izgled cveta i ploda kafe

Različiti cvetovi su klasifikovani kao glavni i mali cvetovi. U polu-suvim oblastima na velikoj nadmorskoj visini, kao i u Kostariki ili Gvatemali, je jedno cvetanje u toku sezone, oko marta. U nižim krajevima sa višegodišnjim kišama, cvetanje i sazrevanje plodova traje praktično cele godine; zreli plodovi, zeleni plodovi, otvoreni cvetovi, a i cvetni pupoljci mogu se naći u isto vreme na istoj grani, ali ne međusobno pomešane, već u određenom redosledu.



Slika 2.5. Presek zrna kafe

Zrno kafe je deo semena ploda drveta kafe. Na početku sazrevanja ploda, plod je zelene boje, koja prelazi u žutu i na kraju u tamno crvenu. U toj fazi se plod bere. Generalno, seme se sastoji iz dve polovine (iako može da sadrži čak tri dela), svaki sa jednom ravnom i jednom zaobljenom stranom (Ukers, 1922), kao što je prikazano na slici 2.5. Ponekad, plod može sadržati jedno zaobljeno zrno koje podseća na grašak (poznato kao Peaberry, ili Caracoli). Zrno kafe je obloženo tankom kožicom. Samo zrno je često zelenkaste boje pre obrade i pečenja.

2.4 Proces industrijske prerade kafe - od plantaže do potrošača

Plodovi kafe sazrevaju u različitom periodu – isto drvo kafe, ili čak grana, mogu u isto vreme nositi nezrele (zelene), zrele (crvene) ili prezrele (crveno-crne) plodove. Najbolji način da se osigura vrhunski kvalitet berbe je ručno branje plodova, jedan po jedan, birajući samo zrele, crvene plodove. Mehaničko branje, gde se grane grabuljaju sa fleksibilnim, široko nazubljenim češljem finansijski je prihvatljivije, ali kvalitet nije tako dobar. Najlošiji metod branja je metod svlačenja, koji znači branje svega što je na grani jednim potezom: zrelih crvenih plodova, zelenih i žutih nezrelih, prezrelih crnih. Lišće i razne nečistoće takođe idu zajedno sa ubranim plodovima. Ovakva berba može uticati na stvaranje loše arome kafe koja tek kasnije, prilikom pripremanja, dolazi do izražaja (Asiedu, 1991).

Bez obzira na metode žetve, zelena i prezrela zrna kafe neizbežno budu pomešana sa savršeno zrelih plodovima i moraju biti odvojeni tokom prerade kafe. Prezrela zrna kafe, nerazvijena zrna, štapići i lišće plutaju u vodi. Zrela i zelena zrna kafe su veće gustine i tonu. Dakle, prvi korak u proizvodnji kafe se sastoji u odvajanju zrna koja plutaju i koja tonu. Kafa koja pluta se obično šalje direktno na sušenje i često je predviđena za ličnu upotrebu.

Za dalju pripremu zrna se obično koristi suvi ili mokri metod. Suvi metod je najtradicionalni način pripreme zrna kafe i sastoji se u razastiranju plodova preko širokog prostora za sušenje koje je potpuno izloženo suncu. Plodovi kafe se redovno grabuljanjem okreću dok se pulpa ne osuši. Neke plantaže su počele da koriste mašine sa toplim vazduhom za sušenje ploda.

Kod mokrog metoda, neposredno posle berbe zreli plodovi se sipaju u mašine za pasiranje koje istiskuju zrna iz ploda, i odvajaju meso pulpe (slika 2.6.) Prvim pranjem u uskim kanalima sa vodom odvajaju se zdrava, jedra/gusta zrna od laganih. Klizava ljepljiva sluz koja prekriva pergament omotač zrna se fermentišeu velikim cementnim tankovima, tokom čega se otpušta poseban miris koji se naziva kafena pulpa. Zrna se zatim ponovo



peru u dosta vode da bi se odstranili ostaci pulpe i drugih nečistoća, a zatim se suše na suncu, ili, češće, u sušačima sa toplim vazduhom. Na slici 2.6. su prikazane pojedine faze idustrijskog procesa obrade kafe (Coffeeresearch, 2014).



Slika 2.6. Odvajanje zrelih od nezrelih zrna kafe i pranje

Kafa se pakuje u vreće i transportuje do potrošačkih zemalja. Po prijemu u određena skladišta, mešaju se sa semenima drugog porekla i peku sa ciljem da se dobije karakterističan ukus i boja koja asocira na kafu (Buffo i Freire, 2004).

2.5 Pečenje kafe - uticaj na fizičko-hemijske promene u zrnu kafe

Proces pečenja kafe (Jansen, 2006) možemo podeliti u tri faze i to su:

1. Inicijalna faza toplotne obrade;
2. Prava faza toplotne obrade;
3. Završna faza toplotne obrade.



1. Početna faza pečenja zrna kafe je endotermna i u ovoj fazi se smanjuje vlažnost zrna, tj. ovo je faza sušenja. Menjaju se miris i boja sirovog zrna; boja se menja od zelene do žućkaste. Prava faza toplotne obrade (pečenja) kafe predstavlja kritični nivo u proizvodnji, zelena zrna se izlažu toploti sa sobne temperature do 220 °C ili više, zrno ekspandira i kompletno mu se menja složena hemija arome.



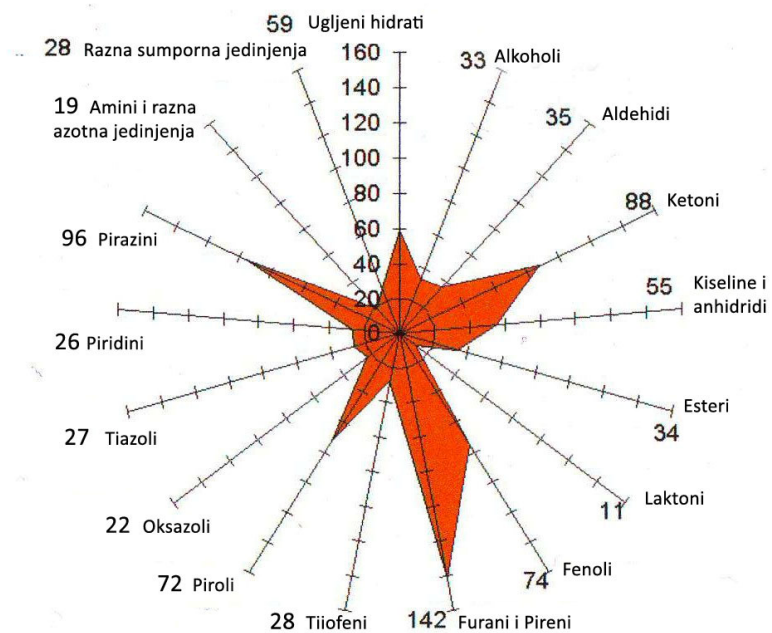
Slika 2.7. Promena boje prilikom prženja kafe

2. U drugoj fazi dolazi do kompleksnih pirolitičkih promena. Hemijska struktura zrna se drastično menja, dolazi do otpuštanja velike količine ugljen-dioksida i

nekoliko stotina supstanci koje se udružuju u jedinstvenu aromu kafe (Buffo i Freire, 2004). Zrno menja boju u tamno braon (slika 2.7). Stepem prženja se može pratiti preko boje zrna, gubitka mase, ukusa i arome ili preko hemijskih promena pojedinih komponenti.

3. Završna faza brzog hlađenja služi da se zaustave egzotermne reakcije koje se dešavaju tokom pečenja. Za ovu fazu se koriste vazduh ili voda kao rashladni agensi. Izlazeći iz pržionika, uzorci se hlade komprimovanim vazduhom koji prekida pirolitičke reakcije. Za hlađenje se koriste vazduh ili voda. Pečeni uzorci se pakuju pod vakuumom u ambalažu od PE ili PS i aluminijuma, da bi se izbegli gubici arome i kontaminacija iz spoljašnje sredine. Nakon toga idu na skladištenje do upotrebe.

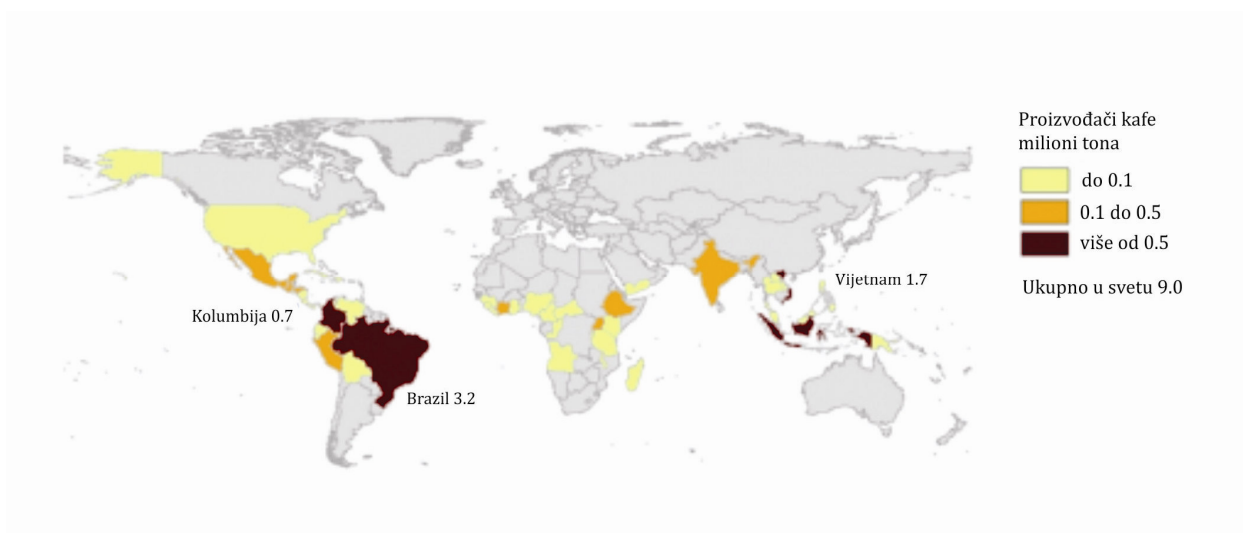
Karakteristične osobine napitka kafe, kao što su ukus i aroma, se razvijaju tokom prženja, kada zrna kafe doživljavaju niz reakcija koje izazivaju izmene u njihovom hemijskom sastavu. Na primer, polisaharidi se degradiraju tokom prženja na ugljene hidrate niske molekularne mase. Stepem pečenja, koji ima uticaj na gore pomenute karakteristike, reflektuje se i na spoljnu boju zrna (od svetlo do tamno braon zbog pirolize organskih jedinjenja). Jedinjenja izgrađena tokom prženja su takođe odgovorna za mnoge pozitivne biološke aktivnosti kafe. Međutim, kancerogena jedinjenja, kao što su policiklični aromatični ugljovodonici, mogu takođe biti formirani nepotpunim sagorevanjem organske materije u toku pečenja. Srećom, oni su prisutni u napitku kafe u zanemarljivim količinama. Formiranje akrilamida je takođe potvrđeno tokom prženja kafe, naročito tokom prvih minuta procesa prženja. Skladištenje u ambijentalnim uslovima smanjuje sadržaj akrilamida u prženoj kafi. Pržena kafa se sastoji od ugljenih hidrata (38-42% suva osnova), melanoidina (23%), lipida (11-17%), belančevina (10%), minerala (4,5-4,7%), hlorogenske kiseline (2,7-3,1%), alifatičnih kiselina (2,4-2,5%), kofeina (1,3-2,4%), itd. Od oko 850 isparljivih jedinjenja identifikovanih do sada u prženoj kafi (slika 2.8.) samo oko 40 doprinese aromi (Jansen, 2006).



Slika 2.8. Identifikovane komponente u prženoj kafi

2.6 Proizvodnja kafe u svetu

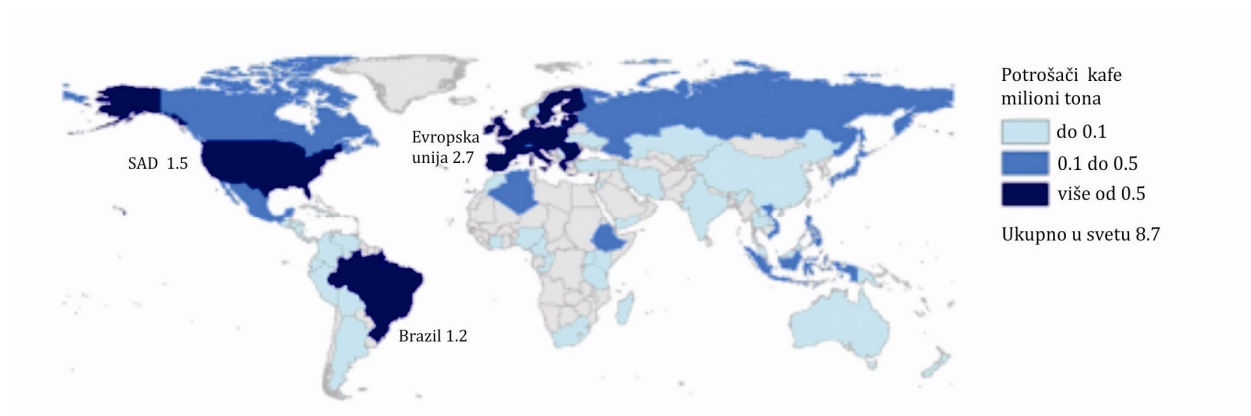
Kafa u zrnu je jedan od prehrambenih proizvoda kojim se najviše trguje u svetu. Po podacima USDA FAS (eng: United States Department of Agriculture, Foreign Agriculture Service), (USDA FAS, 2014), Brazil je 2013. - 2014. godine bio svetski lider u proizvodnji zelene kafe, sa 3.2 miliona tona, zatim slede Vijetnam i Kolumbija. Arabica kafe se gaje u Latinskoj Americi, Istočnoj Africi, Arabiji, ili Aziji. Robusta kafe se gaje u zapadnoj i centralnoj Africi, celoj jugoistočnoj Aziji, i u izvesnoj meri u Brazilu. Na slici 2.9. je prikazana prosečna proizvodnja kafe u svetu u 2013. - 2014. godini.



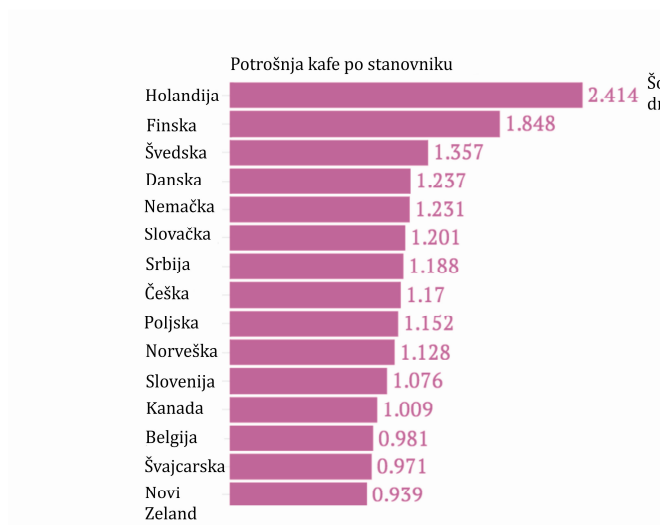
Slika 2.9. Proizvodnja kafe u svetu 2013. – 2014. godine

2.7 Potrošnja kafe u svetu

Po podacima USDA FAS za 2013. - 2014. godinu (USDA FAS, 2014), najveći konzumenti kafe su zemlje Evropske unije, zatim slede SAD i Brazil. Na slici 2.10. je prikazana prosečna potrošnja kafe u milionima tona na godišnjem nivou.



Slika 2.10. Potrošnja kafe u svetu 2013. – 2014. godine (USDA FAS, 2014)



Slika 2.11. Potrošnja kafe po stanovniku u svetu (u šoljama kafe dnevno)

Po podacima Euromonitor International (2009), svetskog lidera u ispitivanju tržišta potrošača, najveći konzumenti kafe su stanovnici Skandinavije. Na slici 2.11. je prikazano prvih 15 zemalja po konzumiranju kafe, izraženo u šoljama kafe dnevno po

stanovniku (podaci za 2009. godinu). Srbija se nalazi na visokom sedmom mestu sa prosečnih 1.2 šolje kafe dnevno po stanovniku.

2.8 Kafa, sastojci kafe i efekti na zdravlje- pregled literature



Brojne meta-analize izvedene su do danas sa ciljem da rezimiraju dokaze iz objavljenih studija koje se odnose na vezu konzumiranja kafe i zdravstvenih rizika, sa posebnim fokusom na hronične neinflamatorne bolesti, uglavnom rak i kardiovaskularne bolesti (KVB) (eng: cardiovascular diseases - CVD), kao glavno opterećenje zdravlja ljudi u svetu. Najnovije meta-analize, analitičkog metoda koji kombinuje i sintetizuje različite međusobno nezavisne studije i integriše njihove rezultate (Ilić, 2009) pokazale su zaštitne efekte konzumiranja kafe na rizik od raka dojke kod žena u postmenopauzi (Jiang i sar., 2013), kao i na slučajeve raka jednjaka (Zheng i sar., 2013). Na osnovu meta-analize sprovedenih prospektivnih studija objavljenih od strane Jiang i sar., (2014), kafa i unos kofeina može značajno smanjiti rizik od dijabetesa tipa 2. Rad O'Keefe i sar., (2013) takođe ukazuje na to da potrošnja kafe može da smanji rizik od dijabetes melitusa tip 2, hipertenzije i drugih uslova povezanih sa KVB kao što su gojaznost i depresija, ali može nepovoljno uticati na profil lipida, u zavisnosti od toga kako je pripremljen napitak. Polazeći od pretpostavke da smanjenje rizika od dijabetes melitusa tipa 2 redovnim konzumiranjem kafe može biti povezano sa prisustvom minerala, fitohemikalija i antioksidanasa u kafi, Pereira i sar., (2006) su ispitivali dejstvo kafe sa i bez kofeina u prospektivnoj studiji koja je obuhvatala 28812 žena u postmenopauzi, bez dijabetesa i kardiovaskularnih oboljenja, na osnovu upitnika o učestalosti konzumiranja namirnica. Rezultat ove studije ukazuje na smanjenje rizika od dijabetes melitusa tipa 2, naročito pri konzumiranju kafe bez kofeina. Takođe, u revijalnom radu Muley i sar., (2012) na osnovu meta analize došlo se do zaključka da je uobičajeno konzumiranje kafe povezano sa smanjenim rizikom od diabetes tipa 2, i to da su osobe koji piju 6-7 šoljica dnevno imale manji rizik od osoba koje piju 4-6 šoljica. Rezultati rada Cheng i sar., (2011), ukazuju na to

da se pozitivni efekti potrošnje kafena dijabetes melitusa tip 2, mogu objasniti delimično zbog sposobnosti glavnih komponenti kafe i metabolita da spreče toksičnu agregaciju amiloidnih polipeptida ostrvaca (eng: islet amyloid polypeptide - IAPP). Za ovaj regulatorni peptid se pretpostavlja da funkcije ostvaruje lokalno, u samim ostrvcima, ali i na nivou udaljenih ciljnih mesta dejstva. Lokalni efekti podrazumevaju inhibiciju sekrecije glukagona i insulina. U mozgu takođe postoje vezna mesta gde verovatno doprinosi regulaciji osećaja sitosti i inhibira pražnjenje želuca. Amilin je otkriven na osnovu sposobnosti agregacije u amiloidnim depozitima pankreasnih ostrvaca, što se posebno povezuje sa dijabetesom tip 2 kod ljudi i dijabetesom kod još nekih sisara, pre svih majmuna i mačaka. Agregirani (nagomilani) amilin ima citotoksične karakteristike i veruje se da ima kritičan značaj u gubitku β ćelija kod obolelih od dijabetesa tipa 2 (Westermarck i sar., 2011).

Potrošnja kafe se takođe povezuje sa smanjenjem rizika od degenerativnih i progresivnih bolesti kao što su Alchajmerova (Hu i sar., 2013) i Parkinsonova bolest (Noyce i sar., 2012; Higdon & Frei, 2006; Wirdefeldt i sar., 2011). Dnevni unos od 2-3 šoljice kafe može da poboljša kognitivno funkcionisanje, osećaj senzacije, kao i varenje prema radu Butt i Sultana (2011). Potencijalni pozitivni uticaj na zdravlje, ukus i doprinos unosu hranljivih materija u ishrani, snažno zavise od hemijskog sastava kafe i načina pripreme (O'Keefe i sar., 2013).

Studije su pokazale da redovno konzumiranje kafe smanjuje za 80 % rizik obolevanja od ciroze jetre (Andersen i sar., 2006). Crippa i sar. (2014) su se u svom radu bavili odnosom konzumiranja kafe i smrtnosti svih uzroka, KVB i kancera, na osnovu meta analize dosadašnjih radova na tu temu, a u odnosu na količinu dnevno popijene kafe. Rezultati analize pokazuju da je konzumiranje kafe obrnuto srazmerno sa svim uzrocima uključujući KVB i kancer.

Podaci o zdravstvenim efektima pojedinih lipida prisutnih u kafi nisu konzistentni. Iako diterpeni pokazuju brojne korisne efekte, uključujući hemopreventivni, antitumorogeni, hepatoprotektivni, antioksidativni i anti-inflamatorni efekat (Shen i sar., 2010), pokazano je da su kafestol i kaveol, diterpen-alkoholi nađeni u lipidnoj frakciji kafe, odgovorni za zabeleženi hiperholesterolemijski efekat i modulaciju enzima jetre (Ricketts i sar., 2007). Zanimljivo je da sadržaj pomenutih alkohola jako zavisi od sastava mešavine

kafe kao i od načina pripremanja (Urgert i sar., 1995). Uopšteno posmatrano, možemo reći da ukus i sastav infuzija kafe kao i nutritivni unos, a samim tim potencijalni efekat na zdravlje, veoma zavisi od hemijskog sastava smeše kafa (uglavnom odnosa arabika/robusta) i korišćenog metoda pripreme napitka (Niseteo i sar., 2012).

Butt i Sultan u svom revijalnom radu na temu "Kafa i konzumiranje: benefit i rizici" iz 2011. godine ističu da, bez obzira na sve veći broj dokaza o pozitivnom uticaju na zdravlje, debata među istraživačima da li je kafa korisna ili donekle problematična za ljudsko zdravlje, još uvek traje.

2.8.1 Kofein

Kofein (1,3,7-trimetilksantin), alkaloid derivat ksantina, sa svojim psihotropnim efektima (psihotropna supstanca - svaka hemijska supstanca koja menja funkciju mozga rezultirajući promenom u percepciji, raspoloženju ili svesti), smatra se za najizrazitije fiziološki aktivno jedinjenje prisutno u kafi (Ioannidis i sar., 2014). Potencijalni rizici konzumiranja kafe, uključujući anksioznost, nesanicu i lupanje srca, kao i gubitak koštane mase i eventualno povećan rizik od preloma, su uglavnom vezani za visok procenat kofeina u kafi (O'Keefe i sar., 2013). Kofein je zastupljen u kafi do oko 2.2 % suve materije, npr. kod robusta kafe. Prema podacima iznesenim u radu Hečimović i sar. (2011) sadržaj kofeina u blago pečenoj kafi se kreće od 0.66–2.55 % za kafe Minas, Cioccolato (*Coffea arabica*) i Cherry (*Coffea robusta*) sa najvećim procentom kofeina od 2.55 %. Procenat kofeina se smanjivao sa stepenom prženja kafe. Na osnovu USDA podataka, 1 šolja kafe, pripremljene od melevene crne kafe sa vodom iz česme, sadrži oko 75 mg kofeina (USDA, 2014). Kod kofeina je pokazana brza apsorpcija, metabolizacija i izlučivanje (Martínez-López i sar., 2014). S obzirom na relativno visoku količina kofeina u kafi, značajne količine njegovih metabolita se očekuju u krvi i mogli bi biti povezani sa fiziološkim efektima koji se odnose na konzumiranje kafe (Gomez-Ruiz, 2007).

Revijalni rad koji se odnosi na efekat kofeina na ljudsko zdravlje (Nawrot i sar., 2003) ukazuje na to da umeren unos kofeina, do 400 mg/dan (4 šolje/dan), nisu povezani sa neželjenim efektima po zdravlje kod odraslih osoba. Međutim, neke grupe, uključujući i

osobe sa hipertenzijom i starije, deca i adolescenti, mogu biti podložni negativnim efektima kofeina (Eilat-Adar i sar., 2013). Trenutno dostupni dokazi ukazuju na to da bi bilo dobro, za žene koje su trudne, u laktaciji, ili planiraju da zatrudne, da ograniče potrošnju kafe na 3 šolje/dan (300 mg/dan kofeina). Prema istim autorima, oralne doze od 5-50 g mogu dovesti do smrtnog ishoda kod odraslih, pri čemu je smrtna doza procenjena na 100 – 200 mg/kg telesne težine a uzimanje doze od 15–30 mg/kg može dovesti do ozbiljne toksikacije. Na osnovu sistematskog pretraživanja dosadašnjih radova na temu uticaja kofeina na zdravlje, autori Ali i sar. (2015) su zaključili da su najčešći neželjeni uticaji na kardiovaskularni i neurološki sistem.

Rezultati animalnih studija ukazuju da sposobnost kofeina da blokira adenozin A2A-receptore u mozgu može dati protektivni efekat. Adenozin je nukleozid koji ima važnu ulogu u biohemijskim procesima, poput transfera energije. On je takođe inhibitorni neurotransmiter, za koji se smatra da učestvuje u promovisanju sna i supresiji uzbuđenja (Koraćević i sar. 2003).

2.8.2 Hlorogenska kiselina

Povoljan efekat konzumiranja kafe se delimično pripisuje antioksidativnoj aktivnosti polifenola prisutnih u kafi (Vignoli i sar., 2011; Cammerer & Kroh, 2006). U zrnu kafe, najzastupljenija polifenolna jedinjenja su fenolne kiseline u esterifikovanoj formi.

Fenolne kiseline su sekundarni metaboliti rasprostranjeni isključivo u biljnom svetu. Hlorogenska kiselina, kao glavni polifenol prisutan u kafi je takođe jedan od najzastupljenijih polifenolnih jedinjenja u ljudskoj ishrani (Meng i sar., 2013). Prema istim autorima, na osnovu dosadašnjih istraživanja pokazano je da hlorogenska kiselina ispoljava mnoge biološke osobine, uključujući antibakterijsko, antioksidativno i antikarcinogeno dejstvo kao i hipoglikemički i hipolipidemijski efekat. Novije studije sugerišu da hlorogenska kiselina može biti korisna po vaskularno zdravlje (Buscemi i sar., 2009), dok unos od 400 mg hlorogenske kiseline može smanjiti sistolni i dijastolni krvni pritisak kod zdravih ljudi (Mubarak i sar., 2012). Mills i sar. (2013) su istraživali uticaj obrade na sadržaj hlorogenske kiseline u komercijalno dostupnim vrstama kafe. Njihovi rezultati

naglašavaju širok spektar količina hlorogenske kiseline u komercijalnoj kafi što ukazuje na to da je izbor kafe važan za optimalan unos hlorogenske kiseline. Pečenjem se uništava više od 70 % hlorogenske kiseline. Hlorogenske kiseline su poznate po svom doprinosu konačnoj kiselosti, oporosti i gorčini napitka (Farah i Donangelo, 2006). Studija Farah i sar., (2008) je pokazala da se hlorogenske kiseline, prisutne u zelenoj kafi, u velikoj meri apsorbuju i metabolišu kod ljudi.

2.8.3 Masne kiseline

Polinezasićene masne kiseline (PMK) su neophodne za normalno funkcionisanje organizma. Dve PMK familije, n-6 i n-3 masne kiseline se fiziološki i metabolički razlikuju. Udeo PMK u fosfolipidima seruma i eritrocita je važan pokazatelj zdravlja i bolesti, i zavisi između ostalog i od unosa hrane (Ristić-Medić, 2013a). Opservacione i interventne studije ukazuju da n-3 PMK imaju kardioprotektivni efekat, delujući anti-inflamatorno, anti-aritmogeno, hipolipidemično i antihipertenzivno. Nasuprot tome, smatra se da n-6 PMK imaju pro-inflamatorno dejstvo. Nizak nivo n-3 i povišen udeo n-6 PMK je pokazan kod pacijenata sa različitim tipovima maligniteta (Ristic-Medic, 2013b).

Sadržaj lipida u napicima od kafe zavisi od načina pripreme. Ratnayakei sar. (1993) su pokazali da filtrirana kafa sadrži manje od 7 mg lipida, a da za razliku od nje, kafa koja se priprema kuvanjem, bez filtriranja, kao i espresso kafa, sadrže čak 60-160 mg lipida u 150ml napitka. Dve najzastupljenije, arabika i robusta vrste kafe sadrže između 7 i 17% lipida (Speer&Kölling-Speer, 2006). Nefiltrirana kafa predstavlja značajan izvor kafestola i kahveola, diteperena za koje se smatra da imaju efekat na porast ukupnog serumskog LDL holesterola (eng: low density cholesterol) (Ludwig i sar., 2014).

Odnos vrsta kafa koje se koriste u mešavini i procenat masnoće u zrnu kafe može biti važan faktor koji utiče na sadržaj masnoće pržene mlevene kafe i samog napitka. Određivanje sadržaja masnih kiselina se takođe smatra i hemijskim deskriptorom za razlikovanje različitih vrsta kafe/mešavina, kao i njihov kvalitet (Martín i sar., 2001).

Preliminarni rezultati u ovoj studiji su pokazali povoljniji odnos masnih kiselina kod taloga espresso kafe, sa nižim sadržajem zasićenih masnih kiselina i višim odnosom mono i

polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na korespondentni napitak, što potvrđuje činjenicu da sadržaj lipida kafe zavisi od načina pripreme napitka (Ranic i sar., 2011). Takodje, ovaj podatak ide u prilog ispitivanju otpadne kafe kao potencijalnog izvora bioaktivnih komponenti koje pozitivno utiču na ljudsko zdravlje.

2.8.4 Minerali

Veći broj studija je do sada uradjeno sa ciljem određivanja mineralnog sastava u različitim mešavinama kafe, kao i u infuzijama kafe (Rajwanshi i sar., 1997; Suseela i sar.,2001; Vega-Carrillo i sar.,2002; Krejčová & Černožský, 2003; Santos i sar.,2004; Tagliaferro i sar.,2007; Ashu & Chandravanshi 2011; Oliveira i sar., 2012). Generalno, interes za elementarnu analizu kafe je porasla i usled opšteg trenda analiziranja sastava hrane (Stelmach i sar.,2013). Esencijalne hranljive materije, uključujući minerale, neophodne su ljudskom telu za održavanje normalnih fizioloških funkcija, dok pojedinačni minerali imaju različite uloge u metabolizmu. Iako minerali čine samo deo ukupne telesne težine, oni su od ključne važnosti za rast, obnavljanje tkiva i kostiju, sintezu vitamina, enzima i hormona, mnoge telesne funkcije, uključujući transport kiseonika, normalizaciju nervnog sistema, cirkulaciju krvi i ćelijski integritet, ukoliko su prisutni u telu u željenom nivou (McDowell, 2003).

Esencijalni minerali se obično svrstavaju u dve kategorije: makro (Ca, Mg, P, K, Na) i mikro ili elementi u tragovima (Fe, Mn, Cr), klasifikovani na osnovu relativne količine u ljudskom telu i dnevnim potrebama (više ili manje od 100 mg dnevno). Iako je sadržaj elemenata u kafi samo oko 5 %(m/m), pokazano je da može biti dobar pokazatelj autentičnosti kafe (Pohl i sar., 2013). Na osnovu mineralnog sastava, moguće je razlikovati pojedine vrste mlevene kafe od npr. instant kafe, što se odnosi i na njihove infuzije (Grembecka i sar., 2007). Oliveira i sar. (2012) su nedavno u svom radu prikazali sadržaj nekih minerala u različitim vrstama kafe, ne samo u kontekstu procene kvaliteta i vrste kafe, već pre u cilju procene unosa minerala putem konzumiranja kafe, da bi se istakao nutritivni značaj ovog napitka. Prema Neil i sar. (2012), bezalkoholna pića, uključujući kafu

i čaj, predstavljaju najveći izvor kalijuma (10.8 %) među odraslim stanovništvom (51 godina starosti i više).

2.9 Potrošnja kafe u Srbiji

U okviru projekata Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. 46013 i 41030, u saradnji Instituta za medicinska istraživanja i Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", u toku 2011. godine popunjavani su upitnici i davani podaci o zdravstvenom stanju, stilu života i navikama ishrane od strane 577 ispitanika uzrasta od 19 do 65 godina (134 muškarca i 430 žena). Na osnovu analize anketnih upitnika za ishranu dobijeni su sledeći rezultati za dnevnu količinu konzumiranja kafe, prikazani u tabeli 2.1 (bez obzira na vrstu):

Tabela 2.1. Prosečno konzumiranje kafe u Srbiji kod različitih polova

Br.šoljica kafe/dnevno	Muškarci (%)	Žene(%)
Ne pije	6.7	1.6
0-1	61	47.4
2-3	27	46.5
4-5	3	4.5
> 5	2.3	/

Dobijena relativno visoka dnevna konzumacija kafe, kao i nedostatak relevantnih analitičkih podataka o nutritivnom sastavu kafe koja se konzumira na srpskom tržištu, racionalizuje dalja istraživanja kao preduslov za sprovođenje dijetetskih studija o proceni efekata kafe na zdravlje ljudi.

2.9.1 Srpska baza podataka o sastavu namirnica – podaci o kafi

U regionu Balkana, uključujući Srbiju, predpostavlja se da se tradicionalna crna kafa konzumira češće u odnosu na druge vrste kafe. Crna kafa, koja se često naziva turska ili grčka, se uglavnom servira u kućnom ambijentu i kafeima, tzv. „kafanama“. Ova vrsta kafe

se odnosi na specifičan način pripreme kafe – samlevena kafa se kuva u posudi za kuvanje kafe (tzv. „džezvi“) i služi u šolji, pri čemu se pusti neko vreme da se kafa istaloži a konzumira se supernatant. Ovakav način pripreme kafe je tipičan na Bliskom istoku, zemljama Kavkaza, Severne Afrike, Balkana i istočne Evrope.

Do sada, postojeći podaci o sastavu crne kafe (mlevena i napitak) u Srpskoj bazi podataka o sastavu namirnica (SBPSN) (SRBFCDB, 2007) su pozajmljivani iz drugih baza podataka o sastavu namirnica (BPSN), uključujući podatke za pečenu mlevenu kafu iz slovačke (SFCDB, 2008) i italijanske BPSN (BDA, 2008) i za napitak crne kafe iz nemačke BPSN (BLS, 2004). Prva “online” srpska BPSN je kreirana od strane Instituta za medicinska istraživanja u okviru Centra izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma, harmonizovana sa standardima Evropske mreže za izvore informacija o hrani (eng: The European Food Information Resource Network project (2005-10; EuroFIR); Network of Excellence (NoE)) (Finglas i sar., 2010). Ovaj projekat Evropske komisije imao je za cilj razvoj platforme za baze podataka o sastavu namirnica uključujući i zemlje centralne i istočne Evrope. Jedan od ciljeva EuroFIR NoE projekta je bio da obezbedi način za prevazilaženje postojećih razlika medju zemljama članicama EuroFIR-a uz poštovanje dokumentovanja i razmene podataka o sastavu namirnica (Bell i sar., 2012). SBPSN je harmonizovana sa EuroFIR preporukama (Becker i sar., 2007, 2008) što dalje omogućava pretraživanje i razmenu podataka preko EuroFIR FoodEXplorer, meta-pretraživača koji omogućava simultanu online pretragu nacionalnih BPSN povezanih sa EuroFIR-om (Pakkala i sar., 2010). Dalji razvoj i ažuriranje SBPSN, je od suštinskog značaja za buduća istraživanja ishrane u Srbiji. Njena primena u projektima, istraživanju i praksi će olakšati unapređanje ishrane i kvaliteta hrane u Srbiji u cilju unapređenja zdravlja cele populacije.

2.10 Biološka aktivnost sastojaka kafe

2.10.1 Antioksidativna aktivnost i slobodni radikali

2.10.1.1 Mehanizam štetnog dejstva slobodnih radikala

Oksidacija kao proces transvera elektrona od jednog do drugog atoma i predstavlja suštinski deo aerobnog života i našeg metabolizma, s obzirom na to da je kiseonik krajnji akceptor elektrona u struji elektrona koja proizvodi energiju u formi adenzin trifosfata (ATP po lat. *Adenosinum triphosphatum*). ATP je nukleotid poznat u biohemiji kao „molekulska valuta“ za unutar ćelijski transfer energije; zapravo, ATP je u stanju da



uskladišti i transportuje energiju unutar ćelija. Problemi mogu nastati kada struja elektrona postane nesparena (prenos nesparenih pojedinačnih elektrona) koji generišu slobodne radikale (Gulcin, 2012).

Slobodni radikali, atomi, joni i molekuli koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, kada prestanu da kruže oko jezgra atoma, postaju prilično „agresivni“ i oštećuju sve na svom putu. Nastaju homolitičkim raskidanjem kovalentnih veza u organskim molekulima ili prenosom jednog elektrona na molekul (jon) (Halliwell, 1994).

Slobodni radikali mogu nastati:

- ◆ fotolizom,
- ◆ termolizom (sagorevanjem ili zagrevanjem),
- ◆ elektromagnetnom radijacijom (dejstvom X- ili γ - zračenja),
- ◆ hemijskim procesima (najčešće reakcijom kiseonika i slobodnih radikala).

Slobodnoradikalske reakcije su lančane i započinju ih inicijatori. Početni stadijum ovih reakcija je faza inicijacije u toku koje nastaje nova slobodnoradikalska vrsta. Sledeća faza je faza propagacije u toku koje slobodni radikali nastali u prvoj fazi reaguju sa novim molekulima gradeći nove slobodne radikale. Poslednja faza, tj. završetak ovih lančanih reakcija je faza terminacije, kada nastaju neaktivni, neradikalski proizvodi (Halliwell, 1994).

Primeri kiseoničnih slobodnih radikala, poznatih kao toksične kiseonične vrste (eng: reactive oxygen species - ROS), su superoksid anjon (O_2^-), hidroksil radikal, (HO), peroksil (ROO), alkoksil (RO) i azotmonoksidni radikal (NO). Hidroksil (polu-život 10-9s) i alkoskil (polu-život 1s) slobodni radikali su veoma reaktivni i brzo napadaju molekule u obližnjim ćelijama, tako da je izazvana šteta neizbežna. S druge strane, superoksid anjon, lipidni hidroperoksidi i azot oksid su manje reaktivni. Kao dodatak ROS radikalima, u živim organizmima postoje drugi ROS neradikali, kao što su singletni kiseonik ($1O_2$ – eksitirano stanje molekulskog kiseonika, O_2), vodonik peroksid (H_2O_2), i hipohlorna kiselina (HOCl). ROS se kontinuirano stvara normalnom telesnom upotrebom kiseonika, kao što je disanje i neke funkcije ćelijskog imuniteta. Dakle, ROS su ili radikali koji sadrže najmanje jedan nesporeni elektron ili reaktivna ne-radikalska jedinjenja, sposobna da oksidišu biomolekule. Ovi intermedijeri se takođe zovu oksidansi ili prooksidansi (Gulcin, 2012).

U normalnim uslovima, nastajanje slobodnih radikala je u ravnoteži sa endogenim antioksidativnim sistemom odbrane ćelije. Pri nekontrolisanom stvaranju slobodnih radikala, može se premašiti antioksidativni kapacitet ćelije i tada nastaje tzv. oksidativni stres. To je stanje u kome je ravnoteža između prooksidanasa i antioksidanasa u ćeliji, pomerena u pravcu prooksidanasa. Slobodni radikali „uzimajući“ elektrone od susednih molekula, oštećuju ćelije i tkiva i igraju ulogu u patogenezi neurodegenerativnih bolesti kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonovu bolest, Huntingtonova bolest, multipleks skleroza, autizam, kancer, srčana oboljenja, ateroskleroza, itd. Slobodni radikali dovode do oštećenja proteina, lipida, ugljenih hidrata i DNK (Udemi i Tchounwou, 2014).

2.10.1.2 Prirodni antioksidansi u hrani

Antioksidansi su supstance koje, u malim koncentracijama, usporavaju ili sprečavaju reakcije oksidacije kojima se stvaraju slobodni radikali i na taj način pomažu telu da se zaštiti od oštećenja izazvanih kiseoničnim (ROS), azotnim (RNS) i hlornim (RCS) reaktivnim česticama (Shahidi, 2000). Iako naše telo stvara mnogo antioksidanasa, to nije dovoljno da se ono izbori sa svim slobodnim radikalima kojima je izloženo tokom dana. Zbog toga je neophodno antioksidanse unositi i sa hranom (tzv. egzogeni antioksidansi). Antioksidansima su bogati: voće i povrće, žitarice, mahunarke, orasi (tabela 2.2). Lako ih je prepoznati, jer su antioksidansi najčešće pigmenti u hrani, koji joj daju boju.

Antioksidativna aktivnost hrane i pića je jedna od osobina koja privlači veliku pažnju naučne javnosti poslednjih decenija (Gulcin, 2012). Treba pomenuti da su prehrambeni proizvodi obično "pojačani" dodatnim količinama antioksidanasa, bilo prirodnim ili sintetičkim s obzirom da dolazi do gubitka prirodno prisutnih antioksidanasa u sirovoj hrani kada su izloženi preradi, zaštiti i čuvanju.

Tabela 2.2. Antioksidansi i namirnice u kojima se nalaze

Antioksidans	Hrana sa visokim sadržajem antioksidansa
Vitamin C	voće i povrće
Vitamin E (tokoferol)	ulje povrća
Polifenoli (flavonoidi, resveratrol)	kafa, čaj, soja, čokolada, origano, crveno vino, cimet, maslinovo ulje
Karotenoidi (likopen, karoteni)	voće i povrće

U najširoj upotrebi u industriji hrane su sintetski antioksidansi kao što su butilisani hidroksianizol (BHA), butilisani hidroksitoluen (BHT), propil galat (PG) i tercijarni butilhidrokinon (TBHQ).

Pokazalo se da su sintetski antioksidansi jeftiniji i efektivniji u procesu usporavanja oksidativne degradacije, u poredjenju sa prirodnim. Sintetski antioksidansi, uvedeni u opštu upotrebu pre nekoliko decenija su u najvećoj meri butilisani fenoli i polifenoli, kao što je BHT, efikasni antioksidans u širokoj upotrebi (Mukhopadhyay, 2006). Imajući u vidu zabrinutost za bezbednost u pogledu očuvanja zdravlja, porastao je interes za prirodne

antioksidanse (Shahidi, 2000), asintetski antioksidansi su postali predmet ponovne procene bezbednosti za upotrebu. Mnoge studije su do sada bile posvećene traženju odgovora na pitanje da li BHT poseduje mutageno/genotoksično dejstvo na ljude (Bomhardi sar., 1992). U svom radu Panicker i sar. (2014) su pokazali da upotreba BHT indukuje značajan hepatotoksičan efekat. U radu Pandey i sar. (2014) pokazano je da između ostalih konzervanasa koji su u opštoj upotrebi u industriji hrane, BHT pokazuje genotoksično dejstvo na hromosome u pouzdanim biljnim esejima. Nedavno je EFSA (eng: European Food Safety Authority) panel dao svoje naučno mišljenje o re-evaluaciji BHT-a kao dodatka hrani (EFSA, 2010). Uprkos kontradiktornim preporukama, BHT je i dalje u upotrebi za zaštitu namirnica, naročito u zemljama u razvoju, zahvaljujući povoljnoj ceni i raspoloživosti i još uvek je veoma popularan antioksidans koji ima više različitih upotreba. 80.000 – 100.000 tona godišnje se proizvodilo u USA, zapadnoj Evropi i Japanu (Mukhopadhyay, 2006). Detaljni pregled trenutne proizvodnje BHT u svetu, sa akcentom na Kinu, dat je u izveštaju koji obuhvata period 2009. - 2014. godine (Yang, 2014).

Prednost prirodnih antioksidanasa. u poređenju sa sintetskim, ogleda se u pogledu tolerancije, sigurnosti i ne-toksičnosti. Kao dodatna vrednost prirodnih antioksidanasa, pored pitanja sigurnosti, može se istaći da antioksidansi iz hrane mogu povećati izvor prirodnih antioksidansa u telu.

Jedinica ORAC (eng: Oxygen radical absorbance capacity) predstavlja metod za merenje antioksidativnog kapaciteta u biološkim uzorcima *in vitro*. Širok spektar hrane je testiran korišćenjem ovog metoda, pri čemu se određeni začini, jagodičasto voće i leguminoze visoko kotiraju (USDA, 2014). Ne postoji dovoljno fizioloških dokaza na osnovu *in vivo* eksperimenata o validnosti teorije slobodnih radikala. S obzirom na tu činjenicu, ORAC metod, nastao na osnovu *in vitro* eksperimenata, ne može se trenutno tumačiti kao relevantan u ljudskoj biologiji ili dijetama. Termin antioksidans se odnosi na mnoga ne-nutritivna jedinjenja u hrani, kao što su polifenoli, čija je antioksidativna kapacitivnost merena *in vitro* što predstavlja veštački indeks antioksidativne jačine - ORAC merilo. Za razliku od vitamina A, C i E, kao dijetetskih antioksidanasa – antioksidativna efikasnost mnogih jedinjenja iz hrane nije do sada dokazana *in vivo*. U odnosu na tu činjenicu regulatorne agencije kao što su FDA (eng: Food and Drug Administration of the United States) ili EFSA su publikovale smernice koje ne dozvoljavaju mogućnost da na

namirnicama stoje etikete sa tvrdnjom ili ukazom na antioksidativni efekat i potencijalni benefit za zdravlje proizvoda sa visokim ORAC, ukoliko za to ne postoje fiziološki dokazi (FDA, 2008; EFSA Panel, 2010, respektivno).

2.10.1.3 Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

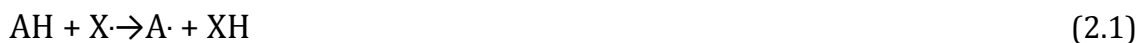
Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti se prema mehanizmu reakcije mogu podeliti na HAT (eng: hydrogen atom transfer) i SET (eng: single electron transfer) metode (Gulcin, 2012). Uopšteno, metode za određivanje antioksidativne kapacitvosti komponenata hrane koriste dva glavna mehanizma za deaktiviranje radikala: eseji zasnovani na SET reakcijama i eseji zasnovani na HAT metodi (Prior i sar., 2005). Krajnji rezultat je isti, bez obzira na mehanizam, ali se razlikuje kinetika i potencijal za bočne reakcije.

HAT metode mere sposobnost antioksidansa da ugasi slobodni radikal doniranjem vodonika. HAT reakcije se odigravaju u rastvaraču, nezavisne su od pH sredine i prilično se brzo odvijaju, obično se završavaju u nekoliko sekundi do minuta. Prisustvo redukcionih agenasa, uključujući metale, predstavlja komplikaciju kod HAT metoda i može dovesti do pogrešno uočene visoke reaktivnosti.

Metode koje se zasnivaju na HAT reakcijama uključuju sledeće metode:

- ◆ ORAC - Oxygen radical absorbance capacity
- ◆ TRAP - Total radical-trapping antioxidant parameter
- ◆ Inhibiciju indukovane LDL oksidacije
- ◆ TOSCA - Total oxyradical scavenging capacity assay
- ◆ Crocin – esej za izbeljivanje
- ◆ Hemiluminescenciju

SET metoda se zasniva na detekciji sposobnosti potencijalnog antioksidansa za prenos elektrona. U ovom slučaju dolazi do promene boje ukoliko dodje do redukcije oksidansa.



SET metode obuhvataju sledeće eseje:

- ◆ Određivanje ukupnih polifenola po Folin-Ciocalteu metodi
- ◆ TEAC- Trolox equivalence antioxidant capacity
- ◆ FRAP - Ferric ion reducing antioxidant power
- ◆ Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta korišćenjem Cu^{2+} kompleksa kao oksidanta
- ◆ DPPH \cdot - 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl „hvatač“ slobodnih radikala
- ◆ ABTS \cdot^+ - 2,2-Azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid esej za hvatanje slobodnih radikala
- ◆ DMPD \cdot^+ - N,N-dimethyl-p-phenylenediamine esej za hvatanje slobodnih radikala
- ◆ CUPRAC - Cupric ions (Cu^{2+}) reducing antioxidant power

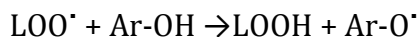
SET i HAT mehanizmi se skoro uvek dešavaju istovremeno u svim uzorcima, sa balansom reakcija određenim antioksidativnom strukturom i pH. SET metode detektuju sposobnost antioksidansa da prenese elektron redukujući bilo koje jedinjenje, uključujući metale, karbonilne grupe i radikale.



SET reakcije su zavisne od pH vrednosti. Uopšteno, jonizacioni potencijal reaktivne funkcionalne grupe opada sa porastom pH vrednosti. SET reakcije su obično spore i mogu zahtevati duže vreme da se dostigne završetak reakcije, tako da se izračunavanje antioksidativnog kapaciteta pre zasniva na procentu smanjenja kapaciteta nego na kinetici. SET metode su veoma osetljive na prisustvo askorbinske i urinske kiseline, pri čemu je primećeno da dolazi do redukcije polifenola (Noguer, 2014). Važno za ove metode je da tragovi komponenti i kontaminanata kao što su metali ometaju odvijanje SET reakcija što dovodi do visokog stepena varijabilnosti i loše reproduktivnosti rezultata.

2.10.1.4 Polifenoli kao antioksidansi

Glavni nosioci antioksidativne aktivnosti u hrani su jedinjenja koja pripadaju familiji polifenola. Polifenoli predstavljaju najmnogobrojniju grupu ne-nutritivnih dijetetskih jedinjenja, tzv. fitohemikalija. Polifenoli predstavljaju najveću grupu sekundarnih metabolita biljaka sa različitim strukturama i funkcijama, ali ono što je zajedničko za sve je jedan aromatičan prsten sa jednim ili više hidroksilnih supstituenata. Polifenoli obuhvataju različite podgrupe fenola i fenolnih kiselina, gde se ubrajaju: hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavonoidi, antocijanidini, proantocijanidini, izoflavoni. Antioksidativna aktivnost različitih polifenola varira, međutim, kao grupa oni imaju najveću sposobnost inhibicije oksidativnih procesa u organizmu (Scalbert, 2005). Oporog su ukusa, inhibiraju aktivnost pojedinih enzima i deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala, prema prikazanoj reakciji:



Namirnice bogate polifenolima su na primer, med, većina mahunarki, voće kao što su jabuke, kupine, borovnice, dinje, nar, trešnje, brusnice, grožđe, kruške, šljive, maline, ribizle, aronija i jagode; i povrće, kao što su brokoli, kupus, celer, crni luk i peršun zatim

crno vino, čokolada, beli čaj, zeleni čaj, maslinovo ulje, arganovo ulje, pčelinji polen, mnoge žitarice i začini (Manach, 2004).

Komparativna studija antioksidativne aktivnosti ekstrakata 30 biljaka od industrijskog interesa korišćenjem raznih metoda (DPPH, ABTS, FRAP, SOD, i ORAC) i sadržaja ukupnih polifenola (Dudonné i sar., 2009), pokazala je značajnu vezu između antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja polifenola. To ukazuje na činjenicu da upravo polifenoli najviše doprinose antioksidativnim osobinama ispitivanih biljaka.

Dokazi iz epidemioloških i interventnih studija čvrsto podržavaju stav da povećana potrošnja hrane bogate polifenolima smanjuje rizik od KVB (McCullough i sar., 2012; Cassidy i sar., 2013; Hooper i sar., 2008). Ovo se jednim delom objašnjava kao rezultat delovanja polifenola na trombocite, doprinoseći plejotropnim efektima (istovremeni uticaj na više fizioloških procesa), polifenola na kardiovaskularno zdravlje. Polifenole odlikuje karakteristična hemijska struktura osnovnog skeleta sa višestrukim hidroksilnim grupama. Prosečni unos od 1 g/dan doprinosi izvanrednom antioksidativnom potencijalu i smatra se najvažnijim izvorom dijetarnih antioksidanasa. Međutim, relevantnost antioksidativnog delovanja *in vivo* je pod znakom pitanja, zbog produženog metaboliziranja i slabe biodostupnosti (Hollman i sar., 2011). Nakon gutanja, izvorni molekuli (u glikoziliranom obliku) su podvrgnuti dejstvu digestivnih enzima u lumenu creva, enzimima ksenobiotičkog metabolizma u enterocitima, enzima jetre i enzimima mikrobiote (prirodne bakterijske mikroflore) debelog creva. Shodno tome, unošenje polifenola će dovesti do pojave raznih molekula u opticaju pri niskim nivoima, prateći kinetiku metaboličkih kaskada. Pojaviće se bezbroj polifenol-izvedenih molekula uključujući aglukone početnog jedinjenja, glukuronide, metil glukuronid sulfate i širok spektar malih molekula nastalih mikrobnom transformacijom.

2.10.1.5 Baze podataka sa dosadašnjim literaturnim podacima o sadržaju polifenola i ostalih bioaktivnih komponenata u hrani

Phenol-Explorer (www.phenol-explorer.eu/) je baza podataka koja se odnosi na polifenole, jedne od najvećih klasa fitohemikalija. Da bi se odredio unos polifenola kod

populacije i uticaj na zdravlje, važno je imati detaljne informacije o njihovom sastavu u hrani. Phenol-Explorer je prva sveobuhvatna internet baza podataka o sadržaju polifenola u hrani (Neveu i sar., 2010). "Web interfejs" omogućava različite upite na osnovu prikupljenih podataka u cilju identifikacije i poredjenja hrane koja sadrži određene količine polifenola. Za svaku srednju vrednost sadržaja, moguće je ispratiti originalne vrednosti sadržaja i njihove literaturne izvore. Ovakve baze podataka su od velike pomoći istraživačima u boljem razumevanju uloge fitohemikalija u tehničkom i nutritivnom kvalitetu hrane, kao i proizvođačima hrane da razviju nove vrste prilagodjene zdrave hrane. Na slici 2.11 je dat prikaz ekrana Phenol-Explorera koji sadrži podatke o polifenolima u filter kafi koji su na osnovu do sada objavljenih i kritički evaluiranih publikacija u međunarodnim časopisima, ušli u bazu podataka. Phenol-Explorer je nedavno proširena novim podacima koji se odnose na retenciju polifenola usled obrade hrane (Rothwell i sar., 2015).

		mean content	min	max	SD	n	N	number of references
Non-alcoholic beverages - Coffee beverage - Unknown Coffee beverages - Coffee beverage [Filter]								
Phenolic acids								
Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid	0.03 mg/100 ml	0.00	0.13	0.06	4	4	4
	3-Caffeoylquinic acid	51.80 mg/100 ml	40.00	63.60	16.69	2	2	2
	4-Caffeoylquinic acid	59.60 mg/100 ml	53.00	66.21	9.34	2	2	2
	5-Caffeoylquinic acid	70.03 mg/100 ml	47.89	96.00	25.76	4	4	4
	5-Feruloylquinic acid	11.69 mg/100 ml	11.69	11.69	0.00	1	1	1
	4-Feruloylquinic acid	8.57 mg/100 ml	8.57	8.57	0.00	1	1	1
	3-Feruloylquinic acid	4.17 mg/100 ml	4.17	4.17	0.00	1	1	1
	3,5-Dicaffeoylquinic acid	1.55 mg/100 ml	1.55	1.55	0.00	1	1	1
	3,4-Dicaffeoylquinic acid	2.66 mg/100 ml	2.66	2.66	0.00	1	1	1
	4,5-Dicaffeoylquinic acid	2.05 mg/100 ml	2.05	2.05	0.00	1	1	1
Other polyphenols								
Alkylmethoxyphenols	4-Vinylguaiaicol	0.46 mg/100 ml	0.46	0.46	0.00	1	1	1
	4-Ethylguaiaicol	0.64 mg/100 ml	0.64	0.64	0.00	1	1	1
Alkylphenols	3-Methylcatechol	0.10 mg/100 ml	0.08	0.11	0.02	3	3	1
	4-Methylcatechol	0.04 mg/100 ml	0.02	0.05	0.02	3	3	1
	4-Ethylcatechol	0.13 mg/100 ml	0.09	0.16	0.04	3	3	1
Methoxyphenols	Guaiaicol	0.16 mg/100 ml	0.16	0.16	0.00	1	1	1
Other polyphenols	Catechol	0.41 mg/100 ml	0.04	0.70	0.28	4	4	2
	Pyrogallol	0.54 mg/100 ml	0.39	0.78	0.21	3	3	1
	Phenol	0.12 mg/100 ml	0.12	0.12	0.00	1	1	1

Slika 2.11. Prikaz ekrana baze podataka Phenol-Explorer

(www.phenol-explorer.eu/)

U okviru FP6/7 projekta EuroFIR Evropske komisije, razvijena je EuroFIR eBASIS (eng: Bioactive Substances in Food Information Systems) baza podataka (Kiely i sar, 2010). eBASIS predstavlja jedinstvenu internet bazu podataka o sastavu i biološkim efektima

hrane koja se odnosi na bioaktivne komponente poreklom iz biljaka sa potencijalnim dobrobitima na zdravlje. Baza sadrži kritički ocenjene, objavljene podatke u publikacijama u međunarodnim naučnim časopisima. Na slici 2.12 je dat prikaz ekrana koji sadrži podatke o pojedinim, do sada analiziranim, komponentama kafe i upotrebljenim analitičkim metodama. EuroFIR eBASIS je u fazi ažuriranja (<http://ebasis.eurofir.org/>).

The screenshot displays the eBASIS web interface. The top section shows the 'Plant Details' for *Coffea arabica L.*, including its scientific name, family (Rubiaceae), and various characteristics like taste (bitter, aromatic) and use (roasted). Below this, there are sections for 'Plant Description', 'Plant Parts Used' (Seed or kernel), and 'National Names' (Arabsko kafe in Bulgaria). To the right, there are images of coffee beans and a 'General information' section.

The bottom section shows a search results table for 'Coffea' and 'Coffee'. The table lists various compounds and their average levels in coffee, along with detailed analytical methods for each.

Id	Plant	Compound	Average level	Analytical method
19830	Coffee	Coumestrol	<0.5	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
19839	Coffee	Coumestrol	<0.5	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
6470	Coffee	Daidzein	0.503	After addition of 4-methylumbelliferone as internal standard, homogenized food samples were extracted with 80% aqueous methanol and an aliquot of the extract was subjected to enzymatic hydrolysis using beta-glucosidase. Then, the aglycones were extracted with ether, transferred into mobile phase and analyzed by HPLC-MS (APCI negativ ionization mode, triple quad). Analyses were quantitated relative to the internal standard.
19832	Coffee	Daidzein	1	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
19842	Coffee	Daidzein	1	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
19831	Coffee	Fomononetin	2	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
19841	Coffee	Fomononetin	2	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
19833	Coffee	Genistein	1	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.
19843	Coffee	Genistein	1	Freeze-dried, dry or defatted foods were extracted (2x) with 70% MeOH at 60-70°C for 2h. One aliquot was analysed for lignan, another for isoflavone. Lignan: alkaline hydrolysis (1M NaOH, 3h RT), SPE, enzymatic hydrolysis (β-glucuronidase), SPE. Eluent was evaporated to dryness, dissolved in MeOH, stored at -20°C. Sample + internal standard were silylated for GC-MS analysis (selected ion monitoring mode). Isoflavone analysis: same procedure without alkaline hydrolysis.

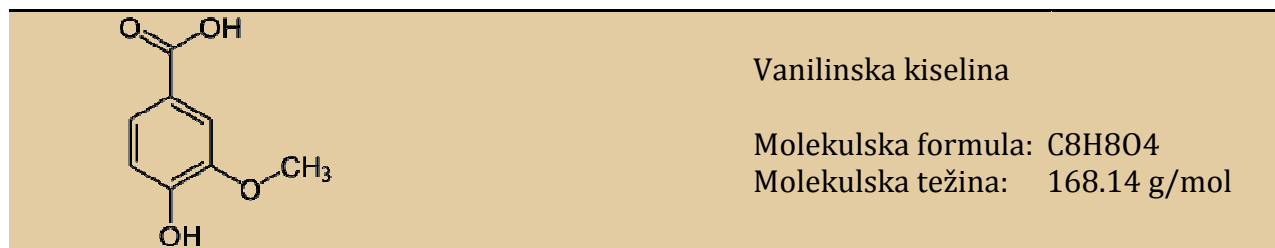
Slika 2.12. Prikazi ekrana baze podatakaEuroFIR eBASIS (www.ebasis.eurofir.org/)

2.10.2 Antioksidativna aktivnost kafe

Više do sada sprovedenih studija ukazuje da visok sadržaj polifenola igra važnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti kafe (Anissi i sar., 2014; Sánchez-González i sar., 2005; Charurin i sar., 2002; Richelle i sar., 2001). Među različitim fenolnim jedinjenjima prisutnim u kafi, najzastupljenije su hidrosicinamične kiseline koje su uglavnom u esterifikovanoj formi (Gomez-Ruiz, 2007). Najbolji primer je hlorogenska kiselina, prirodni antioksidans široko rasprostranjen u biljkama (Clifford, 1999). Prema radu Rodrigues i Bragagnolo (2013), konzumiranjem šolje kafe (50 ml) pržene mlevene kafe i kafe na rastvaranje unosi se 33 i 21 mg hlorogenske kiseline, respektivno. Na osnovu rezultata rada Stalmach i sar. (2014), jedna doza espresso kafe u komercijalnim lokalima obezbedjuje između 24 i 422 mg hlorogenske kiseline. Takođe, nekoliko slobodnih fenolnih kiselina je detektovano u kafi, kofeinska, ferulinska i vanilinska kiselina, mada u malim količinama. Strukturne formule najzastupljenih polifenolnih jedinjenja u kafi prikazane su u tabeli 3.2.

Tabela 2.3. Strukturne formule polifenolnih jedinjenja u kafi

	<p>Hlorogenska kiselina</p> <p>Molekulska formula: C₁₆H₁₈O₉</p> <p>Molekulska težina: 354.31 g/mol</p>
	<p>Kofeinska kiselina</p> <p>Molekulska formula: C₉H₈O₄</p> <p>Molekulska težina: 180.16 g/mol</p>
	<p>Ferulinska kiselina</p> <p>Molekulska formula: C₁₀H₁₀O₄</p> <p>Molekulska težina: 194.18 g/mol</p>



Različite studije su kao rezultat dale podatke o antioksidativnoj aktivnosti hlorogenske i kofeinske kiseline, uglavnom *in vitro* ispitivanjima, ali i kao rezultat *ex vivo* i *in vivo* ispitivanja. Podaci su objavljeni u pogledu antioksidativne aktivnosti metabolita hlorogenske kiseline, kao što su ferulinska, izoferulinska i vanilinska kiselina. Međutim, manja pažnja je bila posvećena potencijalnoj antioksidativnoj aktivnosti nekih drugih jedinjenja koja se takođe povezuju sa konzumiranjem kafe. Budući da se manje od jedne četvrtine od unete hlorogenske kiseline apsorbuje (Stalmach i sar., 2014), velika količina dolazi do debelog creva, gde se hidrolizuje mikroflorom do kofeinske i hininske kiseline. Ova jedinjenja se intenzivno metabolišu na niz proizvoda uključujući i m-kumarinsku, dehidroferulinsku, 3-hidroksifenilpropionsku kiselinu i hipurnu kiselinu. Pored polifenolnih kiselina, antioksidativnu aktivnost pokazuju i nefenolne komponente, kofein i trigonelin (López-Galilea i sar., 2008). Iako se u toku pečenja kafe sadržaj polifenola smanjuje, nastaju novi proizvodi, melanoidini, koji su proizvodi Majlardove (Maillard) reakcije, a nastaju od šećera i aminokiselina. Postoje dokazi da su blokovi hlorogenske, kofeinske i hininske kiseline inkorporirane u melanoidine, zajedno sa drugim jedinjenjima (Delgado-Andrade&Morales, 2005; Farah i Donangelo, 2006). Melanoidini su molekuli velike molekulske mase nepoznate strukture, s obzirom na kompleksnost molekula. Melanoidini takođe pokazuju značajne antioksidativne sposobnosti i sprečavaju oksidaciju lipida (López-Galilea i sar., 2008; Daglia i sar., 2004; R.C. Borrelli i sar., 2002; K. Yanagimoto i sar., 2004).

2.10.2.1 Antioksidativna aktivnost otpadne kafe

U industriji kafe, u toku procesa proizvodnje intant kafe i koncentrata kafe, nastaju ogromne količine čvrstog otpada, poznatog kao talog otpadne kafe (TOK). Istraživanja su

pokazala da je samo u Rimskom okrugu preko 10 000 t TOK-a raspoloživo godišnje za proizvodnju ekstrakta bogatog polifenolima i bioenergijom, što bi značilo potencijalnu proizvodnju od 1400 t/godišnje polifenolnog ekstrakta (Zuorro et al., 2012).

Što se tiče otpadne kafe, možemo razlikovati dva tipa otpada. Industrija instant kafe obuhvata skoro 50 % svetske proizvodnje kafe, sa proporcionalnom količinom otpadne kafe. Drugih 50 % se odnosi na otpad nastao od pripremanja i konzumiranja napitka. U zavisnosti od nameravane ponovne upotrebe otpada, otpadna kafa nastala prilikom pripreme espresso kafe poseduje veći potencijal od otpada nastalog u industrijskim uslovima prilikom proizvodnje instant kafe, kod koje je iscrpljen veći deo rastvorljivih komponenti (Cruz et al., 2012). Otpad koji se dobija prilikom proizvodnje konzumne kafe predstavlja ujedno i veliki ekološki problem. Mnogi su pokušaji korišćenja otpadne kafe do sada kao đubriva, hrane za životinje ili kao goriva (Saenger et al., 2001; Silva et al., 1998).

U svom radu Yen et al. (2005) su ispitivali antioksidativnu aktivnost otpadne kafe nastale prilikom pripreme pečene kafe i došli do zaključka da značajne količine antioksidanasa ostaju u otpadnoj kafi. U ovom eksperimentu, poredjenjem ekstrakcije sa četiri rastvarača (voda, metanol, etanol i n-heksan), pokazalo se da vodeni ekstrakt ostatka pečene kafe pokazuje veći prinos i daje bolju zaštitu od lipidne peroksidacije. Brojna istraživanja su do sada bila usmerena na mogućnosti iskorišćenja različitih tipova otpada iz proizvodnje i konzumiranja kafe (Adriana & Leandro, 2009), no, bez obzira na pozitivne pokazatelje sprovedenih istraživanja, tek u skorije vreme se ispituju mogućnosti dobijanja biološki aktivnih preparata na bazi ekstrakata iz otpadne kafe (Murthy i Naidu 2010, Mussatto et al., 2011a).

Bioaktivne komponente predstavljaju proizvode tzv. „dodate-vrednosti“, opravdavajući proces izolacije iz industrijskog otpada. Ovakav otpad može biti alternativni izvor za dobijanje prirodnih, koji se smatraju potpuno sigurnim u poredjenju sa sintetičkim antioksidansima. Kafa predstavlja jedno od najobilnije korišćenih pića širom sveta sa godišnjom proizvodnjom od preko 105 miliona tona (Murthy i Naidu 2010). Skladištenje otpada od zrna kafe koja su neodgovarajućeg kvaliteta za dalju preradu, kao i ostatak od pripremanja kafe, predstavlja odredjeni rizik za životnu sredinu, a sa druge strane, privlači pažnju kao potencijalni izvor bioaktivnih komponenata. Više dosadašnjih studija se bavilo otpadom koji nastaje u toku različitih stadijuma proizvodnje i prerade kafe (Yen et al., 2005;

Adams i Ghaly, 2007; Kondamudi i sar., 2008; Bravo i sar., 2012; Mussatto i sar., 2011b; Esquivel i sar., 2012; Zuorro & Lavecchia 2012; Cruz i sar., 2012). Medjutim, otpad nastao prilikom pripremanja i konzumiranja napitka kafe još uvek se ne koristi kao sirovi material za druge procese.

Takođe, novije studije nastavljaju da se bave različitim aspektima mogućeg TOK korištenja: ulje ekstrahovano iz TOK-a koristi se kao substrat za proizvodnju poli beta-hidroksibutirinske kiseline (Obruca i sar., 2014); polihidroksialkanoat se proizvodi iz ulja TOK-a dobijenog nadkritičnom ekstrakcijom (Cruz i sar., 2014); kao potencijalne sirovine za proizvodnju mananoligosaharida (Chiyanzu i sar., 2014); za ponovno iskorišćenje manana, biljnog polisaharida (Passos i sar., 2014), itd.

Bez obzira na primenjeni način pripreme kafe, u toku pripremanja napitka efikasnost ekstrakcije je svakako niža u poređenju sa industrijskim uslovima. Stoga, ostatak koji je bogat ne-ekstrahovanim komponentama u poređenju sa samim napitkom, otvara seriju mogućih primena. Ova činjenica vodi nas do pretpostavke da se otpadna kafa, koja se u tonama proizvodi u restoranima, kafeterijama i domaćinstvima, može smatrati značajnim izvorom prirodnih antioksidanata, takođe posmatrano sa ekonomske tačke gledišta (Bravo i sar., 2012). Adams i Ghaly (2006) u svom radu sugerišu alternativnu upotrebu nus-produkata industrije kafe, između ostalog u cilju maksimiziranja samoodrživosti industrije kafe, kroz identifikaciju novih mogućnosti kao i umanjenja troškova i potencijalnih rizika. Smanjenje otpada se takođe može postići pretvaranjem otpada u proizvode tzv. "dodate vrednosti" koji imaju određenu ekonomsku vrednost.

2.10.3 Ekstrakcija polifenola

Ekstrakcija predstavlja prvi i najvažniji korak u izolovanju polifenolnih jedinjenja iz TOK-a. Za ekstrakciju polifenola se koriste vodeni rastvori organskih rastvarača u različitim odnosima zbog velike polarnosti fenolnih kiselina. Različite tehnike su do sada primenjivane za ponovno izolovanje antioksidativnih polifenolnih komponenti iz prirodnih izvora, kao što su čvrsto-tečna ekstrakcija sa organskim rastvaračima, ekstrakcija pomoću ultrazvuka (eng: ultrasound-assisted extraction - UAE), ekstrakcija pomoću mikrotalasa

(eng: microwave-assisted extraction - MAE), nadkritična tečna ekstrakcija u procesima pod visokim pritiskom (Mussatto i sar., 2011a). Različite tehnike ekstrakcije imaju određena ograničenja u smislu vremena ekstrakcije, energije, količine rastvarača i cene, a takođe na njih utiče još nekoliko faktora, kao što su vrsta i koncentracija rastvarača, odnos rastvarač/čvrsta faza, pH, vreme, temperatura, itd. U poređenju sa TOK ekstraktima (ETOK) dobijenim kontinuiranom (Soxlet, 1h i 3h) i diskontinuiranim metodama (čvrsto-tečna ekstrakcija) (Bravo i sar., 2013), MAE se smatra povoljnijom alternativom konvencionalnoj ekstrakciji rastvaračima za izolovanje polifenola iz TOK-a (Upadhyay i sar., 2012).

Najveći prinosi se obično dobijaju korišćenjem rastvora metanola i etanola pri čemu je vodeni rastvor etanola posebno pogodan zbog niske toksičnosti, visokih prinosa i ekonomičnosti (Dai i sar., 2010).

Rastvorljivost polifenola zavisi od više faktora kao što su stepen polimerizacije, interakcija sa drugim komponentama i polarnost rastvarača (Mujica i sar., 2009). Polifenoli su često rastvorljiviji u rastvaračima koji su manje polarni od vode, pri čemu efikasnost ekstrakcije zavisi od selektivnosti rastvarača, temperature (Escribano-Bailon i Santos-Buelga 2003; Stalikas, 2007) kao i prirode materijala iz kojeg se izoluju polifenoli (Robbins, 2003). Pored toga, pH vrednost vode kao rastvarača može znatno uticati na ekstrakciju pojedinih polifenolnih komponenti (Escribano-Bailon i Santos-Buelga, 2003).

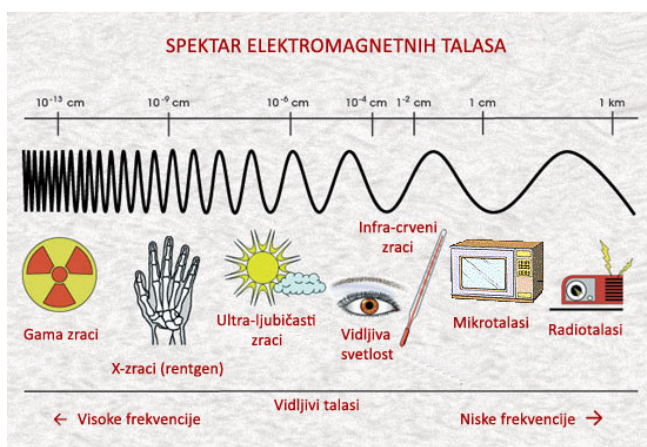
U radu Upadhyay i sar., (2012), vodeni ekstrakt kafe dobijen primenom mikrotalasnog tretmana (temperatura 50°C) sadrži najveći procenat ukupne suve materije kao i najveći udeo hlorogenske kiseline i kofeina u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom čistog metanola i etanola kao rastvarača. Iako voda kao rastvarač ima brojne prednosti u odnosu na organske rastvarače zbog svojih neškodljivih efekata i ekonomičnosti, vodeni ekstrakti, pored polifenola, obično sadrže veću količinu drugih, nepoželjnih komponenti (Mussatto i sar., 2011a). Razlog tome je manja selektivnost vode kao rastvarača u kojoj se, pored polifenolnih komponenti, rastvaraju i druge komponente otpadne kafe kao što su proteini i ugljeni hidrati (Mujica i sar., 2009). U radu Yen i saradnika (2005) ukupan prinos vodenog ekstrakta otpadne kafe je 4,7 puta veći u odnosu na etanolni ekstrakt. Međutim, u radu Milutinović i sar. (2013) je pokazano da sadržaj

polifenola u suvom ekstraktu nije proporcionalan prinosu i raste, u zavisnosti od vrste rastvarača, sledećim redosledom: voda < metanolni rastvor < etanolni rastvor.

2.10.3.1 Ekstrakcija pomoću mikrotalasa - MAE

Ekstrakcija pomoću mikrotalasa (eng: Microwave-assisted extraction – MAE) predstavlja relativno novu ekstrakcionu tehniku koja kombinuje mikrotalase i tradicionalnu ekstrakciju rastvaračima. Nekoliko studija je pokazalo da MAE ima puno prednosti nad ekstrakcijom rastvaračima, što uključuje kraće vreme, manju upotrebu rastvarača i povoljniji odnos rastvarač/čvrsta supstanca (Escribano-Bailon i Santos-Buelga, 2003). MAE je proces koji koristi energiju mikrotalasa, zajedno sa rastvaračem, u cilju ekstrakcije željene supstance iz matrice. Mikrotalasi su deo elektromagnetnog zračenja frekvencije oko 2450 MHz u frekvencijskom rasponu od 1 GHz do 300 GHz, što ih svrstava u familiju talasa kojima se prenose radio i televizijski signali. Preciznije, mikrotalasi su radio talasi frekvencije od 0,3 do 300GHz. Spektar elektromagnetnih talasa je prikazan na slici 2.13.

Mikrotalaska ekstrakcija predstavlja relativno novu tehniku tretiranja i procesiranja prehrambenih proizvoda (Blekić i sar., 2011). Najjednostavniji primer korišćenja mikrotalasa u prehrambenoj industriji je mikrotalaska rečna. Danas su mikrotalaska rečne sve češće sastavni deo kuhinjske opreme i korisna su dopuna pripremanju hrane na klasičan način.



Slika 2.13. Spektar elektromagnetnih talasa

Mikrotalasi se koriste u prehrambenoj industriji, ne samo za pečenje, zagrevanje, sušenje, odmrzavanje, blanširanje, dehidraciju, već i za druge operacije, kao što su pasterizacija i sterilizacija mnogih vrsta namirnica.

MAE se često primjenjuje za analizu tragova organskih jedinjenja kod čvrstih uzoraka. Takođe se primjenjuje za ekstrakciju prirodnih jedinjenja kao što su flavanoidi i kofein, kao i polifenolnih jedinjenja iz čaja i semenki grožđa. Mikrotalasnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom u kombinaciji ultrazvuka i mikrotalasa, moguće je dobiti slične udele ekstrahovanih supstanci kao i standardnim metodama, ali uz puno kraće vreme, što je energetski i ekonomski isplativo. Ova tehnika koristi energiju mikrotalasa da izazove kretanje molekula i rotaciju molekula tečnosti sa permanentnim dipolom dovodeći do veoma brzog zagrevanja rastvarača i uzorka. Mikrotalasna ekstrakcija se koristi za ekstrakciju nutraceutika iz više razloga, kao što su poboljšana efikasnost (Blekić i sar., 2011) i smanjeno vreme ekstrakcije u odnosu na konvencionalne načine ekstrakcije (Ballard i sar., 2010; Liazid i sar., 2011; Pérez-Serradilla i Luque de Castro, 2011), mala potrošnja rastvarača i visok stepen automatizma u poređenju sa konvencionalnim metodama. Međutim, potrebno je obratiti pažnju i na negativna dejstva primene mikrotalasa i ultrazvuka kao što je povišenje temperature, što može negativno uticati na bioaktivna jedinjenja i kvalitet ekstrahovanog materijala. Do sada, MAE je korišćena u radovima za ekstrakciju brojnih jedinjenja iz različitih matrica (Chen i Spiro, 1994; Young, 1995; Lopez-Avila i sar., 1996; Bureau i sar., 1996; Kwon i sar., 2003; Rostagno i sar., 2007; Zhanga i sar., 2008; 2012; Ballard i sar., 2009; Kim i sar., 2012; Li i sar., 2012; Li i sar., 2013; Singh i sar., 2011; Moreira i sar., 2012).

2.10.4 Primena eksperimentalnih modela u optimizaciji procesa ekstrakcije polifenola

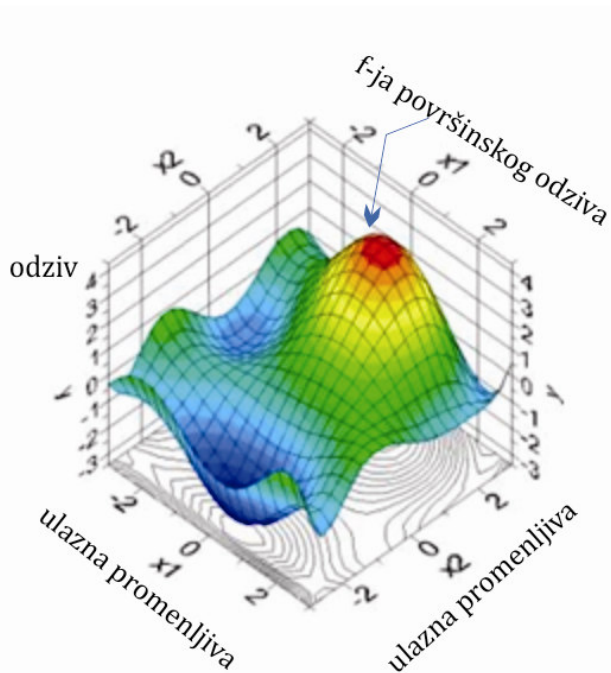
2.10.4.1 Metoda odzivnih površina

Kod klasičnog pristupa eksperimentalnim metodama, potrebno je izvesti više hiljada eksperimenata koje je teško analizirati, tako da se u praksi pribegavalo smanjenju broja

faktora koji se ispituju ili broja njihovog ponavljanja, što svakako ima za posledicu smanjenje pouzdanosti zaključaka (Lazid, 2004). Metodologija odzivne površine (eng: Response surface methodology - RSM) je skup matematičkih i statističkih tehnika značajnih za modelovanje i analizu problema u kojima je traženi rezultat – odziv, pod uticajem nekoliko promenljivih, a cilj je optimizacija tog odziva (Myers i Montgomery, 2002).

Ukratko, ova metoda se može definisati kao empirijska statistička tehnika koja je uspešno primenjena na regresionu analizu podataka koji su dobijeni iz adekvatno planiranog određenog broja eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina (Allen, 2006). RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika za rešavanje problema u kojima je cilj da se optimizuje odziv y sistema ili procesa korišćenjem i nezavisnih promenljivih. Površine odziva (eng: Response surfaces) su glatke analitičke funkcije (eng: Response surface function - RSF) koje su najčešće aproksimirane polinomom odgovarajućeg stepena.

Prema broju ulaznih promenljivih, zavisnost ulaza (x_1, x_2, \dots) i odziva (y) može biti predstavljena u 2D, 3D ili više dimenzionalnom prostoru. Ako postoji samo jedna ulazna promenljiva (x) ova zavisnost je data u 2D prostoru, preko krive odziva. U slučaju dve ulazne promenljive (x_1, x_2) njihova zavisnost u funkciji odziva može biti predstavljena kao površina u 3D prostoru. Tada se x_1, x_2 i y predstavljaju na tri odgovarajuće ose izabranog koordinatnog sistema (slika 2.14).



Slika 2.14. Primer RSM sa dve ulazne promenljive

Odzivne funkcije su polinomnog oblika a kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka se može poboljšati povećanjem stepena polinoma. Ako postoji više od dve ulazne

promenjive, dobijaju se površine u višedimenzionalnom (četvorodimezionalnom, itd.) prostoru, što se teško može nacrtati. Ta veza se može dobiti ako se tačke, koje su dobijene ispitivanjem, aproksimiraju polinomnom funkcijom određenog stepena. RSM predstavlja vrlo efikasan metod za ispitivanje većeg broja promenljivih i njihov međusobni uticaj, pri čemu je dovoljan mali broj testiranja. Takođe, ovaj metod uključuje metodologiju za kvantifikaciju greške i minimiziranje uticaja slučajnih grešaka (Myers i sar., 2009). RSM pruža dobru statističku podlogu za validaciju metoda. U primeni su različiti eksperimentalni planovi: Box-Behnken dizajn (BBD), centralni kompozitni plan (Central Composite Design, CCD), Graeco-Latinov dizajn, potpuni eksperimentalni plan i drugi. Svi planovi zasnovani su na principu ekvivalentne distribucije ulaznih promenljivih veličina oko date nezavisne veličine. RSM se koristi u raznim oblastima nauke i tehnike, za opisivanje brojnih procesa.

Kako mnogi faktori utiču na prinos polifenolne frakcije, RSM se primenjuje da iskoristi matematičke modele koji predstavljaju vezu između odgovora (prinos ekstrakcije) i ulaznih varijabli (vreme ekstrakcije, temperatura, zapremina rastvarača, brzina mešanja) (Moreira i sar., 2012), što se može adekvatno iskoristiti za optimizaciju uslova ekstrakcije korišćenjem mikrotalasa. U revijalnom radu Bezzera i sar., (2008) su prikazane moguće aplikacije RSM pri optimizaciji analitičkih metoda. RSM je do sada korišćen za optimizaciju antioksidativne aktivnosti različitih ekstrakata (Karacabey i sar., 2010; Saha i sar., 2011; Gupta & Banerjee, 2011; Ghafoor i sar., 2009; Singh i sar., 2011; Lu i sar., 2013). Zuorro i Lavecchia (2012), koji su u svom radu dobili 90 % prinosa fenolnih jedinjenja ispitujući uticaj temperature, vremena ekstrakcije, odnosa rastvarač/čvrsta supstanca i koncentracije etanola korišćenjem dvo-stepeni faktorijalni dizajn, preporučuju upotrebu RSM za optimizaciju procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz uzoraka otpadne kafe.

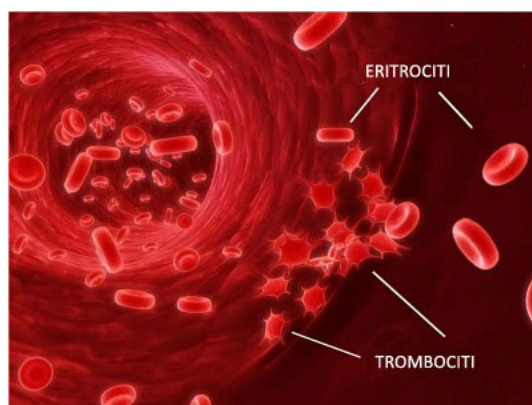
2.11 Primena bioloških metoda za ispitivanje funkcionalnih svojstava polifenola

2.11.1 Aktivacija / agregacija trombocita

Trombociti imaju ključnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih bolesti i doprinose razvoju malignih bolesti, kao najčešćih uzročnika smrtnosti i obolevanja u svetu. Ova činjenica racionalizuje ispitivanje funkcije trombocita kao potencijalnog ciljnog mesta delovanja bioaktivnih komponenata hrane u prevenciji ovih bolesti.

Trombociti su ćelije krvi bez jedra i formiraju se u koštanoj srži. Veličina trombocita je u proseku 2-3 μm u prečniku (slika 2.15). U normalnom stanju, u 1 μl periferne krvi ima 150 do 400 hiljada trombocita. Prosečan životni vek trombocita je do 5 dana na prosečnoj temperaturi od 22 $^{\circ}\text{C}$ (Chandra i sar., 2014).

U fiziološkim uslovima, trombociti imaju ključnu ulogu u procesu hemostaze, koja se zasniva na aktivaciji trombocita vezivanjem za molekule subendotelnog ekstraćelijskog matriksa oštećenog krvnog suda i formiranju agregata trombocita (tromba) i trombocitnog čepa.



Slika 2.15. Izgled trombocita (izvor: <http://www.protein-structure.net/>)

U patološkim stanjima, povećana aktivacija trombocita i sklonost ka agregaciji ima važnu ulogu u etiologiji i patogenezi koronarnih, perifernih i cerebralnih vaskularnih bolesti. Interakcija hiperaktivnih trombocita sa endotelnim ćelijama krvnih sudova i

drugim trombocitima može dovesti do formiranja arterijskih trombova (Willoughby i sar., 2002). Poremećaj funkcije trombocita takođe doprinosi etiopatogenezi ateroskleroze, kao jednog od osnovnih uzočnika KVB i predloženi mehanizmi uključuju interakciju aktiviranih trombocita sa endotelnim ćelijama, neutrofilima, monocitima i makrofagama (Ruggeri, 2002), kao i efekte posredovane trombocitnim hemokinima, proinflamatornim faktorima i mikropartikulama (Huo & Ley, 2004).

Povećan procenat aktiviranih trombocita prisutan je kod pacijenata sa hiperholesterolemijom (Broijersen i sar., 1998), hipertenzijom (Nityanand i sar. 1993), kod pušača (Nowak i sar. 1987), pacijenata sa šećernom bolešću (Manduteanu i sar. 1992) i metaboličkim sindromom (Vaduganathan i sar., 2008). Shodno tome, u naučnoj javnosti je sve prisutnije mišljenje da hiperaktivnost trombocita ne predstavlja samo biomarker akutnih kardiovaskularnih događaja, već se može smatrati faktorom rizika nastanka i razvoja ateroskleroze i KVB, čime se racionalizuje potreba za optimalnom strategijom i evaluacijom antitrombocitnih agenasa u primarnoj, sekundarnoj i tercijarnoj prevenciji ovih bolesti. Drugim rečima, ukoliko je u krvi prisutan viši nivo P-selektina, kao aktivacionog markera za trombocite, to znači da postoji povišen faktor rizika za aterosklerozu.

Takođe, najnovija istraživanja su potvrdila aktivnu ulogu trombocita u procesu metastaze tumora i progresije malignih oboljenja. Vezujući se za maligne ćelije, a pokazano je da maligne ćelije aktiviraju trombocite da se za njih zalepe (Gay i sar., 2011), trombociti predstavljaju zaštitu od elemenata imunskog odgovora organizma i istovremeno doprinose njihovoj ekstravazaciji (izlasku iz krvnog suda u okolno tkivo) i shodno tome, metastatskom potencijalu. Drugim rečima, trombociti vezani za maligne ćelije povećavaju metastaze jer se vežu za krvni sud i mogu 'skliznuti' sa malignom ćelijom u krvni sud i isto tako na nekom udaljenom mestu izaći, doprinoseći metastazama.

Pokazano je da ishrana bogata voćem i povrćem ima povoljno delovanje na faktore rizika za nastanak KVB (Bazzano i sar., 2003). Nenutritivne dijetarne komponente sa izraženom biološkom aktivnošću imaju veoma važnu ulogu u predloženom povoljnom delovanju ovih namirnica.

Potencijalni mehanizmi uključuju efekte na klasične faktore rizika (gojaznost, nivo glukoze i lipidne faktore rizika, markere inflamacije i sl.), funkciju endotelijuma i/ili trombocita u prevenciji i kontroli ateroskleroze, tromboze, inflamacije i vaskularnog

tonusa. U velikom broju *in vitro* istraživanja i studijama efekata dijetarne intervencije kod ljudi – *ex vivo* i *in vivo*, pokazano je da ekstrakti pojedinih dijetarnih biljaka i jedinjenja koja one sadrže, imaju sposobnost da modulišu funkciju trombocita (Hubbard i sar., 2004).

Potvrđujući značaj delovanja biološki aktivnih nenutritivnih sastojaka namirnica na funkciju trombocita, EFSA, odnosno ekspertski tim Panela za dijetetske proizvode, ishranu i alergije (eng. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies -NDA) zaduženo za potvrdu naučne zasnovanost zdravstvenih izjava vezanih za delovanje namirnica odnosno njenih sastojaka, uvrstilo je smanjenje aktivacije i agregacije trombocita delovanjem namirnica ili sastojaka u listu potvrđenih povoljnih delovanja namirnica (EFSA NDA, 2010).

Jednu od najznačajnijih grupa biološki aktivnih nenutritivnih sastojaka, kako po zastupljenosti u ishrani ljudi, tako i po do sada pokazanom delovanju na smanjenju rizika za nastanak hroničnih nezaraznih bolesti, pre svega bolesti kardiovaskularnog sistema, predstavljaju polifenoli i smatra se da se njihova uloga u promociji zdravlja i prevenciji bolesti jednim delom zasniva i na efektima delovanja na funkciju trombocita (Ostertag i sar., 2010).

Mehanizam delovanje polifenola i namirnica koje ih sadrže na funkciju trombocita nije još uvek u potpunosti razjašnjen, ali se dovodi u vezu sa uticajem na inflamatorne i redoks mehanizme u samim ćelijama i interakciju sa ostalim serumskim činiocima kao faktorima rizika.

2.11.1.1 Protočna citometrija u ispitivanju funkcije trombocita

Protočna citometrija predstavlja nezamenjivu tehniku u određivanju populacija i subpopulacija krvnih ćelija na osnovu njihovih morfoloških karakteristika i prisustvu određenih antigena (receptora) na površini. Diferenciranje ćelija na osnovu morfoloških karakteristika zasniva se na upravnom rasipanju zraka svetlosti usmerenog na pojedinačnu ćeliju, koje zavisi od veličine ćelije i bočnom rasipanju, koje zavisi od granulacije i shodno tome karakterističnom položaju na FSC/SSC dijagramu (FSC, od eng. forward light scatter, upravno rasipanje svetlosti; SSC, od eng. side light scatter, bočno rasipanje svetlosti). Vezivanjem antitela obeleženih fluorescentnim bojama za površinske antigene detektuje se

njihovo prisustvo i definiše određeni fenotip ćelijske populacije. Merenjem srednjeg intenziteta fluorescencije analiziranih ćelija u uzorku zasićenom antitelima moguće je proceniti i gustinu, odnosno intenzitet ekspresije pojedinih površinskih antigena (Nunez, 2001).

CD61 (eng: Cluster of differentiation) predstavlja tzv. pan-trombocitni marker za trombocite, što znači da svi trombociti, bez obzira na njihovo aktivaciono stanje, na svojoj površini eksprimiraju CD61 (koji je po svojoj prirodi protein), na osnovu čega možemo znati da se radi o trombocitima. Ekspresija površinskih trombocitnih antigena P-selektina (CD62P) i GPIIb-IIIa (koji nema CD klasifikaciju), predstavlja specifičan indikator aktivacije trombocita, koji se određuje u punoj krvi metodom protočne citometrije. Istovremeno, protočna citometrija pune krvi predstavlja jedinstvenu tehniku kojom je moguće odrediti procenat konjugata trombocita i monocita, odnosno trombocita i neutrofila u cirkulaciji, koji pored direktnog uticaja na proces ateroskleroze i tromboze po nekim autorima predstavljaju specifičniji marker *in vivo* aktivacije trombocita u odnosu na ekspresiju površinskih antigena (Michelson i sar., 2004). Iz tog razloga, protočna citometrija pune krvi smatra se najznačajnijom metodom u proceni *in vivo* aktivacije trombocita.

Prednost primene protočne citometrije u ispitivanju funkcije trombocita, je u detekciji i kvantifikaciji celog spektra površinskih receptora trombocita prisutnih na površini neaktiviranih trombocita, koji se koriste kao pan-trombocitni markeri, ili eksprimiranih nakon aktivacije, koji imaju funkciju aktivacionih markera. Step en aktivacije trombocita procenjuje se na osnovu procenta trombocita koji na površini eksprimiraju određeni aktivacioni marker u odnosu na ukupnu populaciju analiziranih trombocita, kao i na osnovu gustine receptora. Protočna citometrija se koristi u dijagnostici urođenih i stečenih poremećaja funkcije trombocita, detaljnoj dijagnostici KVB i praćenju odgovora na farmakološku terapiju i različite terapijske procedure, sa nizom prednosti i određenim nedostacima, koji se odnose na dostupnost i cenu aparata i reagensa kao i neophodnu ekspertizu u radu (Hagberg & Lyberg, 2000).

Za razliku od kliničke primene, protočna citometrija je nezamenjiva u istraživanjima usmerenim na funkciju trombocita. Princip ove metode omogućava uvid u precizne mehanizme funkcije trombocita i odgovora na različite agoniste u suboptimalnim ili optimalnim koncentracijama kao faktora rizika za razvoj određenih bolesti, specifično

delovanje farmakološki i biološki aktivnih agenasa, ispitivanja u *in vitro* eksperimentalnim uslovima. Pored površinskih markera, protočna citometrija omogućava i detekciju molekula unutar trombocita i drugih ćelija, uključenih u patogenezu tromboze i ateroskleroze (Chakrabarti i sar., 2005). Standardizovani protokoli za primenu protočne citometrije u dijagnostici i istraživanju definišu sve faze laboratorijskog rada, od uzorkovanja do analize i tumačenja dobijenih rezultata, uključujući i analizu direktno pune krvi i minimalnu manipulaciju uzoraka, čime je obezbeđen visok stepen osetljivosti i tačnosti (Krueger i sar., 2002; Barnard i sar., 2003). Zbog niza prednosti, ova metoda predstavlja metodu izbora u proceni funkcije trombocita kao biomarkera rizika za nastanak hroničnih bolesti, kao i za ispitivanje antitrombocitnog delovanja sastojaka namirnica i lekovitih biljaka i identifikaciju potencijalnih mehanizama njihovog delovanja u prevenciji KVB (Matzdorff, 2005).

2.11.2 Uticaj polifenola na funkciju trombocita

Postojeći naučni dokazi koji se odnose na potencijal polifenola da moduliraju funkciju trombocita, uključuju rezultate *in vitro* studija kao i klinička ispitivanja na ljudima. U svom revijalnom radu Ostertag i sar. (2010) su objedinili rezultate 25 kontrolisanih dijetarnih intervencija koje su se bavile efektima polifenola na trombocite.

Posmatrane razlike u dizajnu studija (akutni i/ili hronični efekti), posmatrana populacija (zdravi ispitanici, subjekti u riziku ili pacijenti), dnevni unos polifenola, metode koje se koriste za procenu funkcije trombocita i biomarkeri koji se koriste kao ishodi, pričinjavaju poteškoće u izvođenju krajnjih zaključaka. Međutim, većina prikupljenih studija (10/25) izvedena je sa hranom bogatom flavanolima i procijanidinima (kakao, ekstrakt semena grožđa, čokolada) a u 9/10 studija, efekat je primećen makar kod jednog biomarkera funkcije trombocita. Isti rezultati su takođe dobijeni, kao potvrda, nakon konzumiranja crnog čaja (u 2/3 studija), crvenog vina (2/2) i u pojedinačnim studijama sa kafom, mešavinom različitih bobica, sokom od grožđa i Armanjak konjakom bogatim elagitaninom -ograničeno na neki od analiziranih biomarkera.

Značajna razlika u odnosu na placebo nije pokazana u pojedinačnim studijama sa ekstraktom soje bogatim izoflavonima i soku od pasjakovine, dok su rezultati studije sa kvarcetinom protivurečni sa efektima prikazanim u 2/4 studija. Generalno, pokazano je da polifenoli utiču na trombocite u bazalnom stanju (bez stimulacije) i posle *ex vivo* aktiviranja sa različitim agonistima (kolagenom, adenozin-difosfatom, trombinom, epinefrinom, arahidonskom kiselinom). Važno je naglasiti da su sve studije pružile dokaze aktivacije trombocita i/ili agregacije trombocit-monocita bez obzira na vrstu intervencije, korišćenjem protočne citometrije, što ukazuje na visoku osetljivost same metode. Zaključno, možemo reći da su do sada sprovedene studije o učincima metabolita polifenola na funkcije trombocita i dalje nedovoljne i oskudne da bi pružile nedvosmislene zaključke o odnosu uzrok-efekat za dijetetski unos polifenola i rasvetljavanje preciznih mehanizama njihovog delovanja (Konic-Ristic i sar., 2013a; Konic-Ristic i sar., 2013b; Rechner i sar., 2005).

2.11.3 Uticaj kafe na funkciju trombocita

Brojne kliničke studije su pokazale da konzumacija kafe deluje povoljno na funkciju trombocita (Bydlowski i sar., 1987; Nardini i sar., 2007) kao i da je ovaj efekat nezavisan od sadržaja kofeina u kafi (Natella i sar., 2008). Pokazano je sa druge strane da kofein, kao sastojak energetskih napitaka bez prisustva polifenola dovodi do povećane agregacije trombocita kod zdravih osoba (Worthley i sar., 2010). Shodno tome, može se zaključiti, ne samo da su polifenoli kafe nosioci antitrombocitnog delovanja, što je potvrđeno u brojnim *in vitro* i studijama na animalnim modelima (Bydlowski i sar., 1987; Bhaskar i sar., 2010) već i da su zaslužni za neutralisanje protrombocitnog delovanja drugih sastojaka ovog napitka.

Osnovna polifenolna jedinjenja kafe su derivati hlorogenske kiseline, pre svega kafeoil-hininske kiseline. U najvećoj meri zastupljena je 5-kafeohininska kiselina, a manjoj meri derivati feruoilhininske i dikafeoilhininske kiseline (Ludwig i sar., 2014). Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da i kafena i 5-kafeohininska kiselina u koncentraciji od 0,05 μM statistički značajno inhibiraju ekspresiju P-selektina kao aktivacionog markera

trombocita za 35% , odnosno 38%. Slični efekti dobijeni su i pri oralnoj administraciji ovih polifenolnih jedinjenja (Park, 2009). Važno je istaći i da trombociti predstavljaju specifično ciljno mesto delovanja ovih bioaktivnih jedinjenja, s obzirom da nije pokazano njihovo delovanje na druge faktore uključene u hemostazu i koagulaciju (Bak i sar., 1990).

U skladu sa navedenim, ispitivanje antitrombocitnog delovanja polifenola kafe u proceni optimizacije ekstrakcije biološki aktivnih jedinjenja je racionalno, fiziološki relevantno, naučno zasnovano i svrsishodno za dalju primenu dobijenih ekstrakata kao sastojaka funkcionalnih proizvoda koji mogu da doprinesu promociji kardiovaskularnog zdravlja i prevenciji bolesti.

3 CILJ RADA

Imajući u vidu da konzumiranje kafe u Srbiji predstavlja tradicionalni deo svakodnevnice i sagledavajući potencijal iskorišćenja otpada koji pri tome nastaje, pri planiranju rada na ovoj tezi, postavljeni su sledeći ciljevi, podeljeni u tri segmenta:



1. Ispitati prosečan nutritivni sastav kafe koja se najčešće konzumira u Srbiji kako bi se u Srpsku bazu podataka o sastavu namirnica unele analitičke vrednosti harmonizovane sa standardima Evropske mreže za izvore informacija o hrani (EuroFIR, 2014). Na osnovu dobijenih vrednosti, izračunati doprinos konzumiranja kafe dijetarnom unosu prisutnih komponenti (minerala, makronutrijenata, kofeina, hlorogenske kiseline i masnih kiselina).

2. Definisati optimalne uslove mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne kafe (espreso i crne) kao funkcionalnih komponenti i ispitati njihov antioksidativni potencijal.

3. Ispitati uticaj napitaka i ekstrakata taloga crne i espresso na funkciju trombocita, u pogledu uticaja prisutnih polifenola na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima, u cilju pružanja racionalne osnove za njihovu upotrebu kao funkcionalnih sastojaka hrane u promociji kardiovaskularnog zdravlja i prevenciji bolesti.

4 EKSPERIMENTALNI DEO

Metodologija eksperimentalnog rada u ovoj tezi je, prateći postavljene ciljeve, takodje podjeljena u tri dela i redom prikazana u daljem tekstu.

4.1 Nutritivni sastav crne kafe u Srbiji: Dopuna podataka u Srpskoj bazi podataka o sastavu namirnica

4.1.1 Procena konzumiranja kafe u Srbiji (vrsta i trgovačka marka)

Specifični ciljevi ovog poglavlja rada su (i) pružanje relevantnih podataka o vrsti i trgovačkoj marki crne kafe koja se najviše konzumira u Srbiji; (ii) pružanje pouzdanih podataka o sastavu kafe za unošenje u nacionalnu BPSN; (iii) ocena nutritivnog značaja konzumiranja crne kafe medju srpskim stanovništvom. Da bi dobili odgovore na postavljena pitanja i da bi analizirali koju vrstu kafe građani Srbije piju na dnevnoj osnovi, korišćeni su rezultati FP7 CHANCE studije ("Low cost technologies and traditional ingredients for the production of affordable, nutritionally correct foods improving health in population groups at risk of poverty") (CHANCE, 2013) i Ipsos Marketing istraživanja (IPSOS, 2012).

Učestanost konzumiranja različitih tipova kafe u Srbiji je analiziran korišćenjem anketnih upitnika u okviru FP7 CHANCE projekta. CHANCE anketni upitnici su dizajnirani tako da definišu i reše problem u ishrani u populaciji sa nižim primanjima i sprovedena je u pet Evropskih zemalja: Finskoj, Italiji, Litvaniji, Srbiji i Velikoj Britaniji. 300 naizgled zdravih odraslih građana (18 – 65 godina), oba pola, je učestvovalo u studiji. U Srbiji, učesnici su regrutovani iz tri različite urbane sredine, od februara do juna 2012. godine. Deo upitnika koji se odnosio na ishranu je dizajniran tako da se oceni nutritivni unos i obrazac ishrane korišćenjem dva 24-satna upitnika o konzumiranoj hrani (eng: 24-hour dietary food recall questionnaires) i upitnika o učestalosti konzumiranja pojedinih namirnica (eng: Food frequency questionnaire, FFQ). Dalje, radi procene najčešće

konzumiranih robnih marki kafe u Srbiji, korišćeni su podaci dobijeni od Ipsos Marketing-a (IPSOS, 2012). Istraživanje je sprovedeno u septembru 2012. godine na nacionalnom reprezentativnom uzorku od 2000 ispitanika, građana Republike Srbije. Istraživanje je sprovedeno s ciljem da se identifikuju faktori koji utiču na potražnju i konzumiranje kafe u Srbiji, pružajući dodatne informacije o željama i stavovima domaćih potrošača, uključujući i izbor robne marke.

4.1.2 Metodologija pripreme uzoraka kafe za određivanje prosečnog nutritivnog sastava

Na osnovu rezultata CHANCE nacionalne studije i Ipsos marketing istraživanja, definisan je kompozitni uzorak i razvijen plan uzorkovanja. Kompozitni uzorak je definisan kao smeša jednakih delova (100 g) deset najčešće konzumiranih robnih marki kafe na srpskom tržištu. Za svaki od deset izabranih kafa kupljena su tri pakovanja na različitim prodajnim mestima (tri velika lanca supermarketa i tri lokalne pržionice kafe za prodaju tzv. "kafe na meru"). Jednaki udeli (100 g) svakog od uzoraka su pomešani bez naknadnog sušenja ili usitnjavanja i dalje tretirani kao primarni uzorak. Odgovarajuće jednake količine 10 primarnih uzoraka su pomešane da daju kompozitni uzorak u količini od oko 1 kg. Sva ispitivanja nutritivnog sastava i bioaktivnih komponenti kompozitnog uzorka obavljena su u tri ponavljanja. Sve vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Na osnovu informacija dobijenih od proizvođača, svi uzorci mlevene kafe su mešavine kafa arabika (poreklom od vrste *Coffea arabica*) i robuste (poreklom od vrste *Coffea robusta*), uvezene iz Brazila, Indije, Vijetnama, Afričkih zemalja, u nepoznatom tačnom odnosu. Za svaku robnu marku, sastav smeše varira u dozvoljenom procentu, u zavisnosti od trenutne ponude na tržištu kafe.

4.1.3 Priprema uzorka

Napitak crne kafe za dalja ispitivanja je pripremljena iz kompozitnog uzorka. Dalje će se u radu koristiti izraz infuzija, što se odnosi na hemijski proces koji se dešava prilikom pripreme ove vrste kafe. Hemijska jedinjenja se u ovom procesu pripreme kafe vodom ekstrahuju iz biljnog materijala, dopuštajući da rastvorene supstance ostanu suspendovane u rastvaraču, odnosno vodi, u toku vremena.

Za pripremu infuzije je upotrebljen tradicionalni i najrasprostranjeniji postupak koji se koristi u kućnom okruženju u Srbiji, radi simuliranja uobičajenog postupka pripreme kafe u domaćim uslovima (Midžina, 1877). Detaljnije, 100 ml vode iz česme se zagreje do tačke ključanja (95 – 100 °C). Nakon toga, porcija samlevene kafe se doda u vodu i posuda se vrati nazad na izvor zagrevanja dok se ponovo ne dostigne tačka ključanja (obično je potrebno nekoliko sekundi) i na kraju skloni sa izvora toplote. Napitak se ostavi nekoliko minuta da odstoji dok se talog ne slegne. Talog je prikupljen nakon odlivanja gornjeg, tečnog sloja. Pripremljene su dve vrste infuzije, "jaka infuzija" i "slaba infuzija", dobijene sa 6.9 g i 3.4 g samlevene pržene crne kafe na 100 ml vode (što otprilike odgovara dve, odnosno jednoj kafene kašičice, respektivno). Za određivanje minerala je upotrebljena destilovana voda. Posle tri minuta, supernatant je odvojen od istaložene kafe, tzv. "soca", pažljivim dekantovanjem, imitirajući na taj način pijenje kafe u domaćem okruženju. Dobijeni supernatant odgovara napitku crne kafe koji se pije. Uzorci infuzije kafe (jake i slabe) su pripremljeni u tri ponavljanja. Sve vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.1.4 Hemikalije i reagensi

Svi rastvarači i hemikalije koje su korišćene za određivanje nutritivnog sastava crne kafe su stepena čistoće p.a. Hloroform, metanol, n-heksan, sumporna kiselina i natrijum hidroksid su dobijeni od Centrohema (Stara Pazova, Srbija). BHT i 13:0, tridekaenska kiselina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$) su iz Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Nemačka), a 37 FAME standard iz Supelco (Bellefonte, PA). 37 % koncentrovana hlorovodonična kiselina, 65 %

azotna kiselina, cezijum hlorid, i lantan (III) oksid nabavljeni su od Merck Millipore (Darmstadt, Nemačka). Tashiro indikator je kupljen od Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Enzimi (termostabilne-amilaze, proteaze i amiloglukozidaze) i kiselinom isprani celit kupljeni su od Megazyme (Wicklow, Irska).

Svi reagensi korišćeni za određivanje kofeina i hlorogenske kiseline su analitičke čistoće (Sigma-Aldrich, AcrosOrganics, Belgija; Biokemix, Velika Britanija; Moss- Hemoss, Srbija). Sadržaj su izračunati iz standardne krive (kofein, AcrosOrganics, 98.5 %; Chlorogenic Acid, Aldrich > 95 %).

Za određivanje minerala su korišćeni 37 % koncentrovana hlorovodonična kiselina, 65 %, azotna kiselina, cezijum hlorid, i lantan (III) oksid, od dobavljača Merck Millipore (Darmstadt, Nemačka).

4.1.5 Analitički metod

Preciznost i reproduktivnost dobijenih podataka o sastavu namirnica se zasniva na pravilnoj upotrebi EuroFIR tezaurusa (EuroFIR Thesauri, 2014), sistema tzv. terminološkog rečnika. Upotrebljene analitičke metode su definisane upotrebom indikatora metode, definisanjem jedinice i jedinice matriksa. EuroFIR Metod Indicator deskriptori se koriste za opisivanje analitičke metode koja se koristi za dobijanje vrednosti sastava, uključujući analize, preračunavanja i pripisivanje vrednosti za potrebe razmene podataka putem EuroFIR-a. Takođe su u opisivanje dobijenih vrednosti uključeni i LanguaL™ kodovi koji opisuju ispitivanu hranu kao i način pripremanja (LanguaL™, 2013). LanguaL™, EuroFIR Component i Method Indicator kodovi su dati u tabelama sa dobijenim analitičkim podacima, kao deo dokumentacije neophodne za unos podataka u SBPSN i dalje korišćenje putem FoodEXplorer-a (FoodEXplorer, 2013).

Internacionalne preporuke koje se odnose na način predstavljanja vrednosti sastava hrane u bazama podataka, uključujući jedinice, broj značajnih cifara, preporučeni limit i definisanje sadržaja u tragovima je dato prema FAO preporukama (Greenfield & Southgate, 2003).

4.1.5.1 Makronutrijenti (proteini, ukupni lipidi, ugljeni hidrati, vlakna, voda i pepeo)

Energija, proteini, ukupni lipidi, ugljeni hidrati, vlakna, voda i pepeo su određivani u kompozitnom uzorku pržene, samlevene kafe i u infuzijama, jakoj i slaboj, pripremljenim na tradicionalan način, prethodno opisan u poglavlju 4.1.3. Sadržaj vode se izračunava. Vlažnost se izračunava na osnovu razlike (generički), iz sadržaja suve materije određene gravimetrijski AOAC metodom, sušenjem vazduhom u laboratorijskoj sušnici (Sutjeska, Yugoslavia) na 105 ± 5 °C. Uzorci, 1 g pržene mlevene kafe i 20 ml infuzija (jake i slabe), su sušeni su do konstantne mase izražene kao suva materija (AOAC 935.29, 1995). Suva materija dobijena posle sušenja je korišćena za određivanje pepela, ukupnih lipida i sadržaja proteina u infuzijama, a rezultati su preračunavani na osnovu zapremine napitka. Analiza ukupnog pepela je urađena u pećnici (Iskra term 2 K, Yugoslavia) na 550 °C, korišćenjem 1 g uzorka pržene kafe i 1 g suve materije infuzije kafe koja ostaje nakon sušenja, do postizanja konstantne mase (AOAC 923.03, 1995).

Sadržaj proteina u uzorcima se izračunava na osnovu sadržaja ukupnog azota na osnovu metoda po Kjeldahl-u (AOAC 2001.11, 2005), korišćenjem 6.25 kao faktora konverzije. Ukupni sadržaj lipida se određuje gravimetrijski, nakon ekstrakcije po Soxlet-u i sušenja ekstrakta u sušnici na 105 °C u toku jednog sata. Pre ekstrakcije, uzorak je podrgnut hidrolizi u kiseloj sredini. Ekstrakcija po Soxlet-u je trajala 2 sata, sa 200 mL petrol etra (40 – 60 °C) kao rastvarača prema oficijalnoj AOAC metodi (AOAC 954.02, 1995).

Sadržaj ukupnih dijetnih vlakana je određen enzimsko-gravimetrijskim metodom (AOAC 985.29, 1990).

Sadržaj raspoloživih ugljenih hidrata se izračunava na osnovu razlike, korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Ugljeni hidrati} = 100 - (\text{azot} * 6.25) - (\text{lipidi} + \text{voda} + \text{AOAC vlakna} + \text{minerali}) \quad (4.1)$$

Sadržaj energije u kompozitnom uzorku je izračunat na osnovu sledeće formule:

Energija (kJ) = 17 kJ/g x g proteini + 17 kJ/g x (g ugljeni hidrati - g polioli) + 37 kJ/g x g ukupni lipidi + 29 kJ/g x g alkohol + 13 kJ/g x g organske kiseline + 10 kJ/g x g polioli (4.2)

Polioli i alkohol nisu prisutni u kafi te stoga nisu uzeti u obzir.

4.1.5.2 Određivanje kofeina i hlorogenske kiseline

Za određivanje kofeina i hlorogenske kiseline, infuzija kafe je odvojena korišćenjem vacuum-pumpe (BÜCHI Vacuum Pump V-700) i osušena korišćenjem sprej sušnice (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Kofein i hlorogenska kiselina su određene prema AOAC metodama (AOAC, 965.25 i 962.13, 1998 za kofein i AOAC 957.04, 1998 za hlorogensku kiselinu). ApSORBANCA kofeina (272 nm) i hlorogenske kiseline (325 nm) su očitavane na spektrofotometru (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) i njihovi sadržaji su računati uz pomoć standardne krive. Standardne krive za određivanje sadržaja kofeina i hlorogenske kiseline, kao i dobijene jednačine standardne krive, date su u Prilogu 2., slike P 2.1 i P 2.2, respektivno.

4.1.5.3 Određivanje masnih kiselina

Ukupni lipidi ekstrahovani su modifikovanom metodom po Folch-u (Folch i sar., 1957). Ukratko, kako je za infuziju kafe sadržaj lipida manji od 5 g lipida / 100g, krajnja proporcija hloroform:methanol 2:1 (v/v) je bila 5 ml za 1 ml infuzije. Da bi se sprečila oksidacija uzoraka u toku ekstrakcije, 10 mg/ 100ml BHT je dodato u hloroform:methanol smešu. Dodat je takođe i interni standard 13:0. Gornji sloj je re-ekstrahovan. U toku ekstrakcije nije dodavan rastvor za ispiranje pošto je sadržaj vode u kafenoj infuziji visok. Za ekstrakciju mlevene kafe je korišćena slična procedura; 1 g uzorka je ekstrahovan sa 10 ml Folch-ove smeše i re-ektrahovan sa još 10 ml iste smeše. Ekstrakt sa ukupnim lipidima je propušten kroz natrijum sulfat disk. Lipidi su hidrolizovani i masne kiseline metilovane sa 2000 molm⁻³ sumporne kiseline na 85 °C u trajanju od 2.5 sata.

Metil estri masnih kiselina su odvojeni korišćenjem Shimadzu 2014 gasnog hromatografa (Shimadzu, Kyoto, Japan) opremljenim sa plameno jonizujućim detektorom na Rtx 2330 koloni (60 m x0.25 ID, Restek, Bellefonte, PA). Temperatura injektora je podešena na 220 °C sa odnosom splita 20:1 i temperaturom detektora od 260 °C. Temperaturni program je bio: početna temperatura od 140 °C sa gradijentom od od 3 °C / min do 220 °C. Inicijalna temperatura je zadržana 5 min a krajnja 20 min. Kao gas nosač korišćen je helijum, uz protok 11 ml/min i protokom u koloni od 0.38 ml/min. Testirani faktori odgovora internog standarda 13:0 i masnih kiselina sa 16 – 24 ugljenikova atoma su bili isti. Metilestri masnih kiselina su identifikovani na osnovu retencionih vremena, poređenjem sa retencionim vremenima pojedinačnih jedinjenja u standardu smeše metilestara masnih kiselina, 37 Fame Mix (Supelco, Bellefonte, PA). Sadržaj masnih kiselina izražen je kao procenat od ukupno identifikovanih masnih kiselina i ukupna količina je izračunata na osnovu standarda 13:0 dodatog pre ekstrakcije. Za limit detekcije od 0.05 %, procenat neidentifikovanih pikova je takođe preračunat. Količina i procenat ukupnih zasićenih, mononezasićenih, polinezasićenih, n-3 i n-6 masnih kiselina je izračunat kao suma pojedinačnih masnih kiselina.

4.1.5.4 Određivanje minerala

Sadržaj minerala u ispitivanim uzorcima je kvantifikovan korišćenjem atomske apsorpcione spektrometrije (Spectra AA 10, Varian Pty Ltd., Australija). Pre spektrometrijske analize, uzorci samlevene pržene kafe i kafene infuzije (jake i slabe, pripremljene na tradicionalan način ali sa destilovanom vodom), su homogenizovani i osušeni na 105 ± 2 °C. Približno 0.5 g svakog osušenog uzorka, (u triplikatu) je izmereno i suvo mineralizovano spaljivanjem na 450 °C u pećnici (PF 1, Vecstar LTD, UK) prema zvaničnoj AOAC metodi (AOAC 999.11, 2000). Sadržaj minerala svih mineralizovanih uzoraka je određivan u triplikatu na atomskom apsorpcionom spektrofotometru (Spectra AA 10, Varian Pty Ltd., Mulgrave Victoria, Australia) korišćenjem plamena vazduh/acetilen (Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Mn, Zn) uz upotrebu deuterijuma za korekciju pozadinskog zračenja. Za određivanje Na i K, Cs je dodat standardima i uzorcima kao jonizacioni buffer (0.2 %

w/v), a za merenje Ca i Mg, La je korišćen kao otpuštajući agens (0.1% w/v). Merenja su vršena na sledećim talasnim dužinama (nm): Ca 422.7, Mg 285.2, Na 589.0, K 766.5, Cu 324.7, Fe 248.3, Mn 279.5 and Zn 213.9. Slepe proba i uzorci spikovani sa standardima elemenata su rutinski uključeni u analize.

4.2 Optimizacija procesa mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz otpadne kafe (espresso i crna kafa)

4.2.1 Uzorci

Za potrebe optimizacije uslova ekstrakcije antioksidanasa iz otpadne espresso kafe, korišćena je „Doncafe - Espresso Aromatico-cialde“, (ćalda, it: cialda; eng: pod) i crna kafa „Doncafe Moment“. Ukupan broj uzoraka „Doncafe - Espresso Aromatico-cialde“, kao i crne kafa „Doncafe Moment“, donirani su od strane lokalne kompanije Strauss-Adriatic d.o.o. Doncafe Espresso Aromatico predstavlja smešu dobijenu iz arabika (ispod 50 %) i robusta (preko 50 %) kafe (poreklom iz Santosa, Gvatemale, Indije, Hondurasa i Vijetnama, u zavisnosti od trenutne ponude na tržištu, uzimajući u obzir sličnost u sastavu). Crna kafa „Doncafe Moment“, mešavina je pržene mlevene kafe, Rio minas (Brazil) - arabike, i dve vrste vijetnamske robuste.

4.2.2 Pripremanje uzoraka otpadne espresso i crne kafe

Espresso kafa je pripremljena na Italian Frog Espresso Coffee Pod Machine (Snaga: 450 W; Napon: 230/120 V) u kojoj se koristi ćalda– prethodno upakovana espresso kafa u takozvani kolač mlevene, pržene kafe. 30 ml espresso kafe se dobija iz 7 g mlevene kafe, koliko se nalazi u ćaldi, u trajanju procesa ekstrakcije od 25 s na oko 90 °C.

Crna kafa je pripremljena na tradicionalni način pripreme kafe u domaćim uslovima (Midžina, 1877), po postupku prethodno opisanom u poglavlju 4.1.3. Talog otpadne espresso kafe (TOK) iz ćalde kao i otpadne crne kafe, raširen je u veoma tankom sloju, sa velikom dodirnom površinom, u cilju skraćenja naredne faze (faze sušenja). Otpadna kafa (espresso i crna) je sušena u termostatu na 40 °C (Mimmert). Uzorci su čuvani na 3-4 °C u toku trajanja eksperimenta.

4.2.3 Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije korišćene za ekstrakciju antioksidanasa iz otpadne kafe (espresso i crne) su čistoće p.a., dobavljača Sigma Chemical Co. (St. Luis, USA), Aldrich Chemical Co. (Steineheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) i Sinex laboratory (Srbija). Kao rastvarači korišćeni su etanol (20 % rastvor) i destilovana voda. U metodi određivanja ukupnog sadržaja polifenola korišćeni su Folin-Ciocalteu reagens i natrijum karbonat, a kao standard u toj metodi korišćena je galna kiselina. U metodi određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata otpadne kafe kao slobodan radikal korišćen je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Kao referentne supstance, u odnosu na koje se vršilo poređenje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala eksperimentalnih uzoraka, korišćene su askorbinska kiselina i BHT. FRAP metod je izveden korišćenjem TPTZ reagensa (2,4,6-tripiridil-s-triazin) koji sa Fe^{2+} stvara plavo obojeni kompleks.

4.2.4 Eksperimentalni dizajn optimizacije mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz taloga otpadne espresso i crne kafe

Za optimizaciju mikrotalasne ekstrakcije (MAE) polifenola iz TOK uzoraka korišćen je eksperimentalni model odziva površina (eng: response surface methodology, RSM) sa centralnim kompozitnim planom (eng: central composite design - CCD) (Cochran & Cox, 1992). U tu svrhu je korišćen licencirani softverski program Designe Expert 8.0 (Stat-Easy Inc, Minneapolis, USA). Kako je nemoguće odrediti uticaj svih parametara na proces ekstrakcije, izabrani su parametri sa najvećim uticajem na osnovu preliminarnih eksperimenata. U konkretnom slučaju, RSM je korišćen za proučavanje efekata vremena ekstrakcije (VE), odnosa rastvarač-čvrsta faza (RČ) i snage mikrotalasa (SMT) na sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu. U radu Pavlović i sar., (2013), pokazano je da je 20% rastvor etanola u vodi optimalan za mikrotalasnu ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz otpadne kafe, pa je ovaj procenat etanola u vodi usvojen za dalji rad.

Opseg eksperimentalnih vrednosti je definisan uzimajući u obzir rezultate dobijene u preliminarnim ispitivanjima, kao i operative granice instrumenata i svih značajnih

parametara u tipičnom MAE procesu, koji su izabrani kao nezavisne promenljive: VE (A=11.0-209.0 s), RČ (B=4.76-13.24 ml/g) i SMT (C= 240, 400 i 560 W). Za odabrane parametere određeni su nivoi ispitivanja kako bi se izvršilo modelovanje procesa realnih vrednosti ispitivanih parametara koji se prevode u kodirane vrednosti koje se dalje koriste u modelovanju. Opseg i nivoi 3 nezavisne promenljive i njihove kodirane vrednosti za espresso i crnu kafu predstavljeni su u tabeli 5.1. Promenljive A i B su kodirane u 5 nivoa (- α , -1, 0, 1, + α), dok je varijabla C kodirana u tri nivoa (-1, 0, 1).

Tabela 4.1. Vrednosti ispitivanih nivoa procesnih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu mikrotalasne ekstrakcije antioksidanasa iz taloga otpadne espresso kafe

Procesna promenljiva	Jedinica mere	Simbol	Granične vrednosti				
			- α	-1	0	1	+ α
Vreme ekstrakcije	s	A	11.0	40.0	110	180.0	209.0
Odnos rastvarač/čvrsta faza	ml/g	B	4.76	6.00	9	12.0	13.24
Snaga mikrotalasnog zagrevanja	W	C		240	400	560	

Odzivi obuhvaćeni optimizacijom su: ukupni prinos ekstrakcije (PE; u mg/g s.m. TOK) sadržaj ukupnih polifenola (UP, % (w/w) u ekstraktu), FRAP (mmolFe²⁺/l) i DPPH (% inhibicije DPPH).

Kompletan plan eksperimenta sastojao se iz 30 eksperimenata (espresso kafa, tabela 4.2) i u 33 eksperimenata (crna kafa, tabela 4.3), u tri ponavljanja. Pojedinačni eksperimenti su randomizirani u cilju minimiziranja uticaja neočekivanih promena u posmatranim odgovorima. Rezultati CCD su analizirani multiplom regresionom analizom tako da odgovaraju polinomnom regresionom modelu drugog reda koji sadrži linearni, kvadratni i dvo faktorski koeficijent interakcije. Model jednačina odzivne f-je tri nezavisne promenljive (A,B i C) je data sledećom jednačinom:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.3)$$

gde je Z zavisno promenjiva, β_0 odsečak, β_i linearni koeficijent (glavni efekat), β_{ii} kvadratni koeficijent i β_{ij} koeficijent interakcije. Kod određivanja koeficijenata, pogodnost modela, odnosno provera da li model odgovara eksperimentalnim uslovima, se tumači pomoću jednačine modela, ocenjivanjem nedostatka uklapanja (eng: lack of fit), odnosno, procenu da li su kontrolne eksperimentalne vrednosti pravilno raspoređene oko srednje vrednosti, koeficijenta determinacije (R^2), kao mere odstupanja odzivne f-je od eksperimentalno dobijenih rezultata i vrednosti Fišerovog testa (F-vrednost) dobijenog analizom varijanse (ANOVA) koju generiše korišćeni statistički paket, Design Expert 8. Osim koeficijenta korelacije, sprovode se detaljnije statističke analize da bi se što preciznije utvrdila opravdanost odabranog modela jer se u praksi često dešava da odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti izabrano područje eksperimenta. Razlike se smatraju značajnim pri vrednosti $p < 0.05$. Parametar se ocenjuje kao značajan, kada je vrednost njegove F-statistike manja od 0.05. Optimalne nezavisne promenljive (uslovi ekstrakcije) za maksimum odziva su prethodno ustanovljene superpozicijom odgovarajućih konturnih dijagrama, pri čemu su izvođena dva uzastopna eksperimenta za validaciju jednačina.

Tabela 4.2. Prave i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih vremena ekstrakcije (VE), odnos rastvarač/čvrsta faza (RČ) i snaga mikrotalasnog zagrevanja(SMT) ekstrakta taloga otpadne espresso kafe na osnovu centralnog kompozitnog dizajna za RSM

Procesna promenljiva			
Redni broj	VE (s)	RČ (ml/g)	SMT (W)
1	40.00 (-1) ^a	6.00 (-1)	400 (0)
2	110.00 (0)	4.76 (- α)	550 (1)
3	40.00 (-1)	12.00 (1)	240 (-1)
4	180.00 (1)	6.00 (-1)	400 (0)
5	110.00 (0)	9.00 (0)	240 (-1)
6	208.99(+ α)	9.00 (0)	550 (1)
7	40.00(-1)	12.00 (1)	400 (0)
8	11.01 (- α)	9.00 (0)	550 (1)
9	110.00 (0)	4.76 (- α)	400 (0)
10	110.00 (0)	9.00 (0)	400 (0)
11	110.00 (0)	9.00 (0)	550 (1)
12	208.99(+ α)	9.00 (0)	240(-1)
13	11.01 (- α)	9.00 (0)	400 (0)
14	208.99(+ α)	9.00 (0)	400 (0)
15	180.00 (1)	12.00 (1)	400 (0)
16	40.00 (-1)	6.00 (-1)	240 (-1)
17	40.00 (-1)	12.00 (1)	550 (1)
18	180.00 (1)	6.00 (-1)	240 (-1)
19	110.00 (0)	13.24 (+ α)	400 (0)
20	180.00 (1)	6.00 (-1)	550 (1)
21	110.00 (0)	9.00 (0)	400 (0)
22	110.00 (0)	13.24 (+ α)	550 (1)
23	40.00 (-1)	6.00 (-1)	550 (1)
24	180.00 (1)	12.00 (1)	550 (1)
25	110.00 (0)	9.00 (0)	550 (1)
26	110.00 (0)	13.24 (+ α)	240 (-1)
27	110.00 (0)	9.00 (0)	240 (-1)
28	11.01 (- α)	9.00 (0)	240 (-1)
29	180.00 (1)	12.00 (1)	240 (-1)
30	110.00 (0)	4.76 (- α)	240 (-1)
Vrednosti za validaciju			
A	40	6.78	240
B	40	8	240

Tabela 4.3. Prave i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih vremena ekstrakcije (VE), odnos rastvarač/čvrsta faza (RČ) i snaga mikrotalasnog zagrevanja (SMT) ekstrakta taloga otpadne crne kafe na osnovu centralnog kompozitnog dizajna za RSM

Redni broj	Procesna promenljiva		
	VE (s)	RČ (ml/g)	SMT (W)
1	40.00 (-1) ^a	6.00 (-1)	400 (0)
2	180.00 (1)	6.00 (-1)	240 (-1)
3	40.00 (-1)	12.00 (1)	400 (0)
4	110.00 (0)	9.00 (0)	240 (-1)
5	180.00 (1)	12.00 (1)	240 (-1)
6	110.00 (0)	9.00 (0)	240 (-1)
7	208.99(+ α)	9.00 (0)	400 (0)
8	180.00 (1)	12.00 (1)	400 (0)
9	11.01 (- α)	9.00 (0)	400 (0)
10	11.01 (- α)	9.00 (0)	240 (-1)
11	110.00 (0)	9.00 (0)	560 (1)
12	110.00 (0)	9.00 (0)	400 (0)
13	180.00 (1)	12.00 (1)	560 (1)
14	110.00 (0)	9.00 (0)	560 (1)
15	110.00 (0)	4.76 (- α)	560 (1)
16	40.00 (-1)	6.00 (-1)	240 (-1)
17	110.00 (0)	13.24(+ α)	400 (0)
18	110.00 (0)	9.00 (0)	240 (-1)
19	11.01 (- α)	9.00 (0)	560 (1)
20	110.00 (0)	4.76 (- α)	240 (-1)
21	208.99(+ α)	9.00 (0)	560 (1)
22	180.00 (1)	6.00 (-1)	400 (0)
23	110.00 (0)	9.00 (0)	240 (-1)
24	110.00 (0)	4.76 (- α)	400 (0)
25	110.00 (0)	9.00 (0)	560 (1)
26	40.00 (-1)	6.00 (-1)	560 (1)
27	40.00 (-1)	12.00 (1)	240 (-1)
28	180.00 (1)	6.00 (-1)	560 (1)
29	110.00 (0)	9.00 (0)	400 (0)
30	40.00 (-1)	12.00 (1)	560 (1)
31	208.99 (+ α)	9.00 (0)	240 (-1)
32	110.00 (0)	13.24(+ α)	560 (1)
33	110.00 (0)	13.24(+ α)	240 (-1)
Vrednosti za validaciju			
A	40	12.00	240
B	180	12.00	400

4.2.5 Analiza odgovora (TOK espresso i crne kafe)

4.2.5.1 Ukupni prinos ekstrakcije (PE)

MAE je izvršena korišćenjem mikrotalasne rerne koja se koristi u domaćinstvima (SAMSUNG CE104VD, 1250 W). Ukratko, 3 g s.m. TOK je maceriran sa odgovarajućom zapreminom 20 % (v/v) etanola u Erlenmajerovim bocama od 250 ml. Ekstrakcija sa različitim VE, RČ i SMT je izvedena za talog espresso kafe prema eksperimentalnom modelu (tabela 4.2) u ukupnom broju od 30 uzoraka i za talog crne kafe prema eksperimentalnom modelu (tabela 4.3), u ukupnom broju od 33 uzorka. Nakon ekstrakcije, čvrsta faza je odvojena vakuum-pumpom (BÜCHI Vacuum Pump V-700) i ekstrakti su dopunjeni do početne zapremine za dalje analiziranje.

PE svakog od uzoraka je određen nanošenjem na standardnu krivu vrednosti suve materije dobijenu merenjem optičke gustine (zeleni filter, 570 nm) različitih koncentracija osušenih uzoraka, dobijenih korišćenjem Büchi Mini Spray Dryer B-290 (BüchiLabortechnik AG, Flawil, Switzerland) nakon rastvaranja u 20% (v/v) etanolu, koristeći 20 % (v/v) etanol kao slepu probu. Standardna kriva je prikazana u Prilogu 2, slika P 2.3.

4.2.5.2 Sadržaj ukupnih polifenola (UP)

UP je u ekstraktima otpadne espresso kafe meren korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa prema modifikovanoj metodi Dorđević i sar., (2010). Ukratko, vodeni rastvor (100 µl) ispitivanih uzoraka (podešenih na 1mg s.m. /ml) je mešan 60 s na Vortex-u sa 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 6 ml metanola. Posle toga, 2 ml 15 % Na₂CO₃ je dodato smeši koja je ponovo promešana na Vortex-u u trajanju od 30 s. Na kraju, rastvor je dopunjen do 10 ml dodavanjem destilovane vode. Apsorbancija je merena nakon 2 h na 750 nm na spektrofotometru UV/Vis Ultrospec 3300 Pro (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). Kao standardna kriva (od 1 do 1500 µg/ ml), korišćen je rastvor galne kiseline, a rezultati su izraženi kao mg galne kiseline (EGK - Ekvivalent galne kiseline) po g suve materije

ekstrakta. Standardna kriva za određivanje sadržaja ukupnih polifenola je prikazana u Prilogu 2, slika P 2.4.

4.2.5.3 Antioksidativna sposobnost DPPH• eseja

Sposobnost neutralizacije DPPH• radikala je metod koji se uobičajeno koristi za određivanje antioksidativne sposobnosti (Pisoschi & Negulescu, 2011). Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala ekstraktima otpadne espreso kafe je određena DPPH• metodom (Cuendet i sar., 1997). Ukratko, suvi ekstrakti su rastvoreni u destilovanoj vodi do koncentracije od 1 mg s.m./ml. Po 50 µl rastvora ekstrakta je dalje dopunjeno metanolom do 4 ml. Tom rastvoru je dodat 1 ml 0,2 mmol rastvora DPPH• u metanolu. Dobijeni rastvori su snažno promešani i ostavljeni na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 30 min inkubacije, absorbancija je merena u odnosu na slepu probu (metanol) na 517 nm, upotrebom spektrofotometra UV/Vis Ultrospec3300 Pro (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden).

Antioksidativna aktivnost određena primenom ove metode izražava se preko RSC vrednosti (kapacitet "hvatanja" radikala, eng: Radical scavenging capacity), koja se izračunava primenom jednačine:

$$\text{RSC (\%)} = [(A \text{ kontrole} - A \text{ uzorka}) / A \text{ kontrole}] * 100 \quad (4.4)$$

gde su, A kontrole - absorbancija kontrolne reakcije (koja sadrži sve reagense izuzev testiranog ekstrakta) a A uzorka - absorbancija testiranog ekstrakta. Askrobinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola i svi testovi su uradjeni u triplikatu.

4.2.5.4 FRAP metoda

FRAP metoda koristi antioksidanse kao redukujući agens, tzv. reduktans u redoks - kolorimetrijskoj metodi. Za procenu ukupne antioksidativne aktivnosti ETOK, FRAP metoda se zasniva na sposobnosti fenolnih jedinjenja, rastvornih u vodi (Szöllösi i Szöllösi, 2002), da redukuju Fe³⁺ do Fe²⁺. Nastali Fe²⁺ sa TPTZ reagensom (2,4,6-tripiridil-s-triazin)

stvara plavo obojeni kompleks (Pisoschi i sar., 2011). Ukratko, ETOK su rastvoreni u vodi do koncentracije od 1 mg/ml. 150 μ l rastvora je dodato u 4.5 ml radnog FRAP rastvora koji se sastoji od 25 ml acetatnog pufera (pH 3.6), 2,5 ml 10 mmol rastvora TPTZ-u 40 mmol HCl i 2.5 ml 20 mmol rastvora $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$. U FRAP metodi, žuto obojeni Fe^{3+} -TPTZ kompleks je redukovan do plavog Fe^{2+} -TPTZ kompleksa supstancama koje doniraju elektron, u kiseloj sredini. Bilo koja supstanca koja može donirati elektron sa upola ili nižim redoks potencijalom u poredjenju sa $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ će voditi ka reakciji formiranja plavo obojenog kompleksa. Slepa proba se sastoji iz FRAP reagensa. Za standardnu krivu je korišćen sveže pripremljen rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ različitih koncentracija (200, 400, 600, 800 i 1000 $\mu\text{mol/l}$). Apsorbancija je merena nakon 5 min na 593 nm korišćenjem spektrofotometra UV/Vis Ultrospec 3300 Pro (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden), a rezultati su izraženi kao mmol Fe^{2+} /l ekstrakta. Standardna kriva za određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakta TOK FRAP metodom je prikazana u Prilogu 2, slika P 2.5.

4.3 Ispitivanje uticaja napitaka i ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima *in vitro*

4.3.1 Priprema napitaka i ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe

Priprema uzoraka napitaka crne i espresso kafe, kao i prikupljanje taloga vršeni su na način opisan u odeljku 4.1.3. Ekstrakti taloga otpadne crne i espresso kafe izrađeni su primenom optimalnih uslova ekstrakcije, u pogledu definisanih parametara opisanih u poglavlju 4.2.4. Zbog nepoželjnog delovanja masnih komponenti prisutnih u ekstraktima taloga otpadne kafe, pokazanim u preliminarnim ispitivanjima, talozi su dodatno, a pre ekstrakcije, obezmašćivani tretiranjem n-heksanom, mućkanjem i dekantovanjem. Ostatak je osušen u struji azota i podvrgnut daljoj ekstrakciji na način opisan u odeljku 4.2.5.1.

4.3.2 Uzorkovanje krvi

Krv zdravih dobrovoljaca (n=5) uzorkovana je na tašte, nakon najmanje 12 sati gladovanja, u ranim jutarnjim časovima (8-9 sati), a uzorkovanju je prethodio period potpunog mirovanja u trajanju od najmanje 20 minuta. Krv je uzorkovana u skladu sa standardnim protokolima za određivanje markera aktivacije trombocita i agregacije trombocita i leukocita metodom protočne citometrije (Krueger i sar., 2002; Barnard i sar., 2003) koji podrazumevaju venepunkciju bez upotrebe poveske, korišćenje igle sa najmanjim promerom od 21 g, netraumatičnu venepunkciju i odbacivanje najmanje 2 ml krvi na početku uzorkovanja. Krv je uzorkovana u *Vacutainer* epruvetama sa natrijum-citratom (0.9%) kao antikoagulansom. Uzorci krvi su korišćeni u daljoj analizi odmah po venepunkciji, uz minimalnu manipulaciju uzoraka, na sobnoj temperaturi.

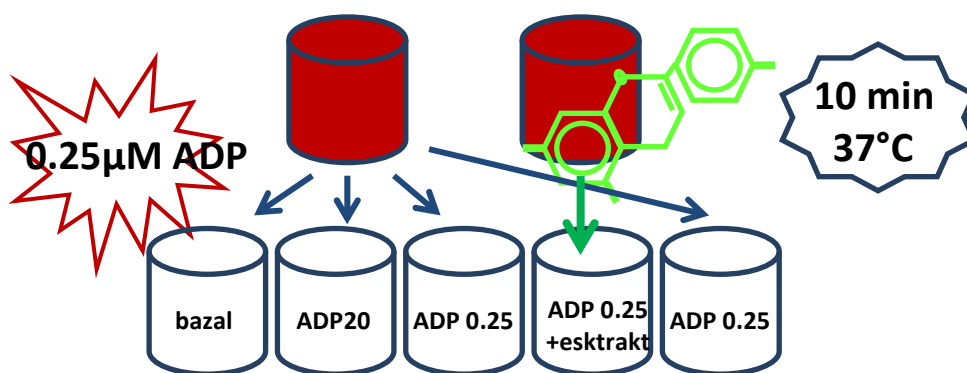
4.3.3 Određivanje parametara aktivacije trombocita

Površinski antigen CD61, kao pan-trombocitni marker, određen je uz pomoć antihumanog anti-CD61 antitela, obeleženog fluorescentnom bojom. Kao markeri aktivacije trombocita određivani su površinski antigeni P-selektin (CD62P) i GPIIb-IIIa, nakon *in vitro* delovanja ADP-a, kao agoniste aktivacije trombocita. Ekspresija ovih antigena određivana je korišćenjem antihumanih anti-CD2P (za P-selektin) i PAC1 (za GPIIb-IIIa) antitela, takođe obeleženih fluorescentnim bojama, primenom protočne citometrije. U eksperimentalnom radu korišćen je protočni citometar FACSCalibur, proizvođača BD Biosciences (SAD) sa integralnim CellQuest softverom za analizu dobijenih podataka. Ekspresija aktivacionih markera određivana je korišćenjem pune krvi ispitanika po prethodno opisanim metodama (Krueger i sar., 2002; Frelinger i sar., 2006).

Za ispitivanje delovanja analiziranih uzoraka kafe u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, prethodno opisana metoda modifikovana je u skladu sa metodom Frelingera i saradnika (2006). Radni rastvori ispitivanih uzoraka činili su napici crne i espresso kafe, kao i ekstrakti taloga otpadne kafe rastvoreni u DMSO-u (kao univerzalnom rastvaraču), u koncentraciji od 100 mg/mL. Puna krv ispitanika je odmah nakon venepunkcije razblažena HTP (HEPES - Tirodov pufer) rastvorom u odnosu 1:10. Alikvoti razblažene krvi (360 μ L) tretirani su rastvorima napitaka espresso i crne kafe i rastvorima ekstrakata taloga otpadne kafe u HTP-u standardizovanih tako da finalna koncentracija iznosi od 100, 50 i 25 μ g/ml EGK, i inkubirani 10 min na 37 °C. U istim eksperimentalnim uslovima alikvoti razblažene pune krvi inkubirani su sa DMSO-om u odgovarajućoj finalnoj koncentraciji, koji je korišćen kao negativna kontrola. Nakon inkubacije, alikvoti uzoraka (45 μ L) obeleženi su anti-CD61, anti-CD62P i PAC-1 antitelima (5 μ L) i odmah nakon toga tretirani rastvorima agonista, ADP-a u finalnim koncentracijama od 0,25 μ M. Jedan alikvot krvi netretiran ekstraktima, tretiran je naknadno ADP-om u koncentraciji of 20 μ M (slika 4.1). Nakon dodavanja agonista, ili HTP-a, uzorci su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završene inkubacije uzorci su fiksirani dodatkom CellFix rastvora (350 μ L), inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i odmah analizirani na protočnom citometru. Antihumana IgG1, IgG2 i IgM antitela korišćena su kao izotipske kontrole za određivanje

nespecifičnog vezivanja antitela. Optimalne zapremine korišćenih antitela određene su titracijom u okviru preliminarnih eksperimenata, korišćenjem krvi 5 zdravih ispitanika. Ekspresija analiziranih markera aktivacije određivana je u populaciji od 20000 trombocita (CD61 pozitivnih ćelija, CD61+) i izražena kao procenat P-selektin (CD62P+CD61+ćelija) i GPIIbIIIa (GPIIbIIIa+CD61+ćelija) pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji analiziranih trombocita. Aparat za protočnu citometriju nam omogućava da se tačno zada broj analiziranih ćelija, tzv. "gejtovanje" (eng: gate). 20 000 analiziranih trombocita predstavlja zapravo 20 000 ćelija koje na svojoj površini eksprimiraju CD61, odn. CD61+, pozitivnih ćelija. Ako se npr. u isto vreme doda i anti-CD61 i anti-CD62P (P-selektin), obeleženih fluorescentnim bojama, aparat registruje ćelije koje istovremeno svetle u dve boje (crveno i narandžasto), što nam govori o tome da se radi o trombocitima (anti-CD61) koji su aktivirani jer na svojoj površini eksprimiraju P-selektin.

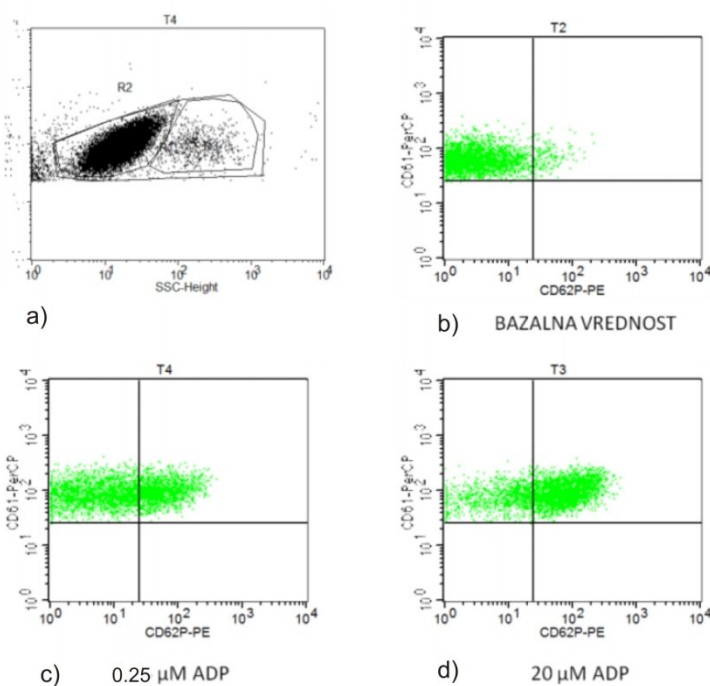
Šematski prikaz protokola dat je na slici 4.1.



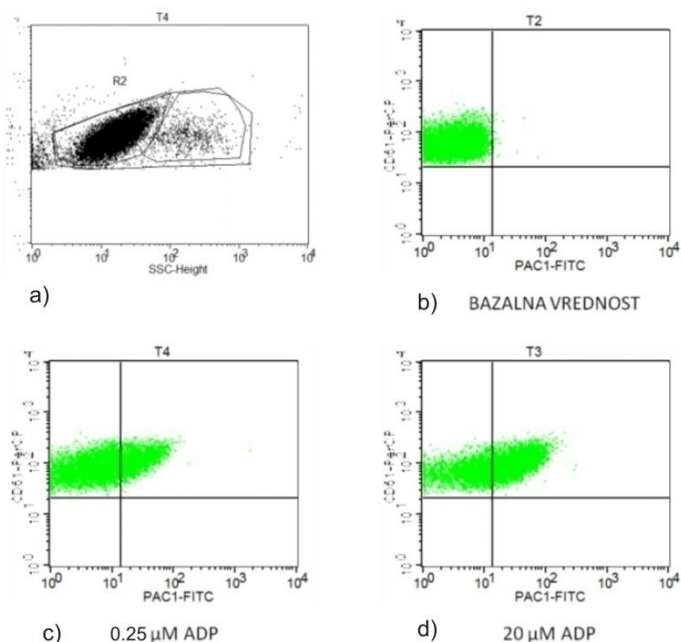
Slika 4.1. Šematski prikaz protokola

Reprezentativni anti CD61/anti CD62P i anti CD61/PAC-1 dijagrami u ukupnoj populaciji trombocita prikazanoj na FSC/SSC dijagramu u nestimulisanim uzorcima i uzorcima stimulisanim suboptimalnom i optimalnom koncentracijom ADP-a, prikazani su na slikama 4.2 i 4.3, respektivno.

Na osnovu položaja na FSC/SSC dijagramu određujemo populaciju od interesa, u ovom slučaju trombocite, slika 4.2 (a). Dalje posmatramo samo “gejtovanu” populaciju trombocita, u gornjem, desnom uglu na dijagramima, slika 4.2 u bazalnom statusu (b), i nakon dodatih suboptimalnih (c) i optimalnih (d), koncentracija agonista, ADP-a.



Slika 4.2. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije trombocita (a) i anti CD61 /anti CD62P dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,25 μ M ADP (c) i 20 μ M ADP (d).



Slika 4.3. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije trombocita (n = 20000) (a) i anti CD61 /PAC1 dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,25 μ M ADP (c) i 20 μ M ADP (d).

4.3.4 Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima

Agregati trombocita sa monocitima, TMA (eng: Platelet-monocyte aggregates, PMA) u ukupnoj populaciji monocita i agregati trombocita sa neutrofilima, TNA (eng: Platelet-neutrophil aggregates, PNA) u ukupnoj populaciji neutrofila određivani su u bazalnim uslovima i nakon *in vitro* delovanja agonista. Heterotipski agregati trombocita sa monocitima i neutrofilima određivani su korišćenjem pune krvi ispitanika po prethodno opisanim metodama (Barnard i sar., 2003; Michelson i sar., 2001), korišćenjem antihumanih anti-CD61, anti-CD11b i anti-CD14 antitela, obeleženih fluorescentnim bojama, primenom protočne citometrije. U eksperimentalnom radu korišćen je protočni citometar FACSCalibur, proizvođača BD Biosciences (SAD) sa integralnim CellQuest softverom za analizu dobijenih podataka.

U ispitivanju delovanja analiziranih ekstrakata kafe u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, puna krv tretirana je ispitivanim ekstraktima na isti način kao i uzorci razblažene krvi pri analizi markera aktivacije trombocita. Nakon inkubacije, 45 μ L krvi tretirane ispitivanim ekstraktima i DMSO-om obeleženo je anti-CD61, anti-CD11b i anti-CD14 antitelima i tretirano rastvorom ADP-a, kao agonista aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od (0,25 i 20 μ M). Alikvoti pune krvi obeleženi antitelima, bez dodatka agonista a uz dodatak iste zapremine HTP-a, korišćeni su za određivanje heterotipskih agregata u bazalnim uslovima. Nakon dodavanja agonista ili HTP-a, uzorci su inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završene inkubacije uzorci su lizirani dodatkom CellLysing rastvora (1mL), inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, ispirani dva puta rastvorom HTP-a, fiksirani CellFix rastvora (350 μ L), inkubirani nakon toga 15 minuta u mraku na sobnoj temperature i odmah analizirani na protočnom citometru. Antihumana IgG1 i IgG2 antitela korišćena su kao izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezivanja antitela. Optimalne zapremine korišćenih antitela određene su titracijom u okviru preliminarnih eksperimenata, korišćenjem krvi 5 zdravih ispitanika.

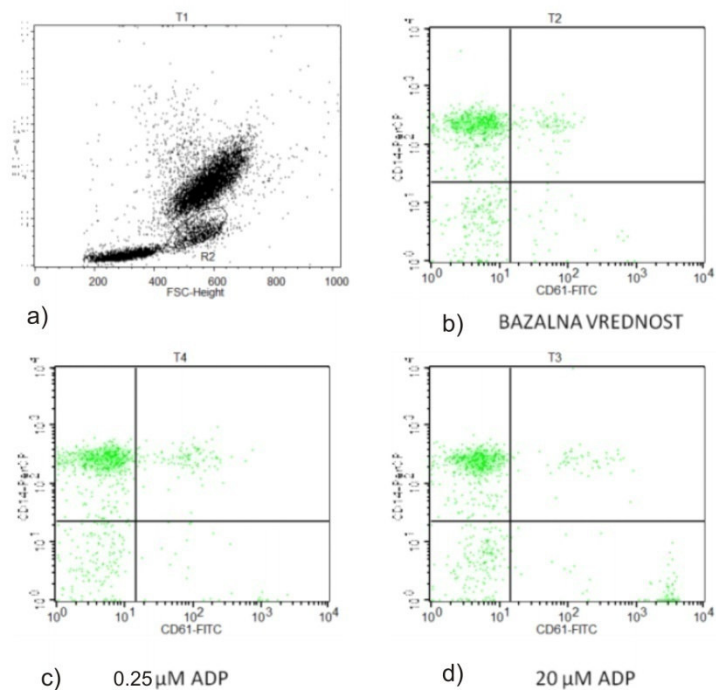
Monociti i neutrofilni su identifikovani na osnovu specifičnih karakteristika u pogledu veličine i granularnosti koje rezultuje karakterističnim položajem na FSC/SSC dijagramu.

U populaciji ćelija na FSC/SSC dijagramu koja po karakteristikama odgovara monocitima procenat agregata trombocita i monocita određivan je na osnovu relativne zastupljenosti (%) CD61+CD14+ događaja u ukupnoj populaciji monocita (CD14+ događaja). Analiza procenta agregata trombocita i monocita analizirana je u ukupnoj populaciji od 1000 monocita (CD14+ događaja). Dakle, ako u isto vreme dodamo i anti CD14 i anti CD61 antitela obeležena fluorescentnim bojama, ćelije koje istovremeno svelte sa dve boje su monociti na koje su se vezali trombociti.

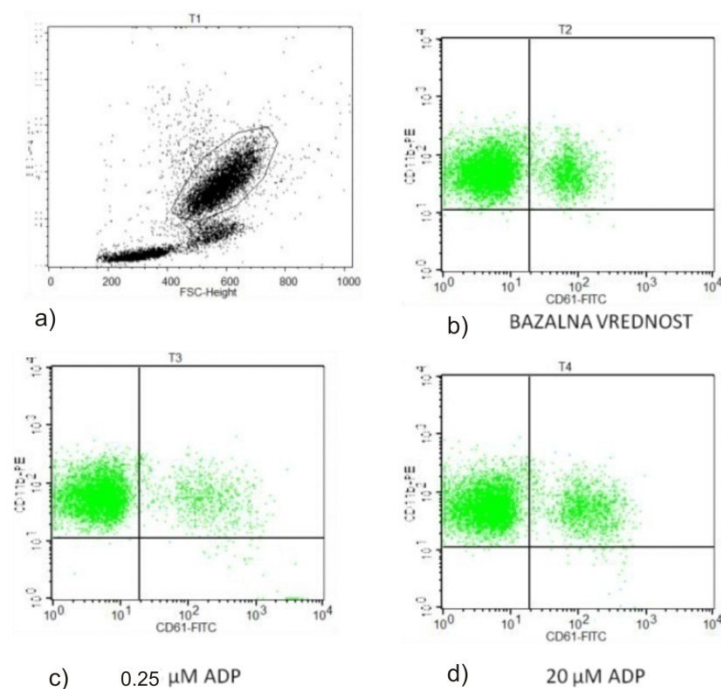
U populaciji na FSC/SSC dijagramu koja po karakteristikama odgovara neutrofilima, procenat agregata trombocita i neutrofila određivan je na osnovu relativne zastupljenosti (%) CD61+CD11b+ događaja u ukupnoj populaciji neutrofila (CD11b+ događaja). Analiza procenta agregata trombocita i neutrofila analizirana je u ukupnoj populaciji od najmanje 10000 neutrofila (CD11b+ događaja). Ako u isto vreme dodamo i anti CD11b i anti CD61 antitela obeležena fluorescentnim bojama, ćelije koje istovremeno svelte sa dve boje su neutrofilni na koje su se vezali trombociti.

Reprezentativni anti CD61/anti CD14 i anti CD61/anti CD11b u ukupnim populacijama monocita i neutrofila prikazanih na FSC/SSC dijagramu u nestimulisanim uzorcima, uzorcima stimulisanim suboptimalnom i optimalnom koncentracijom ADP-a prikazani su na slikama 4.4 i 4.5.

Isto kao i kod populacije trombocita, na osnovu položaja na FSC/SSC dijagramu određujemo položaj željene populacije, monocita ili neutrofila, "gejtujemo" je i dalje posmatramo promenu populacije u gornjem desnom uglu na dijagramima u bazalnom statusu i nakon delovanja suboptimalnih i optimalnih koncentracija ADP-a kao agonista, slike 4.4 (a) i 4.5 (a).



Slika 4.4. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije monocita (n=1000) (a) i anti CD61/anti CD14 dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,25 μ M ADP (c) i 20 μ M ADP (d)



Slika 4.5. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije neutrofila (n = min.10000) (a) i anti CD61/anti CD11b dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,25 μ M ADP (c) i 20 μ M ADP (d)

5 REZULTATI I DISKUSIJA

5.1 Nutritivni i nenutritivni sastav crne kafe koja se najviše konzumira u Srbiji – podaci za unos u Srpsku bazu podataka namirnica

5.1.1 Kontrola i obezbeđenje kvaliteta analitičkih podataka

U pogledu glavnih nutrijenata i mineralnog sastava, sve analitičke procedure, uključujući čuvanje uzoraka, analitički metod i internu i eksternu analitičku kontrolu kvaliteta, su sprovedene pod Internom i eksternom procedurom kontrole kvaliteta, kao deo primenjenog akreditacionog programa (ISO/IEC 17025, 2005) i u skladu sa EuroFIR smernicama za laboratorijske analize (Castanheira i sar., 2009).

U verifikaciju analiza je uključena procena preciznosti, tačnosti i limita kvantifikacije (eng: Limit of Quantification - LoQ). Limit kvantifikacije predstavlja minimalni sadržaj analita u ispitivanom uzorku, koji kvantitativno može biti određen sa opravdanom statističkom sigurnošću. Tačnost je određena na osnovu Sertifikovanog referentnog materijala (CRF) – BRC-381 (Pirinčano brašno, Sigma Aldrich) i Standardnog referentnog materijala (SRF) - NIST 1568a (Pirinčano brašno, National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, USA), a procenat iskorišćenja uzoraka na osnovu spajkovanja (eng: spiking) sa standardima elementa. Sprovođenje metoda je praćeno u toku analize spajkovanjem uzoraka sa standardima elemenata u toku svake serije. Relevantni podaci su prikazani u tabeli 5.1. Kompetentnost laboratorija je potvrđena regularnim učešćem u međulaboratorijskim ispitivanjima kontrole kvaliteta (eng: Interlaboratory proficiency testing, PT). Merenje tačnosti za minerale u SRF NIST 1568a je u rangu 96.25 % do 106.67 %.

Izračunat je takođe i indeks kvaliteta (eng: Quality Index - QI) podataka predviđenih za uključivanje u SBPSN (Oseredczuk et al., 2009). Evaluacija kvaliteta se zasniva na sledećim kategorijama: (1) opis hrane, (2) identifikacija komponenata, (3) plan uzorkovanja, (4) broj analitičkih uzoraka, (5) čuvanje uzoraka, (6) analitički metod i (7) analitička kontrola kvaliteta. Sistem nudi 8 ocena, po jedna za svaku od pomenutih

kategorija i jedna zbirna ocena, (8) QI. Kako se protokol ovog dela rada zasniva na poštovanju kriterijuma koji su opisani u smernicama za određivanje QI, QI je računat za svaku komponentu ponaosob. Za određivanje sadržaja minerala, zbirni QI izračunat kao suma individualnih ocena iznosi 34 (4+5+5+5+5+5+5); za sadržaj makronutrijenata ocena iznosi 34 (4+5+5+5+5+5+5); za sadržaj masnih kiselina i kofeina i hlorogenske kiseline iznosi 32 (4+5+5+5+5+5+2). Niža ocena u slučaju masnih kiselina i kofeina i hlorogenske kiseline je usled nedostatka metode za validaciju i adekvatnog referentnog materijala.

Tabela 5.1

Parametri kvaliteta metoda korišćenih za analizu nutrijenata pržene mlevene kafe i infuzija

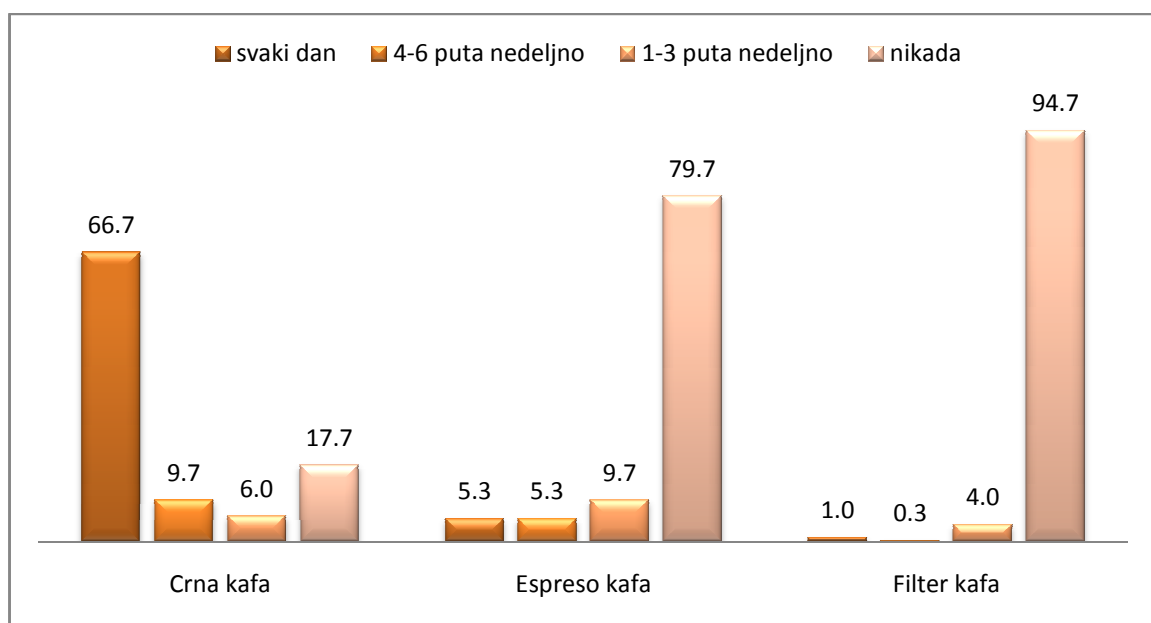
Parametar	Jedinica	Metod analiziranja	LoQ ¹	CRM/ SRM ²	Certifikovana vrednost± U ³	Analizirana vrednost
Proteini	g/100g	Kjeldahl	0.3	BRC-381 ⁴	1.25 ± 0.03	1.26 ± 0.03
Pepeo	g/100g	Paljenje u peći za žarenje	0.1	BRC-381 ⁴	0.86 ± 0.05	0.83 ± 0.03
Ukupni lipidi	g/100g	Kisela digestija, ekstrakcija etrom	0.1	BRC-381 ⁴	1.06 ± 0.20	1.2 ± 0.1
Dijetna vlakna	g/100g	AOAC 985.29	0.6	BRC-381 ⁴	8.2 ± 0.4	8.24 ± 0.3
Minerali		Atomska absorpciona spektrometrija				
Magnezijum	mg/kg		0.1	NIST 1568a ⁵	560 ± 20	549 ± 10.1
Kalcijum	mg/kg		1	NIST 1568a ⁵	118 ± 6	121 ± 7.6
Natrijum	mg/kg		1	NIST 1568a ⁵	6.6 ± 0.8	7.04 ± 0.53
Kalijum	mg/kg		1	NIST 1568a ⁵	1280 ± 8	1280 ± 13.4
Gvožđe	mg/kg		0.6	NIST 1568a ⁵	7.4 ± 0.9	7.23 ± 0.19
Mangan	mg/kg		0.2	NIST 1568a ⁵	20 ± 1.6	19.5 ± 0.65
Bakar	mg/kg		0.06	NIST 1568a ⁵	2.4 ± 0.3	2.31 ± 0.17
Cink	mg/kg		0.06	NIST 1568a ⁵	19.4 ± 0.5	19.6 ± 0.21

¹LoQ – Limit detekcije; ² CRM/ SRM – Sertifikovani / Standardni Referentni Materijal;³U –Nepouzdanost (eng: Uncertainty);⁴BRC-381 – Pirinčano brašno, Sigma Aldrich

⁵NIST 1568a-Pirinčano brašno, National Institute of Standards &Technology, Gaithersburg, USA

5.1.2 Procena vrsta kafe koja se najviše konzumira u Srbiji

Rezultati CHANCE anketnih upitnika, bazirani na FFQ, su pokazali da se crna kafa najviše konzumira među ispitanicima u Srbiji. Rezultati dobijeni na osnovu FFQ su potvrđeni 24-satnim upitnicima. Kao što je prikazano na slici 5.1, većina ispitanika (82.4%) uglavnom pije crnu kafu, pri čemu 66.7 % pije crnu kafu svakog dana. Espresso i filter kafu pije 20.3 i 5.3 % subjekata, respektivno. Takođe je pokazano da konzumiranje kafe zavisi od ekonomskog statusa, definisanog na osnovu EUROSTAT klasifikacije (EUROSTAT, 2013). Značajno više ljudi u populaciji sa srednjim primanjima je izjavilo da pije redovno više od dve šoljice kafe dnevno, u poređenju sa populacijom sa niskim primanjima, 53 % i 39.5 %, respektivno (dvosmerni test proporcija, $p = 0.026$). Samo 7 % participanata uopšte ne pije kafu, dok 44 % pije više od dve šolje kafe dnevno. Prema dobijenim podacima, espresso kafa se pije mnogo manje u odnosu na crnu kafu dok filter kafa skoro uopšte nije zastupljena na dnevnom meniju.



Slika 5.1. Potrošnja raznih vrsta kafe (crna, espresso i filter) u Srbiji, na osnovu CHANCE (CHANCE, 2013) anketa, izraženo u %

5.1.3 Ispitivanje tržišta kafe u Srbiji

Rezultati Brand Puls istraživanja su kao rezultat dali 10 najprodavanijih robnih marki crne kafe na srpskom tržištu (poređanih po opadajućoj frekvenciji kupovine): Grand gold, kafa iz lokalne pržionice, Grand Aroma, Grand DeLux, Doncafe Moment (crveno pakovanje), C coffee, Bonito, Doncafe Minas, Barcaffé i Premia (Brand Puls, 2012).

Informacije proizvođača o poreklu i sastavu kafe koje se nalaze na poledini pakovanja, date su u tabeli 5.2. Ti podaci su vrlo nedosledni i nepotpuni, a podaci o sastavu kafe su uglavnom proizvođačka tajna.

Tabela 5.2. Raspoloživi podaci o najzastupljenijim robnim markama crne kafe na srpskom tržištu

Proizvođač	Robna marka	Sastav ^b	Drugo
Grandkafa	Grand gold ^a	<i>C.arabica</i> : Rio Minas ^c i Santos ^c ; <i>C.robusta</i> : Cherry ^d + Afričke vrste	Samlevena na kamenu
Lokalna pržionica kafe		<i>C.arabica</i> 100%	
Grandkafa	Grand Aroma ^a	<i>C.arabica</i> : Santos ^c ; Cherry ^d + Afričke vrste	<i>C.robusta</i> : Samlevena na industrijskom mlinu
Grandkafa	Grand DeLux ^a	<i>C.arabica</i> : Rio Minas ^c iSantos ^c ; <i>C.robusta</i> : Cherry ^d + Afričke vrste	Samlevena na industrijskom mlinu
Strauss Adriatic doo.	Doncafe Moment ^a	<i>C.arabica</i> :Rio Minas ^c ; <i>C.robusta</i> : two vrste Vijetnamske kafe	
Strauss Adriatic doo.	C coffee ^a		
AtlanticGrupad.d.	Bonito ^a		Stepen prženja 3 ^e
Strauss Adriatic doo.	DoncafeMinas ^a	<i>C.arabica</i> : Rio Minas ^c (min 35%); <i>C.robusta</i> : Južna Azija icentralno Afričke vrste	
Grandkafa	Barcaffé ^a	<i>C.arabica</i> : Santos ^c ; Cherry ^d + Afričke vrste	<i>C.Robusta</i> : Samlevena na industrijskom mlinu
Robna marka supermarketeta	Premia ^a		

^a *C.arabica*/ *C.robusta* mešavina u nepoznatom tačnom odnosu; ^bInformacije dostupne na pakovanju ili dobijene od proizvođača (direktni kontakt ili vebajst); ^cPoreklom iz Brazila

^d Poreklom iz Indije; ^e Stepen prženja kafe dat od strane proizvođača

5.1.4 Hemijski sastav crne kafe

5.1.4.1 Makronutrijenti (proteini, ukupni lipidi, ugljeni hidrati, vlakna, voda, pepeo)

Rezultati analize makronutrijenata mlevene pržene kafe, kao i jake i slabe infuzije, pripremljene na tradicionalni način, dati su u tabeli 5.2.

Zasnovano na dobijenim energetske vrednostima, jaka i slaba infuzija (26 i 12 kJ/100 g, respektivno), crna kafa se može smatrati kao nisko – energetski napitak i ne predstavlja značajan dodatni izvor makronutrijenata, uključujući ugljene hidrate, proteine, masti i vlakna.

Sastav makronutrijenata za slabu i jaku infuziju je poređen sa podacima dobijenim iz 27 baza podataka o sastavu namirnica (BPSN) putem simultanog pretraživanja, korišćenjem EuroFIR FoodEXplorer (FoodEXplorer, 2013). Sadržaj proteina (0.1 g/100g za jaku i za slabu infuziju) je u rangu sadržaja proteina u drugim BPSN, koji se nalaze u opsegu od 0.067 g/100g u Švajcarskoj, do 0.3 g/100g u finskoj i portugalskoj BPSN.

Slično, sadržaj ukupnih lipida koji je generalno nizak, sa vrednostima od 0.1 g/100 g i 0.2 g/100 g (za slabu i jaku infuziju, respektivno), ne doprinosi značajno ukupnom unosu masti i u skladu je sa preuzetim podacima. Treba napomenuti da je sadržaj masti različit od nule u samo 5 od 27 pregledanih BPSN. Pregledane baze podataka ne sadrže podatke o vlaknima sadržanim u crnoj kafi. Na osnovu ispitivanja u ovom radu, ukupni sadržaj vlakana za slabu i jaku kafu je 0.3 i 0.6 g/100 g, respektivno. Ugljeni hidrati su izračunati iz razlike, prema formuli datoj ranije, uz pretpostavku da sadržaj organskih kiselina odgovara sadržaju hlorogenske kiseline. Izračunate vrednosti za jaku i slabu infuziju su 0.9 g/100 g i 0.3 g/100 g, respektivno. Stoga možemo zaključiti da su ugljeni hidrati glavna odrednica energetskog sadržaja u obe infuzije.

Tabela 5.2

Sadržaj makronutrijenata, energije, kofeina i hlorogenske kiseline u mlevenoj prženoj kafi i infuziji kafe (jaka i slaba)

	Energija (kJ /100 g)	Proteini (g /100 g)	Ukupni lipidi (g /100 g)	Ugljeni hidrati (g /100 g)	Vlakna (g /100 g)	Voda (g /100 g)	Suva materija (g /100 g)	Pepeo (g /100 g)	Kofein (mg /100 g)	Hlorogenska kiselina (mg /100 g)
KOD ^a	ENERC	PROT	FAT	CHO	FIBT	WATER	DRYMAT	ASH	CAFFN	CHLRAC
EuroFIR Metod Indikator ^b	MI0107	MI0123	MI1202	MI0183 ^c	MI1307	MI1103 MI0141	MI1103	MI1018	MI1212 MI1154	MI1212 MI1154
LanguaL™ kodovi za prženu mlevenu kafu ^d	A0710, A0845, A1243, A0892, B1305, C0295, E0106, F0014, G0005, H0391, J0174, K0027, M0173, M0351, N0042, N0039, P0026, R0517									
LanguaL™ kodovi za infuzije ^d	A0465, A1241, A0892, A0845, A0639, A0734, B1305, C0228, C0295, E0114, F0014, G0005, G0017, H0391, H0148, J0174, K0027, M0173, M0351, P0026, R0517									
Uzorak ^e										
Pržena mlevena kafa	1430	16.9 ± 0.5	17.6 ± 2.0	26.3	26.5 ± 2.8	3.8 ± 0.0	96.2	4.1 ± 0.0	3310 ± 86	3480 ± 58
Slaba infuzija ^f	12	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3	0.3 ± 0.0	98.9 ± 1.4	1.1	0.1 ± 0.0	70 ± 11	80 ± 8
Jaka infuzija ^g	26	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.9	0.6 ± 0.1	97.9 ± 2.0	2.1	0.2 ± 0.0	118 ± 10	136 ± 12

^a EuroFIR Identifikator komponenti (EuroFIR, Thesauri, 2014)

^b EuroFIR Identifikator metode (EuroFIR, Thesauri, 2014)

^c Računato na osnovu razlike, uključujući sadržaj kofeina i hlorogenske kiseline

^d The LanguaL™ Thesaurus, (LanguaL™, 2013)

^e Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost (n=3) ± SD

^f Slaba infuzija; 3.4 g mlevene kafe na 100 ml vode

^g Jaka infuzija; 6.9 g mlevene kafe na 100 ml vode

5.1.4.2 Kofein i hlorogenska kiselina

Rezultati za sadržaj kofeina i hlorogenske kiseline u pečenoj i infuzijama crne kafe dati su u tabeli 6.2. Dobijeni rezultati ukazuju na relativno visoku ekstraktibilnost bioaktivnih komponenti iz pržene kafe prilikom pripremanja napitka na tradicionalni način, sa 61.6% i 51.4% kofeina prisutnog u slaboj i jakoj infuziji, respektivno, izračunato prema sadržaju kofeina u pečenoj kafi.

Pored ekstraktibilnosti, sadržaj kofeina u kuvanoj kafi veoma zavisi od smeše koja se koristi od strane proizvođača, a prema percepciji potrošača. Većina konzumenata kuvane crne kafe u Srbiji preferira jaču aromu infuzije. U izlistanim BPSN na EuroFIR portalu (EuroFIR, 2014), samo italijanska (BDA, 2008) i kanadska (CNF, 2012) BPSN sadrže podatke o prosečnom sadržaju kofeina u crnoj kafi. Prema italijanskoj bazi, mlevena, pržena kafa sadrži 1000 do 2000 mg/100 g (suve mase) kofeina u zavisnosti od smeše (arabika ili robusta), dok šolja kafe, pripremljena sa približno 6 g mlevene kafe, sadrži 50 - 120 mg kofeina u zavisnosti od načina pripreme. Na osnovu kanadske BPSN, 100 g kafene infuzije sadrži 40 mg kofeina. Poredeći sa ovim podacima, tradicionalni način pripremanja kafe obezbeđuje viši sadržaj kofeina po jestivoj porciji. Na osnovu smernica kliničke prakse za unos kofeina u Kanadi, individualne dnevne preporuke za unos kofeina je manji od 400 mg/day (Health Canada, 2013). Prema „The American Medical Association Council on Scientific Affairs“, tri prosečne šolje (250 ml) kafe (oko 250 mg kofeina) dnevno (ili 5 porcija bezalkoholnih pića ili čaja koji sadrže kofein) se smatra prosečnom ili umerenom količinom kofeina (MedlinePlus, 2013). Prema istom izvoru, 10 šolja kafe (> 800 mg kofeina) dnevno se smatra prekomernim unosom kofeina. Naučni odbor o hrani Evropske unije (EU Scientific Committee on Food), razmatrajući efekte unosa kofeina (1999 i 2003) zaključio je da doza od 5 mg kofeina na kilogram telesne mase (300 mg za osobu od 60 kg telesne mase) može dovesti do prolaznih promena u ponašanju (povećano uzbuđenje, razdražljivost, nervoza ili anksioznost) (Food Standard Agency, 2013). Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da je unos kofeina kod srpske populacije uopšteno visok, uzimajući u obzir da 82.4% odraslih osoba pije crnu kafu svakog dana, jednom ili nekoliko puta dnevno.

Konzumiranje samo 200 ml jake infuzije, što je veoma često i društveno poželjno u Srbiji, doprinosi ukupnom dnevnom unosu sa više od 200 mg kofeina.

Na osnovu rezultata predstavljenih u tabeli 5.2, ekstraktibilnost hlorogenske kiseline je neznatno viša u poređenju sa kofeinom, sa 66.9 % i 56.5 % za slabu i jaku infuziju, respektivno, izračunato u odnosu na sadržaj u mlevenoj kafi. Sadržaj hlorogenske kiseline nije predstavljen u BPSN koje su navedene na EuroFIR portalu (EuroFIR, 2014). Dobijeni sadržaj hlorogenske kiseline u vrednosti od 80 i 136 mg/100g slabe i jake infuzije, respektivno, u skladu je sa sadržajem datim u radu Manach i sar. (2004), sa prosečnim sadržajem od 70 – 350 mg po šolji kafe. Brojni efekti hlorogenske kiseline uključuju smanjenje sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska kod zdravih ljudi sa uobičajenim unosom od 400 mg dnevno (Mubarak i sar., 2012). Skorašnja istraživanja Vinsona i sar., (2012) sugerišu da hlorogenska kiselina takođe može biti efikasna u smanjenju telesne mase, sa 1050 mg efektivne doze. Razmatrajući sadržaj hlorogenske kiseline u uzorcima jake infuzije, unos od 1050 mg se može dostići sa oko 8 šolja (800 ml) jake infuzije dnevno (uzimajući u obzir da se crna kafa u domaćem ambijentu u Srbiji pije iz malih šolja sa prosečnom zapreminom od 100 ml).

5.1.4.3 Masne kiseline

Ukupna količina, kao i količina pojedinih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima je prikazana u tabeli 5.3. Vrednosti za ukupne količine masnih kiselina u našim uzorcima su u saglasnosti sa vrednostima za ukupne lipide u pečenoj kafi u danskoj BPSN (DFCDB, 2009) i kafenoj infuziji u nekim studijama (Ratnayake i sar., 1993). Poredeći infuzije, jaka infuzija crne kafe ima veći sadržaj lipida (153 mg/100 g) u poredjenju sa slabom infuzijom (87.8 mg/100 g). U tom smislu bi bilo interesantno istražiti kako veličina porcije crne kafe utiče na ukupni sadržaj lipida.

Dobijeni rezultati za sastav masnih kiselina pržene kafe su u saglasnosti sa rezultatima predstavljenim u dosadašnjim radovima (Romano i sar., 2014). Nema puno literaturnih podataka koji se odnose na sastav masnih kiselina u kafenoj infuziji. Nađeno je da i slaba i jaka infuzija imaju sličan masnokiselinski sastav kao i uzorci pržene kafe.

Najzastupljenije masne kiseline su palmitinska (F16:0) i linolna (F18:2CN6). Procenat oleinske (F18:1) i stearinske (F18:0) kiseline iznosi oko 10 % i 8 %, respektivno. Druge identifikovane masne kiseline su: arahidonska (F20:0), behenska (F22:0), gondoinska (F20:1CN9) i α -linoleinska kiselina (F18:3CN3).

Mada infuzije kafe sadrže α -linoleinsku kiselinu, konzumiranje 1l crne kafe obezbeđuje samo oko 20 mg te kiseline. Uzimajući to u obzir, infuzija kafe se ne može smatrati značajnim dijetarnim izvorom n-3 masnih kiselina, koja je generalno niska kod stanovništva u Srbiji (Ristic-Medic i sar., 2013a).

Tabela 5.3
Individualne masne kiseline u prženoj mlevenoj kafi i infuzijama kafe (slaboj i jakoj)

Masne kiseline ^a	KOD ^b	EuroFIR Indikator metode ^c	Pržena mlevena kafa		Slaba infuzija ^d		Jaka infuzija ^e	
			mg/100g	%	mg/100g	%	mg/100g	%
Ukupne masne								
kiseline	FACID	MI0202	14600 ± 1350		87.8 ± 15.9		153 ± 15.3	
16:0	F16:0	MI1026	5230 ± 378	34.6 ± 0.60	32.5 ± 6.90	34.8 ± 1.04	54.2 ± 6.04	34.3 ± 0.58
18:0	F18:0	MI1026	1180 ± 130	8.00 ± 0.26	7.49 ± 1.46	8.28 ± 0.75	11.6 ± 1.72	7.49 ± 0.44
20:0	F20:0	MI1026	465 ± 85	3.22 ± 0.36	2.86 ± 0.69	3.22 ± 0.53	4.16 ± 0.79	2.71 ± 0.38
22:0	F22:0	MI1026	94 ± 14	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.13	0.77 ± 0.14	1.02 ± 0.19	0.68 ± 0.07
SFA ^f	FASAT	MI0208	6960 ± 607	46.5 ± 0.58	43.5 ± 8.89	47.0 ± 1.84	70.8 ± 8.74	45.1 ± 1.39
18:1	F18:1	MI1026	1470 ± 135	10.0 ± 0.06	9.01 ± 0.88	10.4 ± 1.01	16.4 ± 2.38	10.7 ± 1.62
20:1n-9	F20:1CN9	MI1026	52 ± 6	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.08	0.40 ± 0.02	0.52 ± 0.06	0.35 ± 0.03
MUFA ^g	FAMS	MI0210	1530 ± 141	10.4 ± 0.07	9.36 ± 0.96	10.8 ± 0.99	17.0 ± 2.44	11.1 ± 1.59
18:2n-6	F18:2CN6	MI1026	6000 ± 588	40.9 ± 0.83	34.2 ± 5.62	38.0 ± 1.34	63.3 ± 5.36	41.4 ± 1.06
18:3n-3	F18:3CN3	MI1026	154 ± 13	1.05 ± 0.03	0.95 ± 0.25	1.05 ± 0.14	1.79 ± 0.10	1.17 ± 0.08
PUFA ^h	FAPU	MI0212	6160 ± 601	41.9 ± 0.86	35.2 ± 5.86	39.1 ± 1.43	65.1 ± 5.47	42.5 ± 1.14
n-6	FACN6	MI0216	6000 ± 588	40.9 ± 0.83	34.2 ± 5.62	38.0 ± 1.34	63.3 ± 5.36	41.4 ± 1.06
n-3	FACN3	MI0216	154 ± 13	1.05 ± 0.03	0.95 ± 0.25	1.05 ± 0.14	1.79 ± 0.10	1.17 ± 0.08
Neidentifikovane MK				0.87 ± 0.26		2.95 ± 0.34		1.89 ± 0.28

^a Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost (n=3) ± SD

^b EuroFIR Identifikator komponenata (EuroFIR, Thesauri, 2014)

^c EuroFIR Indikator metode (EuroFIR, Thesauri, 2014)

^d Slaba infuzija; 3.4 g mlevene kafe na 100 ml vode

^e Jaka infuzija; 6.9 g mlevene kafe na 100 ml vode

^f Zasićene masne kiseline; ^g Mononezasićene masne kiseline; ^h Polinezasićene masne kiseline

5.1.4.4 Minerali

Sadržaj minerala kompozitnog uzorka pržene kafe, slabe i jake infuzije dat je u tabeli 5.4. Korišćenjem simultanog pretraživanja 27 BPSN preko EuroFIR FoodEXplorer-a (FoodEXplorer, 2013), pokazano je da se dobijene vrednosti za sastav minerala pržene kafe slažu sa raspoloživim vrednostima. Dobijeni sadržaj cinka u vrednosti od 0.6 mg/100g je neznatno van opsega od 0.71 do 0.92 mg/100 g, dobijenog pretraživanjem BPSN preko EuroFIR web portala. Isto važi i za kalcijum koji je u opsegu od 120 do 175 mg/100g (dobijena vrednost 110 mg/100g) i za gvožđe rangirano od 4.4 do 10.8 mg/100g (dobijena vrednost 3.9mg/100g). Za ostale minerale, dobijene vrednosti (date u zagradama) su u opsegu raspoloživih vrednosti iz drugih BPSN. Bakar je u opsegu od 0.82 do 2.5mg/100g (1.8mg/100g); mangan je u opsegu od 2.1 do 3.3 mg/100g (3.3 mg/100g); natrijum je rangiran od 2.1 to 74 mg/100g (14 mg/100g); kalijum je u opsegu od 1555 do 3750 mg/100g (1810 mg/100g) i magnezijum u opsegu od 181 do 320 mg/100g (220 mg/100g).

Dnevni referentni unos (eng: Dietary Reference Intakes – DRI) je referentna vrednost nutrijenata data Regulativom Evropske unije Br 1169/2011 (EU Regulation, 2011). DRI za merene minerale je data u tabeli 5.4. Prema istoj regulativi, 7.5 % dnevnog referentnog unosa, koje se obezbeđuje sa 100 ml, u slučaju napitaka, treba uzeti u obzir prilikom odlučivanja šta predstavlja značajnu količinu. Sa konzumiranjem jedne šolje jake infuzije kafe (100 ml), unos dostiže 5.5 % dnevnog referentnog unosa za kalijum, 3.5 % za mangan i 3.0 % za magnezijum. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da se ni jedan mineral ne može označiti kao značajan u pojedinačnoj dozi, s obzirom da ne dostiže vrednost od 7.5 % DRI, prema regulaciji EU, te se stoga konzumiranje jedne šolje ne može smatrati značajnim izvorom minerala u ljudskoj ishrani. Sa druge strane, konzumiranjem 200 - 300 ml kafe dnevno (2 – 3 šolje kafe) može se dostići 7.5 % dnevnog referentnog unosa, naročito u slučaju kalijuma (11 - 15.5 %, respektivno). Međutim, visoka potrošnja kafe čini istovremeno i veoma nizak nivo sadržaja drugih minerala značajnim (npr. cinka i mangana), uz potencijalni rizik da se podceni njihov dnevni unos, ukoliko bi se izrazili u BPSN kao trag. Velika količina minerala ostaje u otpadnoj kafi, nakon pripreme infuzije, što se može videti iz razlike sadržaja minerala u početnoj kafi, i u samoj infuziji.

Tabela 5.4

Mineralni sadržaj pržene mlevene kafe i infuzija kafe (jake i slabe) i unos minerala sa konzumiranjem jedne šolje (100 ml) jake kafe u poređenju sa DRI (%)

	Koncentracija ^a (mg/100g)								Suma ^b
	Kalijum	Magnezijum	Kalcijum	Natrijum	Gvožđe	Mangan	Bakar	Cink	
KOD ^c	K	MG	CA	NA	FE	MN	CU	ZN	
EuroFIR Indikator metode ^d	MI1017, MI1018, MI1006								
Pržena mlevena kafa	1810 ± 107	220 ± 8	110 ± 7	14 ± 3	3.9 ± 0.3	3.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.6 ± 0.0	2164
Slaba infuzija ^e	49 ± 3	5.0 ± 0.2	1.6 ± 0.0	4.9 ± 2.1	0.07 ± 0.02 ^j	0.04 ± 0.00 ^j	0.01 ± 0.00 ^j	0.01 ± 0.00 ^j	60.6
Jaka infuzija ^f	110 ± 10	11 ± 2	3.3 ± 0.2	7.6 ± 1.7	0.10 ± 0.02 ^j	0.07 ± 0.00 ^j	0.01 ± 0.01 ^j	0.02 ± 0.01 ^j	132
DRI (mg/d) ^g	2000	375	800	2400 ^h	14	2	1	10	
% nutritivne referentne vrednosti ⁱ	5.5	3.0	0.4	0.3	0.7	3.5	1	0.2	

^aSve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost(n=3) ± SD

^b Suma koncentracije metala

^cEuroFIRIdentifikator komponenata (EuroFIR,Thesauri, 2014)

^dEuroFIR Indikator metode(EuroFIR,Thesauri, 2014)

^eSlaba infuzija, 3.4 g mlevene kafe na 100 ml vode

^fJaka infuzija; 6.9 g mlevene kafe na 100 ml vode

^gDnevni referentni unos(Daily Reference Intakes - DRIs), na osnovu EU regulative1169/2011 (EU Regulation, 2011)

^hEkvivalentni sadržaj natrijuma izračunat na osnovu formule natrijum = so / 2.5

ⁱ% nutritivne referentne vrednosti koji se obezbeđuje unosom 100 ml jake infuzije (jedna solja)

^jIzuzetak od internacionalne preporuke za limit (Greenfield & Southgate, 2003) i kompajliranje u bazu podataka kao trag

5.2 Mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz taloga otpadne espresso kafe

Uticaj izbora i koncentracije rastvarača na ekstrakciju polifenola je detaljno ispitivana u većem broju radova (Bilek, 2010; Zhang i sar., 2012; Wu i sar., 2011). Za postupak mikrotalasne ekstrakcije u okviru ove teze, kao rastvarač je izabran etanol na osnovu literaturnih podataka o uticaju rastvarača na ekstrakciju polifenola iz otpadne kafe (Milutinović i sar., 2013). 20 % (v/v) rastvor etanola je odabran na osnovu preliminarnih rezultata ispitivanja uticaja koncentracije rastvarača. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Jokić i sar., (2010) koji takođe potvrđuju da niži procenat etanola u vodi pozitivno utiče na izdvajanje polifenola iz soje. Vodeni rastvor etanola je netoksičan i efikasan rastvarač i u isto vreme bio-rastvarač koji se može generisati u toku fermentacije različitih sirovih materijala, sa mogućnošću reciklovanja, što predstavlja osnovu za samoodrživ industrijski proces (Kiassos i sar., 2009).

5.2.1 Određivanje ukupnog prinosa ekstrakcije otpadne espresso kafe

Rezultati određivanja uticaja nezavisno promenljivih faktora definisanih u eksperimentalnom modelu prikazanom u tabeli 4.2. na ukupan prinos suvog ekstrakta su prikazani u tabeli 5.4. Tabela prikazuje eksperimentalno određene rezultate kao i rezultate predviđene dobijenim modelom. Ukupni prinos se kreće od 7,694 do 31.216 mg/g s.m. polaznog materijala (TOK). Maksimum prinosa je zabeležen pod sledećim eksperimentalnim uslovima: 180 s VE, 12 ml/g RČ i 560 W SMT (eksperiment 24). Najniži prinos je zabeležen pri sledećim uslovima: 40 s VE, 6 ml/g RČ i 400 W SMT (eksperiment 1). Na osnovu analize rezultata dobijenih u predstavljenom eksperimentu, povećanje VE, odnosa RČ i SMT dovodi do porasta vrednosti PE. Primenom multiple regresione analize eksperimentalnih podataka, polinom drugog reda koji daje funkcionalnu zavisnost između zavisnih i nezavisnih promenljivih dat je u tabeli 5.5.

Tabela 5.4. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti prinosa ekstrakcije (PE) iz taloga otpadne espresso kafe na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	PE (mg/g s.m. TOK)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	7.694^a	9.357	16.	8.408	6.836
2.	17.245	16.970	17.	25.741	23.699
3.	13.840	15.396	18.	21.534	21.165
4.	22.064	20.344	19.	26.678	24.860
5.	15.269	15.429	20.	23.109	22.992
6.	27.387	29.221	21.	14.729	16.279
7.	16.031	17.917	22.	28.270	29.076
8.	17.541	18.115	23.	13.823	15.139
9.	12.713	12.755	24.	31.216	31.552
10.	15.870	16.279	25.	21.228	20.494
11.	22.195	20.494	26.	22.578	24.011
12.	28.053	28.736	27.	15.112	15.429
13.	12.433	11.684	28.	10.451	8.471
14.	26.768	27.222	29.	30.581	29.725
15.	30.620	28.904	30.	11.277	11.905
Vrednosti za validaciju					
A	7.876*	7.694			
B	8.259*	8.565			

¹E – Eksperimentalne vrednosti

²P – Modelom predviđene vrednosti

^a**Bold** - Minimalne i maksimalne vrednosti

*Nije značajno

Tabela 5.5. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu espresso kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
Prinos ekstrakcije	$Y_{PE} = 16.195 + 5.546*A + 4.280*B + 2.533*C - 1.619*A*C + 1.587*A^2 + 1.264*B^2 + 1.766*C^2$
¹ A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)	

Za ocenu značajnosti modela i uticaja ispitivanih parametra na prinos ekstrakcije, u tabeli 5.6 prikazani su regresioni koeficijenti polinomne funkcije odziva dobijeni analizom varijanse (ANOVA). Svi linerni i kvadratni izrazi su veoma značajni kao i njihove interakcije ($p < 0.01$).

Tabela 5.6. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za prinos ekstrakcije iz otpadne espreso kafe

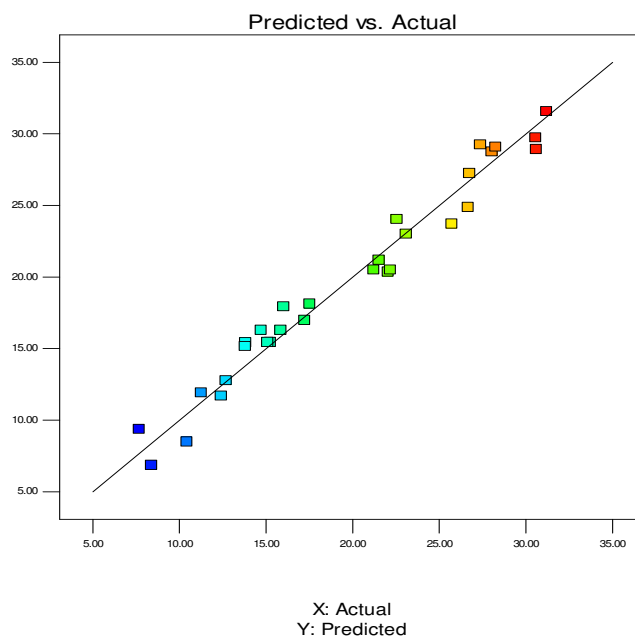
Izvor	PE
p^a - vrednost prob> F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	< 0.0001
C	< 0.0001
AC	0.0002
A ²	0.0005
B ²	0.0036
C ²	0.0044
Nedostatak uklapanja	0.0790
R-kvadratno	0.968599
Podešeno R-kvad.	0.958607
Predviđeno R-kvad.	0.940209
C.V. %	7.304383

^a $p < 0.01$ veoma značajno; $0.01 \leq p < 0.05$ značajno; $p \geq 0.05$ nije značajno

Najznačajnija reakcija između nezavisnih promenljivih je između A i C. Vrednost “lack of fit” (0.0790) koja daje procenu značajnosti odstupanja kontrolnih eksperimentalnih vrednosti od srednje vrednosti, odnosno da li su kontrolne eksperimentalne vrednosti pravilno raspoređene oko srednje vrednosti, potvrđuje da se sistem može dobro opisati dobijenom jednačinom. Odnos između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti pokazuje da su dobijene eksperimentalne vrednosti približne vrednostima predloženog modela, da su dobro raspoređene duž opsega dobijenih vrednosti, tj. da se ucrtane tačke grupišu oko dijagonalne linije kao što je prikazano na slici 5.2, ukazujući na dobro slaganje sa malom disperzijom, s obzirom na dobro slaganje predviđene vrednosti R-kvadrat koja iznosi 0.9586 sa prilagođenim R-kvadratom od 0.9402.

Design-Expert® Software
(Prinos)*1

Color points by value of
(Prinos)*1:
31.216
7.694

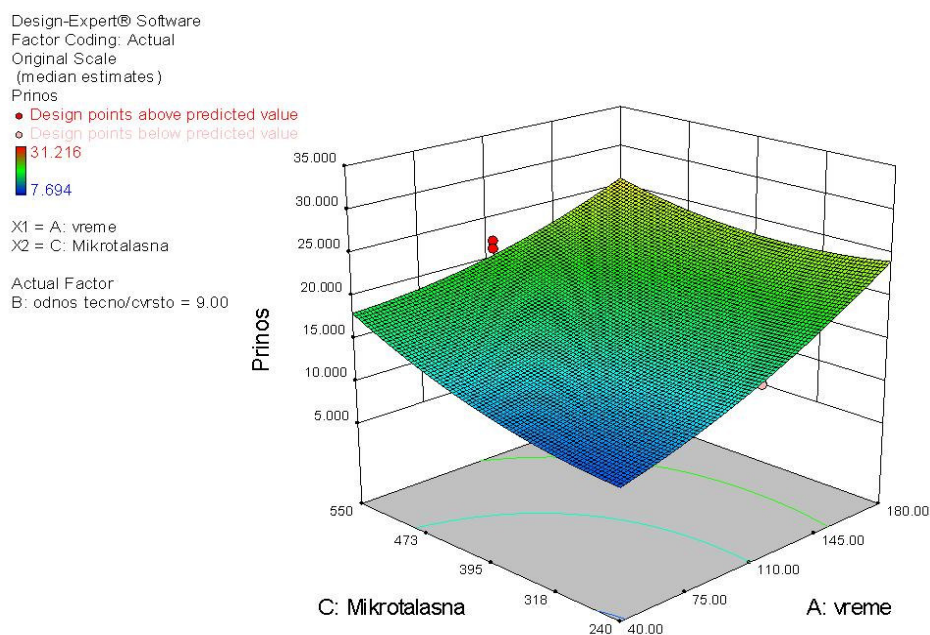
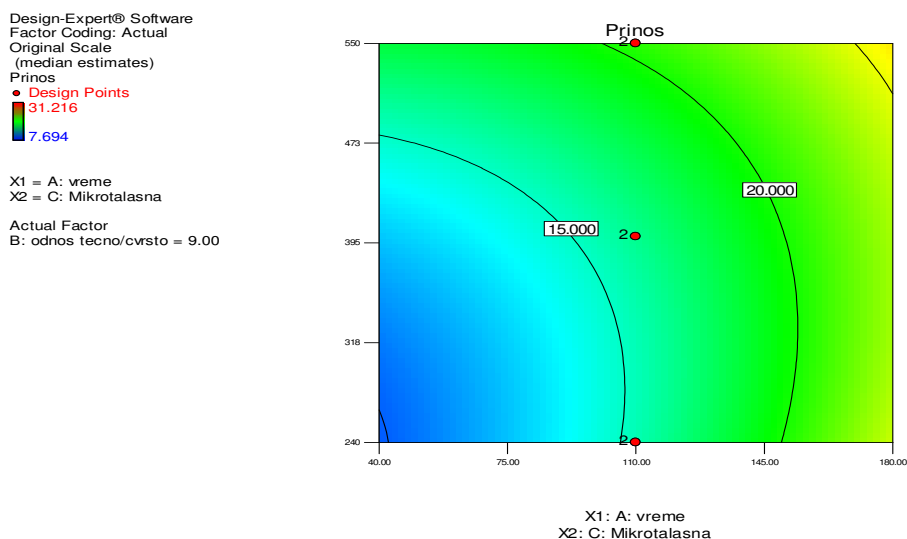


Slika 5.2. Slaganje eksperimentalnih sa modelom predviđenim vrednostima za ukupan prinos

Prilično niska vrednost koeficijenta varijanse C.V. % koja iznosi 7.304 ukazuje na visok stepen preciznosti i pouzdanosti eksperimentalnih vrednosti. Slika 5.3 prikazuje dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz uticaja A (VE) i C (SMT) na PE, ukazujući na značajnost sa p vrednošću od 0.0002. Primena mikrotalasne ekstrakcije u opsegu dužeg vremena ekstrakcije (160-180s) i uz primenu veće SMT (480-560 W) dovodi do porasta PE do maksimuma na određenom nivou. Eksperimenti za verifikaciju (A i B u tabeli 7), izvedeni pod predviđenim uslovima potvrđuju adekvatnost predviđenog modela.

U radu Upadhyay i sar., (2012), prinos ekstrakcije hlorogene kiseline i kofeina iz zelene kafe upotrebom MAE, raste sa porastom SMT sve do 800 W (što je ujedno i gornja granica upotrebljenog aparata). U radu Pan i sar., (2003) ekstrahovanje polifenola i kofeina iz zelenih listova čaja je rađeno korišćenjem SMT od 700 W. Chen and Spiro (1995) su zaključili u svom radu da koncentracija ekstrakata iz listova ruzmarina korišćenjem MAE raste sa upotrebljenom SMT. Međutim, Chemat i sar., (2005) su potvrdili da nema puno razlike u prinosu ekstrakcije iz semena kima pri porastu SMT od 50 do 150 W. Ova razlika se može pripisati različitoj prirodi biljnog materijala i komponenti koje se ekstrahuju.

Upadhyay i sar., (2012), su konstatovali veći prinos sa dužim vremenom ekstrakcije, do 300 s u poređenju sa 120 s. Međutim, vreme ekstakcije duže od 300 s nije dovelo do porasta prinosa. Pan i sar., (2003) su u svom radu dobili da MAE dostiže maksimum ekstrakcije kofeina i polifenola iz listova čaja nakon 240 s.



Slika 5.3. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međuodnosa parametara AB (VE – RČ)

5.2.2 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola otpadne espreso kafe

Predstavljeni eksperimentalni i predviđeni podaci za UP su dati u tabeli 6.7 i izraženi su kao procenat (% w/w) u suvom ETOK. Prinos se kreće od 18.83 do 79.83 % w/w. Maksimalni prinos je zabeležen u uzorku eksperimentu pod brojem 16, pod sledećim eksperimentalnim uslovima: 4 s VE, 240 W SMT i odnos rastvarač – čvrsta faza 6:1. Polinomna odzivna funkcija drugog reda za odzivne promenjive data je u tabeli 5.8. U tabeli 5.9 prikazana je analiza varijanse (ANOVA) modela ispitivanja ukupnog prinosa reakcije. Linerni i kvadratni član su veoma značajni ($p < 0.01$). Najznačajnija inetrakcija je pokazana između nezavisnih promenljivih A i C kao i B i C. Vrednost “lack of fit” u iznosu od 0.0679 ukazuje na adekvatno uklapanje modela sa eksperimentalno dobijenim vrednostima ($p > 0.05$).

Tabela 5.7. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti za ukupan sadržaj polifenola (UP) iz taloga otpadne espreso kafe na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	UP (% u suvom ekstraktu)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	55.918	49.631	16.	79.827	82.833
2.	29.423	29.763	17	41.100	44.584
3.	66.100	64.563	18.	39.010	46.054
4.	19.055	24.547	19.	26.464	24.250
5.	69.372	59.380	20.	33.691	27.407
6.	31.100	30.082	21.	41.945	37.528
7.	46.286	42.368	22.	36.918	34.085
8.	54.782	50.051	23.	39.827	41.528
9.	30.464	34.522	24.	27.055	30.463
10.	36.327	37.528	25.	36.645	40.067
11.	37.555	40.067	26.	31.736	38.318
12.	29.100	33.373	27.	68.645	59.380
13.	48.372	55.266	28.	76.464	85.386
14.	19.055	19.791	29.	29.418	27.784
15.	18.827	17.283	30.	71.555	64.156
Vrednosti za validaciju					
A	76.941*	79.641			
B	82.453*	80.362			

¹E – Eksperimentalne vrednosti

²P – Modelom predviđene vrednosti

^aBold - Minimalne i maksimalne vrednosti

*Nije značajno

Tabela 5.8. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu espresso kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
Ukupan sadržaj polifenola	$Y_{UP} = 37.83 - 12.72*A - 3.80*B - 9.66*C + 5.66*A*C + 5.33*B*C - 4.07*B^2 - 11.90*C^2$
¹ A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)	

Tabela 5.9. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za ukupan sadržaj polifenola iz otpadne espresso kafe

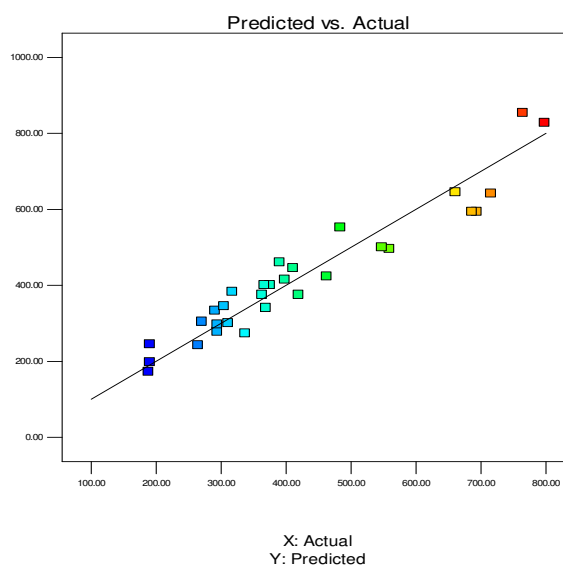
Izvor	UP
p^a - vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	0.0040
C	< 0.0001
AC	0.0007
BC	0.0013
B ²	0.0087
C ²	< 0.0001
Nedostatak uklapanja	0.0679
R-kvadratno	0.918165
Podešeno R-kvad.	0.892127
Predviđeno R-kvad.	0.844539
C.V. %	13.667171

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

Design-Expert® Software
(Sadržaj polifenola)¹

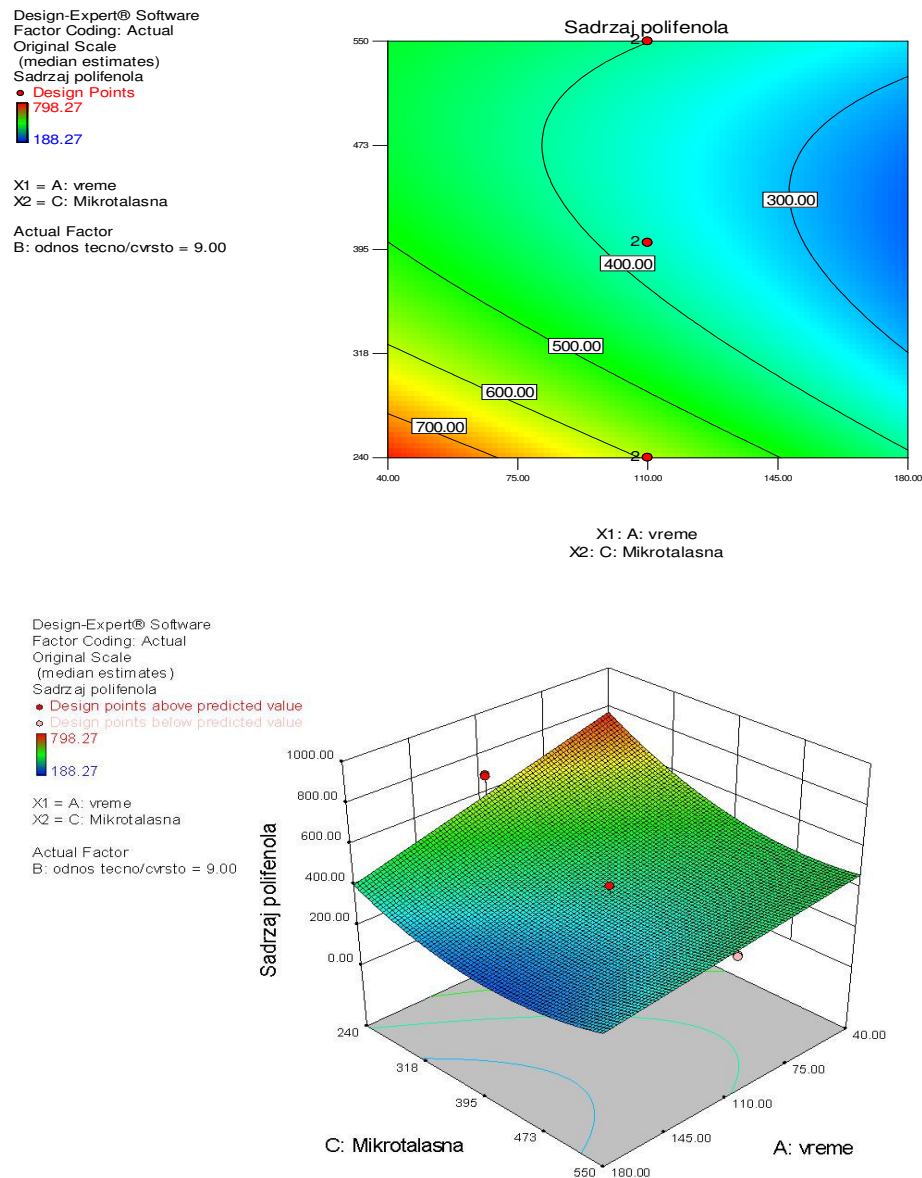
Color points by value of
(Sadržaj polifenola)¹:

■ 798.27
■ 188.27

**Slika 5.4.** Slaganje eksperimentalnih sa modelom predviđenim vrednostima za ukupan sadržaj polifenola

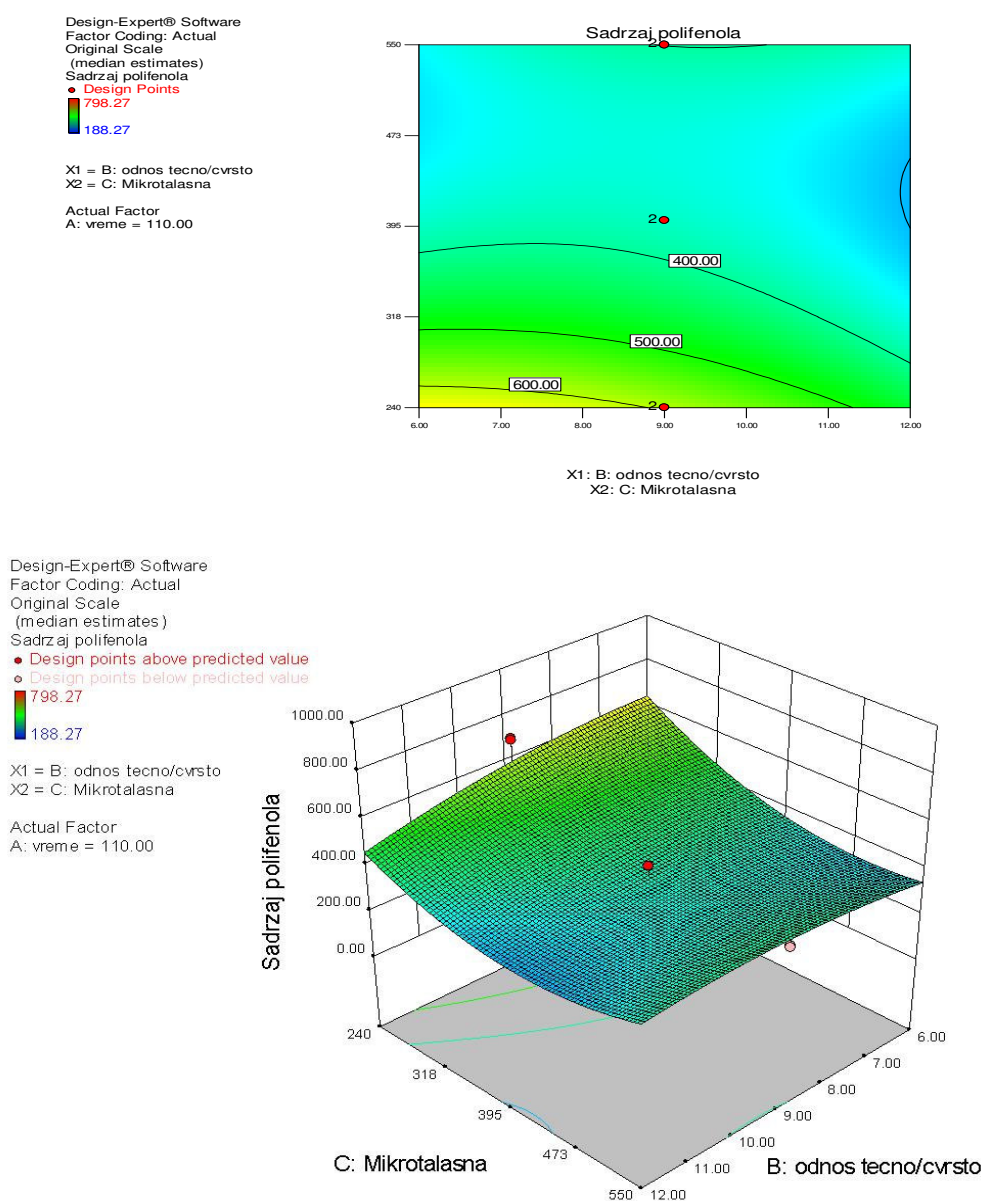
Odnos između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti pokazuje da se ucrtane tačke grupišu oko dijagonale, kao što je prikazano na slici 5.4, ukazujući na dobro slaganje sa malom disperzijom, sa vrednošću R-kvadratno 0.845 i R-podešeno od 0.892. Koeficijent varijanse C.V.% u iznosu od 13.667, ukazuje na zadovoljavajući stepen slaganja preciznosti i pouzdanosti eksperimentalnih vrednosti.

Slika 5.5 daje dvodimenzioni i trodimenzioni grafik odzivne površine UP pod uticajem nezavisnih promenljivih A (VE) i C (SMT), označenih kao značajnim sa vrednošću p od 0.0007.



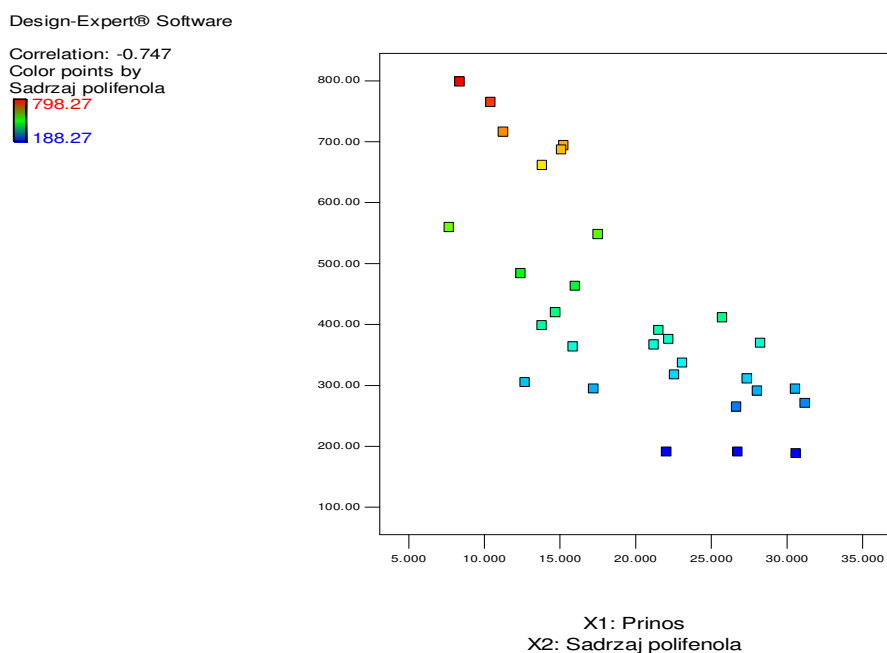
Slika 5.5. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AC (VE – SMT)

Slika 5.6 daje dvodimenzioni i trodimenzioni grafik odzivne površine UP pod uticajem nezavisnih promenljivih B (odnos tečno-čvrsto) i C (snaga mikrotalasa), sa vrednošću $p = 0.0013$. Rezultati ukazuju na to da kraće VE (40 – 110 s) i niži opseg SMT (240 – 320 W) doprinose višem sadržaju UP.



Slika 5.6. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međudnosa parametara BC (TČ–SMT)

Slični rezultati koji se odnose na VE i SMT, mogu se naći u radu Zhang i sar., 2012, u kome je vreme ekstrakcije od 35 s dovoljno da se dostigne maksimalni prinos polifenola iz semena lotosa, sa korišćenjem SMT od 400 W, pri čemu dalji porast ova dva faktora vodi ka opadanju prinosa polifenola. Somporn i sar., 2011 su pokazali da primenjena temperature u procesu prženja kafe može uticati na UP u ekstraktima kafe i da viša temperature i duže vreme prženja kafe vodi porastu UP u ekstraktima. Uticaj odnosa rastvarača prema čvrstoj fazi je teže porediti sa drugim autorima, imajući u vidu da je u ovom radu korišćen niži nivo odnosa TČ, pri užem ispitivanom opsegu (od 4.76 do 13.24 ml/g TOK). Neki istraživači su pokazali da je ukupni prinos polifenola viši sa višim odnosom TČ. Na primer, Mussatto i sar., 2011a pokazali su da je 25 puta odnos TČ rastvora metanola (u opsegu 10 - 50) optimalan za procenat iskorišćenja polifenola iz TOK. Zuorro i Lavecchia, 2012 su zaključili u svom radu da porast odnosa rastvarača i čvrste faze (u opsegu 10-50 ml/g) doprinosi višem sadržaju polifenola u ETOK. Međutim, Franco i sar. (2008), su pokazali da je izdvajanje polifenola iz komine grožđa bio viši sa smanjenjem odnosa TČ (u opsegu 1-5 ml/g rastvora etanola). Poredeći dobijene rezultate UP sa rezultatima PE (ukupno ekstrahovana suva materija ekstrakta), jasno je da je UP obrnuto proporcionalan PE, što je prikazano na slici 5.7. Vrednost korelacionog faktora iznosi -0.747, sa negativnim nagibom. Ekperimentalni uslovi optimalni za maksimum ukupnog PE (duže VE, viši odnos TČ, i veća vrednost SMT) nisu u isto vreme optimalni i za maksimalni sadržaj UP (kraće VE, niži odnos TČ, i manja vrednost SMT). Moguće objašnjenje za ovakav ishod eksperimenta je da ekstrakti sa višim sadržajem suve materije takođe sadrže i povećani sadržaj balastnih komponenti kao što su polisaharidi, proteini i lipidi, čime se proporcionalno smanjenje sadržaja UP (Mussatto i sar., 2011b). Sličan rezultat se može videti u radu Wu i sar., 2011 kada se preračuna doprinos UP u ukupnom prinosu.



Slika 5.7. Prikaz korelacije između sadržaja polifenola i ukupnog prinosa ekstrakcije

5.2.3 Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga espresso kafe određena metodom inhibicije DPPH radikala

Eksperimentalni i predviđeni uslovi za antioksidativnu aktivnost ETOK određenu DPPH metodom dati su u tabeli 5.10. Antioksidativna aktivnost se kreće u opsegu od 35.56 % u eksperimentu 6 do 98.24 % u eksperimentu 28 pod sl. eksperimentalnim uslovima: 11 s VE, odnos TČ jednak je 9 i SMT od 240 W. Polinomna odzivna funkcija drugog reda za odzivne promenjive data je u tabeli 5.11. U tabeli 5.12 prikazana je analiza varijanse (ANOVA) regresionog modela. Korišćeni model se pokazao kao značajan ($p < 0.01$).

Tabela 5.10. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti antioksidativne aktivnosti taloga otpadne espreso kafe određene DPPH metodom, na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	DPPH (%)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	81.520	77.860	16.	91.630	92.545
2.	51.870	51.784	17.	61.290	64.131
3.	91.350	92.584	18.	54.320	56.213
4.	45.250	47.786	19.	59.140	62.673
5.	80.600	78.097	20.	42.110	39.885
6.	36.560	35.088	21.	67.390	66.541
7.	77.870	77.899	22.	54.090	51.839
8.	70.760	69.322	23.	63.470	64.093
9.	64.050	62.618	24.	41.770	39.924
10.	64.520	66.541	25.	54.330	55.707
11.	54.240	55.707	26.	78.100	74.229
12.	51.380	48.904	27.	79.610	78.097
13.	85.860	84.305	28.	98.240	100.286
14.	39.070	41.773	29.	56.710	56.251
15.	45.320	47.824	30.	72.260	74.174
Vrednosti za validaciju					
A	92.963*	92.593			
B	93.912*	94.289			

¹E - Eksperimentalne vrednosti

²P - Modelom predviđene vrednosti

^aBold - Minimalne i maksimalne vrednosti

*Nije značajno

Tabela 5.11. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu espreso kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
DPPH	$Y_{DPPH} = 66.902 - 15.135*A + 0.019*B - 11.195*C + 3.031*A*C - 1.751A^2 - 1.948*B^2$
¹ A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)	

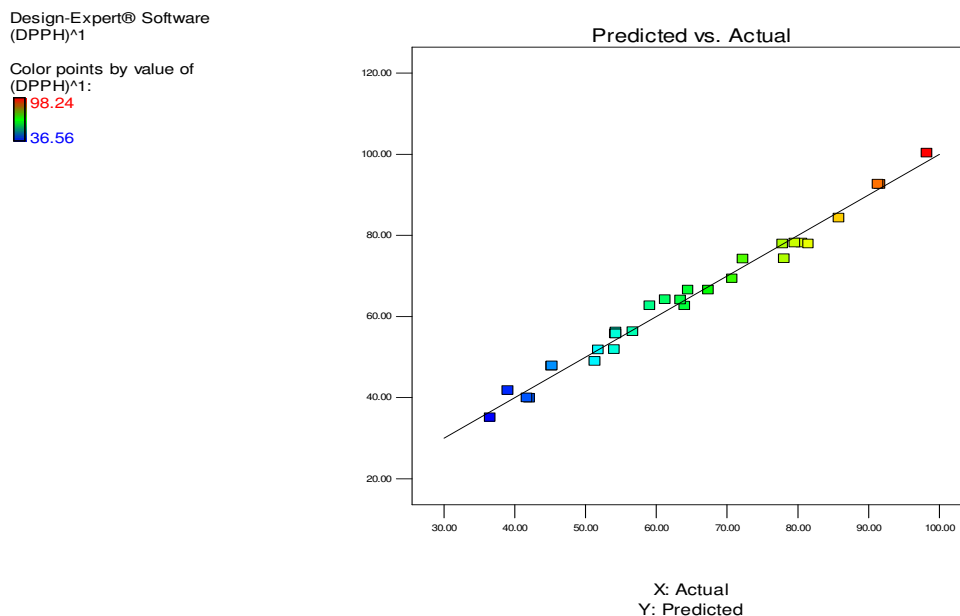
Tabela 5.12. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odyiva antioksidativne aktivnosti taloga otpadne espreso kafe određene DPPH metodom

Izvor	DPPH
p^a - vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	0.9684
C	< 0.0001
AC	< 0.0001
A ²	0.0117
B ²	0.0057
Nedostatak uklapanja	0.1377
R-kvadratno	0.984501
Podešeno R-kvad.	0.980458
Predviđeno R-kvad.	0.97341
C.V. %	3.710808

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

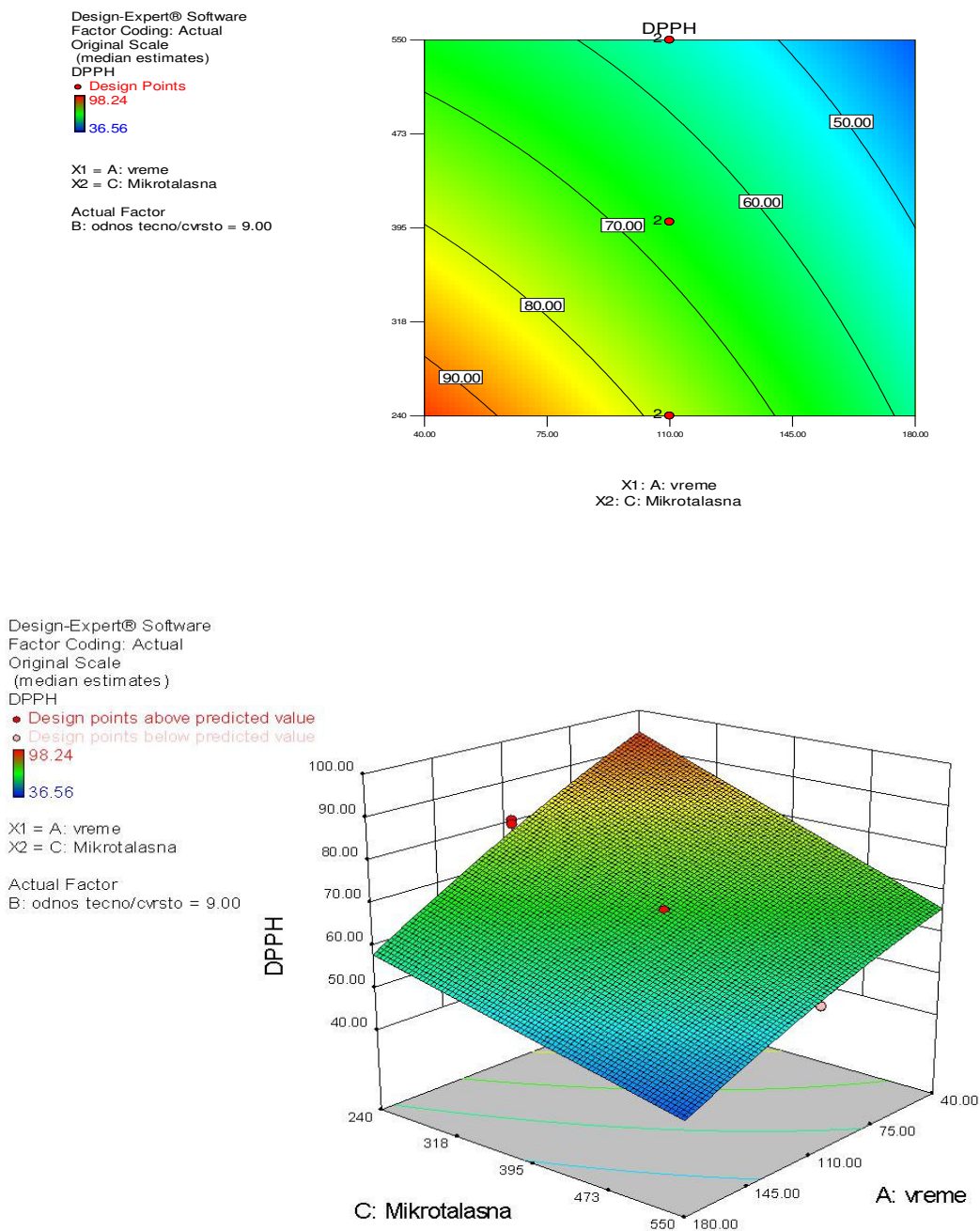
Najznačajnija je interakcija između nezavisnih varijabli A i C. Vrednost “lack of fit” od 0.1377, ukazuje da se model adekvatno uklapa sa eksperimentalno dobijenim vrednostima (p > 0.05). Odnos između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti pokazuje da se tačke grupišu oko dijagonalne linije (slika 5.8) pokazujući dobro slaganje sa malom disperzijom, sa vrednostima za predviđeno R² od 0.97341 i podešeno R² od 0.9805, R² je 0.9845. Koeficijent varijanse C.V.%, 3.711 ukazuje na veoma visok stepen preciznosti eksperimentalnih vrednosti.

Na slici 5.9 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti koji pokazuje kako A i C utiču na DPPH, sa značajnošću p < 0.001. Kraće vreme MAE (11 – 40 s) sa upotrebom nižeg opsega SMT (240 – 400 W), rezultuje višim procentom neutralizacije DPPH radikala.



Slika 5.8. Slaganje eksperimentalnih sa modelom predviđenim vrednostima za DPPH

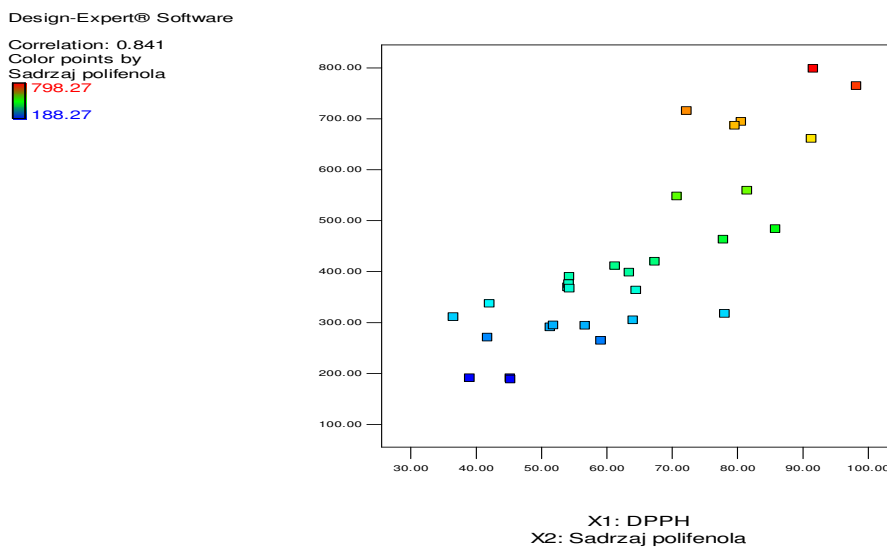
Ovakvi rezultati su u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola (slika 5.10), i obrnuto su srazmerni ukupnom prinosu ekstrakcije (slika 5.11). Faktor korelacije sa sadržajem polifenola iznosi 0,841 a sa prinosom -0,786. Antioksidativna aktivnost ekstrakta otpadne espresso kafe je generalno veća (70 % - 100 %) u uzorcima u kojima je određen veći sadržaj polifenola (650 – 800 mg EGK/g.sm.ekstrakta) i manji sadržaj ukupne suve materije (od 8.5 do oko 15.5 mg/g s.m. ekstrakta).



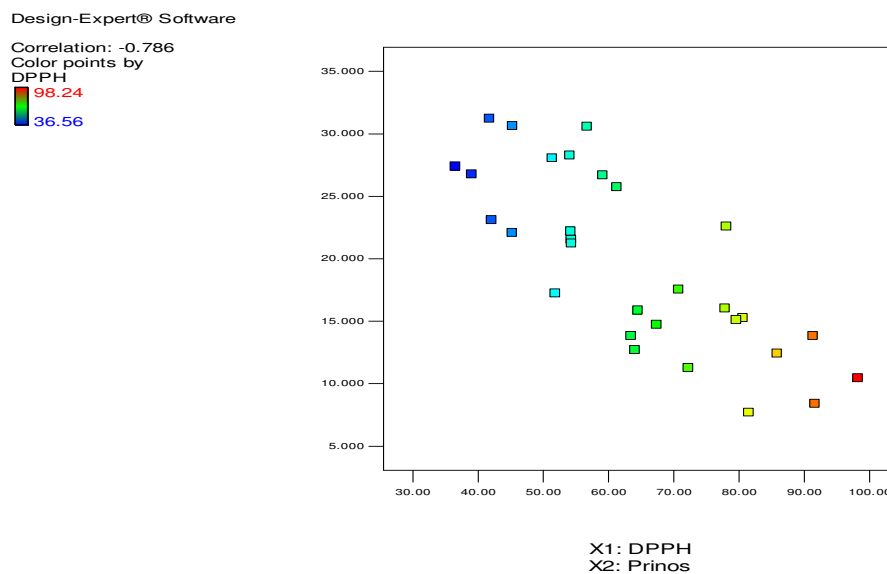
Slika 5.9. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AC (odnos VE i SMT)

Treba napomenuti da su uzorci u predstavljenom eksperimentu korigovani na koncentraciju od 1 mg/ml, tako da rezultati takođe potvrđuju uticaj ispitivanih faktora na odnos UP u ukupnom čvrstom ETOK. U drugim radovima je takođe primećen pozitivan

odnos između sadržaja UP i DPPH inhibitorne aktivnosti (Franco i sar., 2008, Wang i sar., 2011).



Slika 5.10. Prikaz korelacije između sadržaja polifenola i DPPH



Slika 5.11. Prikaz korelacije između ukupnog prinosa ekstrakcije i DPPH

5.2.4 Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga espresso kafe određena FRAP metodom

Eksperimentalne i predviđene vrednosti za antioksidativni kapacitet ETOK određeni FRAP metodom, dati su u tabeli 5.13. Antioksidativna aktivnost se kreće između 2.620 mmol Fe²⁺/l, eksperiment 12, sve do 6.660 mmol Fe²⁺/l u eksperimentu 28, pod eksperimentalnim uslovima od 11 s VE, 9 odnos TČ i 240W SMT. Polinomna funkcija drugog reda za odzivne promenjive data je u tabeli 5.14.

Tabela 5.13. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti antioksidativne aktivnosti taloga otpadne espresso kafe određene FRAP metodom, na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	FRAP (mmol Fe ²⁺ /l)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	4.440	4.723	16.	6.660	6.919
2.	3.940	4.282	17.	3.430	3.227
3.	6.260	6.142	18.	3.850	4.181
4.	3.540	3.173	19.	2.990	3.347
5.	5.910	5.498	20.	3.440	3.566
6.	2.750	2.751	21.	3.460	3.896
7.	3.860	3.947	22.	3.130	3.184
8.	3.670	3.370	23.	4.040	4.004
9.	4.870	4.445	24.	2.630	2.790
10.	3.560	3.896	25.	3.440	3.733
11.	4.170	3.733	26.	5.290	4.949
12.	2.620	2.890	27.	5.860	5.498
13.	4.240	4.320	28.	6.660	6.761
14.	2.630	2.127	29.	2.940	3.405
15.	2.680	2.396	30.	6.240	6.047
Vrednosti za validaciju					
A	6.647*	6.775			
B	6.782*	6.660			

¹ E - Eksperimentalne vrednosti

² P - Modelom predviđene vrednosti

^a Bold - Minimalne i maksimalne vrednosti

*Nije značajno

Tabela 5.14. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu espresso kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
FRAP	$Y_{FRAP} = 3,924 - 0,794*A - 0,388*B - 0,883*C - 0,557*A*C - 0,336*A^2 + 0,693*C^2$

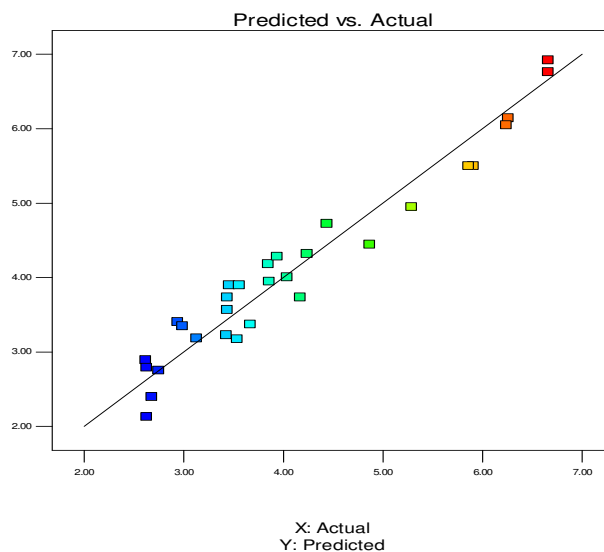
¹A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)

Tabela 5.15. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih antioksidativne aktivnosti taloga otpadne espresso kafe određene FRAP metodom

Izvor	FRAP
p^a - vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	< 0.0001
C	< 0.0001
AC	< 0.0001
A ²	0.0005
C ²	< 0.0001
Nedostatak uklapanja	0.4664
R-kvadratno	0.943311
Podešeno R-kvad.	0.928522
Predviđeno R-kvad.	0.90661
C.V. %	8.324233

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

U tabeli 5.15 prikazana je analiza varijanse (ANOVA) regresionog modela. Iskorišćeni model je značajan (p<0.01) sa svim značajnim parametrima. Najznačajnija reakcija između nezavisnih promenljivih je između A i C. Vrednost "lack of fit" koja iznosi 0.4664 ukazuje da model adekvatno odgovara eksperimentalnim podacima (p>0.05). Odnos između predviđenih i eksperimentalnih vrednosti pokazuju da se tačke grupišu oko dijagonalne linije (slika 5.12) ukazujući na dobro slaganje sa malom disperzijom. R² modela iznosi 0.9433, što potvrđuje da model adekvatno prikazuje odnos između izabranih parametara koji se prate. Koeficijent varijanse koji iznosi C.V.% = 8.324 ukazuje na visok stepen preciznosti i pouzdanost eksperimentalnih vrednosti. A i C parametri utiču na FRAP vrednost sa značajnošću p < 0.0001.

Design-Expert® Software
(FRAP)*1Color points by value of
(FRAP)*1:

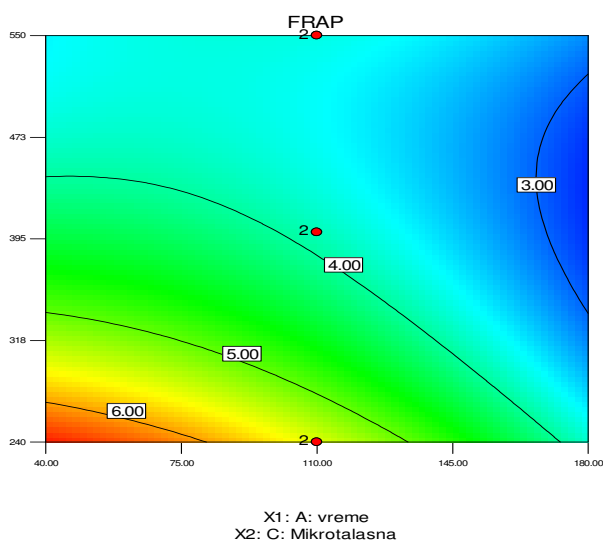
Slika 5.12. Slaganje eksperimentalnih sa modelom predviđenim vrednostima za FRAP

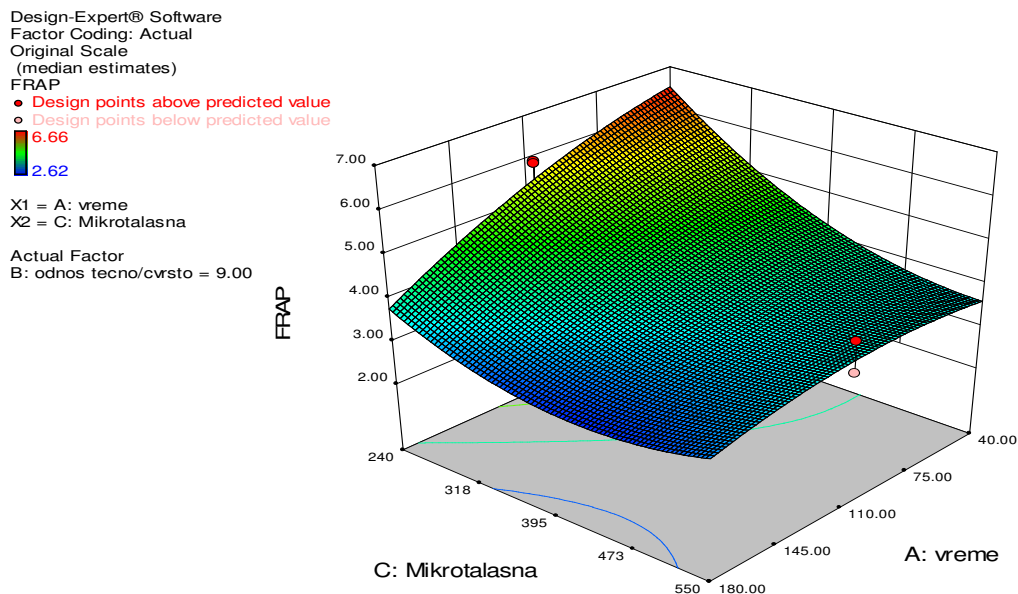
Slika 5.13 nedvosmisleno pokazuje da je kraće MAE vreme (11 – 40 s) sa upotrebom nižeg opsega SMT (240 – 300W) mnogo efikasnije u ekstrakciji antioksidativnih polifenola iz TOK. Ovakvi rezultati su u praksi zadovoljavajuće jer upotreba višeg opsega SMT može dovesti do degradacije polifenolnih komponenti (Chen i sar., 2007).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Original Scale
(median estimates)
FRAP
● Design Points
6.66
2.62

X1 = A: vreme
X2 = C: Mikrotalasna

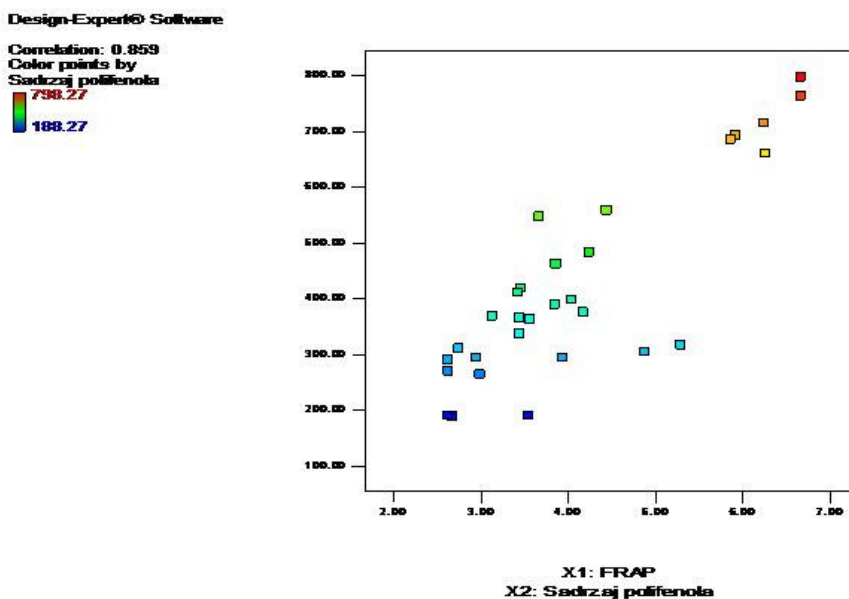
Actual Factor
B: odnos tecno/cvrsto = 9.00



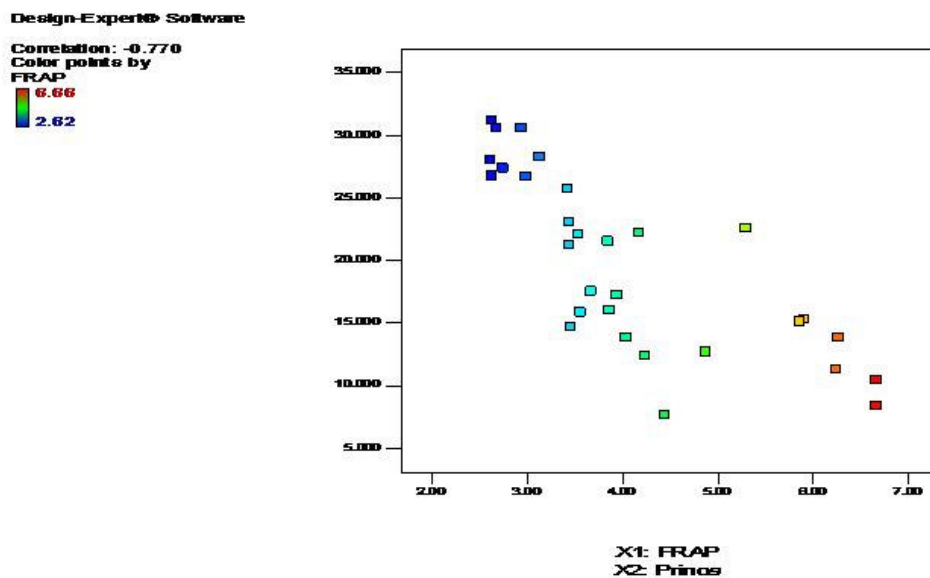


Slika 5.13. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međuodnosa parametara AC (VE - odnos RČ)

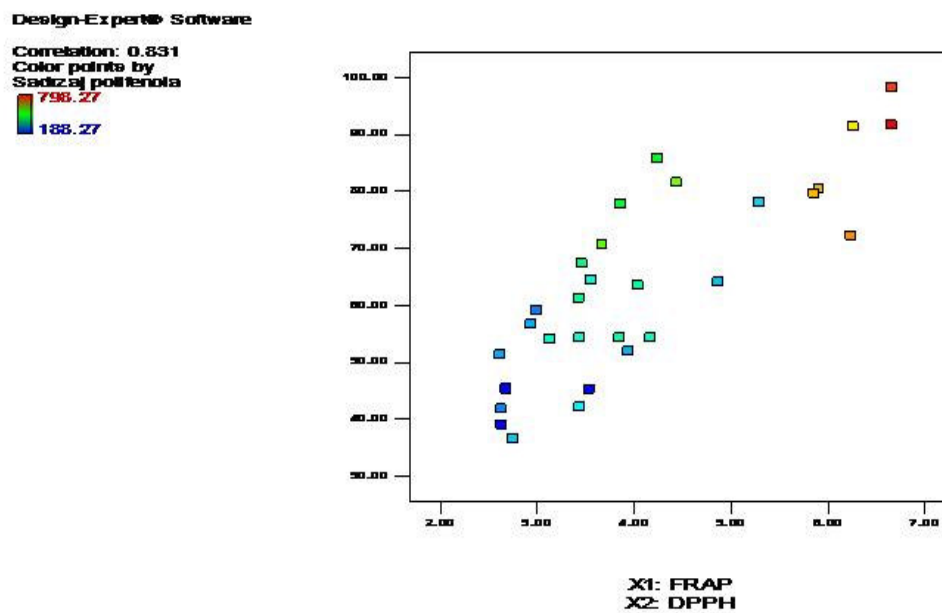
Može se primetiti da su FRAP vrednosti takođe u direktnoj korelaciji sa PE (sa faktorom korelacije 0.859), kao što se vidi na slici 5.14 i inverzno proporcionalni PE (negativni faktor korelacije -0.770, kao što je pokazano na slici 5.15).



Slika 5.14. Prikaz korelacije između FRAP vrednosti i ukupnog sadržaja polifenola



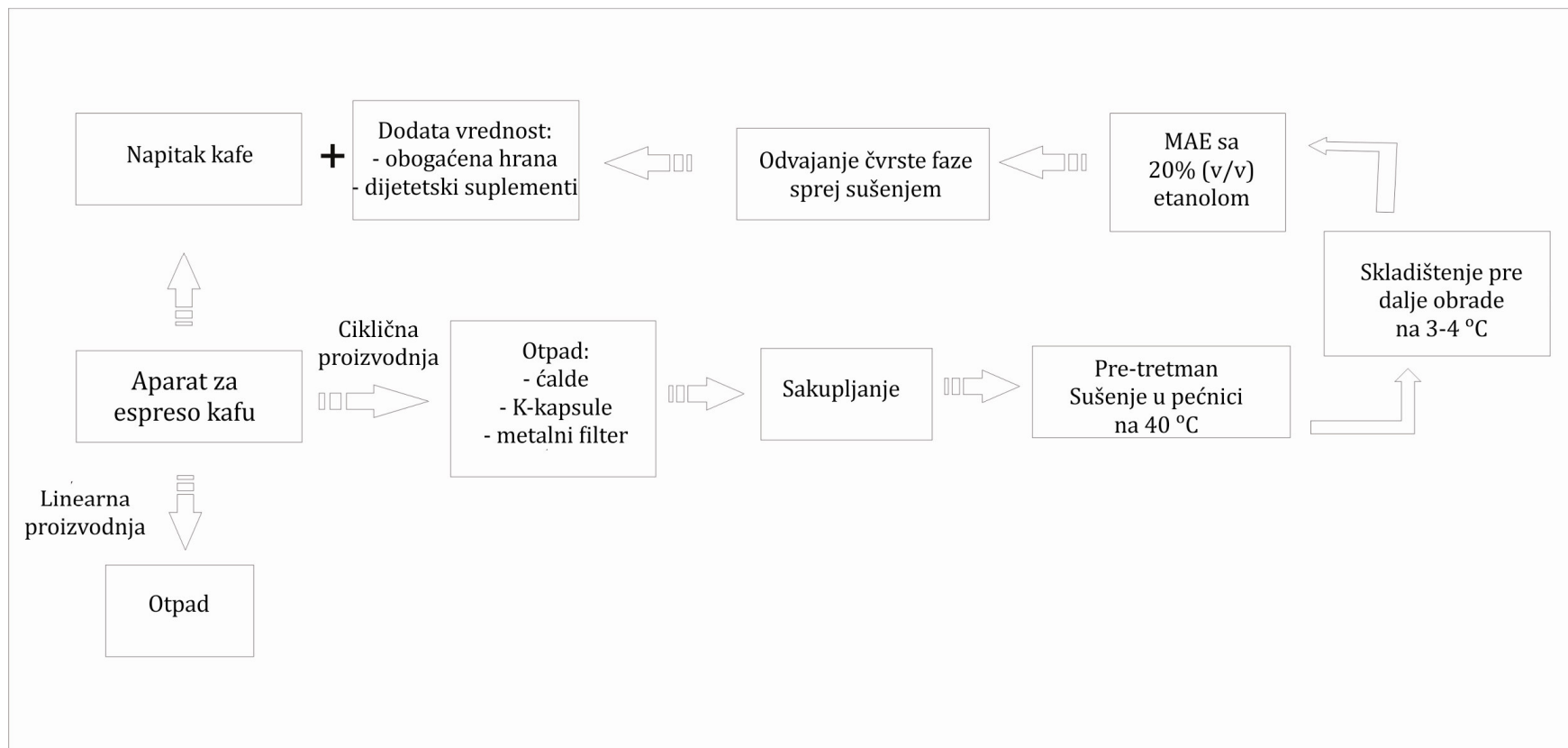
Slika 5.15. Prikaz korelacije između FRAP i ukupnog prinosa ekstrakcije



Slika 5.16. Prikaz korelacije između FRAP i DPPPH

Korelacija između DPPH i FRAP vrednosti (slika 5.16) pokazuje da uzorci sa visokom antioksidativnom aktivnošću određenu DPPH metodom, takođe imaju visoke FRAP vrednosti. Najviša FRAP vrednost je u rangu od 6.0 do 7.0 mmol Fe²⁺/l, a najviša antioksidativna kapacitivnost određena DPPH esejem (70 – 100%), odgovara UP u opsegu od 65 – 80% suvog ETOK. Devet puta odnos rastvarača prema čvrstoj fazi, kraće vreme MAE (40-110 s) i niži opseg SMT (240-400 W) daju optimalne DPPH i FRAP vrednosti. Minimalne devijacije mogu biti rezultat različite rastvorljivosti polifenola u različitim rastvaračima (metanol za DPPH i voda za FRAP). Rezultati predstavljeni u ovoj studiji pokazuju da su korišćeni modeli efikasni u predviđanju izlaznih promenljivih (PE, UP, DPPH i FRAP) espresso TOK korišćenjem nezavisnih promenljivih (VE, odnosa TČ i SMT).

TOK je široko dostupan u restoranima bez dodatnih troškova. To daje veliku ekonomsku opravdanost njegovog daljeg korišćenja. Pored toga, standardi zaštite životne sredine promovišu pravilno, odgovorno i bezbedno upravljanje otpadom i uspešnu prevenciju stvaranja otpada, kao i smanjenje troškove odlaganja na godišnjem nivou (Nelson i Pound, 2009). Starbucks Corporation, američka globalna kompanija kafa i lanac kafeterija, poseduju 20,891 Starbucks prodavnicu, od marta 2013.godine (Loxcel, 2013) u 61 zemlji i teritoriji. Starbucks je počeo da daje besplatno otpad od pripremanja kafe zainteresovanima. Costa Coffee, britanska multinacionalna kompanija kafe, međunarodno posluje u preko 1.700 prodavnica širom 29 zemalja (Costa Coffee, 2013). U 2009. godini, prodato je, 1,6 milijardi tzv. K-kapsula uglavnom napunjenih različitim vrstama espresso kafe (Keurig, 2013). Vredi napomenuti ekološku uređaj za brzo otklanjanje taloga espresso kafe (EP 1803380 A2). Ovaj uređaj omogućava korisniku da ukloni, uz malo truda, u samo jednom potezu potrošenu kafu iz metalnog filtera, nakon pripreme napitka (Campos, 2012). Navedene činjenice doprinose novom konceptu “Waste-to-Product” (WtP) (Bosmans i sar., 2013), u samoodrživom kontekstu. Pretvaranje otpada u dodatu vrednost proizvoda, tj. predloženi ciklični proces ponovna upotrebe TOK-a je prikazan na slici 5.17.



Slika 5.17. Predloženi ciklični proces ponovne upotrebe TOK-a espresso kafe

5.3 Mikrotalasna ekstrakcija polifenola iz taloga otpadne crne kafe

5.3.1 Odredjivanje ukupnog prinosa ekstrakcije taloga crne kafe

Vrednosti sadržaja ukupne suve materije ekstrakta (ukupnog prinosa) u pojedinim uzorcima prikazane su u tabeli 5.16 kao i eksperimentalne vs. vrednosti predviđene modelom.

Tabela 5.16. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti prinosa ekstrakcije (PE) iz taloga otpadne crne kafe na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	PE (mg/g s.m. TOK)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	6.227	10.280	18.	14.122	13.694
2.	11.939	14.207	19.	39.739	36.073
3.	12.691	15.793	20.	28.026	24.884
4.	38.305	40.345	21.	27.415	24.884
5.	8.193	6.1434	22.	21.256	24.884
6.	28.156	26.281	23.	14.409	11.846
7.	15.505	12.910	24.	13.237	15.774
8.	40.088	35.290	25.	18.065	17.360
9.	25.107	24.100	26.	39.725	41.912
10.	25.018	24.100	27.	9.220	7.710
11.	23.247	24.100	28.	31.119	27.848
12.	7.982	11.064	29.	14.655	14.477
13.	12.424	14.991	30.	31.966	36.857
14.	14.137	16.576	31.	23.685	25.667
15.	37.720	41.128	32.	26.954	25.667
16.	7.492	6.9268	33.	28.678	25.667
17.	30.003	27.065			
Vrednosti za validaciju					
A	15.124	15.959			
B	41.167	40.733			

¹ E – Eksperimentalne vrednosti

² P – Modelom predviđene vrednosti

^a Bold - Minimalne i maksimalne vrednosti

Tabela 5.17. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu crnu kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
Prinos ekstrakcije	$Y_{PE} = 24.88 + 7.12*A + 7.91*B + 0.78 * C + 5.16*A*B - 3.94*A^2$
¹ A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)	

Tabela 5.18. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za prinos ekstrakcije iz otpadne crne kafe

Izvor	PE
p^a – vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	< 0.0001
C	0.2197
AB	< 0.0001
A ²	< 0.0001
Nedostatak uklapanja	0.4216
R-kvadratno	0.935332
Podešeno R-kvad.	0.923356
Predviđeno R-kvad.	0.901367
C.V. %	13.28435

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

Iz dobijenih eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti, prikazanih u tabeli 5.16 uočava se da se ukupan prinos ekstrakcije iz otpadne crne kafe u navedenim eksperimentalnim uslovima kreće od 6.227 mg/g s.m. ekstrakta (uzorak broj 1 - VE 40 s, TČ 6 ml/g, SMT 400 W) do 40.088 mg/g s.m. ekstrakta (uzorak broj 8 - VE 180 s, TČ 12 ml/g, SMT 400 W). Prema ovim podacima, može se uočiti da se ukupan prinos ekstrakcije povećava sa dužim VE i većom vrednošću odnosa TČ za istu SMT.

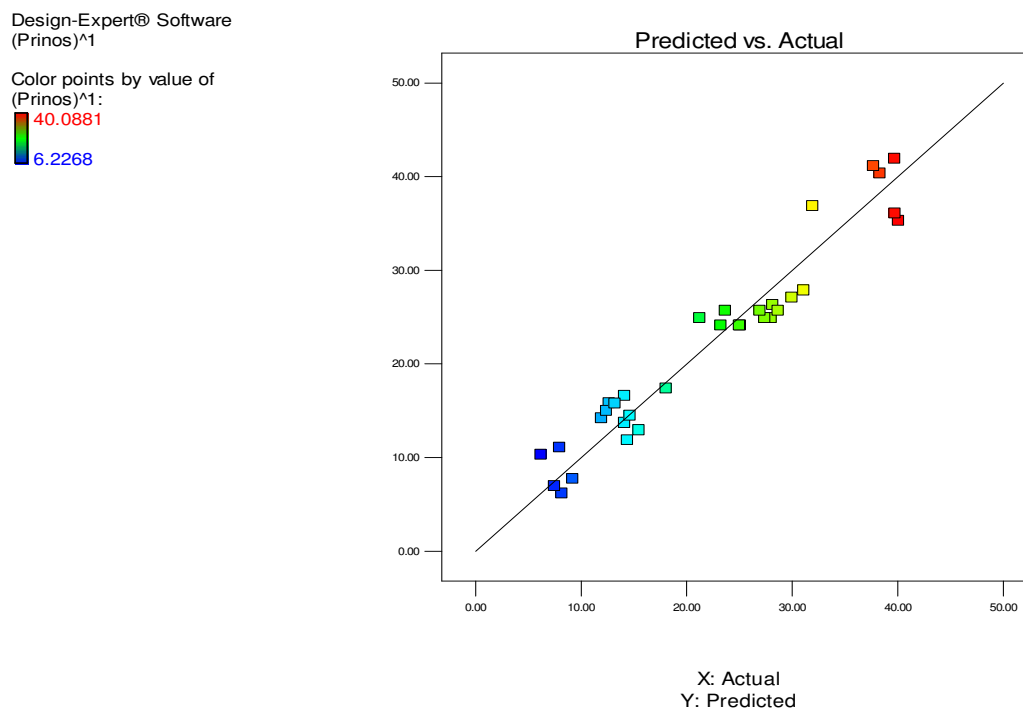
Na osnovu dobijenih podataka i analize sprovedene programom Design Expert 8.0, izvedena je jednačina, polinomna odzivna f-ja drugog reda za dati model, prikazana u tabeli 5.17.

Za ocenu značajnosti modela i uticaja ispitivanih parametara, kao i njihovih međusobnih interakcija, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u tabeli 5.18. Korišćeni model se pokazao kao značajan (p<0.01).

Od međusobnih interakcija faktora najznačajniji su odnosi AB, tj. odnos VE i RČ dok ostale kombinacije faktora imaju manji uticaj. "Lack of fit" ima vrednost 0.4216 što znači da se sistem može dobro opisati dobijenom jednačinom.

Dobijena vrednost koeficijenta korelacije između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti $R^2=0.935332$ (tabela 5.18) ukazuje da je izabrani model odgovarajući.

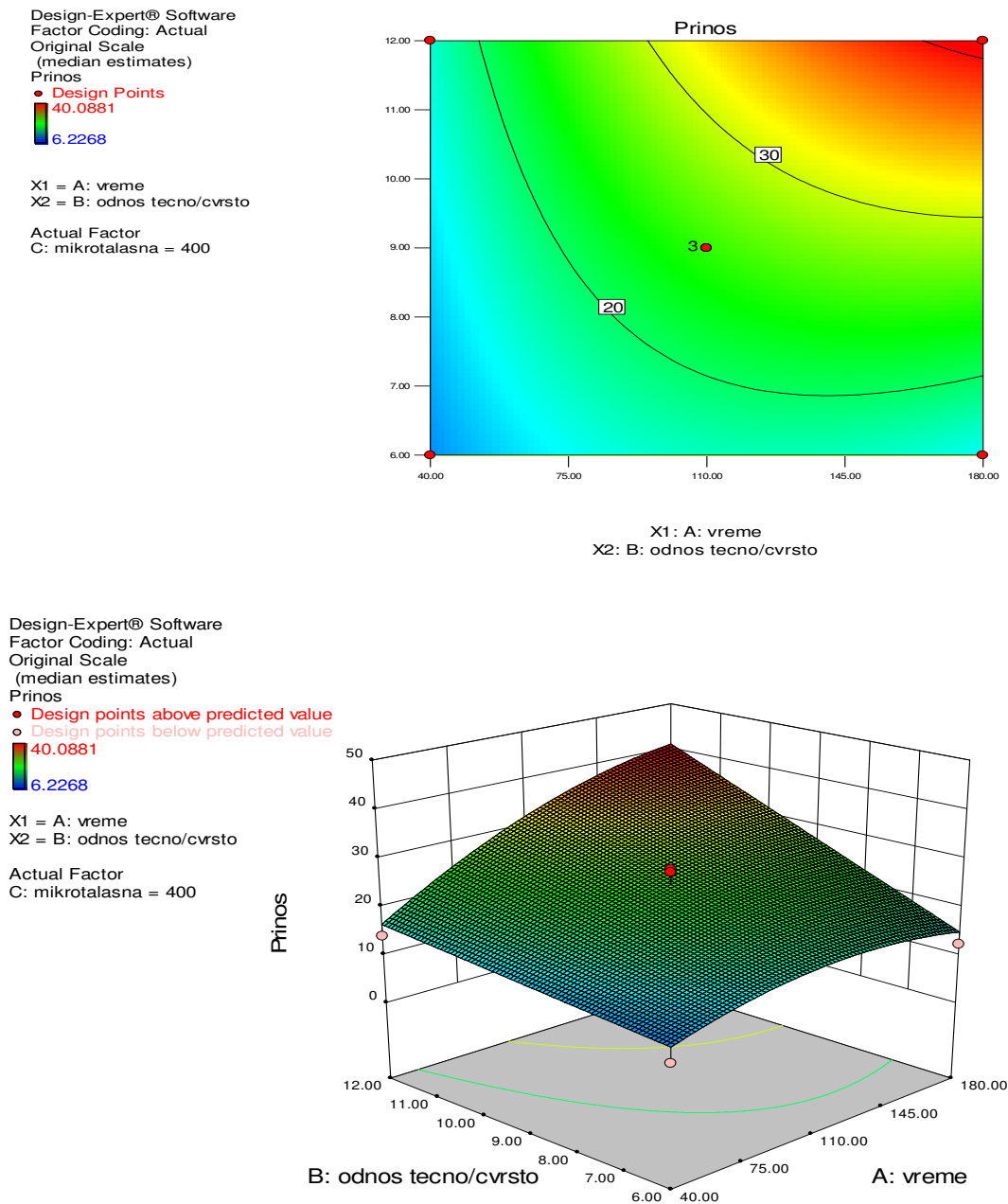
Rezultati određivanja uticaja ispitivanih parametara na vrednost ukupnog prinosa ekstrakcije prikazani su grafički. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti su prikazani na slici 5.17.



Slika 5.17. Slaganje eksperimentalnih sa modelom predviđenim vrednostima za vrednost ukupnog prinosa reakcije

Iz ovih podataka se uočava da su dobijene eksperimentalne vrednosti približne vrednostima predloženog modela i da su gušće raspoređene duž nižih vrednosti opsega dobijenih vrednosti.

Na slici 5.18 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti ukupnog prinosa ekstrakcije od odnosa dva parametra A i B, odnosno, vremena ekstrakcije i odnosa čvrsto/tečno koji je u ANOVA analizi ocenjen kao značajan sa p - vrednošću od < 0.0001 .



Slika 5.18. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međuodnosa parametara AB (vreme ekstrakcije– odnos rastvarač/čvrsta faza)

Iz rezultata prikazanih na slici 5.18 se uočava da se mikrotalasnom ekstrakcijom dobija viša vrednost ukupnog prinosa ekstrakcije u opsegu (polju) dužeg VE (od 40 s do 180 s) i uz primenu više vrednosti odnosa RČ od 6 ml/g do 12 ml/g.

5.3.2 Odredjivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu otpadne crne kafe

Vrednosti sadržaja polifenola u pojedinim uzorcima prikazane se u tabeli 5.19. U tabeli su date eksperimentalno dobijene vrednosti u poređenju sa vrednostima predviđenim modelom kao i njihove razlike.

Tabela 5.19. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti za ukupan sadržaj polifenola (UP) iz taloga otpadne crne kafe na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	UP (% u suvom ekstraktu)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	48.691	44.355	18.	22.282	23.331
2.	15.564	15.160	19.	18.009	23.229
3.	49.509	48.473	20.	22.1	23.280
4.	14.373	10.899	21.	22.191	23.280
5.	57.282	58.209	22.	26.827	23.280
6.	10.145	10.997	23.	31.156	35.554
7.	24.145	24.891	24.	20.645	17.722
8.	19.282	24.789	25.	36.691	39.671
9.	27.282	24.840	26.	13.145	13.461
10.	22.282	24.840	27.	51.373	47.054
11.	26.464	24.840	28.	12.191	15.913
12.	36.736	39.955	29.	19.009	21.771
13.	17.236	16.441	30.	25.009	21.669
14.	44.736	44.072	31.	21.909	21.721
15.	15.145	12.180	32.	22.3.27	21.721
16.	53.054	52.632	33.	21.964	21.721
17.	11.373	13.455			
Vrednosti za validaciju					
A	47.954	48.473			
B	13.165	12.180			

¹ E - Eksperimentalne vrednosti

² P - Modelom predviđene vrednosti; ^a **Bold** - Minimalne i maksimalne vrednosti

Iz tabele 5.19 može se uočiti da se ukupan sadržaj eksperimentalno dobijenih vrednosti polifenola kreće u opsegu od 10.145 do 57.282 % u suvom ekstraktu. Najniža vrednost je izmerena u uzorku 6 za koji su primenjeni sledeći uslovi: VE 180 s, RČ 12 ml/g i SMT 240 W. Najviša vrednost je postignuta u uzorku 5 za koji su primenjeni sledeći uslovi: VE 110 s, RČ 9 ml/g i SMT 240 W. Iz ovih rezultata se može zaključiti da se sadržaj ukupnih polifenola može postići primenom mikrotalasnog zračenja iste snage za kraće VE, uz manji sadržaj rastvarača u odnosu na masu otpadne kafe.

Tabela 5.20. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu crnu kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
Ukupan sadržaj polifenola	$Y_{UP} = 232.80 - 138.51*A - 0.36*B - 15.60*C - 20.95*A*B + 28.41*A*C + 48.81*A^2$

¹A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)

Tabela 5.21. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za ukupan sadržaj polifenola iz otpadne crne kafe

Izvor	UP
p^a - vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	0.9565
C	0.0307
AB	0.0320
AC	0.0015
A ²	< 0.0001
Nedostatak uklapanja	0.3444
R-kvadratno	0.951973
Podešeno R-kvad.	0.940889
Predviđeno R-kvad.	0.917625
C.V. %	11.931795

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

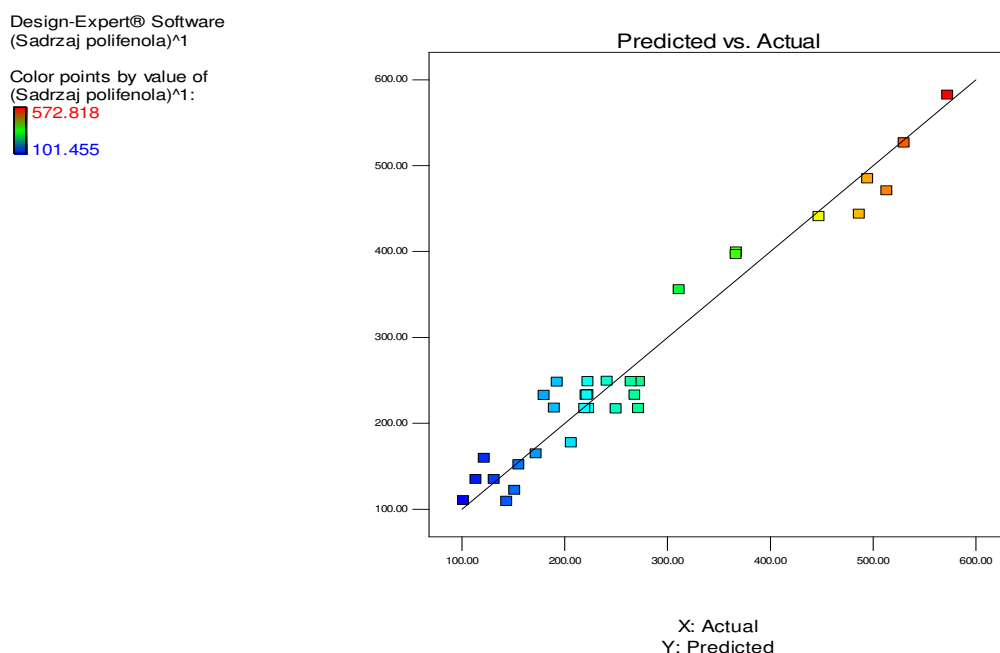
Na osnovu dobijenih podataka i analize sprovedene programom Design Expert 8.0, izvedena je jednačina za dati model koja je prikazana u tabeli 5.20.

Za ocenu značajnosti modela i uticaja ispitivanih parametara, kao i njihovih međusobnih interakcija korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u

tabeli 5.21. Iz podataka prikazanih u tabeli 5.21, uočava se da je izabrani model značajan. Parametri A i C su ocenjeni kao značajni. Najznačajnija inetrakcija je pokazana između nezavisnih promenljivih A i C. Ostale međusobne interakcije faktora imaju manji uticaj.

Valjanost fitovanog modela između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti je prikazana i na osnovu dobijenog koeficijenta korelacije R^2 (tabela 5.21). Visoka vrednost koeficijenta R^2 (0.951973) ukazuje da se većina podataka uklapa u regresioni model.

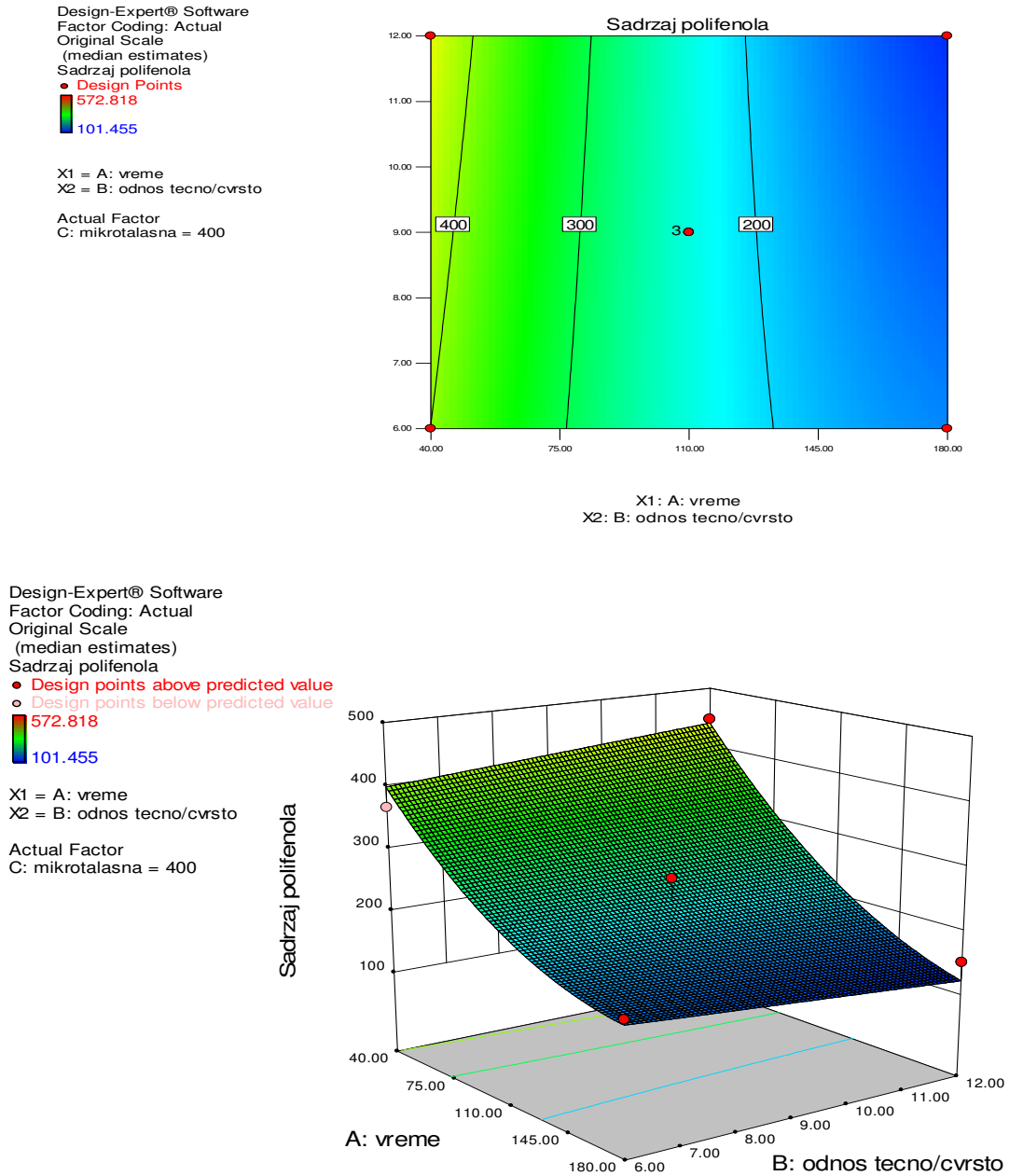
Rezultati određivanja uticaja ispitivanih parametara na vrednost sadržaja ukupnih polifenola prikazani su grafički. Slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti su prikazani na slici 5.19.



Slika 5.19. Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za ukupan sadržaj polifenola

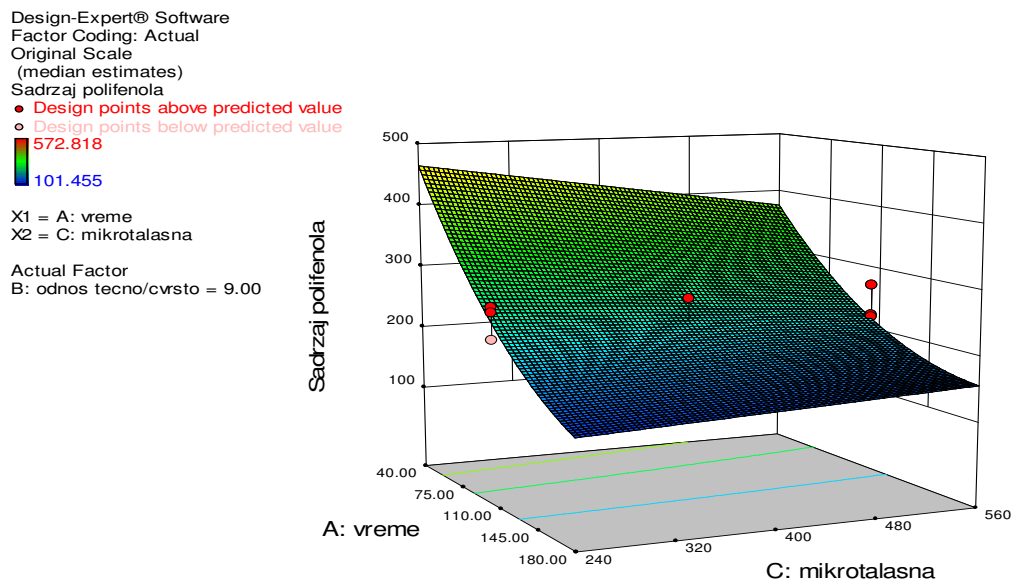
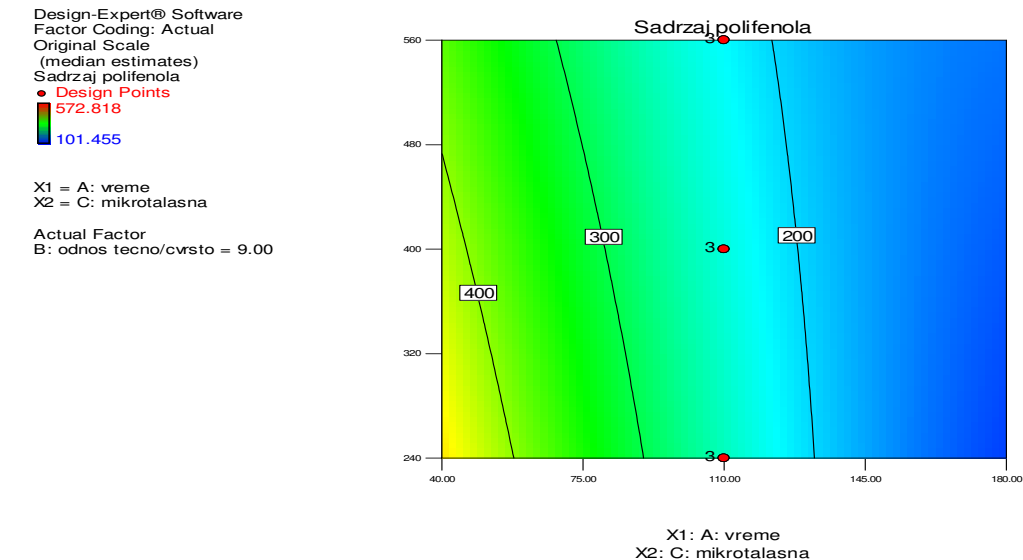
Iz ovih podataka se uočava da su dobijene eksperimentalne vrednosti približne vrednostima predloženog modela i da su dobro raspoređene duž opsega dobijenih vrednosti.

Na slici 5.20 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola od odnosa dva parametra A i B, odnosno, VE i odnosa RČ koji je u ANOVA analizi ocenjen kao značajan sa p - vrednošću od 0.0007.



Slika 5.20. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AB (vreme ekstrakcije – odnos tečno/čvrsto)

Iz rezultata prikazanih na slici 5.20 se uočava da se mikrotalasnom ekstrakcijom dobija veći sadržaj ukupnih polifenola u opsegu (polju) dužeg VE (od 110 s do 180 s) i uz primenu viših vrednosti odnosa RČ od 9 ml/g do 12 ml/g.

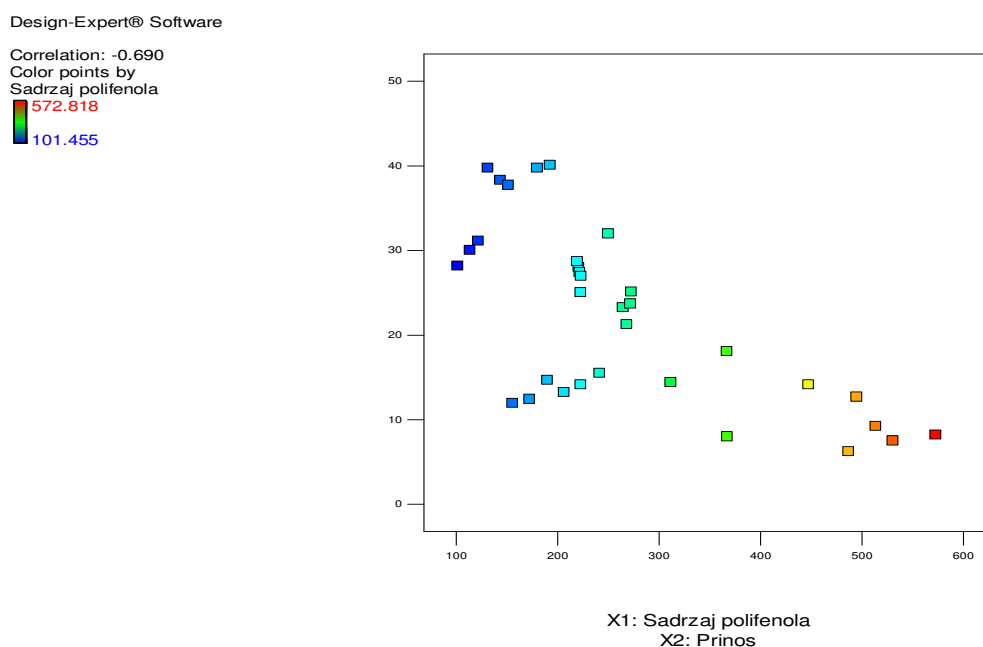


Slika 5.21. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AC (vreme ekstrakcije – snaga mikrotalasnog zagrevanja)

Na slici 5.21 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti sadržaja ukupnih polifenola od odnosa dva parametra A i C, odnosno, vremena ekstrakcije i snage mikrotalasnog zagrevanja koji je u ANOVA analizi ocenjen kao značajan sa p - vrednošću od 0.0007.

Iz rezultata prikazanih na slici 5.21 se uočava da se mikrotalasnom ekstrakcijom dobija veći sadržaj ukupnih polifenola u opsegu (polju) dužeg VE (od 110 s do 180 s) i uz primenu iste SMT od 240 W.

Poredeći ove rezultate sa rezultatima određivanja sadržaja ukupne suve materije u ekstraktima, može se reći da je sadržaj ukupnih polifenola u obrnutoj srazmeri sa ukupnim prinosom ekstrakcije (slika 5.22). Faktor korelacije iznosi -0.690. Uslovi koji su optimalni za ukupan prinos ekstrakcije (duže VE, veća vrednost odnosa RČ i veća SMT) nisu optimalni i za sadržaj ukupnih polifenola (kraće VE, srednja vrednost odnosa RČ i manja SMT). Moguće objašnjenje ovakvih rezultata je to što se kod ekstrakta sa višim vrednostima sadržaja suve materije nalazi i povišen sadržaj drugih (balastnih) materija kao što su polisaharidi, proteini i lipidi tako da se smanjuje udeo ukupnih polifenola.



Slika 5.22. Prikaz korelacije između sadržaja polifenola i ukupnog prinosa ekstrakcije

5.3.3 Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga crne kafe određena metodom inhibicije DPPH radikala

Jedna od metoda za određivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata je metoda neutralizacije DPPH radikala. Princip ove metode je da antioksidansi reaguju sa slobodnim DPPH radikalom (ljubičasto obojen rastvor) i prevode ga u bezbojni DPPH-H (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin). Step en obezbojavanja ukazuje na antioksidativni potencijal ekstrakata. Antioksidansi reaguju sa slobodnim radikalom i na taj način prekidaju lančanu reakciju oksidacije donirajući vodonik iz hidroksilne grupe polifenola.

Tabela 5.21. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti antioksidativne aktivnosti taloga otpadne crne kafe određene DPPH metodom, na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	DPPH (%)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	84.532	80.019	18.	51.370	45.776
2.	49.640	48.643	19.	45.108	45.157
3.	83.603	85.180	20.	44.218	45.466
4.	45.346	42.605	21.	42.211	45.466
5.	91.295	96.637	22.	43.444	45.466
6.	38.515	44.346	23.	45.195	50.575
7.	56.637	58.042	24.	32.889	29.022
8.	54.893	57.423	25.	51.031	55.737
9.	53.580	57.732	26.	19.529	22.985
10.	59.472	57.732	27.	67.733	65.159
11.	59.833	57.732	28.	21.990	26.759
12.	62.785	65.297	29.	33.991	33.509
13.	35.886	38.832	30.	35.104	32.891
14.	76.924	70.459	31.	32.317	33.200
15.	38.991	32.795	32.	35.589	33.200
16.	86.362	80.898	33.	32.125	33.200
17.	41.355	35.552			
Vrednosti za validaciju					
A	83.243	85.181			
B	35.124	32.795			

¹ E - Eksperimentalne vrednosti

² P - Modelom predviđene vrednosti

^a **Bold** - Minimalne i maksimalne vrednosti

Polifenoli na taj način daju stabilan krajnji proizvod i zaustavljaju reakcije oksidacije. Vrednosti inhibicije DPPH radikala u pojedinim uzorcima prikazane su u tabeli 5.21.

Iz dobijenih eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti prikazanih u tabeli 5.21, uočava se da se antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom, kreće od 21.990 % (uzorak broj 28 - VE 11 s, RČ 9 ml/g, SMT 240 W) do 86.362 % (uzorak broj 16 - VE 40 s, RČ 6 ml/g, SMT 240 W). Iz ovih rezultata se može zaključiti da se najveći procenat inhibicije DPPH radikala može postići primenom mikrotalasnog zračenja iste snage za srednje vreme trajanja ekstrakcije – oko 40 s, uz manji sadržaj rastvarača u odnosu na masu otpadne kafe.

Na osnovu dobijenih podataka i analize sprovedene programom Design Expert 8.0, izvedena je jednačina za dati model koja je prikazana u tabeli 5.22. Za ocenu značajnosti modela i uticaja ispitivanih parametara, kao i njihovih međusobnih interakcija korišćena je analiza varijanse (ANOVA) (tabela 5.23).

Tabela 5.22. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu crnu kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
DPPH	$Y_{DPPH}=45.47-16.03*A - 0.22*B-12.27*C-2.7996704 * A *B + 2.46*A*C +6.38*A^2$
¹ A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)	

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.23 može se zaključiti da je izabrani model značajan. Od međusobnih interakcija faktora najznačajniji je odnos AC, tj. odnos vremena i snage mikrotalasnog zagrevanja, dok ostale kombinacije faktora imaju manji uticaj. “Lack of fit” ima vrednost 0.0567, što znači da se sistem može dobro opisati dobijenom jednačinom.

Valjanost fitovanog modela između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti je prikazana u tabeli 5.23. Visoka vrednost koeficijenta $R^2 = 0.958328$ ukazuje na to da se većina podataka uklapa u regresioni model.

Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti su prikazani na slici 5.23.

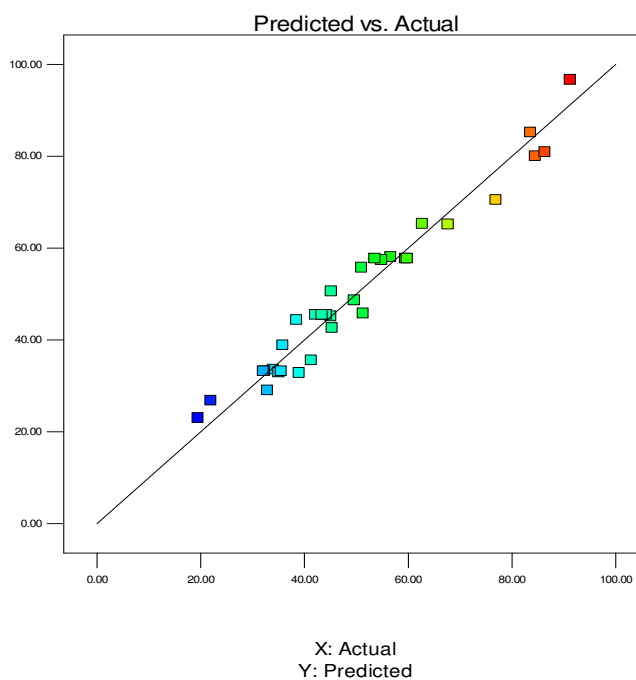
Tabela 5.23. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva antioksidativne aktivnosti taloga otpadne crne kafe određene DPPH metodom

Izvor	DPPH
p^a - vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
B	0.7994
C	< 0.0001
AB	0.0283
AC	0.0265
A ²	< 0.0001
Nedostatak uklapanja	
R-kvadratno	0.958328
Podešeno R-kvad.	0.948711
Predviđeno R-kvad.	0.923538
C.V. %	8.3335908

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

Design-Expert® Software
(DPPH)¹

Color points by value of
(DPPH)¹:
91.295
19.5292



Slika 5.23. Slaganje eksperimentalnih sa modelom predviđenim vrednostima za vrednosti inhibicije DPPH radikala

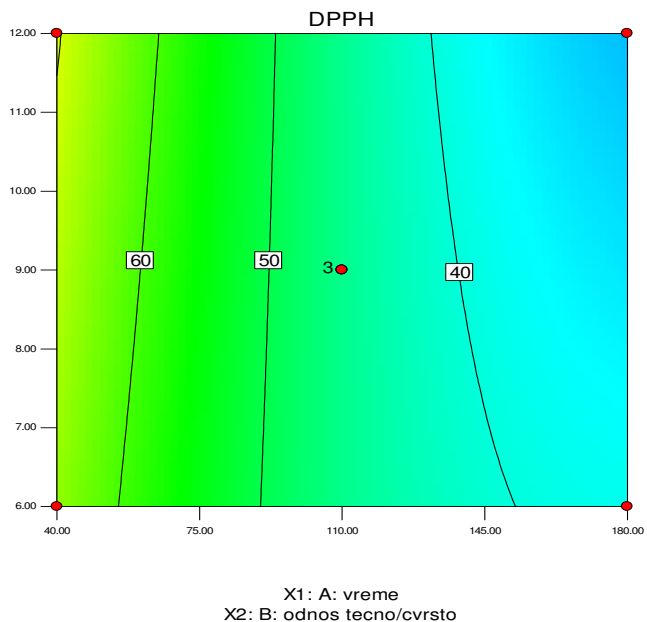
Iz ovih podataka se uočava da su dobijene eksperimentalne vrednosti približne vrednostima predloženog modela i da su gušće raspoređene duž višeg opsega dobijenih vrednosti.

Na slici 5.24 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti inhibicije DPPH radikala od odnosa dva parametra A i B, odnosno, VE i odnosa RČ, koji je u ANOVA analizi ocenjen kao značajan sa p - vrednošću < 0.0001 .

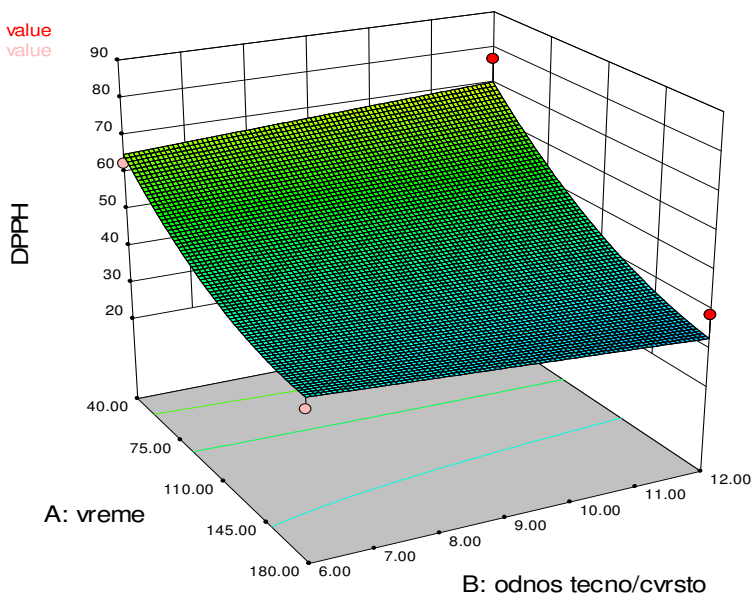
Iz rezultata prikazanih na slici 5.24 se uočava da se mikrotalasnom ekstrakcijom dobija veći procenat inhibicije DPPH radikala u opsegu (polju) dužeg VE od 11s do 40s i uz primenu niže vrednosti odnosa RČ od 6 ml/g do 9 ml/g.

Na slici 5.25 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti inhibicije DPPH radikala od odnosa dva parametra A i C, odnosno, VE i SMT koji je u ANOVA analizi ocenjen kao značajan sa p - vrednošću < 0.0001 . Iz rezultata prikazanih na slici 5.26 se uočava da se mikrotalasnom ekstrakcijom dobija veći procenat inhibicije DPPH radikala u opsegu (polju) dužeg VE od 11 do 40 s duž celog opsega primenjene snage mikrotalasnog zračenja od 240 W.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 (median estimates)
 DPPH
 ● Design Points
 91.295
 19.5292
 X1 = A: vreme
 X2 = B: odnos tecno/cvrsto
 Actual Factor
 C: mikrotalasna = 400



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 (median estimates)
 DPPH
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 91.295
 19.5292
 X1 = A: vreme
 X2 = B: odnos tecno/cvrsto
 Actual Factor
 C: mikrotalasna = 400

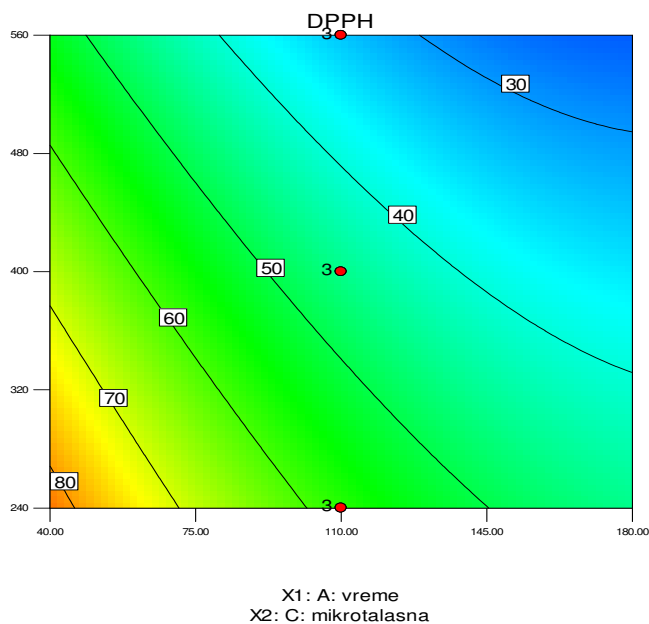


Slka 5.24. Dvodimenzini i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AB (odnos vremena ekstrakcije i odnosa rastvarač/čvrsta faza)

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 (median estimates)
 DPPH
 ● Design Points
 91.295
 19.5292

 X1 = A: vreme
 X2 = C: mikrotalasna

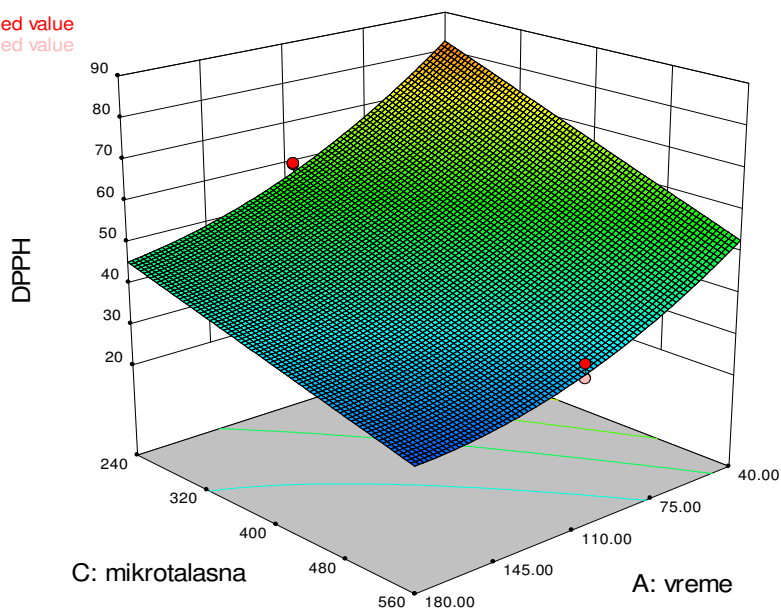
 Actual Factor
 B: odnos tecno/cvrsto = 9.00



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 (median estimates)
 DPPH
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 91.295
 19.5292

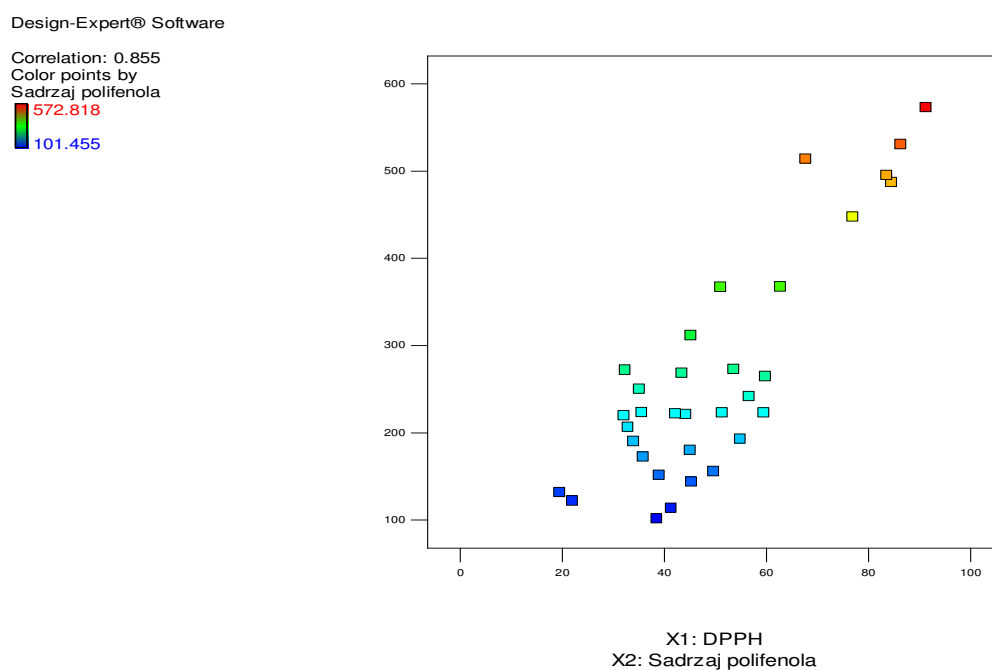
 X1 = A: vreme
 X2 = C: mikrotalasna

 Actual Factor
 B: odnos tecno/cvrsto = 9.00

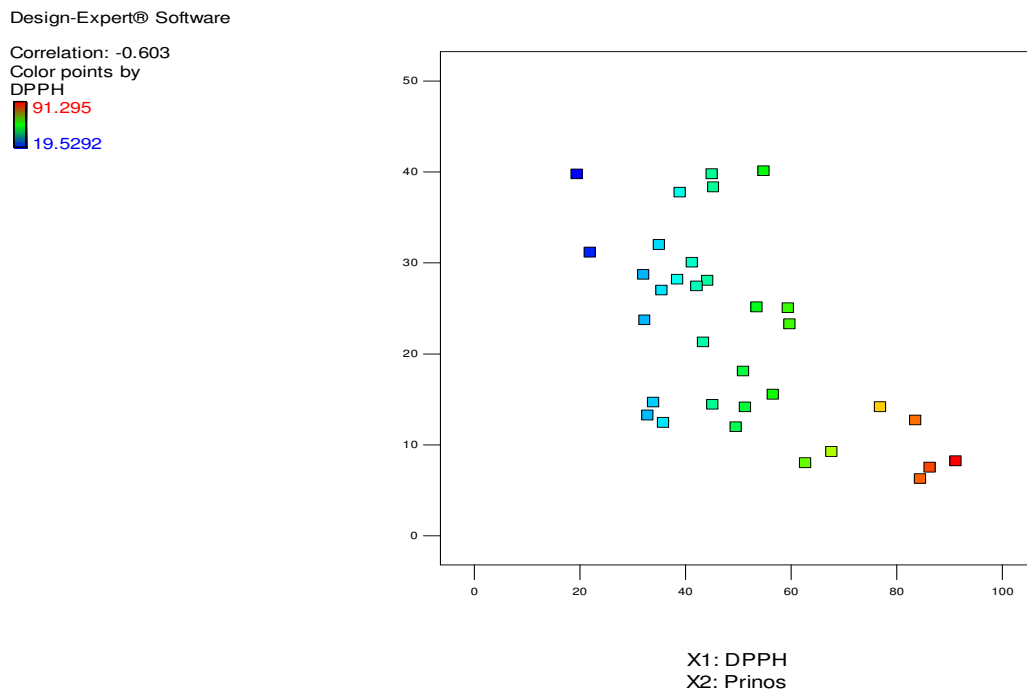


Slika 5.25. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AC (odnos vremena ekstrakcije snage mikrotalasnog zagrevanja)

Ovakvi rezultati su u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola (slika 5.26), mada taj odnos nije u potpunosti linearan i obrnuto su srazmerni ukupnom prinosu ekstrakcije (slika 5.27). Faktor korelacije sa sadržajem polifenola iznosi 0.855, a sa prinosom -0.603. Antioksidativna aktivnost ekstrakta otpadne kafe je generalno veća u uzorcima u kojima je određen veći sadržaj polifenola (460 – 560 mg EGK/g.sm.ekstrakta) i manji sadržaj ukupne suve materije (od 8.5 do oko 22 mg/g s.m. ekstrakta).



Slika 5.26. Odnos sadržaja polifenola i vrednosti DPPH



Slika 5.27. Odnos ukupnog prinosa ekstrakcije i vrednosti procenta inhibicije DPPH radikala

5.3.4 Antioksidativna aktivnost ekstrakta taloga crne kafe određena FRAP metodom

FRAP metoda pripada grupi metoda kojima se određuju antioksidativna svojstva koja se zasnivaju na transferu elektrona. Ove metode mere kapacitet antioksidansa da redukuju prisutnu oksidativnu komponentu uz promenu boje koja se određuje spektrofotometrijski. Stepem promene boje je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Za razliku od inhibicije DPPH radikala, koja je pogodna za antioksidanse rastvorne u organskim rastvaračima (etanolu, metanolu), FRAP metoda određuje antioksidativna svojstva antioksidanasa rastvornih u vodi. FRAP vrednosti u ispitivanim uzorcima prikazane su u tabeli 5.24.

Tabela 5.24. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti antioksidativne aktivnosti taloga otpadne crne kafe određene FRAP metodom, na osnovu CCD za RSM

Eksperimentalni rezultati					
RB.	FRAP (mmol Fe ²⁺ /l)				
	E ¹	P ²		E	P
1.	4.751	4.140	18.	1.902	1.981
2.	1.304	1.237	19.	1.507	1.981
3.	3.736	4.140	20.	1.990	1.981
4.	1.612	1.237	21.	2.051	1.981
5.	5.416	5.249	22.	2.369	1.981
6.	1.074	1.144	23.	2.859	3.103
7.	1.919	2.181	24.	2.045	1.477
8.	1.683	2.181	25.	2.720	3.103
9.	2.221	2.181	26.	1.249	1.477
10.	2.237	2.181	27.	4.061	3.947
11.	2.067	2.181	28.	1.010	1.649
12.	3.068	3.621	29.	1.946	1.782
13.	1.595	1.357	30.	2.045	1.782
14.	3.593	3.621	31.	1.732	1.782
15.	1.502	1.357	32.	2.364	1.782
16.	5.042	4.598	33.	1.601	1.782
17.	1.299	1.396			
Vrednosti za validaciju					
A	3.937	4.294			
B	1.413	1.349			

¹ E - Eksperimentalne vrednosti
² P - Modelom predviđene vrednosti
^a Bold - Minimalne i maksimalne vrednosti

Iz dobijenih eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti, prikazanih u tabeli 5.24, uočava se da se antioksidativna aktivnost primenom FRAP metode kreće u opsegu od 1.010 mmol Fe²⁺/l (uzorak broj 28 - VE 11 s, odnos RČ 9 ml/g, SMT 240 W) do 5.042 mmol Fe²⁺/l (uzorak broj 16 - VE 40 s, odnos RČ faza 6 ml/g, SMT 240 W). Iz ovih rezultata se može zaključiti da se najveća FRAP vrednost može postići primenom mikrotalasnog zračenja iste snage za duže vreme trajanja ekstrakcije, uz niži sadržaj rastvarača u odnosu na masu otpadne kafe.

Na osnovu dobijenih podataka i analize sprovedene programom Design Expert 8.0, izvedena je jednačina za dati model data u tabeli 5.25.

Tabela 5.25. Polinomna odzivna funkcija drugog reda izračunata za uslove ekstrakcije za otpadnu espresso kafu

Promenljiva odziva	Polinomna odzivna funkcija drugog reda ¹
FRAP	$Y_{FRAP}=45.47-16.03*A - 0.22*B-12.27*C-2.81 * A *B + 2.46*A*C +6.40*A^2$
¹ A, vreme ekstrakcije (s), B, odnos rastvarač – čvrsta faza (ml/g), C, snaga mikrotalasa (W)	

Iz podataka dobijenih analizom varijanse (ANOVA), za ocenu značajnosti modela i uticaja ispitivanih parametara, prikazanih u tabeli 5.26, može se zaključiti da je izabrani model značajan. Vreme je ocenjeno kao značajan parameter, dok ostali parametri kao i međusobne interakcije parametara imaju manji uticaj.

Vrednost koeficijenta korelacije $R^2=0.91587$ je nešto niži u odnosu na vrednosti dobijene kod ispitivanja drugih karakteristika ekstrakta ali možemo zaključiti da je fitovani model dobar (tabela 5.26).

Tabela 5.26. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih antioksidativne aktivnosti taloga otpadne crne kafe određene FRAP metodom

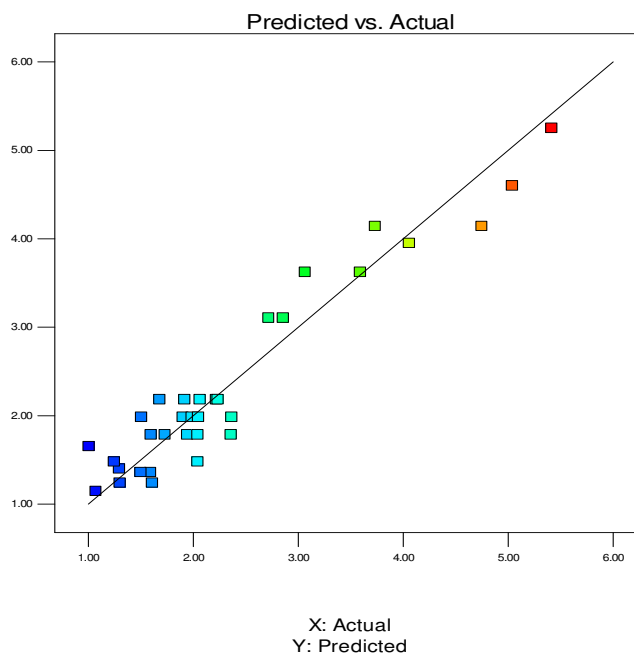
Izvor	FRAP
p^a - vrednost prob > F	
Model	< 0.0001
A	< 0.0001
C	0.0133
AC	0.0009
A ²	< 0.0001
Nedostatak uklapanja	0.1527
R-kvadratno	0.91587
Podešeno R-kvad.	0.90385
Predviđeno R-kvad.	0.87356
C.V. %	15.02957

^a p < 0.01 veoma značajno; 0.01 ≤ p < 0.05 značajno; p ≥ 0.05 nije značajno

Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti prikazani su na slici 5.28.

Design-Expert® Software
(FRAP)¹

Color points by value of
(FRAP)¹:

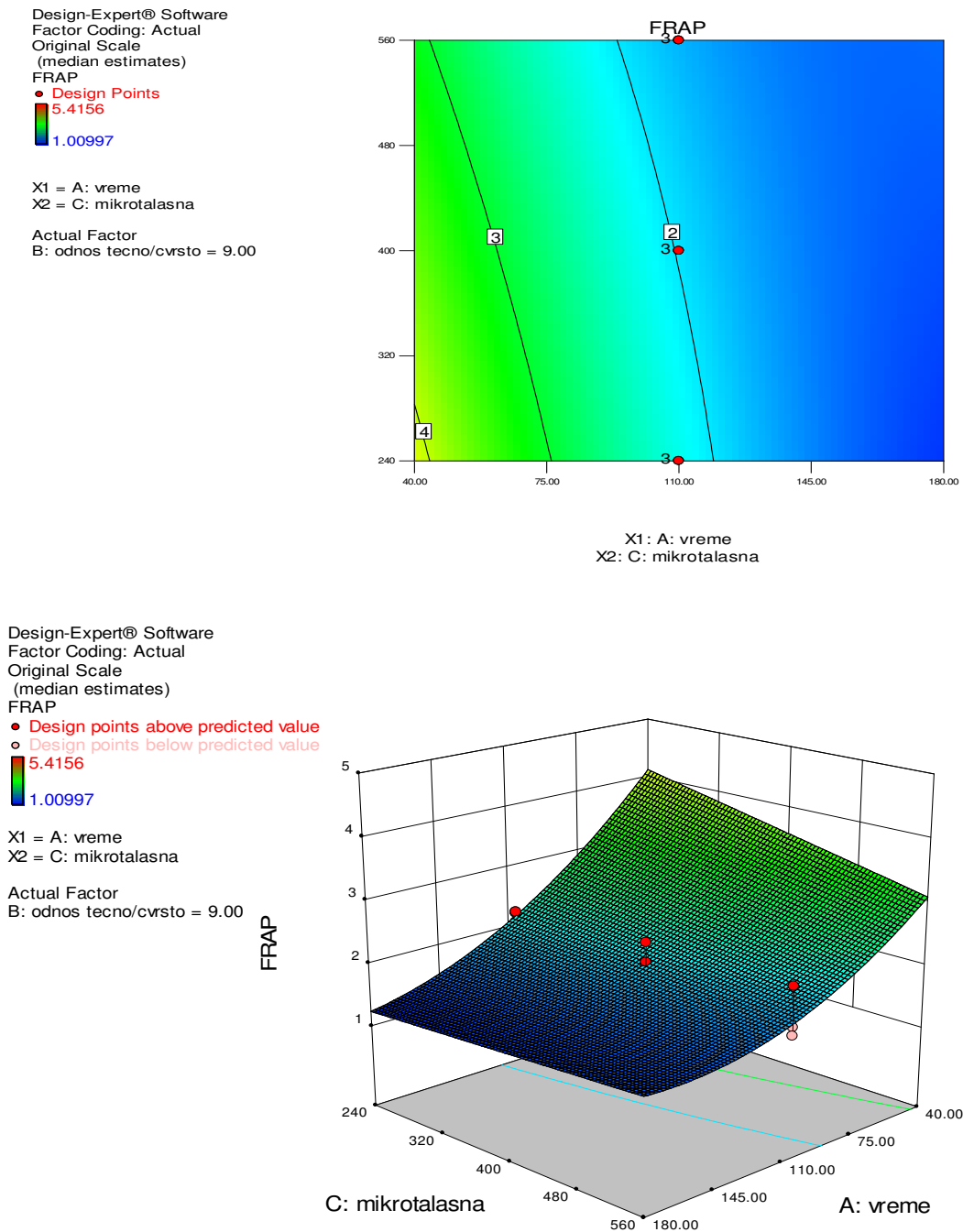


Slika 5.28. Slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti za FRAP vrednosti

Iz ovih podataka se uočava da dobijene eksperimentalne vrednosti približne vrednostima predviđenog modela i da su gušće raspoređene duž nižeg opsega dobijenih vrednosti.

Na slici 5.29 je prikazan dvodimenzioni i trodimenzioni grafikon zavisnosti FRAP vrednosti od odnosa dva parametra A i C, odnosno, odnosa vremena i snage mikrotalasnog zračenja koji je u ANOVA analizi ocenjen kao značajan sa p – vrednošću <.0001, odnosno kao značajan.

Iz rezultata prikazanih na slici 5.29 se uočava da se mikrotalasnom ekstrakcijom dobija veća FRAP vrednost u opsegu (polju) višeg VE (od 11s do 40 s) ali u polju iste primenjene SMT od 240W.



Slika 5.29. Dvodimenzioni i trodimenzioni prikaz značajnih međusobnih parametara AC

Korelacija FRAP vrednosti sa sadržajem ukupnih polifenola je data na slici 6.30. Faktor korelacije iznosi 0.966. FRAP vrednosti ekstrakta otpadne kafe se kreću od oko 6.0

do 7.0 mmol Fe²⁺/l u uzorcima u kojima je sadržaj polifenola između 650 i 800 mg EGK/g s.m. ekstrakta, dok su FRAP vrednosti bile između oko 5.0 do 7.0 mmol Fe²⁺/l u uzorcima u kojima je sadržaj polifenola iznad 600 mg EGK/g s.m. ekstrakta.

Design-Expert® Software

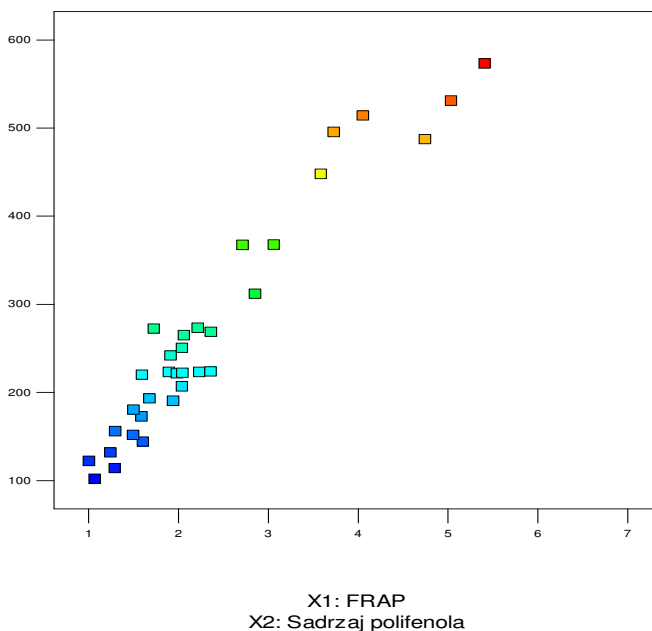
Correlation: 0.966

Color points by

Sadržaj polifenola

572.818

101.455



Slika 5.30. Odnos FRAP vrednosti i ukupnog sadržaja polifenola

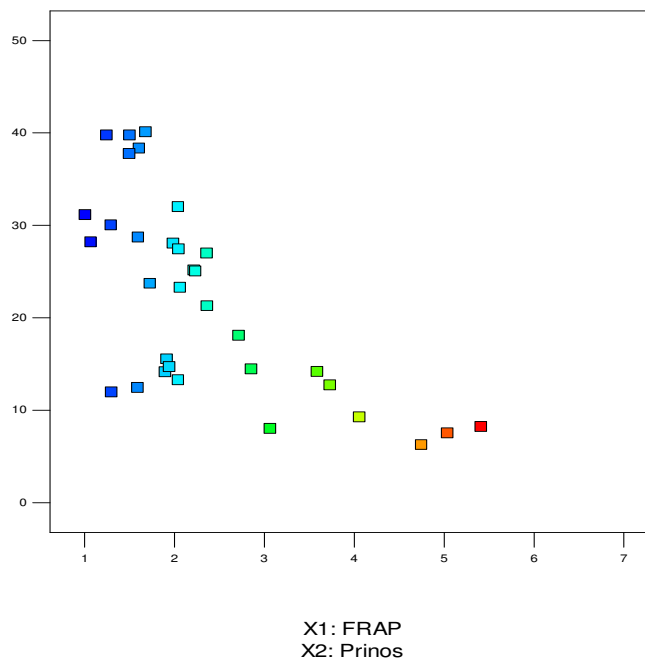
Korelacija FRAP vrednosti sa ukupnim prinosom ekstrakcije je prikazana na slici 5.31. Faktor korelacije iznosi -0.685. Iz ovih rezultata se vidi da je FRAP vrednost dobijenih ekstrakta takođe obrnuto srazmerna prinosu ekstrakcije, odnosno, veće FRAP vrednosti (između 6 i 7 mmol Fe²⁺/l) su dobijene u uzorcima gde je postignut manji ukupni prinos ekstrakcije (8 do 15 mg/g s.m.).

Design-Expert® Software

Correlation: -0.685

Color points by

FRAP



Slika 5.30. Odnos FRAP vrednosti i ukupnog prinosa ekstrakcije

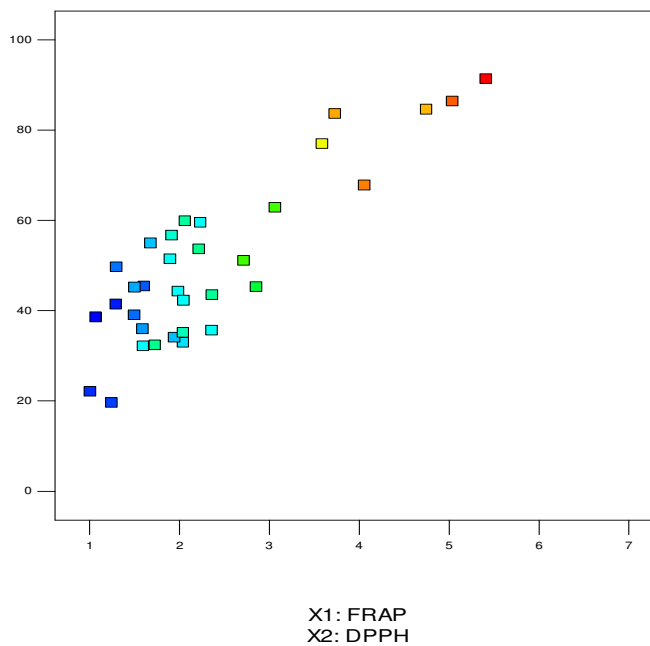
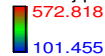
Još jedna korelacija se može utvrditi iz dobijenih podataka, a to je odnos FRAP i DPPH vrednosti (slika 5.31.).

Design-Expert® Software

Correlation: 0.865

Color points by

Sadržaj polifenola



Slika 5.31. Odnos FRAP vrednosti i procenta inhibicije DPPH radikala

Prema ovim rezultatima, postoji dobra korelacija između FRAP vrednosti i procenta inhibicije DPPH radikala (faktor korelacije 0.855). Uzorci ekstrakta kafe koji pokazuju visok procenat inhibicije DPPH radikla takođe poseduju i visoku FRAP vrednost. Manja odstupanja koja se mogu uočiti mogu biti posledica različite rastvorljivosti polifenola sa antioksidativnim svojstvima u različitim rastvaračima (metanolu za DPPH ili vodi za FRAP).

Dobijeni rezultati iz svih modela su visoko korelisani, što znači da se svaki model može koristiti za predviđanje ishoda na osnovu navedenih nezavisnih promenljivih. Validacija modela nisu pokazale statistički značajne razlike između rezultata dobijenih u eksperimentu i onih predviđenih modelima.

Na osnovu do sada izloženog, espresso TOK može biti jeftini izvor prirodnih antioksidanasa. Ekstrakti dobijeni iz espresso TOK u ovoj studiji imaju visok sadržaj UP (do 79.83 %) suve materije, dobijeno pod optimalnim eksperimentalnim ulovima. Nešto niža vrednost sadržaja UP (do 57.28 %) je dobijen pod optimalnim uslovima iz TOK crne kafe. U tom smislu, TOK se može porediti sa drugim izvorima koji se koriste u slične svrhe, kao što je kinema, jelo popularno u Nepalju koje nastaje fermentacijom soje, sa 135 mg EGK/g s.m. (Saha i sar., 2011); kora krompira 3.94 mg/g s.m. (Singh i sar., 2011); seme grožđa (*Vitis vinifera*), 5.44 mg EGK/100mL (Ghafoor i sar., 2009); paradajz, 4.89-9.97 mg EGK/g s.m. (Li i sar., 2012); ili čvrsti ostatak od luka (*Allium cepa*), za koji je teoretski predviđeno da ima 93.42 ± 14.35 mg EGK/g s.m., pod optimalnim uslovima (Kiassos i sar., 2009). Mnoge kompanije koje se bave proizvodnom hranom i kozmetičkom industrijom koriste MAE za ekstrakciju biljnih nutrijenata. Zanimljivo je napomenuti da kompanije CRODAROM i CODIF koriste MAE za ekstrakciju antioksidanasa i boja iz biljaka i morskih algi, respektivno (Li i sar., 2013). Oprema za mikrotalasnu ekstrakciju je još uvek u razvoju naročito za kontinuirane procese (Radoiu, 2013). Mandal i sar., 2007 su dali detaljni pregled MAE za ekstrakciju aktivnih komponenti lekovitog bilja i naglasili važnost optimizovanja MAE procesa za postizanje maksimalnog prinosa. Das i saradnici su u svom radu 2013. poredili različite metode za ekstrakciju lupeola iz *Ficus racemosa* listova. Oni su zaključili da je MAE brži i pogodniji metod za ekstrakciju, sa većim prinosom i nižom potrošnjom rastvarača u poređenju sa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Oni su takođe zaključili da se metoda odzivnih površina može koristiti za sve prirodne proizvode i da pri adekvatnoj upotrebi mogu biti efikasni u industrijskim razmerama.

Prikazani rezultati takođe sugerišu da MAE može biti efikasna tehnika za ekstrakciju polifenola iz otpadne espresso kafe. Sa kratkim vremenom ekstrakcije, nižom korišćenom snagom mikrotalasa i srednjim odnosom rastvarača prema čvrstoj materiji, kao i sa minimalnom koncentracijom etanola može se dobiti polifenolni ekstrakt sa visokom antioksidativnom aktivnošću.

5.4 Uticaj napitaka i ekstrakata taloga otpadne espreso i crne kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima u *in vitro* eksperimentalnim uslovima

5.4.1 Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u uzorcima napitaka i ekstrakata taloga otpadne espreso i crne kafe

Sadržaj ukupnih polifenola, hlorogene kiseline i kofeina u ispitivanim napicima crne i espreso kafe, kao i u obezmašćenim ekstraktima taloga otpadne crne i espreso kafe prikazani su u tabeli 5.27.

Uporedo sa određivanjem sadržaja bioaktivnih jedinjenja u ovim uzorcima, određen je i njihov antioksidativni potencijal primenom DPPH i FRAP testa, opisanim u poglavljima 4.2.5.3 i 4.2.5.4, respektivno.

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.27.

Tabela 5.27. Sadržaj ukupnih polifenola, hlorogene kiseline i kofeina i antioksidativni potencijal u uzorcima napitaka i taloga otpadne espreso i crne kafe

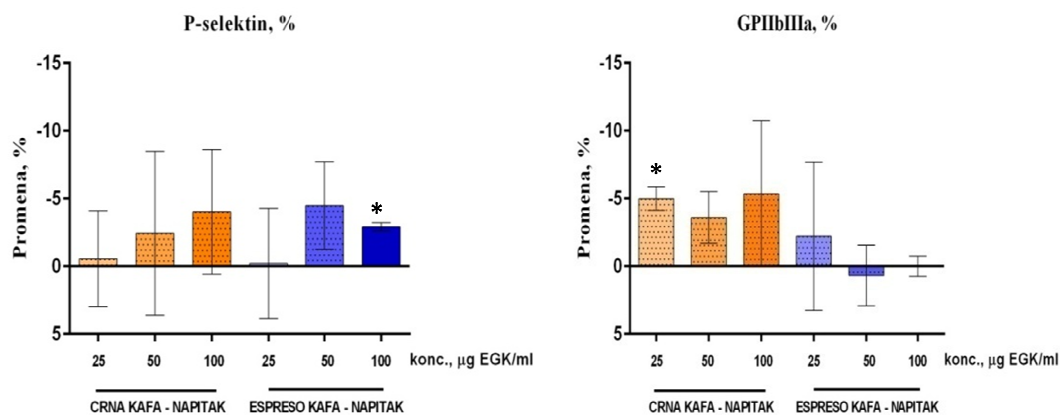
Uzorak	Ukupni polifenoli (mg EGK/g s.m. ekstrakta)	DPPH % ¹	FRAP (mmol Fe ²⁺ /l)	Hlorogenska kiselina (mg /g)	Kofein (mg /g)
Espresso napitak	189.5	57.4	1.44	3.30	2.84
Espresso TOK	210.6	61.8	1.48	3.89	3.15
Crna kafa napitak	134.8	42.8	0.99	4.08	3.65
Crna kafa TOK	168.1	55.4	1.50	3.75	3.25

¹za koncentraciju 1 mg ekstrakta

5.4.2 Uticaj napitaka crne i espresso kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima

Analiza napitaka crne i espresso kafe, u istom rasponu koncentracija ukupnih polifenola (25, 50 i 100 μg EGK/ ml) u predloženom eksperimentalnom modelu, imala je za cilj ispitivanje njihovog delovanja na aktivaciju i agregaciju sa monocitima i neutrofilima, u odnosu na sastav specifičnih polifenola prisutnih u njima, kao i potencijalno antagonističko delovanje drugih sastojaka.

Uticaj ekstrakata crne i espresso kafe na aktivaciju trombocita delovanjem adenzin-difosfata, kao agoniste njihove funkcije, praćen je određivanjem procenata P-selektin-pozitivnih i GPIIb/IIIa-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ($n=20000$) krvi zdravih ispitanika ($n=5$). Dobijeni rezultati prikazani su na slici 5.32.



Slika 5.32. Uticaj napitaka crne i espresso kafe na procenat P-selektin- i GPIIb/IIIa-pozitivnih trombocita u populaciji trombocita krvi zdravih ispitanika ($n=5$) nakon *in vitro* delovanja ADP-a ($0,25 \mu\text{M}$). Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i ADP-om i predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: * $p < 0.05$; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Rezultati su prikazani tzv. „box and whisker“ dijagramima, gde visina stuba predstavlja srednju vrednost promene P-selektin i GPIIb/IIIa pozitivnih trombocita

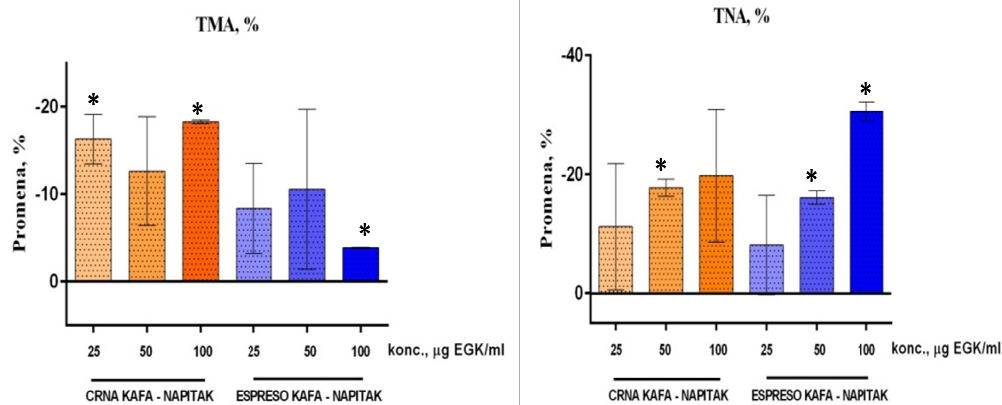
(aktiviranih trombocita), u prisustvu različitih koncentracija polifenola u napicima i ETOK crne i espresso kafe (izraženu u procentima) a crta (eng: whisker) po sredini stuba standardnu devijaciju. Pokazana je dozna zavisnost delovanja napitka crne kafe na ekspresiju P-selektina ($r=0,943$), adhezionog receptora odgovornog za interakciju trombocita sa leukocitima i endotelnim ćelijama kao ključnim činiocima u procesu aterogeneze i etiopatologije kardiovaskularnih bolesti. Takođe je izražena inter individualna varijacija.

Napici crne i espresso kafe pri srednjoj koncentraciji polifenola, izraženim u $\mu\text{g}/\text{mL}$ ekvivalenata galne kiseline ($50 \mu\text{g EGK}/\text{ml}$) dovode do inhibicije ekspresije P-selektina u rasponu od 2.6-4.7 % i 3.7-7.7 %, uz uočenu doznu zavisnost. Pri najvećoj koncentraciji od $100 \mu\text{g EGK}/\text{ml}$ kod napitka crne kafe, inhibicija P-selektina se kreće u rasponu od 3.4 do 6.7 %. Kod napitka espresso kafe, pri najvišoj koncentraciji od $100 \mu\text{g EGK}/\text{ml}$, uočena je nesrazmerna inhibicija od 2.3-6.4 %, što ukazuje na antagonističko delovanje, tj. mogućnost da je u ovoj vrsti ekstrakata prisutna i komponenta sa stimulatornim delovanjem.

Za razliku od napitka crne kafe koji je pokazao efekat na ekspresiju drugog aktivacionog markera, GPIIb/IIIa, u svim ispitivanim koncentracijama (25, 50 i $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ EGK), bez uočene dozne zavisnosti, napitak espresso kafe nije pokazao značajne efekte. Ovaj glikoprotein ima funkciju receptora za fibrinogen i posreduje u homotipskoj agregaciji trombocita sa drugim trombocitima, pa samim tim ima ključnu ulogu u etiopatogenezi tromboze.

Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal polifenola prisutnih u napicima crne i espresso kafe da modulišu aktivnost trombocita pri delovanju ADP-a kao intrizičkog agoniste (unutrašnjeg – trombociti u sebi imaju rezervoar ADP-a) njihove funkcije.

Kao parametri agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima, određivani su procenat agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita i procenat agregata trombocita i neutrofila u ukupnoj populaciji neutrofila zdravih ispitanika, kao odgovor na agonističko delovanje ADP-a.



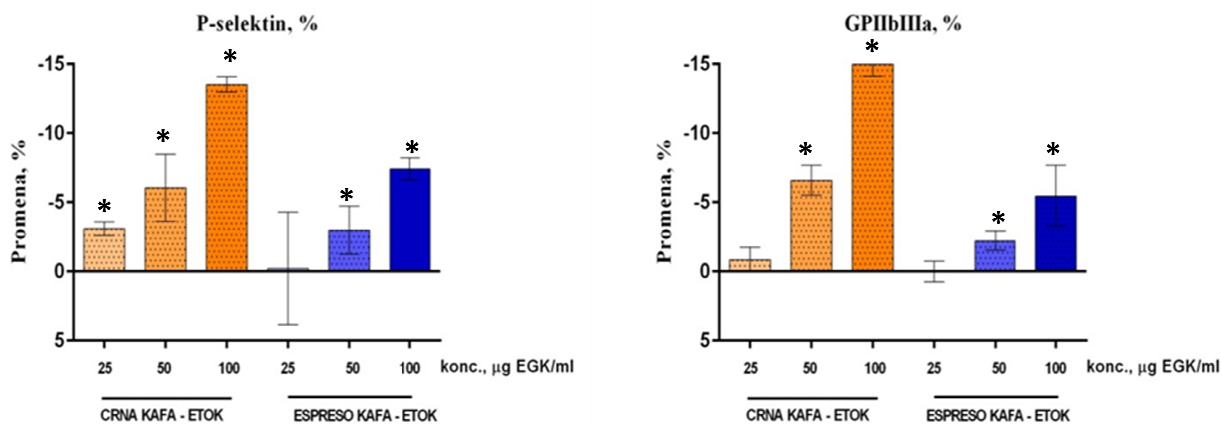
Slika 5.33. Uticaj napitaka crne i espreso kafe na procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u populaciji monocita ($n = 1000$) i procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u populaciji neutrofila ($n = 10000$), kod zdravih ispitanika nakon delovanja ADP-a kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i ADP-om i predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: $*p < 0.05$; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Dobijeni rezultati, prikazani na slici 5.33, ukazuju na potencijal prisutnih polifenola da inhibiraju agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima. Napitak crne kafe je pokazao značajno delovanje na inhibiciju agregacije trombocita sa monocitima, u interval od 13.4 do 18.7 %, bez uočene dozne zavisnosti. Dozna zavisnost je izražena u inhibitornom delovanju na agregaciju sa neutrofilima, statistički značajno pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g EGK/ml}$, što indirektno može da ukaže i na antiinflamatorno delovanje prisutnih bioaktivnih jedinjenja.

Napitak espreso kafe je pokazao manje izraženo delovanje na agregaciju trombocita sa monocitima u odnosu na napitak crne kafe a izraženije delovanje (do 32.8 %,) na agregaciju trombocita sa neutrofilima u odnosu na napitak crne kafe, uz izraženu doznu zavisnost. Izražena interindividualna varijacija delimično ukazuje na potrebu za detaljnijim ispitivanjem na većem broju ispitanika u stogo kontrolisanim uslovima.

5.4.3 Uticaj ekstrakata taloga otpadne espresso i crne kafe na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima u *in vitro* eksperimentalnim uslovima

Uticaj ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa izraženu kao procenat P-selektin-pozitivnih i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita krvi zdravih ispitanika kao odgovor na agonističko delovanje ADP-a, prikazani su na slici 5.34, kao procenat promene analiziranih parametara u odnosu na kontrolne uzorke tretirane DMSO-om i ADP-om.

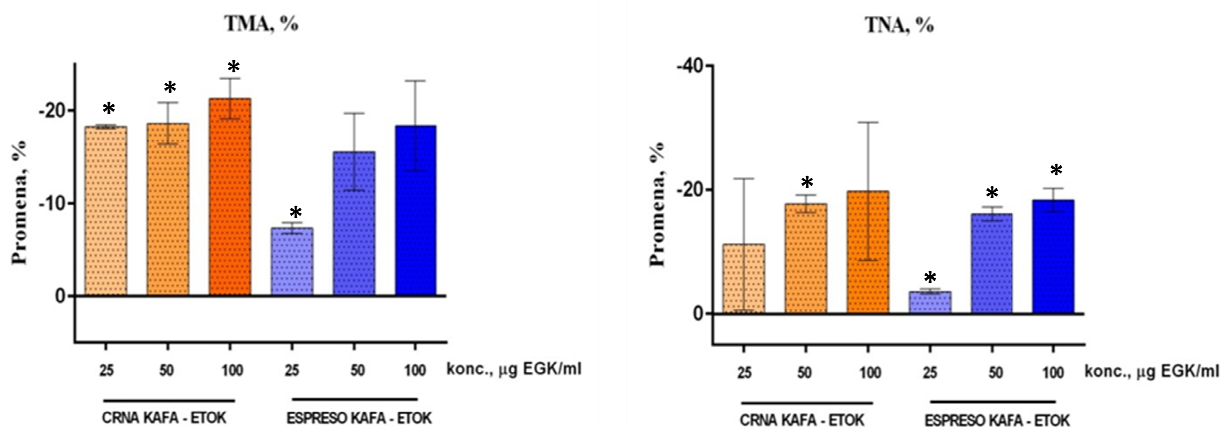


Slika 5.34. Uticaj ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe na procenat P-selektin- i GPIIb/IIIa-pozitivnih trombocita u populaciji trombocita krvi zdravih ispitanika (n=5) nakon *in vitro* delovanja ADP-a (0,25 µM). Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu ADP-om i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: *p<0.05; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da polifenoli prisutni u ekstraktima taloga crne i espresso kafe imaju izraženije delovanje na aktivaciju trombocita u odnosu na polifenole prisutne u napicima, pri istim koncentracijama. Ne postoji statistički značajna razlika u delovanju na pojedine aktivacione markere (P-selektin i GPIIb/IIIa) pri istim koncentracijama polifenola iste vrste ekstrakta, dok je pokazano izraženije delovanje polifenola taloga crne u odnosu na espresso kafu. Uočeno je dozno zavisno delovanje polifenola prisutnih u talogu i na P-selektin i GPIIb/IIIa aktivacione markere. Kod napitka

crne kafe, smanjenje ekspresije P-selektina pri svim koncentracijama polifenola je pokazalo statističku značajnost, dok smanjenje ekspresije oba aktivaciona markera pri najvećim koncentracijama polifenola (100 $\mu\text{g EGK/ml}$), ide i do 15%.

Rezultati ispitivanja delovanja ekstrakata taloga crne i espresso kafe na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima prikazani su na slici 5.35.



Slika 5.35. Uticaj ekstrakata taloga otpadne crne i espresso kafe na agregata trombocita i monocita (TMA) u populaciji monocita ($n = 1000$) i procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u populaciji neutrofila ($n = 10000$), kod zdravih ispitanika nakon delovanja ADP-a kao agonista ($0,25 \mu\text{M}$). Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu ADP-om i predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: * $p < 0.05$; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Dobijeni rezultati ukazuju na izraženo delovanje ETOK i crne i espresso kafe na agregaciju trombocita sa monocitima, sa izaženijom doznom zavisnošću ETOK espresso kafe (0.948) u odnosu na ETOK crne kafe (0.795). Delovanje na agregaciju trombocita sa neutrofilima pokazuje umerenu doznu zavisnost za oba ekstrakta (0.778 i 0.705), bez statistički značajne razlike u odnosu na napitke crne i espresso kafa sa istim sadržajem polifenola. Kod taloga crne kafe uočeno je statistički značajno delovanje ekstrakta na agregaciju trombocita sa monocitima koje se kreće do 22.4 % i trombocita sa neutrofilima do 24.3 %. Kod espresso ETOK, pokazano je statistički značajno delovanje na agregaciju trombocita sa monocitima pri najnižim koncentracijama i delovanje na agregaciju trombocita sa monocitima pri svim ispitivanim koncentracijama (25, 50 i 100 $\mu\text{g EGK/ml}$).

Rezultati prikazani u ovom radu potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja i činjenicu da bioaktivne komponente kafe imaju potencijal da povoljno deluju na funkciju trombocita. Dodatno, izraženije delovanje ekstrakta taloga otpadne kafe odnosu na odgovarajuće napitke, ukazuje na povoljniji profil bioaktivnih komponenata ili odsustvo komponenata sa pro-trombocitnim delovanjem i time racionalizuje njihovu primenu kao funkcionalnih sastojaka. Fiziološki značaj dobijenih vrednosti inhibicije aktivacije trombocita u prevenciji KVB potvrđuju rezultati studije na životinjama koji su pokazali da je prisustvo samo 7% aktiviranih trombocita u cirkulaciji, koji su 3 puta dnevno ubrizgavani miševima u periodu od 4 nedelje, dovelo do povećanja aterosklerotskih lezija za 30% (Huo i sar., 2003).

Istovremeno, iako je uzeto kao osnova procene biološke aktivnosti ekstrakata u ovom radu, delovanje na trombocite predstavlja samo jedno od mnogobrojnih povoljnih efekata polifenola kafe na zdravlje ljudi, koja favorizuju njihovu primenu. Druga potvrđena delovanja uključuju inhibiciju enzima odgovornih za digestiju ugljenih hidrata i masti u gastro-intestinalnom traktu (Dougall i sar., 2008), inhibiciju resorpcije glukoze i drugih ugljenih hidrata iz digestivnog trakta (Williamson, 2013), specifično inhibiciju delovanja na proces glukoneogeneze u jetri i povećanje osetljivosti na insulin (Akash i sar., 2014), povoljno delovanje na funkciju endotela krvnih sudova (Ochiai i sar., 2014), i mnoga druga (Ludwig i sar., 2014).

6 ZAKLJUČAK

6.1 Nutritivni sastav crne kafe u Srbiji - Srpska baza podataka o sastavu namirnica

Crna kafa se pije kao nezaobilazni dnevni ritual u Srbiji i kao takva, kafa predstavlja napitak koji ima težinu kulturološkog i socijalnog fenomena. Zasnovoano na podacima dobijenim iz istraživanja sprovedenim u okviru CHANCE projekta, crna kafa je veoma zastupljena u značajnim količinama među stanovništvom Srbije, dok je tradicionalni način pripreme kafe najzastupljeniji. Podaci za infuziju kafe u SBPSN su do sada bili nekompletni



i kopirani iz drugih BPSN, bez obzira na to što se crna kafa smatra “tradicionalnom hranom”, s obzirom na način pripreme. Predstavljeni rezultati su originalni analitički podaci koji su u skladu sa kriterijumima definisanim od strane EuroFIR-a, što je neophodno da bi mogli biti uključeni u SBPSN i dalje razmenjivani putem EuroFIR FoodEXplorer-a (Ranić i sar., 2015). Izgled strane SBPSN sa analitičkim podacima za crnu kafu je dat u Prilogu 3, slika P 3.1.

Primećene razlike u nutritivnom sastavu pržene kafe i kafene infuzije među zemljama se mogu pripisati različitim načinima pripreme, različitim robnim markama i proizvođačima ili različitom sastavu vode iz česme koja se koristi za pripremu kafe. Predstavljeni rad je imao za cilj da pruži podatke o sastavu infuzija kafe pripremljenih na široko rasprostranjeni način u domaćem okruženju u Srbiji, bez dodatka šećera. Sastav kafe sa dodatim šećerom, zaslađivačem ili mlekom, koja se često konzumira kao takva, može se računati kao recept. Pretpostavljeni uticaj dodate hrane na ekstrakciju mikro i makronutrijenta, i bioaktivnih sastojaka može biti predmet daljih istraživanja.

Sadržaj makronutrijenata crne kafe je u saglasnosti sa podacima datim u drugim BPSN i karakteriše ga niska energetska vrednost i umeren doprinos dijetarnom unosu

makronutrijenata. Konzumiranje jake infuzije u frekvenciji od 200 ml (2 šolje) dnevno, može se smatrati značajnim za unos kalijuma sa doprinosom od 11 % dnevnom referentnom unosu.

Iako se pojedinačne doze kofeina do 200 mg (oko 3 mg / kg telesne mase za 70- kg za odrasle) smatraju sigurnim tj. ne dovode do zabrinutosti oko nepoželjnih efekata po zdravlje za opšte zdrave populacije, na osnovu naučno zasnovanog mišljenja EFSA NDA panela (2015), sadržaj kofeina u jakoj infuziji crne kafe u vrednosti od 118 mg /100 ml kafe ukazuje na generalno visok dnevni unos među srpskim stanovništvom, uzimajući u obzir i druge izvore kofeina u ukupnom dnevnom unosu.

S obzirom na relativno nizak dnevni unos (CHANCE, 2013) drugih namirnica u Srbiji sa visokim sadržajem hlorogenske kiseline, kao što su borovnice, kivi, šljive, trešnje, jabuke sa oko 50 -200 mg hlorogenske kiseline/100g svežeg voća (Manach, 2004), može se zaključiti da kafa sa 136 mg/100g jake infuzije predstavlja značajan izvor hlorogenske kiseline u ukupnom dnevnom unosu. Takodje, kafa se može smatrati značajnim izvorom polifenola u ukupnom dnevnom unosu koji može dostići 1 g/dnevno kod ljudi koji konzumiraju nekoliko porcija voća i povrća u toku dana (Manach, 2004).

Kao deo SBPSN, dobijeni podaci u prezentovanom radu se mogu dalje koristiti za tačnu procenu unosa makro-, mikronutrimenata kao i ne-nutritivnih jedinjenja, na osnovu različitih metoda za procenu dijetarnog unosa. Stoga, to omogućava definisanje adekvatnih nutritivnih preporuka i zdravstvene politike na nacionalnom nivou i takođe se treba uzeti u obzir prilikom planiranja ishrane ili kao važno sredstvo u epidemiološkim randomiziranim kliničkim studijama.

6.2 Optimizacija procesa ekstrakcije jedinjenja polifenola iz taloga otpadne espreso i crne kafe

Samoodrživost proizvodnje i prerade kafe se može značajno poboljšati upotrebom nus proizvoda, usvajanjem novih tehnologija koji maksimiziraju profitabilnost procesa. Talog nastao pripremanjem espreso i crne kafe predstavlja besplatni nus-proizvod konzumiranja kafe. Talog sadrži značajnu količinu vrednih polifnolnih i drugih jedinjenja sa

visokom antioksidativnim kapacitetom. MAE zajedno sa RSM se pokazao kao efikasan u proceni tri nezavisno promenljive (VE, RČ i SMT) na ekstrakciju polifenola iz otpadne kafe.

6.2.1 Espresso kafa

1. Najveći prinos ekstrakcije se postiže pri dužem vremenu ekstrakcije (180 s i više) i pri višoj vrednosti odnosa tečno/čvrsto (12 ml/g) pri većoj snazi mikrotalasnog zagrevanja od 550 W.

2. Na sadržaj polifenola značajno utiču svi procesni parametri (VE, RČ i SMT), a najveći prinos se postiže kombinacijom kraćeg vremena (od 40 s do 110 s) i odnosa tečno/čvrsto od 6-9 ml/g, uz snagu mikrotalasnog zagrevanja oko 240 W.

3. Veći procenat inhibicije DPPH radikala, postignut je za kraće vreme (do 40 s) i pri manjoj snazi mikrotalasnog zagrevanja.

4. Najveće FRAP vrednosti su dobijene korišćenjem manje snage mikrotalasnog zagrevanja (240 W), kao i kraćeg vremena (do 40 s).

5. Uzorci ekstrakta espresso kafe koji pokazuju visok procenat inhibicije DPPH radikala takođe poseduju i visoku FRAP vrednost.

6. Rezultati ispitivanja u ovom radu su pokazali da su svi primenjeni modeli značajni, sa različitim brojem značajnih faktora i njihovih međusobnih odnosa i da postoji visok koeficijent korelacije R^2 , odnosno, da se svi modeli mogu dobro opisati dobijenim jednačinama.

7. Rezultati validacije modela su pokazali da nema značajne statističke razlike između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti za zadate parametre.

6.2.2 Crna kafa

1. Najveći prinos ekstrakcije se postiže pri dužem vremenu ekstrakcije (180 s i više) i pri višoj vrednosti odnosa rastvarač – čvrsta faza (12 ml/g) pri srednjoj snazi mikrotalasnog zagrevanja od 400 W.

2. Na sadržaj polifenola značajno utiču svi procesni parametri (VE, RČ i SMT) a najveći prinos se postiže kombinacijom kraćeg vremena (do 110 s) i odnosa rastvarač – čvrsta faza od 9-12 ml/g, uz snagu mikrotalasnog zagrevanja oko 240 W.

3. Veći procenat inhibicije DPPH radikala, postignut je za kraće vreme (od 40 s) i pri snazi mikrotalasnog zagrevanja oko 240 W.

4. Na FRAP vrednosti, najveći uticaj ima vreme ekstrakcije.

5. Rezultati ispitivanja u ovom radu su pokazali da su svi primenjeni modeli značajni, sa različitim brojem značajnih faktora i njihovih međusobnih odnosa i da postoji visok koeficijent korelacije R^2 , odnosno, da se svi modeli mogu dobro opisati dobijenim jednačinama.

6. Rezultati validacije modela su pokazali da nema značajne statističke razlike između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti za zadate parametre.

6.3 Uticaj kafe i otpadne kafe na funkciju trombocita

1. Rezultati su pokazali da napici espresso i crne kafe inhibiraju ekspresiju P-selektina i u manjoj meri GPIIb/IIIa, kao markera aktivacije trombocita nakon delovanja ADP-a *in vitro*. Ovi efekti su delimično dozno zavisni. Pokazana dozna zavisnost izražavanja je u delovanju napitka crne kafe.

2. Ekstrakti taloga otpadne kafe sa istim sadržajem ukupnih polifenola kao i napici, pokazali su izraženije delovanje u pogledu inhibicije ekspresije aktivacionih markera, P-selektina i GPIIb/IIIa, pri delovanju agoniste *in vitro*.

3. Uporedo sa delovanjem na aktivaciju ispitivani napici u *in vitro* uslovima inhibiraju i agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima, ključnim činiocima u etiologiji ateroskleroze.

4. Inhibicija aktivacije delovanjem bioaktivnih komponenata ekstrakata taloga otpadne kafe praćena je i srazmernim smanjenjem agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima indukovane ADP-om *in vitro*.

5. Dobijeni rezultati pokazuju da talog otpadne kafe predstavlja značajan izvor polifenola kao biološki aktivnih sastojaka kafe sa specifičnim antitrombocitnim delovanjem, koje potencijalno doprinosi plejotropnom povoljnom efektu polifenola na zdravlje ljudi.

6. Istovremeno, izraženije delovanje polifenola ekstrakata taloga otpadne kafe na funkciju trombocita u odnosu na delovanje napitka istog sadržaja polifenola, ukazuje na veći antitrombocitni potencijal specifičnih polifenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima.

Iako je potrebna detaljna analiza troškova za procenu ekonomske isplativosti predloženog pristupa, analize i rezultate iskazane u ovoj studiji mogu biti od velikog značaja za buduću eksploataciju taloga otpadne espresso i crne kafe kao vredan izvor prirodnih antioksidansa u industrijskim razmerama.

Dobijeni rezultati ispitivanja antitrombocitnog delovanja polifenola kafe u proceni optimizacije ekstrakcije biološki aktivnih sastojaka, potvrđuju činjenicu da komponente kafe imaju potencijal da povoljno deluju na funkciju trombocita. Dodatno, izraženije delovanje ekstrakta taloga otpadne kafe u odnosu na odgovarajuće napitke, ukazuje na povoljniji profil bioaktivnih komponenata ili odsustvo komponenata sa pro-trombocitnim delovanjem i time racionalizuje njihovu primenu kao funkcionalnih sastojaka.

Predstavljeni podaci (Ranic i sar., 2014) mogli bi biti pouzdane smernice za izradu projekta punog opsega i samim tim dobra poslovna mogućnost za mala i srednja preduzeća u cilju proizvodnje obogaćene hrane ili dodataka ishrani sa farmakološkim dozama i procenjenom bezbednosti primenjenih doza (Mennen i sar., 2005).

7 LITERATURA

- Adams, M., & Ghaly, A. E. (2007). Maximizing sustainability of the Costa Rican coffee industry. *Journal of Cleaner Production*, 15(17), 1716-1729.
- Adriana, S.F. & Leandro, S.O. (2009). Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives, in: G.S. Ashworth, P. Azevedo, Eds. *Agricultural Wastes*, Nova Science Publishers.
- Akash, M. S., Rehman, K., & Chen, S. (2014). Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition*, 30(7-8), 755-763.
- Ali, F., Rehman, H., Babayan, Z., Stapleton, D., & Joshi, D. D. (2015). Energy drinks and their adverse health effects: a systematic review of the current evidence. *Postgrad Med*, 1-15.
- Allen, T.T. (2006). *Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems*. Springer, London.
- Andersen, L. F., Jacobs, D. R., Jr., Carlsen, M. H., & Blomhoff, R. (2006). Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr*, 83(5), 1039-1046.
- Anissi, J., El Hassouni, M., Ouardaoui, A., & Sendide, K. (2014). A comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: a kinetic approach. *Food Chem*, 150, 438-447.
- AOAC (1990). Method 985.29. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (1995). Method 923.03. *Official methods of analysis of AOAC international*, 16th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (1995). Method 935.29. *Official methods of analysis of AOAC international*, 16th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (1995). Method 954.02. *Official methods of analysis of AOAC international*, 16th ed. Gaithersburg, MD, USA.

- AOAC (1998). Method 957.04, Official methods of analysis of AOAC international, 16th ed. ed. 4th Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (1998). Method 962.13. Official methods of analysis of AOAC international, 16th ed. ed. 4th Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (1998). Method 965.25. Official methods of analysis of AOAC international, 16th ed. ed. 4th Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (2000). Method 999.11. Association of Official Analytical Chemists. In Official methods of analysis chemists (17th ed.). Washington, DC.
- AOAC (2005). Method 2001.11. Official methods of analysis of AOAC international, 18th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- Ashu, R., & Chandravanshi, B. S. (2011). Concentration levels of metals in commercially available Ethiopian roasted coffee powders and their infusions. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*.
- Asiedu, J. J. (1991). *Processing tropical crops: a technological approach*. Economie et Developpement (France). ISBN 2-86537-334-7.
- Bak, A. A., van Vliet, H. H., & Grobbee, D. E. (1990). Coffee, caffeine and hemostasis: results from two randomized studies. *Atherosclerosis*, 83(2-3), 249-255.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185-1192.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. F. (2009). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *J Agric Food Chem*, 57(8), 3064-3072.
- Barnard, M. R., Krueger, L. A., Frelinger, A. L., 3rd, Furman, M. I., & Michelson, A. D. (2003). Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 6, Unit 6 15.
- Bazzano, L. A., Serdula, M. K., & Liu, S. (2003). Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, 5(6), 492-499.
- BDA (2008). *Food Composition Database for Epidemiological Studies in Italy, Version 1*. Objavljena januara 2008, European Institute of Oncology. Objavljena online na: <http://www.ieo.it/>.

- Becker, W., Møller, A., Ireland, J., Roe, M., Unwin, I., & Pakkala, H. (2008). Proposal for Structure and Detail of a EuroFIR Standard on Food Composition Data. II: Technical Annex. European Food Information Resource Network.
- Becker, W., Unwin, I., Ireland, J., & Møller, A. (2007). Proposal for Structure and Detail of a EuroFIR Standard on Food Composition Data. I: Description of Standard European Food Information Resource Network.
- Bell, S., Pakkala, H., & Finglas, M. P. (2012). Towards a European food composition data interchange platform. *Int J Vitam Nutr Res*, 82(3), 209-215.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bhaskar, S., & Rauf, A. A. (2010). Modulatory effect of coffee on platelet function. *Indian J Physiol Pharmacol*, 54(2), 141-148.
- Bilek, S. E. (2010). The effects of time, temperature, solvent: solid ratio and solvent composition on extraction of total phenolic compound from dried olive (*Olea europaea* L.) leaves. *GIDA*, 35(6), 411-416.
- Blekić, M., Jambrak, A.R., & Chemat, F. (2011). Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 3 (1) 32-47.
- BLS (2004). The German Nutrient Data Base. Objavljena maja 2004. Federal Research Centre for Nutrition and Food (BfEL). Objavljena online na: <http://www.bls.nvs2.de/>.
- Bomhard, E. M., Bremmer, J. N., & Herbold, B. A. (1992). Review of the mutagenicity/genotoxicity of butylated hydroxytoluene. *Mutat Res*, 277(3), 187-200.
- Bond, T.G. (2012). *Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health*, ed. A. Crozier, H. Ashihara and F. Tomas-Barberan, Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 1-24.
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem*, 50(22), 6527-6533.

- Bosmans, A., Vanderreydt, I., Geysen, D., & Helsen, L. (2013). The crucial role of Waste-to-Energy technologies in enhanced landfill mining: a technology review. *Journal of Cleaner Production*, 55(0), 10-23.
- Brand Puls (2012). <http://marketnetwork.rs/retail/analiza/> 43-trgovina-analiza-istrzivanje/1258-kafa-kava-kahva
- Bravo, J., Juániz, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Evaluation of Spent Coffee Obtained from the Most Common Coffeemakers as a Source of Hydrophilic Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12565-12573.
- Bravo, J., Monente, C., Juániz, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610-616.
- Broijersen, A., Hamsten, A., Eriksson, M., Angelin, B., & Hjemdahl, P. (1998). Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia-importance of combined hyperlipidemia. *Thromb Haemost*, 79(2), 268-275.
- Buffo, R. A., & Cardelli-Freire, C. (2004). Coffee flavour: an overview. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2), 99-104.
- Bureau, S., Razungles, A., Baumes, R., & Bayonove, C. (1996). Glycosylated Flavor Precursor Extraction by Microwaves from Grape Juice and Grapes. *Journal of Food Science*, 61(3), 557-560.
- Buscemi, S., Verga, S., Batsis, J. A., Tranchina, M. R., Belmonte, S., Mattina, A., et al. (2009). Dose-dependent effects of decaffeinated coffee on endothelial function in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(10), 1200-1205.
- Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2011). Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(4), 363-373.
- Bydlowski, S. P., Yunker, R. L., Rymaszewski, Z., & Subbiah, M. T. (1987). Coffee extracts inhibit platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Vitam Nutr Res*, 57(2), 217-223.
- Cämmerer, B., & Kroh, L. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223(4), 469-474. Nema ga u radu??

- Campos, D.A. (2012). Ecological Device for Quick Removal and Without Knocking Impact of the Spent Espresso Coffee Grounds. EP 1803380 A3. <http://www.google.com/patents/EP1803380A2?hl=sr&cl=en>.
- Cassidy, A., Mukamal, K. J., Liu, L., Franz, M., Eliassen, A. H., & Rimm, E. B. (2013). High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation*, 127(2), 188-196.
- Castanheira, I., Roe, M., Westenbrink, S., Ireland, J., Møller, A., Salvini, S., Beernaert, H., Oseredczuk, M., & Calhau, M. A. (2009). Establishing quality management systems for European food composition databases. *Food Chemistry*, 113(3), 776-780.
- Chakrabarti, S., Vitseva, O., Iyu, D., Varghese, S., & Freedman, J. E. (2005). The effect of dipyrindamole on vascular cell-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(2), 494-500.
- CHANCE (2013). FP7 EC project. Low cost technologies and traditional ingredients for the production of affordable, nutritionally correct foods improving health in population groups at risk of poverty. Preuzeto novembra 2013 sa: <http://www.chancefood.eu/>.
- Chandra, T., Gupta, A., & Kumar, A. (2014). Extended shelf life of random donor platelets stored for 7 days in platelet additive solution at different temperatures. *Biomed J*, 37(4), 211-217.
- Charurin, P., Ames, J. M., & del Castillo, M. D. (2002). Antioxidant activity of coffee model systems. *J Agric Food Chem*, 50(13), 3751-3756.
- Chemat, S., Aït-Amar, H., Lagha, A., & Esveld, D. C. (2005). Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44(12), 1320-1326.
- Chen, S. S. and Spiro, M. (1995). Kinetics of microwave extraction of rosemary leaves in hexane, ethanol and a hexane + ethanol mixture. *Flavour Fragr. J.*, 10, 101-112.
- Chen, S. S., and Spiro, M. (1994). Study of microwave process of essential oil constituents from plant materials. *The Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 29(4), 231-241.
- Chen, Y., Xie, M.-Y., & Gong, X.-F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162-170.

- Cheng, B., Liu, X., Gong, H., Huang, L., Chen, H., Zhang, X., Li, C., Yang, M., Ma, B., Jiao, L., Zheng, L., & Huang, K. (2011). Coffee Components Inhibit Amyloid Formation of Human Islet Amyloid Polypeptide in Vitro: Possible Link between Coffee Consumption and Diabetes Mellitus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13147-13155.
- Chiyanzu, I., Brienzo, M., Garcia-Aparicio, M. P., & Gorgens, J. F. (2014). Application of endo-beta-1,4,D-mannanase and cellulase for the release of manno oligosaccharides from steam-pretreated spent coffee ground. *Appl Biochem Biotechnol*, 172(7), 3538-3557.
- Clarke, R. & Vitzthum, O. G. (2001). *Coffee: Recent Developments*, Wiley-Blackwell, ISBN: 978-0-632-05553-1 272 page.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362-372.
- CNF (2012). Canadian Nutrient File. Modifikovana: 2012-04-26. Health Canada. Objavljena online na: <http://webprod3.hc-sc.gc.ca/cnf-fce/index-eng.jsp>
- Cochran, W.G. & Cox, G.M. (1992). *Experimental designs*, 2nd edn. John Wiley and Sons, New York. 335-375.
- Coffeeresearch (2014). (www.coffeeresearch.org/agriculture/processing.htm).
- Costa Coffee (2013). (<http://www.costacoffee.com/>).
- Crippa, A., Discacciati, A., Larsson, S. C., Wolk, A., & Orsini, N. (2014). Coffee consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a dose-response meta-analysis. *Am J Epidemiol*, 180(8), 763-775.
- Cruz, M. V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V. D., Simões, P., Barreiros, S., & Reis, M. A. M. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource Technology*, 157(0), 360-363.
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., & Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *J Agric Food Chem*, 60(32), 7777-7784.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blume*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144–1152.

- Daglia, M., Racchi, M., Papetti, A., Lanni, C., Govoni, S., & Gazzani, G. (2004). In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem*, 52(6), 1700-1704.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Das, A. K., Mandal, V., & Mandal, S. C. (2013). Design of experiment approach for the process optimisation of microwave assisted extraction of lupeol from *Ficus racemosa* leaves using response surface methodology. *Phytochem Anal*, 24(3), 230-247.
- Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2005). Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem*, 53(5), 1403-1407.
- DFCDB (2009). The Danish Food Composition Database. Nova verzija mart 2009., National Food Institute - Technical University of Denmark (DTU). Objavljena online na: <http://www.foodcomp.dk/>
- Dorđević, T. M., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119(3), 957-963.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- EFSA NDA (2010). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061, *EFSA Journal*, 8, 2,1489.
- EFSA NDA (2011). EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health, *EFSA Journal*, 9, 12, 2474.
- EFSA NDA (2015). EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the safety of caffeine, *EFSA Journal*, 13, 5, 4102.

- Eilat-Adar, S., Sinai, T., Yosefy, C., & Henkin, Y. (2013). Nutritional Recommendations for Cardiovascular Disease Prevention. *Nutrients*, 5(9), 3646-3683.
- Enciclopedia Britannica (2014).
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/124329/coffee>
- Escribano-Bailon M.T., & Santos-Buelga C. (2003). Polyphenols Extraction from Foods. In: *Methods in Polyphenol Analysis* (eds. C. Santos-Buelga, G. Williamson). Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, pp. 1–16.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488-495.
- EU Regulation (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers adopted by the European Parliament and the Council. *Official Journal of the EU L 304/61, Annex VIII*
- EuroFIR (2014). European Food Information Resource – Food composition databases.
http://www.eurofir.org/?page_id=96.
- EuroFIR Thesauri (2013). European Food Information Resource Thesauri. Preuzeto oktobra 2014. sa: http://www.eurofir.org/?page_id=209.
- Euromonitor International (2009). www.euromonitor.com
- EUROSTAT (2013). Income, Social Inclusion and Living Conditions.
http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/income_social_inclusion_living_conditions/introduction
- Farah, A. & Donangelo, C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol*, 18(1), 23-36.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M., & Lafay, S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr*, 138(12), 2309-2315.
- FDA (2008). Guidance for Industry, Food Labeling; Nutrient Content Claims; Definition for "High Potency" and Definition for "Antioxidant" for Use in Nutrient Content Claims for Dietary Supplements and Conventional Foods U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition

- Finglas, P., Weichselbaum, E., & Buttriss, J.L. (2010). The 3rd International EuroFIR Congress 2009: European food composition data for better diet, nutrition and food quality. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 1-3.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Food Standard Agency (2013). <http://www.food.gov.uk/policy-advice/additivesbranch/energydrinks#.UoIyYHBJPng>.
- FoodEXplorer (2013). Preuzeto oktobra 2013, sa: <http://www.eurofir.org/foodexplorer/>.
- Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., Núñez, M.J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *EJEAFCh*, 7(8), 3210-3216.
- Frelinger, A. L., 3rd, Furman, M. I., Linden, M. D., Li, Y., Fox, M. L., Barnard, M. R., & Michelson, A. D. (2006). Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation*, 113(25), 2888-2896.
- Gay, L. J., & Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*, 11(2), 123-134.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988-4994.
- Gomez-Ruiz, J. A., Leake, D. S., & Ames, J. M. (2007). In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem*, 55(17), 6962-6969.
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2003). *Food Composition Data: Production, Management and Use*, second ed. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Grembecka, M., Malinowska, E., & Szefer, P. (2007). Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Science of The Total Environment*, 383(1-3), 59-69.
- Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*, 86(3), 345-391.

- Gupta, S., & Banerjee, R. (2011). Radical scavenging potential of phenolics from *Bryophyllum pinnatum* (LAM.) OKEN. *Prep Biochem Biotechnol*, 41(3), 305-319.
- Hagberg, I. A., & Lyberg, T. (2000). Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets*, 11(3), 137-150.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721-724.
- Health Canada (2013). <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/caf/food-caf-aliments-eng.php>
- Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 129(3), 991-1000.
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(2), 101-123.
- Hollman, P. C. H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., & Vidry, S. (2011). The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established. *The Journal of nutrition*, 141(5), 989S-1009S.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., Ryder, J. J., Hall, W. L., & Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 88(1), 38-50.
- Horstman, L. L., & Ahn, Y. S. (1999). Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*, 30(2), 111-142.
- Hu, N., Yu, J. T., Tan, L., Wang, Y. L., & Sun, L. (2013). Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, 2013, 524820.
- Hubbard, G. P., Wolfram, S., Lovegrove, J. A., & Gibbins, J. M. (2004). Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost*, 2(12), 2138-2145.
- Huo, Y., & Ley, K. F. (2004). Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 14(1), 18-22.

- Huo, Y., Schober, A., Forlow, S. B., Smith, D. F., Hyman, M. C., Jung, S., Littman, D. R., Weber, C., & Ley, K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*, 9(1), 61-67.
- Ilić, I. (2009). Meta-analiza. *Acta Medica Medianae*, 48(2), 28-31.
- Ioannidis, K., Chamberlain, S. R., & Müller, U. (2014). Ostracising caffeine from the pharmacological arsenal for attention-deficit hyperactivity disorder – was this a correct decision? A literature review. *Journal of Psychopharmacology*, 28(9), 830-836.
- IPSOS Marketing (2012). Preuzeto decembra 2012, sa: <http://www.ipsos.rs/>.
- ISO/IEC 17025. (2005). General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025:2005.
- Jansen, G. A. (2006). *Coffee Roasting, Magic – Art – Science: Physical changes and chemical reactions*. Munich: GmbH, Sueddeutscher Verlag. ISBN: 3937889574
- Jiang, W., Wu, Y., & Jiang, X. (2013). Coffee and caffeine intake and breast cancer risk: an updated dose-response meta-analysis of 37 published studies. *Gynecol Oncol*, 129(3), 620-629.
- Jiang, X., Zhang, D., & Jiang, W. (2014). Coffee and caffeine intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Nutr*, 53(1), 25-38.
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010). Modelling of solid-liquid extraction process of total polyphenols from soybeans. *Czech J. Food Sci*, 28, 206-212.
- Karacabey, E., & Mazza, G. (2010). Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 119(1), 343-348.
- Keurig (2013). (<http://www.keurig.com/>).
- Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 246-252.
- Kiely, M., Black, L. J., Plumb, J., Kroon, P. A., Hollman, P. C., Larsen, J. C., Speijers, G. J., Kapsokefalou, M., Sheehan, D., Gry, J., & Finglas, P. (2010). EuroFIR eBASIS: application for health claims submissions and evaluations. *Eur J Clin Nutr*, 64 Suppl 3, S101-107.

- Kim, H.K., Do, J.R., Lim, T.S., Akram, K., Yoon, S.R., & Kwon, J.H. (2012). Optimisation of microwave-assisted extraction for functional properties of *Vitis coignetiae* extract by response surface methodology. *J. Sci. Food Agric* 92 (8), 1780-1785.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11757-11760.
- Konić-Ristić, A., Srđić-Rajić, T., Kardum, N. & Glibetić, M. (2013a). Biological activity of *Aronia melanocarpa* antioxidants pre-screening in an intervention study design. *J Serb Chem Soc*, 78(3), 429–443.
- Konic-Ristic, A., Srđic-Rajic, T., Kardum, N., Aleksic-Velickovic, V., Kroon, P. A., Hollands, W. J., Needs, P. W., Boyko, N., Hayran, O., Jorjadze, M., & Glibetic, M. (2013b). Effects of bioactive-rich extracts of pomegranate, persimmon, nettle, dill, kale and *Sideritis* and isolated bioactives on arachidonic acid induced markers of platelet activation and aggregation. *J Sci Food Agric*, 93(14), 3581-3587.
- Koraćević, D., Bjelaković, G., Đorđević, V. *Biohemija. savremena administracija*. ISBN 86-387-0622-7.
- Krejčová, A., & Černožský, T. (2003). The determination of boron in tea and coffee by ICP–AES method. *Food Chemistry*, 82(2), 303-308.
- Krueger, L. A., Barnard, M. R., Frelinger, A. L., 3rd, Furman, M. I., & Michelson, A. D. (2002). Immunophenotypic analysis of platelets. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 6, Unit 6 10.
- Kwon, J.H., Bélanger, J. M. R., & Paré, J. R. J. (2003). Optimization of Microwave-Assisted Extraction (MAP) for Ginseng Components by Response Surface Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1807-1810.
- LanguaL™ (2013). The LanguaL™ Thesaurus, the International Framework for Food Description. Preuzeto oktobra 2014 sa: http://www.langual.org/langual_Thesaurus.asp
- Lazid, Z.R. (2004). *Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide*, Wiley–VCH, Weinheim.
- Lev, E. I., Arikan, M. E., Vaduganathan, M., Alviar, C. L., Tellez, A., Mathuria, N., Builes, A., Granada, J. F., del Conde, I., & Kleiman, N. S. (2007). Effect of caffeine on platelet

- inhibition by clopidogrel in healthy subjects and patients with coronary artery disease. *Am Heart J*, 154(4), 694 e691-697.
- Leytin, V., Mody, M., Semple, J. W., Garvey, B., & Freedman, J. (2000). Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(2), 565-570.
- Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.* 130 (4), 928-936.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2013). Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants and Food Colors. In F. Chemat & G. Cravotto (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds*,(pp. 103-125): Springer US.
- Liazid, A., Guerrero, R. F., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124(3), 1238-1243.
- Lopez-Avila, V., Young, R., Teplitsky, N.Y.R. . (1996). Microwave-assisted process as an alternative to Soxhlet, sonication and supercritical fluid process. *J AOAC Int*, 79, 142-156.
- López-Galilea, I., de Peña, M. P., & Cid, C. (2008). Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *European Food Research and Technology*, 227(1), 141-149.
- Loxcel (2013). (<http://www.loxcel.com/sbux-faq.html>).
- Lu, J., Zhou, C., Rong, O., Xu, Y., Zhou, B., Zhonghai, L. . (2013). Optimization of Microwave-assisted Extraction of Flavonoids from *Cryptotaenia japonica* Hassk using Response Surface Methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(6), 310-317.
- Ludwig, I. A., Clifford, M. N., Lean, M. E. J., Ashihara, H., & Crozier, A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & Function*, 5(8), 1695-1717.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.
- Manduteanu, I., Calb, M., Lupu, C., Simionescu, N., & Simionescu, M. (1992). Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 24(4), 539-547.
- Martínez, M. a. J., Pablos, F., González, A. G., Valdenebro, M. a. S., & León-Camacho, M. (2001). Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation. *Talanta*, 54(2), 291-297.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Baeza, G., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food Research International*, 64(0), 125-133.
- Matzdorff, A. (2005). Platelet function tests and flow cytometry to monitor antiplatelet therapy. *Semin Thromb Hemost*, 31(4), 393-399.
- McCullough, M. L., Peterson, J. J., Patel, R., Jacques, P. F., Shah, R., & Dwyer, J. T. (2012). Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*.
- McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2008). Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 34(1), 73-80.
- McDowell, L. R. (2003). *Minerals in animal and human nutrition*. (2nd ed.). Editor: McDowell, L. R. ISBN 0-444-51367-1.
- Medline Plus (2013). A service of the U.S. National Library of Medicine from the National Institutes of Health.
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002445.htm>
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: eCAM, 2013, 801457.
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 326S-329S.

- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. (2001). Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*, 104(13), 1533-7.
- Michelson, A. D. (2004). Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*, 110(19), e489-493.
- Midžina, K.P. (1877). *Veliki Srpski Kuvar* ("The Great Serbian Cookbook"), Učiteljsko deoninarsko društvo „Natošević“, Novi Sad, Serbia: ISBN 978-86-910677-0-0. Retrieved August 14 2014 from:
http://secanja.com/wp-content/uploads/2012/05/Pages-260-296_-from-Kuina.pdf
- Mills, C. E., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. E. (2013). The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141(4), 3335-3340.
- Milutinović, M. D., Šiler-Marinković, S.S., Antonović, D.G., Mihajlovska, K.R., Pavlović, M.D., Dimitrijević-Branković, S.I. (2013). The antioxidant properties of dried extracts from the spent espresso coffee. *Chemical Industry*, 67(2), 261-267.
- Moreira, M. M., Morais, S., Barros, A. A., Delerue-Matos, C., & Guido, L. F. (2012). A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Anal Bioanal Chem*, 403(4), 1019-1029.
- Mubarak, A., Bondonno, C. P., Liu, A. H., Considine, M. J., Rich, L., Mas, E., Croft, K. D., & Hodgson, J. M. (2012). Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial. *J Agric Food Chem*, 60(36), 9130-9136.
- Mujica, M. V. , Granito, M. & Soto, N. (2009). Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus Vulgaris* L. *Interciencia*. 34(9), 650-654.
- Mukhopadhyay, S., Luthria, D. L., & Robbins, R. J. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 156-162.
- Muley, A., Muley, P., & Shah, M. (2012). Coffee to reduce risk of type 2 diabetes?: a systematic review. *Curr Diabetes Rev*, 8(3), 162-168.

- Murthy, P., & Naidu, M. M. (2010). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 897-903.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011a). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83(0), 173-179.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011b). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 368-374.
- Myers, R. H., Montgomery, D.C. (2002). *Response Surface Methodology*, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc., New York.
- Myers, R. H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M. (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 3rd ed, John Wiley and Sons Inc., New York.
- Naito, S., Yatagai, C., Maruyama, M., & Sumi, H. (2011). Effect of coffee extracts on plasma fibrinolysis and platelet aggregation. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 46(2), 260-269.
- Nardini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2007). Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets*, 18(3), 224-243.
- Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., Pignatelli, P., Di Santo, S., Ghiselli, A., Violi, F., & Scaccini, C. (2008). Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr*, 100(6), 1276-1282.
- National Coffee Association USA. (2015).
<http://ncausa.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=75>
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam*, 20(1), 1-30.
- Neil, C., Keast, D., Fulgoni, V., & Nicklas, T. (2012). Food Sources of Energy and Nutrients among Adults in the US: NHANES 2003–2006. *Nutrients*, 4(12), 2097-2120.
- Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online

- comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database (Oxford), 2010, bap024.
- Niseteo, T., Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Budeč, M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, 134(4), 1870-1877.
- Nityanand, S., Pande, I., Bajpai, V. K., Singh, L., Chandra, M., & Singh, B. N. (1993). Platelets in essential hypertension. *Thromb Res*, 72(5), 447-454.
- Noguer, M., Cerezo, A.B., Moyá, N.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2014). Synergism Effect between Phenolic Metabolites and Endogenous Antioxidants in Terms of Antioxidant Activity. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 4(2), 258-265.
- Nowak, J., Murray, J. J., Oates, J. A., & FitzGerald, G. A. (1987). Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation*, 76(1), 6-14.
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol*, 72(6), 893-901.
- Nunez, R. (2001). Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr Issues Mol Biol*, 3(2), 39-45.
- Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(13), 5883-5890.
- Ochiai, R., Sugiura, Y., Shioya, Y., Otsuka, K., Katsuragi, Y., & Hashiguchi, T. (2014). Coffee polyphenols improve peripheral endothelial function after glucose loading in healthy male adults. *Nutrition Research*, 34(2), 155-159.
- O'Keefe, J. H., Bhatti, S. K., Patil, H. R., DiNicolantonio, J. J., Lucan, S. C., & Lavie, C. J. (2013). Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol*, 62(12), 1043-1051.
- Oliveira, M., Casal, S., Morais, S., Alves, C., Dias, F., Ramos, S., Mendes, E., Delerue-Matos, C., & Beatriz P.P. Oliveira, M. (2012). Intra- and interspecific mineral composition

- variability of commercial instant coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. *Food Chemistry*, 130(3), 702-709.
- Oseredczuk, M., Salvini, S., Roe, M., & Moller, A. (2009). Guidelines for Quality Index attribution to original data from Scientific literature or reports for EuroFIR data interchange, EuroFIR Network of Excellence, D1.3.21, revised version. <http://www.eurofir.org/wp-content/uploads/2014/05/3.-Guidelines-for-Quality-Index-attribution-to-original-data-from-Scientific-literature-or-reports-for-EuroFIR-data-interchange.pdf>
- Ostertag, L. M., O'Kennedy, N., Kroon, P. A., Duthie, G. G., & de Roos, B. (2010). Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res*, 54(1), 60-81.
- Pakkala, H., Christensen, T., de Victoria, I. M., Presser, K., & Kadvan, A. (2010). Harmonised information exchange between decentralised food composition database systems. *Eur J Clin Nutr*, 64 Suppl 3, S58-63.
- Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(2), 129-133.
- Pandey, H., Kumar, V., & Roy, B. K. (2014). Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. *Toxicology Reports*, 1, 0, 300-308.
- Panicker, V.P., George, S., Dhanush Krishna, B. (2014). Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3, 8, 758-763.
- Park, J. B. (2009). 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *J Nutr Biochem*, 20(10), 800-805.
- Passos, C. P., Moreira, A. S., Domingues, M. R., Evtuguin, D. V., & Coimbra, M. A. (2014). Sequential microwave superheated water extraction of mannans from spent coffee grounds. *Carbohydr Polym*, 103, 333-338.
- Pavlović, M. D., Buntić, A. V., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2013). Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants

- obtaining from spent filter coffee. *Separation and Purification Technology*, 118(0), 503-510.
- Pereira, M.A., Parker, E.D., & Folsom, A.R. (2006). Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. An 11-Year Prospective Study of 28 812 Postmenopausal Women. *Arch Intern Med*. 166(12), 1311-1316.
- Pérez-Serradilla, J. A., & Luque de Castro, M. D. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124(4), 1652-1659.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G.P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*, 1(1), 106.
- Pohl, P., Stelmach, E., Welna, M., & Szymczycha-Madeja, A. (2013). Determination of the Elemental Composition of Coffee Using Instrumental Methods. *Food Analytical Methods*, 6(2), 598-613.
- Prior, R. L., 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(10), 4290-4302.
- Radoiu, M. (2013). The Scale-up of Microwave-assisted Extraction, International Congress on Green Extraction of Natural Products e GENP. Avignon, France, April 16 e 17, book of abstract, p. 119.
- Rajwanshi, P., Singh, V., Gupta, M.K., Kumar, V., Shrivastav, R., Ramanamurthy, M., & Dass, S. (1997). Studies on aluminium leaching from cookware in tea and coffee and estimation of aluminium content in toothpaste, baking powder and paan masala. *Sci Total Environ*, 193, 243-249.
- Ranić, M., Konić-Ristić, A., Takić, M., Glibetić, M., Pavlović, Z., Pavlović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2015). Nutrient profile of black coffee consumed in Serbia: Filling a gap in the food composition database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40(0), 61-69.
- Ranic, M., Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, 80(0), 69-79.

- Ranic, M., Dimitrijevic Brankovic, S., Arsic, A., Ivanovic, J., Milutinovic, M., Siler-Marinkovic, S. (2011). Fatty acid profiles of supercritical extracts of commercial espresso coffee and spent coffee. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 11th FENS European Nutrition Conference, Madrid, Spain, Vol. 58, p. 102.
- Ratnayake, W. M. N., Hollywood, R., O'Grady, E., & Stavric, B. (1993). Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food and Chemical Toxicology*, 31(4), 263-269.
- Rechner, A. R., & Kroner, C. (2005). Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*, 116(4), 327-334.
- Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem*, 49(7), 3438-3442.
- Ricketts, M. L., Boekschoten, M. V., Kreeft, A. J., Hooiveld, G. J., Moen, C. J., Muller, M., Frants, R. R., Kasanmoentalib, S., Post, S. M., Princen, H. M., Porter, J. G., Katan, M. B., Hofker, M. H., & Moore, D. D. (2007). The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Mol Endocrinol*, 21(7), 1603-1616.
- Ristić-Medić, D., Vučić, V., Takić, M., Karadžić, I. & Glibetić, M. (2013a). Polyunsaturated fatty acid in health and disease. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78, (9,) 1269–1289.
- Ristic-Medic, D., Takic, M., Vucic, V., Kandic, D., Kostic, N., & Glibetic, M. (2013b). Abnormalities in the serum phospholipids fatty acid profile in patients with alcoholic liver cirrhosis - a pilot study. *J Clin Biochem Nutr*, 53(1), 49-54.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 51(10), 2866-2887.
- Rodrigues, N. P., & Bragagnolo, N. (2013). Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 105-115.
- Romano, R., Santini, A., Le Grottaglie, L., Manzo, N., Visconti, A., & Ritieni, A. (2014). Identification markers based on fatty acid composition to differentiate between

- roasted Arabica and Canephora (Robusta) coffee varieties in mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35(1), 1-9.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2007). Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Analytica Chimica Acta*, 588(2), 274-282.
- Rothwell, J. A., Medina-Remon, A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Knaze, V., Slimani, N., & Scalbert, A. (2015). Effects of food processing on polyphenol contents: a systematic analysis using Phenol-Explorer data. *Mol Nutr Food Res*, 59(1), 160-170.
- Ruggeri, Z. M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8(11), 1227-1234.
- Saenger, M., Hartge, E. U., Werther, J., Ogada, T., & Siagi, Z. (2001). Combustion of coffee husks. *Renewable Energy*, 23(1), 103-121.
- Saha, J., Biswas, A., Chhetri, A., & Sarkar, P. K. (2011). Response surface optimisation of antioxidant extraction from kinema, a *Bacillus*-fermented soybean food. *Food Chemistry*, 129(2), 507-513.
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1-2), 133-139.
- Santos, E. E., Lauria, D. C., & Porto da Silveira, C. L. (2004). Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuffs by adult inhabitants of Rio de Janeiro city. *Science of The Total Environment*, 327(1-3), 69-79.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S-217S.
- Schumacher, E., Vigh, E., Molnar, V., Kenyeres, P., Feher, G., Kesmarky, G., Toth, K., & Garai, J. (2011). Thrombosis preventive potential of chicory coffee consumption: a clinical study. *Phytother Res*, 25(5), 744-748.
- SFCDB (2008). The Slovak Food Composition Data Bank. Objavljena 2008. VUP Food Research Institute Bratislava. Objavljena online na: <http://www.pbd-online.sk/en>.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44(3), 158-163.
- Shen, T., Lee, J., Lee, E., Kim, S. H., Kim, T. W., & Cho, J. Y. (2010). Cafestol, a coffee-specific diterpene, is a novel extracellular signal-regulated kinase inhibitor with AP-1-targeted inhibition of prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biol Pharm Bull*, 33(1), 128-132.

- Silva, M. A., Nebra, S. A., Machado Silva, M. J., & Sanchez, C. G. (1998). The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass and Bioenergy*, 14(5-6), 457-467.
- Singh, A., Sabally, K., Kubow, S., Donnelly, D. J., Garipey, Y., Orsat, V., & Raghavan, G. S. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from potato peels. *Molecules*, 16(3), 2218-2232.
- Somporn, C., Kamtuo, A., Theerakulpisut, P., & Siriamornpun, S. (2011). Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). *International Journal of Food Science & Technology*, 46(11), 2287-2296.
- Speer, K., & Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 201-216.
- SRBFCDB (2007). The Serbian Food Composition Database, Datum objave: 2007. Institute for Medical Research, Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism. Objavljena online na: <http://www.serbianfood.info/>.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*, 30(18), 3268-3295.
- Stalmach, A., Williamson, G., & Crozier, A. (2014). Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food Funct*, 5(8), 1727-1737.
- Statista (2014), <https://www.statista.com/search/?q=coffee>
- Stelmach, E., Pohl, P., & Szymczycha-Madeja, A. (2013). The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew. *Food Chemistry*, 141(3), 1956-1961.
- Suseela, B., Bhalke, S., Kumar, A. V., Tripathi, R. M., & Sastry, V. N. (2001). Daily intake of trace metals through coffee consumption in India. *Food Addit Contam*, 18(2), 115-120.
- Szöllösi, R., Szölloösi Varga, I. (2002). Total antioxidant power in some species of Labiate (adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*, 46, 125-127.

- Tagliaferro, F. S., De Nadai Fernandes, E. A., Bacchi, M. A., Bode, P., & Joacir De França, E. (2007). Can impurities from soil-contaminated coffees reach the cup? *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 271(2), 371-375.
- Udensi, U., & Tchounwou, P. (2014). Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 106.
- Ukers, W.H. (1935). All about coffee. Library of Alexandria. Ed. The Tea and Coffee trade Journal
- Upadhyay, R., Ramalakshmi, K., & Jagan Mohan Rao, L. (2012). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chemistry*, 130(1), 184-188.
- Urgert, R., van der Weg, G., Kosmeijer-Schuil, T. G., van de Bovenkamp, P., Hovenier, R., & Katan, M. B. (1995). Levels of the Cholesterol-Elevating Diterpenes Cafestol and Kahweol in Various Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2167-2172.
- USDA FAS. (2014), Coffee:World Markets and Trade, Office of Global Analysis, Foreign Agricultural Service/United States Department of Agriculture, <http://www.fas.usda.gov/>
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2014). Dostupan online na: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- Vaduganathan, M., Alviar, C. L., Arikani, M. E., Tellez, A., Guthikonda, S., DeLao, T., Granada, J. F., Kleiman, N. S., Ballantyne, C. M., & Lev, E. I. (2008). Platelet reactivity and response to aspirin in subjects with the metabolic syndrome. *Am Heart J*, 156(5), 1002 e1001-1002 e1007.
- Van Wyk, B.E. & Wink, M. (2004). *Medicinal plants of the world*: Timber Press.
- Vega-Carrillo, H. R., Iskander, F. Y., & Manzanares-Acuña, E. (2002). Elemental content in ground and soluble/instant coffee. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 252(1), 75-80.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G., Benassi, M.T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. *Food Chem.* 124, 863-868.

- Vinson, J. A., Burnham, B. R., & Nagendran, M. V. (2012). Randomized, double-blind, placebo-controlled, linear dose, crossover study to evaluate the efficacy and safety of a green coffee bean extract in overweight subjects. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 5, 21-27.
- Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., Atungulu, G.G. (2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal*, 5, 17-25.
- Westermarck, P., Andersson, A., & Westermarck, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*, 91(3), 795-826.
- Willoughby, S., Holmes, A., & Loscalzo, J. (2002). Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 1(4), 273-288.
- Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res*, 57(1), 48-57.
- Wirdefeldt, K., Adami, H. O., Cole, P., Trichopoulos, D., & Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26 Suppl 1, S1-58.
- Worthley, M. I., Prabhu, A., De Sciscio, P., Schultz, C., Sanders, P., & Willoughby, S. R. (2010). Detrimental effects of energy drink consumption on platelet and endothelial function. *Am J Med*, 123(2), 184-187.
- Wu, X., Yu, X., & Jing, H. (2011). Optimization of phenolic antioxidant extraction from Wuweizi (*Schisandra chinensis*) pulp using random-centroid optimization methodology. *Int J Mol Sci*, 12(9), 6255-6266.
- Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, K. G., & Shibamoto, T. (2004). Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *J Agric Food Chem*, 52(3), 592-596.
- Yang, K. (2014). The '2014 Anti-oxidant BHT, (264) (CAS 128-37-0) Industry Report - Global and Chinese Market Scenario' is a professional and in-depth study on the current state of the global Anti-oxidant BHT (264) (CAS 128-37-0) industry with a focus on the Chinese market, report
- Yen, W. J., Wang, B. S., Chang, L. W., & Duh, P. D. (2005). Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem*, 53(7), 2658-2663.
- Young, J. C. (1995). Microwave-Assisted Extraction of the Fungal Metabolite Ergosterol and Total Fatty Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2904-2910.

- Zhang, Y., Zheng, B., Tian, Y., & Huang, S. (2012). Microwave-assisted extraction and anti-oxidation activity of polyphenols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seeds. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1577-1584.
- Zhanga, B., Yang, R., & Liu, C.-Z. (2008). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 480-483.
- Zheng, J.S., Yang, J., Fu, Y.Q., Huang, T., Huang, Y.J., Li, D. (2013). Effects of green tea, black tea, and coffee consumption on the risk of esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutr Cancer*, 65, 1, 1-16.
- Zuorro, A., & Lavecchia, R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 34(0), 49-56.

PRILOG 1: Spisak skraćenica korišćenih u disertaciji

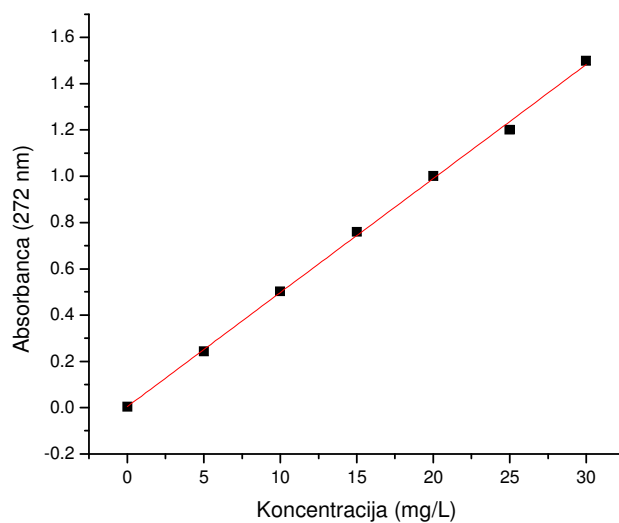
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ADP	Adenozin difosfat
ANOVA	Jednosmerna analiza varijanse
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
ATP	Adenozin trifosfat
BBD	Box-Behnken plan (<i>Box-Behnken design</i>)
BHT	Butilisani hidroksitoluen
BLS	Nemačka baza podataka o sastavu namirnica (<i>Bundeslebensmittelschlüssel</i>)
BPSN	Baza podataka o sastavu namirnica
cAMP	Intracelularni ciklični adenozin-monofosfat
CCD	Centralni kompozitni plan (<i>Central Composite Design</i>)
CRF	Sertifikovani referentni material (<i>Certified Reference Material</i>)
DMSO	Dimetil sulfoksid
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
DRI	Dnevni referentni unos (<i>Dietary Reference Intakes</i>)
eBASIS	<i>Bioactive Substances in Food Information Systems</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EuroFIR NoE	<i>European Food Information Resource project - Network of Excellence</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration of the United States</i>
FFQ	Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica (<i>Food Frequency Questionnaire</i>)
FRAP	Antioksidativni potencijal neutralizacije jona gvožđa (<i>Ferric ion reducing antioxidant power</i>)
FSC	Upravno rasipanje svetlosti (<i>Forward light scatter</i>)
EGK	Ekvivalent galne kiseline
GC	Gasna hromatografija (<i>Gas chromatography</i>)
HAT	Hydrogen atom transfer

HPLC	Tečna hromatografija sa visokim performansama (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HTP	HEPES-Tirodov puffer (<i>HEPES- Tyrode buffer</i>)
KVB	Kardiovaskularne bolesti (<i>Cardiovascular diseases, KVD</i>)
LOD	Limit detekcije (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limit kvantifikacije (<i>Limit of quantification</i>)
MAE	Ekstrakcija asistirana mikrotalasima (<i>Microwave-assisted extraction</i>)
ORAC	Antioksidativni potencijal neutralizacije kiseoničnih radikala (<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>)
PE	Ukupni prinos reakcije
PMK	Polinezasićene masne kiseline (<i>Polyunsaturated fatty acids, PUFA</i>)
QI	Indeks kvaliteta (<i>Quality Index</i>)
RČ	Odnos rastvarač-čvrsta faza
RCS	Hlorne reaktivne čestice (<i>Reactive chlorine species</i>)
RI	Retencioni indeks (<i>Retention index</i>)
RNS	Azotne reaktivne čestice (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Kiseonične reaktivne čestice (<i>Reactive oxygen species</i>)
RSC	Kapacitet "hvatanja" radikala (<i>Radical scavenging capacity</i>)
RSF	Glatke analitičke funkcije (<i>Response surface function</i>)
RSM	Metodologija odzivne površine (<i>Response surface methodology</i>)
SBPSN	Srpska baza podataka o sastavu namirnica
SET	<i>Single electron transfer</i>
SFCDB	Slovačka baza podataka o sastavu namirnica (<i>Slovak Food Composition Database</i>)
SMT	Snaga mikrotalasa
SRF	Standardni referentni materijal
SSC	Bočno rasipanje svetlosti (<i>Side light scatter</i>)
TMA	Agregati trombocita sa monocitima (<i>Platelet-monocyte aggregates, PMA</i>)
TNA	Agregati trombocita sa neutrofilima (<i>Platelet-neutrophil aggregates, PNA</i>)
TOK	Talog otpadne kafe
ETOK	Ekstrakt taloga otpadne kafe

TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazin
UAE	Ekstrakcija asistirana ultrazvukom (<i>Ultrasound-assisted extraction</i>)
UP	Ukupni polifenoli
USDA, FAS	<i>United States Department of Agriculture, Foreign Agriculture Service</i>
VE	Vreme ekstrakcije

PRILOG 2: Standardne krive

P 2.1 Standardna kriva za određivanje koncentracije kofeina



Slika P 2.1. Standardna kriva za određivanje sadržaja kofeina

Dobijena jednačina standardne krive je :

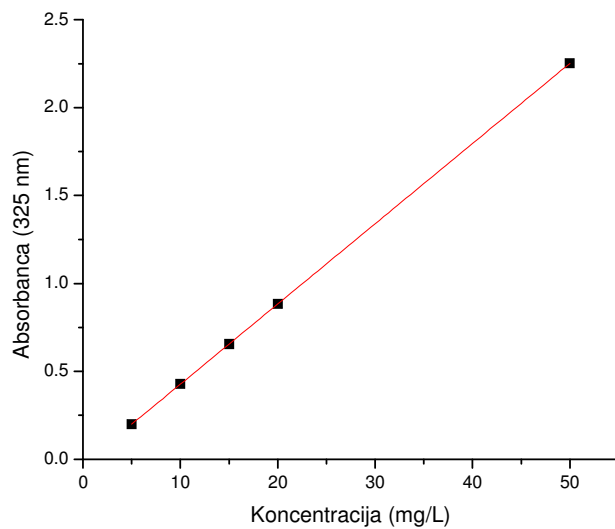
$$Y = 0.04925 X + 0.00504$$

$$R = 0.9993$$

Y – absorbanca uzorka (272 nm),

X – koncentracija kofeina (mg/L).

P 2.2 Standardna kriva za određivanje sadržaja hlorogenske kiseline



Slika P 2.2. Standardna kriva za određivanje sadržaja hlorogenske kiseline

Dobijena jednačina standardne krive je:

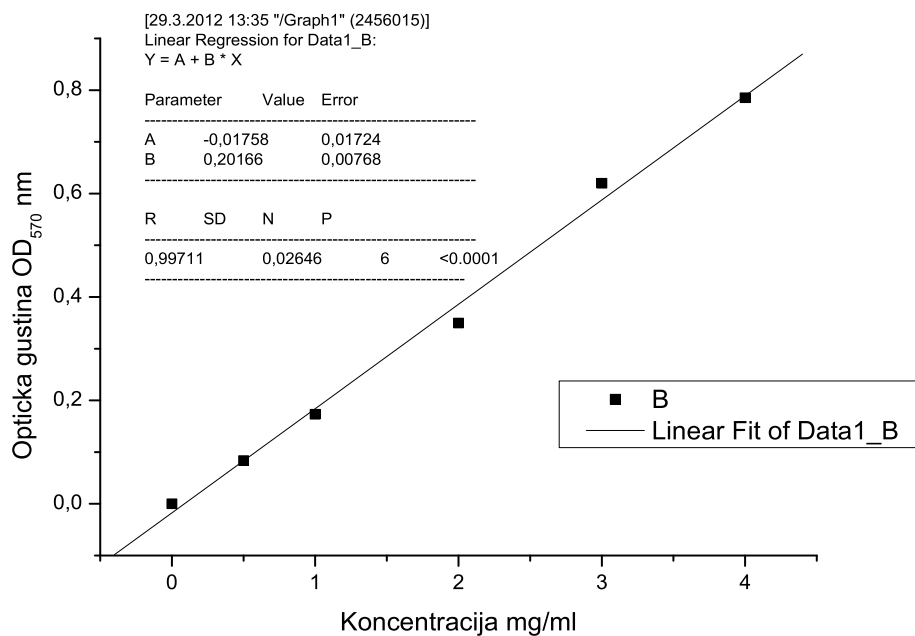
$$Y = 0.04556 X - 0.02772$$

$$R = 0.9999$$

Y – absorbanca uzorka (325 nm),

X – koncentracija hlorogenske kiseline (mg/L).

P 2.3 Standardna kriva za određivanje suve materije ekstrakta otpadne kafe



Slika P 2.3. Standardna kriva za određivanje suve materije ekstrakta

Dobijena jednačina standardne krive je:

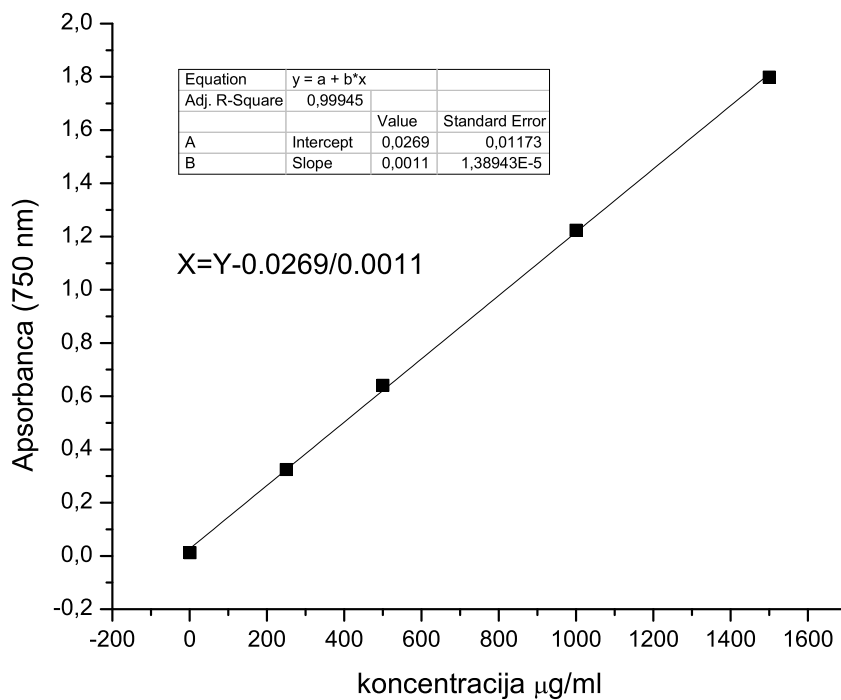
$$Y = 0.20166X - 0.001758$$

$$R = 0.99711$$

Y – Optička gustina OD₅₇₀ nm

X – Sadržaj ukupne suve materije u ekstraktu (mg/ml)

P 2.4. Standardna kriva za određivanje sadržaja polifenola ekstrakta otpadne kafe



Slika P 2.4. Standardna kriva za određivanje sadržaja polifenola

Dobijena jednačina standardne krive je:

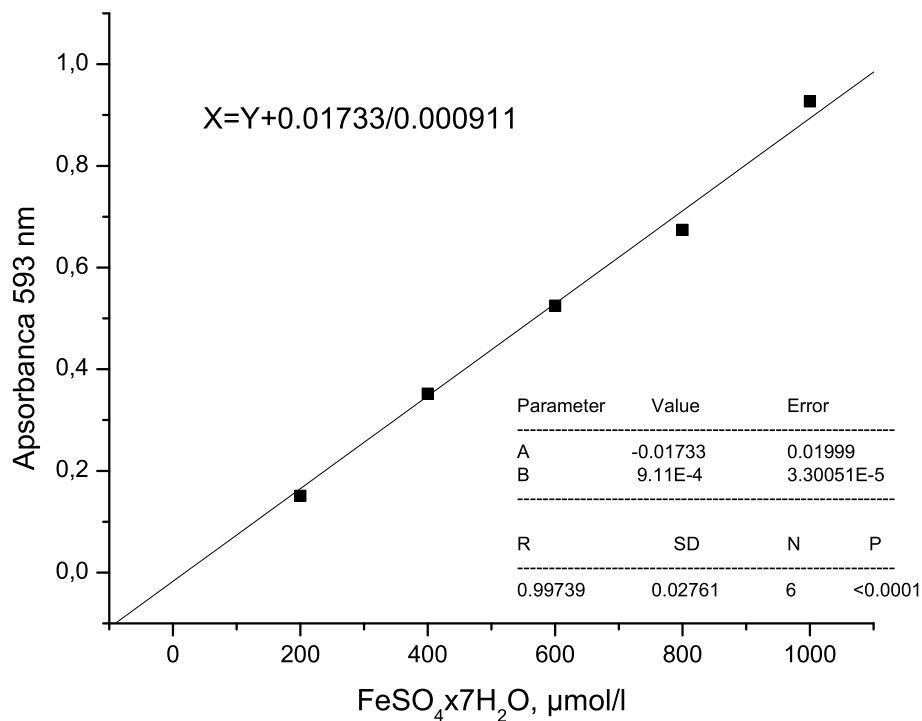
$$Y = 0.0269X - 0.0011$$

$$R = 0.9997$$

Y – apsorbanca uzorka (750 nm),

X – koncentracija ukupnih polifenola (g galne kiseline/ml).

P 2.5 Standardna kriva za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata otpadne kafe korišćenjem FRAP metode



Slika P 2.5. Standardna kriva za određivanje sposobnosti redukcije Fe³⁺ do Fe²⁺ (FRAP)

Rezultati se izračunavaju prema jednačini standardne krive:

$$Y = 0.000911 X - 0.01733$$

$$R = 0.99739$$

Y - absorbanca uzorka (593 nm),
X - koncentracija Fe²⁺ (μmol Fe²⁺/l).

PRILOG 3: Izgled Srpske baze podataka o sastavu namirnica – podaci za crnu kafu



Centar Izuzetne Vrednosti
u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma
Centre of Research Excellence
in Nutrition and Metabolism

SERBIAN FOOD &
NUTRITION DATABASE



EuroFIR
European Food Information Resource

*This page is under construction

FOOD NAME AND IDENTIFIERS	
Food Code	2941
Food name (origin)	Turska, srpska, domaca kafa (jaka)
Food name (english)	Turkish, old style coffee (strong)
Scientific Food name	
Origin (vegetable/animal)	Vegetable
Codex Food Standards	
Article Number (bar code)	
E-number	
Ins Code	





VALUES			SAMPLE....	QUALITY ASSESSMENT...
COMPONENT ID	VALUE	UNIT	DESCRIPTION	DETAILS
ASH	0.2		gash (minerals)	DETAILS...
CA	3.3	mg	calcium	DETAILS...
CHO	0.9	g	carbohydrate	DETAILS...
CLD	1	mg	chloride	DETAILS...
CU	0.01	mg	copper	DETAILS...
ENERC	26	kJ	energy, total metabolisable; calculated from energy-producing food components	DETAILS...
F18:1	16.4	mg	fatty acid 18:1 (octadecenoic acid)	DETAILS...
F18:2	63.3	mg	fatty acid 18:2	DETAILS...
F18:3CN3	1.79	mg	fatty acid 18:3 n-3 cis	DETAILS...
FAMS	17	mg	fatty acids, total monounsaturated	DETAILS...
FAPU	65.1	mg	fatty acids, total polyunsaturated	DETAILS...
FAPUN3	1.79	mg	fatty acids, total n-3 polyunsaturated	DETAILS...
FAPUN6	63.3	mg	fatty acids, total n-6 polyunsaturated	DETAILS...
FASAT	70.8	mg	fatty acids, total saturated	DETAILS...
FAT	0.2	g	fat, total (total lipid)	DETAILS...
FE	0.1	mg	iron, total	DETAILS...
FIBT	0.6	g	fibre, total dietary	DETAILS...
FOL	1	ug	folate, total	DETAILS...
K	110	mg	potassium	DETAILS...
MG	11	mg	magnesium	DETAILS...
MN	0.07	mg	manganese	DETAILS...
NA	7.6	mg	sodium	DETAILS...
NIAEQ	4339	ug	niacin equivalents, total	DETAILS...
P	6	mg	phosphorus	DETAILS...
PANTAC	23	ug	pantothenic acid (vitamin B5)	DETAILS...
PROT	0.1	g	protein, total	DETAILS...
RIBF	148	ug	riboflavin	DETAILS...
SUGAR	16633	mg	sugars, total	DETAILS...
THIA	1	ug	thiamin	DETAILS...
VITB6	2	ug	vitamin B-6, total	DETAILS...
VITC	167	ug	vitamin C (ascorbic acid)	DETAILS...
WATER	97.9	g	water (moisture)	DETAILS...
ZN	0.02	mg	zinc	DETAILS...


Slika P 3.1. Izgled SBPSN sa unetim analitičkim podacima za crnu kafu
(www.serbianfood.info)


PRILOG 4: JOŠ NEKOLIKO REČI O KAFI


Zanimljivosti o kafi


 Guverner holandske Indonezije van Horn doneo je kafu (1706. godine) u Amsterdam, gdje je uzgajana u stakleniku, u veštačkim uslovima.


 Jedan grm kafe stigao je i u Pariz - na poklon francuskom kralju Louisu XIV. Smatrajući tu biljku dragocijenim rarijetom, Louis XIV dao je da se napravi posebna kućica - staklenik u Jardin des plantes.

 Iz jedne jedine stabljike kafe - donešene iz Pariza na Martinique (1723. godine) - za nešto više od pola veka razmnožilo se čak osamnaest miliona stabala kafe!

 Naziv kafa ne potiče od prapostojbine kafe Kaffe, etiopske pokrajine, jer se tamo ta biljka naziva "bun", već od arapske imenice "qahwe" - čime se imenuje svako piće, biljni napitak, pa čak i vino. Arapska imenica "qahwa" izgovara se kao "kafa", a s vremenom je postala identifikacija samo za napitak od biljke "bun".

 Prva pržionica kafe na Balkanu proradila je u Hrvatskoj - u Zagrebu (Franck) - 1892.

 Glavni sastojak kafe - kofein pronašao je nemački hemičar Runge kojem je Johann Wolfgang Goethe darovao nekoliko zrna kafe. U svojoj laboratoriji Runge je u kafi pronašao bezbojne kristale kofeina.


 Najskuplja i najređa kafa - Sorta Kopi Luwak kafa (na idnonežanskom Kopi znači kafa) se pravi na ostvima Sumatra, Java i Sulavesi, na kojima žive cibetke (lat. paradoxurus). Ovi torbari hrane se plodovima kafe i zato su smatrani štetočinama, sve dok





nije otkriveno da zrno koje prođe kroz njihov digestivni trakt dobije specifični ukus, koji mu daju enzimi iz želuca ove životinje. Polusvarena zrna se skupljaju i od njih se pravi najskuplja kafa na svetu bogate i jake arome. Ova kafa je izuzetno retka, godišnje se, zbog specifičnosti, proizvede mala količina, pa se tako 100g prodaje za 75 američkih dolara.

Izvor: www.kafasale.com/zanimljivosti_o_kafi


Rekli su o kafi...


 Kafa u Engleskoj uvek ima ukus hemijskog eksperimenta – Agatha Christie (pisac)


 Lakše je promeniti veru nego kafu – Courteline Georges (pisac, pesnik i dramaturg)


 Izmenio sam svoj život kašičicama kafe – Eliot, Thomas Stearns (pesnik, dramaturg i književni kritičar)


 Zrno kafe, miris ambrozije – Beligi (turski pesnik)

 Pijem 40 kafa dnevno da bih bio potpuno budan i mislim, mislim, mislim i mislim kako da pobedim tirane i glupake – Volitare (pesnik, pisac i filozof)

 Kafa je samo način da krademo vreme koje nam po pravu pripada dok polako starimo – Terry Pratchett

 Žena je kao šoljica dobre kafe: prvi put kada je popijete, poremeti vam san – Alexandre Dumas (pisac)

 Preko čaja istok prodire u građanske salone a preko kafe u naše glave - Paul Morand (pisac)

 Kafa čini da krv prostruji, budi pokretačke sile i izaziva uzbuđenje koje pospešuje varenje, tera san i produžava moždane aktivnosti – Honore de Balzac (pisac)



Kafa se pije vrela, sedeći i bez naročitog razloga – Italijanska poslovice



Kafa prijatno miluje grlo i sve stavlja u pokret: ideje se gomilaju kao bataljoni velike vojske; bitka počinje – Honore de Balzac (pisac)

Izvor: (<http://www.zrnce.net/zrnwp1/>)

Tradicionalna upotreba u medicini



Brazil: Dobijena esencije semena se uzima oralno za influencu;



Kuba: Ekstrakt semena u toploj vodi muškarci uzimaju oralno, kao afrodisijak;



Haiti: Dobijena esencija od pečenog ploda i lišća oralno se uzima za anemiju, edem, asteniju i bes. Plod se uzima oralno za hepatitis i problem sa jetrom. Za glavobolju, esencija dobijena iz lista kafe se uzima oralno ili se glava obloži listovima.



Meksiko: Listovi pretvoreni u obloge koriste se za lečenje groznice. Ekstrakt pečenog semena u toploj vodi se uzima za povećanje proizvodnje mleka kod dojilja.



Nikaragva: Listovi se spolja koriste za glavobolju, a ekstrakt u toploj vodi se uzima za bolove u stomaku. Esencija semena se uzima oralno kod groznice i koristi za spoljne obloge kod posekotina i hemoragije.



Peru: Ekstrakt sušenog ploda u toploj vodi se uzima oralno, kao stimulans za pospanost i stanje alkoholisanosti.



Zapadna Indija: Ekstrakt semena se uzima za astmu dok se sok korena uzima oralno protiv ujeda Škorpiona.

Izvor: sr.wikipedia.org/sr/Kafa

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Ranić rođena je u Svilajncu, Republika Srbija 12.04.1968., gde je završila osnovnu i srednju školu, kao nosilac Vukove diplome. Diplomirala je 1994. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Organska hemijska tehnologija – grupa: tehnologija polimernih materijala i stekla stručno zvanje diplomirani inženjer tehnologije.

Po diplomiranju, Marija Ranić je u toku školske 1994.-1995. godine bila zaposlena na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, finansirana od strane Ministarstva za nauku kao talenat za naučno-istraživački rad. Od jula 1996. godine je zaposlena u Institutu za medicinska istraživanja u Laboratoriji za ishranu i metabolizam kao istraživač pripravnik. U međuvremenu je stekla istraživačko zvanje istraživač saradnik u Centru izuzetne vrednosti za ishranu i metabolizam, Instituta za medicinska istraživanja.

U okviru usavršavanja i sticanja novih znanja u oblasti istraživanja kojim se bavi, Marija Ranić je prošla veći broj obuka i treninga u zemlji i inostranstvu od kojih su najznačajniji „Food & Health Entrepreneurship Program (FHEP) one-week course open for international academic researchers and engineers working in the field of food science and nutrition to move ahead their research to the market“, Barselona, Španija, 27.-31. maja 2013., „FOCUS-BALKANS (Food Consumer Science in the Balkans, FP7) Training module about Food Consumer Science (Frameworks, Protocols and Networks for a better Knowledge of Food Behaviour)“, 22. – 23. juna 2009., Ohrid, Makedonija i „Training on structure, function and data entry systems of EuroFIR BASIS (FP6). Evaluation and inputting of compositional data on flavanones in plant foods“, februar - mart 2009., Institute for Food Research, Norwich, UK.

U toku dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada, Marija Ranić je bila angažovana na više projekata koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS: III 41030- Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji. (2011-2015); TR31035 Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije; (2011- 2015); MNTRS 145071. Razvoj

novih terapijskih postupaka u prevenciji i lečenju bolesti jetre-uloga i mehanizam delovanja polinezasićenih masnih kiselina; (2006-2010).

Takođe, Marija Ranić je bila angažovana na više projekata iz FP7 i FP6 programa Evropske komisije: BACCHUS FP7 – Cardiovascular benefits from food Bioactives (2012-2016); EFSA (European Food Safety Authority) – Dietary monitoring tools for risk assessment (2012-2013); EuroFIR NEXUS FP7 – The EuroFIR Food Platform: Further integration, refinement and exploitation for its long-term self-sustainability (2011-2013); CHANCE FP7 – Low cost technologies and traditional ingredients for the production of affordable, nutritionally correct foods improving health in population groups at risk of poverty (2011-2013); BaSeFOOD FP7- Sustainable exploitation of bioactive components from the Black Sea Area traditional foods (2009-2011); EuroFIR FP6 – European Food Information Resource Network, (2006-2010); Eurreca FP6- EUropean micronutrient REcommendations Aligned, RA 2.7 Low Income and Immigrants; Spreading of Excellence (2007-2011).

Školske 2002.- 2003. godine upisala je poslediplomske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Biohemija, a 2009. godine je prešla na doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9.73. Završni ispit pod nazivom: "Ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata kafe i otpadne kafe i njihovog uticaja na aktivaciju trombocita" sa detaljnim obrazloženjem teme i predlogom eksperimentalnog rada, kandidat Marija Ranić je odbranila 30.10.2012. sa ocenom deset (10), pred komisijom u sastavu Dr Suzana Dimitrijević Branković, Dr Slavica Šiler Marinković i Dr Dušan Antonović.

Marija Ranić je autor i koautor ukupno 53 rada koji su publikovani u naučnim časopisima i saopšteni na naučnim skupovima. Od toga, 6 radova je publikovano u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), 5 radova u međunarodnom časopisu (M23), 2 rada u časopisu međunarodnog značaja verifikovan posebnom odlukom (M24), 2 rada u časopisu nacionalnog značaja (M52), 2 rada u časopisu nacionalnog značaja (M53), 1 predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32), 1 saopštenje sa

medjunarodnog skupa štampano u celini (M33), 22 saopštenja sa medjunarodnog skupa štampano u izvodu (M34) i 12 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampanih u izvodu (M64).

Na 3rd International EuroFIR Congress: European Food Composition Data for better Diet, Nutrition and Food Quality, održanom 8. do 10. Septembra 2009. u Beču, Austrija, osvojila je nagradu za najbolji poster pod nazivom „Evaluation and inputting of compositional data on flavanones in plant food in EuroFIR BASIS database“. Od 2009. do danas je angažovana u saradnji sa Institute for Food Research, Norwich, UK kao u potpunosti obučeni evaluator za unos kompozicionih podataka u eBASIS bazu podataka bioaktivnih supstanci (www.ebasis.eurofir.org).

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

1. **Ranić, M.**, Konić-Ristić, A., Takić, M., Glibetić, M., Pavlović, Z., Pavlović, M., Dimitrijević-Branković, S.: Nutrient profile of black coffee consumed in Serbia: Filling a gap in the food composition database. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 40, no. 0, pp. 61-69, 2015 (IF = 2.259; 5 Year IF=2.799) (ISSN 0889-1575)

2. **Ranic, M.**, Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., & Dimitrijevic-Brankovic, S. Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, vol 80, no. 0, pp. 69-79, 2014 (IF = 3.590; 5 Year IF = 4.088) (ISSN 0959-6526)

Saopštenje sa medjunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. **Ranic, M.**, Pavlovic, M., Siler-Marinkovic, S., Dimitrijevic Brankovic, S. A study on total polyphenols content in spent coffee extracts (black, espresso and filter coffee), *Annals of nutrition and metabolism*, 2013, vol. 63, ISSN: 0250-6807, pp. 1655-1656.

2. **Ranic, M.**, Dimitrijevic-Brankovic, S., Arsic, A., Ivanovic, J., Milutinovic, M., Siler-Marinkovic, S. Fatty acid profiles of supercritical extracts of commercial espresso coffee

and spent coffee. *Annals of nutrition and metabolism*, 2011, vol. 58, ISSN: 0250-6807, pp. 102-102.

3. Milutinovic, M., Siler – Marinkovic, S., **Ranic, M.**, Dimitrijevic – Brankovic, S. Total polyphenols and antioxidative activity of water extracts of spent coffee. *Annals of nutrition and metabolism*, 2011, vol. 58, ISSN: 0250-6807, pp. 396-397.

IZJAVA O AUTORSTVU

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Марија Ранић _____

број индекса _____ 2009/4048 _____

Изјављујем

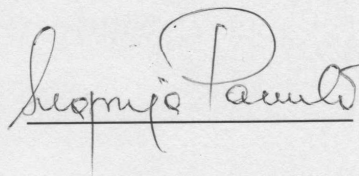
да је докторска дисертација под насловом

**Антиоксидативна активност екстраката кафе и отпадне кафе и њихов утицај
на активацију тромбоцита**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, ____07.07.2015.____



IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Марија Ранић _____

Број индекса _____ 2009/4048 _____

Студијски програм _____ Биохемијско инжењерство и биотехнологија _____

Наслов рада _____ **Антиоксидативна активност екстраката кафе и отпадне
кафе и њихов утицај на активацију тромбоцита**Ментор _____ Др Сузана Димитријевић Бранковић, ванредни професор
Технолошко - металуршког факултета Универзитета Београду _____

Потписани/а _____ Марија Ранић _____

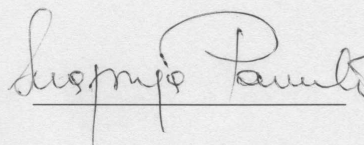
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 07.07.2015. _____



IZJAVA O KORIŠĆENJU

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Антиоксидативна активност екстраката кафе и отпадне кафе и њихов утицај на активацију тромбоцита

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, ____07.07.2015.____

Потпис докторанда

