

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj dana 21.06.2018. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Ispitivanje antioksidativnog i antimikrobnog potencijala kakao praha i njegovog uticaja na ponašanje miševa nakon kratkotrajne i dugotrajne suplementacije**“ kandidata Vanje Todorović, diplomiranog farmaceuta, u sastavu:

1. **Dr Slađana Šobajić**, redovni profesor, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. **Dr Miroslav Savić**, redovni profesor, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. **Dr Boris Šakić**, Associate Professor, Department of Psychiatry and Behavioral Neurosciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada (Visiting Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Serbia)
4. **Dr Bato Korać**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „**Ispitivanje antioksidativnog i antimikrobnog potencijala kakao praha i njegovog uticaja na ponašanje miševa nakon kratkotrajne i dugotrajne suplementacije**“, sadrži šest poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijali i metode, Rezultati i diskusija, Zaključci i Literatura. Na početku rada je priložen Sažetak/Abstract, dok se na kraju rada nalazi spisak publikovanih/saopštenih radova koji čine deo doktorske disertacije, kratka biografija kandidata i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije (obavezni Prilozi 1, 2 i 3).

Disertacija je napisana na 154 strane i sadrži 62 slike (17 u Uvodu, 5 u Materijalima i metodama i 40 u Rezultatima i diskusiji), 21 tabela (3 u Uvodu, 6 u Materijalima i metodama i 12 u Rezultatima i diskusiji). Pregled literature sadrži 244 navoda.

Uvod se sastoji iz pet delova, u kojima je dat detaljan prikaz dosadašnjih saznanja iz oblasti koje su neposredno vezane za predmet disertacije. U prvom delu Uvoda dat je kratak pregled istorijata korišćenja ploda biljke kakao (*Theobroma cacao*). U drugom delu Uvoda opisana je biljka kakaovac i njen plod koji se koristi za proizvodnju kakao proizvoda i

navedene su najčešće gajene sorte kakao zrna. Treći deo Uvoda posvećen je tehnološkom postupku dobijanja kakao praha i čokolade. U sledećem delu Uvoda dat je pregled dosadašnjih ispitivanja hemijskog sastava kakao praha kroz dve celine: metilksantini i polifenoli kakao praha. Peti deo Uvoda predstavlja pregled fizioloških efekata kakao praha na organizam obrađenih kroz šest podnaslova. U ovom delu data je definicija redoks ravnoteže, pregled najznačajnijih komponenti enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite, sa osvrtom na prethodno objavljene rezultate ispitivanja antioksidativne aktivnosti kakao praha. U nastavku su prikazani rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti kakao praha potkrepljeni potencijalnim mehanizmima iz dosadašnjih istraživanja. Poslednji deo Uvoda posvećen je delovanju kakao praha na određene organske sisteme, te je opisano hepatoprotektivno delovanje kakao praha, delovanje na kardiovaskularni sistem, antikancerogeni efekat, kao i neuroprotektivne i neurokognitivne funkcije kakao praha. Posebno je ukazano na heterogenost bihevioralnih efekata izazvanih dijetarnim suplementacijama biološki aktivnim jedinjenjima kakaoa.

Ciljevi istraživanja u okviru ove doktorske disertacije podrazumevali su hemijsku karakterizaciju kakao praha i ispitivanje njegove biološke aktivnosti u različitim *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima. Oni su bili postavljeni kroz pet faza ispitivanja:

- a) Identifikacija i kvantifikacija sadržaja polifenolnih komponenti i metilksantina u uzorcima kakao praha i kakao proizvoda sa tržišta;
- b) Procena antioksidativnog potencijala uzoraka kakao proizvoda. U ovoj fazi je, dodatno, analizirana korelacija između antioksidativnog potencijala i utvrđenog polifenolnog sastava kakao proizvoda;
- c) Testiranje antimikrobnog potencijala različitih uzoraka kakao praha na Gram+ i Gram- bakterije i gljivicu *Candida albicans*. Takođe je procenjen uticaj procesa tehnološke obrade na antioksidativne i antimikrobne karakteristike kakao praha;
- d) Ispitivanje efekta dijetarno relevantnih količina odabranog nealkalizovanog kakao praha u poređenju sa ekvivalentnom količinom kombinovanih sintetskih metilksantina kakaoa (teobromin i kofein) na učenje, memoriju, motivaciju i emocionalnu reaktivnost kod miševa. Pored efekata kratkotrajne suplementacije praćeni su i efekti na navedene domene ponašanja nakon dugotrajne suplementacije;
- e) Procena *in vivo* antioksidativnog delovanja kakao praha nakon dugotrajne suplementacije eksperimentalnih miševa. Naime, u ovoj fazi određivan je nivo proteina i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u homogenatu jetre starih miševa.

Poglavlje **Materijal i metode** podeljeno je u dve celine: *In vitro* ispitivanja sastava aktivnih komponenti kakao proizvoda i *In vivo* ispitivanja fizioloških efekata kakao praha. U delu koji se odnosi na *In vitro* ispitivanja date su relevantne informacije o korišćenim hemiklijama, karakteristikama analiziranih kakao proizvoda, načinu pripreme sojeva mikroorganizama, kao i postupcima pripreme adekvatnih ekstrakata kakao praha/čokolade. Takođe, detaljno su objašnjene analitičke tehnike za hemijsku karakterizaciju kakao proizvoda (gasna hromatografija visokih performansi (HPLC) i spektrofotometrija) i određivanje antioksidativnog i antimikrobnog potencijala kakao praha. U delu *In vivo* ispitivanja kakao praha prikazani su podaci o eksperimentalnim životinjama i korišćenju

osnovnoj hrani, o dizajnu suplementacione studije, objašnjen je eksperimentalni dizajn ogleda merenja ponašanja, i detaljno su opisani protokoli analitičkih i bihevioralnih eksperimentalnih procedura kao i načini izolacije i pripreme tkiva jetre za merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i analizu nivoa proteina Western blot tehnikom. U tekstu protokola bihevioralnih testova (neurološki testovi, test silaženja sa platforme, test održavanja na žici, rota-rod test, test hodanja po gredi, test spontanij alternacija, spontana noćna aktivnost, test novog objekta, test otvorenog polja, i Morisov vodeni lavirint) detaljno su opisane korišćene aparature i postupak praćenja ponašanja životinja uz pomoć specijalizovanog ANYmaze softvera.

Na kraju ovog poglavlja, opisani su statistički testovi koji su korišćeni u analizi dobijenih rezultata i navedeni su programi u kojima je vršena obrada istih (SPSS Statistics 20 i GraphPad Prism 6).

U poglavlju **Rezultati i diskusija** kandidat je originalne rezultate prikazao kroz 40 slika i 12 tabela koje je na jasan i sveobuhvatan način objašnjavao ličnim tumačenjem ali i poređenjem sa rezultatima publikovanim u relevantnoj literaturi. U diskusiji je velika pažnja posvećena razlikama u sadržaju biološki aktivnih jedinjenja (polifenoli i metilksantini) koje su rezultat procesa alkalizacije kakao praha i drugih procesa koji se koriste u proizvodnji čokolade. Diskusija suplementacione studije teži rasvetljavanju potencijala bioaktivnih kakao jedinjenja u oblikovanju ponašanja zavisno od dužine primene, kao i uticaja na redoks ravnotežu u jetri eksperimentalnih miševa.

Na kraju disertacije dati su **Zaključci** koji proizilaze iz analize dobijenih rezultata, a u skladu su sa postavljenim eksperimentalnim ciljevima.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 244 reference citirane harvardskim stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru rezultata analize profila biološki aktivnih jedinjenja u različitim kakao proizvodima prikazani su podaci o utvrđenom polifenolnom sastavu (kroz različite fenolne frakcije ali i pojedinačna jedinjenja) i sastavu metilksantinskih komponenti. Naime, najzastupljenija biološki aktivna jedinjenja svih kakao proizvoda bili su teobromin (14,100 mg/g) i kofein (5,838 mg/g). U kakao prahu identifikovano je i kvantifikovano 15 polifenolnih jedinjenja: monomerni flavan-3oli (epikatehin, katehin, galokatehin), polimerni procijanidini tipa A, B i C izomera, izomeri kvercetina, protokatehnična kiselina, kafeoil-asparaginska kiselina i derivati ruzmarinske kiseline: klovamid i deoksiklovamid. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, proantocijanidina i monomernih flavan-3ola bio je značajno niži u alkalizovanim u poređenju sa prirodnim kakao prahovima. Utvrđeno je i da proces alkalizacije nije uticao na sadržaj metilksantina u kakao prahu.

Antioksidativni potencijal meren pomoću DPPH, FRAP i ABTS testa statistički se značajno razlikovao između prirodnih i alkalizovanih kakao prahova, ali i između crnih (sa i bez dodatka maline) i mlečnih čokolada. Statističko-matematičkim modelom računat je antioksidativni kompozitni indeks (ACI) kakao proizvoda, te su prirodni kakao prahovi pokazali prosečnu ACI vrednost 89,4%, alkalizovani kakao prahovi 54,6%, crne čokolade sa malinom 31,7%, crne čokolade 26,7%, dok je prosečna vrednost ACI za mlečne čokolade bila svega 6,5%. Antioksidativni kompozitni indeks eksperimentalnih kakao proizvoda bio je

u značajnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem polifenola, flavonoida i proantocijanidina, kao i sa zbirnom koncentracijom epikatehina i katehina. Visoke korelacije ukazuju da kod kakao proizvoda fenolna jedinjenja daju najveći doprinos antioksidativnom potencijalu.

Antimikrobna aktivnost prikazana je tabelarno kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ekstrakata kakao praha dobijena testiranjem na tri Gram pozitivne, četiri Gram negativne bakterije i jedan soj gljivice *Candida albicans*, koja se ispostavila najosetljivijim mikroorganizmom. Suprotno od dobijenih rezultata za antioksidativnu aktivnost, antimikrobni potencijal ekstrakata alkalizovanih kakao prahova na Gram negativne bakterije bio je statistički viši u poređenju sa prirodnim kakao prahovima.

Dobijeni rezultati uticaja biološki aktivnih jedinjenja kakao praha na bihejvioralni fenotip zdravih mužjaka miševa soja C57BL/6 analizirani su i poređeni kroz vreme: pre suplementacije (*baseline*), nakon kratkotrajne suplementacije i nakon dugotrajne suplementacije. Suplementaciona studija sprovedena je na 36 miševa koji su bili podeljeni u tri grupe: kontrolni miševi (C, n = 12), miševi suplementirani kakao prahom (CP, n = 12) i miševi suplementirani metilksantinima (M, n = 12). Tokom studije nije utvrđena značajna razlika između grupa u telesnoj masi. Unos hrane i vode svih životinja bio je konstantan. Efekat na domen afektivnih moždanih funkcija nije ostvarila ni suplementacija kakao prahom ni suplementacija metilksantinima. Statistički je pokazano da su biološki aktivna jedinjenja kakao praha unapredila prostornu orijentaciju životinja nakon kratkotrajne suplementacije, ali nisu doprinela emocionalnom odgovoru miševa, kao ni stopi prostornog učenja i pamćenja nezavisno od dužine suplementacije. Lokomotorna aktivnost bila je smanjena usled kratkotrajne suplementacije metilksantinima u poređenju sa kontrolnom i kakao grupom, ali je ovaj efekat izostao nakon dugotrajne suplementacije.

Efekat dugotrajne suplementacije na potencijalno poremećenu redoks ravnotežu usled starosti ostvario se samo na nivou proteina, ali uključivanjem post-translacionih nivoa regulacije povećana aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri miševa nije dokazana. Naime, suplementacija metilksantinima dovela je do povećanja nivoa γ -GCS i GSH-Px proteina, dok su i suplementacija kakao prahom i suplementacija metilksantinima prouzrokovale povećanje nivoa CuZnSOD proteina. Nivo glutationa nije bio afektovan iako je nivo proteina za enzime koji učestvuju u njegovom prometu bio povećan usled suplementacije metilksantinima.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Kakao prah je industrijski proizvod koji se dobija preradom kakao zrna (*Theobroma cacao* L.) i poseduje jedinstven ukus i aromu. Sve češće se svrstava u popularnu grupu „funkcionalnih namirnica“ kojima se pripisuju, pored nutritivnih, i povoljni zdravstveni efekti (Ackar i sar., 2013). Visok sadržaj biološki aktivnih jedinjenja kao što su polifenoli i metilksantini omogućava fiziološke efekte kakao praha koji prevazilaze uobičajenu nutritivnu ulogu namirnica.

Rezultati dobijeni u prvom delu ove doktorske disertacije potvrđuju da kakao prah predstavlja dobar dijetarni izvor biološki aktivnih jedinjenja, ali da alkalizacija i neizbežni procesi proizvodnje u konditorskoj industriji značajno smanjuju sadržaj istih (Miller i sar.,

2009). Dosadašnji objavljeni rezultati ispitivanja uticaja procesa alkalizacije na smanjenje sadržaja fenola u kakao prahu su konzistentni, uz činjenicu da smanjenje značajno varira od 20,4% (Stanley i sar., 2015) do 60,5% (Miller i sar., 2008). Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali su prosečno 45,5% niži nivo ukupnih polifenolnih jedinjenja u alkalizovanim u odnosu na native kakao prahove. Nakon određivanja pojedinačnih fenolnih komponenti, utvrđeno je da je koncentracija epikatehina 62,5% bila niža u grupi alkalizovanih kakao prahova, dok je u slučaju katehina sniženje bilo 40,1%. Dakle, epikatehin/katehin odnos je promenjen u korist katehina (2,21 u prirodnim i 1,45 u alkalizovanim uzorcima). Ova pojava može se objasniti epimerizacijom, koja se javlja usled efekata toplote i bazne sredine tokom procesa alkalizacije. Veoma sličan rezultat publikovan je i za katehine zelenog čaja (Wang i Helliwell 2000), dok rezultati za kakao prah do sada nisu publikovani. U delu određivanja sadržaja ukupnih polifenola u čokoladama uočene su više vrednosti u poređenju sa rezultatima dobijenim u studiji (Belsčak-Cvitanović i sar., 2012), gde je kao ekstraktivni medijum korišćena voda, te ovakav nalaz potvrđuje manju ekstraktivnu efikasnost vode u poređenju sa organskim rastvaračima u slučaju fenolnih jedinjenja. Kada je reč o sadržaju metilksantina i monomernih flavan-3ola u čokoladama, vrednosti dobijene u ovom istraživanju korespondiraju sa rezultatima prethodno sprovedenih studija (Langer i sar., 2011; Cooper i sar., 2008).

Za *in vitro* ispitivanje antioksidativne aktivnosti različitih namirnica, najboljim pristupom smatra se primena kombinacije nekoliko metoda koje se zasnivaju na različitim mehanizmima delovanja (Llorent-Martinez, i sar., 2016; Mocan i sar., 2016). Shodno tome, u ovoj studiji za procenu antioksidativnog potencijala primenjenja su tri testa (DPPH, FRAP i ABTS), a kombinacija dobijenih rezultata omogućila je izračunavanje vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) svih analiziranih kakao proizvoda (Seeram i sar., 2008). Antioksidativni kompozitni indeks eksperimentalnih kakao proizvoda bio je u značajnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem polifenola, flavonoida i proantocijanidina, kao i sa zbirnom koncentracijom epikatehina i katehina i ovakvi rezultati u skladu su sa studijama koje su dokazale visoku korelaciju između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta kod namirnica kod kojih su ona dominantni antioksidansi (Huang i sar., 2005; Paixao i sar., 2007).

Upoređivanjem dobijenih rezultata u delu određivanja antimikrobnog potencijala sa literaturnim podacima za pojedine biljne ekstrakte, može se zaključiti da je antimikrobna aktivnost analiziranih uzoraka testiranih protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* veoma slična efektima ekstrakata origana, žalfije, karanfila, ruzmarina i celera, koji se smatraju dobrim antimikrobnim agensima u tradicionalnoj medicini (Witkowska i sar., 2013). Dobijen viši antimikrobni potencijal alkalizovanih kakao prahova u poređenju sa prirodnim, uprkos manjem sadržaju polifenola i nižem antioksidativnom potencijalu, veoma je interesantan i značajan nalaz ove studije. Potencijalno objašnjenje ovakvog fenomena može biti formiranje različitih jedinjenja tokom procesa alkalizacije koja poseduju antimikrobni ali ne i antioksidativni potencijal (Li i sar., 2012).

Druga celina ove disertacije je bilo ispitivanje *in vivo* efekata kakao praha. Shodno činjenici da je svaka namirnica specifična po svom hemijskom sastavu ali i da se često postavlja pitanje da li ona svoje efekte ostvaruje zahvaljujući ukupnom sastavu (gde funkcionalna interakcija između komponenti može značajno povećati ili smanjiti njihove

samostalne efekte), ili je reč o delovanju pojedinačnih komponenti, u drugom delu ovog istraživanja procenjen je uticaj kakao praha kao jedinstvene namirnice (Ellam i Williamson 2013), ali i ekvivalentne količine metilksantina (najzastupljenija bioaktivna jedinjenja kakao praha) na ponašajni profil kratkotrajno i dugotrajno suplementiranih miševa, kao i preventivno delovanje na promenu enzimske komponente antioksidativne zaštite miševa usled starenja.

Nekoliko animalnih suplementacionih studija, u kojima je korišćena dijeta sa sadržajem između 1 i 2% voćnog soka grožđa, šipka, jagode ili borovnice, ili u kojima su korišćeni pojedinačni flavonoidi (epikatehin i kvercetin), pokazalo je da polifenolna jedinjenja mogu uticati na različite aspekte pamćenja i učenja; naročito na brzu (Wang i sar., 2006) i sporu (Joseph i sar., 2009) memorijsku akviziciju, kratkoročnu radnu memoriju (Pu i sar., 2007; Ramirez i sar., 2005) i dugoročnu referentnu memoriju (Casadesus i sar., 2004). Analizirajući ponašajni profil suplementiranih miševa u testu spontanih alternacija i Morisovom vodenom lavirintu, utvrđeno je da biološki aktivna jedinjenja kakao praha jesu unapredila prostornu orijentaciju životinja nakon kratkotrajne suplementacije, ali da nisu doprinela emocionalnom odgovoru miševa, kao ni stopi prostornog učenja i pamćenja nezavisno od dužine suplementacije. Razlog ne-značajnog uticaja suplementacije na kognitivne performanse može biti činjenica da su u ovom istraživanju korišćene dijetarno relevantne količine kakao praha, što je rezultiralo unosom 12 µg flavonoida po gramu telesne mase miševa, a što je mnogostruko manje od količine kojom su suplementirani miševi u studiji (Praag i sar., 2007), gde je aplikovano 500 µg epikatehina/g. Dobijeni rezultati za ovaj domen ponašanja donekle su konzistentni sa rezultatima studije (Stringer i sar., 2015), čiji je predmet istraživanja bila suplementacija miševa flavanolima. Sledeći domen ponašanja od interesa u ovoj studiji bio je emocionalna reaktivnost miševa i dobijeni rezultati u koliziji su sa rezultatima dobijenim od strane Stringera i saradnika koji su pokazali da je suplementacija epikatehinom miševa u testu otvorenog polja dovela do značajnog povećanja odnosa vremena provedenog u centralnom regionu i onog provedenog na periferiji kod epikatehin-tretiranih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom (Stringer i sar., 2015). Što se lokomotorne aktivnosti tiče, rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji u smislu smanjene spontane noćne aktivnosti nakon kratkotrajne suplementacije metilksantinima ali bez efekata nakon dugotrajne suplementacije, u saglasnosti su sa nalazom dobijenim od strane Barraco i saradnika. Ova istraživačka grupa ispitala je uticaj agonista i antagonista adenozijskih receptora na spontanu lokomotornu aktivnost na odraslim Swiss Webster mužjacima miševa i dobila da najniža doza (10 µg) kofeina dovodi do značajnog smanjenja lokomotorne aktivnosti, ali da je u višim dozama (150 µg) kofein doveo do akutnog povećanja lokomotorne aktivnosti (Barraco i sar., 1985).

Relevantni rezultati dosadašnjih istraživanja bioaktivnih kakao jedinjenja su malobrojni i varijabilni kako u pogledu njihovog uticaja na nivo proteina tako i na aktivnost enzima antioksidativne zaštite jetre suplementiranih miševa. Noori i saradnici pokazali su da je tronedeljna suplementacija kakao prahom zdravih pacova Wistar soja prouzrokovala značajno povećanje nivoa glutaciona, SOD-a i CAT-a (Noori i sar., 2009) što korespondira sa rezultatom dobijenim samo za nivo SOD proteina u ovoj studiji. Dugoročna suplementacija miševa kofeinom (20 mg/kg/dan) u studiji (Mukhopadhyay i sar., 2003), nije dovela do povećanja aktivnosti GSH-Px što je konzistentno sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji

Literatura:

- Ackar D, Valek Lendic K, Valek M, Subaric D, Milicevic B, Babic J, Nedic I (2013) Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food? *Journal of Chemistry* 2013, 7.
- Barraco RA, Phillis JW, Altman HJ (1985) Depressant effect of forskolin on spontaneous locomotor activity in mice. *General Pharmacology: The Vascular System* 16, 521-524.
- Belscak-Cvitanovic A, Durgo K, Gacina T, Horzic D, Franekic J, Komes D (2012) Comparative study of cytotoxic and cytoprotective activities of cocoa products affected by their cocoa solids content and bioactive composition. *European Food Research and Technology* 234, 173-186.
- Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee HG, Smith MA, Joseph JA (2004) Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci.* 7, 309-316.
- Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G (2008) Cocoa and health: a decade of research. *Br.J Nutr* 99, 1-11.
- Ellam S, Williamson G (2013) Cocoa and human health. *Annu.Rev Nutr* 33, 105-128.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric.Food Chem* 53, 1841-1856.
- Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D (2009) Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci.* 29, 12795-12801.
- Langer S, Marshall LJ, Day AJ, Morgan MR (2011) Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8435-8441.
- Li Y, Feng Y, Zhu S, Luo C, Ma J, Zhong F (2012) The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis* 25, 17-23.
- Llorent-Martinez EJ, Ortega-Barrales P, Zengin G, Uysal S, Ceylan R, Guler GO, Mocan A, Aktumsek A (2016) Lathyrus aureus and Lathyrus pratensis: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities. *RSC Advances* 6, 88996-89006.
- Miller KB, Hurst WJ, Payne MJ, Stuart DA, Apgar J, Sweigart DS, Ou B (2008) Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *J Agric.Food Chem* 56, 8527-8533.
- Miller KB, Hurst WJ, Flannigan N, Ou B, Lee CY, Smith N, Stuart DA (2009) Survey of Commercially Available Chocolate- and Cocoa-Containing Products in the United States. 2. Comparison of Flavan-3-ol Content with Nonfat Cocoa Solids, Total Polyphenols, and Percent Cacao. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9169-9180.

- Mocan A, Zengin G, Uysal A, Gunes E, Mollica A, Degirmenci NS, Alpsoy L, Aktumsek A (2016) Biological and chemical insights of *Morina persica* L.: A source of bioactive compounds with multifunctional properties. *Journal of Functional Foods* 25, 94-109.
- Mukhopadhyay S, Mondal A, Poddar MK (2003) Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian J Exp.Biol* 41, 283-289.
- Noori S, Nasir K, Mahbood T (2009) Effects of cocoa powder on oxidant/ antioxidant status in liver, heart and kidney tissues of rats. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 19, 174-178.
- Paixao N, Perestrelo R, Marques JC, Comara JS (2007) Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, ros+ê and white wines. *Food Chemistry* 105, 204-214.
- Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Yip E, Afanador M, Schroeter H, Hammerstone J, Gage FH (2007) Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci.* 27, 5869-5878.
- Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, Egawa T, Kitamura Y, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2007) Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci* 104, 329-334.
- Ramirez MR, Izquierdo I, Raseira MdCB, Zuanazzi J+, Barros D, Henriques AT (2005) Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacological Research* 52, 457-462.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric.Food Chem* 56, 1415-1422.
- Stanley TH, Smithson AT, Neilson AP, Anantheswaran RC, Lambert JD (2015) Analysis of Cocoa Proanthocyanidins Using Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrochemical Detection: Application to Studies on the Effect of Alkaline Processing. *J Agric.Food Chem* 63, 5970-5975.
- Stringer TP, Guerrieri D, Vivar C, van Praag H (2015) Plant-derived flavanol (-) epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. *Translational Psychiatry* 5, e493.
- Wang H, Helliwell K (2000) Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry* 70, 337-344.
- Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N, Dickstein DL, Thiyagarajan M, Percival SS, Talcott ST, Pasinetti GM (2006) Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 20, 2313-2320.

Witkowska A, Hickey D, Alonso-Gomez M, Wilkinson M (2013) Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research* 2, 37.

D. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju i dopunjuju dosadašnja saznanja o uticaju alkalizacije i drugih neophodnih tehnoloških procesa u proizvodnji čokolade na sadržaj biološki aktivnih jedinjenja (metilksantina i polifenola) različitih kakao proizvoda. Dodatno, rezultati ove disertacije proširuju razumevanje funkcionalnosti kakao praha u pogledu antioksidativnih i antimikrobnih karakteristika.

S obzirom na ograničeni broj prethodnih istraživanja, rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos rasvetljavanju pitanja oblikovanja ponašanja, kao i modulacije nivoa oksidativnog stresa, na modelu eksperimentalnih životinja, primenom kratkotrajne i dugotrajne dijetarne intervencije suplementacijom kakao prahom ili ekvivalentnom količinom sintetskih metilksantina kakaoa (teobromin i kofein). Primljena količina kakao praha (3 %) za prvu eksperimentalnu grupu i količina metilksantina (0,087%, identična sa dozom ovih jedinjenja koju konzumiraju životinje suplementirane kakao prahom) približno su ekvivalentne dnevnom unosu dve kašike kakao praha odnosno 50 g crne čokolade ekstrapolirano na ljude. Izabrane doze smatraju se nutritivno opravdanim, odnosno mogu se postići uobičajenim dijetarnim unosom. Upravo dijetarno relevantne doze diferenciraju ovo istraživanje od ostalih u kojima se primenjene količine biološki aktivnih jedinjenja, bilo polifenola bilo metilksantina, mogu postići samo ekstrakcijom iz prirodnih izvora i unosom putem dijetetskih suplemenata, a ne konvencionalnom hranom.

E. OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu dva rada u časopisima koji su na SCI listi (kategorije M21 i M22), kao i u obliku većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanih u izvodu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku:

1. Todorovic V, Radojic-Redovnikovic I, Todorovic ZB, Jankovic G, Dodevska M, Sobajic S. Polyphenols, methyxantines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *J Food Composition Analysis*. 2015; 41:137-143 (IF(2017): 3.224, *Food Science & Technology* 31/133, M21).
2. Todorovic V, Milenkovic M, Vidovic B, Todorovic Z, Šobajić S. Correlation between Antimicrobial, Antioxidant Activity, and Polyphenols of Alkalized/Nonalkalized Cocoa Powders. *Journal of Food Science*. 2017; 82 (4):1020–1027. (IF(2017): 2.307 *Food Science & Technology* 42/133, M22).

F. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast hemije hrane i bromatologije.

Kandidat je uspešno ostvario jasno postavljene istraživačke ciljeve, ovladao brojnim metodama u cilju hemijske analize i pocene zdravstvenih efekata kakao praha, a rezultate ove doktorske disertacije publikovao u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M21 i M22.

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „**Ispitivanje antioksidativnog i antimikrobnog potencijala kakao praha i njegovog uticaja na ponašanje miševa nakon kratkotrajne i dugotrajne suplementacije**“ kandidata Vanje Todorović, diplomiranog farmaceuta.

Beograd, 06.07.2018.

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Slađana Šobajić (mentor), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Miroslav Savić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Boris Šakić, Associate Professor, Department of Psychiatry and Behavioral Neurosciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada (Visiting Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Serbia)

Dr Bato Korać, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet
