

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Vanja M. Todorović

**ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG I  
ANTIMIKROBNOG POTENCIJALA  
KAKAO PRAHA I NJEGOVOG UTICAJA  
NA PONAŠANJE MIŠEVA NAKON  
KRATKOTRAJNE I DUGOTRAJNE  
SUPLEMENTACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Vanja M. Todorović

**INVESTIGATION OF COCOA POWDER'S  
ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL  
POTENTIAL AND ITS IMPACT ON MICE  
BEHAVIOR AFTER SHORT-TERM AND  
LONG-TERM SUPPLEMENTATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**MENTOR:**

dr Slađana Šobajić, redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Farmaceutski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

dr Miroslav Savić, redovni profesor Univerziteta 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 Univerziteta u Beogradu - Biološki fakultet

U Beogradu, \_\_\_\_\_

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Katedre za bromatologiju i vivarijumu Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, laboratorijama Zavoda za biohemijско inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Zagrebu, Hrvatska, laboratorijama Departmana za hemiju hrane, tehnologiju i biotehnologiju Hemijskog fakulteta Tehnološkog Univerziteta u Gdanjsku, Poljska (u okviru projekta CA16112 „Personalized Nutrition in aging society: redox control of major age-related diseases“), laboratorijama Departmana za hranu i biotehnologiju, Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, kao i u laboratorijama Departmana za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se:*

*mentoru prof. dr Slađani Šobajić na ukazanom poverenju i pruženim prilikama za stručna usavršavanja, na pomoći u osmišljavanju eksperimenata i diskusijama rezultata, kao i na aktivnom učešću prilikom pisanja radova i izrade ove doktorske disertacije*

*prof. dr Miroslavu Saviću na korisnim predlozima prilikom planiranja eksperimenata kao i komentarima i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije*

*prof. dr Borisu Šakiću na stručnim savetima i pomoći u planiranju eksperimenata ponašanja, kao i analizi i diskusiji rezultata*

*prof. dr Bati Koraću na sjajnim idejama i smernicama tokom eksperimenata, ali i na komentarima i predlozima tokom pisanja ove doktorske disertacije*

*kolegama sa Katedre za bromatologiju na razumevanju i toleranciji*

*prijateljima na neizmernoj podršci*

*porodici na bezuslovnoj ljubavi i beskrajnoj veri u uspeh*

# ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG I ANTIMIKROBNOG POTENCIJALA KAKAO PRAHA I NJEGOVOG UTICAJA NA PONAŠANJE MIŠEVA NAKON KRATKOTRAJNE I DUGOTRAJNE SUPLEMENTACIJE

## SAŽETAK

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 veoma popularnu grupu „funkcionalnih namirnica“. Visok sadržaj biološki aktivnih jedinjenja omogućava fiziološke efekte kakao praha koji prevazilaze uobičajenu nutritivnu ulogu namirnica. Specifičan polifenolni profil uz prisustvo purinskih alkaloida čine ovu namirnicu od posebnog interesa u brojnim studijama i dosadašnji nalazi afirmativni su u kontekstu antioksidativnog i antimikrobnog potencijala, hepatoprotektivnog delovanja, zatim delovanja biološki aktivnih jedinjenja kakao praha na rad kardiovaskularnog i nervnog sistema.

Prvi eksperimentalni cilj ove disertacije bio je hemijska karakterizacija kakao praha i ispitivanje njegove *in vitro* antioksidativne i antimikrobne aktivnosti kao i uticaja tehnološke obrade kakao praha na iste. Drugi deo disertacije imao je za cilj ispitivanje uloge biološki aktivnih jedinjenja kakao praha na bihevioralni fenotip zdravih miševa soja C57BL/6 i procenu *in vivo* antioksidativne aktivnosti u pogledu enzima antioksidativne zaštite hepatocita suplementiranih miševa.

HPLC-DAD-MS karakterizacijom kakao praha identifikovano je i kvantifikovano 17 biološki aktivnih jedinjenja od kojih su najzastupljeniji bili metilksantini (teobromin (14,10 mg/g) i kofein (5,84 mg/g)), zatim monomerni flavan-3oli (epikatehin (1,00 mg/g), katehin (0,51 mg/g) i galokatehin (0,25 mg/g)), nakon čega su sledili oligomerni procijanidini i derivati hidoksibenzoeve kiseline. Prirodni kakao prahovi imali su značajno veći sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, proantocijanidina, i monomernih flavan-3ola u poređenju sa alkalizovanim kakao prahovima i analiziranim grupama čokolada (crne čokolade sa ili bez maline i mlečne čokolade). Konzistentno sa tim, prirodni kakao prahovi pokazali su najveću prosečnu vrednost antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) od 89,4%. Među testiranim mikrobiološkim sojevima, gljivica *Candida albicans* izdvojila se kao najosetljiviji

mikroorganizam (MIK = 5,0 mg/ml). Antimikrobni potencijal ekstrakata alkalizovanih kakao prahova samo na Gram negativne bakterije bio je statistički viši u poređenju sa prirodnim kakao prahovima. Procesi prerade kakao praha značajno smanjuju sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost, ovaj efekat je manje izražen kod metilksantina, dok je na antibakterijski efekat kakao praha proces alkalizacije delovao stimulatивно.

Za procenu ponašajnog fenotipa miševa korišćena je baterija testova nakon kratkotrajne i dugotrajne suplementacije dijetarno relevantnim količinama kakao praha i ekvivalentne količine sintetskih metilksantina (teobromin i kofein). Ova studija ukazuje da su sve kratkotrajno suplementirane životinje pokazale bolju prostornu orijentaciju, ali da efekta na učenje i pamćenje nije bilo ni posle kratkotrajne ni posle dugotrajne suplementacije. Bioaktivna kakao jedinjenja nisu uticala na emocionalne odgovore kod miševa. Samo kratkotrajna suplementacija metilksantinima prouzrokovala je smanjenje spontane noćne aktivnosti miševa, dok je ovaj efekat izostao nakon dugotrajne suplementacije. Dugotrajna suplementacija metilksantinima dovela je do povećanja nivoa GSH-Px,  $\gamma$ -GCS proteina u jetri, ali se efekat u smislu povećane aktivnosti antioksidativnih enzima niti nivoa glutaciona nije pokazao kod iste grupe miševa. Nivo CuZnSOD proteina jetre bio je povećan usled suplementacije i kakao prahom i metilksantinima, ali ne i aktivnost ovog enzima.

Ova studija potvrdila je *in vitro* antioksidativno i antimikrobno delovanje kakao praha, a *in vivo* nalazi suplementacije dijetarno relevantnim količinama kakao praha nisu potvrdili njegov modulatorni efekat na ponašanje i aktivnost enzima antioksidativne zaštite, čime se otvorila nova tema za eksperimente koji se odnose na rasvetljavanje mehanizama i količina u kojima biološki aktivna jedinjenja kakao praha mogu imati ulogu u oblikovanju ponašanja i promeni redoks ravnoteže na nivou hepatocita miševa.

**Ključne reči:** kakao prah, polifenoli, metilksantini, antioksidativni kompozitni indeks, antimikrobna aktivnost, ponašanje, enzimi antioksidativne zaštite

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Bromatologija

**UDK broj:** 615:663.91:57.084(043.3)

# INVESTIGATION OF COCOA POWDER'S ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL AND ITS IMPACT ON MICE BEHAVIOR AFTER SHORT-TERM AND LONG-TERM SUPPLEMENTATION

## ABSTRACT

Cocoa powder is an industrial product obtained by processing cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) and has a unique flavor and aroma. High content of several biologically active compounds allows various physiological effects of cocoa powder that exceed the usual nutritional role of this food, so it is often classified into a very popular group of "functional foods". Specific polyphenol profile in the presence of purine alkaloids make this food stimulating research topic, and the findings so far are affirmative in the context of antioxidant and antimicrobial potential, hepatoprotective action, as well as the effects on cardiovascular and nervous system.

The first experimental goal of this dissertation was the chemical characterization of non-nutritive compounds in cocoa powder, evaluation of its *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, with the emphasis on the difference between natural and processed cocoa powder properties. The second part of dissertation was focused on examination of the role of cocoa powder or methylxanthines supplementation in doses that were dietary relevant on behavioral phenotype of healthy C57BL/6 mice and on the assessment of *in vivo* antioxidant activity in regard to antioxidant enzymes in mice liver.

HPLC-DAD-MS characterization of cocoa powder has identified and quantified 17 biological active compounds, the most abounded were methylxanthines (teobromine (14,1 mg / g) and caffeine (5.8 mg / g)), followed by monomer flavan-3ols (epicatechin (1.0 mg / g), catechin (0.5 mg / g) and galocatechin (0.26 mg / g)), oligomeric procyanidins and hydroxybenzoic acid derivatives. Natural cocoa powders had significantly higher content of total polyphenols, flavonoids, proanthocyanidins, and monomer flavan-3ol compared to alkalized cocoa powders and analyzed chocolate groups (black chocolates with or without raspberry and milk chocolates). Consistently, natural cocoa powders showed the highest average value of antioxidant composite index (ACI = 89.4%). Among the tested microbiological strains, *Candida albicans* was the most sensitive microorganism (MIC = 5.0 mg / ml). The antimicrobial potential of

alkalized cocoa powder extracts, exclusively on Gram negative bacteria, was statistically higher compared to natural cocoa powders. Cocoa powder processing significantly reduced the polyphenol content and antioxidant activity, this effect is less reflected in methylxanthines, while the antibacterial effect of cocoa powder has even been enhanced by the alkalization process.

To assess mice behavioral phenotype a comprehensive battery of tests was used after a short-term and long-term supplementation with dietary relevant quantities of cocoa powder and an equivalent amount of synthetic methylxanthines (theobromine and caffeine). This study suggests that all short-term supplemented animals showed a better spatial orientation, but the effects on learning and memory were not noticed either after short-term nor long-term supplementation. Bioactive cocoa compounds did not affect emotional responses in mice. Only short-term supplementation with methylxanthines caused a decrease in spontaneous nocturnal activity of mice, while this effect was absent after long-term supplementation. Long-term supplementation with methylxanthines led to increased level of GSH-Px,  $\gamma$ -GCS proteins in liver homogenates, but the effect in terms of increased antioxidant enzymes activity and glutathione level were not shown in the same mice group. The CuZnSOD protein level was increased by both cocoa powder and methylxanthines supplementation, but enzyme activity was not affected.

This study confirmed *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of cocoa powder. *In vivo* findings of supplementation with dietary relevant quantities of cocoa powder did not confirm its modulating effect on mice behavior nor on activity of liver antioxidant enzymes. Thus, it opened a new topic for experiments related to mechanisms and quantities of biologically active cocoa compounds that could play a role in shaping behavior and changing redox balance at the hepatocyte level in mice.

**Key words:** cocoa powder, polyphenols, methylxanthines, antioxidant composite index, antimicrobial activity, behavior, antioxidant enzyme protection

**Scientific filed:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Bromatology

**UDC number:** 615:663.91:57.084(043.3)



## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1	KAKAO – ISTORIJA.....	1
1.2	KAKAO ZRNO.....	1
1.2.1	Sorte kakao zrna.....	3
1.3	KAKAO PRAH I KAKAO PROIZVODI.....	4
1.3.1	Tehnološki postupak proizvodnje kakao praha i čokolade.....	4
1.4	HEMIJSKI SASTAV KAKAO PRAHA.....	6
1.4.1	Metilksantini kakao praha.....	7
1.4.2	Polifenoli kakao praha.....	8
1.5	EFEKTI KAKAO PRAHA NA ORGANIZAM.....	14
1.5.1	Redoks ravnoteža.....	14
1.5.1.1	Reaktivne kiseonične vrste.....	15
1.5.1.2	Sistemi antioksidativne zaštite.....	17
1.5.1.2.1	Enzimski sistem antioksidativne zaštite.....	18
1.5.1.2.2	Neenzimski sistem antioksidativne zaštite.....	19
1.5.1.2.2.1	Antioksidativna aktivnost kakao praha.....	21
1.5.2	Antimikrobna aktivnost kakao praha.....	23
1.5.3	Hepatoprotektivno delovanje kakao praha.....	26
1.5.4	Kardiovaskularni sistem i kakao prah.....	27
1.5.4.1	Antioksidativna aktivnost.....	29
1.5.4.2	Anti-inflamatorna aktivnost.....	30
1.5.5	Kancer i kakao prah.....	30
1.5.6	Nervni sistem i kakao prah.....	31
1.5.6.1	Neuroprotektivni efekat.....	35
1.5.6.2	Neuromodulatorni efekat.....	37
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	39
3.	MATERIJAL I METODE.....	40
3.1	<i>IN VITRO</i> ISPITIVANJA KAKAO PROIZVODA.....	40
3.1.1	Materijali.....	40
3.1.2	Hemikalije.....	41
3.1.3	Priprema ekstrakata kakao praha.....	42

3.1.4	Priprema ekstrakata čokolade.....	42
3.1.5	Hemijska karakterizacija profila biološki aktivnih sastojaka kakao praha	43
3.1.5.1	Određivanje sadržaja biološki aktivnih sastojaka HPLC-MS metodom	43
3.1.5.2	Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja - mikro-metoda.....	44
3.1.5.3	Određivanje ukupnih flavonoida - mikro-metoda.....	45
3.1.5.4	Određivanje proantocijanidina .....	45
3.1.6	Hemijska karakterizacija profila biološki aktivnih sastojaka čokolade.....	46
3.1.6.1	Određivanje sadržaja biološki aktivnih sastojaka HPLC metodom ...	46
3.1.6.2	Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja .....	47
3.1.6.3	Određivanje ukupnih flavonoida.....	47
3.1.6.4	Određivanje proantocijanidina .....	48
3.1.7	Određivanje antioksidativnog potencijala kakao praha.....	48
3.1.7.1	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) mikro-metoda.....	48
3.1.7.2	FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mikro-metoda .....	49
3.1.7.3	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) mikro-metoda.....	49
3.1.8	Određivanje antioksidativnog potencijala čokolade.....	50
3.1.8.1	DPPH metoda.....	50
3.1.8.2	FRAP metoda .....	50
3.1.8.3	TEAC metoda.....	51
3.1.9	Određivanja antimikrobnog potencijala kakao praha.....	51
3.1.9.1	Priprema sojeva mikroorganizama.....	51
3.1.9.2	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK).....	52
3.2	<i>IN VIVO</i> ISPITIVANJA KAKAO PRAHA .....	53
3.2.1	Priprema hrane za suplementacionu studiju .....	53
3.2.2	Dizajn suplementacione studije .....	56
3.2.2.1	Merenje ponašanja.....	58
3.2.2.1.1	Neurološki testovi.....	58
3.2.2.1.2	Test silaženja sa platforme (Step-Down Test).....	59
3.2.2.1.3	Test održavanja na žici (Hanging Basket Test) .....	59
3.2.2.1.4	Rota-rod test.....	59
3.2.2.1.5	Test hodanja po gredi (Beam Walking Test) .....	60

3.2.2.1.6	Test spontanih alternacija (Spontaneous Alternation Behaviour Test)	60
3.2.2.1.7	Spontana noćna aktivnost (Spontaneous Nocturnal Activity)	61
3.2.2.1.8	Test novog objekta (Novel Object Test)	61
3.2.2.1.9	Test otvorenog polja (Open Field Test)	62
3.2.2.1.10	Morisov vodeni lavirint (Morris Water Maze Test)	62
3.2.3	Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri miševa nakon dugotrajne suplementacije	63
3.2.3.1	Priprema homogenata jetre za određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite	63
3.2.3.2	Određivanje koncentracije proteina	64
3.2.3.3	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	64
3.2.3.4	Određivanje aktivnosti ukupne superoksid-dismutaze (SOD)	64
3.2.3.5	Određivanje aktivnosti MnSOD i CuZnSOD	65
3.2.3.6	Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)	65
3.2.3.7	Određivanje aktivnosti glutation-S-tranferaze (GST)	66
3.2.3.8	Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)	66
3.2.3.9	Određivanje ukupnog glutationa	67
3.2.4	Određivanje proteina u jetri miševa nakon dugotrajne suplementacije – Western blot	67
3.2.4.1	Priprema homogenata jetre za Western Blot	67
3.2.4.2	Razdvajanje proteina na SDS-PAGE	68
3.2.4.3	Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu	69
3.2.4.4	Imunološka detekcija proteina (Western blot)	69
3.2.4.5	Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom	70
3.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	71
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	72
4.1	SADRŽAJ BIOLOŠKI AKTIVNIH SASTOJAKA KAKAO PRAHA	72
4.2	SADRŽAJ BIOLOŠKI AKTIVNIH SASTOJAKA ČOKOLADE	80
4.3	ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL KAKAO PRAHA	85
4.4	ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL ČOKOLADE	87
4.5	ANTIOKSIDATIVNI KOMPOZITNI INDEKS KAKAO PROIZVODA	89
4.6	ANTIMIKROBNI POTENCIJAL KAKAO PRAHA	93

4.7	UTICAJ KRATKOTRAJNE I DUGOTRAJNE DIJETARNE SUPLEMENTACIJE KAKAO PRAHOM NA PONAŠANJE MIŠEVA.....	96
4.7.1	Telesna masa.....	98
4.7.2	Unos hrane i vode .....	99
4.7.3	Neurološki testovi.....	100
4.7.4	Test silaženja sa platforme .....	100
4.7.5	Test održavanja na žici .....	101
4.7.6	Rota-rod test .....	103
4.7.7	Test hodanja po gredi .....	103
4.7.8	Test spontanij alternacija .....	104
4.7.9	Spontana noćna aktivnost.....	106
4.7.10	Test novog objekta.....	107
4.7.11	Test otvorenog polja.....	108
4.7.12	Morisov vodeni lavirint .....	109
4.7.13	Učenje/pamćenje, emocionalna reaktivnost i lokomotorna aktivnost .....	113
4.8	UTICAJ DUGOTRAJNE DIJETARNE SUPLEMENTACIJE KAKAO PRAHOM NA NIVO PROTEINA I AKTIVNOST ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U HOMOGENATU JETRE .....	120
4.8.1	Nivo glutaciona .....	121
4.8.2	Glutation-peroksidaza (GSH-Px) .....	122
4.8.2.1	Nivo GSH-Px proteina .....	122
4.8.2.1	Aktivnost GSH-Px.....	123
4.8.3	Nivo $\gamma$ -GCS ( $\gamma$ -glutamincistein-sintetaza) proteina .....	124
4.8.4	Aktivnost glutacion-reduktaze (GR) .....	124
4.8.5	Aktivnost glutacion-S-transferaze (GST).....	125
4.8.6	Superoksid-dismutaza (SOD).....	125
4.8.6.1	Aktivnost SOD .....	125
4.8.6.2	Nivo CuZnSOD proteina.....	126
4.8.6.3	Aktivnost CuZnSOD .....	127
4.8.6.4	Nivo MnSOD proteina .....	127
4.8.6.5	Aktivnost MnSOD.....	128
4.8.7	Katalaza (CAT).....	128
4.8.7.1	Nivo proteina katalaze.....	128

4.8.7.2	Aktivnost CAT .....	129
4.8.8	Efekat biološki aktivnih jedinjenja kakao praha na enzime antioksidativne zaštite	129
5.	ZAKLJUČCI .....	132
6.	LITERATURA.....	136

# 1. UVOD

## 1.1 KAKAO – ISTORIJAT

Veruje se da biljka kakaovac vodi poreklo iz Amazona ili basena reke Orinoko. Još od 1500. godine p. n. e. kakaovac, kao domaći usev, uzgajan je od strane Olemek Indijanaca. Sofisticirano društvo njihovih kulturoloških naslednika, Maja, konzumiralo je cenjeni napitak *xocoatl* (sho-kwa-til, odnosno kakao), koji je pripreman od mlevenog kakao semena pomešanog sa vodom, crnim biberom, vanilom i drugim začinima. Maje oko 600. godine migriraju ka Južnoj Americi osnivajući najstariju plantažu kakaoa na Jukataniu. Kakao zrna tog vremena bila su veoma vredna roba i korišćena su kao sredstva za plaćanje i jedinice računanja.

Kristofer Kolumbo 1502. godine donosi kakao zrno iz Južne Amerike u Evropu, ali njegova vrednost nije odmah prepoznata. Dvadesetak godina kasnije španski osvajač Korteza, osvajajući Meksiko, proba čuveni napitak *xocoatl* i prepoznaje njegovu čar i vrednost. Ne mnogo kasnije osniva plantažu kakaoa sa ciljem da "uzgaja novac" i tako Španija započinje svoj kakao monopol.

Upravo su Evropljani bili ti koji su od kakao zrna počeli da prave čokoladu i ostale kakao proizvode. Čokoladne proizvode koji su nam danas dostupni dugujemo holandskom hemičaru Conradu J. Van Houtenu, koji je 1828. godine patentirao hidrauličnu presu koja mrvči kakao zrna iz kojeg nastaje kakao prah.

## 1.2 KAKAO ZRNO

Kakao zrno je plod biljke kakaovca (*Theobroma cacao* L., porodica *Stericuliaceae*). Botanički naziv ove biljke potiče iz starogrčkog (θεός (*theos*) i βρῶμα (*broma*)) što se doslovno može prevesti „hrana Bogova“.

Kakaovac (Slika 1) je listopadno drvo, visine 4–8 m. Listovi kakaovca su krupni, jajoliki, zašiljeni na vrhu, naizmenični. Cvetovi se razvijaju direktno na stablu i glavnim granama (kauliflorija). Plod je krupna, sočna bobica, na donjem delu proširena, zašiljena

na vrhu. U pulpi ploda, dužine oko 20 cm, nalazi se do 50 semena (Kovacevic, 2004). Drvo kakaovca počinje da cveta treće godine od zasada, a da daje plod nakon pet godina. Prosečan životni vek mu je dvadeset godina.



Slika 1. Kakaovac (*Theobroma cacao L.*)

Postoje dve interesantne teorije o poreklu kakaovca. Jedna grupa istraživača veruje da su originalne jedinice kakaovca rasle od jugoistočnog Meksika sve do reke Amazon, a kasnije bile kultivisane na ravninama Južne Amerike. Novija proučavanja pokazuju da kakaovac potiče iz tropskih područja Amazona, a posle od strane čoveka biva rasprostranjen do Srednje, čak i Severne Amerike.

Ova biljka danas uspeva u ravničarskim područjima ispod Anda na visinama od 200–400 m, u oblastima Južne i Centralne Amerike i Afrike. Klimatski uslovi koji najbolje pogoduju kakaovcu uključuju raspon temperature 22 – 32 °C i prosečnu količinu godišnjih padavina od 1250 – 3000 mm. Idealno zemljište za kakaovac bi trebalo biti dubine najmanje 1,5 m sa sadržajem gline od 30 – 40%. On se najuspešnije gaji na zemljištu sa širokim spektrom pH, od 6 do 7,5 kako bi mu bili dostupni svi neophodni nutrijenti.

Plod kakaovca (Slika 2) tokom zrenja menja boju. Upravo po boji, zaključuje se koji se plod može ubrati. Plod se ubira tako da se ne ošteti mala peteljka koja ga drži, jer iz nje ponovo raste cvet. Zatim se plod pažljivo preseca kako se kakao zrno ne bi oštetilo. Kakao zrna se vade zajedno sa pulpom koja ih okružuje i kao takva započinju proces jednonedeljne fermentacije pod uticajem prirodnih mikroorganizama koji se razmnožavaju koristeći šećer iz pulpe kao izvor energije. Kakao zrna od purpurne

prelaze u karakterističnu braon boju i počinju da ispuštaju karakterističan miris. Nakon fermentacije kakao zrna se izlažu sušenju na suncu ili u specijalnim pećima na drva. Dalje se ona mogu pržiti i mleti, pakovati i isporučivati u svrhu dalje prerade.



Slika 2. Kakao zrno

Poznato je da se najveće količine kakaovog zrna upotrebljavaju u konditorskoj industriji. Međutim, ono nalazi svoju primenu i u kozmetičkoj industriji, kao i u izradi nekih farmaceutskih oblika gde se često kao podloga koristi kakao maslac (*Butyrum Cacao*) koji je jedan od produkata prerade kakao zrna.

### 1.2.1 Sorte kakao zrna

Četiri vrste kakao zrna, pogodne za ljudsku upotrebu, (*criollo*, *forastero*, *trinitario* i *nacional*), međusobno se razlikuju po boji kotiledona. Antocijanini daju boju kotiledonima i imaju ključnu ulogu u stvaranju arome kakao proizvoda.

*Criollo* je "izvorni" španski kakaovac koji je bio otkriven od strane Kolumba na otoku Gvajani 1502. godine. Predstavlja najređu vrstu kakaovca (5 -10 % svetske proizvodnje) i uzgaja se samo u Južnoj Americi. Ima belu boju kotiledona jer su antocijanini prisutni u leuko formi te je svojstvene "fine" arome. Kakao proizvodi proizvedeni od ovog zrna imaju svetlo braon boju s blagom aromom lešnika.

*Forastero*, afrički varijetet, nalazi najveću primenu u konditorskoj industriji. Ima ljubičastu boju kotiledona te zbog toga nema posebnu aromu.



*Trinitario* potiče iz Trinidada, a hibrid je prethodna dva varijeteta i objedinjuje njihova najbolja svojstva. Zauzima oko 10 - 15% svetske proizvodnje. Preradom daje kakao zrna izvrsne arome tako da se primjenjuje u proizvodnji "finih" čokolada (Beckett, 2009; Wollgast i Anklam, 2000a).

Postoji i četvrti varijetet *nacional*, koji se proizvodi u Ekvadoru i spada u plemenite sorte kakaovca (Counet i sar., 2004).

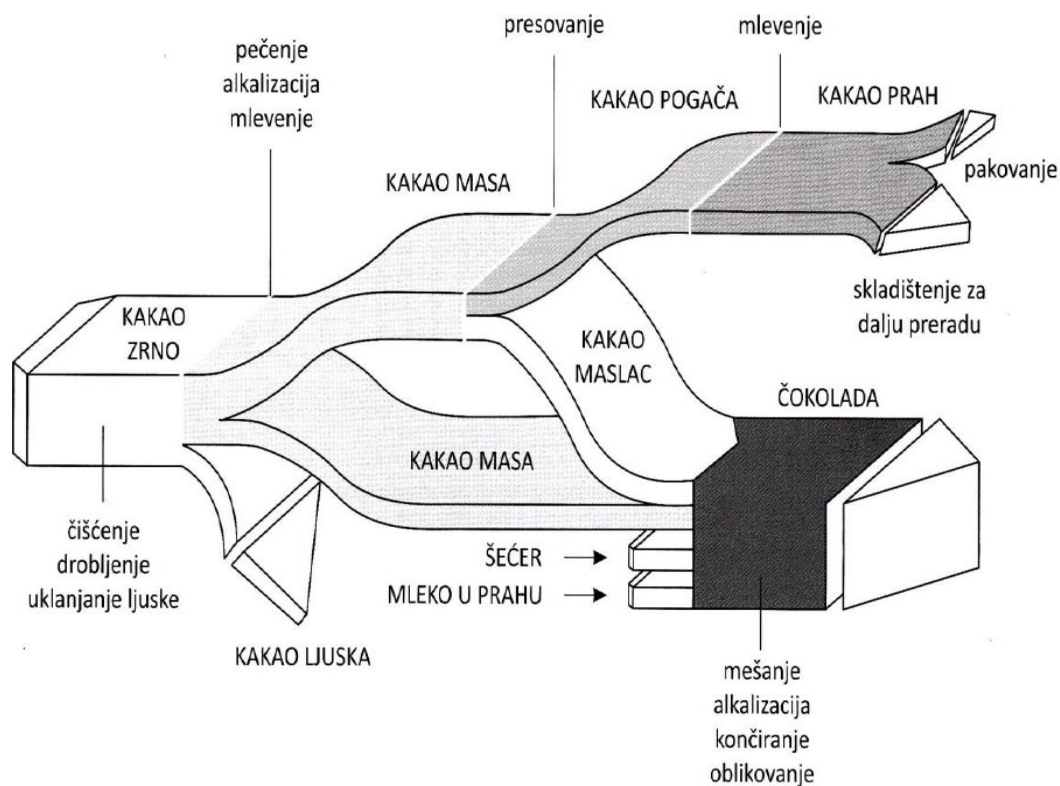
### **1.3 KAKAO PRAH I KAKAO PROIZVODI**

Konditorski proizvodi, a posebno kakao prah i čokolada, spadaju u grupu proizvoda koje konzumira široka populacija, naročito deca, tako da je, pored zdravstvene bezbednosti, veoma važna i njihova senzorna prihvatljivost (Betoret i sar., 2011; Pajin i sar., 2013). Njihov kvalitet uključuje različite fizičke karakteristike (veličina čestica, čvrstoća, mazivost, reološka svojstva) a koje su uslovljene primjenim procesom proizvodnje (Loncarevic i sar., 2016).

#### **1.3.1 Tehnološki postupak proizvodnje kakao praha i čokolade**

Tehnologija proizvodnje kakao praha i čokolade obuhvata postupke prerade kakao zrna (čišćenje, drobljenje, uklanjanje ljuske), proizvodnju kakao mase i kakao maslaca, proizvodnju i pakovanje kakao praha, proizvodnju čokoladne mase kao i proizvodnju i pakovanje čokolade (Slika 3) (Beckett, 2009).

Veoma česta pojava je da se u zemljama u kojima se gaji kakao zrno, ono i prerađuje do kakao mase. Na ovaj način se rešava problem promene vlage zrna tokom transporta i njegove potencijalne mikrobiološke kontaminacije. Proces prerade kakao zrna do kakao mase obuhvata čišćenje kakao zrna, termički tretman (pečenje) i uklanjanje ljuske (Pajin i sar., 2013).



Slika 3. Tehnološki postupak dobijanja kakao praha i čokolade (Vasiljevic, 2016)

Prva faza u proizvodnji kakao proizvoda jeste čišćenje kakao zrna (uklanjanje grubih i finih nečistoća, prašine). Potom sledi drobljenje koje ima za cilj dobijanje kakao loma odgovarajućih dimenzija bez izmene hemijskog sastava. Treća faza predstavlja odvajanje dobijenog kakao loma od kakao ljuske. Ovakva kakao zrna (kotiledoni) dalje se peku, melju i vrlo često alkalizuju u cilju dobijanja kakao mase. Naime, usitnjavanje kakao loma u cilju dobijanja kakao mase, u osnovi predstavlja razaranje ćelija kotiledona zbog oslobađanja kakao maslaca. Kakao maslac difunduje na površinu nemasnih kakao čestica čineći kakao masu stabilnom suspenzijom usitnjenog kakao jezgra (čestice manje od 40  $\mu\text{m}$ ) u kakao maslacu. Kakao masa ne sme sadržati više od 5% kakao ljuske i ne više od 10% ukupnog pepela.

Alkalizacija je veoma čest proces pri kome se usitnjena kakao zrna tretiraju alkalnim rastvorima soli da bi se postigla tamnija boja i ublažio gorko-kiseli ukus, kao i da bi se poboljšala svojstva dispergovanja u kakao napicima. Kiseli ukus koji potiče od fermentisanog kakao zrna se ublažava jednostavnom neutralizacijom pomoću rastvora alkalne soli. Pri procesu alkalizacije pH vrednost se povećava sa 5,2-5,6 na približno

neutralnu vrednost 6,8-7,5. Nastala smeša naziva se kakao masom koja se dalje koristi za proizvodnju kakao praha, odnosno čokolade.

U proizvodnji kakao praha, kakao masa podleže presovanju pri čemu se iz nje izdvaja kakao maslac, a sa ciljem formiranja kakao pogače koja se dalje melje do gotovog proizvoda. Ovakav kakao prah se može pakovati i smatrati finalnim proizvodom ili se skladištiti za dalju preradu u konditorskoj industriji.

Prilikom proizvodnje čokolade, kakao masi dodaju se šećer i mleko u prahu kako bi se dobila čokoladna masa koja se adekvatno meša, alkalizuje, končira (dugotrajno mešanje čokoladne mase sa ciljem razvoja aromatičnih materija (hemijske promene) i optimizacije osobina proticanja odnosno reološkog ponašanja (fizičke promene)) i oblikuje u krajnji proizvod.

Tabela 1. Sastav kakao praha, mlečne i crne čokolade (%)

sastojak	kakao prah	crna čokolada	mlečna čokolada
<b>kakao masa</b>	90	45	10
<b>kakao maslac</b>	10	5	25
<b>šećer</b>	0	50	45
<b>mleko u prahu</b>	0	0	20

## 1.4 HEMIJSKI SASTAV KAKAO PRAHA

Osnovni nutritivni sastojci kakao praha jesu svakako lipidi, ugljeni hidrati i proteini. U pogledu masno-kiselinskog sastava lipida najzastupljenije su oleinska (34 %) i stearinska kiselina (34 %), zatim palmitinska (27 %), a u manjoj meri su prisutne i linolna (3%) i linolenska kiselina (0,3 %) (Torres-Moreno i sar., 2015). Kakao prah se smatra brzim izvorom energije upravo iz razloga visokog udela prostih šećera (pre svega saharoze). S obzirom da kakao zrno može biti dobar izvor dijetnih vlakana, kakao prah se sve više ispituje na sadržaj lignana kojima se pripisuje pozitivan uticaj na smanjenje krvnog pritiska i holesterola u krvi (Sarria i sar., 2012). Od proteinskih struktura zastupljeni su: albumini, globulini, prolamini i glutenini. Oni često u kakao prahu mogu biti prisutni u obliku slabo rastvornih jedinjenja sa polifenolima (Bertazzo i sar., 2011).

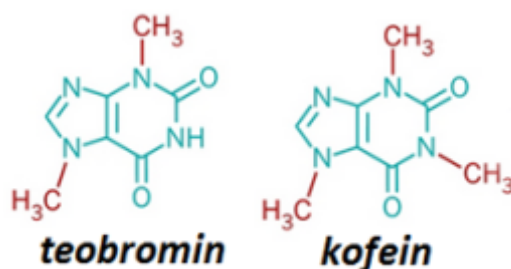
Pored makronutrijenata, kakao prah doprinosi dijetarnom unosu gvožđa, bakra, kalcijuma i fosfora kao i askorbinske kiseline i vitamina B grupe.

Kakao prah sadrži i čitav niz različitih biološki aktivnih supstanci koji ostvaruju brojna povoljna delovanja u ljudskom organizmu: metilksantini (teobromin i kofein), polifenolne strukture (flavonoidi i fenolne kiseline), biogeni amini, cijanidini, slobodne masne kiseline (Aprotosoai e sar., 2015).

Količina navedenih komponenti znatno zavisi od sorte i sastava kakao zrna, njegovog načina obrade, tehnološkog postupka proizvodnje, kao i vrste finalnog kakao proizvoda.

#### 1.4.1 Metilksantini kakao praha

Kakao prah predstavlja značajan dijetarni izvor purinskih alkaloida sa snažnim fiziološkim delovanjima – to su metilksantini, od kojih su najviše zastupljeni teobromin i kofein (Slika 4). Teobromin je dominantna ksantinska komponenta kakao praha, koja je svoj naziv i dobila po kakaou kao najvažnijem izvoru u prirodi.



Slika 4. Hemijska struktura metilksantina kakaoa

Teobromin je manje rastvoran u poređenju sa kofeinom tako da se on duže metaboliše u organizmu, sporije deluje te mu je potrebno duže vreme da dostigne maksimalni farmakološki efekat (Tarka, Jr., 1982). Teobromin poseduje blag stimulatívni efekat na centralni nervni sistem, dok je stimulatívni efekat kofeina daleko izraženiji (Cappelletti i sar., 2015). Metilksantini svoje povoljne fiziološke efekte ostvaruju i na nivou kardiovaskularnog, gastrointestinalnog, respiratornog i urinarnog sistema (Nehlig i sar., 1992; Spiller, 1998).

Količine navedenih purinskih alkaloida variraju u zavisnosti od vrste kakao proizvoda. Određivanje njihovog sadržaja ima i veliki značaj sa aspekta procene bezmasnih kakao delova kakao proizvoda, koji se mogu dovesti u vezu i sa drugim bioaktivnim jedinjenjima kakaoa (Richards i Wailes, 2012).

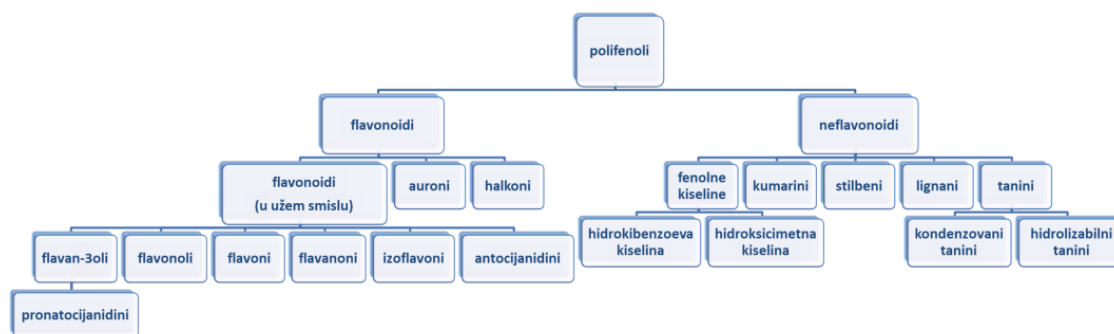
Sadržaj teobromina u prirodnom kakao prahu kreće se u opsegu 1,5 – 2%, dok je sadržaj kofeina oko tri puta niži. U čokoladi sa 60 % kakao-mase, sadržaj teobromina iznosi oko 0,9 %, dok mlečna čokolada sadrži između 0,15 i 0,20 % teobromina (Gavrilovic, 2003). Belščak i saradnici (Belscak i sar., 2009) su u svojim istraživanjima na različitim vrstama kakao proizvoda pokazali da su proizvodi sa višim sadržajem kakao-delova imali i veći udeo metilksantina.

#### **1.4.2 Polifenoli kakao praha**

Fenolna jedinjenja ili polifenoli predstavljaju najbrojniju i najrasprostranjeniju grupu biološki aktivnih supstanci u biljnom svetu. Do sada je otkriveno više od 8000 različitih polifenola. Oni su produkti sekundarnog metabolizma biljaka, a njihovo prisustvo u animalnim tkivima je posledica konzumiranja biljne hrane (Shahidi i Naczk, 2003).

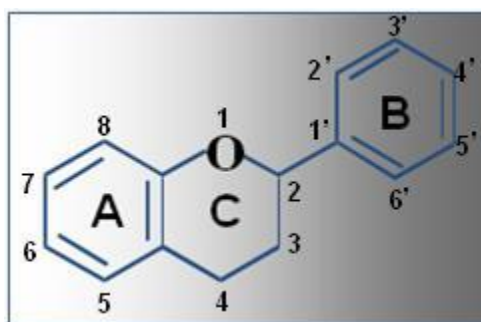
Biosinteza polifenola se odvija jednim od dva metabolička puta: put šikiminske kiseline i put malonske kiseline (acetogeninski put) (Bravo, 2009). Obe navedene kiseline potiču iz metabolizma glukoze u biljkama (Formica i Regelson, 1995).

Svi polifenoli se u osnovi mogu podeliti na flavonoide i neflavonoide (Slika 5). Sa dijetarnog aspekta, najznačajniji među njima iz klase flavonoida su flavan-3-oli, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini, a što se neflavonoida tiče to su derivati hidroksibenzoeve kiseline, derivati hidroksicimetne kiseline i stilbeni.



Slika 5. Klasifikacija polifenola (Jaganath i Crozier, 2009)

Flavonoidi su najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja u biljkama sa 15 atoma ugljenikovih atoma u osnovnoj C6-C3-C6 strukturi (Slika 6), od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C), a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva.

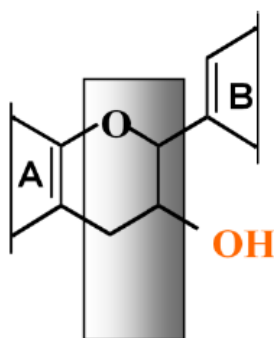


Slika 6. Osnovna hemijska struktura flavonoida

Flavan-3-oli su strukturno najkompleksnija podklasa flavonoida (Slika 7). Obuhvataju jedinjenja od jednostavnih monomera, katehina i njegovog epimera epikatehina, do oligomernih i polimernih proantocijanidina, koji se još nazivaju i kondenzovanim taninima. Za flavan-3-ole se često u literaturi može naći naziv flavanoli ili katehini, a zavisno od položaja prstena B i hidroksilne grupe na poziciji tri u odnosu na prsten C, mogu se javiti u dva epimerna oblika: (+)-katehin i (-)-epikatehin sa

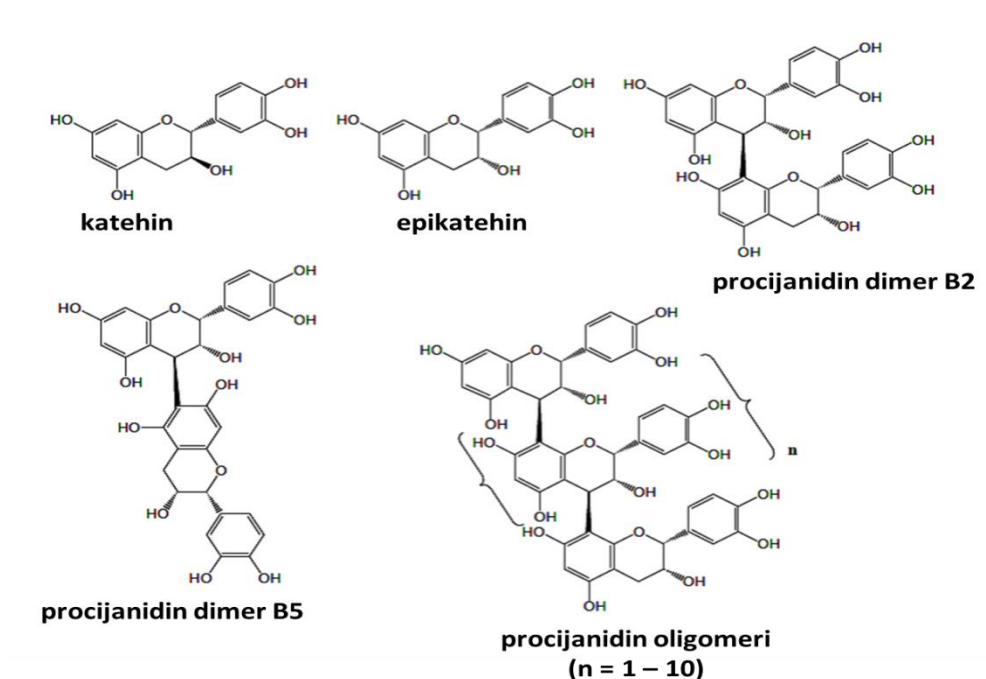
njihovim odgovarajućim derivatima. Flavan-3-oli podležu reakcijama hidroksilacije pri čemu nastaju (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin. Takođe, često učestvuju u esterifikaciji sa galnom kiselinom gradeći katehin galate, od kojih su najrasprostranjeniji (-)-epikatehin galat i (-)-epigalokatehin galat. Njihova veoma važna karakteristika je da grade polimere koji se nazivaju proantocijanidini ili kondenzovani tanini.

Proantocijanidini obično sadrže od 2 do 60 monomernih jedinica, koje su uglavnom povezane C8-C4 vezom. Ukoliko se broj monomernih jedinica kreće od 2-7, nazivaju se oligoproantocijanidini (Tsao, 2010). Prisustvo flavan-3-ola u hrani doprinosi formiranju određenih parametara kvaliteta kakvi su: gorčina, kiselost, slast, viskozitet, aroma i boja (Aron i Kennedy, 2008; Ribereau-Gayon i sar., 2006).



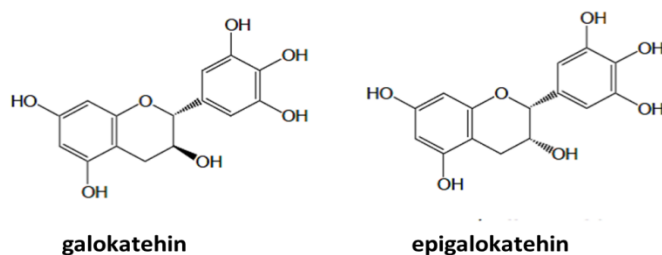
Slika 7. Opšta struktura flavan-3-ola

Istraživanja kakao polifenola sprovode se još od ranih pedesetih godina. Smatra se da oni značajno doprinose karakterističnom kakao ukusu i među prvima su identifikovani: katehini, proantocijanidini, antocijanini, i neke fenolne kiseline (Foryth, 1955). Naime, najzastupljenije polifenolne strukture su: flavan-3-oli (epikatehin i katehin) kao i njihovi oligomeri i polimeri (Slika 8). Kuplovanje (epi)katehinskih subjedinica se javlja prvenstveno između pozicija 4 i 8, ali mogu se uključiti i pozicije 4 i 6. Najvažniji kakao proantocijanidini su dimeri (B1, B2, B3, B4, B5), trimer (C1) i tetramer (A2) (Prior i Gu, 2005).



Slika 8. Osnovni flavan-3-oli kakao praha

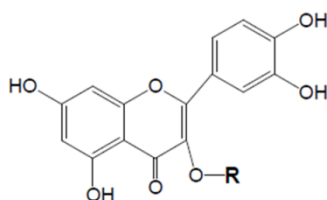
Pored navedenih osnovnih katehina, kakao prah je izvor i galokatehina i epigalokatehina (Slika 9), koji inače predstavljaju osnovne fenolne komponente čaja (Zeeb i sar., 2000).



Slika 9. Manje zastupljeni flavan-3-oli u kakao prahu

Flavonoidni profil kakao praha upotpunjava i prisustvo manjih količina flavonola kvercetina i njegovih glikozida (arabinozid, glukozid, galaktozid) (Slika 10) (Lamuela-Raventos i sar., 2001). Dodatno, Sanchez-Rabaneda i saradnici identifikovali su flavanon naringenin; flavone luteolin i apigenin i njihove glikozide (Sanchez i sar., 2003).



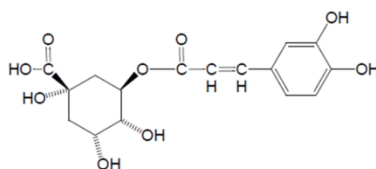


**kvercetin**

R = H, arabinoza, glukoza,  
galaktoza, glukuronska kiselina

Slika 10. Osnovni flavonol kakao praha

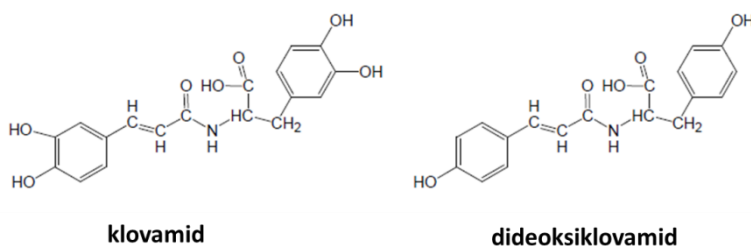
S obzirom da kotiledoni kakao semena obiluju fenolnim kiselinama, neke od njih opstaju tokom procesa prerade i sadržane su u finalnim kakao proizvodima (Jalal i Collin, 1977). Ovakvu osobinu pokazuju derivati hidroksicimetne kiseline, i to posebno hlorogenska kiselina (Slika 11).



**hlorogenska kiselina**

Slika 11. Neflavonoid kakao praha

U dosadašnjim *in vitro* ispitivanjima biološke aktivnosti kakao praha pokazano je da amidi hidroksicimetne kiseline sa aromatičnim aminokiselinama (klovamid i dideoksiklovamid) u pogledu antioksidativnog potencijala mogu da se porede sa gore opisanim polifenolnim jedinjenjima (Slika 12). Ova dva jedinjenja pripadaju grupi fenolnih struktura, većinski zastupljenih u crvenoj detelini (Tebayashi i sar., 2000).



**klovamid**

**dideoksiklovamid**

Slika 12. Amidi ruzmarinske kiseline prisutni u kakao prahu

Brojne su studije čiji je predmet istraživanja profilisanje i kvantifikovanje polifenola u različitim vrstama kakao proizvoda. Sadržaj polifenolnih komponenti kakao proizvoda, kako ukupnih tako i pojedinačnih značajno varira, i to zbog razlike u varijetetu (u nekim zrnima sadržaj ide i do 20%), geografskom poreklu, kultivaciji, načinu gajenja biljke i rukovanju sa plodovima posle branja (Niemenak i sar., 2006; Wollgast i Anklam, 2000b). Takođe, znatno zavisi od brojnih faktora tokom proizvodnog procesa kakao proizvoda ali i samih primenjenih metoda tokom određivanja. U Tabeli 2 sumirani su dosadašnji najznačajniji literaturni nalazi.

Tabela 2. Sadržaj polifenola kakao proizvoda u odnosu na primenjenu analitičku tehniku

<b>proizvod</b>	<b>ekstrakcija</b>	<b>metoda</b>	<b>sadržaj</b>	<b>referenca</b>
<b>kakao prah</b>	70 % metanol	Folin-Ciocalteu (galna kiselina)	15-32 mg/g ukupnih polifenola	(Belscak i sar., 2009)
<b>kakao prah</b>	70 % aceton	Folin-Ciocalteu (galna kiselina)	41,82 mg/g ukupnih polifenola	(Nsor-atindana i sar., 2012)
<b>kakao prah</b>	70:29,5:0,5 aceton/ voda/sirćetna kiselina	Folin-Ciocalteu (galna kiselina)	35,69 mg/g ukupnih flavan-3ola	(Miller i sar., 2009)
<b>kakao prah</b>	70:29,5:0,5 aceton/ voda/sirćetna kiselina	NP-HPLC-MS (epikatehin, katehin)	1,964-3,723 mg/g epikatehina i katehina	(Miller i sar., 2009)
<b>kakao prah</b>	70:29,5:0,5 aceton/ voda/sirćetna kiselina	NP-HPLC-DAD (epikatehin)	1,05-2,53 mg/g epikatehina	(Langer i sar., 2011)
<b>kakao masa</b>	50 % aceton	RP-HPLC-ESI/MS (epikatehin)	5,02 mg/g proantocijanidina	(Pedan i sar., 2016)
<b>crna čokolada</b>	voda	Folin-Ciocalteu (galna kiselina)	1,822 mg/g ukupnih polifenola	(Belscak-Cvitanovic i sar., 2012)
<b>mlečna čokolada</b>	voda	Folin-Ciocalteu (galna kiselina)	1,343 mg/g ukupnih polifenola	(Belscak-Cvitanovic i sar., 2012)

## 1.5 EFEKTI KAKAO PRAHA NA ORGANIZAM

Konзумiranje kakao proizvoda bilo je ranije često kritikovano zbog sadržaja masti i šećera, i njihova potrošnja (naročito čokolade) povezivana je sa pojavom akni, karijesa, gojaznosti, hipertenzije, bolesti koronarnih arterija i dijabetesa. Prema tome, mnogi lekari su upozoravali pacijente o potencijalnim zdravstvenim opasnostima od konzumiranja velikih količina kakao proizvoda. Međutim, nedavno otkrivanje biološki aktivnih fenolnih jedinjenja kakao praha promenilo je ovu percepciju i stimulisalo istraživanje njegovih efekata u starenju, poremećaju redoks ravnoteže, regulaciji krvnog pritiska, aterosklerozi. Kroz vreme kakao proizvodi bivaju ističani zbog svog izraženog antioksidativnog potencijala. Međutim, u mnogim studijama, kontradiktorni rezultati i zabrinutost oko metodoloških problema otežavaju zdravstvenim radnicima i javnosti da razumeju dostupne dokaze o uticaju kakao praha / čokolade na zdravlje.

Poslednjih godina kakao prah sve se češće nalazi na listi popularnih „funkcionalnih namirnica“ kojima se pripisuju povoljni biološki i zdravstveni efekti. Specifičan polifenolni profil uz prisustvo purinskih alkaloida omogućava fiziološke efekte kakao praha koji prevazilaze uobičajenu nutritivnu ulogu namirnica (Ackar i sar., 2013). Upravo ovakav sastav čini ovu namirnicu veoma interesantnom i od posebnog interesa kako sa prehrambenog tako i sa farmakološkog aspekta (Visioli i sar., 2009). Jedinstven hemijski sastav predstavlja polaznu tačku različitih istraživačkih pitanja u smislu biološkog delovanja pojedinačnih kakao jedinjenja ali i njihovih potencijalnih interakcija te posledičnih pojačanih ili oslabljenih efekata na zdravlje kakao praha kao punog matriksa. Rezultati dosadašnjih studija afirmativni su u kontekstu preventivnog delovanja kakao praha i njegovih aktivnih principa u smislu antioksidativnog i antimikrobnog potencijala, hepatoprotektivnog delovanja, zatim delovanja na rad kardiovaskularnog i nervnog sistema, dok su nalazi dobijeni u ispitivanjima anti-kancerogenih efekata kakao praha i dalje diskutabilni.

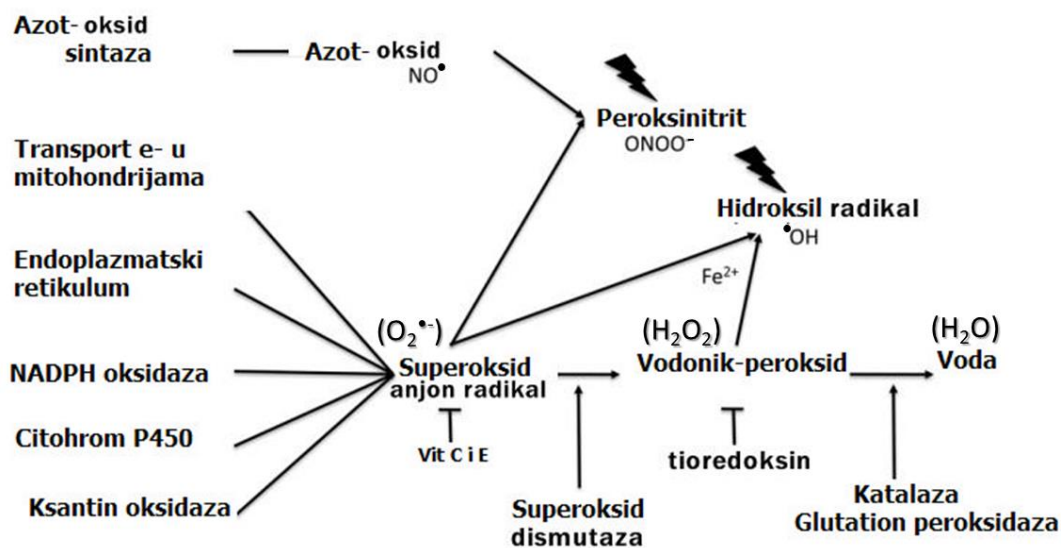
### 1.5.1 Redoks ravnoteža

Koncept postojanja ravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih procesa u ćeliji je centralan za razumevanje oksidativnog stresa iz više razloga. Prvo, naglašeno je da harmonija može biti poremećena promenama na bilo kojoj strani te ravnoteže;

abnormalnim generisanjem slobodnih kiseoničnih vrsta (*reactive oxygen species*, ROS) ili nekim nedostatkom u antioksidativnom odbrambenom mehanizmu. Iako su ROS prvi put privukli pažnju biologa kao potencijalno štetni nusproizvodi aerobnog metabolizma, kroz brojna istraživanja prepoznato je da oni igraju važne uloge u mnogim unutarćelijskim signalnim putevima i metaboličkim procesima (Droge, 2002; Zhang i sar., 2016). Ovaj koncept o ravnoteži ukazuje i na činjenicu da će odgovor na oksidativni stres biti gradiran. Dakle, manji poremećaji u ravnoteži se brzo popravljaju usled homeostatske adaptacije, dok veliki poremećaji u ravnoteži mogu dovesti do progresivne štete i smrti ćelije. Postoji mnogo potencijalnih izvora ROS, a njihov relativni doprinos zavisi od okolnosti u određenom sistemu. Kako je delovanje ROS često ograničeno difuzijom, efekti na ćelijsku funkciju su pre svega posledica delovanja na biomolekule u neposrednoj blizini. Ako se uzme u obzir raznovrsnost reaktivnih vrsta kiseonika, kao i njihovih potencijalnih ciljeva, može se postaviti pitanje koje su sve potencijalne biohemijske i patofiziološke posledice njihovih interakcija.

#### 1.5.1.1 Reaktivne kiseonične vrste

Pod terminom "reaktivne kiseonične vrste" obuhvaćeni su i slobodni radikali i njihovi ne-radikalni intermedijeri. Slobodni radikali se definišu kao hemijske vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, i baš ta nestabilna elektronska konfiguracija daje visoku reaktivnost ovim vrstama. Slobodni radikali se mogu generisati od mnogih hemijskih elemenata, ali u biološkim sistemima fundamentalni su oni koji nastaju od kiseonika ili azota (Slika 13).



Slika 13. Osnovne reaktivne kiseonične vrste, njihovo poreklo i putevi neutralizacije (modifikacija, (Burton i Jauniaux, 2011))

U fiziološkim uslovima, najčešći slobodni radikal kiseonika je superoksidni anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), pri čemu se mitohondrije smatraju njegovim glavnim izvorom (Cadenas i Davies, 2000). Prenos elektrona duž kompleksa respiratornog lanca nije potpuno efikasan, pa se dešava „curenje“ elektrona na molekularni kiseonik, posebno iz kompleksa I i III, što rezultira formiranjem  $O_2^{\bullet-}$ . Stopa formiranja  $O_2^{\bullet-}$  je veća ako postoji veći broj elektrona u lancu, na primer u uslovima povećane glukoze ( $> 6,1$  mmol/l) i usled povećanog prisustva kiseonika (Burton i Jauniaux, 2011). Paradoksalno, stvaranje  $O_2^{\bullet-}$  je povećano i u uslovima hipoksije, a to se objašnjava činjenicom da smanjena raspoloživost kiseonika, koji predstavlja konačni akceptor elektrona sa kompleksa IV, uzrokuje akumuliranje elektrona (Li i Jackson, 2002). Pri normalnim fiziološkim uslovima, ~2% kiseonika se pretvara u  $O_2^{\bullet-}$ , umesto da se redukuje do vode (Boveris i Chance, 1973). Zbog svog naelektrisanja,  $O_2^{\bullet-}$  ne može da prođe kroz membranu mitohondrija, i posledično ostaje u matriksu ove organele. Drugi izvori  $O_2^{\bullet-}$  pri fiziološkim uslovima uključuju delovanje enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (Raijmakers i sar., 2006). U patološkim uslovima, enzim ksantin-oksidaza ima dominantnu ulogu u formiranju  $O_2^{\bullet-}$ . Uloga ksantin-oksidaze je da degradira purine, ksantin i hipoksantin u mokraćnu kiselinu u fiziološkim uslovima, koristeći  $NAD^+$  kao elektronski akceptor. Međutim, pod hipoksičnim uslovima on se

proteolitički cepa do oksidovanog oblika koji pomaže prenosu elektrona na molekularni kiseonik (Raijmakers i sar., 2006).

Superoksidni anjon radikal se neutrališe delovanjem enzima, superoksid-dismutaze, koji ga konvertuje u vodonik-peroksid. Vodonik-peroksid nije slobodni radikal, pa je i manje reaktivan nego  $O_2^{\cdot-}$ . Međutim, i on potpada pod termin ROS, jer je blisko uključen u stvaranje i neutralizaciju slobodnih radikala. Pošto je nepolarna supstanca, sposobna je da difunduje kroz plazma membranu i membrane organela, a samim tim i deluje široko kao sekundarni glasnik u putevima prenosa signala. Vodonik-peroksid se, pak, detoksikuje odnosno pretvara u vodu delovanjem enzima katalaza i glutation-peroksidaza. Važno je da antioksidativni enzimi ne budu u koliziji, jer neuravnoteženost između superoksidnog anjon radikala i vodonik-peroksida može rezultovati formiranjem mnogo reaktivnijeg hidroksil radikala ( $\cdot OH$ ). Ova reakcija je katalizovana slobodnim fero jonima u Fentonovoj reakciji (Florence, 1984). Hidroksil radikal neselektivno oksiduje bilo koji biomolekul u njegovoj neposrednoj blizini i ima procenjeni poluživot od  $10^{-9}$  s.

Sa druge strane, prekomerna generacija superoksidnog anjon radikala može takođe dovesti do interakcije sa azotnim oksidom i do stvaranja peroksinitrita, koji je moćan prooksidans. Peroksinitrit ima sposobnost difuzije te može da deluje i na susedne ćelije (Pacher i sar., 2007).

#### 1.5.1.2 Sistemi antioksidativne zaštite

Sa ciljem održavanja ravnoteže između produkcije i eliminacije slobodnih radikala razvijeni su različiti sistemi koji predstavljaju zaštitu od oksidativnih oštećenja. Osnovni zadatak antioksidativne zaštite je sprečavanje i odlaganje oštećenja, ali i reparacija oštećenja ćelija i ćelijskih struktura već nastalih delovanjem slobodnih radikala. Sistem antioksidativne odbrane se može podeliti na enzimski i neenzimski (Birben i sar., 2012).

#### 1.5.1.2.1 Enzimski sistem antioksidativne zaštite

Svi enzimi odbrane imaju prelazni metal u svom aktivnom centru, sposoban da zauzme različita oksidativna stanja dok prenosi elektrone tokom procesa neutralizacije. Antioksidativni enzimi se mogu podeliti na:

- a) Primarne antioksidativne enzime - reaguju direktno sa prooksidativnim vrstama sprečavajući formiranje slobodnih radikala ili uklanjaju već stvorene slobodne radikale. Ovoj grupi pripadaju: superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GSH-Px), katalaza (CAT), i glutation-S-transferaza (GST).
- b) Sekundarne antioksidativne enzime - regenerišu molekule antioksidanasa malih molekulskih masa. Ovoj grupi pripadaju glutation-reduktaza (GR) i glukozo-6-fosfat-dehidrogenaza (G-6-PD).

Dve izoforme superoksid-dismutaze pretvaraju superoksidni anjon radikal u vodonik-peroksid i molekularni kiseonik; oblik sa manganom koji je ograničen na mitohondrije, i oblik sa bakrom i cinkom koji se predominantno nalazi u citoplazmi. To je jedini enzim koji reaguje direktno sa slobodnim radikalom i predstavlja prvu liniju odbrane protiv slobodnih radikala. Vodonik-peroksid se potom konvertuje do vode delovanjem katalaze ili glutation-peroksidaze. Katalaza je veoma reaktivan enzim koji razgrađuje  $H_2O_2$  nastao prilikom dismutacije  $O_2^{\cdot -}$  ili u reakcijama koje katalizuje ksantin-oksidaza, a kao proizvodi razgradnje nastaju voda i molekularni kiseonik („katalazna reakcija“).

Glutation-peroksidaza čini veću grupu enzima od kojih su najzastupljeniji: selen-zavisna glutation-peroksidaza, selen-nezavisna glutation-peroksidaza i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (Kutlu i Susuz, 2004). Ovi enzimi katalizuju redukciju  $H_2O_2$  do  $H_2O$ , kao i redukciju organskih hidroperoksida (ROOH) do odgovarajućih alkohola (ROH) uz prateću reakciju oksidacije glutationa. Dakle, aktivnost glutation-peroksidaze zavisi od prisustva redukovanog glutationa (GSH) jer se on ponaša kao donor vodonika.

Glutation-S-transferaza predstavlja familiju proteina koja katalizuje nukleofilni napad atoma sumpora iz glutationa na elektrofilne supstrate, te je osnovna uloga GST detoksikacija velikog broja jedinjenja: ksenobiotika, hepatičkih toksina, kancerogena,

epoksida i drugih potencijalno toksičnih supstanci. Pored enzimske, GST ima još i transportnu i sintetičku funkciju.

Tripeptid glutation je glavni ćelijski tiol redoks puffer, i sintetiše se u citoplazmi iz L-glutamata, L-cisteina i glicina. GSH učestvuje u velikom broju reakcija detoksikacije, pri čemu formira glutation-disulfid, koji se konvertuje nazad u GSH dejstvom glutation-reduktaze uz utrošak NADPH (Nicol i sar., 2000).

Osnovna uloga glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze je kataliza oksidacije glukoza-6-fosfata u 6-fosfoglukonolakton čime započinje pentozo fosfatni put, u kome nastaju pentoze koje su prekursori nukleinskih kiselina i svih nukleotidnih koenzima. Oksidacijom glukoza-6-fosfata regeneriše se i NADPH neophodan za različite reakcije biosinteze i detoksikacije u organizmu.

Aktivnost antioksidativnih metalo-enzima zavisi od unosa odgovarajućih mikroelemenata, gvožđa, bakra, cinka, selena, mangana hranom i od njihovog statusa u organizmu.

#### *1.5.1.2.2 Neenzimski sistem antioksidativne zaštite*

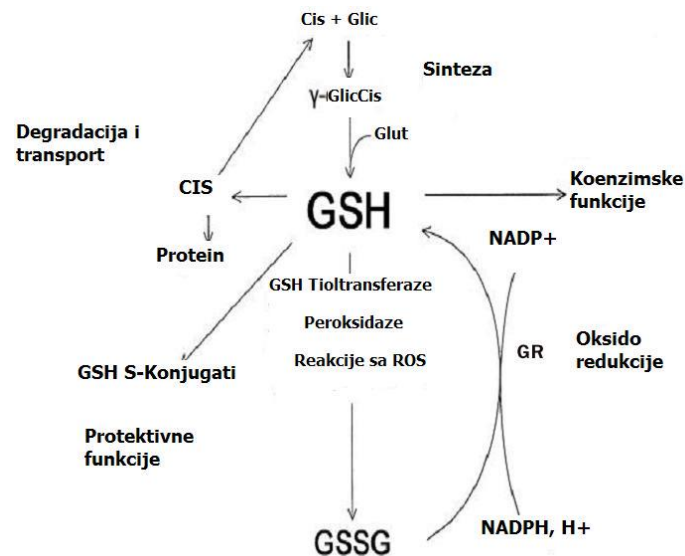
Neenzimski antioksidansi se prema poreklu mogu podeliti na endogene i egzogene (dijetarne antioksidanse). Endogeni antioksidansi imaju ključnu ulogu u održavanju normalnih ćelijskih funkcija i opšteg zdravlja organizma. Međutim, usled brojnih uticaja spoljašnje sredine, veoma često antioksidativni potencijal endogenih molekula opada, te je dijetarni unos antioksidanasa neophodan za normalno funkcionisanje organizma. Procenjuje se da bi više od dve trećine slučajeva kancera, nastalih kao posledica mutacije gena, moglo biti sprečeno promenom navika u ishrani, što podrazumeva povećani unos hrane bogate prirodnim antioksidansima (Ratnam i sar., 2006). Neenzimska zaštita od slobodnih radikala obuhvata:

- a) visokomolekularne antioksidanse – metaloproteini koji imaju sposobnost da spreče stvaranje slobodnih radikala tako što vezuju slobodne jone metala u forme koje im onemogućavaju katalitičko delovanje. Najvažniji metaloproteini koji regulišu nivo gvožđa i bakra u ćeliji su transferin, feritin i ceruloplazmin.



- b) niskomolekularne antioksidanse - heterogena grupa supstanci u koju se ubrajaju glutacion, askorbat (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), vitamin A, koenzim Q10 i različiti produkti sekundarnog metabolizma biljaka.

Glutacion je tripeptid ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicin - GSH) koji se nalazi u citoplazmi, jedru i mitohondrijama i predstavlja glavni endogeni antioksidans u ćelijama. Osnovno mesto sinteze glutaciona u organizmu je jetra. Uloge glutaciona u ćeliji su sledeće: deluje kao koenzim i učestvuje u transportu aminokiselina; učestvuje u metabolizmu i održavanju tiolnih grupa proteina i niskomolekulskih jedinjenja kao što je koenzim A; regeneriše askorbinsku kiselinu i održava je u redukovanom obliku; učestvuje u formiranju dezoksiribonukleotida; vrši detoksikaciju enzimskim putem (GST) ili neenzimskim putem u reakciji sa toksičnim jedinjenjima pri čemu nastaju GSH-konjugati; štiti organizam od oksidativnih oštećenja, pri čemu neenzimski reaguje sa reaktivnim kiseoničnim vrstama ili učestvuje u razgradnji peroksida kao supstrat glutation-peroksidaze (Anderson, 1998) (Slika 14).



Slika 14. Metabolizam i osnovne funkcije glutaciona

Legenda: GSH – glutacion; GSSG – oksidovani glutacion; Cis – cistein; Glic – glicin; Glut – glutamat; GR - glutation-reduktaza; NADP<sup>+</sup> – nikotinamid dinukleotid fosfat; NADPH - redukovani nikotinamid dinukleotid fosfat

Odnos redukovanog i oksidovanog oblika glutaciona (GSH/GSSG) je jedan od osnovnih indikatora oksidativnog stresa u ćeliji.

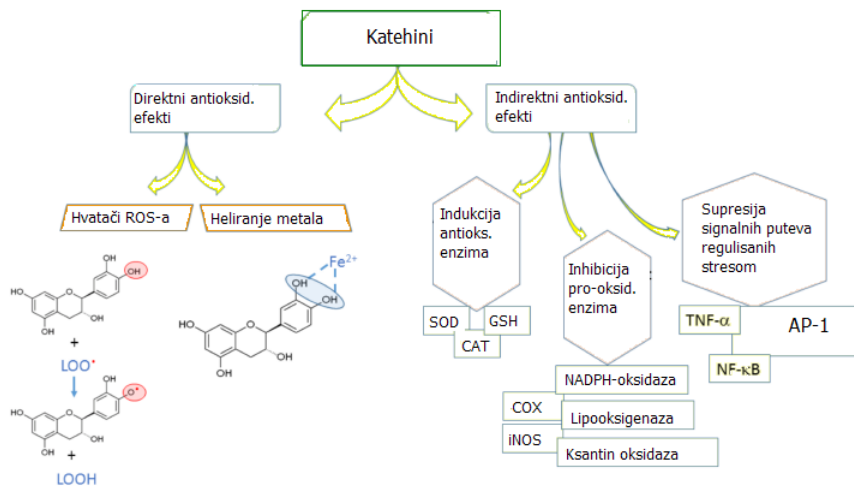
Vitamin C (L-askorbinska kiselina) je esencijalni mikronutrijent i pripada grupi hidrosolubilnih vitamina. Askorbat ima izražena antioksidativna svojstva koja se u slučaju lipidne peroksidacije iskazuju doniranjem jednog elektrona lipidnom radikal, u cilju prekidanja lančane reakcije, pri čemu nastaje askorbat radikal. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) i vitamin A su efikasni liposolubilni antioksidansi koji funkcionišu tako što prekidaju lanac lipidne peroksidacije u plazma membrani i LDL česticama. Aktivnost sva tri antioksidativna vitamina zavisi od unosa hranom i statusa u organizmu.

Koenzim Q10 je jedinjenje iz grupe ubihinona. Posедуje fenolnu strukturu koja mu omogućava antioksidativnu aktivnost. Neophodan je deo mitohondrijalnog elektron-transportnog lanca u kome služi kao nosač elektrona i protona. Koenzim Q10 se sintetiše u organizmu i unosi hranom, što postaje značajno sa godinama, obzirom da starenjem njegova produkcija u organizmu opada.

Polifenoli su najbrojniji sekundarni metaboliti biljaka i utvrđeno je da imaju jak antioksidativni potencijal. Široko su rasprostranjeni u voću i povrću te im se pripisuje paleta bioloških efekata, računajući i hvatanje slobodnih radikala.

#### *1.5.1.2.2.1 Antioksidativna aktivnost kakao praha*

S obzirom da kakao prah obiluje polifenolnim strukturama i to pre svega flavan-3-olima odnosno katehinima, na Slici 15 sistematizovana su delovanja ovih jedinjenja u pogledu antioksidativne aktivnosti. Naime, oni mogu ispoljiti svoju antioksidativnu aktivnost direktnim mehanizmima kao što su „čišćenje“ ROS i heliranje metalnih jona ili putem indirektnih mehanizama koji uključuju: aktivaciju antioksidativnih enzima, inhibiciju prooksidativnih enzima i modulaciju interakcija receptora i liganada kojima otpočinju brojni signalni putevi inflamacije, a čiji je okidač oksidativni stres (Fan i sar., 2017; Fraga i sar., 2010; Youn i sar., 2006).



Slika 15. Antioksidativna aktivnost flavan-3-ola (katehina) (modifikacija, (Bernatoniene i Kopustinskiene, 2018))

Legenda: ROS – reaktivne kiseonične vrste; SOD - superoksid-dismutaza; CAT – katalaza; GSH – glutation-peroksidaza; NADPH - nikotin amid adenin dinukleotid fosfat; COX – ciklooksigenaza; iNOS – inducibilna azot oksid-sintaza; TNF - faktor nekroze tumora, NF – nuklearni faktor; AP – aktivator protein

Sve je više primarnih referenci koje svedoče o aktuelnosti ispitivanja *in vivo* antioksidativne aktivnosti kakao praha. Pokazano je da akutni unos 900 mg kakao flavan-3-ola doprinosi povećanju ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme, ali da ova količina nije dovoljna da se suprotstavi povećanom formiranju ROS usled intenzivne fizičke aktivnosti (Decroix i sar., 2017). Davison i saradnici pokazali su da konzumacija 100 g komercijalne crne čokolade sa 70 % kakao delova 2 h pre intenzivnog vežbanja doprinosi značajnom povećanju antioksidativnog kapaciteta plazme ali i smanjenju (na nivou trenda) koncentracije  $\text{F}_2$  izoprostana (marker lipidne peroksidacije) (Davison i sar., 2012). Dvonedeljna dijetarna intervencija sprovedena na profesionalnim biciklistima ukazala je da svakodnevni unos 40 g crne čokolade doprinosi značajnom smanjenju lipidne peroksidacije i koncentracije oksidovanih LDL čestica (Allgrove i sar., 2011).

Sa druge strane, veoma je važno napomenuti i potencijalni doprinos metilksantina ukupnom antioksidativnom potencijalu kakao praha. Konačni proizvod katabolizma purinskih alkaloida u organizmu jeste mokraćna kiselina (Glantzounis i sar., 2005). U ranijim studijama ispitivano je i potvrđeno da mokraćna kiselina ima

sposobnost direktnog uklanjanja hidroksil radikala, kao i sposobnost inhibicije oksidativnih oštećenja DNK molekula (Cohen i sar., 1984). Takođe, zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi, mokraćna kiselina može vezati jone gvožđa ili bakra što rezultira čuvanjem i potenciranjem antioksidativne aktivnosti askorbata.

### **1.5.2 Antimikrobna aktivnost kakao praha**

Rezistencija na antimikrobne agense postaje sve važniji globalni problem. Od 2 miliona ljudi koji godišnje steknu intrahospitalnu bakterijsku infekciju, u 70% slučajeva infekcija je izazvana sojem koji je rezistentan na najmanje jednu grupu antibiotika. Najveći razlog za brigu je meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), koji danas predstavlja 50% izolata *S. aureus*-a (Gurusamy i sar., 2013). Značajna ulaganja i ozbiljna istraživanja u oblasti antiinfektivnih agenasa sve su više potrebna kako bi se izbegla velika kriza u oblasti javnog zdravlja. Sa tim u vezi moguća su dva pristupa: strukturno modifikovati već postojeće hemoterapeutike ili razviti nove antimikrobne supstance koje deluju na potpuno druga ciljna mesta u odnosu na trenutno raspoložive. Ovo predstavlja izuzetno veliki izazov, te pokušaji u otkrivanju efikasnih i netoksičnih antimikrobnih agenasa veoma često usmeravaju istraživanja prema ekstraktima i etarskim uljima različitih biljaka.

Samonikle biljke pružaju ogromnu mogućnost i predstavljaju bogatu bazu za izolovanje biomolekula koji ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Nove supstance prirodnog porekla pružaju različite modele hemijskih struktura potencijalnih antibiotika. Otkrivanje i razvoj novih antibiotika su neophodni zbog stalne borbe mikroorganizama i lekova, česte i brze pojave rezistencije. Pored istraživanja retkih i endemičnih biljaka, intenzivan je i rad na proveru efikasnosti nekih biljnih lekova koji se vekovima koriste kod infektivnih bolesti. Ovakav pristup pruža nove podatke o sastojcima koji su nosioci antimikrobne aktivnosti ili načinu pripreme efikasnih terapijskih sredstava. Konkretna primena biljnih lekova u terapiji bolesti prouzrokovanih patogenim mikroorganizmina nema veći značaj zbog nedovoljnog broja podataka o *in vivo* efektima, ali i zbog činjenice da je aktivnost prirodnih supstanci srednjeg ili slabog intenziteta. Biljni lekovi se koriste, uglavnom, kao antiseptici i za profilaksu infektivnih bolesti. U tom pogledu njihova primena može da ima sasvim zadovoljavajući efekat.

Biljke poseduju skoro neograničenu sposobnost sinteze hemijski raznovrsnih niskomolekularnih jedinjenja, kroz različite biosintetske puteve svog sekundarnog metabolizma. Sinteza ovih supstanci, često, predstavlja mehanizam odbrane i odgovor biljke na napad različitih patogena i pojavu infekcije (fitoaleksini). Ako u biljci imaju ovakvu ulogu, može se očekivati da istu ispolje i u *in vitro* uslovima. Ipak, kao što je i napomenuto, ekstrapolacija ka *in vivo* efikasnosti nije tako jednostavna, pa zato i nema puno biljnih lekova potvrđene efikasnosti i opravdane primene kod infektivnih oboljenja. Takođe, i pored intenzivnih istraživanja viših biljaka, farmaceutska industrija nije otkrila potentno, netoksično jedinjenje širokog antimikrobnog spektra koje bi vredelo dalje transformisati radi dobijanja novog antibiotika (Lewis i Ausubel, 2006).

Istraživanja tokom poslednjih decenija definisala su najvažnije sastojke biljaka koji poseduju izvesnu antimikrobnu aktivnost, te su upravo oni odgovorni za određenu delotvornost biljnih droga. Potvrđeno je da antimikrobnu aktivnost poseduju brojni polifenolni sastojci biljaka (flavonoidi, fenolne kiseline, lignani, hinoni, tanini, kumarini), terpenoidi i etarska ulja, alkalodi, lektini, polipeptidi, poliacetileni, masne kiseline, pa čak i neki jednostavni šećeri ili organske kiseline (Cowan, 1999).

Do danas u pogledu antimikrobne aktivnosti, najdetaljnije su ispitivana etarska ulja (kao smeše), odnosno pojedinačni sastojci etarskih ulja (Swamy i sar., 2016). Poslednjih dvadesetak godina, intenzivirano je ispitivanje flavonoidnih jedinjenja. Vekovima, preparati koji sadrže flavonoide, kao osnovne fiziološke aktivne komponente, korišćeni su za lečenje različitih infekcija. Na primer, lekovita svojstva propolisa (ili 'tzori' na Hebrejskom) pokazana su još u Starom zavetu, a postoje i dokazi da je ovaj balzam i Hipokrat propisivao (460-377 pne) u drevnoj Grčkoj za lečenje rana i ulkusa. Antimikrobna svojstva propolisa pripisuju se visokom sadržaju flavonoida, a posebno prisustvu galangina i pinocembrina (Bosio i sar., 2001).

Mnoge istraživačke grupe su otišle korak dalje, i urađena je izolacija i identifikacija tačne strukture flavonoida odgovorne za antibakterijsko delovanje. Primeri takvih flavonoida su epikatehin, apigenin, galangin, pinocembrin, ponciretin, genkvanin, soforaflavanon G i njegovi derivati, naringin i naringenin, epigalokatehin galat i njegovi derivati, luteolin i luteolin 7-glukozid, kvercetin, 3-O-metilkerketin i razni kvercetin

glikozidi, kampferol i njegovi derivati. Neki istraživači su opisali sinergizam između prirodnih flavonoida i/ili drugih antibakterijskih agenasa.

Dve studije pokazuju i antibakterijsko delovanje flavonoida *in vivo*. U Ramesovoj (Ramesh, 1996), oralna administracija 142,9 mg/kg kvercetrina kod zamoraca sa indukovanom šigela infekcijom dovela je do njihove zaštite. Dastidar i saradnici (Dastidar i sar., 2004) opisali su da intraperitonealno ubrizgavanje 1,58 mg/kg soforaisoflavon A ili 3,16 mg/kg 6,8-diprenilgeniestina dovodi do značajne protekcije miševa zaraženih sojem *Salmonella tiphimurium*.

Mehanizam antimikrobne aktivnosti dokazan je samo za neke flavonoidne strukture: epikatehin, soforaflavon G i epigalokatehin galat inhibiraju funkciju citoplazmatske membrane bakterija; kvercetin inhibira DNK girazu; likohalkoni A i C inhibiraju energetske metabolizam (Cushnie i Lamb, 2005).

S obzirom da su još drevni Asteci koristili kakao zrno kao izvor antibakterijskih supstanci u lečenju oboljenja creva, javlja se opravdano istraživačko pitanje da li biološki aktivna jedinjenja kakao praha i kako ispoljavaju antimikrobna svojstva (Dillinger i sar., 2000). Radovi na temu antimikrobnog delovanja kakao praha retki su u literaturi (Atikah i sar., 2016; Bubonja-Sonje i sar., 2011). Može se primetiti da dobijeni rezultati zavise od vrste korišćenih sojeva mikroorganizama, tipa kakao ekstrakta kao i stepena obrađenosti kakao praha i da do sada još uvek nisu izvedeni zaključci o praktičnim mogućnostima korišćenja ovog biljnog materijala kao antimikrobnog agensa.

Nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim flavon-3-oli, dominantne polifenolne strukture kakao praha, interferiraju sa plazma membranom, ali u opticaju su dve teorije. Prvo, katehini mogu direktno prodirati kroz lipidni dvosloj, narušiti ga i na kraju ometati barijernu funkciju. Alternativno, katehini mogu izazvati membransku fuziju, proces koji rezultuje „curenjem“ intramembranskih materijala i njihovom agregacijom. Dodatno je pokazano da je ova membranska fuzija izazvana epigalokatehin-galatom znatno manja ukoliko membrana sadrži negativno naelektrisane lipide. Stoga se niska osetljivost Gram-negativnih bakterija prema katehinima bar delimično može pripisati prisustvu lipopolisaharida u njihovoj membrani. Drugi potencijalni mehanizam antimikrobnog delovanja flavonoida je inhibicija DNK-giraze.

Naime, oni deluju vezujući se za  $\alpha$ -subjedinicu ovog enzima, a njegova osnovna uloga je da uvodi negativne supernavoje u molekul DNK uz utrošak ATP čime se obezbeđuje održavanje visoko konzervirane 3-D strukture bakterijskog hromozoma (Cushnie i Lamb, 2005).

Prilično često, biljni ekstrakti koji sadrže flavonoide, imaju prisutne i metilksantine. Kombinacija flavonoida i metilksantina je upravo zastupljena u kakao prahu, te se opravdano nameće pitanje da li antimikrobna aktivnost kakaoa potiče i od ovih biljnih agenasa. U studiji (Raj i Dhala, 1965) brojni mikroorganizmi bili su eksponirani različitim koncentracijama metilksantina, i pokazano je da većina organizama može dobro tolerisati koncentraciju metilksantina nižu od 2500 jig/ml. Naime, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. lutea*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *A. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *S. disenteriae*, *P. vulgaris* i *S. schottmuelleri* su bili potpuno inhibirani, dok su se *S. piogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i gljivica *C. albicans* pokazali potpuno neosetljivim na koncentracije metilksantina nižim od 5000 jig/ml. Kofein je pokazao veću efikasnost od teofilina i teobromina, a kofein-citrat veću efikasnost od samog kofeina.

Na osnovu rezultata odgovarajućih studija, ima indicija da je antimikrobno delovanje kofeina zasnovano pre svega na ometanju sinteze RNK patogenih bakterija (Sledz i sar., 2015). Međutim u istraživanju urađenom na *E. coli*, kofein je dominantno ometao sintezu DNK patogena, tako što je uticao na preuzimanje timidina i njegovu konverziju do deoksitimidin trifosfata (dTTP). Dodatno, kofein je imao uticaj i na sledeće enzime: purin nukleozid fosforilazu, DNK polimerazu i endonukleazu (Sandlie i sar., 1980). Slično tome, Labe i Nolan (Labbe i Nolan, 1987) navode da kofein inhibira inkorporaciju [<sup>14</sup>C] adenina, [<sup>14</sup>C] timidina i <sup>14</sup>C-obeležene aminokiseline kod bakterije *Clostridium perfringens*.

### **1.5.3 Hepatoprotektivno delovanje kakao praha**

Jetra se često naziva laboratorijom organizma. Ona ima ključnu ulogu u metabolizmu. Pored toga, jetra reguliše detoksikaciju i izlučivanje mnogih endogenih i

egzogenih jedinjenja pa svaka povreda ili oštećenje njenih funkcija može dovesti do ozbiljnih posledica po zdravlje (Subramaniam i sar., 2015).

Različita biološki aktivna jedinjenja ispitivana su u smislu hepatoprotektivnog delovanja: polifenoli, karotenoidi, terpenoidi (Abou Seif, 2016) i sugerije se da su njihovi mehanizmi hepatoprotekcije složeni. Naime, iako pokazuju hepatoprotektivno delovanje usled izraženog antioksidativnog potencijala, postoje i druge komponente hepatoprotekcije, kao što su imunomodulatorni, antivirusni (Wiert i sar., 2005) i antiinflamatorni efekat (Sandur i sar., 2007).

Značajnu ulogu u hepatoprotektivnom delovanju kakao praha, pored polifenolnih jedinjenja, ima i metilksantinska komponenta kofein. Rezultati većeg broja studija ukazuju da unos ovog purinskog alkaloida značajno doprinosi smanjenju prevalencije hroničnih oboljenja jetre (Shimazu i sar., 2005; Tverdal i Skurtveit, 2003). Takođe, hepatoprotektivno delovanje kofeina potvrđeno je i od strane Modi i saradnika (Modi i sar., 2010), u smislu inverzne povezanosti unosa kofeina i razvoja napredne fibroze, naročito kod pacijenata sa HCV (*hepatitis C virus*) infekcijom.

Ćelije jetre poseduju niz kompenzatornih mehanizama koji su usko povezani sa prometom reaktivnih vrsta kiseonika u organizmu. Neki od njih su indukcija antioksidativnih enzima (SOD, GSH-Px, CAT, GST), pa se stoga opisano antioksidativno delovanje nalazi u osnovi hepatoprotektivnih efekata kakao praha. U studiji, koju su sproveli Giacometti i saradnici (Giacometti i sar., 2016) ispitivana je hepatoprotektivna aktivnost kakao praha i epikatehina, kao glavnog antioksidativnog molekula, kod ženki BALB/cN miševa kod hepatične nekroze izazvane karbon-tetrahloridom (CCl<sub>4</sub>). Saopšteni rezultati sugeriju da je tretman epikatehinom i posebno suplementacija kakao prahom prouzrokovala povećanje aktivnosti mitohondrijalne superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze i katalaze, kao i sadržaj ukupnih proteinskih tiola u poređenju sa kontrolom. Dodatno, kakao prah, kao pun matriks, obezbedio je bolju hepatoprotekciju u poređenju sa epikatehinom.

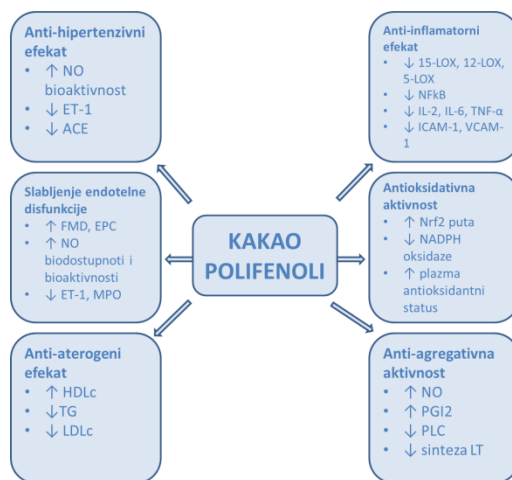
#### **1.5.4 Kardiovaskularni sistem i kakao prah**

Dugo je u naučnoj zajednici vladala zabrinutost u pogledu efekata metilksantina (naime kofeina) na nivou kardiovaskularnog sistema. Međutim, naučno mišljenje



Evropske agencije za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority, EFSA*) iz 2015. godine je da doza kofeina do 200 mg (oko 3 mg/kg telene mase za odrasle od 70 kg) ne izaziva zabrinutost u pogledu bezbednosti. Dodatno, nalazi studija ukazuju da štetnog delovanja nema kod umerenog unosa metilksantina, i da metilksantini poseduju vazodilatatorne efekte i uzrokuju poboljšanje mikrocirkulacije (Monteiro i sar., 2016). Ovi efekti posredovani su povećanjem nivoa cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) i inhibicijom aktivnosti fosfodiesteraze (Riksen i sar., 2011). Kardioprotektivnom efektu kakao praha doprinosi i teobromin delujući na nivo lipoproteinskih čestica u plazmi, i to: povećavajući nivo lipoproteina visoke gustine (HDL), a smanjujući nivo lipoproteina niske gustine (LDL) (Neufingerl i sar., 2013). Upravo specifičnost sastava i količine purinskih alkaloida, izdvaja kakao od ostalih metilksantinskih droga i čini ga sve više interesantnim predmetom istraživanja kako animalnih tako i humanih studija.

Kardioprotektivne osobine kakao praha podrazumevaju aktivnost njegovih polifenolnih komponenti i one uključuju: antioksidativnu, anti-hipertenzivnu, anti-aterogenu i anti-inflamatornu aktivnost, inhibiciju aktivacije i agregacije trombocita, kao i slabljenje endotelne disfunkcije (Slika 16).



Slika 16. Kardioprotektivni efekti kakao polifenola

Legenda: ACE – angiotenzin konvertujući enzim; EPC – endotelne progenitorske ćelije; ET-1 endotelin 1; FMD – dilatacije usled protoka; HDLc – HDL holesterol; ICAM – intraćelijski adhezioni molekul; IL – interleukin; LDLc – LDL holesterol; LOX – lipooksigenaza; LT – leukotrieni; MMP-2 – matriksne metaloproteinaze; MPO – mijeloperoksidaza; NADPH – redukovani nikotin amid dinukleotid fosfat; NF – nuklearni faktor; NO – azot oksid; Nrf2 – nuklearni faktor; PGI2 – prostaglandin I2; PLC – fosfolipaza C; TG – trigliceridi; TNF – faktor nekroze tumora; VCAM – vaskularni adhezioni molekul; XO – ksantin-oksidaza

#### 1.5.4.1 Antioksidativna aktivnost

Oksidativni stres je aktivno uključen u patogenezu bolesti kardiovaskularnog sistema. Povećana koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), uglavnom superoksid anjon radikala, utiče na metabolizam azot monoksida (NO) i pospešuje endotelnu disfunkciju (Franzini i sar., 2012). U eksperimentalnim modelima na životinjama, dokazano je da dugoročna suplementacija kakaom rezultira značajnim povećanjem ukupnog antioksidantnog kapaciteta plazme (Keen i sar., 2002). Sa druge strane, neke studije sprovedene na zdravim humanim subjektima nisu otkrile promene u biomarkerima oksidativnog stresa usled konzumiranja kakao praha. Može se pretpostaviti da antioksidativni efekti kakao proizvoda bivaju bolje izraženi u patološkim uslovima (Jalil i Ismail, 2008). Takođe, teško je dokazanu *in vitro* antioksidativnu aktivnost kakao praha potvrditi u *in vivo* uslovima. Razlog za to može biti loša bioraspoloživost i niska koncentracija kakao polifenola u plazmi, te se pretpostavlja da kakao polifenoli češće posredno deluju kao antioksidansi kroz interakcije sa enzimima povezanim sa metabolizmom prooksidanasa i

kardiovaskularnim bolestima (NADPH-oksidge, lipoksigenaze, mijeloperoksidaze) (Fraga i sar., 2010; Habauzit i Morand, 2012).

#### 1.5.4.2 Anti-inflamatorna aktivnost

Bolesti kardiovaskularnog sistema se, između ostalog, smatraju inflamatornim bolestima; one uključuju zapaljenske i imunološke reakcije (Goya i sar., 2016). Na ćelijskim kulturama, kakao ekstrakti sa sadržajem ukupnih polifenola 5-100 g/mL, i sadržajem ukupnih katehina (25 g/mL) inhibiraju proizvodnju inflamatornih citokina (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), ali i ekspresiju inducibilne NO-sintaze (iNOS) narušavajući signalni put NF- $\kappa$ B. U zavisnosti od doze, oni smanjuju i aktivnost 15-lipooksigenaze (15-LOX), 12-LOX i 5-LOX (Rimbach i sar., 2009). Konzumiranje kakao proizvoda bogatih flavan-3olima (446 mg flavanola/dan) značajno je smanjilo ekspresiju vaskularnog adhezionog molekula 1 (VCAM-1) kod žena sa postmenopauznom hiperholesterolemijom. Takođe, kod pacijenata sa visokim kardiovaskularnim rizikom, unos čokolade bogate polifenolima (495 mg ukupnih polifenola) prouzrokovao je smanjenje nivoa intercelularnog adhezionog molekula 1 (ICAM-1). Međutim, kod gojaznih odraslih osoba sa rizikom od insulinske rezistencije ili kod pacijenata sa hiperholesterolemijom, unos 300-900 mg flavan-3ola/dan nije doveo do promena nivoa ICAM-1 i VCAM-1 (Lee i sar., 2008). Ovi kontradiktorni podaci mogu se objasniti različitim dozama polifenola, ali i veoma raznolikim i kompleksnim patofiziološkim stanjima pacijenata, uključujući i inflamatornu sliku.

#### 1.5.5 Kancer i kakao prah

Brojne epidemiološke studije pokazale su da redovni unos hrane bogate antioksidansima, kao što su voće i povrće, doprinosi smanjenju učestalosti različitih vrsta karcinoma. Stoga se može pretpostaviti da i konzumacija kakao proizvoda koji imaju visoku antioksidativnu aktivnost, može biti korisna u inhibiciji kompleksnih molekularnih procesa zastupljenih u razvoju karcinoma (Weisburger, 2001). Kakao prah, sa svojom jedinstvenom kombinacijom flavonoida i metilksantina, poseduje

značajan antiproliferativan uticaj na rast humanih ćelija karcinoma (Jourdain i sar., 2006; Okano i sar., 2008).

Generalno, potencijalni mehanizmi delovanja kakao praha u procesu karcinogeneze uključuju modulaciju redoks statusa i više ključnih elemenata u signalnim putevima koji se odnose na proliferaciju ćelija, diferencijaciju, apoptozu, zapaljenje, angiogenezu i metastaze. Studije izvedene na životinjama pokazale su da kakao i njegove aktivne komponente mogu sprečiti i/ili usporiti inicijaciju i progresiju različitih vrsta karcinoma kao što je kancer prostate, jetre, debelog creva, leukemija itd. Pored toga, nekoliko humanih studija doprinelo je ispitivanju anti-kancerogenih efekata kakao praha saopštavanjem značajnih promena u biomarkerima koji procenjuju antioksidativni status organizma. Međutim, potrebna je velika opreznost u pokušajima ekstrapolacije *in vitro* zapažanja na *in vivo* modele životinjskih, a posebno humanih tumora. Sveobuhvatno, kakao proizvodi zaslužuju dalje istraživanje, s obzirom da molekularni mehanizmi anti-kancerogenog delovanja nisu u potpunosti okarakterisani i razjašnjeni.

### **1.5.6 Nervni sistem i kakao prah**

Istorija korišćenja kakao praha u ishrani ljudi praćena je legendama o njegovom delovanju na raspoloženje i izdržljivost. Drevni narodi Maja i Asteka konzumirali su dragocena kakao pića uz verovanje da im najveća snaga i mudrost dolaze upravo iz kakao zrna – „hrane Bogova“. Tek nedavno su se pojavili prvi radovi na temu uticaja kakao praha na učenje, memoriju, motivaciju i emocionalnu reaktivnost. Delovanje kakao praha i kakao proizvoda na nervni sistem i ponašanje objašnjava se prisustvom nekoliko biološki aktivnih sastojaka: metilksantina, polifenola, biogenih amina (triptamin, serotonin) i tetrahidro- $\beta$ -karbolin-a. Sve veće interesovanje za ispitivanje različitih zdravstvenih efekata kakao praha i njegovih biološki aktivnih jedinjenja potvrđuje činjenica da se na sajtu Nacionalnog instituta zdravlja, (*National Institute of Health*, NIH) mogu pronaći čak 72 aktuelne/planirane kliničke studije sa ovim predmetom istraživanja (NIH, 2018). Filtriranom pretragom može se videti da se četiri studije tiču upravo delovanja kakao praha na nervni sistem (Tabela 3).

Tabela 3. Aktuelne/planirane studije Nacionalnog Instituta za Zdravlje (NIH) - neurokognitivni i neuroprotektivni efekti bioaktivnih jedinjenja kakao praha

<b>naziv studije</b>	<b>vremenski okvir</b>	<b>stanje</b>	<b>tretman</b>	<b>trajanje tretmana</b>	<b>broj ispitanika</b>
<i>COcoa Supplement and Multivitamin Outcomes Study for the Mind</i>	2016 - 2020 godina	kognitivna oštećenja; demencija; starenje	750 mg kakao ekstrakta/dan i multivitaminski preparat	4 godine	18000
<i>Effect of Polyphenol-rich Cocoa Products on Cognitive Function</i>	2017 - 2018 godina	starenje	17,5 g čokolade/6 g kakao praha sa povećanim/snižanim sadržajem polifenola	8 nedelja	128
<i>The Effects of Flavonoid Supplementation on Cognition and Neural Mechanisms in Healthy Older Adults (CoCo_Chronic)</i>	2016 - 2018 godina	mentalni procesi usled starenja	300 mg flavanola/dan i 0 mg flavanola/dan	24 i 36 nedelja	80
<i>Dietary Flavanols and Dentate Gyrus Function</i>	2015 - 2018 godina	gubitak memorije	0 mg, 225 mg, 425 mg i 600 mg kakao flavanola/dan	12 nedelja	260

Četiri različita mehanizma smatraju se odgovornim za farmakološko delovanje metilksantina: antagonizam adenozijskih receptora, inhibicija fosfodiesteraze, modulacija GABA receptora, i regulacija intracelularnih nivoa kalcijuma (Monteiro i sar., 2016). U smislu dozne relevantnosti, neselektivni antagonizam adenozijskih A<sub>2a</sub> receptora najviše doprinosi neuroefektima metilksantina (Camandola i sar., 2018).

Delovanje metilksantina na nivou nervnog sistema ogleda se u njihovim neuroleptičkim i neuroprotektivnim karakteristikama. Kofein, metilksantinska komponenta kakao praha sa najvišim psihostimulativnim potencijalom, aktivira dopaminergičke, noradrenergičke i serotonergičke neurone. Međutim, njegovo psihostimulativno delovanje kod čoveka je često suptilno i nije ga lako otkriti. Učinak kofeina na učenje, pamćenje i koordinaciju se može povezati sa njegovim efektom u

smislu povećane budnosti i smanjenog umora (Nehlig i sar., 1992). Howell i saradnici pokazali su da kofein i drugi metilksantini mogu imati značajni uticaj na različite parametre u bihevioralnim testovima (Howell i sar., 1997). U određenom rasponu doza, kofein i srodni ksantini imaju stimulatorni efekat na ponašanje, dok veće doze ksantina mogu suzbiti bihevioralne aktivnosti i prekinuti procese učenja i pamćenja uz znake anksioznosti i disforije. U modelu Parkinsonove bolesti izazvanom jednostranom intrastrijatalnom aplikacijom 6-hidroksidopamina kod pacova, sugerisano je da kofein blokadom adenozijskih A<sub>2a</sub> receptora oporavlja poremećenu lokomotornu aktivnost koja se viđa kod grupe pacova koja nije primila kofein (Machado-Filho i sar., 2014).

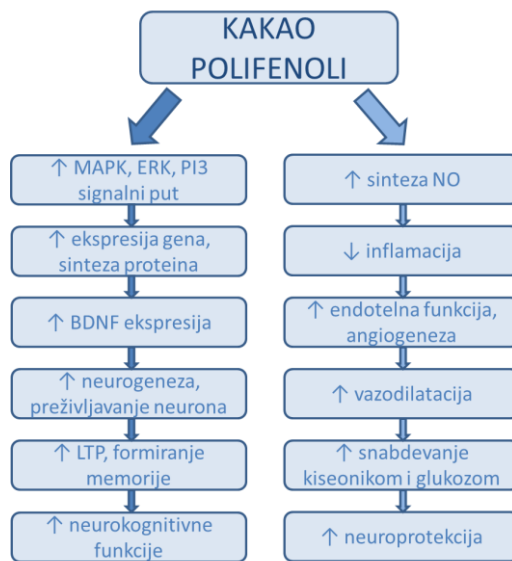
Ukoliko se porcijom kakao praha smatra količina od 7,3 g (dve kašike) koja je potrebna za pripremu kakao napitka u skladu sa uputstvom proizvođača (Lee i sar., 2003), količine metilksantina koje se tom prilikom unesu su 40 mg za kofein i 110 mg za teobromin. Shodno potvrđenim psihofarmakološkim efektima metilksantina u dozama od 200 mg kofeina i 250 mg teobromina (Baggott i sar., 2013), kakao prah se može smatrati njihovim odličnim dijetarnim izvorom. Takođe, saopšteno je i da delovanje kakao praha na nervni sistem u najvećoj meri potiče od kofeina, dok teobromin može samo blago da ga dopuni (Franco i sar., 2013).

Dvostruko slepa placebo-kontrolisana studija koja je ispitala efekte kakao praha i metilksantina sadržanih u 50 g crne čokolade na kognitivne performanse ljudi pokazala je značajne promene u raspoloženju i ponašanju, uključujući povećanu energičnost, povećanu motivaciju za radom kao i povećanu budnost (Smit i sar., 2004).

Druga grupa aktivnih sastojaka kakao praha sa potencijalnim efektima na ponašanje i nervni sistem su polifenoli. Rezultati dosadašnjih animalnih studija ukazuju na to da flavan-3oli i njihovi metaboliti mogu proći krvno-moždanu barijeru, izazivajući veoma korisne efekte na moždanom tkivu i moždanim funkcijama kao što su angio- i neurogeneza, promene u neuronskoj morfologiji, ali takođe relaksiraju cerebralne krvne sudove i stimulišu moždanu cirkulaciju (Vauzour i sar., 2008). Najzastupljeniji flavan-3ol u kakao prahu, epikatehin (Whiting, 2001), kod ljudi se brzo apsorbuje, i već nakon 30 min se detektuje u plazmi. Nivoi epikatehina su najviši u plazmi 2-3 h po uzimanju i vraćaju se na bazalnu vrednost 6-8 h nakon konzumacije kakaoa. Ako se u obzir uzme mogućnost da se flavan-3oli i njihovi metaboliti akumuliraju u regionima mozga koji su

uglavnom povezani sa učenjem i pamćenjem, može se razmišljati u smeru da ova jedinjenja ispoljavaju neuroprotektivni i prokognitivni karakter (Nehlig, 2013). Veruje se da se neurobiološki uticaj flavan-3ola na mozak ispoljava na dva glavna načina (Slika 17). Prvo, flavonoidi mogu specifično biti inkorporirani u nekoliko intracelularnih signalnih puteva, prvenstveno u MAPK (mitogenom aktivirana protein kinaza), ERK (ekstracelularno regulisana kinaza) ili u PI3-kinaza/Akt signalnu kaskadu. Aktivacija ovih signalnih kaskada i posledična sinteza odgovarajućih proteina je fundamentalna za stvaranje dugotrajne potencijacije (*long term potentiation*, LTP) i uspostavljanje dugoročne memorije (Kelleher i sar., 2004). Flavonoidi inhibicijom pomenutih protein-kinaza modulišu transkripcione faktore i tako promovišu ekspresiju gena, npr za BDNF (*brain derived neurotrophic factor*). Uprošćeno, ovaj faktor je neka vrsta hrane za mozak, posebno za neke moždane strukture koje su fundamentalne za učenje, pamćenje i afekat kao što su hipokampus i subventrikularna zona. On omogućava obnovu i granjanje neurona u ovim strukturama (Kim i sar., 2006; Valente i sar., 2009). Drugo, flavonoidi indukuju sintezu signalnog molekula, azot monoksida, u endotelu cerebralnih krvnih sudova. Ovaj molekul prelazi u subendotel, opušta glatke mišiće i povećava cerebralni protok. Isto se može očekivati i na perifernim krvnim sudovima, te tako dolazi do boljeg snabdevanja hranjivim materijama i perifernih neurona (Fisher i sar., 2003; Hollenberg i sar., 2009). Pored toga, animalni modeli ukazuju na to da administracija kakao flavonoida dovodi i do angiogeneze u hipokampusu (Praag i sar., 2007).

Jedno od interesantnih naučnih pitanja koje još nema definitivni odgovor je pitanje količine kakao praha koja bi imala potencijalno korisne efekte na ponašanje i nervni sistem i da li se te količine mogu postići pri uobičajenom korišćenju kakao praha i kakao proizvoda u ishrani ili je efekat ostvarljiv samo preko suplemenata i funkcionalne hrane koja bi sadržala koncentrovane doze aktivnih sastojaka kakaoa.



Slika 17. Neurobiološki efekti kakao polifenola

Legenda: MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza; ERK - ekstracelularno regulisana kinaza; PI3 – fosfatidil-inozitol 3-kinaza; BDNF - *brain derived neurotrophic factor*; LTP – *long term potentiation*; NO – azot monoksid

#### 1.5.6.1 Neuroprotektivni efekat

U nekoliko animalnih modela fiziološkog i patološkog starenja ispitivani su efekti kakao praha na brzinu nastanka kognitivnog deficita uzrokovanog starenjem. Rozan i saradnici ispitivali su preventivni efekat polifenolnog ekstrakta kakao praha na proizvodnju slobodnih radikala od strane leukocita pacova nakon izlaganja toploti i protektivni efekat kakao praha na kognitivne performanse (Rozan i sar., 2007). Kakao prah sa visokim sadržajem flavan-3ola (22,9 mg / kg / dan) i vitamin E, kao referentna antioksidativna supstanca, davani su oralno pacovima 14 dana pre izlaganja toploti. Dan nakon izlaganja toploti, proizvodnja slobodnih radikala kod pacova tretiranih bilo kakao prahom bilo vitaminom E značajno je smanjena u poređenju sa kontrolom. Za razliku od kontrolne grupe, pacovi tretirani kakao prahom ili vitaminom E razlikovali su aktivne od neaktivnih poluga u testu izbegavanja svetlosti. Tokom testiranja, pacovi kojima je aplikovan kakao prah ili vitamin E su brže dostizali skrivenu platformu u Morisonovom vodenom lavirintu. Ovi rezultati sugerišu da dnevna oralna primena kakao praha ili vitamina E deluje preventivno protiv prekomerne produkcije slobodnih radikala, i time



pacove eksponirane toploti štiti od kognitivnih oštećenja. Bisson i saradnici su oralno aplikovali kakao prah obogaćen flavan-3olima pacovima (u uzrastu između 15. i 27. meseca života) u dozi od 24 mg/kg/dan (Bisson i sar., 2008). Kod starijih pacova, aplikovanje kakao praha bogatog flavan-3olima je unapredilo kognitivne performanse u testu izbegavanja svetlosti i u vodenom lavirintu i produžilo životni vek. Može se uočiti da primenjeni kakao prah usporava poremećaje nastale usled starenja, kao što su neurodegenerativna oboljenja i kognitivno propadanje. Slični dokazi dobijeni su u studijama u kojima su korišćeni animalni modeli neurodegenerativnih oboljenja kao što je Alchajmerova bolest. Fernandez-Fernandez i saradnici ispitali su u svojoj studiji mogućnost da ishrana koja je bogata polinezasićenim masnim kiselinama i kakao polifenolima spreči oštećenja uzrokovana starošću i različite neuropatologije kod *wild type* miševa i transgenih miševa (povećana ekspresija gena za amiloidni protektivni protein, što predstavlja animalni model Alchajmerove bolesti) (Fernandez-Fernandez i sar., 2012). Naime, dobijeni rezultati u bateriji bihevioralnih testova ukazuju da je ishrana imala jasan uticaj na ponašanje oba genotipa miševa. Takođe, praćeno je i preventivno delovanje ishrane na razvoj beta amiloidnih plakova u hipokampusu i pokazano je da je došlo do odlaganja njihovog nastanka. U animalnom modelu ishemijskog moždanog udara, Shah i saradnici aplikovali su miševima 5, 15 ili 30 mg/kg epikatehina 90 min pre okluzije cerebralne arterije (Shah i sar., 2010). Miševi tretirani epikatehinom, u poređenju sa kontrolnom grupom, pokazali su znatno manje infarktne lezije i poboljšani neurološki skor. Miševi kojima je aplikovan epikatehin u dozi 30 mg/kg i do 3 sata nakon okluzije, takođe pokazuju manju infarktnu leziju u poređenju sa kontrolnom grupom.

Poznati korisni efekti flavonoida na kardiovaskularni sistem (Ried i sar., 2012) mogu predstavljati obećavajući pristup u lečenju cerebrovaskularnih poremećaja i poboljšavanju kognicije kod starijih osoba. *Per os* aplikacija kakaoa sa visokim sadržajem flavan-3ola u korelaciji je sa povećanim protokom krvi kroz cerebralne krvne sudove, što može biti korisno u lečenju cerebrovaskularnih ishemičnih sindroma kao što su demencija i moždani udar. Sorond i saradnici pokazali su da je posle dvonedeljne aplikacije kakao praha sa visokim sadržajem flavan-3ola kod 34 zdrava dobrovoljca (starosne dobi od  $72 \pm 6$  godina, u trajanju od 16 meseci) brzina protoka krvi u srednjoj cerebralnoj arteriji povećana za 10% (Sorond i sar., 2008). Ovakav nalaz sugerise da

potencijalno antioksidativno i antiinflamatorno svojstvo flavonoida igra fundamentalnu ulogu u sprečavanju kognitivnih oštećenja, koji su predvorje demencije i Alchajmerove bolesti. Desideri i saradnici su sprovedli studiju u kojoj je učestvovalo 90 starijih osoba sa već razvijenom demencijom (prosečna starost 71 godina), i ove ispitanike su podelili u tri grupe tako da osam nedelja konzumiraju dnevno 990 mg, 520 mg ili 45 mg kakao flavan-3ola (Desideri i sar., 2012). Kognitivne funkcije su procenjivane ispitivanjem mini-mentalnog stanja i testom fluidnosti u govoru. Na kraju perioda praćenja, rezultati istraživanja prvog testa su bili slični u sve tri grupe. Fluidnost u govoru je bila znatno bolja u prve dve grupe. Ovo je bila jedna od prvih studija koja je pokazala efikasnost redovne upotrebe kakao flavan-3ola u pospešivanju kognitivnih performansi starijih osoba sa već razvijenom demencijom.

#### 1.5.6.2 Neuromodulatorni efekat

Veruje se da flavonoidi, takođe, indukuju ekspresiju neuromodulatornih proteina u regijama mozga koji su uključeni u učenje i pamćenje, što ukazuje na to da kakao flavan-3oli mogu pokazati akutne i kratkoročne pozitivne efekte na memoriju, motivaciju i emocionalnu reaktivnost. Iznenadjuće, do sada je samo nekoliko animalnih studija imalo ovo kao tematiku. Miševi tretirani sa jednim od glavnih kakao flavan-3ola, epikatehinom, u dozi od 500 µg/g pokazali su značajnu neoangiogenezu u hipokampusu (Praag i sar., 2007). Ako je unos epikatehina bio kombinovan sa vežbanjem (okretanje točka), miševi su pokazivali značajno poboljšanje prostorne memorije i bila im je povećana gustina dendrita, tj. granjanje neurona u dentatnom girusu hipokampusa. Osim toga, unos epikatehina indukovao je i ekspresiju gena u hipokampusu povezanih sa učenjem. Yamada i saradnici su upoređivali efekte kratkoročne i dugoročne suplementacije kakao prahom u velikim količinama (100 mg/100 g telesne težine) na ponašanje pacova u uzdignutom plus lavirintu, najznačajnijem modelu anksioznosti (Yamada i sar., 2009). Kratkoročna suplementacija značajno je smanjila izbegavanje otvorenog prostora u ovom testu, što se može interpretirati kao anksiolitički efekat, dok je dugotrajna suplementacija dovela do značajnog povećanja koncentracije serotonina i njegovog prometa u mozgu. Poznato je da se ovaj modulator povezuje sa moždanim funkcijama kao što su regulacija apetita, raspoloženja i regulacija bola. Sve ovo može

ukazati da flavan-3oli mogu delovati i van hipokampusa i subventrikularne zone, najpre na amigdaloidno jedro, čija se hiperaktivnost takođe povezuje sa anksioznim poremećajima.

U randomizovanoj, dvostruko slepoj, kontrolisanoj, *cross over* studiji, 30 zdravih mladih odraslih osoba konzumiralo je kakao napitak sa visokim sadržajem flavan-3ola (520 mg i 994 mg) ili odgovarajući kontrolni napitak, pri čemu je pauza između konzumacije napitaka bila 3 dana (Scholey i sar., 2010). Tokom jednočasovnog testiranja, učesnici studije su u nekoliko desetominutnih ciklusa bili podvrgnuti bateriji kognitivnih testova i na skali im je kvantifikovan mentalni zamor. Rezultati su bili takvi da je aplikovanje napitka sa 994 mg flavanola dovelo do poboljšanja u testu brzog vizuelnog pamćenja, ali su učesnici više grešili u testu brojanja unazad. Aplikovanje napitka sa 520 mg flavanola doveo je do toga da su svi učesnici subjektivno prijavljivali manji mentalni zamor. Ovo je prvi izveštaj o neposrednom poboljšanju kognitivnih funkcija nakon konzumacije kakaoa sa visokim sadržajem flavan-3ola kod mladih zdravih osoba. Pase i saradnici su u svojoj studiji sprovedenoj na 72 zdrava učesnika starosti 40-65 godina ispitali akutne i subhronične efekte flavan-3ola na afekat i kognitivne performanse (Pase i sar., 2013). Ispitanici su bili podeljeni u tri grupe koje su tokom mesec dana konzumirale čokoladu koja sadrži 500, 250 ili 0 mg (placebo) polifenola. Kako bi se stekao utisak o akutnom efektu polifenola, odabrani parametri mereni su posle 1h, posle 2,5h i posle 4h od konzumacije; a u cilju ispitivanja subhroničnih efekata merenja su sprovedena posle mesec dana konzumacije flavan-3ola. Inače od baterije kognitivnih testova korišćeni su testovi brzine reagovanja, budnosti, radne memorije, test ponavljanja reči i test prepoznavanja slike. Raspoloženje je samoprocenjivano odgovarajućom Bond-Ladera skalom (Bond i Lader, 1974). Dok ni u jednoj grupi, ni u jednoj vremenskoj tački nije prijavljeno poboljšanje kognitivnih performansi, uticaja na raspoloženje je bilo u testu subhroničnog efekta. Posle 30 dana tretmana, grupa kojoj je aplikovana visoka doza flavanola prijavljuje spokoj i zadovoljstvo, i to statistički značajnije nego placebo grupa. Ishod ove studije sugerise mogućnost da kakao polifenoli mogu dovesti do poboljšavanja simptoma koji su povezani sa anksiozno-depresivnim poremećajem. Neke studije se detaljnije bave vezom između potrošnje kakao proizvoda i depresivnih poremećaja (Rose i sar., 2010). Međutim, ostaje da se objasni tačan mehanizam ovakvog delovanja.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje imalo je za cilj hemijsku karakterizaciju kakao praha i ispitivanje njegove biološke aktivnosti u različitim *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima. Ispitivanja su bila organizovana kroz pet faza.

- U prvoj fazi istraživanja okarakterisan je i kvantifikovan sadržaj polifenolnih komponenti i metilksantina u uzorcima kakao praha i kakao proizvoda sa tržišta.
- Druga faza imala je za cilj procenu antioksidativnog potencijala uzoraka kao i procenu postojanja korelacije između antioksidativnog potencijala i utvrđenog polifenolnog sastava kakao praha i kakao proizvoda.
- U trećoj fazi određen je antimikrobni potencijal različitih uzoraka kakao praha na *Gram+* i *Gram-* bakterije i *Candidu albicans*. Takođe je procenjen uticaj procesa tehnološke obrade na antioksidativne i antimikrobne karakteristike kakao praha.
- U četvrtoj fazi ispitivani su efekti fiziološki relevantnih količina odabranog nealkalizovanog kakao praha i ekvivalentne količine 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.
- Peta faza obuhvatala je *in vivo* ispitivanja antioksidativnog delovanja (određivanje količine i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u homogenatu jetre) kakao praha i metilksantina nakon dugotrajne suplementacije eksperimentalnih miševa.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 IN VITRO ISPITIVANJA KAKAO PROIZVODA

##### 3.1.1 Materijali

*In vitro* studija ovog istraživanja sprovedena je na 11 različitih kakao prahova i 12 čokolada. Šest prirodnih i pet alkalizovanih uzoraka kakao prahova, potiču od uvezenih sirovina namenjenih konditorskoj industriji, nabavljene su od vodećih srpskih proizvođača čokolade. Pet mlečnih i sedam crnih čokolada kupljene su u prodavnicama na teritoriji Beograda i sve su proizvedene u Srbiji. Svi kakao proizvodi (Tabela 4) uzorkovani su u triplikatu, iz različitih serija.

Tabela 4. Karakteristike kakao proizvoda

kakao prah	proizvođač	kod	kategorija
CP1	Gerkens - Holandija	NA-54	prirodni
CP2	De Zaan, SAD	11-N100	prirodni
CP3	Nederland - Holandija	PN11	prirodni
CP4	Nederland - Holandija	PNGH11	prirodni
CP5	De Zaan, SAD	N11N	prirodni
CP6	De Zaan, SAD	11-N-003	prirodni
CP7	Nederland	PARR11	alkalizovani
CP8	De Zaan, SAD	D-11-V	alkalizovani
CP9	De Zaan, SAD	D-11-B	alkalizovani
CP10	Nederland	PARN11	alkalizovani
CP11	De Zaan, SAD	D-11-MR	alkalizovani
čokolada	proizvođač	masti (%)	deklarisani sadržaj kakao delova (%)
MC1	A	31	27
MC2	B	31,9	28
MC3	C	31	25

MC4	D	31	29
MC5	E	30	29
DC1	A	40	75
DC2	B	36,6	70
DC3	C	33	65
DC4	D	30	70
DC5	E	38	70
DCR1	A	36	60
DCR2	B	36	70

Legenda: CP – kakao prah; MC – mlečna čokolada, DC – crna čokolada; DCR1 – crna čokolada sa dodatkom maline 4%, DCR2 – crna čokolada sa dodatkom maline 1,6%; A - Soko-Štark, Beograd; B - Bambi, Požarevac; C - Pionir, Subotica, D - Simka, Vranje; E - Premia, Beograd

### 3.1.2 Hemikalije

Sve hemikalije upotrebljene *in vitro* u eksperimentalnom radu bile su analitičke čistoće. Sirćetna kiselina, hlorovodonična kiselina koncentrovana, n-butanol su nabavljeni od „Zorka“ (Šabac, Srbija). Gvožđe-(III)-hlorid-6-hidrat, natrijum-acetat, natrijum-karbonat, natrijum-dihidrogenfosfat, di-natrijum-hidrogenfosfat, aluminijum-hlorid, natrijum-hidroksid, natrijum-hlorid i natrijum-nitrit su nabavljeni od Centrohema (Beograd, Srbija). Etanol je nabavljen od Vrenje-špiritana d.o.o (Beograd, Srbija).

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), ( $\pm$ )-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), 2,4,6-tri-2-piridil-s-triazin (TPTZ), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) di-amonijumova so (ABTS), kalijum-persulfat, natrijum-hidroksid, teobromin, kofein, epikatehin, katehin, galokatehin, procijanidin B1, procijanidin B2, procijanidin C1, procijanidin A2, kvercetin, kafe kiselina, protokatehnična kiselina, n-heksan, aceton su nabavljeni od Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka).

Dimetilsulfoksid (DMSO), metanol, mravlja kiselina, glacijalna sirćetna kiselina i acetonitril HPLC stepena čistoće su nabavljeni od J.T. Baker (New Jersey, USA). Folin-Ciocalteu reagens, galna kiselina su nabavljeni od Merck (Darmstadt, Nemačka).

Miler-Hinton i Saburo-dekstrozni agar korišćeni u mikrobiološkim ispitivanjima bili su DIFCO brenda (Md., U.S.A.), dok je antibiotik ampicilin nabavljen od Oxoid Thermo Scientific (Hampshire, UK). Sojevi mikroorganizama kupljeni su kod Microbiologics Inc. (St. Cloud, Minn., U.S.A.) i kao liofilizati skladišteni na 4 °C do dana kultivacije.

### **3.1.3 Priprema ekstrakata kakao praha**

Uzorci kakao praha (100 mg) odmereni su u ependorfama zapremine 1,5 ml. U svaku ependorfu dodato je 1 ml rastvarača za ekstrakciju (etanol/voda (70:30 v/v)), nakon čega je sadržaj snažno izmešan i vorteksiran 1 min. Uzorci su zatim centrifugirani (15000 rcf, 5 min, 25 °C), te su čisti supernatanti pokupljeni i korišćeni kao ekstrakti kakao praha u daljim ispitivanjima.

### **3.1.4 Priprema ekstrakata čokolade**

Ekstrakti čokolade pripremljeni su kako je opisano od strane Hammerstone i saradnika sa nekim modifikacijama ((Hammerstone i sar., 1999). Naime, 2 g usitnjene čokolade ekstrahovano je tri puta sa 10 ml n-heksana, kako bi se eliminisale masne materije. Zatim su obezmašćeni uzorci sušeni na vazduhu tokom 24 h u cilju isparavanja organskog rastvarača (Adamson i sar., 1999). Osušeni uzorci su dalje bili podvrgnuti dvostrukoj ekstrakciji sa 5 ml rastvarača (aceton/destilovana voda/sirćetna kiselina (70/29,8/0,2 v/v/v) na ultrazvučnom kupatilu FALC (Treviglio, Italija) u trajanju od 30 min. Smeše su centrifugirane (5000 rcf, 10 min, 25 °C) i nakon svake ekstrakcije supernatanti su dekantirani i prikupljeni u odmerne sudove zapremine 10 ml. Ovako pripremljeni ekstrakti čokolade bili su korišćeni u daljim ispitivanjima.

### 3.1.5 Hemijska karakterizacija profila biološki aktivnih sastojaka kakao praha

#### 3.1.5.1 Određivanje sadržaja biološki aktivnih sastojaka HPLC-MS metodom

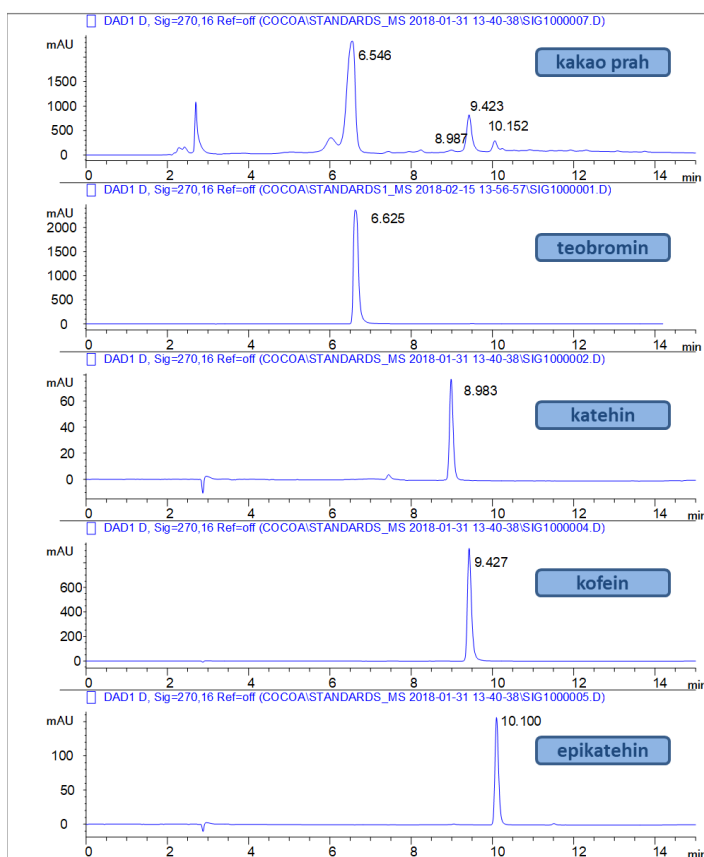
Kvantifikacija biološki aktivnih jedinjenja ekstrakata kakao praha obavljena je tačnom hromatografijom visoke rezolucije (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) spregnutom sa *Diode-Array* detekcijom (DAD) i masenom spektrometrijom (MS) upotrebom tačnog hromatografa Agilent 1100 Series (USA) (Kusznierewicz i sar., 2012). Maseni spektrometar (kvadripolni analizator) bio je opremljen interfejsom elektron-sprej jonizacije (ESI, Agilent). Razdvajanje jedinjenja izvedeno je pomoću kolone Agilent Eclipse H16 - 420278 (4,6 x 150 mm, 5 µm). Sistem rastvarača je imao konstantan protok od 0,8 ml/min. Mobilna faza bila je destilovana voda sa 0,1 % mravlje kiseline (rastvarač A) i acetonitril sa 0,1 % mravlje kiseline (rastvarač B). Eluiranje je sprovedeno linearnim programom gradijenta kako bi se obezbedio sledeći odnos rastvarača B do A: od 0 do 30 min (5: 95 - 50: 50 - 100: 0 v/v). Injekciona zapremina je bila 15 µl, a temperatura je održavana konstantnom na 25 °C. Pojedinačna jedinjenja su identifikovana upoređivanjem njihovih vremena zadržavanja u koloni s onima za standarde ili na osnovu dostupnih podataka u literaturi o njihovim masenim spektrima. Kvantitativno određivanje katehina/metilksantina, fenolnih kiselina i derivata flavonola postignuto je na sledećim talasnim dužinama: 270, 325 i 360 nm. Kalibracione krive konstruisane su integracijom pikova apsorpcije, određenih tokom analiza serijskih razblaženja odgovarajućih standarda (Tabela 5). Primer hromatograma standarda i jednog uzorka kakao praha prikazani su na Slici 18.

Tabela 5. Kalibracione krive standarda

standard	kalibraciona kriva	regresioni koeficijent	opseg koncentracija (mg/ml)
teobromin	$y = 22338x - 863.44$	$R^2 = 0,9952$	0,5 - 2
kofein	$y = 53222x - 211.92$	$R^2 = 0,9990$	0,069 – 0,206
epikatehin	$y = 10158x - 31.362$	$R^2 = 0,9999$	0,023 – 0,46



katehin	$y = 10502x - 193.26$	$R^2 = 0,9965$	0,019 – 0,38
galokatehin	$y = 41124x - 662.6$	$R^2 = 0,9882$	0,03 – 0,1
procijanidin B2	$y = 9102.3x - 6.5333$	$R^2 = 0,9994$	0,00625 – 0,1
procijanidin C1	$y = 4239.7x + 131.35$	$R^2 = 0,9918$	0,00625 – 0,1
procijanidin A1	$y = 3543.9x + 16.933$	$R^2 = 0,9963$	0,00625 – 0,1
kvercetin	$y = 57.034x - 1.5917$	$R^2 = 0,9999$	0,0002 – 0,05
kafena kiselina	$y = 139.54x + 56.016$	$R^2 = 0,9989$	0,0002 – 0,01
protokatehnična kiselina	$y = 53387x - 44.322$	$R^2 = 0,9994$	0,01 – 0,1



Slika 18. Pojednostavljen hromatogram ekstrakta kakao praha ( $\lambda=270$ ) i hromatogrami standarda: teobromin, katehin, kofein, epikatehin

### 3.1.5.2 Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja - mikro-metoda

Sadržaj ukupnih polifenola ekstrakata kakao praha određen je metodom po Folin-Ciocalteu-u na mikrotitracionoj ploči (Attard, 2013). Ukratko, 10  $\mu\text{L}$  alikvotiranog uzorka (odgovarajućeg razblaženja ekstrakta) pipetirano je u bazenčice mikrotitracione ploče (MTP). U bazenčice je potom dodato 100  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu-ovog reagensa (komercijalni reagens razblažen 10 puta) i vodeni rastvor  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (80  $\mu\text{L}$ , 7,5%) u cilju postizanja bazne sredine (pH  $\sim$  10) koja je neophodna za oksido-redukcionu reakciju između polifenolnih jedinjenja i Folin Ciocalteu-ovog reagensa. Mikrotitraciona ploča je zatim ostavljena da se inkubira 1h na sobnoj temperaturi, zaštićena od svetlosti. Apsorbancija reakcione smeše je merena u odnosu na slepu probu (rastvarač za ekstrakciju) na talasnoj dužini od 630 nm na MTP čitaču (BIOTEK, USA, ELx800 Absorbance Microplate Reader). Sadržaj polifenolnih jedinjenja određen je metodom standardne krive, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g uzorka. Kalibraciona kriva ( $y = 0,002x + 0,0003$ ) pripremljena na osnovu radnih rastvora galne kiseline u opsegu koncentracija od 0 do 80 mg/ml pokazala je dobru linearnost ( $R^2 = 0,9996$ ).

#### 3.1.5.3 Određivanje ukupnih flavonoida - mikro-metoda

Sadržaj ukupnih flavonoida ekstrakata kakao praha procenjen je kolorimetrijski sa aluminijum hloridom (Zhishen i sar., 1999) i izražen kao mg ekvivalenta katehina (CE) po g uzorka. 10  $\mu\text{L}$  alikvotiranog uzorka, 200  $\mu\text{L}$  destilovane vode i 30  $\mu\text{L}$  5%  $\text{NaNO}_2$  rastvora pipetirano je u bazenčice MTP-a u triplicatu. Nakon 5 min inkubacije na 37 °C dodat je 10% rastvor  $\text{AlCl}_3$  (30  $\mu\text{l}$ ), a 6 min kasnije i 20  $\mu\text{L}$  1M rastvora  $\text{NaOH}$ . Apsorbancija reakcione smeše je merena na MTP čitaču na 490 nm u odnosu na slepu probu. Kalibraciona kriva ( $y = 0,0005x + 0,036$ ) je razvijena korišćenjem 1 mM rastvora katehina u intervalima od 200  $\mu\text{M}$  i pokazala je dobru linearnost ( $R^2 = 0,9960$ ).

#### 3.1.5.4 Određivanje proantocijanidina

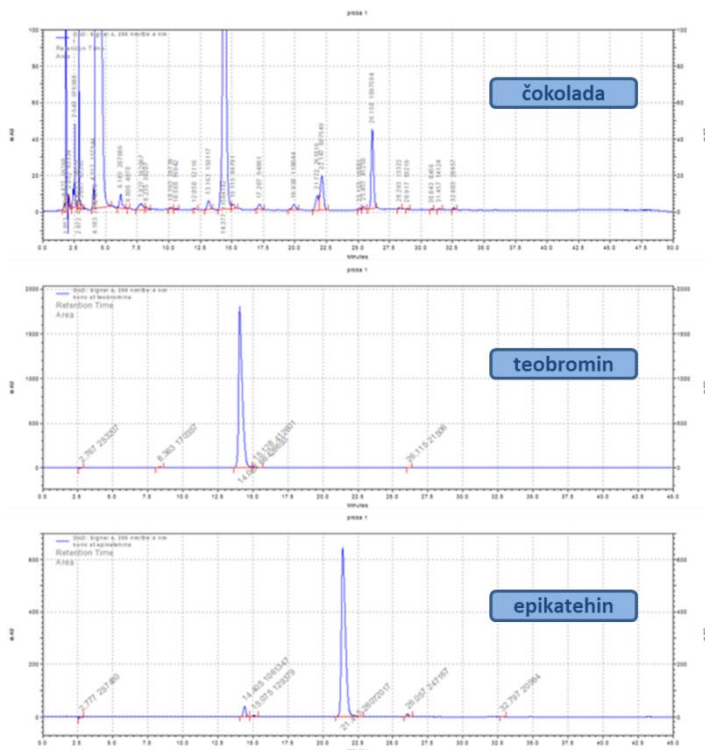
Spektrometrijsko određivanje ukupnih proantocijanidina sprovedeno je prema metodi koju su opisali Bate-Smith i saradnici te kasnije modifikovali Porter i saradnici (Bate-Smith, 1954; Porter i sar., 1985). Ukratko, 0,2 ml ekstrakta pomešano je sa 6 ml

smeše n-butanola i koncentrovane HCl (70/30, v/v) i 0,3 ml 2% rastvora  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  u 2M HCl. Epruvete sa pažljivo izmešanim sadržajem zatvorene su i zagrevane 45 min na 95 °C u vodenom kupatilu Memmert (Büchenbach, Nemačka). Potom su reakcione smeše hlađene do sobne temperature i merena je njihova apsorbcija na  $\lambda = 550$  nm. Količina proantocijanidina je određena iz kalibracione krive konstruisane na osnovu standarda cijanidin hlorida i izražena kao mg ekvivalenta cijanidin hlorida (CyE) po g kakao praha. Opseg od 0,05 do 0,3 mg/ml standardnog rastvora je korišćen za kalibracionu krivu ( $y = 3,7248x + 0,0129$ ,  $R^2 = 0,9987$ ).

### **3.1.6 Hemijska karakterizacija profila biološki aktivnih sastojaka čokolade**

#### **3.1.6.1 Određivanje sadržaja biološki aktivnih sastojaka HPLC metodom**

Sadržaj biološki aktivnih sastojaka čokolade određen je HPLC metodom uz primenu eksternih standarda. Kao standardi korišćena su sledeća jedinjenja: teobromin, kofein, epikatehin i katehin. Rastvori standarda pripremani su u dimetilsulfoksidu (DMSO), i to u opsegu koncentracija 0,1-0,35 mg/ml za flavan-3ole, 0,7-1 mg/ml za teobromin i 0,3-0,8 mg/ml u slučaju kofeina. Kalibracione krive svih standarda su imale visok stepen linearnosti ( $R^2 > 0,99$ ). Svi uzorci i rastvori standarda su filtrirani kroz filter sa veličinama pora od 0,45  $\mu\text{m}$  pre direktnog injektovanja u kolonu. Biološki aktivna jedinjenja su određivana upotrebom tečnog hromatografa Varian LC Star Sistem 9010 opremljenog sa UV/DAD detektorom, a razdvajanje jedinjenja je vršeno sa RP-LC kolonom (Waters Spherisorb ODS. 250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$  I.D., Milford, USA). Mobilna faza je bila voda sa sirćetnom kiselinom (97,5/2,5, v/v) (A) i acetonitril (B). Uslovi eluiranja bili su sledeći: 0 min. 97% A; 0-13 min. 91% A; 13-18 min. 89% A; 18-25 min. 82% A; 25-45 min 70% A; i 45-50 min 97% A. Talasna dužina detekcije je birana na osnovu apsorpcionog maksimuma analiziranih jedinjenja,  $\lambda = 278$  nm (Guyot i sar., 1998). Primer hromatograma standarda i jednog uzorka crne čokolade prikazani su na Slici 19.



Slika 19. Hromatogram ekstrakta crne čokolade ( $\lambda=280$ ) i hromatogrami standarda: teobromin i epikatehin

### 3.1.6.2 Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih polifenola čokolade određen je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu –u adaptiranom od strane Swain-a i Hills-a (Swain i Hillis, 1959). U 0,5 ml razblaženog ekstrakta čokolade dodato je 2,5 ml reagensa po Folin-Ciocalteu-u. Reakciona smeša je dobro promešana i ostavljena na tamnom mestu 5 minuta. Nakon toga, smeši je dodato 30 ml destilovane vode i 7,5 ml 20% rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , i nakon dopunjavanja do zapremine od 50 ml dobijena reakciona smeša je ostavljena da se inkubira 2h na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Apsorbancija je merena na 760 nm. Upravo je pripremana i slepa proba, kod koje je uzorak bio zamenjen rastvaračem za ekstrakciju. Koncentracija fenolnih jedinjenja je očitavana sa kalibracione krive ( $y = 0,0121x + 0,0194$ ,  $R^2=0,9988$ ) standardnog rastvora galne kiseline, a rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline (mg GAE/g).

### 3.1.6.3 Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida ekstrakata čokolade bio je procenjen prema metodi Lee-a i saradnika (Lee i sar., 2003). U epruvetu od 10 ml dodato je 0,5 ml ekstrakta i 2 ml destilovane vode, a zatim je dobijeni rastvor dobro homogenizovan. Nakon homogenizacije dodato je 0,15 ml 5 % NaNO<sub>2</sub>. Posle 5 minuta dodato je 0,15 ml 10 % AlCl<sub>3</sub>, a nakon još 6 minuta i 1 ml 1M NaOH, posle čega je zapremina rastvora dopunjena do 5 ml destilovanom vodom. Apsorbancija rastvora je određivana na talasnoj dužini od 510 nm u odnosu na odgovarajuću slepu probu pomoću UV-VIS J.P. SELECTA spektrofotometru (Barselona, Španija). Kao standard korišćen je rastvor katehina, a rezultati su izraženi u mg ekvivalenata katehina (CE) po g čokolade. Razvijena kalibraciona kriva ( $y = 0,0028x + 0,1144$ ) pokazala je dobru linearnost ( $R^2 = 0,994$ ).

#### 3.1.6.4 Određivanje proantocijanidina

Sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktima čokolade određen je metodom opisanom u poglavlju 3.1.5.4 ove doktorske disertacije.

### 3.1.7 Određivanje antioksidativnog potencijala kakao praha

Antioksidativna aktivnost ekstrakata kakao praha određivana je pomoću tri metode baziranim na reakcijama u kojima dolazi do transfera elektrona. Sva tri testa urađena su na mikrotitracionim pločama, te je reč o brzim i efikasnim mikro-metodama.

#### 3.1.7.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) mikro-metoda

Antioksidativni kapacitet ekstrakata kakao praha određen je korišćenjem DPPH mikro-metode opisane od strane Melendez i saradnika sa malim modifikacijama (Melendez i sar., 2014). Dakle, 7  $\mu$ l alikvotiranog uzorka je dodato u 193  $\mu$ L DPPH radnog rastvora (smeša  $1,86 \times 10^{-4}$  mol/l DPPH rastvora sa 0,1 M rastvorom acetatnog pufera u odnosu 2:1 (v/v)) u bazenčice MTP-a u triplikatu i reakciona smeša je energično promešana. Nakon 1h inkubiranja na sobnoj temperaturi apsorbancija je merena na MTP čitaču pri talasnoj dužini od 490 nm. Kalibraciona kriva ( $y = 44,626k +$

1,6538), u opsegu 0,2 do 0,7 mmol Troloks/ml je korišćena za kvantifikaciju antioksidativne aktivnosti i pokazala je dobru linearnost ( $R^2 = 0,9922$ ). Rezultati su izraženi u mM Troloks Ekvivalenta (TE)/g kakao praha.

#### 3.1.7.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mikro-metoda

FRAP mikro-metoda na ekstraktima kakao praha uradjena je u skladu sa metodom Bolanosa i saradnika uz neke modifikacije (Bolanos de la Torre AA i sar., 2015). Najpre je FRAP radni rastvor pripremljen mešanjem 10-zapremina 300 mM acetatnog pufera (pH 3.6) sa jednom zapreminom 10 mM TPTZ-a (2, 4, 6-tripiridil-s-triazin) u 40 mM HCl i jednom zapreminom 20 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , a potom zagrevan na 37 °C 10 min pre upotrebe. Alikvotirani uzorak (20  $\mu$ L) pomešan je sa 280  $\mu$ L FRAP radnog rastvora u mikrotitracionoj ploči sa 96 bazenčića u triplikatu. Inkubacija je trajala 30 min na 37 °C zaštićeno od svetlosti. Apsorbancija obojenog proizvoda (kompleks gvožđa i tripiridiltriazina) merena je na 630 nm koristeći MTP čitač. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracione krive ( $y = 1,0965x + 0,486$ ,  $R^2 = 0,9996$ ) razvijene u opsegu 0,1 do 0,8 mmol Troloks/ml. Rezultati su izraženi kao mM Troloks Ekvivalenti (TE) po gramu kakao praha.

#### 3.1.7.3 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) mikro-metoda

TEAC mikro-metoda na ekstraktima kakao praha zasnovana je na dekolozaciji ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin- 6-sulfonska kiselina) radikala, a prilagođena je za aplikaciju na mikrotitracionu ploču od strane Pastorize i saradnika (Pastoriza, 2011). Osnovni ABTS rastvor (7 mM) i kalijum peroksodisulfat (2,45 mM) u 5mM fosfatnom puferu (pH 7,4) su pripremljeni i pomešani u jednakim zapreminama. Smeša je ostavljena da reaguje na sobnoj temperaturi, preko noći (12 do 16 sati) u mraku da bi se omogućilo stvaranje slobodnih radikala i zatim je razblažena fosfatnim puferom (1/80, v/v). U bazenčiće mikrotitracione ploče pipetirano je 20  $\mu$ L alikvotiranog uzorka i 280  $\mu$ L radnog rastvora ABTS-a u tri ponavljanja. Nakon tačno 6 min apsorbancija je merena pomoću MTP čitača na 630 nm. Kalibraciona kriva ( $y = 510,11x - 3,3025$ ) razvijena je

korišćenjem opsega 0,2 do 1,5 mmol Troloks/ml i pokazala je dobru linearnost ( $R^2 = 0,9946$ ). Rezultati su izraženi kao mM Troloks Ekvivalenti (TE) po gramu kakao praha.

### 3.1.8 Određivanje antioksidativnog potencijala čokolade

Antioksidativna aktivnost ekstrakata čokolade određivana je kroz tri spektrofotometrijske metode (DPPH, FRAP, TEAC).

#### 3.1.8.1 DPPH metoda

U svrhu određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata čokolade korišćena je DPPH metoda koju su opisali Brand-Williams i saradnici (Brand-Williams i sar., 1995). Radni DPPH rastvor napravljen je mešanjem etanolnog rastvora DPPH koncentracije  $1,86 \times 10^{-4}$  mol/l sa 0,1 M rastvorom acetatnog pufera u odnosu 2:1 (v/v). U 0,2 ml alikvotiranog uzorka dodato je 2,8 ml radnog DPPH rastvora, nakon čega je reakciona smeša dobro promešana i ostavljena u mraku jedan sat. Apsorbancija je merena na talasnoj dužini od 525 nm na sobnoj temperaturi. Za slepu probu korišćen je rastvarač. Kao standard za merenje antiradikalske aktivnosti korišćen je rastvor Troloksa. Konstruisan je dijagram zavisnosti procenta inhibicije DPPH radikala u funkciji koncentracije rastvora Troloksa, čime je dobijena linearna standardna kriva ( $y = 152,08x - 10,331$ ,  $R^2 = 0,9955$ ) sa koje su očitavani rezultati u mM Trolox Ekvivalenata (TE)/g čokolade. Procenat inhibicije računat je prema sledećoj formuli:  $I \% = (A_{sp} - A_a) / A_{sp} \times 100$ , pri čemu je I – procenat inhibicije DPPH radikala;  $A_{sp}$  – apsorbancija slepe probe;  $A_a$  – apsorbancija analize.

#### 3.1.8.2 FRAP metoda

Primenjena FRAP metoda na ekstrakte čokolade razvijena je od strane Benzie i Strain (Benzie i Strain, 1996). Naime u 0,1 ml alikvotiranog uzorka dodato je 0,3 ml destilovane vode i 3 ml FRAP reagensa (priprema opsiana u poglavlju 3.1.7.2), nakon čega je reakciona mešavina inkubirana na 37°C. Apsorbancija je očitavana nakon 40 minuta na 593 nm. Za slepu probu korišćen je rastvarač sa ekstrakciju. Kao standard

korišćen je rastvor Troloksa, te je antioksidativna aktivnost očitavana sa kalibracione krive ( $y = 1,3543x - 0,033$ ,  $R^2 = 0,9976$ ), a rezultati su izražavani u mM Troloks Ekvivalenta (mM TE) u odnosu na gram čokolade.

### 3.1.8.3 TEAC metoda

Ekstrakti čokolade bili su podvrgnuti i TEAC metodi u cilju određivanja antioksidativne aktivnosti. Metoda je zasnovana na reakciji ABTS radikala i jedinjenja sa redukcionim osobinama (Re i sar., 1999). U epruvetu sa 0,03 ml alikvotiranog uzorka dodato je 3 ml radnog ABTS rastvora (priprema opisana u poglavlju 3.1.7.3), nakon čega je usledila inkubacija u trajanju od 40 minuta na 30 °C. Apsorbancija je merena na 734 nm. Za slepu probu je korišćen 5 mM fosfatni pufer. Inhibicija ABTS radikala nakon 40 minuta je izračunata upotrebom iste formule kao u DPPH metodi (poglavlje 3.1.8.1). Kao standard je korišćen rastvor Troloksa u 5 mM fosfatnom puferu i konstruisani su dijagrami zavisnosti inhibicije ABTS radikala od koncentracije uzorka i koncentracije Troloksa pomoću kojih je izračunata TEAC vrednost po formuli:

$$TEAC (mM) = \text{koeficijent pravca krive uzorka} / \text{koeficijent pravca krive standarda}$$

## 3.1.9 Određivanja antimikrobnog potencijala kakao praha

### 3.1.9.1 Priprema sojeva mikroorganizama

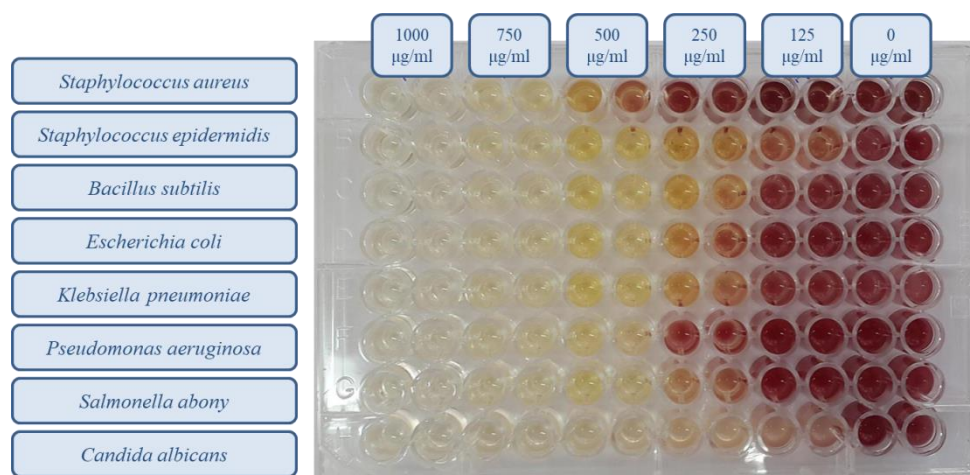
Ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakata kakao praha bujon-mikrodilucionom metodom (CLSI, 2009). Ispitivanje je izvršeno na osam standardnih laboratorijskih sojeva: Gram pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* (ATCC [American Type Culture Collection] 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)); Gram negativne bakterije (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella abony* (NCTC [National Collection of Type Cultures] 6017)); jedan soj gljivice (*Candida albicans* (ATCC 10231)). Sva ispitivanja na bakterijskim sojevima su izvedena u *Mueller-Hinton* bujonu, dok je antigljivična aktivnost ekstrakata kakao praha ispitana u *Saburo-dekstroznom* bujonu. Nakon inkubacije tokom 24 h na 37 °C i



25 °C, gustina bakterija/kandide podešena je na gustinu od 0,5 po *MacFarland* standardu. Potom su sojevi razblaženi sveže pripremljenim bujonima kako bi se postigle finalne koncentracije  $2,5 \times 10^6$  CFU (*Colony Forming Units*)/ml bujona za bakterije i  $1,2 \times 10^7$  CFU/ml za gljivicu.

### 3.1.9.2 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)

U mikrotitracionu ploču sa 96 mesta je dodato po 100  $\mu$ L razblaženog ekstrakta kakao praha (uparenog do suva i redispergovanog u DMSO) u duplikatu i po 100  $\mu$ L bakterijske/kandida suspenzije. Kao pozitivna kontrola su postavljena dva duplikata mikroorganizama u medijumu bez dodatka ekstrakta. Nakon kultivacije u termostatu u aerobnim uslovima očitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Minimalna inhibitorna koncentracija je predstavljala najnižu koncentraciju ekstrakta kakao praha (najveće razblaženje), pri kojoj nije uočen vidljiv rast mikroorganizma pomoću binokularnog mikroskopa u poređenju sa kontrolnim bazenčićima nakon inkubacije na 35 °C tokom 24h (bakterija) ili 48 do 72 h (kandida) (Savran i sar., 2016). Ampicilin je primenjen kao kontrolni antibiotik. Minimalne inhibitorne koncentracije flavan-3ola (epikatehina i katehina) bile su pojedinačno određene u paralelnim eksperimentima kako bi se potpunije proverila osetljivost testiranih mikroorganizama (Slika 20).



Slika 20. Minimalne inhibitorne koncentracije epikatehina

### **3.2 IN VIVO ISPITIVANJA KAKAO PRAHA**

*In vivo* ogledi ove disertacije sprovedeni su na miševima soja C57BL/6, kupljenim od Odeljenja za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja Vojno Medicinske Akademije (VMA, Beograd, Srbija). Životinje su bile smeštene u prostorijama Vivarijuma Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Eksperimenti su odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. dozvole 119-01-51/6/2016-09).

U cilju procene uticaja kakao praha na ponašanje, kao i njegove potencijalne *in vivo* antioksidativne i hepatoprotektivne aktivnosti, sprovedena je suplementaciona studija za čije potrebe su pripremljene i peletirane dve vrste suplementiranih hrana za životinje: standardna hrana za laboratorijske miševе suplementirana kakao prahom i standardna hrana za laboratorijske miševе suplementirana čistim metilksantinima – kombinacijom teobromina i kofeina.

#### **3.2.1 Priprema hrane za suplementacionu studiju**

Prirodni kakao prah koji će se koristiti u *in vivo* ispitivanjima izabran je na osnovu hemijske karakterizacije biološki aktivnih sastojaka u prvom delu ove disertacije. Metilksantinske supstance, teobromin i kofein su bile analitičkog kvaliteta i nabavljene su od Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Kakao prah/metilksantini su kombinovani sa kontrolnom hranom LM-2 19%, koju proizvodi Veterinarski zavod Subotica, Srbija.

Priprema i peletiranje eksperimentalne i kontrolne hrane obavljani su u sektoru „*Feed to Food pilot plant*“, Instituta za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Srbija. S obzirom da je kontrolna hrana dobijena od proizvođača kao već tretirana toplotom (ekstrudirana), cilj dalje obrade je bio njeno homogeno mešanje sa aktivnim supstancama i priprema u oblik koji odgovara navikama u ishrani laboratorijskih životinja. Operacija mešanja obavljena je u laboratorijskoj dvosmernoj mešalici sa lopaticom (F-6-RVC, Forberg International AS, Norveška). Vreme mešanja bilo je 90 s, nakon čega je dodata voda da bi se postigao sadržaj vlage približno 9%, kako bi se

olakšalo vezivanje čestica tokom peletiranja. Za oblikovanje kontrolne i eksperimentalnih smeša korišćena je ravna modla za laboratorijsko peletiranje (14-175, Amandus Kahl, Nemačka), sa prečnikom otvora od 6 mm. Kako bi se izbegao gubitak jedinjenja od interesa temperatura peletiranja bila je 45 °C.

Hrana sa inkorporiranim kakao prahom CP1 u dozi od 3% je približno ekvivalentna dnevnom unosu dve kašike kakao praha ili dve štangle crne čokolade kod ljudi. Doza od 0,087% metilksantina u hrani namijenjenoj drugoj eksperimentalnoj grupi životinja je identična sa dozom metilksantina koju konzumiraju životinje suplemetirane kakao prahom (prva eksperimentalna grupa). Sve tri vrste hrane su držane na suvom i tamnom mestu i sveže davane životinjama svakodnevno. Sastav korišćenog prirodnog kakao praha kao i sastav ove tri hrane dati su u Tabeli 6 i Tabeli 7.

Tabela 6. Energetska i nutritivna vrednost kakao praha CP1

<b>Energetska vrednost</b>	<b>4,1 kcal/g</b>
<b>Makronutrijenti</b>	<b>sadržaj (%)</b>
<b>Proteini</b>	24,1
<b>Ugljeni hidrati</b>	50,5
<b>Mati</b>	12,0
<b>Celuloza</b>	1,9
<b>Vlaga</b>	5,0
<b>Pepeo</b>	6,5
<b>Vitamini</b>	<b>sadržaj (mg/100g)</b>
<b>Vitamin E</b>	1,3 - 3,7
<b>Vitamin C</b>	tragovi
<b>Vitamin B1</b>	0,09 - 0,36
<b>Vitamin B2</b>	0,03 - 0,15
<b>Vitamin B3</b>	1,15 - 4,80
<b>Vitamin B6</b>	0,03 - 0,18
<b>Minerali</b>	<b>sadržaj (mg/100g)</b>
<b>Natrijum</b>	25-80
<b>Kalijum</b>	800-2000
<b>Kalcijum</b>	120 – 190
<b>Magnezijum</b>	370 – 700
<b>Fosfor</b>	550 – 850
<b>Gvožđe</b>	10 – 30
<b>Bakar</b>	3 – 5
<b>Cink</b>	5 – 11
<b>Mangan</b>	2 – 5
<b>Sumpor</b>	75 - 210

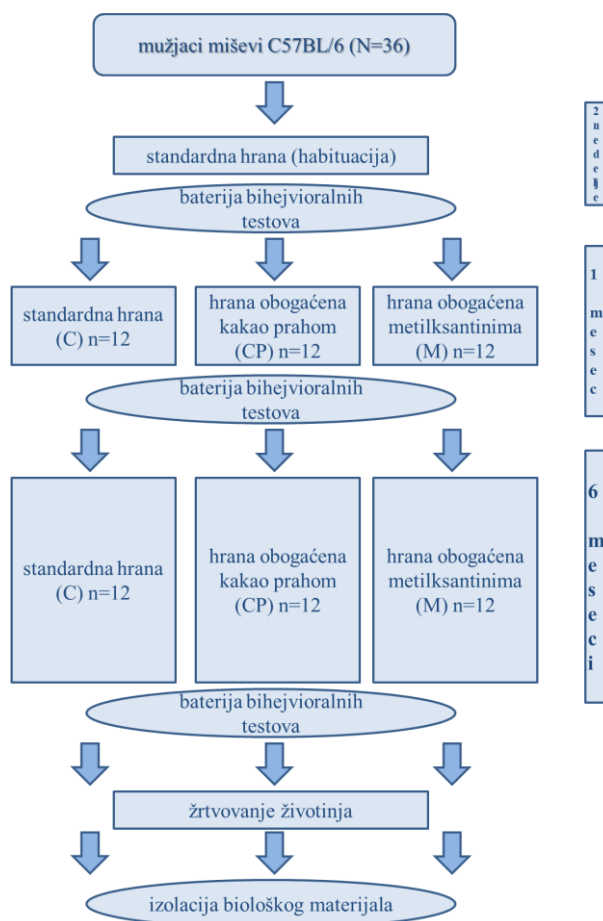
<b>Polifenoli</b>	<b>sadržaj (mg/g)</b>
<b>Ukupni flavan-3ol monomeri</b>	2,2
<b>Epikatehin</b>	1,4
<b>Metilksantini</b>	<b>sadržaj (mg/g)</b>
<b>Teobromin</b>	14,6
<b>Kofein</b>	5,2

Tabela 7. Sastav kontrolne (C), kakao (CP) i metilksantinske (M) hrane

<b>Energetska vrednost (MJ/kg)</b>	<b>C</b>	<b>CP</b>	<b>M</b>
	14,4	14,3	14,5
<b>Makronutrijenti</b>	<b>% (% energije)</b>	<b>% (% energije)</b>	<b>% (% energije)</b>
Proteini	18,4 (21,4)	18,3 (21,3)	18,2 (21,0)
Ugljeni hidrati	55,1 (64,1)	54,0 (63,0)	54,4 (63,0)
Masti	5,5 (14,5)	6,0 (15,7)	6,1 (15,9)
Celuloza	6,1	7,1	6,6
Vlaga	8,6	8,7	8,8
Pepeo	6,3	6,1	5,9
<b>Vitamini</b>	<b>sadržaj</b>	<b>sadržaj</b>	<b>sadržaj</b>
Vitamin A (I.J./kg)	min 12000	min 12000	min 12000
Vitamin E (mg/kg)	min 10	min 10	min 10
Vitamin D3 (I.J./kg)	min 2000	min 2000	min 2000
Vitamin K3 (mg/kg)	dodat	dodat	dodat
Vitamin C (mg/kg)	dodat	dodat	dodat
Vitamini B kompleksa	dodati	dodati	dodati
<b>Minerali</b>	<b>sadržaj</b>	<b>sadržaj</b>	<b>sadržaj</b>
Kalcijum (%)	min 1	min 1	min 1
Fosfor (%)	min 0,7	min 0,7	min 0,7
Natrijum (%)	0,15-0,20	0,15-0,20	0,15-0,20
Cink (mg/kg)	min 60	min 60	min 60
Bakar (mg/kg)	min 6	min 6	min 6
Mangan (mg/kg)	min 100	min 100	min 100
Jod (mg/kg)	min 0,8	min 0,8	min 0,8
Selen (mg/kg)	min 0,15	min 0,15	min 0,15
Kobalt (mg/kg)	dodat	dodat	dodat
<b>Dodaci</b>	<b>sadržaj</b>	<b>sadržaj</b>	<b>sadržaj</b>
Kakao prah (mg/kg)	0,0	30	0,0
Metilksantini (mg/kg)	0,0	0,87	0,87

### 3.2.2 Dizajn suplementacione studije

Dizajn suplementacione studije prikazan je na Slici 21.

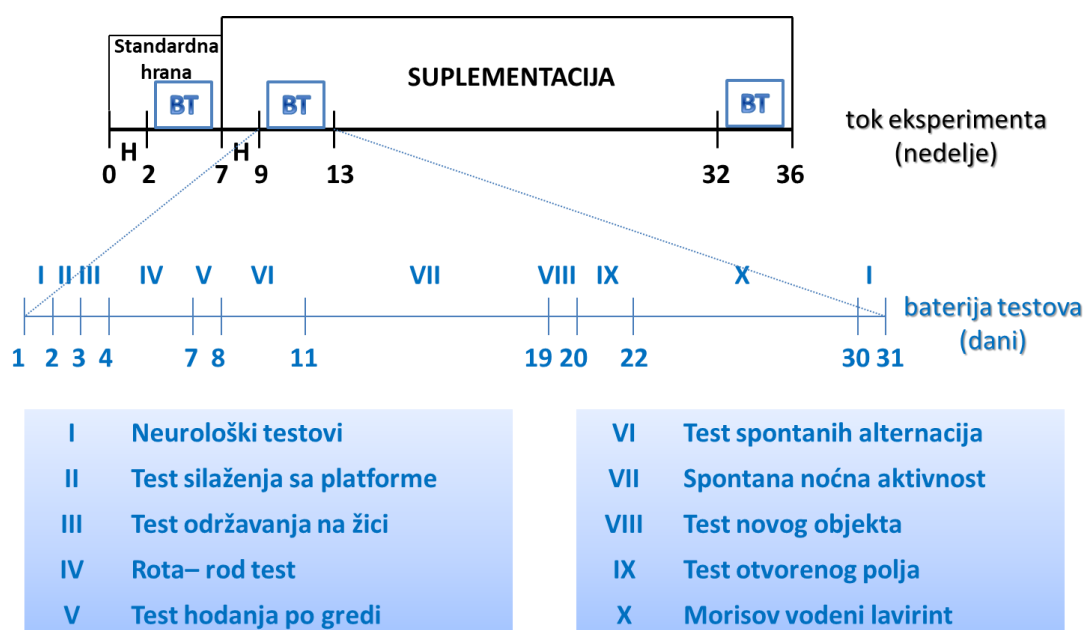


Slika 21. Šematski prikaz dizajna suplementacione studije

Legenda: C - kontrolna grupa miševa; CP - grupa miševa suplementiranih kakao prahom; M - grupa miševa suplementiranih metilksantinima

Sva ispitivanja sprovedena su na zdravim miševima C57BL/6 soja. Miševi starosti 12 nedelja bili su smešteni pojedinačno u standardnim kavezima od polipropilena sa poklopcima od nerđajućeg čelika (290 mm x 178 mm x 160 mm), na konstantnoj temperaturi od  $23 \pm 1$  °C i dnevno/noćnom ciklusu od 12h (osvetljenje od 6h do 18h, intenzitet svetla 120 lx). Uzimanje hrane i česemske vode bilo je *ad libitum*. Posle dvonedeljnog perioda habituacije na prisustvo eksperimentatora, miševi su nakon sprovedene baterije bihejvioralnih testova statistički (analiza glavne komponente (PCA)) podeljeni u tri jednake grupe (n =12 / grupi): kontrolna grupa – C; grupa suplementirana

kakao prahom (3 %) – CP; i grupa miševa suplementiranih metilksantinima (0,087%) – M (ista doza metilksantina kao u CP grupi). Eksperimentalni dizajn i baterija testova su prikazani na Slici 22. Suplementaciona studija ukupno je trajala šest meseci, pri čemu su životinje testirane nakon jednog meseca od početka suplementacije kao i na kraju šestomesečnog perioda suplementacije. Testiranje je rađeno u toku svetle faze (12 – 18h), izuzev spontane noćne aktivnosti koja je praćena u periodu od 20 – 08h. Telesna masa miševa merena je na nedeljnom nivou. Procena unosa hrane i vode (tokom perioda od 24 sata) praćena je tokom prvih, srednjih i poslednjih pet nedelja eksperimenta (trajanje baterije testova).



Slika 22. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna merenja ponašanja. Na gornjoj skali se može videti da su miševi testirani nakon kratkotrajne (1 mesec) i dugotrajne suplementacije (6 meseci). Na donjoj skali je prikazan redosled izvođenja testova po danima. Pojedinačni testovi su označeni rimskim brojevima. H – habituacija; BT – baterija testova

Sve životinje su svakodnevno nadgledane, te su tokom ekperimenata jedan miš u kontrolnoj grupi i jedan u CP grupi eutanazovani zbog prekomernog gubitka težine. Žrtvovanje dekapitacijom je sprovedeno nakon intraperitonealne aplikacija ketamina (50 mg/kg) i ksilazina (16 mg/kg).

### 3.2.2.1 Merenje ponašanja

U toku testiranja uvek je uzimana naizmenično po jedna životinja iz svake eksperimentalne grupe. Nakon testiranja svake životinje aparature su čišćene (sredstvo *Max Clean*), kako tragovi defekacije i urina ne bi uticali na analizirane parametre.

#### 3.2.2.1.1 Neurološki testovi

Potencijalni neurološki poremećaji koji bi mogli ometati odgovore životinja u bihevioralnim testovima proveravani su merenjem refleksa kroz četiri neurološka testa na početku i na kraju svake baterije.

Vizuleni refleks (*Visual Placing Reflex*): Životinja se drži za srednji deo repa i ujednačenim tempom se lagano spušta prema čvrstoj i tamnoj površini (ivica stola) do visine njuške i očiju, ne dodirujući je. Odgovor se smatra normalnim ukoliko životinja pruža prednje ekstremitete ka tamnoj površini želeći da se na nju osloni. Bilo koji drugi vid ponašanja ukazuje na probleme sa čulom vida testirane životinje.

Refleks spajanja zadnjih ekstremiteta (*The Hind-Limb Clasping Reflex*): Životinja se drži za srednji deo repa i podignuta je od podloge pri čemu se njeno ponašanje zadnjih ekstremiteta ocenjuje na skali od 0 do 3, i to tako da 0 predstavlja idealan odgovor tj. životinja skroz širi svoje ekstremitete, a ocena 3 se dodeljuje životinji koja ukršta zadnje ekstremitete i ukazuje na teške neurološke poremećaje.

Refleks uspravljanja (*The Righting Reflex*): Životinja se postavlja na žičanu mrežu, a mreža se okreće ka podlozi tako da leđa miša budu okrenuta nadole. Od životinje se očekuje da se što pre okrene i stane na sva četiri ekstremiteta na podlogu kao normalan odgovor. U suprotnom reč je o smetnjama u radu vestibularnog aparata životinje i može se evidentirati neurološki deficit.

Geotaksija (*Geotaxis*): Životinja se pozicionira na ravnu površinu stiropora koji se u odnosu na podlogu postavi pod uglom od 45 °. Glava životinje treba da bude okrenuta ka podlozi. Nakon pet minuta prati se odgovor koji se smatra standardnim ukoliko životinja krene ka gore tj. stigne do najvišeg kraja stiropora, odnosno suprotno sili Zemljine teže (negativna geotaksija).

#### 3.2.2.1.2 *Test silaženja sa platforme (Step-Down Test)*

Životinja se postavlja na staklenu platformu sa poklopcem od žičane mreže, dimenzija 10 x 8 cm, izdignutu od podloge ~6 cm u cilju testiranja straha od visine tj. akrofobije (Sakic i sar., 1994). U ove svrhe štopericom je merena latencija odnosno vreme koje protekne do momenta dok životinja sa sva četiri ekstremiteta ne siđe sa platforme. Maksimalna dužina testiranja testa po životinji iznosila je 5 minuta.

#### 3.2.2.1.3 *Test održavanja na žici (Hanging Basket Test)*

Životinja se postavlja na sredinu unutrašnje strane žičane mreže koja predstavlja poklopac kutije od providnog pleksiglasa, dimenzija 20 x 20 cm. Kada se životinja stabilizuje, kutija se okreće tako da životinja visi tj. održava se na žici u svrhu merenja izdržljivosti i mišićne snage njenih ekstremiteta (Mocholi i sar., 2011; Paylor i sar., 1998). Kao varijabla od interesa uzimano je vreme dok se životinja ne otkači sa žice (latencija) i maksimalno zadržavanje životinje na žici (*cut off*) je bilo 3 min. Test se radi u tri ponavljanja sa kratkim intervalima odmora između i u obzir se uzima srednja vrednost latencija.

#### 3.2.2.1.4 *Rota-rod test*

Motorna spretnost i senzomotorno učenje (Jones i Roberts, 1968) miševa procenjivani su na "rotarod" aparatu. Aparat (Treadmill 7600, Ugo Basile, Milano, Italija) se sastojao od rotirajućeg vretena prečnika 3 cm, podeljenog na pet jednakih arena širine 5,5 cm. Vreteno se okretalo konstantnom brzinom od 15 obrtaja u minuti. Na pod svake arene postavljan je komad papirne vate koji je omogućavao lako i efikasno čišćenje tragova urina i defekacija nastalih tokom testiranja. Miševi su testirani kroz tri pokušaja tokom tri uzastopna dana. Maksimalna dužina trajanja „vožnje“ rotarod aparata bila je 300 s. Za procenu motorne spretnosti i učenja merena je latencija do pada, odnosno vreme koje je životinja provela na rotirajućem cilindru pre pada.



### 3.2.2.1.5 Test hodanja po gredi (*Beam Walking Test*)

Uz rotarod test vrlo često se u bihevioralnim ispitivanjima za procenu motorne koordinacije i balansa koristi test hodanja po gredi (Carter i sar., 2001). Za potrebe ovog testa od providnog pleski glasa napravljena je greda, dimenzija 72,5 x 0,8 x 1,2 cm, na čijem početku se nalazila platforma (6 x 4 cm) koja je bila osvetljena belim svetlom. Na kraju grede nalazila se „kućica“ od crnog pleksiglasa koja je za analizirane miševе predstavljala sigurno sklonište. Celokupna aparatura bila je postavljena na visini od 70 cm. Sam protokol sastojao se od tri faze uvođenja životinje u eksperiment (*shaping* – životinja istražuje gredu tako što je eksperimentator postavlja sve dalje od skloništa: sam kraj grede, sredina grede, polazna platforma) i faze testiranja. Svaka životinja je u toku testiranja snimana video kamerom (Panasonic, SDR-H288) nakon čega su, pregledanjem usporenih snimaka za varijable od interesa, uzimani: vreme prelaska preko grede kao i broj proklizavanja prednjih i zadnjih ekstremiteta tokom prelaska grede (procena održavanja balansa i koordinacije pokreta na gredi).

### 3.2.2.1.6 Test spontanih alternacija (*Spontaneous Alternation Behaviour Test*)

U sklopu merenja ponašanja, a sa aspekta orijentacije, prostorne memorije i tendencije miševa da biraju delove aparatura u kojima nisu boravili do tada, test spontanih alternacija se često izvodi (Hughes, 2004). Korišćena aparatura u ovom testu bila je +-lavirint, dimenzija 15 x 25 x 10 cm i napravljen od sivog pleksiglasa, koji se sastojao se od četiri unakrsna kraka i četiri klizna separatora koji bi mogli da modifikuju oblik lavirinta u L, T ili + oblik. Postupak testiranja životinje uključivao je dve faze. Faza 1 podrazumevala je držanje miša pet sekundi na početnoj poziciji nakon čega mu je dopušteno da ode u levi ili desni krak lavirinta koji je bio otvoren. Po ulasku miša u randomizovano odabran krak separator se spušta, krak se zatvara i životinja se ostavlja u njemu 60 s. Faza 2 podrazumevala je da životinja opet kreće sa iste početne pozicije i sama bira krak u koji će da ode (oba su otvorena). Smatralo se da je životinja ušla u određeni krak lavirinta kada se u njemu nađe sa sve četiri šapice (Richman i sar., 1986). Ovakva dvofazna akvizicija ponovljena je pet puta nakon čega je usledio reverzni pokušaj. Reverzija je uključivala fazu 1 identičnu kao u akviziciji, dok je faza 2 počinjala sa početne pozicije 180° rotirane u odnosu na istu u akvizicionom delu

eksperimenta. Upravo ovakav protokol primenjen je u cilju provere nesigurnosti miševa (Bertholet i Crusio, 1991), tj. da li su za orijentaciju koristili svoje telo ili prostor. Pod pretpostavkom da je miš koristio prostornu strategiju za pamćenje spoljnih znakova, očekivalo se da nakon napuštanja nove početne pozicije ode u do tada neispitan novi krak lavirinta.

#### 3.2.2.1.7 *Spontana noćna aktivnost (Spontaneous Nocturnal Activity)*

Merenje spontane lokomotorne (noćne) aktivnosti vršeno je u uslovima crvenog svetla (20 lx) u četiri bele poluprozirne kutije od pleksiglasa na čijem dnu je bio tanak sloj piljevine, dimenzija 40 x 25 x 35 cm. Istovremeno su praćene četiri različite životinje čiji je raspored unapred bio randomizovano određen. Životinje su snimane kamerom (Microsoft DV Camera and VCR) u toku 12 sati, sa početkom od 20h, a preko ANY-maze softvera analizirana je ukupna pređena distanca svake životinje. Iz razloga uključivanja ventilacije u 06h koja je ometala spontano ponašanje životinja, za statističku analizu uzeto je prvih deset sati snimanja.

#### 3.2.2.1.8 *Test novog objekta (Novel Object Test)*

Sa ciljem ispitivanja kako lokomotornih tako i istraživačkih sposobnosti laboratorijskih životinja, test novog objekta vrlo često ima bitnu ulogu u merenju njihovog ponašanja (Sakic i sar., 2015). Navedeni segmenti ponašanja miševa su u našoj studiji mereni u „otvorenom kavezu“ tj. areni od sivog pleskiglasa, dimenzija 65 x 45 x 45 cm. U sobi je za vreme testiranja bilo uključeno indirektno belo svetlo jačine 20 lx. Protokol testa sastojao se iz prazne i pune faze. Prazna faza je predstavljala praćenje životinje u opisanoj areni u trajanju od pet minuta. Sve su životinje u arenu puštane iz istog ugla. Po završetku prazne otpočinjala je puna faza, i to unošenjem novog objekta u centar arene tako da je životinja praćena tokom sledećih pet minuta. Za snimanje životinja korišćena je kamera (Microsoft DV Camera and VCR), a softver ANY-maze za analizu željenih promenljivih: ukupna pređena distanca za lokomociju, a latencija, frekvencija i trajanje ispitivanja novog objekta za eksploraciju.

### 3.2.2.1.9 Test otvorenog polja (*Open Field Test*)

Kako bi se ispitao strah od otvorenog prostora odnosno potencijalna agorafobija, miševi su bili izloženi testu otvorenog polja (Denenberg, 1969; Walsh i Cummins, 1976). Test otvorenog polja izvođen je bez prethodne habituacije, u areni (drvena kutija sa podlogom od sivog pleksiglasa) dimenzija 100 x 100 x 50 cm, uz jako neonsko osvetljenje u trajanju od 20 minuta. Životinje su u arenu puštane uvek iz istog ugla. Za snimanje je korišćena kamera (Microsoft DV Camera and VCR), a za analizu varijabli softver ANY-maze. Arena je bila vizuelno podeljena na centralnu zonu (50 %) i tigmotaksičnu zonu (15 cm od zida arene). Parametri od značaja bili su ukupna pređena distanca i koliko je koja životinja provela u kojoj zoni arene.

### 3.2.2.1.10 Morisov vodeni lavirint (*Morris Water Maze Test*)

Poslednji test u bateriji sprovedenoj u ovoj studiji bio je i najkompleksniji, Morisov vodeni lavirint. Često ovaj test predstavlja zlatni standard u merenju sposobnosti prostornog učenja i pamćenja kod laboratorijskih miševa (Higaki i sar., 2018). Kao vodeni lavirint korišćen je beli okrugli bazen od polipropilena, prečnika 170 cm i visine 50 cm. Bazen je za svrhe eksperimenta punjen vodom temperature  $23 \pm 1$  °C do visine od 30 cm. Platforma od providnog pleskiglasa (prečnika 15 cm) koja predstavlja izlaz iz lavirinta je postavljena na dno bazena tako da se njena gornja površina nalazila 1 cm ispod nivoa vode (izuzev prvog dana). U prostoriji za testiranje nalazili su se vizuelni orjentiri poput vrata i cevi na zidovima i plafonu, a difuzno belo osvetljenje je bilo obezbeđeno neonskim lampama postavljenim na zid ispod nivoa gornje ivice bazena. Protokol testiranja miševa trajao je osam dana (Kapadia i sar., 2016): „obeleženi“ dan (na platformi je postavljan objekat tamne boje kako bi bila što uočljivija); četiri dana akvizicije (dani prostornog učenja i formiranja memorije, pri čemu je platforma bila postavljena na istom mestu kao i prvog dana testiranja, ali ispod nivoa vode); „*probe*“ dan (sve životinje plivaju 120 s u bazenu bez platforme radi formiranja dugoročne memorije i provere strategije učenja); „obeleženi“ reverzni dan (platforma je postavljena u suprotnom kvadrantu u odnosu na poziciju u danu 1); i reverzni dan (proveravanje da li prethodno naučeni odgovori potiskuju nove odgovore). Svakog dana životinje su puštane da plivaju četiri puta uzastopno u pokušaju da pronađu

platformu. U svakom pokušaju puštane su sa jedne od četiri randomizovano odabrane strane sveta. Nakon pronalaženja platforme životinja se na njoj zadržavala 60 sekundi kako bi formirala mapu prostora. Ukoliko životinja ne bi pronašla platformu za 120 sekundi, istraživač bi je odveo do platforme. Životinje su nakon testiranja bile brisane papirnom vatom. Eksperiment je sniman kamerom (Axis 212 PTZ Network Camera), a ANY maze softver je bio korišćen za deljenje arene na četiri kvadranta, na zone (centralna i tigmokasična), za obeležavanje zone platforme kao i analizu različitih promenljivih uglavnom povezanih sa orijentacijom ka poziciji platforme (latencija i distanca do platforme, prosečna brzina plivanja, gubitak tigmotaksije (tendencija plivanja uz ivicu bazena). Iz „probe“ dana u razmatranje je uzimano vreme koje životinja provede u ciljnom kvadrantu (gde je pre bila platforma).

### **3.2.3 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri miševa nakon dugotrajne suplementacije**

Nakon šestomesečne suplementacije kakao prahom i svih bihevioralnih ispitivanja miševi su žrtvovani dekapitacijom, u dubokoj anesteziji, izazvanoj intraperitonealnom aplikacijom anestetika ketamina (50 mg/kg) i ksilazina (16 mg/kg). Postupak izolacije jetre obavljen je brzo i na ledu u cilju očuvanja enzimske aktivnosti. Po izolaciji, jetra je ispirana fiziološkim rastvorom i zamrznuta u tečnom azotu, nakon čega je čuvana na -80°C do daljih analiza.

#### **3.2.3.1 Priprema homogenata jetre za određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite**

Odmereno tkivo je macerirano i homogenizovano u saharoznom puferu (0,25 M saharoza, 0,05 M TRIS, 1 mM EDTA, pH 7,4), tri puta u trajanju deset sekundi sa pauzom po deset sekundi, u homogenizeru (Heidolph DIAX 600) u skladu sa metodom Rossija i saradnika i Waziersa i Albrechta (Waziers i Albrecht, 1987; Rossi i Dianzani, 1988). Potom su uzorci sonifikovani pri jačini od 10 kHz, tri puta po 15 sekundi sa po 15 sekundi pauze (Takada i sar., 1982). Deo ovako tretiranih uzoraka je ultracentrifugiran (Beckam Coulter, Indianapolis, Indiana, US) na 85000 g, 90 min. Nakon centrifugiranja odvajanje supernatant i čuvan na -80°C. Deo pripremljenih sonifikata je korišćen za

određivanje količine glutationa, nakon taloženja proteina 10% sulfosalicilnom kiselinom i centrifugiranja 10 min na 3000 g, u supernatantu.

### 3.2.3.2 Određivanje koncentracije proteina

Spektrofotometrijska metoda korišćena je u svrhu određivanja koncentracije proteina (Lowry i sar., 1951). Metoda se bazira na reakciji  $\text{Cu}^{2+}$  sa peptidnim vezama proteina u baznoj sredini pri čemu dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$ . Nakon toga se u reakcionu smešu dodaje Folin Ciocalteu-ov reagens (fosfovolframova i fosfomolibdenska kiselina) koji reaguje sa  $\text{Cu}^+$  - protein kompleksom kao i sa bočnim lancima triptofana, tirozina i cisteina stvarajući u početku nestabilan kompleks koji se polako redukuje pri čemu se razvija plavo obojenje. Apsorbancija nastalog rastvora se meri na 500 nm, a intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja je očitavana sa standardne krive konstruisane određivanjem apsorbancije rastvora albumina poznate koncentracije. Koncentracija proteina je izražavana u mg/ml.

### 3.2.3.3 Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalaza je široko rasprostranjen enzim prisutan kod prokariota i eukariota. Veoma je važan učesnik u antioksidativnoj zaštiti organizma tako što katalizuje reakciju razgradnje toksičnog  $\text{H}_2\text{O}_2$  do kiseonika i vode.

Aktivnost katalaze određivana je metodom opisane od strane Beutlera (Beutler, 1971). Princip metode se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju raspada  $\text{H}_2\text{O}_2$ , standardne koncentracije 10 mM, pod dejstvom katalaze, na talasnoj dužini od 230 nm koja predstavlja apsorbcioni maksimum vodonik peroksida. Aktivnost katalaze izračunavana je preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta za vodonik peroksid koji iznosi 0,071, a rezultati su izražavani u jedinicama po mg proteina.

### 3.2.3.4 Određivanje aktivnosti ukupne superoksid-dismutaze (SOD)

SOD je osnovni enzim antioksidativne zaštite koji katalizuje prvu reakciju u nizu odgovora na kompromitovanu redoks ravnotežu.

Metoda koju su razvili Misra i Fridovich korišćena je za određivanje ukupne aktivnosti superoksid-dismutaze, uz male modifikacije (Misra i Fridovich, 1972). Za izvor superoksid anjon radikala primenjivan je adrenalin. Naime, autooksidacijom adrenalina u baznoj sredini nastaje  $O_2^{\bullet -}$  koji ubrzava ovu reakciju. Brzina reakcije praćena je spektrofotometrijski na 480 nm. Uloga superoksid-dismutaze je u inhibiranju autooksidacije adrenalina pri čemu stepen inhibicije reakcije predstavlja meru aktivnosti enzima. Za jedinicu aktivnosti SOD uzimana je zapremina uzorka, odnosno količina proteina, koja dovodi do 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom opsegu promene apsorbancije. SOD aktivnost je izražavana u jedinicama po mg proteina.

#### 3.2.3.5 Određivanje aktivnosti MnSOD i CuZnSOD

Određivanje MnSOD omogućeno je usled tretiranja reakcione smeše za određivanje ukupne aktivnosti SOD rastvorom 8 mM KCN (1:1). Zapravo, nakon ovakvog tretmana dolazi do inhibicije CuZnSOD cijanidom, na koji je MnSOD rezistentna. Detektovana aktivnost potiče isključivo od MnSOD.

Aktivnost CuZnSOD se dobija iz razlike vrednosti za ukupnu SOD aktivnost i vrednosti za MnSOD aktivnosti.

#### 3.2.3.6 Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GSH-Px)

Glutacion-peroksidaza je opšti naziv za familiju izoenzima, čija je osnovna biološka uloga da redukuju  $H_2O_2$  ili organske hidroperoksidi do molekula vode ili odgovarajućeg alkohola, uz pomoć redukovanog glutaciona koji ima ulogu donora elektrona (Halliwell i sar., 1999).

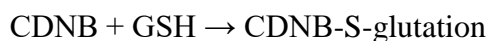
Za određivanje aktivnosti GSH-Px u supernatantu tkiva jetre primenjivana je metoda Paglia-a i Valentine-a (Paglia i Valentine, 1967). Princip metode zasniva se na osobini glutacion peroksidaze da katalizuje oksidaciju redukovanog glutaciona (GSH) u oksidovani glutacion (GSSG), uz redukciju velikog broja molekula hidroperoksida. Oksidovani glutacion se zatim ponovo redukuje do GSH uz NADPH (nikotinamid

adenin dinukleotid fosfat) kao donora vodonika, i glutation-reduktazu (GR) koja katalizuje ovu reakciju. Aktivnost GSH-Px je praćena posredno određivanjem potrošnje NADPH, odnosno oksidacije NADPH uz GR na 340 nm. Jedinica aktivnosti GSH-Px je definisana kao kolićina enzima koja oksiduje 1 nM NADPH u minuti i rezultati su izraženi u jedinicama po mg proteina.

#### 3.2.3.7 Određivanje aktivnosti glutation-S-tranferaze (GST)

Enzim GST ima osnovnu ulogu u katalizi metabolićkih reakcija ksenobiotika od strane glutatona (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Aktivnost GST je određivana po metodi Habig-a i saradnika (Habig i sar., 1974). Metoda se zasniva na sposobnosti enzima da katalizuje reakciju 1-hloro-2-4-dinitrobenzena (CDNB) sa -SH grupom glutatona. U reakciji nastaje kompleks CNDN-S-glutation, ćija se absorbancija meri na 340 nm.

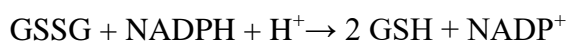


GST aktivnost je izraćunavana preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta CNDN (9,6) i izražavana u nM GSH/min/mg proteina.

#### 3.2.3.8 Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)

Enzim glutation-reduktaza (GR) je ukljućen u sistem antioksidativne zaštite i odgovoran je za sprećavanje štetnih efekata koje stvaraju endogeni i egzogeni hidroperoksidi (Ulus i sar., 2010).

Za određivanje aktivnosti glutation-reduktaze primenjena je metoda razvijena od strane Glatzle-a i saradnika (Glatzle i sar., 1974). Naime, glutation-reduktaza katalizuje redukciju oksidovanog glutatona (GSSG) uz oksidaciju NADPH, tako da je aktivnost GR praćena preko brzine oksidacije NADPH ćiji je maksimum apsorbacije na 340 nm.



Aktivnost je izražavana u jedinicama po mg tkiva, a jedinica je definisana kao nM NADPH oksidovanog u minuti.

#### 3.2.3.9 Određivanje ukupnog glutaciona

Glutation je endogeni antioksidans, uključen u različite ćelijske funkcije: metabolizam askorbata, održavanje interćelijske komunikacije, prevencija -SH grupa proteina od oksidacije i međusobnog povezivanja.

Količina ukupnog glutaciona (GSH + GSSG) merena je metodom Griffit-a (Griffith, 1980). Pincip metode ima reciklirajuće karakteristike: naizmenično se vrši oksidacija GSH sa 5, 5' ditio-bis-(2-nitrobenzoičnom kiselinom) (DTNB) i redukcija sa NADPH u prisustvu glutacion-reduktaze. Brzina formiranja 2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline prati se merenjem apsorbancije na 412 nm.

Količina glutaciona u uzorcima izračunavana je na osnovu prethodno konstruisane standardne krive različitih količina GSH. Rezultati su izražavani u  $\mu\text{M}$  GSH/min/mg tkiva.

### **3.2.4 Određivanje proteina u jetri miševa nakon dugotrajne suplementacije – Western blot**

Nakon šestomesečne suplementacije kakao prahom životinje su žrtvovane i uzeta im je jetra kako je opisano u poglavlju 3.2.3. Iz jetre su pripremljeni homogenati koji su bili podvrgnuti Western Blot analizi.

#### 3.2.4.1 Priprema homogenata jetre za Western Blot

Za Western Blot analizu, tkiva jetre koja su izolovana iz 4 životinje koje pripadaju istoj eksperimentalnoj grupi su sjedinjena nakon čega je pristupljeno pripremi homogenata. Tako sjedinjeno tkivo jetre je macerirano i potom homogenizovano u RIPA (*radio immuno precipitation buffer*) (2 M NaCl, 10% triton X-100, 0,5 M TRIS, 10% SDS, pH 7,5) puferu sa proteaznim inhibitorima (Roche), 3 puta deset sekundi sa po



deset sekundi pauze. Sonifikacija uzoraka je vršena na jačini od 10 kHz, 3 puta petnaest sekundi sa po petnaest sekundi pauze. Nakon toga sonifikat je ultracentrifugiran, 90 min na 85000 g. Dobijeni supernatanti su korišćeni za Western blot analizu.

### 3.2.4.2 Razdvajanje proteina na SDS-PAGE

Proteini su, na osnovu molekulske mase razdvajani SDS-poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u BioRad Mini-PROTEAN Tetra Cell sistemu. Da bi se razdvojili proteini iz prethodno pripremljenih uzoraka, najpre su nalivani gelovi za razdvajanje različitih procentnosti, čija je koncentracija određivana na osnovu molekulske mase ispitivanog proteina, a zatim je nalivan 5% gel za koncentrovanje. Komponente gelova za razdvajanje i gela za koncentrovanje su prikazane u Tabeli 8.

Tabela 8. Komponente gelova za razdvajanje i koncentrovanje proteina

12% gel za razdvajanje		10% gel za razdvajanje		5% gel za koncentrovanje	
dH <sub>2</sub> O	6,8 ml	dH <sub>2</sub> O	7,92 ml	dH <sub>2</sub> O	5,62 ml
30% bis/akrilamid	8 ml	30% bis/akrilamid	6,66 ml	30% bis/akrilamid	1,67ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5ml
10% SDS	200 µl	10% SDS	200 µl	10% SDS	100 µl
10% APS	200 µl	10% APS	200 µl	10% APS	100 µl
TEMED	2 µl	TEMED	2 µl	TEMED	1 µl

Dodavanje 0,05% amonijum persulfata (APS) i 0,033% N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) omogućilo je polimerizaciju gelova. Pufer za rezervoare se sastojao od 0,192 M glicina, 0,1% SDS i 0,025 M Tris, pH 8,3.

Neposredno pre nalivanja, uzorci su 2 puta razblaženi puferom za uzorke (4% SDS; 20% glicerol; 10% β-merkaptioetanol; 0,125 M Tris, pH 6,8; 0,025% brom fenol plavo). Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 min u ključaloj vodi u cilju potpune denaturacije proteina, nakon čega su snažno promešani i u jednakim količinama nanošeni u bunariće. Ukupna količina proteina po bunariću bila je 10 µg. Na svaki gel je nanošen proteinski marker koji se sastojao od proteina poznatih molekulske mase radi

provere molekulske mase ispitivanog proteina (Fermentas, Estonija). Proteini su razdvajani elektroforezom pri naponu od 120 V u trajanju od 60 do 90 min.

#### 3.2.4.3 Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu

Poliviniliden difluorid membrana (PVDF; Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) je aktivirana u metanolu u trajanju od 10 sekundi, isprana u dH<sub>2</sub>O i čuvana u puferu za transfer na 4°C do upotrebe. Nakon razdvajanja, proteini su sa gelova preneseni na aktivirane membrane. U tu svrhu membrane i gelovi su pažljivo pakovani i smeštani u rezervoare sa transfer puferom koji je sadržao 0,192 M glicin, 20% metanol i 0,025 M Tris, pH 8,3. Komponente za transfer, filter papiri i suđeri, takođe su pripremljeni potapanjem u pufer za transfer. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer po sledećem redosledu: suđer, filter papir, gel, membrane, filter papir i suđer, kasetu je ubačena u uređaj za transfer, prelivena puferom za transfer, a zatim izložena dejstvu električnog polja jačine 100 V, 60 min. Gel je postavljan bliže katodi, a membrana bliže anodi, pri čemu su se negativno naelektrisani proteini kretali ka anodi kada je i dolazilo do zaustavljanja proteina i njihovog vezivanja za membranu. Uspešnost transfera je proveravana sa 5% Ponceau S bojom rastvorenom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Ispiranjem destilovanom vodom membrane su odbojene, a zatim su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani - 5% BSA (*bovine serum albumine*) u Tris-boratnom puferu sa dodatkom Tween deterdženta (TBS-T: 0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,05% Tween20, pH 7,4) ili alternativno - 5% rastvorom obranog mleka u TBS-T. Nakon blokiranja membrane su inkubirane sa primarnim antitelom.

#### 3.2.4.4 Imunološka detekcija proteina (Western blot)

Western blot analiza je rađena kvantitativno. Podaci o antitelima kao i koncentracije korišćene u ovom eksperimentu prikazani su u Tabeli 9. Po blokiranju sa BSA, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima rastvorenim u 5% BSA, preko noći, na 4°C. Potom, one su ispirane od potencijalnog viška i inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca,

odnosno miša (*goat-anti rabbit HRP*, Santa Cruz Biotechnology, Inc. i *goat-anti mouse HRP*, BD Bioscience Pharmingen), u razblaženju 1 : 2000 (antitelo:5% BSA), 2 sata, na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane TBS rastvorom, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu, luminolu, uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 3 min. Nakon toga, rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (0,5-2 min). Filmovi su razvijani, te skenirani i korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

Alternativno, membrane su inkubirane u rastvoru 4-hloro- $\alpha$ -naftola uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do pojave traka (2-10 min), reakcija je prekidana ispiranjem membrane u destilovanoj H<sub>2</sub>O, a membrane su potom skenirane za kompjutersku kvantifikaciju.

Tabela 9. Primarna antitela korišćena za Western Blot

Antitelo	Proizvođač i kat. broj	Poreklo	razblaženje ili koncentracija	Mr (kD)
$\gamma$ GCS	Abcam, ab17926	zečje poliklonsko	5 $\mu$ g/ml	73
CuZnSOD	Santa Cruz Biotechnology, ab13498	zečje poliklonsko	1:300	~18
MnSOD	Chemicon, ab13533	mišje monoklonsko	1:1000	25
CAT	Abcam, ab18771	zečje poliklonsko	1:5000	59
GSH-Px	Abcam, ab59546	zečje poliklonsko	1:2000	27

Legenda:  $\gamma$ GCS - gama-glutamilstein-sintetaza; CuZnSOD - CuZn superoksid-dismutaza; MnSOD - Mn superoksid-dismutaza; CAT - katalaza; GSH-Px - glutation-peroksidaza

#### 3.2.4.5 Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom

Softverski paket ImageQuant korišćen je za analizu i kvantifikaciju rezultata. Naime, rezultati, izraženi putem integracije volumena, predstavljaju sumu vrednosti svih piksela pobuđenih signalom (1 piksel=0.007744 mm<sup>2</sup>) unutar označenog objekta (u našem slučaju trake), detektovanog na prethodno objašnjen način. Kada se ova vrednost umanji za *background* tj. fon pozadine, ona predstavlja *volume* tj. intenzitet zatamnjenja na celoj površini trake.

### 3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za prikaz sveobuhvatnijeg profila antioksidativnog kapaciteta analiziranih kakao proizvoda matematičkim putem izračunavan je antioksidativni kompozitni indeks (ACI). Naime, vrednost 100% dodeljena je najvišem rezultatu antioksidativne aktivnosti za svaki test (DPPH, FRAP, TEAC) nakon čega je ACI indeks određen za sve ostale rezultate u jednom testu prema formuli:

$$\text{Indeks antioksidativnog potencijala (\%)} = [(\text{rezultat za uzorak/najbolji rezultat}) \times 100]$$

Srednja vrednost indeksa antioksidativnog potencijala ova tri testa predstavljala je ACI vrednost za određeni kakao proizvod (Seeram i sar., 2008).

Podaci su analizirani u SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) i GraphPad Prism 6 softveru. Rezultati su izražavani kao srednje vrednosti sa odgovarajućim standardnim odstupanjima (devijacijama ili greškama). Pre statističke obrade, podaci su testirani na homogenost i normalnu raspodelu.

Za razliku između grupa kakao proizvoda korišćeni su Studentov t-test i Analiza varijanse (ANOVA). U ogleđima suplementacione studije korišćeni su sledeći testovi: PCA analiza u cilju ujednačavanja grupa pre početka suplementacije; ANOVA sa ponovljenim merenjima za ispitivanje efekata faktora suplementacije, dok su prilikom analize određenih testova ponašanja vremenski interval, pokušaj i dan predstavljali zavisne faktore varijabilnosti unutar grupe; multivarijantna analiza varijanse (MANOVA) u okviru pojedinih vremenskih intervala, ANOVA u tački nakon dugotrajne suplementacije; LSD i Tukey *post hoc* testovi za utvrđivanje razlike između grupa; studentov t-test za uparene uzorke prilikom posmatranja pojedinačne grupe u toku vremena;  $\lambda^2$  test za analizu razlika između grupa u proporciji miševa koji su kao odgovor dali spontane alternacije.

Pirsonov koeficijent korelacije primenjivan je za proveravanje odnosa između promenljivih. U svim statističkim testovima značajnim su smatrane vrednosti  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 SADRŽAJ BIOLOŠKI AKTIVNIH SASTOJAKA KAKAO PRAHA

Kakao prah je proizvod koji se često dalje obrađuje. Jedan od najčešće primenjivanih tretmana prilikom obrade jeste proces alkalizacije. Ovo je proces star čak 180 godina i u osnovi predstavlja tretiranje sa alkalnim rastvorom koji neutrališe kisele karakteristike kakaoa do neutralne pH vrednosti. Pored promena fizičkih i senzornih karakteristika (intenzivniji "čokoladni" ukus, tamnija boja i manja adstrigencija), neizbežne su i hemijske modifikacije kakao praha kao posledice alkalizacije. Dodatno, proces proizvodnje čokolade uključuje i druge tretmane kao što su mešanje, ponovna alkalizacija, končiranje, oblikovanje. Ovi procesi takođe značajno utiču na karakteristike konačnog proizvoda. Uzimajući u obzir navedene činjenice postavljen je prvi eksperimentalni cilj ove doktorske disertacije, te je u pogledu sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina kao i sastava i sadržaja pojedinačnih fenola i metilksantina analizirano i poređeno šest nativnih i pet alkalizovanih kakao prahova.

U Tabeli 10 prikazan je sadržaj ukupnih polifenola (TP), flavonoida (TF) kao i sadržaj proantocijanidina (PA) šest prirodnih (CP1 - CP6) i pet alkalizovanih kakao prahova (CP7 - CP11).

Sadržaj TP kretao se od 41,55 mg GAE/g u prirodnom kakao prahu CP3 do 10,67 mg GAE/g u alkalizovanom kakao prahu CP9, dok je TF sadržaj istih uzoraka bio 95,21  $\mu$ mol CE/g u CP3 i 27,58  $\mu$ mol CE/g u CP9. Sadržaj proantocijanidina varirao je između 8,51 mg CiE/g u CP3 i 0,95 mg CiE/g u CP9 (Tabela 10).

Tabela 10. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina u kakao prahu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, n=3.

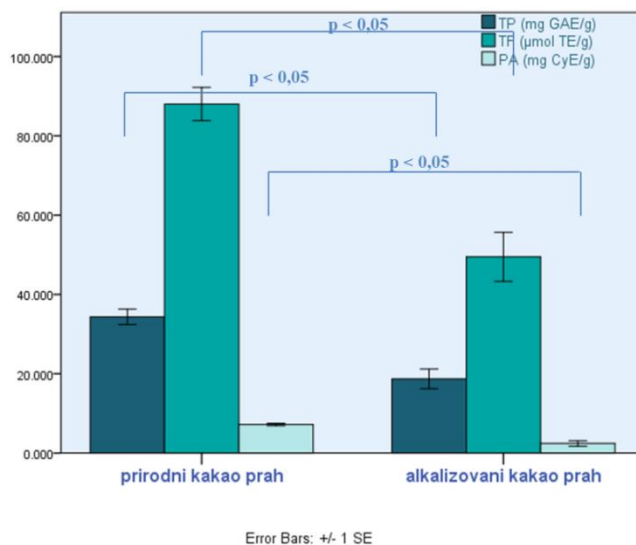
kakao prah	TP (mg GAE/g)	TF ( $\mu$ mol CE/g)	PA (mg CyE/g)
CP1	34,34 $\pm$ 1,99	97,38 $\pm$ 1,41	6,76 $\pm$ 0,78
CP2	34,69 $\pm$ 1,46	84,87 $\pm$ 2,65	6,49 $\pm$ 0,89
CP3	41,55 $\pm$ 1,71	95,21 $\pm$ 1,62	8,51 $\pm$ 0,95
CP4	36,14 $\pm$ 2,79	97,85 $\pm$ 1,95	6,57 $\pm$ 0,52

CP5	26,83±3,25	78,90±2,48	7,43±0,87
CP6	32,58±2,38	73,91±1,85	7,38±0,66
CP7	19,83±1,61	55,74±1,24	1,09±0,05
CP8	22,21±1,43	55,57±0,94	2,81±0,12
CP9	10,67±2,36	27,58±1,51	0,95±0,08
CP10	24,92±1,47	63,38±1,25	4,71±0,51
CP11	15,94±0,99	45,19±1,41	2,57±0,32

Legenda: TP - ukupni polifenoli; TF - ukupni flavonoidi; PA - ukupni proantocijandini, GAE - ekvivalent galne kiseline; CE - katehin ekvivalent; CyE - cijanidin hlorid ekvivalent

Polifenoli su jedinjenja nestabilna u alkalnoj sredini usled koje oni mogu podleći različitim reakcijama kao što su: oksidativna degradacija, epimerizacija, polimerizacija monomernih do oligo- i polimernih jedinjenja (Zhu i sar., 2003). Dosadašnji objavljeni rezultati ispitivanja uticaja procesa alkalizacije na sadržaj 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. Slične promene su zapažene u ukupnom sadržaju flavonoida i proantocijanidina u našoj studiji, ali i u drugim studijama (Andres-Lacueva i sar., 2008; Gu i sar., 2006). Interesantno je da su najniže vrednosti TP, TF i PA sadržaja procenjene za alkalni kakao prah CP9 koji se od početka eksprimenata izdvajao po karakterističnoj intenzivno tamnoj boji. Dodatno, zapažene su i varijacije unutar svake grupe što može sugerisati da na sadržaj ispitivanih bioaktivnih komponenti kakao praha može uticati vrsta kakao zrna, način obrade kao što su pečenje i fermentacija, ali i stepen i postupak procesa alkalizacije (Arteel i sar., 2000).

Na osnovu Studentovog t-testa za nezavisne uzorke (Slika 23) može se zaključiti da su alkalizovani kakao prahovi statistički značajno bili oskudniji u pogledu TP ( $t_9 = 5,010$ ,  $p = 0,001$ ), TF ( $t_9 = 5,303$ ,  $p < 0,001$ ) i PA ( $t_9 = 6,745$ ,  $p < 0,001$ ) sadržaja u poređenju sa prirodnim kakao prahovima.



Slika 23. Uporedna analiza sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina kakao praha

Legenda: TP - ukupni polifenoli; TF - ukupni flavonoidi; PA - ukupni proantocijanidini, GAE - ekvivalent galne kiseline; CE - katehin ekvivalent; CyE - cijanidin hlorid ekvivalent

Sastav i sadržaj biološki aktivnih jedinjenja u prirodnim i alkalizovanim kakao prahovima određen HPLC-DAD-MS analizom prikazan je u Tabeli 11 i Tabeli 12.

Hromatografska analiza kakao ekstrakata omogućila je identifikaciju i kvantifikaciju dva metilksantinska jedinjenja: teobromin (prosečna vrednost 14,100 mg/g) i kofein (prosečna vrednost 5,838 mg/g). Ovo su bile komponente zastupljene u najvećoj količini u svim analiziranim kakao prahovima (Tabela 11).

Tabela 11. Sadržaj metilksantina u kakao prahu. Rezultati, izraženi u mg/g kakao praha, prikazani su kao srednja vrednost ± standardna devijacija, n=3.

	teobromin	kofein
CP1	14,619±0,807	5,200± 0,040
CP2	12,960±0,680	4,738± 0,125
CP3	13,430±0,338	4,912± 0,042
CP4	14,462±0,518	6,800± 0,110
CP5	15,852±0,295	7,417± 0,085
CP6	16,061±0,968	7,980±0,109
CP7	14,753±0,642	6,272±0,118
CP8	11,472±0,292	3,704±0,150

<b>CP9</b>	12,018±0,260	4,449±0,347
<b>C10</b>	15,242±0,666	6,992±0,178
<b>CP11</b>	14,227±0,214	5,757±0,188

U kakao ekstraktima, hromatografskim razdvajanjem uočeno je pored metilksantina i 15 pikova polifenolnih jedinjenja koji su dalje identifikovani na osnovu njihove MS fragmentacije. Nakon kvantifikacije primenom adekvatnih stadarda, uočeno je da su najprisutnije polifenolne komponente katehini (flavan-3oli). Naime, dominantna fenolna struktura jeste monomerni flavan-3ol, epikatehin, koga slede njegov izomer katehin i veoma sličan derivat galokatehin. Sadržaj epikatehina u uzorcima kretao se od 0,304 mg/g u alkalnom kakao prahu CP9 do gotovo šest puta veće vrednosti u prirodnom kakao prahu CP3. Katehinska frakcija kakao prahova bila je upotpunjena prisustvom oligomernih jedinjenja: procijanidina A, B i C izomera. Od flavonoida u analiziranim uzorcima kvantifikovan je još i kvercetin, ali u daleko nižim koncentracijama (0,028 mg/g). Flavonoidni profil analiziranih uzoraka kakao praha veoma je sličan onom koji su odredili Pedan i saradnici ispitujući antioksidativnu aktivnost kondenzovanih kakao polifenola (Pedan i sar., 2016). Karakterizacijom biološki aktivnih jedinjenja kakao prahova kvantifikovana su i jedinjenja iz grupe fenolnih kiselina, i to derivati hidroksibenzojeve kiseline: kafeoil-asparaginska i protokatehnična kisleina. Takođe HPLC-DAD-MS analizom potvrđen je nalaz Sanbongi i saradnika da kakao sadrži dve veoma karakteristične komponente, derivate ruzmarinske kiseline: klovamid i njegov analog deoksikovamid (Sanbongi i sar., 1998).



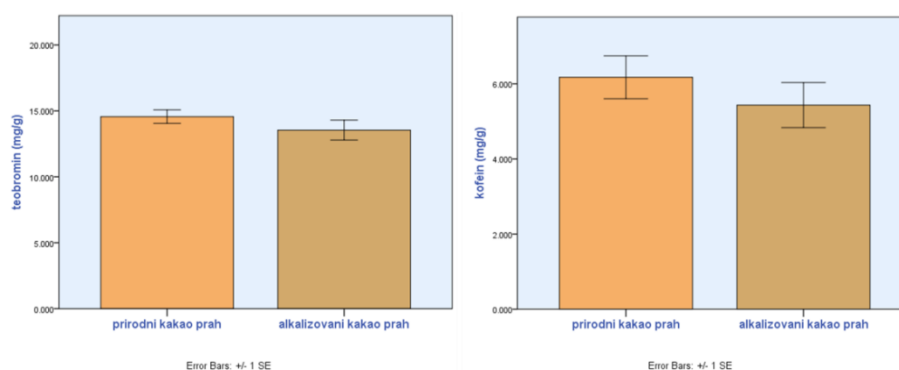
Tabela 12. Sastav i sadržaj polifenolnih jedinjenja u kakao prahu. Rezultati, izraženi u mg/g kakao praha, prikazani su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, n=3.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	C10	CP11
<b>epikatehin</b>	1,361 $\pm$ 0,037	1,374 $\pm$ 0,037	1,816 $\pm$ 0,022	1,337 $\pm$ 0,024	1,460 $\pm$ 0,028	1,290 $\pm$ 0,028	0,554 $\pm$ 0,026	0,651 $\pm$ 0,025	0,304 $\pm$ 0,009	0,755 $\pm$ 0,032	0,561 $\pm$ 0,019
<b>katehin</b>	0,631 $\pm$ 0,009	0,625 $\pm$ 0,007	0,690 $\pm$ 0,010	0,632 $\pm$ 0,014	0,670 $\pm$ 0,029	0,650 $\pm$ 0,031	0,363 $\pm$ 0,009	0,385 $\pm$ 0,014	0,255 $\pm$ 0,023	0,418 $\pm$ 0,024	0,402 $\pm$ 0,021
<b>galokatehin</b>	0,290 $\pm$ 0,031	0,279 $\pm$ 0,012	0,258 $\pm$ 0,011	0,244 $\pm$ 0,033	0,311 $\pm$ 0,012	0,281 $\pm$ 0,024	0,219 $\pm$ 0,016	0,238 $\pm$ 0,016	0,216 $\pm$ 0,010	0,257 $\pm$ 0,009	0,232 $\pm$ 0,005
<b>procijanidin B izomer</b>	0,037 $\pm$ 0,005	0,034 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,002	0,047 $\pm$ 0,001	0,088 $\pm$ 0,016	0,051 $\pm$ 0,007	0,022 $\pm$ 0,006	0,036 $\pm$ 0,008	0,026 $\pm$ 0,008	0,027 $\pm$ 0,007	0,025 $\pm$ 0,002
<b>procijandidin B1</b>	0,102 $\pm$ 0,005	0,250 $\pm$ 0,011	0,073 $\pm$ 0,011	0,113 $\pm$ 0,012	0,197 $\pm$ 0,008	0,2052 $\pm$ 0,008	0,042 $\pm$ 0,005	0,135 $\pm$ 0,009	0,110 $\pm$ 0,011	0,352 $\pm$ 0,048	0,055 $\pm$ 0,009
<b>procijanidin B izomer</b>	0,033 $\pm$ 0,002	0,033 $\pm$ 0,008	0,019 $\pm$ 0,003	0,169 $\pm$ 0,021	0,055 $\pm$ 0,007	0,022 $\pm$ 0,003	nd	0,022 $\pm$ 0,004	0,023 $\pm$ 0,004	0,128 $\pm$ 0,011	0,033 $\pm$ 0,012
<b>procijanidin B izomer</b>	0,1778 $\pm$ 0,013	0,200 $\pm$ 0,015	0,126 $\pm$ 0,002	0,184 $\pm$ 0,020	0,319 $\pm$ 0,037	0,261 $\pm$ 0,002	0,080 $\pm$ 0,018	0,173 $\pm$ 0,023	0,094 $\pm$ 0,004	0,184 $\pm$ 0,024	0,105 $\pm$ 0,016
<b>procijanidin C1</b>	0,043 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,001	0,035 $\pm$ 0,002	nd	0,066 $\pm$ 0,002	0,0545 $\pm$ 0,003	0,034 $\pm$ 0,002	0,047 $\pm$ 0,003	0,037 $\pm$ 0,003	0,039 $\pm$ 0,002	0,046 $\pm$ 0,005
<b>procijanidin C izomer</b>	0,042 $\pm$ 0,002	0,038 $\pm$ 0,002	0,033 $\pm$ 0,001	nd	0,060 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,003	nd	0,047 $\pm$ 0,003	0,031 $\pm$ 0,002	nd	0,037 $\pm$ 0,003
<b>procijanidin A izomer</b>	0,045 $\pm$ 0,006	0,101 $\pm$ 0,009	nd	0,018 $\pm$ 0,006	0,199 $\pm$ 0,027	0,109 $\pm$ 0,018	0,053 $\pm$ 0,006	0,053 $\pm$ 0,002	nd	0,132 $\pm$ 0,028	0,115 $\pm$ 0,035
<b>kafeoil-asparaginska kiselina</b>	0,054 $\pm$ 0,004	0,018 $\pm$ 0,004	0,037 $\pm$ 0,002	0,050 $\pm$ 0,002	0,061 $\pm$ 0,002	0,068 $\pm$ 0,001	0,055 $\pm$ 0,001	0,030 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,002	0,030 $\pm$ 0,001	0,025 $\pm$ 0,003
<b>protokatehuidna kiselina</b>	0,063 $\pm$ 0,013	0,218 $\pm$ 0,009	0,128 $\pm$ 0,007	0,085 $\pm$ 0,001	0,068 $\pm$ 0,001	0,074 $\pm$ 0,005	0,098 $\pm$ 0,002	0,057 $\pm$ 0,003	0,168 $\pm$ 0,007	0,134 $\pm$ 0,010	0,195 $\pm$ 0,002
<b>klovamid</b>	0,015 $\pm$ 0,002	nd	0,007 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,002	0,029 $\pm$ 0,003	0,022 $\pm$ 0,010	0,019 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,001	nd	0,009 $\pm$ 0,002	nd

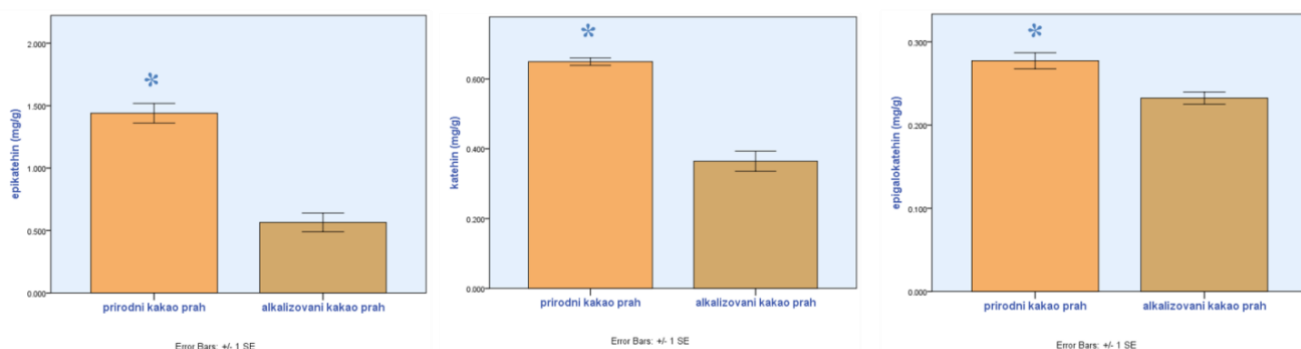
<b>deoksiklovamid</b>	0,011± 0,002	0,008± 0,000	0,012± 0,001	0,018± 0,001	0,021± 0,002	0,016± 0,003	0,014± 0,004	0,007± 0,002	0,006± 0,002	0,018± 0,005	0,015± 0,002
<b>kvercetin</b>	0,028± 0,002	0,010± 0,001	0,023± 0,004	0,034± 0,005	0,040± 0,002	0,040± 0,004	0,036± 0,002	0,023± 0,003	0,010± 0,001	0,040± 0,008	0,020± 0,002

Legenda: nd - nije detektovano

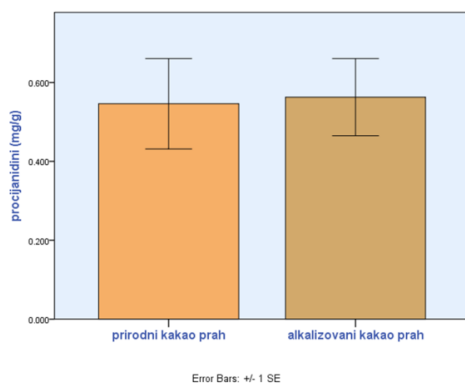
Primenom Studentovog t-testa za nezavisne uzorke razmatrana je razlika između sadržaja navedenih komponenti u alkalizovanim i prirodnim kakao prahovima (Slike 24 - 28). Može se uočiti da se sadržaj purinskih alkaloida statistički nije razlikovao između grupa. Dobijeni rezultat u skladu je sa nalazom ispitivanja uticaja alkalizacije na sadržaj bioaktivnih i isparljivih jedinjenja kakao praha u kome je pokazano višestruko manje sniženje koncentracije metilksantina u odnosu na druge komponente (Li i sar., 2012). Što se fenolnih jedinjenja tiče, statistički značajne razlike uočene su samo kod osnovnih polifenolnih struktura (epikatein ( $t_9 = 7,948$ ,  $p < 0,001$ ), katehin ( $t_9 = 9,989$ ,  $p < 0,001$ ), galokatehin ( $t_9 = 3,561$ ,  $p = 0,006$ ). Potencijalno objašnjenje ovakvog rezultata može biti daleko niža koncentracija ostalih fenolnih jedinjenja u uzorcima kakao praha kao i visoke standardne devijacije u grupama.



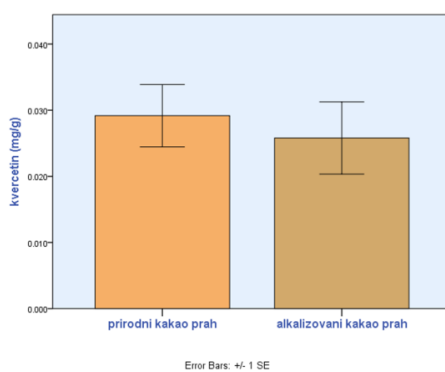
Slika 24. Uporedna analiza sadržaja metilksantina alkalizovanih i prirodnih kakao prahova



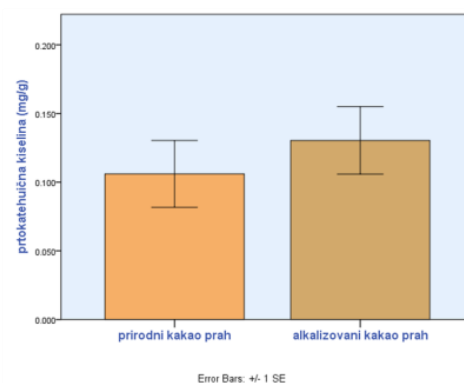
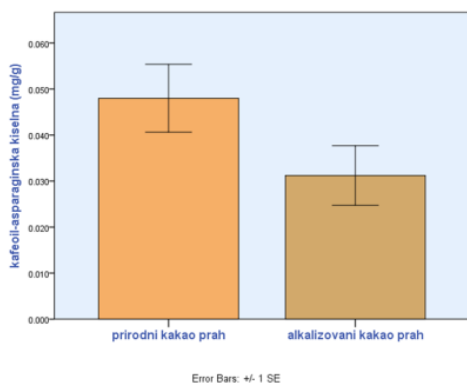
Slika 25. Uporedna analiza sadržaja monomernih flavan-3-ola alkalizovanih i prirodnih kakao prahova

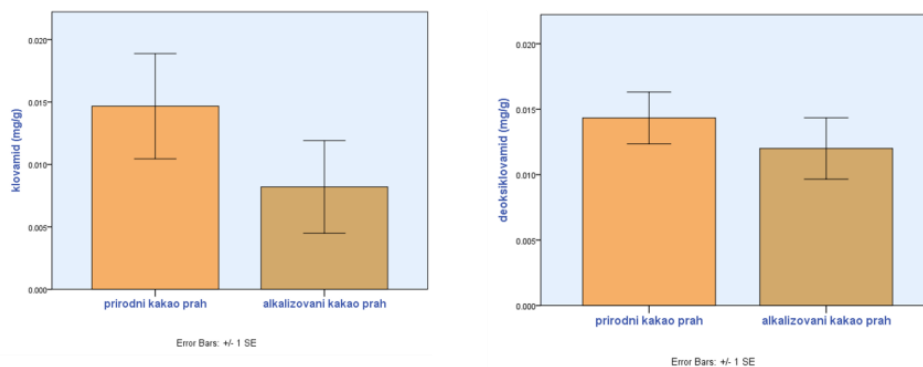


Slika 26. Uporedna analiza sadržaja zbirnih procijanidina alkalizovanih i prirodnih kakao prahova



Slika 27. Uporedna analiza sadržaja flavonola-kvercetina alkalizovanih i prirodnih kakao prahova





Slika 28. Uporedna analiza sadržaja neflavonoidnih jedinjenja alkalizovanih i prirodnih kakao prahova

Kod epikatehina i njegovog izomera katehina, zanimljivo je da je koncentracija epikatehina 62,5% bila niža u grupi alkalizovanih kakao prahova, dok je u slučaju katehina sniženje iznosilo 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 epikatehina, 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). Mazor Jolić i saradnici su čak u svojoj studiji pokazali povećan sadržaj kakao katehina kao posledicu procesa alkalizacije usled epimerizacije (Mazor i sar., 2011). Proces epimerizacije se smatra nepovoljnim uzimajući u obzir veću biološku aktivnost epikatehina u odnosu na katehin u finalnim kakao proizvodima (Donovan i sar., 2006). Drugo potencijalno objašnjenje za promenjen odnos epikatehin/katehin može biti da je u uslovima alkalizacije (visoka temperatura, visok pH) epikatehin kao cis-izomer manje stabilan u poređenju sa trans-izomerom katehina.

## 4.2 SADRŽAJ BIOLOŠKI AKTIVNIH SASTOJAKA ČOKOLADE

Čokolada je omiljeni kakao proizvod svih generacija. S obzirom na njenu veliku svetsku potrošnju (prosečno 2 kg po glavi stanovnika godišnje), ona predstavlja veoma značajan dijetarni izvor svih biološki aktivnih kakao jedinjenja. S obzirom da do sada nije bilo detaljnog izveštaja o sadržaju bioaktivnih jedinjenja u čokoladama proizvedenim u Srbiji, jedan deo ove studije posvećen je njihovoj analizi.

U Tabeli 13 prikazan je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina, spektrofotometrijski određenih u pet mlečnih i sedam crnih čokolada od kojih su dve bile sa dodacima maline. U crnim čokoladama sadržaj deklariranih kakao delova je varirao od 60 % do 75 %, dok se kod mlečnih čokolada nalazio u opsegu od 25 % do 29 %.

Primećeno je da su crne čokolade sa ili bez maline bile veoma slične u pogledu sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida sa rasponom 7,21-12,65 mg GAE/g za polifenole i 11,3-24,4 mmol CE/g za flavonoide. U mlečnim čokoladama sadržaj ovih klasa fenolnih jedinjenja bio je u proseku četiri puta niži u poređenju sa crnim čokoladama. Koncentracija proantocijanidina u ekstraktima čokolada varirala je između 0,69 mg CyE/g u mlečnim i 3,68 mg CyE/g u crnim čokoladama i pratila je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida u svim analiziranim uzorcima.

Tabela 13. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina u čokoladi.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, n=3.

čokolada	TP (mg GAE/g)	TF ( $\mu$ mol CE/g)	PA (mg CyE/g)
MC1	2,70 $\pm$ 0,06	4,64 $\pm$ 0,32	0,49 $\pm$ 0,01
MC2	2,90 $\pm$ 0,03	5,37 $\pm$ 0,53	0,71 $\pm$ 0,03
MC3	2,91 $\pm$ 0,18	6,34 $\pm$ 0,50	0,88 $\pm$ 0,00
MC4	2,98 $\pm$ 0,06	6,02 $\pm$ 0,14	0,84 $\pm$ 0,05
MC5	2,03 $\pm$ 0,16	4,42 $\pm$ 0,32	0,53 $\pm$ 0,04
DC1	12,65 $\pm$ 0,45	24,35 $\pm$ 0,58	3,68 $\pm$ 0,03
DC2	12,05 $\pm$ 0,69	23,20 $\pm$ 1,70	2,37 $\pm$ 0,13
DC3	10,42 $\pm$ 0,23	16,89 $\pm$ 0,74	1,77 $\pm$ 0,08
DC4	10,63 $\pm$ 0,69	19,92 $\pm$ 0,92	1,85 $\pm$ 0,04
DC5	7,21 $\pm$ 0,49	11,28 $\pm$ 0,85	1,87 $\pm$ 0,07
DCR1	12,04 $\pm$ 0,95	20,24 $\pm$ 2,26	2,12 $\pm$ 0,14
DCR2	11,27 $\pm$ 0,88	19,94 $\pm$ 2,67	2,42 $\pm$ 0,13

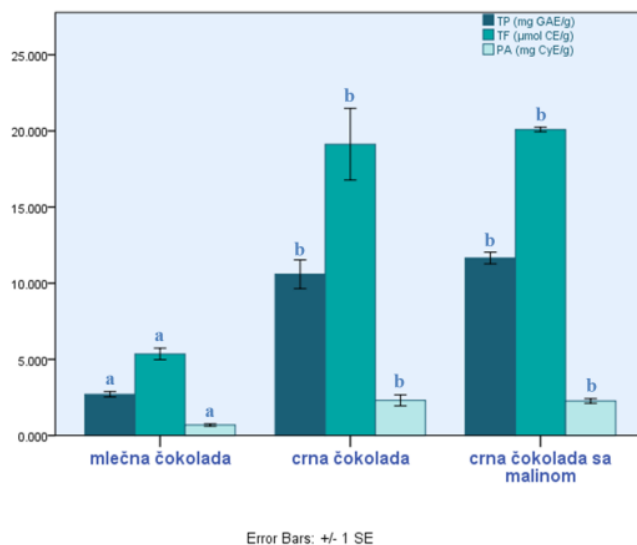
Legenda: TP - ukupni polifenoli; TF - ukupni flavonoidi; PA - ukupni proantocijandini, GAE - ekvivalent galne kiseline; CE - katehin ekvivalent; CyE - cijanidin hlorid ekvivalent

Svi analizirani uzorci u grupi tamnih čokolada, iako proizvedeni od različitih proizvođača, sadržali su sličnu količinu ukupnih polifenola i flavonoida, osim jedne crne čokolade DC5 koja je imala znatno niže vrednosti. Slično je primećeno i u grupi mlečnih

čokolada gde je uzorak MC5 zaostajao u pogledu sadržaja određivanih jedinjenja. S obzirom da je vrednost deklariranih kakao delova ovih čokolada (DC5 i MC5) bila slična ostalim uzorcima shodno grupi, može se zaključiti da kvalitet polazne sirovine kao i proces proizvodnje značajno doprinose kvalitetu finalnog proizvoda u pogledu sadržaja biološki aktivnih jedinjenja.

Belsčak-Cvitanović i saradnici, između ostalih kakao proizvoda, analizirali su različite čokolade u pogledu sadržaja ukupnih polifenola koristeći vodu kao ekstrakcioni rastvarač (Belscak-Cvitanovic i sar., 2012). Više vrednosti dobijene u našoj studiji mogu se objasniti primenom acetona kao sredstva za ekstrakciju, što potvrđuje manju ekstraktivnu efikasnost vode u poređenju sa organskim rastvaračima u slučaju fenolnih jedinjenja. Komparacija dobijenih rezultata se može napraviti sa podacima koje su saopštili Miller i saradnici o sadržaju ukupnih polifenola čokoladnih proizvoda u SAD (Miller i sar., 2006) i sa rezultatima sadržaja flavonoida prikazanih u radu Pimentela i saradnika (Pimentel i sar., 2010).

Primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), analizirana je razlika između grupa u pogledu sadržaja TP ( $F(2, 11) = 47,391, p < 0,001$ ), TF ( $F(2, 11) = 22,779, p < 0,001$ ) i PA ( $F(2, 11) = 12,345, p = 0,003$ ) i nakon LSD *post hoc* testa uočeno je da se grupa mlečnih čokolada izdvojila po smanjenom sadržaju svih analiziranih fenolnih frakcija od druge dve grupe, grupe crnih čokolada i grupe crnih čokolada sa dodatkom malinom (Slika 29). Interesantno je da su udeo maline od 4% u čokoladi sa 60% kakao delova i udeo maline od 1,6% u čokoladi sa 70% kakao delova imali za ishod veoma sličan sadržaj ukupnih polifenola, što ukazuje da se dodacima sa prirodno visokim sadržajem polifenola može nadoknaditi smanjeni sadržaj kakao praha u čokoladama.



Slika 29. Uporedna analiza sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina u različitim vrstama čokolada

Legenda: TP - ukupni polifenoli; TF - ukupni flavonoidi; PA - ukupni proantocijanidini, GAE - ekvivalent galne kiseline; CE - katehin ekvivalent; CyE - cijanidin hlorid ekvivalent

Sadržaj metilksantina u analiziranim čokoladama predstavljen je u Tabeli 14. Kao što je i očekivano, teobromin je bio vodeća bioaktivna komponenta čokolada (5,5 - 14,6 mg/g). Sadržaj teobromina je pratio deklarirani sadržaj kakao delova, te je u crnim čokoladama bio u proseku dva puta veći nego u mlečnim čokoladama. Primećeno je da se odnos teobromina i kofeina značajno razlikovao u zavisnosti od vrste čokolade, te je on iznosio 13 : 1 u crnim čokoladama, a 30 : 1 u mlečnim čokoladama. Ovakva pojava sugerira značajan uticaj proizvodnog procesa i formulacije finalnog proizvoda na sadržaj purinskih alkaloida čokolada. Dostupni literaturni podaci za sadržaj teobromina i kofeina u različitim vrstama čokolada uporedivi su sa vrednostima dobijenim u našoj studiji (Langer i sar., 2011).

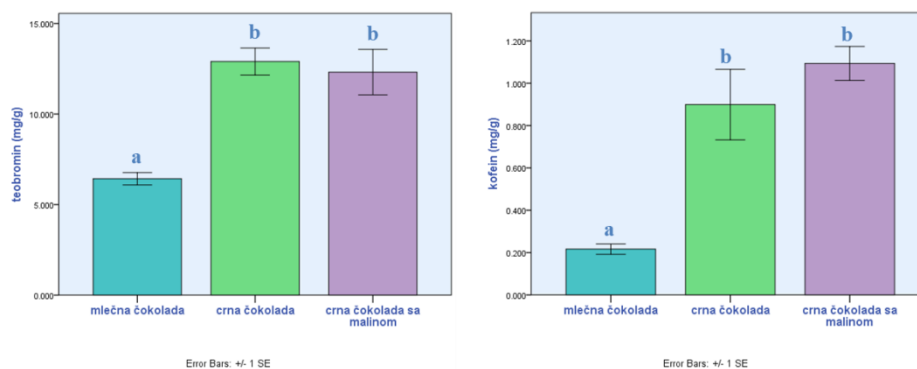
Uzimajući u obzir prethodno određen polifenolni profil kakao praha, u analiziranim uzorcima ekstrakata čokolada od fenolnih komponenti kvantifikovani su samo monomerni flavan-3-oli, kao jedinjenja sa najvećim udelom u polaznom materijalu. Epikatehin je bio zastupljeniji u svim analiziranim ekstraktima čokolada (prosečno 0,200 mg/g), dok je sadržaj katehina bio za 40% niži i ovakav nalaz u skladu je sa rezultatima studije Cooper i saradnika (Cooper i sar., 2008).



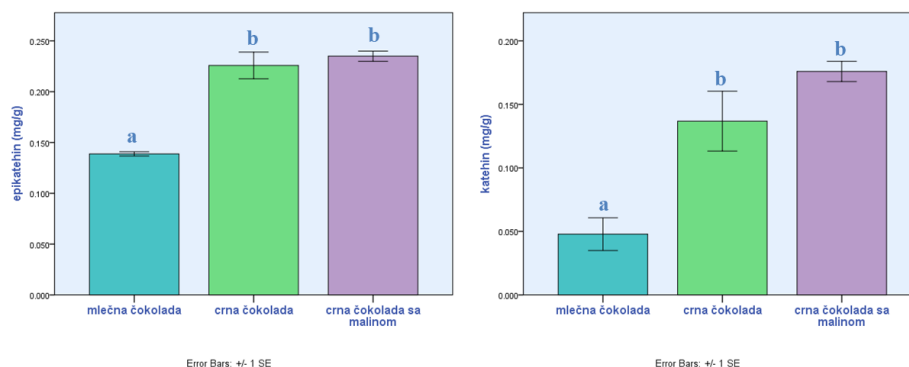
Tabela 14. Sadržaj osnovnih flavan-3-ola i metilksantina u čokoladi. Rezultati, izraženi u mg/g čokolade, prikazani su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, n=3.

čokolada	epikatehin	katehin	teobromin	kofein
MC1	0,147 $\pm$ 0,023	0,053 $\pm$ 0,002	5,481 $\pm$ 0,331	0,250 $\pm$ 0,003
MC2	0,137 $\pm$ 0,016	0,072 $\pm$ 0,000	7,552 $\pm$ 0,782	0,270 $\pm$ 0,008
MC3	0,136 $\pm$ 0,012	0,077 $\pm$ 0,008	6,054 $\pm$ 0,233	0,241 $\pm$ 0,005
MC4	0,138 $\pm$ 0,008	0,027 $\pm$ 0,005	6,505 $\pm$ 0,421	0,185 $\pm$ 0,001
MC5	0,136 $\pm$ 0,033	0,010 $\pm$ 0,012	6,560 $\pm$ 0,512	0,136 $\pm$ 0,001
DC1	0,229 $\pm$ 0,037	0,151 $\pm$ 0,039	14,590 $\pm$ 0,831	0,475 $\pm$ 0,010
DC2	0,263 $\pm$ 0,014	0,183 $\pm$ 0,028	12,301 $\pm$ 0,660	1,359 $\pm$ 0,012
DC3	0,223 $\pm$ 0,021	0,113 $\pm$ 0,009	12,363 $\pm$ 0,240	1,025 $\pm$ 0,039
DC4	0,233 $\pm$ 0,009	0,180 $\pm$ 0,018	10,692 $\pm$ 0,564	1,078 $\pm$ 0,013
DC5	0,181 $\pm$ 0,018	0,057 $\pm$ 0,012	14,562 $\pm$ 0,925	0,558 $\pm$ 0,024
DCR1	0,230 $\pm$ 0,019	0,168 $\pm$ 0,044	11,060 $\pm$ 0,780	1,013 $\pm$ 0,098
DCR2	0,240 $\pm$ 0,012	0,184 $\pm$ 0,032	13,573 $\pm$ 1,391	1,174 $\pm$ 0,125

Konzistentno sa prethodno diskutovanim razlikama u sadržaju ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina, statističkom analizom podataka (ANOVA), potvrđena je i razlika između analiziranih grupa u korist crnih čokolada sa ili bez dodate maline u pogledu sadržaja metilksantina i flavan-3-ola (Slika 30, Slika 31).



Slika 30. Uporedna analiza sadržaja metilksantina u različitim vrstama čokolada



Slika 31. Usporedna analiza sadržaja flavan-3-ola u različitim vrstama čokolada

### 4.3 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL KAKAO PRAHA

Nakon urađene hemijske karakterizacije u pogledu sadržaja različitih polifenolnih jedinjenja koji se smatraju potentnim antioksidansima, postavljena hipoteza o uticaju procesa prerade na kvalitet kakao praha proširena je testiranjem *in vitro* antioksidativne aktivnosti.

Do sada je razvijeno nekoliko metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta, ali ne postoji konsenzus oko metode koja bi se uzela kao standardna. Razlog za ovo su razna ograničenja i nedostaci metoda, kao što su: ograničenje kod određivanja hidrofилnih ili hidrofobnih antioksidanasa (jednom metodom se obično mogu odrediti samo hidrofилni ili samo hidrofobni antioksidansi), teškoće kod određivanja završne tačke reakcije, osetljivost na svetlost mnogih reagenasa, izvođenje analize pri pH vrednosti sredine koja je fiziološki irelevantna, moguća interakcija sa drugim komponentama hrane, upotreba različitih standarda za izražavanje rezultata itd. (Karadag i sar., 2009). U cilju izbegavanja navedenih nedostataka antioksidativni potencijal uzoraka kakao praha procenjen je pomoću tri različite metode (DPPH, FRAP, ABTS) i dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 15.

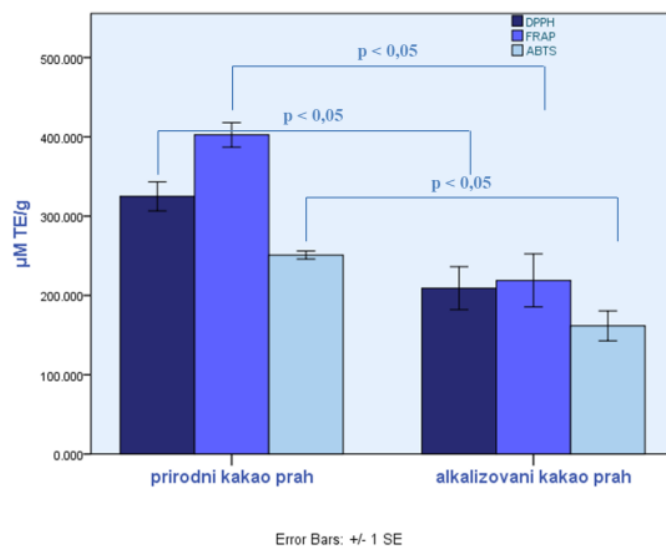
Tabela 15. Antioksidativna aktivnost kakao praha. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, n=3.

kakao prah	DPPH ( $\mu\text{M TE/g}$ )	FRAP ( $\mu\text{M TE/g}$ )	ABTS ( $\mu\text{M TE/g}$ )
CP1	253,3 $\pm$ 5,3	426,7 $\pm$ 2,9	260,0 $\pm$ 14,4
CP2	322,6 $\pm$ 11,9	385,4 $\pm$ 3,2	253,8 $\pm$ 6,8
CP3	352,8 $\pm$ 9,9	454,7 $\pm$ 2,1	262,3 $\pm$ 9,03
CP4	386,6 $\pm$ 5,3	417,1 $\pm$ 1,6	250,7 $\pm$ 7,4
CP5	328,5 $\pm$ 3,6	383,0 $\pm$ 3,3	251,5 $\pm$ 0,6
CP6	306,0 $\pm$ 3,1	347,8 $\pm$ 1,6	227,4 $\pm$ 7,0
CP7	198,8 $\pm$ 6,6	211,5 $\pm$ 2,1	149,8 $\pm$ 3,8
CP8	267,2 $\pm$ 5,7	262,8 $\pm$ 2,3	169,1 $\pm$ 4,2
CP9	128,1 $\pm$ 3,8	110,1 $\pm$ 1,1	112,6 $\pm$ 5,1
CP10	271,2 $\pm$ 5,9	309,4 $\pm$ 2,1	227,7 $\pm$ 1,8
CP11	180,4 $\pm$ 10,1	201,1 $\pm$ 1,6	149,3 $\pm$ 3,8

Legenda: DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power*; ABTS (TEAC) - *Trolox equivalent antioxidant capacity*; TE - Troloks ekvivalent

Za *in vitro* ispitivanje antioksidativne aktivnosti različitih namirnica, najboljim pristupom smatra se primena kombinacije nekoliko metoda koje se zasnivaju na različitim principima određivanja antioksidativnog potencijala analiziranog materijala kroz različite mehanizme delovanja (Llorent-Martinez i sar., 2016; Mocan i sar., 2016). DPPH, FRAP i ABTS su najčešće korišćene metode za određivanje *in vitro* antioksidativnog kapaciteta hrane i pića. DPPH esej zasnovan je na najjednostavnijem mehanizmu antioksidativne zaštite:  $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{RH (antioksidans)} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{R}^{\bullet}$ . FRAP metoda se bazira na sposobnosti antioksidanasa, rastvornih u vodi, da redukuju gvožđe iz  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ . Suprotno od DPPH metode, koja je pogodna za određivanje antioksidanasa rastvornih u organskim rastvaračima (etanol, metanol), FRAP metodom mogu se odrediti antioksidativna svojstva hidrosolubilnih jedinjenja (Dai i Mumper, 2010). Metoda ABTS u osnovi predstavlja merenje procenta inhibicije ABTS radikala u poređenju sa komerijalnim standardom Troloksom. Što se same reakcije tiče, FRAP test se odvija preko SET (*single electron transfer*) mehanizma, dok DPPH i ABTS predstavljaju reakcije u kojima ova dva radikala mogu da budu neutralisana putem SET ili HAT (*hydrogen atom transfer*) mehanizma (Prior i Gu, 2005).

Rezultati dobijeni analizom antioksidativnog potencijala kroz navedene metode prate isti obrazac gotovo u svim analiziranim kakao prahovima. Pošto je urađena statistička analiza, zapažen je značajno viši antioksidativni kapacitet kod prirodnih u odnosu na nativne kakao prahove nakon sva tri primenjena testa (Slika 32).



Slika 32. Uporedna analiza antioksidativnog potencijala alkalizovanih i prirodnih kakao prahova

Legenda: DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power*; ABTS (TEAC) - *Trolox equivalent antioxidant capacity*; TE - Troloks ekvivalent

Rezultati dobijeni u ovoj studiji u saglasnosti su sa rezultatima objavljenim od strane Šinela i saradnika za metode DPPH i ABTS (Schinella i sar., 2010), dok su podaci o izmerenoj antioksidativnoj aktivnosti kakao praha FRAP testom u ovom istraživanju u skladu sa rezultatima Vertuanija i saradnika (Vertuani i sar., 2014).

#### 4.4 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL ČOKOLADE

U cilju procene antioksidativnog potencijala čokolada primenjeni su isti testovi kao i za kakao prahove, i ti su rezutati predstavljeni u Tabeli 16.

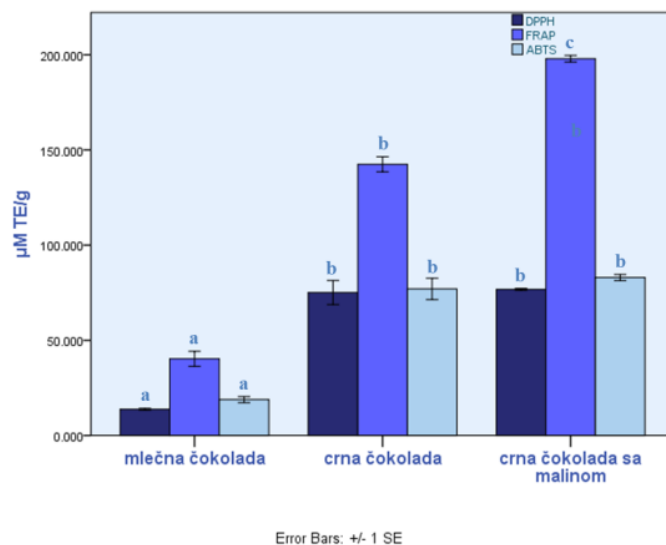
Tabela 16. Antioksidativna aktivnost čokolade. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, n=3.

čokolada	DPPH ( $\mu\text{M TE/g}$ )	FRAP ( $\mu\text{M TE/g}$ )	ABTS ( $\mu\text{M TE/g}$ )
MC1	13,0 $\pm$ 0,1	33,2 $\pm$ 1,7	19,7 $\pm$ 0,3
MC2	14,1 $\pm$ 0,1	38,0 $\pm$ 3,2	16,1 $\pm$ 1,8
MC3	14,5 $\pm$ 0,3	45,2 $\pm$ 1,1	24,2 $\pm$ 1,1
MC4	14,9 $\pm$ 0,2	53,0 $\pm$ 7,6	19,4 $\pm$ 0,4
MC5	12,0 $\pm$ 0,5	31,8 $\pm$ 5,2	14,7 $\pm$ 1,0
DC1	90,9 $\pm$ 1,1	150,2 $\pm$ 2,5	92,2 $\pm$ 1,8
DC2	85,4 $\pm$ 1,6	143,1 $\pm$ 12,4	87,8 $\pm$ 1,8
DC3	74,1 $\pm$ 2,5	151,4 $\pm$ 7,5	73,4 $\pm$ 3,6
DC4	70,4 $\pm$ 4,3	137,4 $\pm$ 10,4	68,6 $\pm$ 3,4
DC5	54,7 $\pm$ 4,4	130,3 $\pm$ 18,0	63,0 $\pm$ 4,2
DCR1	77,3 $\pm$ 5,3	199,7 $\pm$ 9,4	84,6 $\pm$ 2,6
DCR2	76,2 $\pm$ 5,9	196,2 $\pm$ 10,4	81,3 $\pm$ 0,9

Legenda: DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power*; ABTS (TEAC) - *Trolox equivalent antioxidant capacity*; TE - Troloks ekvivalent

Dobijeni rezultati za sva tri testa pokazali su da je antioksidativni kapacitet analiziranih ekstrakata čokolada pratio obrazac sadržaja fenolnih jedinjenja. Uzorci MC5 i DC5, čiji je sadržaj polifenola bio niži u poređenju sa ostalim čokoladama pokazali su i niže antioksidativne kapacitete izmerene u sva tri testa.

Iako dodatak maline crnoj čokoladi nije rezultovao značajnim uticajem na ukupan sadržaj polifenola i flavonoida, statistička analiza rezultata (ANOVA) pokazala je značajno veću vrednost antioksidativne aktivnosti merene FRAP testom u grupi crnih čokolada sa malinom u poređenju sa mlečnim i crnim čokoladama bez maline (Slika 33). Objašnjenje za primećenu razliku može biti prisustvo drugih hidrosolubilnih sastojaka u malini sa izraženim antioksidativnim kapacitetom, ali i različit polifenolni profil maline u poređenju sa kakaom. Podaci o uticaju dodatih sastojaka čokoladi na njihov antioksidativni kapacitet do sada je retko ispitan, te postoje nalazi za crvenu papriku i ružmarin (Cervellati i sar., 2008) koji sugerišu da su ovi dodaci doprineli značajnom povećanju antioksidativne aktivnosti izmerene ABTS testom.



Slika 33. Uporedna analiza antioksidativnog potencijala u različitim vrstama čokolada

Legenda: DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power*; ABTS (TEAC) - *Trolox equivalent antioxidant capacity*; TE - Troloks ekvivalent

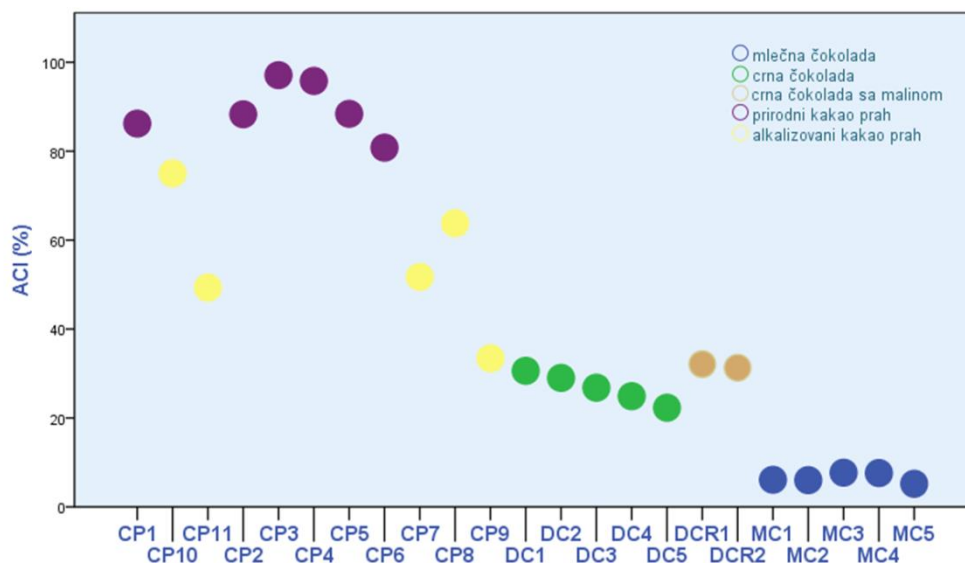
Apsolutne vrednosti antioksidativne aktivnosti čokolada dobijene u ovoj studiji više su u poređenju sa nalazima dobijenim od strane Belščak i saradnika (Belscak i sar., 2009), ali su u vrlo dobroj saglasnosti sa rezultatima Tabertera i saradnika (Tabertero i sar., 2006).

## 4.5 ANTIOKSIDATIVNI KOMPOZITNI INDEKS KAKAO PROIZVODA

Kombinacijom rezultata antioksidativne aktivnosti merene kroz tri različita testa (DPPH, FRAP, ABTS) omogućeno je izračunavanje vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) svih analiziranih kakao proizvoda (Slika 34). S obzirom da pojedinačni testovi pokrivaju različite segmente antioksidativne akcije, njihova kombinacija ima određene prednosti. Integrisanjem vrednosti pojedinačnih testova u jednu ACI vrednost omogućen je sveobuhvatniji uvid u antioksidativnu aktivnost analiziranih kakao proizvoda. Prema dostupnim literaturnim podacima, ACI vrednost korišćena je za procenu antioksidativne aktivnosti pića bogatih polifenolima u SAD (Seeram i sar., 2008), kao i biljnih i voćnih čajeva (Veljkovic i sar., 2013). Ovakav način

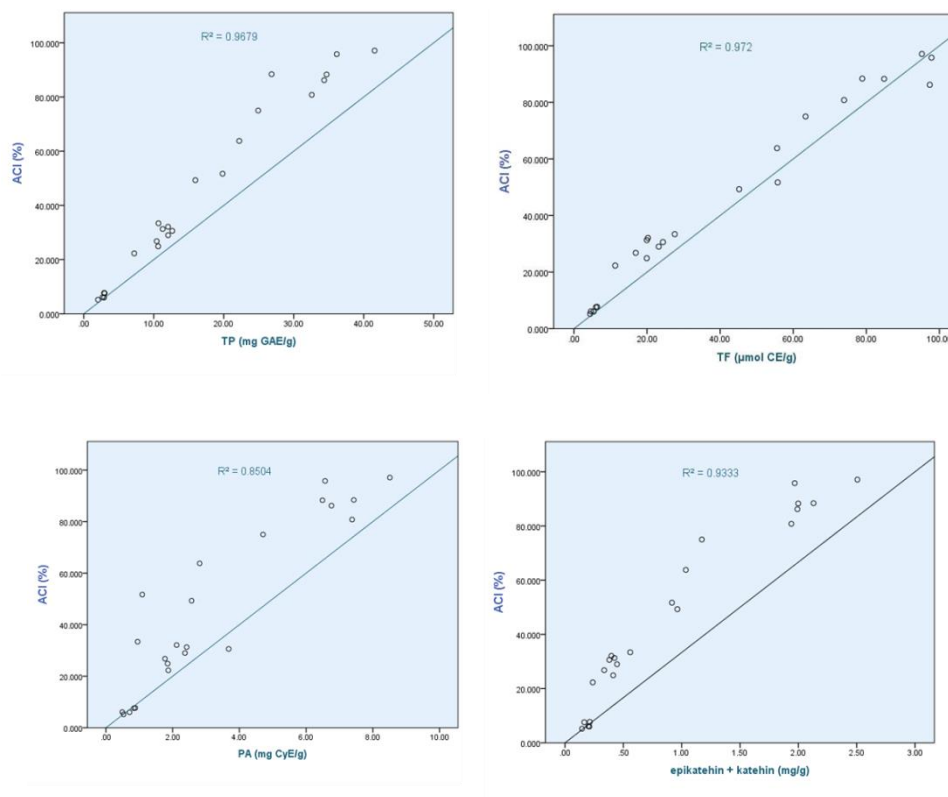
prikazivanja i izražavanja rezultata antioksidativne aktivnosti pruža mogućnost poređenja velikog broja različite hrane i pića i potencijalno može poslužiti za pravljenje popularnih tablica namirnica bogatih antioksidansima koje bi bile od izuzetne koristi kako istraživačima tako i krajnjim potrošačima.

Nakon primene formule navedene u odeljku 3.3 ove disertacije, zapaženo je da su prirodni kakao prahovi pokazali prosečnu ACI vrednost od 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% (Slika 34). Analizom varijanse (ANOVA) utvrđena je značajna razlika između posmatranih grupa proizvoda ( $F(4,22) = 80,078, p < 0,001$ ), a LSD *post hoc* testom pokazano je da se jedino grupe crnih čokolada sa i bez dodataka maline nisu međusobno razlikovale.



Slika 34. Antioksidativni kompozitni indeks (ACI) kakao proizvoda

Antioksidativni kompozitni indeks kakao proizvoda bio je u statistički veoma značajnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem polifenola, flavonoida i proantocijanidina, kao i sa zbirnom koncentracijom epikatehina i katehina (Slike 35). Ovakvi rezultati su u skladu 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) i upravo potvrđuju da kod kakao proizvoda različiti fenoli daju najveći doprinos antioksidativnom potencijalu.



Slika 35. Korelacije između antioksidativnog kompozitnog indeksa i sadržaja različitih klasa fenolnih jedinjenja kakao proizvoda

Legenda: ACI - antioksidativni kompozitni indeks; TP - ukupni polifenoli; TF - ukupni flavonoidi; PA - ukupni proantocijandini; GAE - ekvivalent galne kiseline; CE - katehin ekvivalent; CyE - cijanidin hlorid ekvivalent

Dodatno, korelacija između rezultata dobijenih pomoću metoda DPPH, FRAP i ABTS i izračunatih ACI vrednosti je bila veoma visoka i statistički značajna ( $r > 0.90$ ). Interesantno je da statistički značajne korelacije nije bilo između sadržaja procijanidina kao ni sadržaja neflavonoida sa rezultatima antioksidativne aktivnosti, što se potencijalno može objasniti veoma malim prisustvom ovih jedinjenja u svim analiziranim kakao prahovima (Tabela 17).

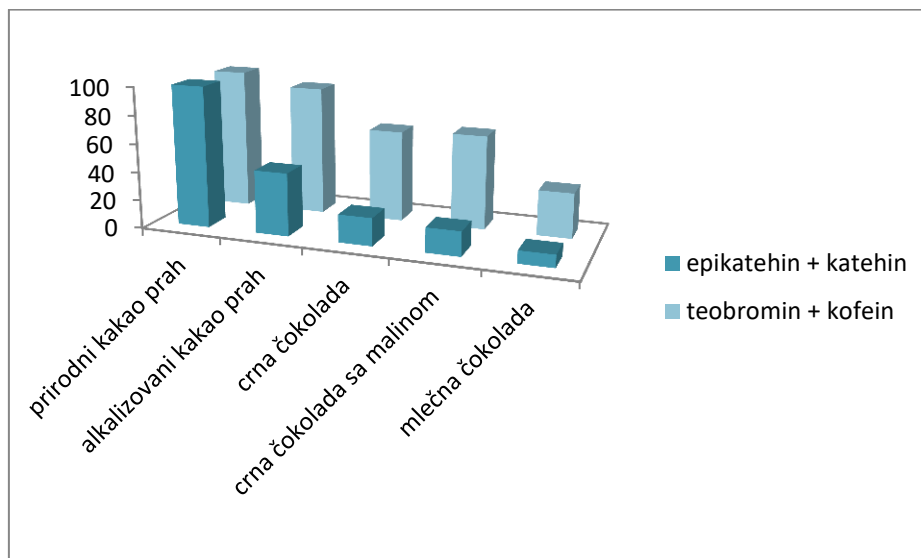


Tabela 17. Korelacije između antioksidativnog potencijala i sadržaja različitih klasa fenolnih jedinjenja kakao proizvoda

TP		TF	PA	epikatehin	katehin	pro- cijanidini	neflavonoidi	DPPH	FRAP	ABTS	ACI
TP	1	,983	,931	,958	,967	,215	-,091	,963	,981	,974	,984
		*	*	*	*	,526	,791	*	*	*	*
	23	23	23	23	23	11	11	23	23	23	23
TF		1	,905	,960	,979	,255	-,139	,971	,969	,983	,986
			*	*	*	,449	,683	*	*	*	*
		23	23	23	23	11	11	23	23	23	23
PA			1	,950	,917	,489	-,018	,884	,941	,913	,922
				*	*	,127	,958	*	*	*	*
			23	23	23	11	11	23	23	23	23
epikatehin				1	,967	,318	-,015	,934	,945	,941	,951
					*	,340	,965	*	*	*	*
				23	23	11	11	23	23	23	23
katehin					1	,411	,008	,968	,956	,978	,979
						,210	,982	*	*	*	*
					23	11	11	23	23	23	23
procijanidini						1	,061	,457	,366	,513	,454
							,858	,158	,268	,107	,161
						11	11	11	11	11	11
neflavonoidi							1	-,128	-,136	-,043	-,107
								,709	,689	,901	,754
							11	11	11	11	11
DPPH								1	,947	,976	,986
									*	*	*
								23	23	23	23
FRAP									1	,973	,984
										*	*
									23	23	23
ABTS										1	,995
											*
										23	23
ACI											1
											23

Legenda: TP - ukupni polifenoli; TF - ukupni flavonoidi; PA - ukupni proantocijandini; DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power*; ABTS (TEAC) - *Trolox equivalent antioxidant capacity*; ACI - antioksidativni kompozitni indeks

Nakon analize različitih kakao proizvoda, bilo je zanimljivo sumirati kako se kretao sadržaj osnovnih biološki aktivnih sastojaka u analiziranim grupama. Na Slici 36 prikazano je smanjenje sadržaja metilksantina i monomernih flavan-3ola u alkalizovanim kakao prahovima i različitim vrstama čokolada u odnosu na grupu prirodnih kakao prahova.



Slika 36. Procentualni sadržaj biološki aktivnih sastojaka kakao proizvoda

Ukoliko se prirodni kakao prah posmatra kao najbolji izvor bioaktivnih sastojaka, može se izvesti zaključak da njihov sadržaj vidno opada od alkalizovanog kakao praha, preko crnih do mlečnih čokolada. Dodatno, zapaženo je više nego duplo smanjenje fenolnih jedinjenja u poređenju sa purinskim alkaloidima u istim grupama kakao proizvoda. Očigledno je da proces alkalizacije i procesi koji se koriste u proizvodnji čokolade manje utiču na metilksantine u odnosu na nestabilnije polifenolne komponente.

#### 4.6 ANTIMIKROBNI POTENCIJAL KAKAO PRAHA

S obzirom da antimikrobna rezistencija predstavlja problem globalnih razmera, sve je više aktuelno ispitivanje antimikrobnog potencijala agenasa iz prirode. Naime, istraživanja se orjentišu ka brojnim etarskim uljima, ali i ekstraktima različitih biljaka. Sa tim u vezi, hemijski sastav kakao praha opravdava istraživačko pitanje njegove antimikrobne aktivnosti. Međutim kako mnogi faktori mogu uticati na funkcionalnost krajnjih proizvoda, u ovom delu studije postavljena je hipoteza da li proces alkalizacije ima uticaja na antimikrobnu aktivnost kakao praha.

Rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakata prirodnih i alkalizovanih kakao prahova sažeti su u Tabeli 18.

Tabela 18. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ekstrakata kakao praha. Rezultati su izraženi u mg/ml (za kakao ekstrakte) i µg/ml (za antibiotik i flavan-3ole).

<b>kakao prah</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 1228)	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Salmonella abony</i> (NCTC 6017)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
CP1	12,5	7,5	12,5	17,5	12,5	12,5	17,5	5,0
CP2	7,5	7,5	12,5	17,5	17,5	12,5	17,5	5,0
CP3	7,5	5,0	12,5	17,5	17,5	17,5	17,5	5,0
CP4	12,5	25,0	12,5	25,0	25,0	25,0	25,0	5,0
CP5	25,0	25,0	25,0	17,5	25,0	25,0	25,0	5,0
CP6	12,5	12,5	12,5	17,5	17,5	17,5	17,5	5,0
<b>SV ± SD</b>	<b>12,9±6,4</b>	<b>13,7±9,0</b>	<b>14,6±5,1</b>	<b>18,7±3,1</b>	<b>19,2±4,9</b>	<b>18,3±5,6</b>	<b>20,0±3,9</b>	<b>5,0±0,0</b>
CP7	5,0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	5,0
CP8	5,0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	5,0
CP9	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	5,0
CP10	7,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	17,5	5,0
CP11	12,5	12,5	12,5	12,5	7,5	7,5	12,5	5,0
<b>SV ± SD</b>	<b>8,5±3,8</b>	<b>10,5±2,7</b>	<b>10,5±2,7</b>	<b>10,5±2,7*</b>	<b>9,5±2,7*</b>	<b>9,5±2,7*</b>	<b>11,5±4,2*</b>	<b>5,0±0,0</b>
<b>Ampicilin</b>	0,5	1,5	1,8	2,0	4,9	7,4	n,t,	6,2 <sup>Nys</sup>
<b>Epikatehin</b>	500	250	250	500	250	500	500	125
<b>Katehin</b>	500	250	250	500	500	500	250	125

\* Statistički značajna razlika između prirodnog i alkalizovanog kakao praha, p <0,05

Legenda: SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija, ATCC - *American Type Culture Collection*, NCTC - *National Collection of Type Cultures*, Nys - *Nystatin*, n,t, – nije testirano

Analizirani ekstrakti kakao prahova pokazali su antimikrobnu aktivnost na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, kao i na *Candida albicans* koristeći bujon-mikrodilucionu metodu, u opsegu MIK vrednosti od 5,0 do 25,0 mg/ml. Među testiranim mikrobiološkim sojevima, gljivica *Candida albicans* ispostavila se kao najosetljiviji mikroorganizam sa najnižim MIK-om (5,0 mg/ml). Što se antibakterijske aktivnosti tiče, analizirani kakao ekstrakti (pretežno prirodni kakao prah) imali su nešto veći potencijal protiv Gram pozitivnih bakterija.

Minimalne inhibitorne koncentracije dobijene za Gram pozitivne bakterije nisu korelirale sa različitim sadržajem fenola (TP, TF, PA, flavan-3oli), dok su vrednosti MIK-a za Gram negativne bakterije bile u statistički značajnoj korelaciji sa navedenim sadržajima ( $0,634 < r < 0,777$ ,  $p < 0,05$ ).

Kako bi se procenila relativna antibakterijska efikasnost analiziranih kakao ekstrakata, paralelnim eksperimentom određene su MIK vrednosti za komercijalni antibiotik ampicilin, kao i za dva osnovna kakao fenolna jedinjenja, epikatehin i katehin. Rezultati iz Tabele 18 sugerišu da je efikasnost ekstrakta kakao prahova bila znatno niža u poređenju sa ampicilinom ( $3,5 \times 10^3$  puta) i čistim flavan-3olima (70 puta). Međutim, kada uporedimo dobijene rezultate sa literaturnim podacima za pojedine biljne ekstrakte, antimikrobna aktivnost naših uzoraka testiranih protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* veoma je slična onoj koja je dobijena sa ekstraktima origana, žalfije, karanfilića, ruzmarina i celera, koji se smatraju dobrim antimikrobnim agensima u tradicionalnoj medicini (Witkowska i sar., 2013).

Kada je reč o procesu alkalizacije, nije utvrđena statistički značajna razlika u antimikrobnoj aktivnosti prema Gram pozitivnim bakterijama između grupa kakao prahova. Interesantno, upoređivanjem vrednosti MIK-a procenjenih za Gram negativne bakterije pokazano je da ekstrakti alkalizovanih kakao prahova imaju statistički veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa nealkalizovanim. Ovakav fenomen ukazuje na to da antimikrobna aktivnost kakao prahova nije posledično smanjena kao rezultat procesa alkalizacije uprkos nižem sadržaju fenolnih jedinjenja, već je i povećana. Sličnu pojavu primetili su Rian i saradnici, koji su uočili da gubitak flavanola tokom pečenja i fermentacije kakao zrna nije usko povezan sa smanjenjem inhibicije digestivnih enzima (Ryan i sar., 2016). Potencijalno objašnjenje za ova zapažanja može biti formiranje

novih bioaktivnih jedinjenja tokom alkalizacije koji imaju istaknuti antimikrobni, ali ne i antioksidativni potencijal. Li i saradnici pronašli su više od 80 isparljivih jedinjenja u kakao masi nakon procesa alkalizacije (Li i sar., 2012). Neki od njih su i proučavani u kontekstu antimikrobnih karakteristika. Naime, Lu i saradnici saopštili su da ciklični terpen limonen poseduje viši antimikrobni potencijal prema Gram negativnim u poređenju sa Gram pozitivnim bakterijama (Lu i sar., 2016). Dodatno, aldehidi i ketoni, isparljive komponente čiji se sadržaj povećava nakon alkalizacije kakao praha, poznati su kao elektronegativna jedinjenja koja mogu uzeti učešće u biološkim procesima sa ulogom prenosioca elektrona i reagovati sa proteinima i nukleinskim kiselinama, te stoga inhibirati rast mikroorganizama (Dorman i Deans, 2000). Ovi podaci ukazuju na neophodnost za sprovođenje detaljnijih ispitivanja koja bi omogućila otkrivanje novih antimikrobnih agenasa koji se potencijalno formiraju u kakao prahu usled procesa alkalizacije. Takođe, potrebna su dalja istraživanja koja bi za cilj imala objašnjenje mehanizama antibakterijske aktivnosti kakao ekstrakata. Ispitivano je i potvrđeno da polifenoli interaguju sa ćelijskim membranama bakterija što posledično dovodi do narušavanja njihovih funkcija. Dokazano je i da se flavan-3-oli, epikatehin i katehin, mogu čvrsto vezivati za pozitivno naelektrisani lipidni dvosloj Gram pozitivnih bakterija pa njihova raspodela unutar lipidnog dvosloja rezultira strukturnim i funkcionalnim promenama koje dovode do smrti bakterijske ćelije (Koech i sar., 2014). Takođe, još jedan mogući mehanizam baktericidnih efekata polifenola uključuje inhibiciju enzima i smetnje u proizvodnji određenih amino kiselina neophodnih za bakterijski rast.

#### **4.7 UTICAJ KRATKOTRAJNE I DUGOTRAJNE DIJETARNE SUPLEMENTACIJE KAKAO PRAHOM NA PONAŠANJE MIŠEVA**

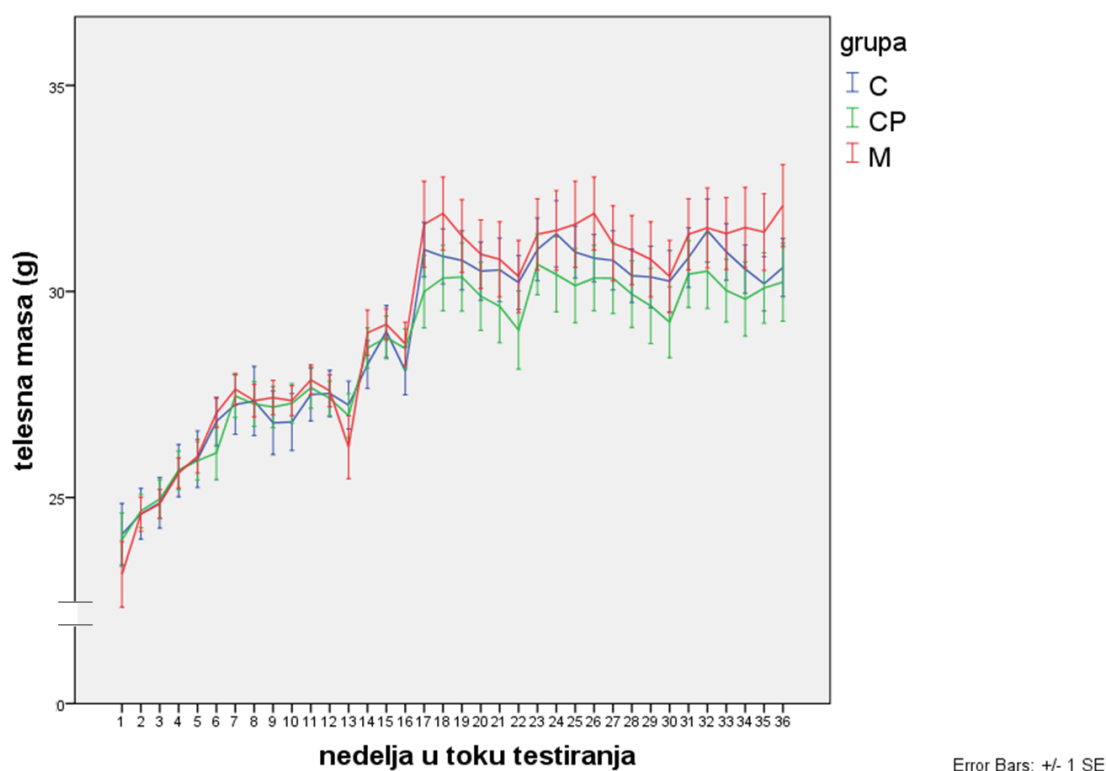
S obzirom na mali broj studija u kojima je praćen bihevioralni fenotip laboratorijskih životinja nakon suplementacije biološki aktivnim jedinjenjima kakao praha, sledeći eksperimentalni cilj je bio da se ispita uticaj kratkotrajne i dugotrajne suplementacije kakao prahom i ekvivalentne količine kombinovanih sintetskih metilksantina kakaoa (teobromin i kofein) na ponašanje zdravog soja C57BL/6 miševa. Ovaj soj miševa pokazuje jako dobru lokomociju i koordinaciju, poseduje i

odgovarajuću sposobnost učenja i umerenu anksioznost, što ga čini veoma pouzdanim modelom za sveobuhvatna bihevioralna ispitivanja. U studiji je korišćena baterija testova kako bi se ispitale neurološke funkcije, senzomotorna koordinacija, eksploracija, lokomotorna aktivnost, emocionalna reaktivnost i učenje/pamćenje.

Detaljna hemijska analiza različitih kakao proizvoda u *in vitro* delu ovog istraživanja, kao i poređenje sadržaja biološki aktivnih sastojaka i funkcionalnosti istih, izdvojili su prirodni kakao prah CP1 za suplementaciju standardne hrane laboratorijskih miševa. Dodatno, uzimajući u obzir specifičnost kakao praha u pogledu hemijskog sastava, postavlja se pitanje da li on efekte ostvaruje u svom punom sastavu ili delovanje potiče od njegovih aktivnih principa, te je za drugu eksperimentalnu grupu standardna laboratorijska hrana suplementirana sintetskim metilksantinima. Primenjena 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, pri čemu je u obzir uzeta razlika u brzini metabolizma između ljudi i miševa. Izabrane doze smatraju se nutritivno opravdanim, odnosno mogu se postići uobičajenim dijetarnim unosom. Ovakav dijetarni pristup ne zahteva prethodnu ekstrakciju biološki aktivnih jedinjenja kakao praha i primenu putem dijetetskih suplemenata. Većina istraživačkih grupa koje su se bavile ispitivanjem fizioloških efekata kakao praha na modelima životinja koristile su doze koje su višestruko prevazilazile količine koje se mogu postići konzumiranjem kakao proizvoda (Fidaleo i sar., 2014; Praag i sar., 2007). Naime, u ovom delu studije postavljeno je istraživačko pitanje da li dijetarno relevantne količine kakao praha i metilksantina imaju uticaj na različite domene ponašanja kod zdravih miševa usled dijetarne intervencije u trajanju od mesec dana (kratkotrajna suplementacija) i dijetarne intervencije u trajanju od šest meseci (dugotrajna suplementacija). Takođe su kod dugotrajno suplementiranih životinja posmatrane bihevioralne promene usled starenja, a samim tim i eventualni uticaj efekta suplementacije na taj fiziološki proces.

#### 4.7.1 Telesna masa

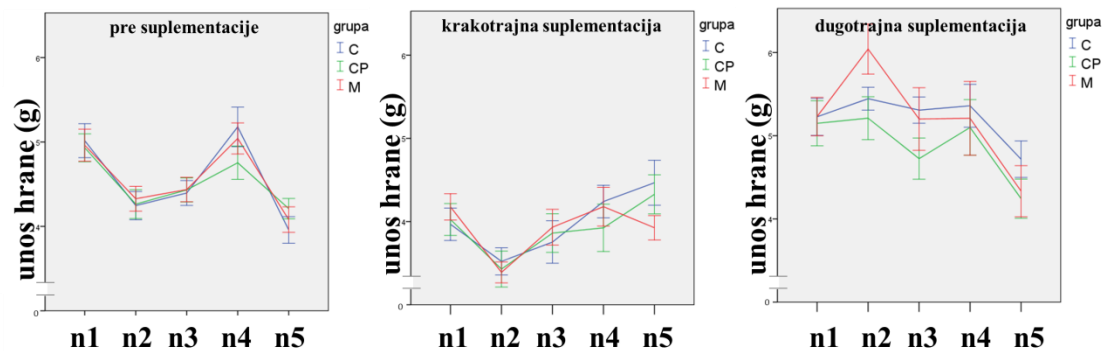
Bez obzira na tip i dužinu suplementacije, sve životinje su vremenom uvećavale svoju telesnu masu (Slika 37; nedelja:  $F(35, 1085) = 91,450, p < 0,001$ ). Statistički značajnih razlika u telesnoj masi između grupa nije bilo (grupa x nedelja:  $F(70, 1085) = 1,015, p = 0,447$ ). Od 18-te nedelje eksperimenta grupe su počele da se razdvajaju, ali usled relativno velike varijabilnosti i potencijalno malog uzorka statistička razlika je izostala (grupa x nedelja:  $F(34, 527) = 0,664, p = 0,095$ ).



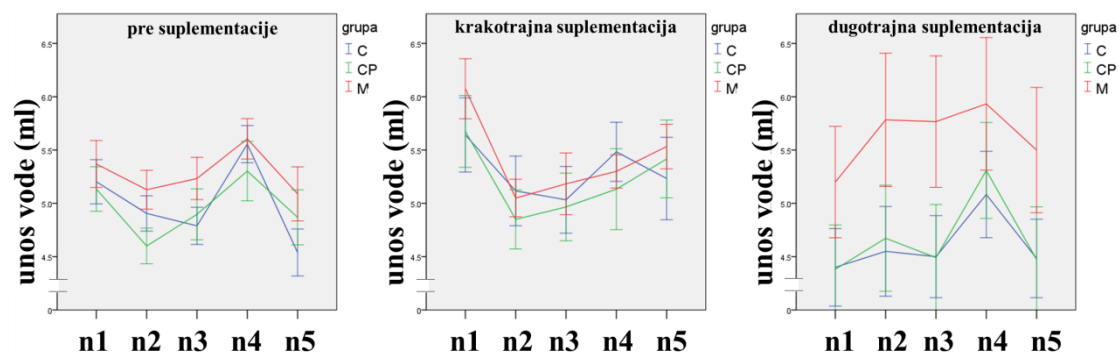
Slika 37. Telesna masa miševa u toku suplementacione studije. Sve životinje (kontrola (C), miševi suplementirani kakao prahom (CP), miševi suplementirani metilksantinima (M)) su vremenom uvećavale telesnu masu, ali grupna razlika je izostala (grupa x nedelja:  $F(70, 1085) = 1,015, p = 0,447$ ).

#### 4.7.2 Unos hrane i vode

Unos hrane i vode praćen je pet nedelja za vreme trajanja svake baterije testova (Slika 38, Slika 39).



Slika 38. Dnevni unos hrane miševa u toku suplementacione studije. Vrednosti na grafikonima predstavljaju prosečan dnevni unos hrane posmatran u toku pet nedelja (n).



Slika 39. Dnevni unos vode miševa u toku suplementacione studije. Vrednosti na grafikonima predstavljaju prosečan dnevni unos vode posmatran u toku pet nedelja (n).

Porast unosa hrane, a posebno vode kod miševa suplementiranih metilksantinima u okviru faze dugotrajne suplementacije je očigledan ali se ovo nije odrazilo na telesnu masu miševa. Statistički značajna razlika između grupa u ovim parametrima nije utvrđena (Tabela 19).



Tabela 19. Rezultati statističke analize unosa hrane i vode miševa

parameter	vreme		dan		grupa		interakcija vreme x grupa	
	F (2, 256)	p	F (4, 256)	p	F (2, 32)	p	F (4, 256)	p
<b>unos hrane</b>	58,087	<0,01	16,233	<0,01	0,312	n.z.	0,735	n.z.
<b>unos vode</b>	1,170	n.z.	4,512	<0,05	1,145	n.z.	0,902	n.z.

Legenda: n.z. - nije statistički značajno

### 4.7.3 Neurološki testovi

Miševi iz sve tri suplementacione grupe su pokazali standardne odgovore prilikom testiranja vizuelnog refleksa, refleksa spajanja zadnjih ekstremiteta, geotaksije i refleksa uspravljanja u svim tačkama testiranja (na početku i na kraju svake baterije testova). Prilikom izvođenja refleksa spajanja zadnjih ekstremiteta primećeno je da određen broj miševa iz sve tri grupe spaja zadnje ekstremitete (Tabela 20), što je odgovaralo oceni 1 na skali od 0 do 3, međutim, nijedna životinja nije pokazala ozbiljan poremaćaj refleksa zadnjih ekstremiteta (što bi odgovaralo oceni 2 ili 3). Statistički značajne razlike između grupa nisu pronađene, ni na početku ( $\lambda^2 = 0,562$ , n.z.), ni na kraju eksperimenta ( $\lambda^2 = 1,419$ , n.z.).

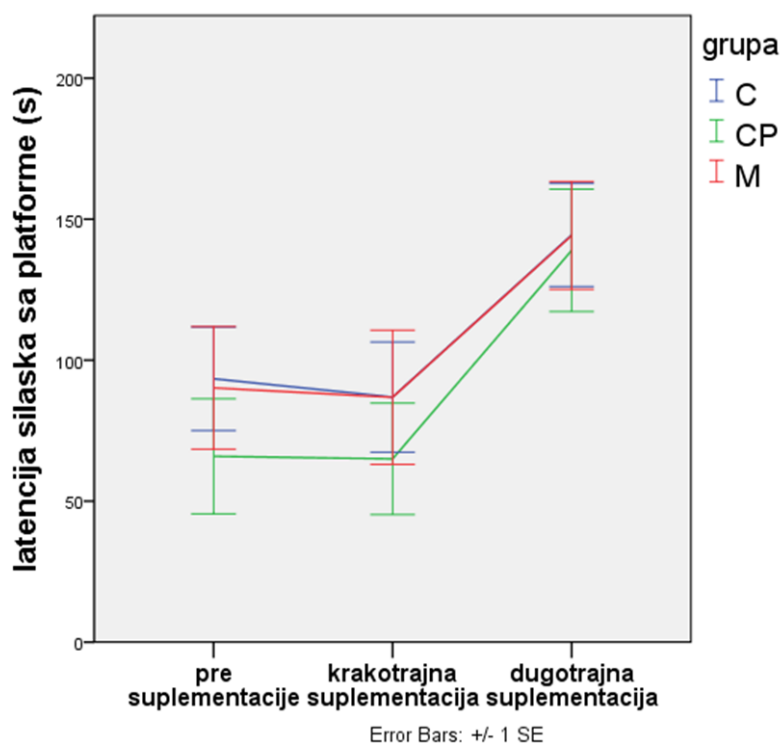
Tabela 20. Procenat miševa koji je imao približene zadnje ekstremitete prilikom izvođenja refleksa spajanja zadnjih ekstremiteta (ocena 1 na skali od 0 do 3) na početku i na kraju eksperimenta

grupa	C		CP		M	
<b>početak eksperimenta</b>	16,67 %	2(12)	8,33 %	1(12)	8,33 %	1(12)
<b>kraj eksperimenta</b>	27,27 %	3(11)	18,18 %	2(11)	8,33 %	1(12)

### 4.7.4 Test silaženja sa platforme

Statistički značajna razlika između grupa nije utvrđena u pogledu latencije silaska sa platforme (grupa x vreme:  $F(4,64) = 0,115$ ,  $p = 0,977$ ) (Slika 40). Ovakav nalaz ukazuje da primenjena količina kakao praha, kao ni sintetskih metilksantina ne pokazuju anksiolitički efekat koji bi se u testu silaženja sa platforme mogao pokazati. Dodatno je zapaženo da su miševi testirani nakon dugotrajne suplementacije pokazali

dužu latenciju u testu silaženja sa platforme u osvetljenoj prostoriji (vreme:  $F(2, 64) = 11,073$ ,  $p < 0,001$ ). Ovo se može potencijalno objasniti da su se životinje habituisale tokom prethodna dva testiranja na eksperimentalne uslove (svetlost u prostoriji), ali može biti i posledica starenja.

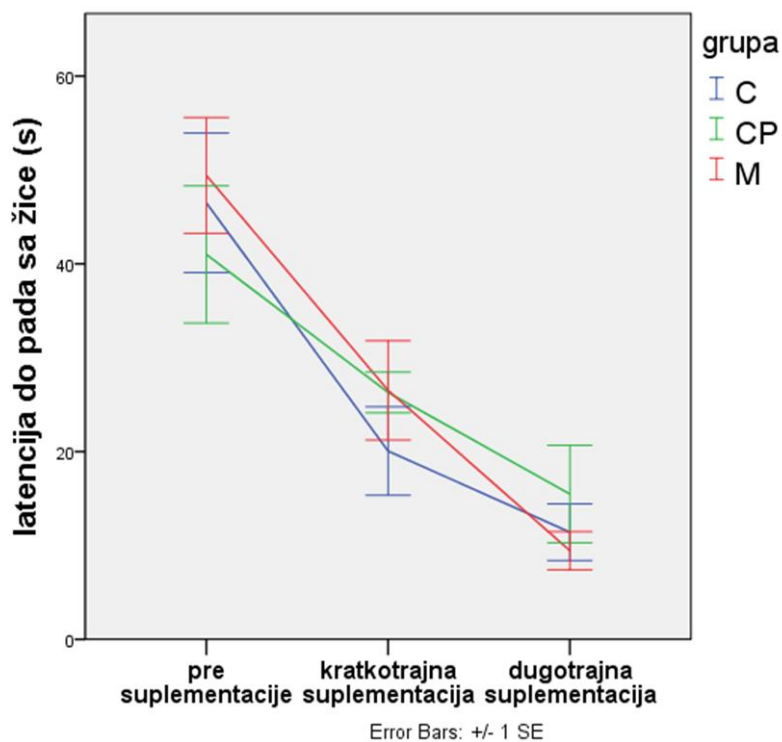


Slika 40. Performansa miševa u testu sližanja sa platforme. Nije zapažen uticaj suplementacije na smanjenje straha od visine kod miševa (grupa x vreme:  $F(4,64) = 0,115$ ,  $p = 0,977$ ). Miševi testirani nakon dugotrajne suplementacije pokazali su dužu latenciju u poređenju sa testiranjem pre suplementacije i nakon kratkotrajne suplementacija (vreme:  $F(2, 64) = 11,073$ ,  $p < 0,001$ ).

#### 4.7.5 Test održavanja na žici

Na Slici 41 prikazane su performanse postignute u testu održavanja na žici. Ovaj test koncipiran je za procenu izdržljivosti prednjih ekstremiteta miševa, ali dobijeni

rezultati se mogu tumačiti i sa aspekta antidepresivnog efekta bioaktivnih jedinjenja kakao praha.

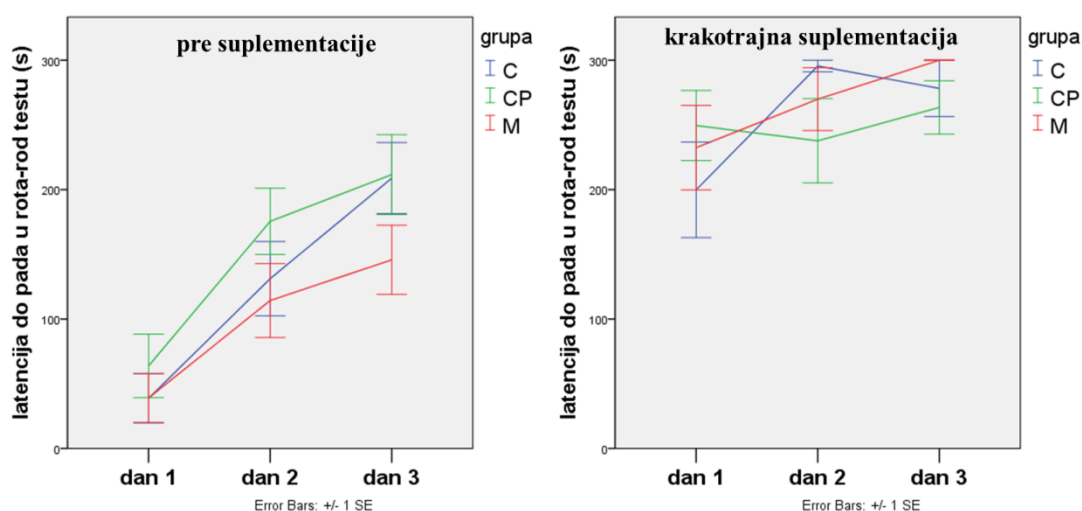


Slika 41. Performansa miševa u testu održavanja na žici. Vrednosti na grafiku predstavljaju prosečne latencije tri pokušaja. Latencija miševa se nije menjala usled suplementacije (grupa x vreme:  $F(4,64) = 0,535$ ,  $p = 0,711$ ), ali se vremenom skraćivala (vreme:  $F(2, 64) = 40,825$ ,  $p < 0,001$ ).

Statistički značajna razlika između suplementacionih grupa nije utvrđena (grupa x vreme:  $F(4,64) = 0,535$ ,  $p = 0,711$ ). Dodatno je uočeno da se latencija do pada sa žice tokom suplementacione studije svih miševa značajno skratila ( $t_{35} = 5,372$ ,  $p < 0,001$ ;  $t_{34} = 4,846$ ,  $p < 0,001$ ). Ovo bi se moglo objasniti povećanjem telesne mase životinja tokom studije, jer postoji značajna negativna korelacija između telesne mase i latencije pada tokom prvog pokušaja još pre suplementacije ( $r_{36} = -0,355$ ,  $p = 0,033$ ).

#### 4.7.6 Rota-rod test

Sve grupe pokazivale su napredak iz dana u dan u ovom testu senzomotornog učenja (dan:  $F(2, 66) = 35,325, p < 0,001$ ). S obzirom da su nakon kratkotrajne suplementacije gotovo sve životinje dostizale maksimalnih pet minuta vožnje, testiranje je izostavljeno nakon dugotrajne suplementacije. Faktor suplementacije nije imao značajan efekat na dužinu latencije pre pada sa brvna koje se okreće (grupa x vreme:  $F(4, 66) = 1,422, p = 0,237$ ), (Slika 42).

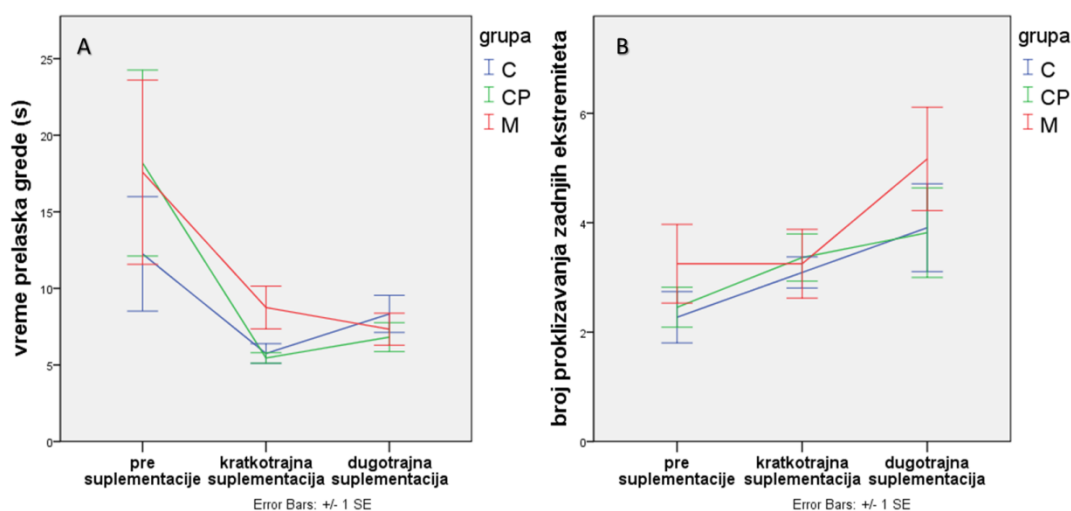


Slika 42. Performansa miševa u rota-rod testu. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost tri pokušaja po danu. Kratkotrajna suplementacija miševa nije značajno pospešila njihovo senzomotorno učenje (grupa x vreme:  $F(4, 66) = 1,422, p = 0,237$ ). 34 miša je u poslednjem pokušaju trećeg dana već nakon kratkotrajne suplementacije dostiglo maksimalnu performansu.

#### 4.7.7 Test hodanja po gredi

Analizom lokomotorne aktivnosti miševa u testu hodanja po gredi primećeno je da je svim miševima bilo potrebno kraće vreme da pređu gredu nakon prvog testiranja (vreme:  $F(2, 64) = 8,507, p = 0,001$ ), ali statistički značajna razlika između grupa kroz vreme nije utvrđena (grupa x vreme:  $F(4, 64) = 0,535, p = 0,711$ ) (Slika 43). Prilikom testiranja nakon kratkotrajne suplementacije, vreme prelaska grede životinja

suplementiranih kakao prahom bilo je značajno kraće u odnosu na vreme potrebno miševima suplemetiranim metilksantinima ( $F(2, 35) = 4,101, p = 0,026$ ), ali ovaj efekat je izostao nakon dugotrajne suplementacije ( $F(2, 34) = 0,504, p = 0,609$ ). Broj proklizavanja prednjih ekstremiteta prilično je varirao u grupama te nije mogao doprineti ukupnoj slici ponašanja životinja u ovom testu (rezultati nisu prikazani). Kod svih životinja zapažen je porast broja proklizavanja zadnjih ekstremiteta i to potpuno suprotno od skraćivanja vremena prelaska grede (vreme:  $F(2, 62) = 5,123, p = 0,009$ ), te se može reći da su životinje vremenom bile brže, ali ne i spretnije.



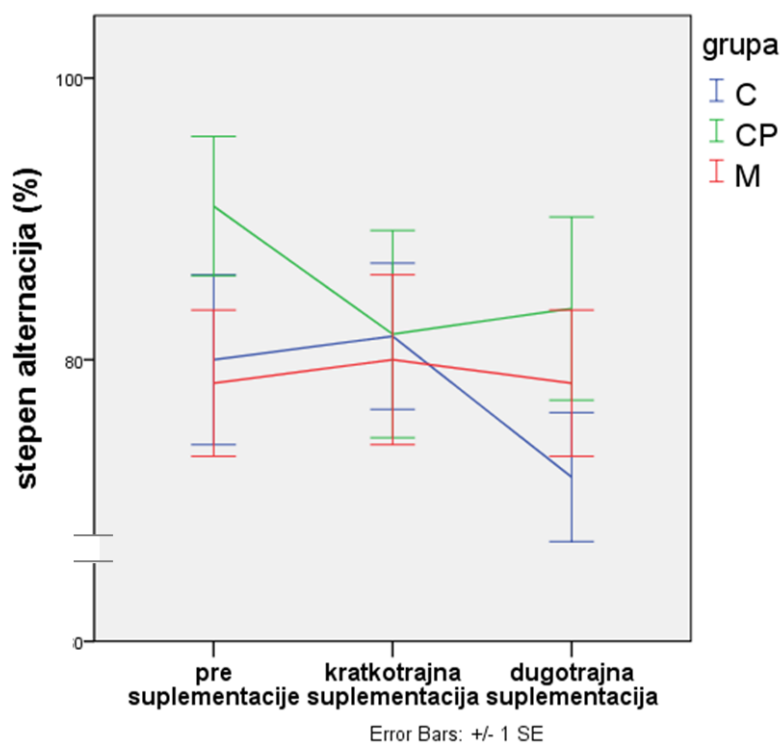
Slika 43. Performansa miševa u testu hodanja po gredi. (A) Tokom ponovljenih pokušaja vreme prelaska grede se smanjivalo u svim grupama (vreme:  $F(2, 64) = 8,507, p = 0,001$ ), ali i (B) povećan broj proklizavanja zadnjih ekstremiteta (vreme:  $F(2, 62) = 5,123, p = 0,009$ ). Međutim, efekat suplementacije je izostao u oba vremenska perioda (grupa x vreme:  $F(4, 64) = 0,535, p = 0,711$ ).

#### 4.7.8 Test spontanijh alternacija

U cilju procene eksplorativnog nagona i prostorne orijentacije, odgovor miševa u testu spontanijh alternacija prikazan je na Slici 44 i Tabeli 21. Naime, utvrđeno je da se stepen alternacija nije razlikovao kako između sprovedenijh baterija testova, tako ni između testiranih grupa (grupa x vreme:  $F(2, 64) = 0,566, p = 0,688$ ). U reverznoj fazi

primećen je efekat kratkotrajne suplementacije na prostorno učenje miševa ( $\lambda^2 = 8,400$ ,  $p = 0,015$ ) koji je izostao nakon dugotrajne suplementacije ( $\lambda^2 = 2,238$ ,  $p = 0,327$ ).

Dakle, kratkotrajna suplementacija je, bilo kakao prahom, bilo metilksantinima, povećala stepen spontanijh alternacija kod miševa, dok je nakon dugotrajne suplementacije došlo do adaptacije na količine biološki aktivnih jedinjenja kakao praha ili se odrazio efekat starenja, te napretka u učenju nije bilo.



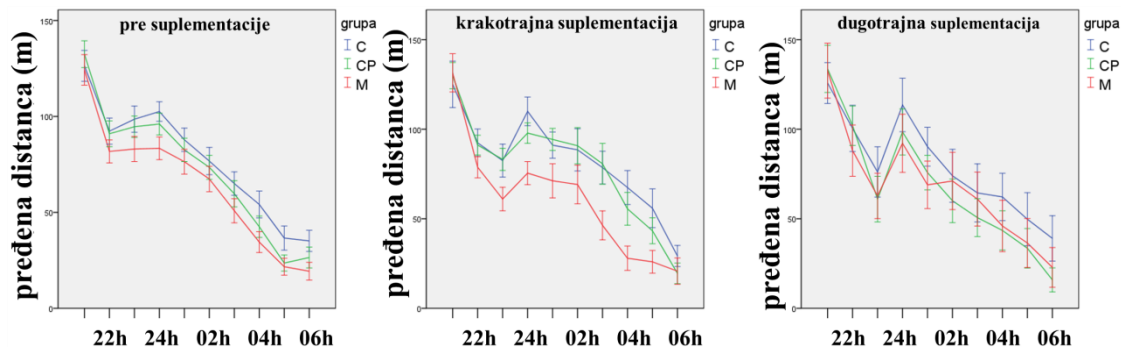
Slika 44. Ponašanje miševa u akvizicionoj fazi testa spontanijh alternacija. Ni tip ni dužina suplementacije nisu pokazali uticaj na procenat alternacija miševa (grupa x vreme:  $F(2, 64) = 0,566$ ,  $p = 0,688$ ).

Tabela 21. Procenat miševa koji je odlazio u neispitan (novi) krak lavirinta u reverznoj fazi testa spontanijh alternacija

trajanje suplementacije	C		CP		M	
pre suplementacije	25 %	3(12)	16,67 %	2(12)	8,33 %	1(12)
kratkotrajna	41,67 %	5(12)	100 %	0(12)	8,33 %	1(12)
dugotrajna	33,33 %	4(12)	45,45 %	5(11)	16,67 %	2(12)

#### 4.7.9 Spontana noćna aktivnost

Ritam noćne aktivnosti (lokomocija) životinja kroz varijablu ukupna pređena distanca prikazan je na Slici 45.



Slika 45. Spontana noćna aktivnost miševa. Svaka tačka na grafiku predstavlja spontanu aktivnost u toku jednog sata u periodu od 20:00 – 06:00 h. Miševi suplementirani metilksantinima su pokazivali manju lokomotornu aktivnost u toku testiranja, ali grupna rezlika kroz vreme nije potvrđena (grupa x vreme x sat:  $F(36, 594) = 0,767$ ,  $p = 0,835$ ). Pokazan je efekat kratkotrajne suplementacije na ukupno pređenu distancu miševa (videti u tekstu).

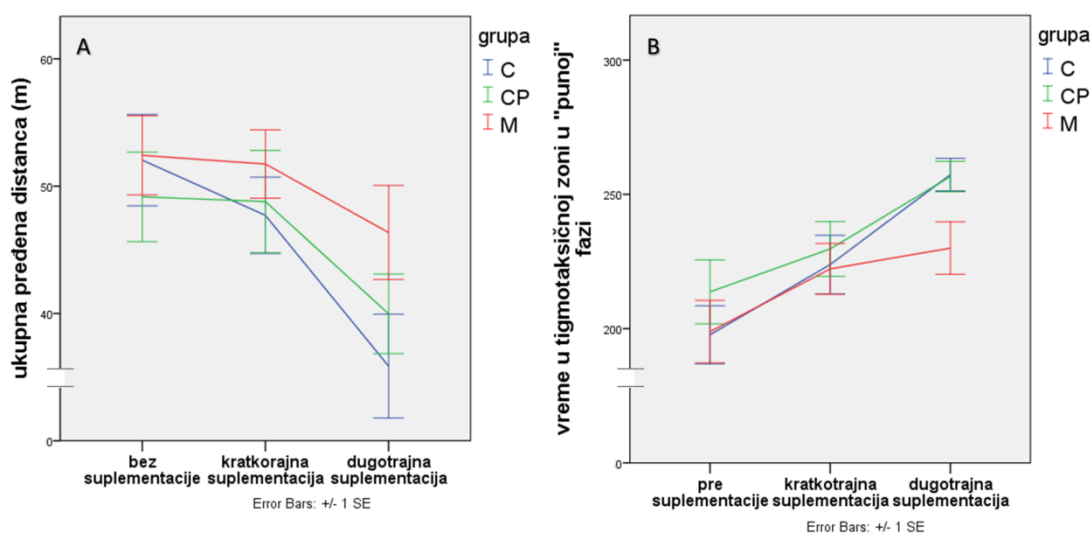
Najveća lokomotorna aktivnost svih životinja nezavisno od dužine suplementacije i testirane grupe uočena je oko ponoći (sat:  $F(9, 594) = 164,299$ ,  $p < 0,001$ ). Miševi suplementirani metilksantinima su prilikom izvođenja sve tri bihevioralne baterije prelazili kraće distance, ali statistički značajna razlika između grupa nije pronađena (grupa x vreme x sat:  $F(36, 594) = 0,767$ ,  $p = 0,835$ ). S obzirom da su sve životinje u prvom satu pokazale hiperlokomociju indukovanu novom sredinom, ovaj segment je eliminisan iz analize i uzeto je u razmatranje smanjenje ukupne pređene distance kod miševa suplementiranih metilksantinima nakon kratkotrajne suplementacije koje se ispostavilo statistički značajno ( $F(2, 33) = 5,104$ ,  $p = 0,012$ ), dok ovog efekta nije bilo nakon dugotrajne suplementacije ( $F(2, 33) = 0,263$ ,  $p = 0,771$ ). Ovakav nalaz afirmativan je u pogledu efekta kratkotrajne suplementacije koji je uočen i u testu spontanih alternacija, sa tim da se po pitanju smanjene lokomocije izdvojila metilksantinska grupa.

#### 4.7.10 Test novog objekta

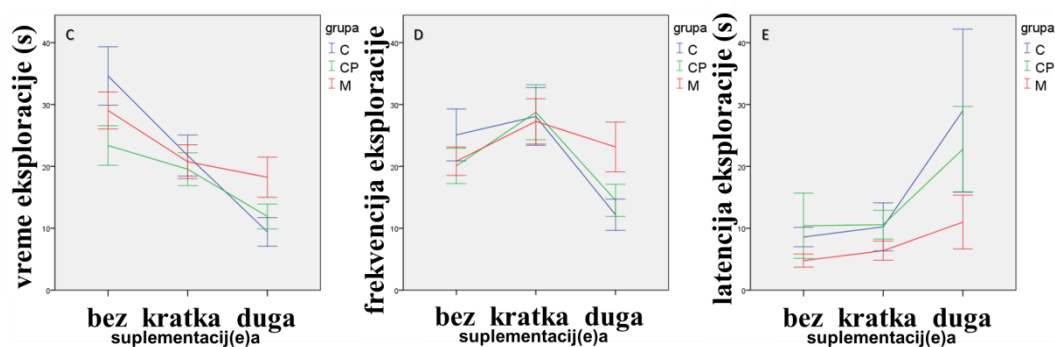
Lokomocija i istraživačko ponašanje životinja u testu novog objekta prikazani su na Slici 46.

Lokomotorna aktivnost svih životinja se vremenom smanjivala (vreme:  $F(2, 64) = 19,068$ ,  $p < 0,001$ ), ali značajne razlike između suplementacionih grupa nije bilo (grupa x vreme x faza:  $F(4, 64) = 0,339$ ,  $p = 0,851$ ). Dodatno, želja za ispitivanjem se umereno smanjivala, što je predstavljeno dužim vremenom koje su životinje provodile u tigmotaksičnoj zoni tokom pune faze eksperimenta (vreme:  $F(2, 64) = 78,045$ ,  $p < 0,001$ ).

Nakon kratkotrajne suplementacije eksplorativno interesovanje životinja se nije promenilo u odnosu na testiranje pre suplementacije (grupa:  $F(3, 32) = 1,013$ ,  $p = 0,400$ ), dok je nakon šest meseci kod životinja zapažen trend opadanja (grupa:  $F(3, 31) = 2,888$ ,  $p = 0,051$ ), te ovakav nalaz može biti posledica starenja i/ili habituisanja na arenu. Nakon testa novog objekta važno je napomenuti da su kakao prahom suplementirane životinje održale svoje eksplorativno vreme nakon kratkotrajne suplementacije ( $t_{11} = 1,498$ ,  $p = 0,162$ ), za razliku od kontrole ( $t_{11} = 2,699$ ,  $p = 0,021$ ) i miševa suplementiranih metilksantinima ( $t_{11} = 2,575$ ,  $p = 0,026$ ) kod kojih je ono značajno opalo (Slika 46).







Slika 46. Performansa miševa u testu novog objekta. (A) Efekat suplementacije na lokomotornu aktivnost miševa nije zapažen (grupa x vreme x faza:  $F(4, 64) = 0,339$ ,  $p = 0,851$ ). (B) Želja za ispitivanjem se kroz vreme smanjivala kod svih miševa (vreme:  $F(2, 64) = 78,045$ ,  $p < 0,001$ ). (C, D, E) Primećen je trend opadanja eksplorativnog interesovanja nakon dugotrajne suplementacije ( $F(3, 31) = 2,888$ ,  $p = 0,051$ ).

#### 4.7.11 Test otvorenog polja

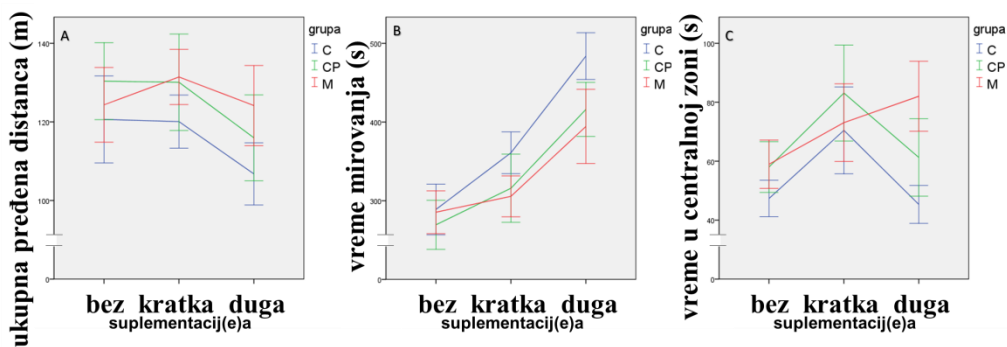
Emocionalna reaktivnost miševa merena je testom otvorenog polja i postignute performanse prikazane su na Slici 47.

Statistički značajna razlika između grupa u pogledu ukupne pređene distance u testu otvorenog polja nije utvrđena (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 0,428$ ,  $p = 0,788$ ). Tokom vremena došlo je do povećanja imobilnosti svih životinja (vreme:  $F(2, 62) = 27,381$ ,  $p < 0,001$ ); ovakav nalaz može biti rezultat njihovog prethodnog poznavanja arene i smanjenog eksplorativnog nagona što je konzistentno sa rezultatima testa novog objekta.

Sličan ishod dobijen je kada su grupe posmatrane u posebnim vremenskim okvirima, u pogledu pređene distance i vremena provedenog u tigmotaksičnoj zoni (rezultati nisu prikazani). Naime, nakon kratkotrajne suplementacije nije bilo grupne razlike (grupa:  $F(2, 33) = 0,260$ ,  $p = 0,772$ ), dok je dugotrajnom suplementacijom dostignut trend u odnosu na kontrolu (grupa:  $F(2, 31) = 2,913$ ,  $p = 0,069$ ).

Kako bi se upotpunio ponašajni profil suplementiranih životinja u testu otvorenog polja, urađeno je poređenje njihovog ponašanja u centralnoj zoni (provedeno

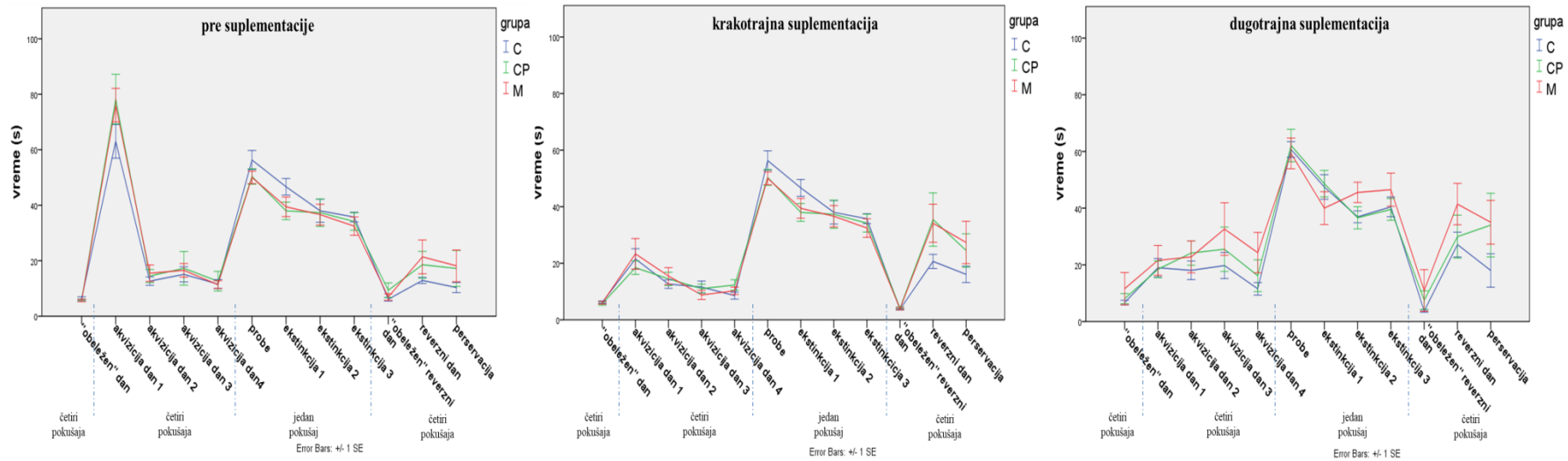
vreme, broj ulazaka kao i pređena distanca). Uočeno je da se kod miševa koji su bili kratkotrajno izloženi suplementaciji kakao prahom produžilo vreme provedeno u centralnoj zoni ( $t_{11} = 2.411$ ,  $p = 0,035$ ) i da je ovaj efekat nestao nakon dugotrajne suplementacije, a da do promena nije došlo u toku suplementacije metilksantinima (Slika 47).



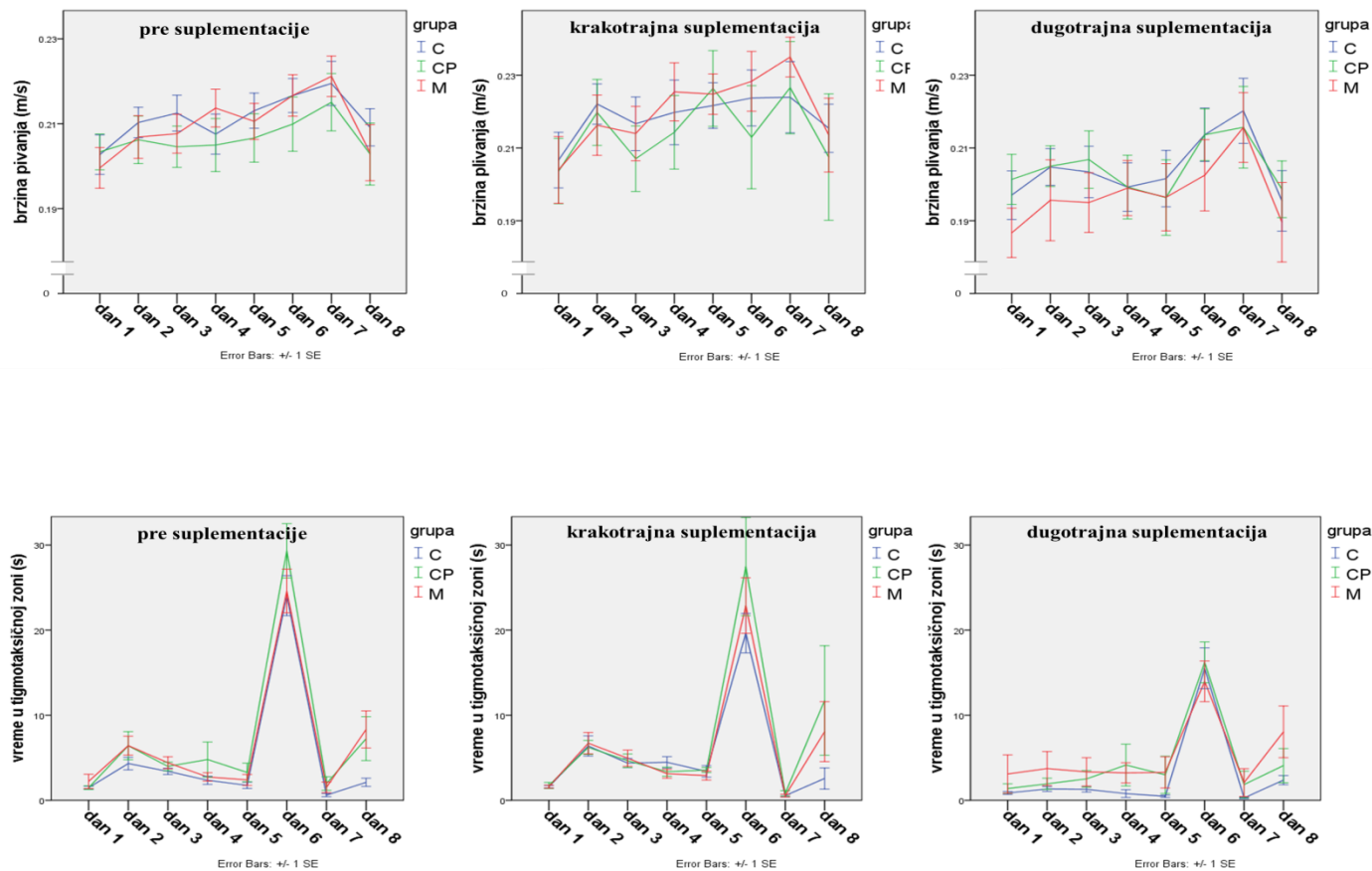
Slika 47. Performansa miševa u testu otvorenog polja. (A) Faktor suplementacije kroz vreme nije imao značajan efekat na ukupnu pređenu distancu (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 0,428$ ,  $p = 0,788$ ). (B) Usled vremena imobilnost svih životinja je povećana (vreme:  $F(2, 62) = 27,381$ ,  $p < 0,001$ ). (C) Miševi kratkotrajno izloženi suplementaciji kakao prahom proveli su više vremena u centralnoj zoni (videti u tesktu).

#### 4.7.12 Morisov vodeni lavirint

Sposobnosti učenja i pamćenja miševa u Morisovom vodenom lavirintu sumirane su na Slici 48 i Slici 49.



Slika 48. Performansa miševa u Morisovom vodenom lavirintu. Na grafikonima je prikazana srednja vrednost latencija do pronalaženja platforme u prvom danu testiranja iz četiri pokušaja, zatim srednja vrednost latencija iz četiri pokušaja tokom četiri dana akvizicije, vreme provedeno u ciljanom kvadrantu (gde se proteklih dana nalazila platforma) u pokušajima *probe* i održavanja memorije, srednja vrednost latencija do pronalaženja platforme iz četiri pokušaja u reverznim danima, kao i ukupno vreme provedeno u ciljanom kvadrantu poslednjeg dana testiranja. Ni tip ni dužina suplementacije nisu doprineli emocionalnom odgovoru miševa, kao ni stopi prostornog učenja i pamćenja (videti u tekstu).



Slika 49. Brzina plivanja miševa (gore) i vreme provedeno u tigmotaskičnoj zoni Morisovog vodenog lavirinta (dole). Vrednosti na grafikonima predstavljaju srednju vrednost četiri pokušaja za svakog miša po danu. Brzina plivanja miševa dugotrajno suplementiranih metilksantinima menjala je svoj trend (videti u tekstu). Sve eksperimentalne životinje šestog dana smanjile su svoj tigmotaksis nakon dugotrajne suplementacije (vreme:  $F(2, 62) = 94,416, p < 0,001$ ).

Bez obzira da li su miševi suplementirani ili ne, svi su prvog dana testiranja u Morisovom vodenom lavirintu pokazali dobro plivanje i vizuo-motorno navođenje ka vidljivoj platformi na osnovu latencije (grupa x vreme x pokušaj:  $F(12, 186) = 0,720$ ,  $p = 0,731$ ). Međutim, posmatranjem brzine plivanja uočeno je da su dugotrajno suplementirane životinje metilksantinima plivale sporije u poređenju sa prethodna dva testiranja ( $t_{11} = 2,504$ ,  $p = 0,029$ ). Vreme koje su miševi proveli u tigmotaksičnoj zoni nije se značajno promenilo u ovoj fazi testa vodenog lavirinta (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 0,874$ ,  $p = 0,485$ ).

Prvog dana akvizicije, svim miševima u fazi pre suplementacije bilo je potrebno znatno više vremena da pronađu nevidljivu platformu u poređenju sa fazama kratkotrajne i dugotrajne suplementacije (vreme:  $F(2, 62) = 97,704$ ,  $p < 0,001$ ). Ovakav nalaz potvrđuje da su se sve životinje dobro upoznale sa lavirintom tokom prvog testiranja. Latencija je značajno opadala tokom naredna tri dana akvizicije u fazi pre suplementacije (dan:  $F(3, 99) = 153,014$ ,  $p < 0,001$ ) i nakon kratkotrajne suplementacije (dan:  $F(3, 99) = 13,331$ ,  $p < 0,001$ ) što nam ukazuje na to da su životinje učile. Kod životinja (posebno) dugotrajno suplementiranih metilksantinima latencija se povećala, dakle ove životinje nisu pokazivale sposobnost učenja, ali statistički značajna razlika između grupa nije utvrđena (grupa x dan:  $F(6, 93) = 0,697$ ,  $p = 0,653$ ). Interesantno, brzina plivanja suplementiranih životinja menjala je svoj trend usled dugotrajne suplementacije, i to tako da su metilksantinske životinje smanjile svoju brzinu plivanja u danima akvizicije ( $t_{11} = 2,514$ ,  $p = 0,030$ ). Nakon dugotrajne suplementacije došlo je do povećanja tigmotaksije kod obe eksperimentalne grupe: kakao prah ( $t_{33} = 4,394$ ,  $p < 0,001$ ) i metilksantini ( $t_{33} = 3,236$ ,  $p = 0,003$ ).

Analizom vremena provedenog u kvadrantu bazena gde je prethodnih dana bila pozicionirana platforma, dobijeno je da svi miševi provode većinu vremena u toku prvog pokušaja upravo u tom kvadrantu (pokušaj x vreme:  $F(6, 186) = 5,310$ ,  $p < 0,001$ ), što je ukazalo da svi koriste prostornu strategiju učenja. Dodatno, u toku naredna tri pokušaja, istog dana, vreme provedeno u tom kvadrantu se smanjivalo na isti način kod svih životinja te razlike između grupa nisu zabeležene. Šta više, brzina plivanja životinja dugo suplementiranih metilksantinima u ovoj fazi testa Morisovog vodenog lavirinta bila je značajno snižena nakon dugotrajne suplementacije ( $t_{11} = 4,524$ ,  $p = 0,001$ ). Sve

eksperimentalne životinje smanjile su svoj tigmotaksis nakon dugotrajne suplementacije (vreme:  $F(2, 62) = 94,416$ ,  $p < 0,001$ ).

Sedmog dana testiranja sve životinje su za jako kratko vreme pronalazile platformu te grupne razlike nije bilo (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 0,561$ ,  $p = 0,692$ ). U pogledu njihove brzine plivanja (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 0,243$ ,  $p = 0,913$ ) i tigmotaksije (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 1,101$ ,  $p = 0,364$ ) takođe nije bilo razlika.

Poslednjeg dana testiranja, kada je platforma bila postavljena u suprotni kvadrant bazena, ali ispod nivoa vode, svim miševima bilo je potrebno više vremena da pronađu platformu u poređenju sa vremenom potrebnim prethodnog dana (bez suplementacije:  $t_{35} = 3,888$ ,  $p < 0,001$ ; kratkotrajna suplementacija:  $t_{35} = 6,645$ ,  $p < 0,001$ ; dugotrajna suplementacija:  $t_{33} = 6,585$ ,  $p < 0,001$ ). Ovo se može dovesti u vezu sa njihovim produženim zadržavanjem u kvadrantu gde je platforma bila pozicionirana u toku prvih pet dana testiranja. Brzina plivanja nije bila afektovana grupom niti dužinom suplementacije (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 0,449$ ,  $p = 0,773$ ). Što se tigmotaksije tiče ispostavilo se da je bila izraženija kod dugotrajno suplementiranih životinja metilksantinima ali bez statističke značajnosti (grupa x vreme:  $F(4, 62) = 1,130$ ,  $p = 0,351$ ).

#### **4.7.13 Učenje/pamćenje, emocionalna reaktivnost i lokomotorna aktivnost**

Sagledavajući bihejvioralni fenotip miševa kroz različite testove od kojih svaki sadrži gotovo sve segmente ponašanja, efekte kratkotrajne i dugotrajne suplementacije kakao prahom možemo „grubo“ podeliti na tri glavna domena: učenje/pamćenje, emocionalna reaktivnost i lokomotorna aktivnost.

Starenje je fiziološki proces povezan sa mnogim hroničnim neurodegenerativnim bolestima, međutim precizan uzrok neuronske degeneracije, koja je u osnovi ovih bolesti, do danas nije u potpunosti ispitan. Smatra se da je u patologiji razvoja uključeno nekoliko ćelijskih i molekularnih mehanizama, uključujući poremećaj redoks ravnoteže, poremećaj funkcije mitohondrija, aktivaciju neuronske apoptoze, depoziciju agregiranih proteina, i eksitotoksičnost. Većina postojećih lekova za lečenje neurodegenerativnih poremećaja nema potencijal da suprimira nastajanje neuronske degeneracije, i stoga

postoji opravdano interesovanje da se razviju alternativne opcije koje bi sprečile ili prevenirale progresivni gubitak specifične neuronske populacije. Imajući u vidu da je u osnovi mnogih neurodegenerativnih bolesti povećan moždani oksidativni stres, čine se snažni napori usmereni ka razvijanju antioksidativne strategije u borbi protiv neuronskih oštećenja.

Naime, veoma je intenzivno interesovanje za neuroprotektivne efekte grupe sekundarnih metabolita biljaka poznatih kao polifenoli, koji su moćni antioksidansi *in vitro*. Veliki broj dijetarnih interventnih studija polifenolima kod ljudi (Macready i sar., 2009) i životinja (Rendeiro i sar., 2012; Spencer, 2009) pokazao je korisne efekte na vaskularnu funkciju i poboljšanje kognitivnih performansi. Među njima ističu se studije u kojima su istraživačka pitanja bila usmerena ka suplementaciji proizvodima na bazi grožđa, zelenog čaja, borovnice i kakao praha, tj. ka namirnicama koje karakteriše visok sadržaj flavonoida. Dosadašnji dokazi impliciraju da ove niskomolekularne molekule, koje suštinski nisu esencijalne, mogu biti odgovorne za brojne neuroefekte hrane bogate flavonoidima, direktno ili indirektno intetereagujući sa moždanim struktrama koje se povezuju sa memorijom (Spencer, 2009; Williams i sar., 2008). Istorijski gledano, prvo je neuroprotektivni potencijal flavanola pripisivan njihovoj sposobnosti da ispolje antioksidativno delovanje (Rice-Evans i sar., 1996), koje se ogledalo, ili u tome da budu direktni „hvatači“ reaktivnih vrsta kiseonika, ili da utiču na neku unutarćeljsku redoks reakciju (Pollard i sar., 2006). Međutim, postaje potpuno jasno da ova antioksidativna aktivnost flavanolima nije dovoljna za delovanje *in vivo*, naročito u moždanom tkivu, gde dostižu veoma niske koncentracije. Umesto toga, postulirano je da je njihov efekat u mozgu posredovan sposobnošću da zaštite osetljive neurone, da poboljšavaju postojeću neuronsku funkciju, stimulišu moždani protok krvi i indukuju neurogenezu (Spencer, 2008).

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 nekoliko aspekata pamćenja i učenja; naročito na brzu (Wang i sar., 2006) i sporu (Hartman i sar., 2006; Joseph i sar., 2009) memorijsku akviziciju, kratkoročnu radnu memoriju (Pu i sar., 2007; Ramirez i sar., 2005), dugoročnu

referentnu memoriju (Casadesus i sar., 2004), učenje preokreta (Hofmann, 2004) i zadržavanje memorije/pronalazak (Hofmann, 2004). Na primer, za flavanol epikatehin (500 µg/g telesne mase), pokazano je da poboljšava zadržavanje prostorne memorije kod miševa u testu Morisonovog vodenog lavirinta (Praag i sar., 2007).

Imajući ovo u vidu, domeni ponašanja pamćenje i učenje u našoj studiji mereni su kroz dva testa: Morisov vodeni lavirint i test spontanijih alternacija. Iako je veliki broj studija ispitivao učestalost različitih regija mozga u posredovanju efekata psihotropnih supstanci u Morisovom vodenom lavirintu, čini se da je uloga hipokampusa od centralnog značaja (Morris i sar., 1986; Poucet i sar., 2000). Sa tim u vezi, u vodenom lavirintu je moguće istraživati dve komponente memorije - proceduralnu (implicitnu) i deklarativnu (eksplicitnu), naravno u meri u kojoj se ovi termini mogu primeniti na eksperimente u glodara (Izquierdo i sar., 2006). Test spontanijih alternacija u osnovi testira prostornu orijentaciju i učenje. Imajući u vidu da glodar ima slobodu izbora odlaska u različite krake lavirinta, svrha testa je da pacov ili miš zapamti koji krak lavirinta je poslednje posećen i da ode u novi, neispitan krak. Šire gledano, svrha i ovog testa je testiranje memorije koja je posledica hipokampalnih promena. U našoj studiji, u testu spontanijih alternacija, dobijen je nalaz da je kratkotrajna suplementacija, bilo kakao prahom, bilo metilksantinima, unapredila prostorno učenje kod miševa, ali da posle dugotrajne suplementacije efekta nije bilo. U Morisovom vodenom lavirintu, prostorno učenje i formiranje memorije miševa praćeno je posmatranjem vremena do pronalaženja platforme, a strategije učenja analizom vremena provedenog u kvadrantu bazena gde je prethodnih dana bila pozicionirana platforma. Praćeni parametri nisu se statistički značajno menjali, kako nakon kratkotrajne, tako ni nakon dugotrajne suplementacije.

Analizirajući ponašajni profil suplementiranih miševa u testu spontanijih alternacija i Morisovom vodenom lavirintu, može se sumirati da su biološki aktivna jedinjenja kakao praha u primenjenim koncentracijama 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. Ovakav nalaz stimuliše buduće studije na većem uzorku i opravdava logičko pitanje koliko bi trebalo da traje suplementacija biološki aktivnim komponentama hrane i u kojoj količini je potrebno uzimati iste da bi se efekti na ovaj domen ponašanja realizovali.



Razlog neznačajnog uticaja suplementacije na kognitivne performanse može biti činjenica da su u našoj studiji miševi u proseku uzimali 12 µg flavonoida po gramu telesne mase, što je mnogostruko manje od količine kojim su suplementirani miševi u studiji (Praag i sar., 2007), gde je aplikovano 500 µg epikatehina/g. Dodatno, u studiji (Casadesus i sar., 2004), pozitivan uticaj na memoriju pacova, indukcijom hipokampalne neurogeneze, uočen je tek suplementacijom od 20 g flavonoidnog ekstrakta borovnice po kg telesne mase. Rezultati naše studije su donekle konzistentni sa rezultatima studije urađene od strane Stringera i saradnika (Stringer i sar., 2015). Ovi autori ispitivali su uticaj suplementacije flavanolima (4 mg dnevno) na test prostornog razdvajanja. Test se sastojao u tome da miš prepozna dva indentična oblika na ekranu, sa tim što objekti mogu biti blizu jedan drugog ili međusobno udaljeni, te se ova pojava naziva veliko i malo razdvajanje. Na kraju testa nije bilo statistički značajne razlike u brzini velikog i malog razdvajanja između kontrolne i tretirane grupe. Autori su ovo interpretirali da suplementacija flavanolima nije uticala na poboljšanje prostorne memorije kod miševa.

Sledeći domen ponašanja od interesa u ovoj studiji bio je emocionalna reaktivnost miševa, odnosno potencijalni anksiolitički i antidepresivni efekat koji bi se mogao postići suplementacijom kakao prahom ili metilksantinima. Efekti flavonoida na navedeni domen ponašanja uočeni su u odgovarajućem broju studija, kako na ljudima, tako i u animalnim modelima (An i sar., 2008; Messaoudi i sar., 2008). Za ispitivanje emocionalnih odgovora kod miševa sprovedeni su: test otvorenog polja, test silaženja sa platforme, test održavanja na žici i test novog objekta. Naime, za procenu anksiolitičkog efekta aktivnih komponenti kakao praha primenjen je test otvorenog polja u kome je poređeno ponašanja kontrolne i suplementiranih grupa u areni sa obeleženim zonama (broj ulazaka, provedeno vreme i pređena distanca) kao i test silaženja sa platforme kojim je posmatrano vreme za koje se miševi spuštaju sa uzvišene platforme u osvetljenoj prostoriji. Test koji se koristi za ispitivanje uticaja na lokomotorne sposobnosti, ali čiji rezultati mogu biti interpretirani i u svetlu antidepresivnog efekta je test održavanja na žici. Test novog objekta nam je poslužio za ispitivanje uticaja suplementacije na istraživaško ponašanje životinja, praćenjem parametara eksplorativnog nagona (trajanje, frekvencija i latencija).

Anksiolitički efekat primenjenih količina biokativnih jedinjenja kakaoa u testu silaženja sa platforme nije dokazan. U testu otvorenog polja uočeno je da se kod miševa koji su bili kratkotrajno izloženi suplementaciji kakao prahom produžilo vreme provedeno u centralnoj zoni arene i da je ovaj efekat nestao nakon dugotrajne suplementacije, a da do promena nije došlo u toku suplementacije metilksantinima. U testu novog objekta dobijeno je da se nakon kratkotrajne suplementacije eksplorativno interesovanje životinja nije promenilo, dok je kod dugotrajno suplementiranih životinja zapažen visok trend opadanja. Latencija do pada svih miševa sa žice tokom suplementacione studije značajno se skraćivala, što se interpretira da ni suplementacija kakao prahom, niti metilksantinima ne afektuje odgovor životinja u testu održavanja na žici. Sveobuhvatno, ovi rezultati ukazuju da u našoj studiji niti kakao prah, niti sintetski metilksantini u primenjenim dozama nisu imali značajan uticaj na afektivni domen moždanih funkcija. Ovi rezultati su u koliziji sa rezultatima dobijenim od strane Stringera i saradnika (Stringer i sar., 2015). Autori su pokazali da suplementacija miševa epikatehinom ne dovodi do statistički značajne razlike u ukupnom pređenom putu između kontrolne grupe miševa i onih tretiranih epikatehinom u testu otvorenog polja. Međutim, odnos vremena provedenog u centralnom regionu polja u poređenju sa vremenom provedenim na periferiji bio je značajno veći kod epikatehin-tretiranih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom.

Razlog disonance između naših rezultata i rezultata navedene studije možda leži u sledećem. Postoje dokazi da je anksiolitički efekat epikatehina posledica povećane proizvodnje i/ili smanjene razgradnje kateholamina u strukturama kao što su prefrontalna kora i hipokampus. Takođe, treba pomenuti i podatak da epikatehin dovodi do povećane ekspresije gena za BDNF u hipokampusu, što takođe doprinosi anksiolitičkom efektu, ali i antidepressivnom efektu. Za postizanje ovih efekata epikatehina bila je potrebna četvoromesečna suplementacija, pri čemu su miševi svakodnevno uzimali 4 mg epikatehina, što je mnogostruko više od količine ukupnih flavan-3ola koji su ingestirali miševi u našoj studiji.

Treći segment našeg istraživanja uticaja suplementacije kakao prahom i metilksantinima na ponašanje miševa bila je lokomotorna aktivnost i ona je primarno merena u testu spontane noćne aktivnosti, rota-rod testu i testu hodanja po gredi.

Ispitivanje opšte motorne aktivnosti glodara predstavlja jedan od fundamentalnih pristupa prilikom testiranja psihofarmaka (Geyer i sar., 1990). Sam termin „spontana noćna lokomotorna aktivnost” ukazuje da se radi o grupi neuslovljenih, odnosno etoloških testova u kojima nema eksplicitnih uslovljavanja i gde se rutinski prate parametri kretanja, propinjanje, timarenje, grickanje i dr. Mnoge psihotropne supstance se definišu kao stimulansi ili depresivi dominantno na bazi njihovog opšteg uticaja na lokomotornu aktivnost u glodara. Smanjenje aktivnosti u ovom testu može se povezati sa sedativnim efektom koji se javlja nakon primene pojedinih supstanci. Za praćenje efekta u ovom testu koriste se obično parametri kao što su ukupni pređeni put i vreme provedeno u imobilnosti. Pre više od pola veka, pokazano je da se stepen relaksacije skeletne muskulature koju prouzrokuju određeni lekovi može proceniti na osnovu kapaciteta miša ili pacova da ostane na pokretnom rota-rodu (Dunham i Miya, 1957). Brojne laboratorije i danas rutinski koriste ovaj test, ali prvenstveno za procenu uticaja psihotropnih lekova na motornu funkciju jer se ataksija tj. gubitak motorne koordinacije može smatrati dobrim prediktorom sedativnog efekta. Oštećenje motorne funkcije može značajno uticati na ispitivanje učenja i pamćenja, eksploracije, motivacije i drugih fenomena, pa je rotarod test od velikog značaja za istraživače iz različitih oblasti (Rustay i sar., 2003). Takođe, s obzirom da je ataksija jedan od osnovnih znakova mnogih neuroloških poremećaja, kao i moguće intoksikacije lekovima i pokazatelj neurotoksičnosti, regulatorni autoriteti su ovaj test svrstali u bihevioralnu bateriju testova za osnovnu procenu bezbednosti novih lekova (EMA, 2000). Na široku primenjivost rotaroda veliki uticaj imaju i drugi činioci: oprema nije skupa i omogućava lako rukovanje, validacija je prilično jednostavna, a test daje konzistentne i pouzdane rezultate. Treći rutinski test korišćen u našoj studiji za procenu održavanja balansa i koordinacije pokreta je test hodanja po gredi u kome je motorika kvalifikovana i kvantifikovana brojem proklizavanja prednjih i zadnjih ekstremiteta miševa i vremenom potrebnim za prelazak grede.

Rezultati naše studije pokazuju da je posle kratkotrajne primene dijetarno relevantnih količina, vreme prelaska grede životinja suplementiranih kakao prahom bilo statistički kraće u odnosu na vreme potrebno miševima suplementiranim metilksantinima. Ova statistička značajnost nije potvrđena nakon dugotrajne suplementacije. Rotarod test ukazuje da faktor suplementacije nije imao značajan efekat na trajanje „vožnje“, tj nije

bilo statistički značajne razlike između suplementiranih i kontrolne grupe, nezavisno od vremena. Test spontane noćne lokomotorne aktivnosti pokazuje značajno smanjenje lokomocije kod miševa suplementiranih metilksantinima nakon kratkotrajne suplementacije, dok su životinje iste grupe nakon dugotrajne suplementacije povećale svoju lokomotornu aktivnost te grupna razlika nije utvrđena. Sumirano, kratkotrajna suplementacija metilksantinima dovodi do smanjenja lokomotorne aktivnosti, dok dugotrajna suplementacija nema efekta na istu. Dobijeni rezultati se mogu porediti sa nalazom dobijenim u studiji sprovedenoj od strane Barraco i saradnika (Barraco i sar., 1985), u kojoj je ispitivan uticaj agonista i antagonista adenozijskih receptora na spontanu lokomotornu aktivnost na odraslim Swiss Webster mužjacima miševa. Lokomotorna aktivnost je merena i beležena pomoću Stoelting 31410 modular elektronskog monitora aktivnosti sa 6 senzora. Najniža doza (10 µg) kofeina dovela je do smanjenja lokomotorne aktivnosti ( $p < 0,05$ ), ali u višim dozama (150 µg) kofein je doveo do akutnog povećanja lokomotorne aktivnosti. Sa druge strane, Nikodijević i saradnici dobili su rezultat da akutno aplikovanje 20 mg/kg kofeina dovodi do povećanja lokomotorne aktivnosti, u odnosu na kontrolnu grupu (Nikodijevic i sar., 1993). Suprotno, hronično aplikovanje iste doze kofeina tokom 14 dana, dovelo je do toga da razlika u lokomotornoj aktivnosti miševa tretiranih kofeinom i miševa iz kontrolne grupe ne bude statistički značajna. Ovakvi ishodi mogu se tumačiti time da se bihejvioralni uticaj metilksantina ostvaruje delovanjem na najmanje dva različita tipa adenozijskih receptora. Naime, aktivacija  $A_1$  adenozijskih receptora povezana je sa smanjenjem nivoa cikličnog AMP, i ovo se ostvaruje pri nanomolarnim koncentracijama supstrata. Adenozijske  $A_2$  receptore, sa druge strane aktivira tek mikromolarna koncentracija adenzina spregnuto sa smanjenjem cAMP. Imajući u vidu da je afinitet kofeina veći za  $A_1$  receptore, može se pretpostaviti da će niska koncentracija ovog metilksantina prvo antagonizovati  $A_1$  receptore (i tako dovesti do inhibicije neurona i posledičnog smanjenja lokomocije), a tek viša koncentracija u moždanom tkivu (preko 60 µM) antagonizovati  $A_2$  receptore, ekscitirati neurone i povećati lokomotornu aktivnost (Snyder i sar., 1981). Iz navedenog možemo pretpostaviti da je u našoj studiji koncentracija metilksantina postignuta u moždanim strukturama bila niska, i da je to razlog smanjenja lokomocije usled kratkotrajne suplementacije. Ovakva pretpostavka postavlja pitanje zašto se efekat nije održao nakon dugotrajne suplementacije. Odgovor

bi mogao biti akumulacija metilksantina u organizmu ili činjenica da se na kofein tokom hroničnog unosa razvija tolerancija što je sasvim jasno dokazano u istraživanju lokomotorne aktivnosti na pacovima (Holtzman, 1983).

Sveobuhvatno, može se izvesti zaključak da se proces starenja u velikoj meri odrazio na testirano ponašanje životinja, i to uglavnom na domen emocionalne reaktivnosti, ali da na ove promene primenjene količine biološki aktivnih jedinjenja kakao praha nisu imale uticaj. Kratkotrajna suplementacija, bilo kakao prahom, bilo metilksantinima unapredila je prostornu orijentaciju životinja, a spontana lokomotorna aktivnost miševa bila je značajno smanjena samo nakon kratkotrajne suplementacije metilksantinima.

#### **4.8 UTICAJ DUGOTRAJNE DIJETARNE SUPLEMENTACIJE KAKAO PRAHOM NA NIVO PROTEINA I AKTIVNOST ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U HOMOGENATU JETRE**

Peta faza ove doktorske disertacije imala je za cilj da ispita uticaj dugotrajne primene dijetarno relevantnih količina kakao praha i ekvivalentne količine kombinovanih sintetskih metilksantina kakaoa (teobromin i kofein) na nivo proteina i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u homogenatu jetre starih miševa soja C57BL/6. Naime, ovaj deo suplementacione studije sproveden je na tri grupe eksperimentalnih životinja: kontrolni miševi (C, n = 11), miševi suplementirani kakao prahom (CP, n = 11) i miševi suplementirani metilksantinima (M, n = 12).

Narušavanje redoks ravnoteže smatra se jednim od osnovnih promena do kojih dolazi usled starenja čiji se efekat odražava na sve organe. Potvrđeno je da starenjem inicirano stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i povećana osetljivost tkiva jetre na oksidativna oštećenja mogu dovesti do različitih oboljenja. Uzrok ovakvih događaja su, između ostalog, promene aktivnosti enzima i koncentracija supstrata na nivou antioksidativne zaštite jetre (Yang i sar., 2015). Dakle, s obzirom da fiziološko starenje narušava redoks ravnotežu hepatocita, postavljena je hipoteza da li kakao prah, ali i njegove biološki aktivne komponente (metilksantini), mogu ispoljiti preventivno

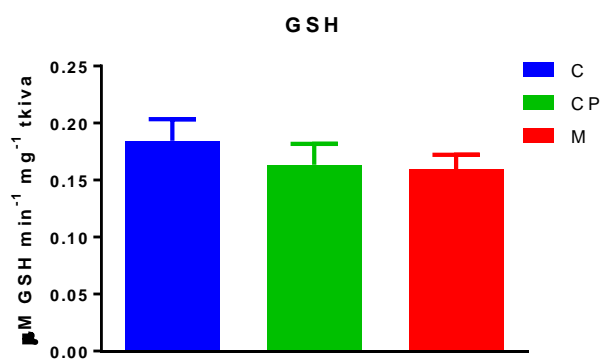
delovanje u pogledu antioksidativne zaštite kod starih miševa. Poznato je da je svaka namirnica specifična po svom hemijskom sastavu, međutim često se postavlja pitanje da li ona svoje efekte ostvaruje zahvaljujući ukupnom sastavu (gde funkcionalna interakcija između komponenti može značajno povećati ili smanjiti njihove samostalne efekte), ili je reč o delovanju pojedinačnih komponenti. Upravo je ovakav pristup primenjen u ovom delu suplementacione studije, te je procenjeno preventivno delovanje kakao praha kao jedinstvene namirnice shodno svom hemijskom sastavu (Ellam i Williamson, 2013), ali i ekvivalentne količine metilksantina kao najzastupljenijih bioaktivnih jedinjenja kakao praha na promenu enzimske komponente antioksidativne zaštite usled starenja.

Jetra je izabrana kao ciljni organ izučavanja nivoa proteina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite jer ona ima centralnu ulogu u metabolizmu i ujedno je glavni organ za neutralizaciju i eliminaciju brojnih endogenih i egzogenih supstanci iz organizma sa najvećim antioksidativnim kapacitetom u telu (Dufour i Clavien, 2010; Postic i sar., 2004). Efikasno funkcionisanje antioksidativnog sistema odbrane u jetri je od ključne važnosti za održavanje celokupnog sistema zaštite organizma.

Različiti su nivoi regulacije kojima ćelija nastoji da održi konstantno poželjno stanje, stanje homeostaze. Oni uključuju brojne mehanizme na nivou transkripcije, translacije, proteinske ekspresije ali i na nivou ispoljavanja svojih funkcija (npr. aktivnost enzima). Shodno tome da su hepatociti ćelije sa izrazito visokim homeostatskim potencijalom, ispitivan je uticaj suplementacije kakao prahom kao i njegovim bioaktivnim jedinjenjima na nivo proteinske ekspresije i aktivnosti enzima u homogenatu jetre starih miševa i rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (Slike 50 - 62).

#### **4.8.1 Nivo glutationa**

Nivo glutationa izražen kao  $\mu\text{M}$  GSH/min/mg tkiva prikazan je na Slici 50. Primenom analize varijanse nije zabeležena statistički značajna razlika između grupa.

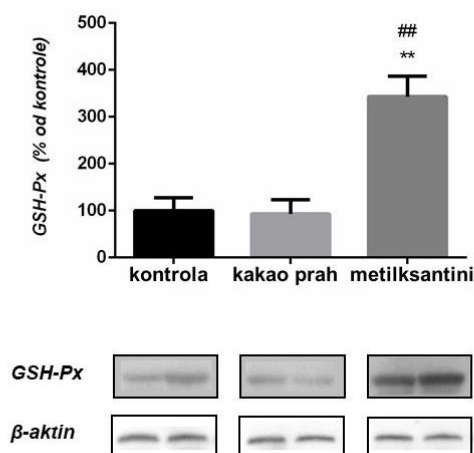


Slika 50. Nivo glutationa u homogenatu jetre miševa  
 Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

## 4.8.2 Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

### 4.8.2.1 Nivo GSH-Px proteina

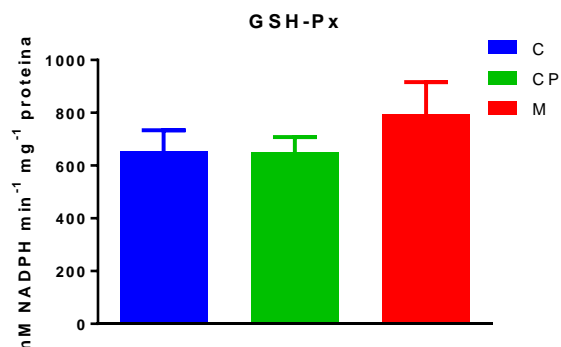
Rezultati dobijeni kvantifikacijom originalnih blotova za GSH-Px, prikazani na Slici 51, pokazuju da se nivo GSH-Px proteina statistički značajno razlikuje između grupa ( $F = 13,07$ ,  $p < 0,01$ ). Dodatno, primenom Tukey *post hoc* testa zapaženo je da je on značajno veći u grupi miševa suplementiranih metilksantinima u odnosu na kontrolne miševe ali i u odnosu na miševe koji su bili izloženi suplementaciji kakao prahom.



Slika 51. Nivo proteina GSH-Px normalizovan u odnosu na aktin u homogenatu jetre miševa. \*\* razlika eksperimentalne grupe od kontrolne ( $p < 0,01$ ), ## razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,01$ )

#### 4.8.2.1 Aktivnost GSH-Px

Merenjem aktivnosti GSH-Px uočeno je blago povećanje u grupi miševa tretiranih metilksantinima u odnosu na kontrolnu i drugu suplementacionu grupu, ali je statistički značajna razlika izostala (Slika 52). Interesantno je da je ista suplementaciona grupa imala značajno povećanje nivoa GSH-Px proteina, ali do ispoljavanja povećane aktivnosti nije došlo. Ovakav nalaz ukazuje nam na to da hepatociti regulišu aktivnost ovog enzima post-translaciono, odnosno aktivnost nije afektovana povećanim nivoom proteina jer hepatociti uvek teže da funkcionišu shodno aktuelnom stanju.

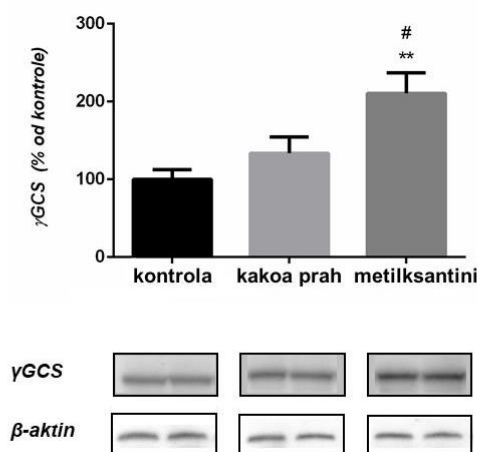


Slika 52. Aktivnost GSH-Px u homogenatu jetre miševa  
 Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini



#### 4.8.3 Nivo $\gamma$ -GCS ( $\gamma$ -glutamilcistein-sintetaza) proteina

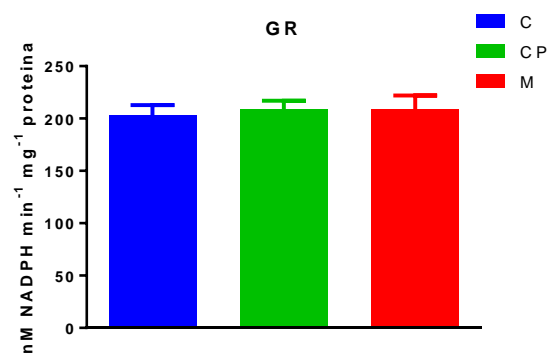
Promene nivoa  $\gamma$ -GCS proteina u homogenatu jetre miševa prikazane su na Slici 53. Izlaganje miševa dugotrajnoj suplementaciji metilksantinima dovelo je do povećane ekspresije  $\gamma$ -GCS proteina u poređenju sa kontrolnom grupom ali i grupom miševa čija je hrana bila obogaćena kakao prahom ( $F = 11,52$ ,  $p < 0,01$ ). Ovakav efekat metilksantina veoma je konzistentan sa njihovim efektom povećanja nivoa GSH-Px proteina. S obzirom da su oba ova proteina uključena u promet glutaciona, nameće se pitanje zašto njegov nivo nije afektovan istim tretmanom. Dakle, efekat metilksantina ostaje na nivou povećanja proteinske ekspresije.



Slika 53. Nivo proteina  $\gamma$ -GCS normalizovan u odnosu na aktin u homogenatu jetre miševa. \*\* razlika eksperimentalne grupe od kontrolne ( $p < 0,01$ ), # razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,05$ )

#### 4.8.4 Aktivnost glutation-reduktaze (GR)

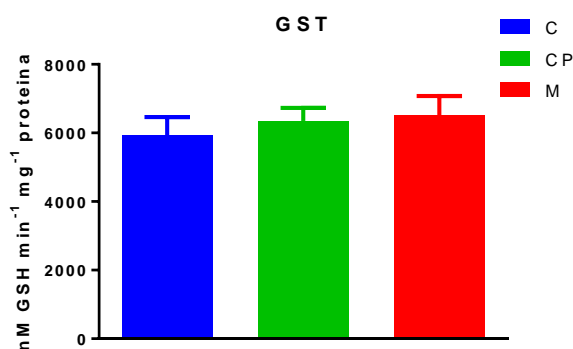
Aktivnost GR u homogenatu jetre miševa prikazana je na Slici 54. Rezultati pokazuju da je aktivnost GR bila oko  $200 \text{ nM NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteina u sve tri analizirane grupe miševa.



Slika 54. Aktivnost GR u homogenatu jetre miševa  
 Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

#### 4.8.5 Aktivnost glutation-S-transferaze (GST)

Izmerena aktivnost GST pratila je prethodno navedeni rezultat za aktivnost GR, te grupne razlike u pogledu ovog parametra nije bilo (Slika 55).

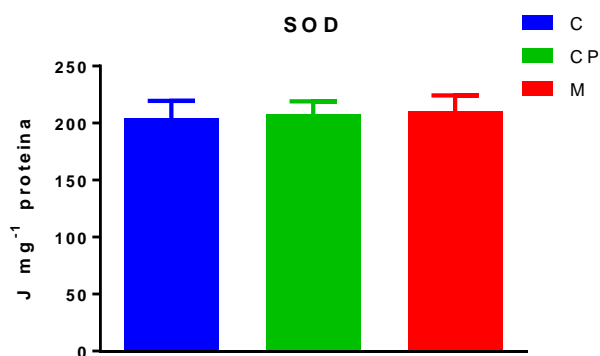


Slika 55. Aktivnost GST u homogenatu jetre miševa  
 Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

#### 4.8.6 Superoksid-dismutaza (SOD)

##### 4.8.6.1 Aktivnost SOD

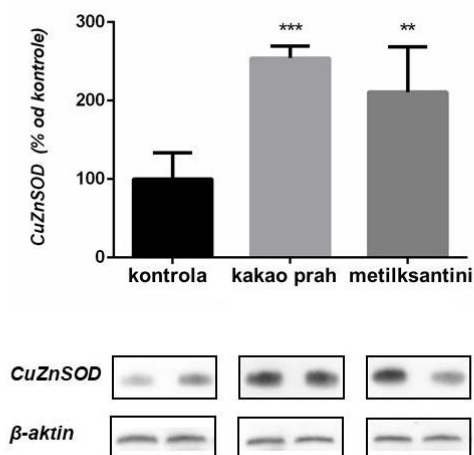
Aktivnost SOD je prikazana na Slici 56 sa koje se može primetiti da su određene vrednosti gotovo iste za sve tri grupe miševa.



Slika 56. Aktivnost SOD u homogenatu jetre miševa  
 Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

#### 4.8.6.2 Nivo CuZnSOD proteina

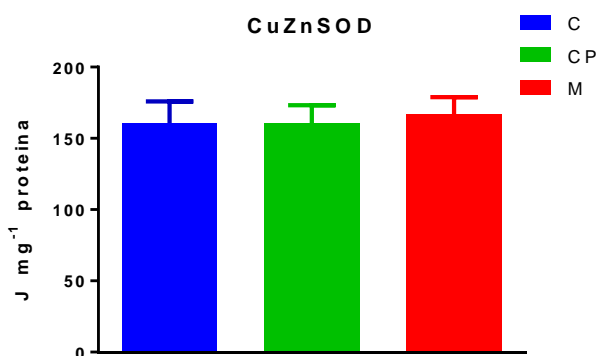
Western blot za CuZnSOD je pokazao statistički značajnu razliku u nivou ovog enzima u homogenatu jetre analiziranih miševa ( $F = 12,8$ ,  $p < 0,001$ ) (Slika 57). Primećena je razlika između i jedne i druge grupe suplementiranih životinja u odnosu na kontrolu, sa najvećom ekspresijom izmerenom za grupu miševa suplementiranih kakao prahom. Takođe, nije zapažena značajna razlika između suplementacionih grupa.



Slika 57. Nivo proteina CuZnSOD normalizovan u odnosu na aktin u homogenatu jetre miševa. \*\* razlika eksperimentalne grupe od kontrolne ( $p < 0,001$ ), \*\*\* razlika eksperimentalne grupe od kontrole ( $p < 0,01$ )

#### 4.8.6.3 Aktivnost CuZnSOD

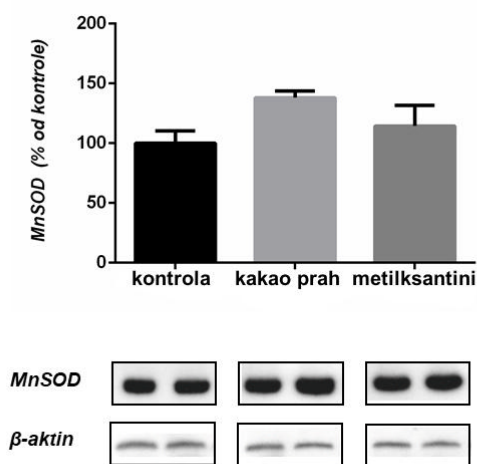
Kao što je prikazano na Slici 58, izlaganje miševa suplementaciji, bilo kakao prahom bilo metilksantinima, ne utiče značajno na aktivnost CuZnSOD hepatocita. Dobijeni nalaz u koliziji je sa povećanom ekspresijom CuZnSOD proteina i sugeriše da su uključeni dodatni mehanizmi regulacije ćelija u aktivnost ovog enzima.



Slika 58. Aktivnost CuZnSOD u homogenatu jetre miševa  
Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

#### 4.8.6.4 Nivo MnSOD proteina

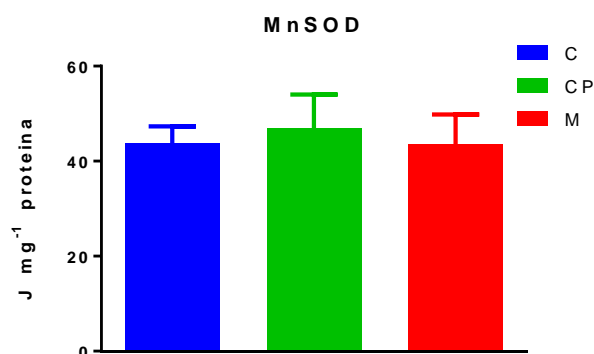
Može se zapaziti da se nivo MnSOD proteina kretao u opadajućem nizu: miševi suplementirani kakao prahom, miševi suplementirani metilksantinima, kontrolni miševi, ali statistički značajne razlike nije bilo (Slika 59).



Slika 59. Nivo proteina MnSOD normalizovan u odnosu na aktin u homogenatu jetre miševa

#### 4.8.6.5 Aktivnost MnSOD

Suplementacija kakao prahom dovela je do minimalnog porasta aktivnosti MnSOD u poređenju sa kontrolom dok promena usled suplementacije metilksantinima nije zabeležena (Slika 60).

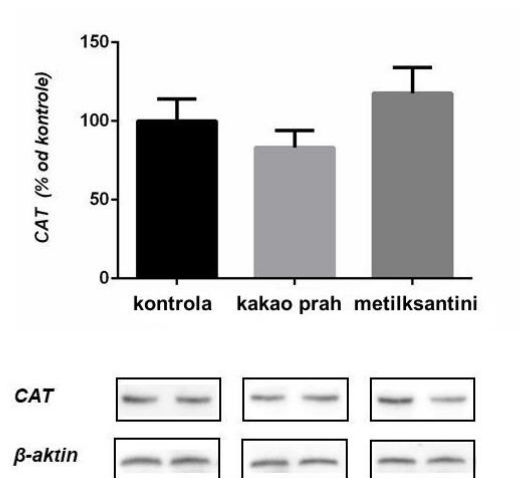


Slika 60. Aktivnost MnSOD u homogenatu jetre miševa  
Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

#### 4.8.7 Katalaza (CAT)

##### 4.8.7.1 Nivo proteina katalaze

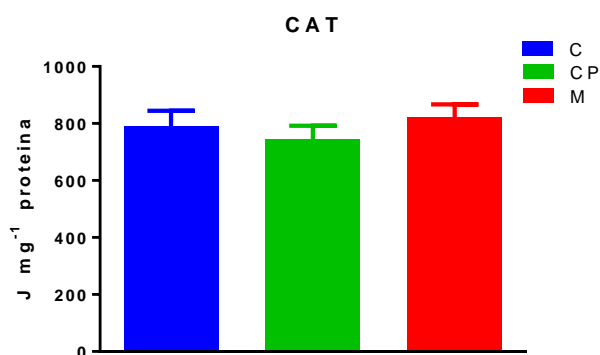
Rezultati dobijeni Western blot analizom katalaze prikazani su na Slici 61 i pokazuju da je suplementacija metilksantinima dovela do povećanja proteinske ekspresije katalaze, dok je suplementacija kakao prahom dovela čak do njenog smanjenja, ali primenom statističke analize razlika između grupa nije utvrđena.



Slika 61. Nivo proteina katalaze normalizovan u odnosu na aktin u homogenatu jetre miševa

#### 4.8.7.2 Aktivnost CAT

Uprkos blagim razlikama u proteinskom nivou katalaze kod suplementiranih miševa, efekta u pogledu promene katalazne aktivnosti nije bilo (Slika 62).



Slika 62. Aktivnost katalaze u homogenatu jetre miševa  
 Legenda: C - kontrola; CP - kakao prah; M - metilksantini

#### 4.8.8 Efekat biološki aktivnih jedinjenja kakao praha na enzime antioksidativne zaštite

Sagledavanjem ishoda petog eksperimentalnog cilja ove doktorske disertacije, možemo sumirati da je dugotrajna primena dijetarno relevantnih količina metilksantina

dovela do povećanja nivoa GSH-Px i  $\gamma$ GCS proteina, da su i kakao prah i metilksantini prouzrokovali povećanje nivoa CuZnSOD proteina, ali da se nivo glutatona i aktivnost analiziranih antioksidativnih enzima nisu promenili. Dobijen nalaz potvrđuje da su enzimi antioksidativne zaštite veoma složeno regulisani; na transkripcionom, translacionom i post-translacionom nivou, te možemo pretpostaviti da je došlo do određene post-translacione modifikacije koja je umanjila aktivnost sintetisanih proteina.

Značajno povećanje nivoa GSH-Px i CuZnSOD proteina i povećanje nivoa katalaze (bez statističke značajnosti) usled suplementacije metilksantinima moglo bi se objasniti sledećim molekularnim mehanizmom. Naime, metilksantini povećavaju cAMP, samim tim produkuje se više AMP, koji aktivira AMPK (*AMP-activated protein kinase*), a ona fosforiliše transkripcioni faktor Nrf2. Nrf2 se smatra antioksidativnim transkripcionim faktorom (Joo i sar., 2016), koga fosforilacija oslobađa represora i on može da pređe iz citoplazme u nukleus, gde se vezuje za DNK sekvencu koja dovodi do povećane transkripcije gena koji štite ćeliju od oksidativnog stresa, ARE (*antioxidant response elements*). Na ovaj način se pokreće transkripcija gena za SOD, GSH-Px i CAT (Surh i sar., 2008). U studiji (Jeyapaul i Jaiswal, 2000) saopšteno je da i  $\gamma$ -GCS protein može biti regulisan ARE sekvencom, odnosno Nrf2 transkripcionim faktorom u asocijaciji sa Jun proteinima, što potkrepljuje rezultat povećanja nivoa ovog proteina u grupi miševa suplementiranih metilksantinima.

Suplementacija kakao prahom uticala je jedino na nivo CuZnSOD proteina, tako da je bio viši u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na miševe metilksantinske grupe. Pored opisanih biološki aktivnih jedinjenja u ovoj disertaciji, kakao prah jeste i dobar dijetarni izvor bakra (Joo i sar., 1995). Dakle, moguće je postulirati da upravo bakar indirektno doprinosi ovakvom ishodu u našoj studiji.

Rezultati dosadašnjih malobrojnih istraživanja bioaktivnih kakao jedinjenja varijabilni su kako u pogledu njihovog uticaja na nivo proteina tako i na aktivnost enzima antioksidativne zaštite jetre. Noori i saradnici pokazali su da je tronedeljna suplementacija kakao prahom zdravih pacova Wistar soja prouzrokovala značajno povećanje nivoa glutatona, SOD-a i CAT-a (Noori i sar., 2009). U četvonedeljnoj studiji na dijabetičnim pacovima davan je kakao ekstrakt u dozi 600 mg/kg/dan koji je doprineo povećanju aktivnosti SOD-a ali nije pokazana povećana aktivnost CAT-a, a to

je delimično u saglasnosti sa našim rezultatima (Jalil i sar., 2008). Dugoročna suplementacija miševa kofeinom (20 mg/kg/dan, može se porediti sa primenjenom dozom u ovoj studiji), nije dovela do povećanja aktivnosti GSH-Px što je konzistentno sa našim istraživanjem (Mukhopadhyay i sar., 2003).

Iz navedenog se može sumirati da kakao prah u svom punom sastavu nije značajno uticao na redoks ravnotežu hepatocita starih miševa, kako na nivo proteina (osim CuZnSOD proteina), tako ni na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Međutim, metilksantinke komponente kakao praha jesu značajno povećale nivo GSH-Px,  $\gamma$ GCS i CuZnSOD proteina. Ovakav nalaz nam sugerise potencijalni modulirajući efekat drugih sastojaka kakao praha na aktivnost metilksantina i podstiče dalja istraživanja koja bi za cilj imala otkrivanje njihovih ciljnih mesta delovanja u pogledu nivoa regulacije enzima antioksidativne zaštite.



## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanja kakao praha, kao značajnog dijetarnog izvora biološki aktivnih jedinjenja (polifenoli i metilksantini), sprovedenim u *in vitro* i *in vivo* uslovima mogu se izvesti sledeći zaključci:

- I. Rezultati *in vitro* ispitivanja
  1. Utvrđen je profil biološki aktivnih jedinjenja kakao proizvoda (prirodni kakao prahovi, alkalizovani kakao prahovi, crne čokolade sa i bez dodate maline, i mlečne čokolade), te je urađena njihova komparacija na osnovu procenjenih parametara razmatrajući uticaj alkalizacije i procesa prerade u proizvodnji čokolade.
  2. HPLC-DAD-MS karakterizacijom profila biološki aktivnih jedinjenja uočeno je da su metilksantinske komponente, teobromin (14,1 mg/g) i kofein (5,8 mg/g), zastupljene u najvećoj količini u svim analiziranim kakao prahovima. Što se polifenolne frakcije tiče, ističu se katehini: monomerni flavan-3ol, epikatehin (1,0 mg/g), njegov izomer katehin (0,5 mg/g) i veoma sličan derivat galokatehin (0,2 mg/g). Njih slede oligomerna jedinjenja, procijanidin A, B i C izomeri, a kvantifikovana su i jedinjenja iz grupe fenolnih kiselina, i to derivati hidroksibenzoeve kiseline: kafeoil-asparaginska i protokatehnična kiselina, kao i derivati ruzmarinske kiseline: klovamid i njegov analog deoksikovamid.
  3. Prirodni kakao prahovi imali su značajno veći sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina, kao i sadržaj monomernih flavan-3ola u poređenju sa alkalizovanim kakao prahovima, dok slična razlika nije uočena kod metilksantina.
  4. Analizom čokolada kao najpopularnijeg kakao proizvoda, i to sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina, ali i sadržaja metilksantina (teobromin i kofein) i epikatehina i katehina kao najznačajnijih polifenola kakao praha, utvrđena je značajna razlika između grupa kod svih ispitivanih parametara i to u korist crnih čokolada sa ili bez dodate maline u poređenju sa mlečnim čokoladama.

5. Ispitivanja antioksidativne aktivnosti kakao prahova i čokolada izvršeno je korišćenjem tri analitička testa, izračunavanjem antioksidativnog kompozitnog indeksa i utvrđivanjem stepena korelacije između ovih vrednosti i utvrđenog sadržaja polifenolnih komponenti tako da su kakao proizvodi međusobno poređeni i sagledan je uticaj proizvodnih procesa na njihov sveobuhvatni antioksidativni potencijal.
6. Antioksidativni potencijal bio je statistički značajno viši kod prirodnih u odnosu na alkalizovane kakao prahove i to u sva tri primenjena testa (DPPH, FRAP i ABTS).
7. Crne čokolade sa dodatkom malinom pokazale su značajno viši antioksidativni potencijal izmeren u FRAP testu u poređenju sa mlečnim i crnim čokoladama. Grupe crnih i mlečnih čokolada su se u pogledu antioksidativne aktivnosti značajno razlikovale korišćenjem sva tri testa (DPPH, FRAP, ABTS).
8. Prirodni kakao prahovi pokazali su prosečnu vrednost antioksidativnog kompozitnog indeksa (ACI) od 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%.
9. Antioksidativni kompozitni indeks eksperimentalnih kakao proizvoda bio je u statistički veoma značajnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem polifenola, flavonoida i proantocijanidina, kao i sa zbirnom koncentracijom epikatehina i katehina. Visoke korelacije su potvrda da kod kakao proizvoda fenolna jedinjenja daju najveći doprinos antioksidativnom potencijalu.
10. Ispitivanje antimikrobnog potencijala alkalizovanih i nelakalizovanih kakao prahova izvršeno je na tri Gram pozitivne, četiri Gram negativne bakterije i jedan soj gljivice *Candida albicans* bujon-mikrodilucionom metodom i ukazalo je da kakao prah ima sličan nivo efikasnosti kao neki drugi biljni materijali poput origana, žalfije, karanfila, ruzmarina i celera.
11. Među testiranim mikrobiološkim sojevima, gljivica *Candida albicans* ispostavila se kao najosetljiviji mikroorganizam (MIK = 5,0 mg/ml).
12. Antimikrobni potencijal ekstrakata alkalizovanih kakao prahova na Gram negativne bakterije bio je statistički značajno viši u poređenju sa prirodnim kakao prahovima.

13. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata kakao prahova dobijene za Gram negativne bakterije bile su u značajnoj korelaciji sa sadržajem različitih fenolnih frakcija (ukupni polifenoli, flavonoidi, proantocijanidini, monomerni flavan-3oli).
14. Uočeni povoljni efekat alkalizacije kakao praha na antimikrobnu aktivnost ukazuje na formiranje različitih jedinjenja usled delovanja povišene temperature i bazne sredine, koja poseduju antimikrobni ali ne i antioksidativni potencijal.

## II. Rezultati *in vivo* ispitivanja

15. Primenjeni režim suplementacije miševa soja C57BL/6 tokom šest meseci sa dijetarno relevantnim količinama kakao praha ili ekvivalentnom količinom metilksantina (teobromin (0,075% standardne hrane) i kofein (0,012% standardne hrane)) nije uticao na dužinu života jedinki, njihove osnovne fiziološke parametre i ukupni mortalitet.
16. Tri primenjena različita načina ishrane eksperimentalnih životinja – suplementacija kakao prahom, suplementacija metilksantinima i uobičajena hrana za laboratorijske miševе, nije uticala na prosečan dnevni unos hrane i vode miševa tako da statistički značajne razlike između grupa u pogledu ovih parametara nije bilo.
17. Telesna masa miševa se postepeno povećavala u skladu sa njihovim sazrevanjem, ali statistički značajna razlika između grupa nije utvrđena.
18. Bihevioralni fenotip eksperimentalnih životinja je ispitan korišćenjem baterije testova na osnovu koje su procenjeni različiti domeni ponašanja životinja u dve interventne i jednoj kontrolnoj grupi, i to u dve tačke eksperimenta: nakon mesec dana intervencije (kratkotrajna suplementacija) i nakon šest meseci suplementacije (dugotrajna suplementacija).
19. Suplementacija kakao prahom, kao i suplementacija metilksantinima značajno su unapredile prostornu orijentaciju životinja nakon kratkotrajne primene, ali nisu doprinele emocionalnom odgovoru miševa, kao ni stopi prostornog učenja i pamćenja nezavisno od dužine suplementacije.

20. Efekat kratkotrajne suplementacije metilksantinima ostvario se i kroz značajno smanjenje lokomotorne aktivnosti miševa, dok dugotrajna suplementacija nije imala efekta na istu.
21. Emocionalna reaktivnost miševa nije bila afektovana metilksantinima, kako nakon kratkotrajne, tako ni nakon dugotrajne suplementacije, dok je kratkotrajna suplementacija kakao prahom održala eksplorativni nagon životinja koji je kod kontrolne i metilksantinske grupe vremenom značajno opao.
22. Nakon žrtvovanja životinja efekti dugotrajne suplementacije tokom šest meseci sa dijetarno relevantnim količinama kakao praha ili ekvivalentnom količinom metilksantina, ispitani su na homogenatima jetre u pogledu nivoa proteina i aktivnosti antioksidativnih enzima i uočene su razlike u koncentraciji nekih od ispitivanih proteina značajnih za antioksidativnu odbranu ćelija.
23. Suplementacija metilksantinima je uticala na značajno povećanje nivoa GSH-Px i  $\gamma$ -GCS proteina.
24. Uprkos statistički većem nivou GSH-Px i  $\gamma$ -GCS proteina u jetri miševa suplementiranih metilksantinima, povećana aktivnost GSH-Px statistički nije potvrđena, kao ni povećanje nivoa glutationa u homogenatu jetre miševa.
25. Suplementacija kakao prahom i suplementacija metilksantinima uticale su na značajno povećanje nivoa CuZnSOD proteina, ali povećana aktivnost ovog enzima je izostala.
26. Aktivnost GR, GST i CAT nije bila afektovana niti suplementacijom kakao prahom niti suplementacijom metilksantinima.

\* \* \*

Ova studija potvrdila je i proširila saznanja o sastavu i sadržaju biološki aktivnih sastojaka u kakao prahu i njegovim proizvodima, utvrdila značajan efekat procesa prerade kakao praha na njegovo *in vitro* antioksidativno i antimikrobno delovanje i iznela nove dokaze da se radi o iscrpnom i interesantnom nutraceutiku. *In vivo* nalazi otvorili su jednu novu temu za eksperimente koji se odnose na rasvetljavanje mehanizama kojim biološki aktivna jedinjenja kakao praha uzimaju ulogu u oblikovanju ponašanja i promeni redoks ranoteže na nivou hepatocita miševa. Dalja istraživanja treba usmeriti ka karakterizaciji odgovarajuće doze, dužini dijetarne intervencije kao i obliku bioaktivnih kakao jedinjenja, potrebnih za postizanje povoljnih zdravstvenih efekata.

## 6. LITERATURA

Abou Seif HS (2016) Physiological changes due to hepatotoxicity and the protective role of some medicinal plants. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **5**, 134-146.

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.

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric.Food Chem.* **47**, 4184-4188.

Allgrove J, Farrell E, Gleeson M, Williamson G, Cooper K (2011) Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **21**, 113-123.

An L, Zhang YZ, Yu NJ, Liu XM, Zhao N, Yuan L, Chen HX, Li YF (2008) The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol Psychiatry* **32**, 1484-1490.

Anderson ME (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem.Biol.Interact.* **111-112**, 1-14.

Andres-Lacueva C, Monagas M, Khan N, Izquierdo-Pulido M, Urpi-Sarda M, Permanyer J, Lamuela-Raventos RM (2008) Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *J Agric.Food Chem* **56**, 3111-3117.

Aprotosoiaie AC, Luca S, V, Miron A (2015) Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**, 73-91.

Aron PM, Kennedy JA (2008) Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**, 79-104.

Arteel GE, Schroeder P, Sies H (2000) Reactions of Peroxynitrite with Cocoa Procyanidin Oligomers. *The Journal of Nutrition* **130**, 2100S-2104S.

Atikah AR, Budi HS, Kusumaningsih T (2016) Antibacterial effects of 70% ethanol and water extract of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*; Vol 49, No 2 (2016): (June 2016)DO - 10.20473/j.djmk.v49.i2.p104-109.

- Attard E (2013) A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Central European Journal of Biology* **8**, 48-53.
- Baggott MJ, Childs E, Hart AB, de Bruin E, Palmer AA, Wilkinson JE, de Wit H (2013) Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology* **228**, 109-118.
- 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.
- Bate-Smith E (1954) Flavonoid compounds in foods. *Adv. Food Res* **5**, 261-300.
- Beckett T (2009) 'Industrial Chocolate Manufacture and Use, Fourth Edition.'
- Belscak A, Komes D, Horzic D, Ganic KK, Karlovic D (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* **42**, 707-716.
- 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.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Bernatoniene J, Kopustinskiene DM (2018) The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules.* **23**.
- Bertazzo A, Comai S, Brunato I, Zancato M, Costa CVL (2011) The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chemistry* **124**, 93-96.
- Bertholet JY, Crusio WE (1991) Spatial and non-spatial spontaneous alternation and hippocampal mossy fibre distribution in nine inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research* **43**, 197-202.
- Betoret E, Betoret N, Vidal D, Fito P (2011) Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology* **22**, 498-508.
- Beutler E (1971) 'Red cell metabolism: a manual of biochemical methods.' (Grune & Stratton:
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization journal* **5**, 9-19.
- Bisson JF, Nejdi A, Rozan P, Hidalgo S, Lalonde R, Messaoudi M (2008) Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. *Br.J Nutr* **100**, 94-101.

- Bolanos de la Torre AA, Henderson T, Nigam PS, Owusu-Apenten RK (2015) A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem.* **174**, 119-123.
- Bond ALS, Lader MAC (1974) The use of analogue scales in rating subjective feelings. *British Journal of Medical Psychology* **47**, 211-218.
- Bosio K, Avanzini C, Davolio A, Ozino O, Savoia D (2001) In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 174-177.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem.J* **134**, 707-716.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25-30.
- Bravo L (2009) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M (2011) Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry* **127**, 1821-1827.
- Burton GJ, Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* **25**, 287-299.
- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic.Biol.Med.* **29**, 222-230.
- Camandola S, Plick N, Mattson MP (2018) Impact of Coffee and Cacao Purine Metabolites on Neuroplasticity and Neurodegenerative Disease. *Neurochemical Research*.
- Cappelletti S, Daria P, Sani G, Aromatario M (2015) Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Current Neuropharmacology* **13**, 71-88.
- Carter RJ, Morton J, Dunnett SB (2001) Motor Coordination and Balance in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience* **15**, 8.
- 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.
- Cervellati R, Greco E, Costa S, Guerra MC, Speroni E (2008) A comparison of antioxidant properties between artisan-made and factory-produced chocolate. *International Journal of Food Science & Technology* **43**, 1866-1870.
- CLSI (2009) 'Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard nineteenth informational supplement M100-S19. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Inst.'

Cohen AM, Aberdroth RE, Hochstein P (1984) Inhibition of free radical-induced DNA damage by uric acid. *FEBS Lett.* **174**, 147-150.

Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G (2008) Cocoa and health: a decade of research. *Br.J Nutr* **99**, 1-11.

Counet C, Ouwerx C, Rosoux D, Collin S (2004) Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6243-6249.

Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol.Rev.* **12**, 564-582.

Cushnie TP, Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int.J Antimicrob.Agents* **26**, 343-356.

Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15**, 7313-7352.

Dastidar SG, Manna A, Kumar KA, Mazumdar K, Dutta NK, Chakrabarty AN, Motohashi N, Shirataki Y (2004) Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int.J Antimicrob.Agents* **23**, 99-102.

Davison G, Callister R, Williamson G, Cooper KA, Gleeson M (2012) The effect of acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *Eur J Nutr* **51**, 69-79.

Decroix L, Tonoli C, Soares DD, Descat A, Drittij-Reijnders MJ, Weseler AR, Bast A, Stahl W, Heyman E, Meeusen R (2017) Acute cocoa Flavanols intake has minimal effects on exercise-induced oxidative stress and nitric oxide production in healthy cyclists: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* **14**, 28.

Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann.N.Y.Acad.Sci* **159**, 852-859.

Desideri G, Kwik-Urbe C, Grassi D, Necozione S, Ghiadoni L, Mastroiacovo D, Raffaele A, Ferri L, Bocale R, Lechiara MC, Marini C, Ferri C (2012) Benefits in cognitive function, blood pressure, and insulin resistance through cocoa flavanol consumption in elderly subjects with mild cognitive impairment: the Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) study. *Hypertension* **60**, 794-801.

Dillinger TL, Barriga P, Escalürcega S, Jimenez M, Lowe DS, Grivetti LE (2000) Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. *The Journal of Nutrition* **130**, 2057S-2072S.

Donovan JL, Crespy V, Oliveira M, Cooper KA, Gibson BB, Williamson G (2006) (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Radic Res* **40**, 1029-1034.



- Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* **88**, 308-316.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**, 47-95.
- Dufour J, Clavien P (2010) 'Signaling Pathways in Liver Diseases.' (Springer Berlin Heidelberg:
- Dunham NW, Miya TS (1957) A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **46**, 208-209.
- Ellam S, Williamson G (2013) Cocoa and human health. *Annu.Rev Nutr* **33**, 105-128.
- EMA (2000) 'The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product. Human Medicines Evaluation Unit.'
- Fan FY, Sang LX, Jiang M (2017) Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules.* **22**.
- Fernandez-Fernandez L, Comes G, Bolea I, Valente T, Ruiz J, Murtra P, Ramirez B, Angles N, Reguant J, Morello JR, Boada M, Hidalgo J, Escorihuela RM, Unzeta M (2012) LMN diet, rich in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, improves mouse cognitive decline associated with aging and Alzheimer's disease. *Behav.Brain Res* **228**, 261-271.
- Fidaleo M, Fracassi A, Zuorro A, Lavecchia R, Moreno S, Sartori C (2014) Cocoa protective effects against abnormal fat storage and oxidative stress induced by a high-fat diet involve PPARalpha signalling activation. *Food Funct.* **5**, 2931-2939.
- Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK (2003) Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens.* **21**, 2281-2286.
- Florence TM (1984) The production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide. *Journal of Inorganic Biochemistry* **22**, 221-230.
- Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem.Toxicol.* **33**, 1061-1080.
- Foryth WG (1955) Cacao polyphenolic substances. 3. Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochem.J.* **60**, 108-111.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol.Aspects Med.* **31**, 435-445.
- Franco R, Onatibia-Astibia A, Martinez-Pinilla E (2013) Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrinets* **5**.

Franzini L, Ardigo D, Valtuena S, Pellegrini N, Del RD, Bianchi MA, Scazzina F, Piatti PM, Brighenti F, Zavaroni I (2012) Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. *Nutr Metab Cardiovasc.Dis.* **22**, 50-57.

Gavrilovic, Milena. Tehnologija konditorskih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija. 2003.

Ref Type: Generic

Geyer MA, Swerdlow NR, Mansbach RS, Braff DL (1990) Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia. *Brain Res Bull.* **25**, 485-498.

Giacometti J, Muhvic D, Pavletic A, Cudacic L (2016) Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anticancerogenic, and anti-necrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Journal of Functional Foods* **23**, 177-187.

Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA (2005) Uric acid and oxidative stress. *Curr.Pharm.Des* **11**, 4145-4151.

Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K (1974) Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* **30**, 665-667.

Goya L, Martin MU, Sarria B, Ramos S, Mateos R, Bravo L (2016) Effect of Cocoa and Its Flavonoids on Biomarkers of Inflammation: Studies of Cell Culture, Animals and Humans. *Nutrients* **8**, 212.

Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal.Biochem* **106**, 207-212.

Gu L, House SE, Wu X, Ou B, Prior RL (2006) Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J Agric.Food Chem* **54**, 4057-4061.

Gurusamy KS, Wilson P, Davidson BR (2013) Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in non surgical wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau JF (1998) Reversed-Phase HPLC following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1698-1705.

Habauzit V, Morand C (2012) Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Ther.Adv.Chronic.Dis.* **3**, 87-106.

- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130-7139.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) 'Free Radicals in Biology and Medicine.' (Oxford University Press:
- Halliwell B, Zhao K, Whiteman M (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* **31**, 651-669.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH (1999) Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric.Food Chem.* **47**, 490-496.
- Hartman RE, Shah A, Fagan AM, Schwetye KE, Parsadonian M, Schulman RN, Finn MB, Holtzman DM (2006) Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* **24**, 506-515.
- Higaki A, Mogi M, Iwanami J, Min LJ, Bai HY, Shan BS, Kan-No H, Ikeda S, Higaki J, Horiuchi M (2018) Recognition of early stage thigmotaxis in Morris water maze test with convolutional neural network. *PLoS.One.* **13**, e0197003.
- Hofmann SG (2004) Cognitive mediation of treatment change in social phobia. *J Consult Clin Psychol.* **72**, 392-399.
- Hollenberg NK, Fisher ND, McCullough ML (2009) Flavanols, the Kuna, cocoa consumption, and nitric oxide. *J Am.Soc.Hypertens.* **3**, 105-112.
- Holtzman SG (1983) Complete, reversible, drug-specific tolerance to stimulation of locomotor activity by caffeine. *Life Sci* **33**, 779-787.
- Howell LL, Coffin VL, Spealman RD (1997) Behavioral and physiological effects of xanthines in nonhuman primates. *Psychopharmacology* **129**, 1-14.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric.Food Chem* **53**, 1841-1856.
- Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **28**, 497-505.
- Izquierdo M, Ibanez J, Gonzalez-Badillo JJ, Hakkinen K, Ratamess NA, Kraemer WJ, French DN, Eslava J, Altadill A, Asiain X, Gorostiaga EM (2006) Differential effects of strength training leading to failure versus not to failure on hormonal responses, strength, and muscle power gains. *J Appl Physiol (1985.)* **100**, 1647-1656.
- Jaganath I, Crozier A (2009) 'Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds'.

Jalal M, Collin A (1977) 'Polyphenols of Mature Plant, Seedling and Tissue Cultures of *Theobroma cacao*'.

Jalil AM, Ismail A (2008) Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*. **13**, 2190-2219.

Jalil AM, Ismail A, Pei CP, Hamid M, Kamaruddin SH (2008) Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *J Agric.Food Chem* **56**, 7877-7884.

Jeyapaul J, Jaiswal AK (2000) Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of +-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochemical Pharmacology* **59**, 1433-1439.

Jones BJ, Roberts DJ (1968) A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* **259**, 211.

Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG (2016) AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Mol Cell Biol* **36**, 1931-1942.

Joo S, Kies C, Schnepf M (1995) Chocolate and chocolate-like products: impact on copper status of humans. *J.Appl.Nutr.* **47**, 67-77.

Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D (2009) Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci.* **29**, 12795-12801.

Jourdain C, Tenca G, Deguercy A, Troplin P, Poelman D (2006) In-vitro effects of polyphenols from cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur.J Cancer Prev.* **15**, 353-361.

Kapadia M, Xu J, Sakic B (2016) The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference. *Neurosci.Biobehav.Rev* **68**, 195-217.

Karadag A, Ozcelik B, Saner S (2009) Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods* **2**, 41-60.

Keen CL, Holt RR, Polagruto JA, Wang JF, Schmitz HH (2002) Cocoa flavanols and cardiovascular health. *Phytochemistry Reviews* **1**, 231-240.

Kelleher RJ, Govindarajan A, Tonegawa S (2004) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* **44**, 59-73.

Kim DH, Jeon SJ, Son KH, Jung JW, Lee S, Yoon BH, Choi JW, Cheong JH, Ko KH, Ryu JH (2006) Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **85**, 658-668.

Koech K, Wachira F, Ngure R, Wanyoko J, Bii C, Karori S, Kerio L (2014) Antioxidant, antimicrobial and synergistic activities of tea polyphenols. *African Crop Science Journal* **22**.

Kovacevic N (2004) 'Osnovi farmakognozije.' (Farmaceutski fakultet Beograd:

Kusznierewicz B, Piekarska A, Mrugalska B, Konieczka P, Namiesnik J, Bartoszek A (2012) Phenolic composition and antioxidant properties of Polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC postcolumn derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization. *J Agric.Food Chem.* **60**, 1755-1763.

Kutlu M, Susuz F (2004) Biochemical Properties of Glutathione Peroxidase in *Gammarus pulex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **73**, 432-436.

Labbe RG, Nolan LL (1987) Inhibition of macromolecular synthesis by caffeine in *Clostridium perfringens*. *Can.J Microbiol.* **33**, 589-592.

Lamuella-Raventos RM, Andres-Lacueva C, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M (2001) More Antioxidants in Cocoa. *The Journal of Nutrition* **131**, 834.

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.

Lee KW, Kang NJ, Oak MH, Hwang MK, Kim JH, Schini-Kerth VB, Lee HJ (2008) Cocoa procyanidins inhibit expression and activation of MMP-2 in vascular smooth muscle cells by direct inhibition of MEK and MT1-MMP activities. *Cardiovasc.Res* **79**, 34-41.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY (2003) Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7292-7295.

Lewis K, Ausubel FM (2006) Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat.Biotechnol.* **24**, 1504-1507.

Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am.J Physiol Cell Physiol* **282**, C227-C241.

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.

Loncarevic I, Pajin B, Petrovic J, Zaric D, Sakac M, Torbica A, Lloyd DM, Omorjan R (2016) The impact of sunflower and rapeseed lecithin on the rheological properties of spreadable cocoa cream. *J.Food Eng.* **171**, 67-77.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

Lu H, Xu C, Liang Y, Liu X (2016) Antibacterial effect of limonene on food-borne pathogens. *ric.Life Sci.* **42**, 306-312.

Machado-Filho JA, Correia AO, Montenegro ABA, Nobre MEP, Cerqueira GS, Neves KRT, Naffah-Mazzacoratti MdG, Cavalheiro EA, de Castro Brito GA, de Barros Viana GS (2014) Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. *Behavioural Brain Research* **264**, 116-125.

Macready AL, Kennedy OB, Ellis JA, Williams CM, Spencer JP, Butler LT (2009) Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr* **4**, 227-242.

Mazor JS, Radojicic R, I, Markovic K, Ivanec SD, Delonga K (2011) Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science & Technology* **46**, 1793-1800.

Melendez NP, Nevarez-Moorillon V, Rodriguez-Herrera R, Espinoza JC, Aguilar CN (2014) A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemistry Research* **8**, 14-18.

Messaoudi M, Bisson JF, Nejdi A, Rozan P, Javelot H (2008) Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. *Nutr Neurosci.* **11**, 269-276.

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, Stuart DA, Smith NL, Lee CY, McHale NL, Flanagan JA, Ou B, Hurst WJ (2006) Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J Agric.Food Chem* **54**, 4062-4068.

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.

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **247**, 3170-3175.

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.

Mocholi E, Ballester-Lurbe B, Arque G, Poch E, Peris B, Guerri C, Dierssen M, Guasch RM, Terrado J, Perez-Roger I (2011) RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PLoS.One.* **6**, e19236.

Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH (2010) Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* **51**, 201-209.

Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM (2016) Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules.* **21**.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776.

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.

Nehlig A (2013) The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *Br.J Clin Pharmacol.* **75**, 716-727.

Nehlig A, Daval JL, Debry G (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **17**, 139-170.

Neufingerl N, Zebregs YE, Schuring EA, Trautwein EA (2013) Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**, 1201-1209.

Nicol CJ, Zielenski J, Tsui LC, Wells PG (2000) An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J* **14**, 111-127.

Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Omokolo Ndoumou D, Lieberei R (2006) 'Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents'.

NIH. National Institute of Health.

[https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cocoa&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cocoa&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=) . 2018.

Ref Type: Electronic Citation

- Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW (1993) Effects of combinations of methylxanthines and adenosine analogs on locomotor activity in control and chronic caffeine-treated mice. *Drug Development Research* **30**, 104-110.
- 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.
- Nsor-atindana J, Zhong F, Kebitsamang J, Lamine Mothibe M, Bangoura C, Lagnika C (2012) 'Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells.'
- Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y (2008) Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol.Toxicol.* **102**, 543-551.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* **87**, 315-424.
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**, 158-169.
- 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.
- Pajin B, Dokc L, Zaric D, Soronja-Simovic D, Loncarevic I, Nikolic I (2013) Crystallization and rheological properties of soya milk chocolate produced in a ball mill. *Journal of Food Engineering* **114**, 70-74.
- Pase MP, Scholey AB, Pipingas A, Kras M, Nolidin K, Gibbs A, Wesnes K, Stough C (2013) Cocoa polyphenols enhance positive mood states but not cognitive performance: a randomized, placebo-controlled trial. *J Psychopharmacol.* **27**, 451-458.
- Pastoriza S (2011) A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry* v. **129**, 1926-2011.
- Paylor R, Nguyen M, Crawley JN, Patrick J, Beaudet A, Orr-Urtreger A (1998) Alpha7 nicotinic receptor subunits are not necessary for hippocampal-dependent learning or sensorimotor gating: a behavioral characterization of Acra7-deficient mice. *Learn.Mem.* **5**, 302-316.
- Pedan V, Fischer N, Rohn S (2016) An online NP-HPLC-DPPH method for the determination of the antioxidant activity of condensed polyphenols in cocoa. *Food Research International* **89**, 890-900.
- Pimentel FA, Nitzke JA, Klipel CB, Jong EVd (2010) Chocolate and red wine comparison between flavonoids content. *Food Chemistry* **120**, 109-112.



- Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, Rice-Evans C, Spencer JP (2006) The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun.* **350**, 960-968.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG (1985) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **25**, 223-230.
- Postic C, Dentin R, Girard J (2004) Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* **30**, 398-408.
- Poucet B, Save E, Lenck-Santini PP (2000) Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci.* **11**, 95-111.
- 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.
- Prior RL, Gu L (2005) Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* **66**, 2264-2280.
- 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.
- Raijmakers MT, Burton GJ, Jauniaux E, Seed PT, Peters WH, Steegers EA, Poston L (2006) Placental NAD(P)H oxidase mediated superoxide generation in early pregnancy. *Placenta* **27**, 158-163.
- Raj C, Dhala S (1965) Effect of naturally occurring xanthines on bacteria. i. antimicrobial action and potentiating effect on antibiotic spectra. *Appl. Microbiol.* **13**, 432-436.
- Ramesh K (1996) Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**, 191-193.
- 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.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* **113**, 189-207.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.

- Rendeiro C, Guerreiro JD, Williams CM, Spencer JP (2012) Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. *Proc Nutr Soc* **71**, 246-262.
- Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006) 'Handbook of Enology'.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**, 933-956.
- Richards A, Wailes B (2012) Estimation of Fat-Free Cocoa Solids in Chocolate and Cocoa Products - Global Survey of Typical Concentrations of Theobromine and Caffeine Determined by HPLC. *Journal of the Association of Public Analysts* **40**, 01-12.
- Richman CL, Dember WN, Kim P (1986) Spontaneous alternation behavior in animals: A review. *Current Psychological Research & Reviews* **5**, 358-391.
- Ried K, Sullivan TR, Fakler P, Frank OR, Stocks NP (2012) Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database Syst.Rev* CD008893.
- Riksen NP, Smits P, Rongen GA (2011) The cardiovascular effects of methylxanthines. *Handb.Exp.Pharmacol* 413-437.
- Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE (2009) Polyphenols from Cocoa and Vascular Health GÇöA Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 4290-4309.
- Rose N, Koperski S, Golomb BA (2010) Mood food: chocolate and depressive symptoms in a cross-sectional analysis. *Arch.Intern.Med.* **170**, 699-703.
- Rossi MA, Dianzani MU (1988) Analysis of glutathione-dependent enzyme activities in two different rat hepatomas and in normal liver in relation to their role in resistance to oxidative stress. *Tumori* **74**, 617-621.
- Rozan P, Hidalgo S, Nejdi A, Bisson JF, Lalonde R, Messaoudi M (2007) Preventive antioxidant effects of cocoa polyphenolic extract on free radical production and cognitive performances after heat exposure in Wistar rats. *J Food Sci* **72**, S203-S206.
- Rustay NR, Wahlsten D, Crabbe JC (2003) Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav.Brain Res* **141**, 237-249.
- Ryan CM, Khoo W, Ye L, Lambert JD, O'Keefe SF, Neilson AP (2016) Loss of Native Flavanols during Fermentation and Roasting Does Not Necessarily Reduce Digestive Enzyme-Inhibiting Bioactivities of Cocoa. *J Agric.Food Chem* **64**, 3616-3625.
- Sakic B, Cooper MP, Taylor SE, Stojanovic M, Zagorac B, Kapadia M (2015) Behavioral Phenotyping of Murine Disease Models with the Integrated Behavioral Station (INBEST). *J Vis.Exp* **98**, e51524.

Sakic B, Szechtman H, Talangbayan H, Denburg SD, Carbotte RM, Denburg JA (1994) Disturbed emotionality in autoimmune MRL-lpr mice. *Physiology & Behavior* **56**, 609-617.

Sanbongi C, Osakabe N, Natsume M, Takizawa T, Gomi S, Osawa T (1998) Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *J Agric.Food Chem* **46**, 454-457.

Sanchez F, Jauregui O, Casals I, Andres-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventos RM (2003) Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* **38**, 35-42.

Sandlie I, Solberg K, Kleppe K (1980) The effect of caffeine on cell growth and metabolism of thymidine in *Escherichia coli*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **73**, 29-41.

Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, Limtrakul P, Badmaev V, Aggarwal BB (2007) Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* **28**, 1765-1773.

Sarria B, Mart, ez-Lopez S, a, Fernandez-Espinosa A, Gomez-Juaristi M, Goya L, Mateos R, Bravo L (2012) Effects of regularly consuming dietary fibre rich soluble cocoa products on bowel habits in healthy subjects: a free-living, two-stage, randomized, crossover, single-blind intervention. *Nutrition & Metabolism* **9**, 33.

Savran A, Zengin G, Aktumsek A, Mocan A, Glamoclija J, Ciric A, Sokovic M (2016) Phenolic compounds and biological effects of edible *Rumex scutatus* and *Pseudosempervivum sempervivum*: potential sources of natural agents with health benefits. *Food Funct.* **7**, 3252-3262.

Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar M, Muguerza B, Ramon D, Rios JL (2010) Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. ID - 20103314482. *Food Research International* **43**, 1614-1623.

Scholey AB, French SJ, Morris PJ, Kennedy DO, Milne AL, Haskell CF (2010) Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *J Psychopharmacol.* **24**, 1505-1514.

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.

Shah ZA, Li Rc, Ahmad AS, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, Dore S (2010) The flavanol (-)epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **30**, 1951-1961.

Shahidi F, Naczki M (2003) 'Phenolics in Food and Nutraceuticals.' (CRC Press:

- Shimazu T, Tsubono Y, Kuriyama S, Ohmori K, Koizumi Y, Nishino Y, Shibuya D, Tsuji I (2005) Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int.J Cancer* **116**, 150-154.
- Sledz W, Los E, Paczek A, Rischka J, Motyka A, Zoledowska S, Piosik J, Lojkowska E (2015) Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. *Acta Biochim.Pol.* **62**, 605-612.
- Smit HJ, Gaffan EA, Rogers PJ (2004) Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology* **176**, 412-419.
- Snyder SH, Katims JJ, Annau Z, Bruns RF, Daly JW (1981) Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 3260-3264.
- Sorond FA, Lipsitz LA, Hollenberg NK, Fisher ND (2008) Cerebral blood flow response to flavanol-rich cocoa in healthy elderly humans. *Neuropsychiatr.Dis.Treat.* **4**, 433-440.
- Spencer JP (2008) Flavonoids: modulators of brain function? *Br.J Nutr* **99 E Suppl 1**, ES60-ES77.
- Spencer JP (2009) The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chem Soc Rev* **38**, 1152-1161.
- Spiller GA (1998) 'Caffeine' CRC-Press.
- 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.
- Subramaniam S, Hedayathullah Khan HB, Elumalai N, Sudha Lakshmi SY (2015) Hepatoprotective effect of ethanolic extract of whole plant of *Andrographis paniculata* against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Comparative Clinical Pathology* **24**, 1245-1251.
- Surh YJ, Kundu JK, Na HK (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* **74**, 1526-1539.
- Swain T, Hillis WE (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10**, 63-68.

Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR (2016) Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid.Based.Complement Alternat.Med.* **2016**, 3012462.

Tabernero M, Serrano J, Saura-Calixto F (2006) The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. *International Journal of Food Science & Technology* **41**, 28-32.

Takada Y, Noguchi T, Okabe T, Kajiyama M (1982) Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res* **42**, 4233-4235.

Tarka SM, Jr. (1982) The toxicology of cocoa and methylxanthines: a review of the literature. *Crit Rev.Toxicol.* **9**, 275-312.

Tebayashi Si, Ishihara A, Tsuda M, Iwamura H (2000) Induction of clovamide by jasmonic acid in red clover. *Phytochemistry* **54**, 387-392.

Torres-Moreno M, Torrescasana E, Sarria B, Blanch C (2015) Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry* **166**, 125-132.

Tsao R (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.

Tverdal A, Skurtveit S (2003) Coffee intake and mortality from liver cirrhosis. *Ann.Epidemiol.* **13**, 419-423.

Ulusu N, Acan N, Turan B, Tezcan E (2010) The effect of selenium on glutathione redox cycle enzymes of some rabbit tissues. *Trace Elements and Electrolytes* **17**, 29.

Valente T, Hidalgo J, Bolea I, Ramirez B, Angles N, Reguant J, Morello JR, Gutierrez C, Boada M, Unzeta M (2009) A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *J Alzheimers.Dis.* **18**, 849-865.

Vasiljevic I (2016) Uticaj sirovinskog sastava i tehnološkog postupka na sadržaj metala u cokoladnim i krem proizvodima. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnoloski fakultet.

Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JPE (2008) The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & Nutrition* **3**, 115-126.

Veljkovic JN, Pavlovic A, Mitic S, Tosic S, Stojanovic G, Kalicanin BM, Stankovic DM, Stojkovic M, Mitic M, Bracanovic JM (2013) Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: Spectrophotometrical and electrochemical approaches. *Journal of food and nutrition research* **52**, 12-24.

Vertuani S, Scalambra E, Vittorio T, Bino A, Malisardi G, Baldisserotto A, Manfredini S (2014) Evaluation of antiradical activity of different cocoa and chocolate products: relation with lipid and protein composition. *J Med Food* **17**, 512-516.

Visioli F, Bernaert H, Corti R, Ferri C, Heptinstall S, Molinari E, Poli A, Serafini M, Smit HJ, Vinson JA, Violi F, Paoletti R (2009) Chocolate, lifestyle, and health. *Crit Rev. Food Sci. Nutr* **49**, 299-312.

Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* **83**, 482-504.

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.

Waziers I, Albrecht R (1987) The effects of vitamin A nutritional status on glutathione, glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in rat intestine. *Experientia* **43**, 394-395.

Weisburger JH (2001) Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **226**, 891-897.

Whiting DA (2001) Natural phenolic compounds 1900-2000: a bird's eye view of a century's chemistry. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 583-606.

Wiert C, Kumar K, Yusof MY, Hamimah H, Fauzi ZM, Sulaiman M (2005) Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1. *Phytother. Res* **19**, 1069-1070.

Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, Jahreiss L, Fleming A, Pask D, Goldsmith P, O'Kane CJ, Floto RA, Rubinsztein DC (2008) Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem Biol* **4**, 295-305.

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.

Wollgast J, Anklam E (2000a) Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International* **33**, 449-459.

Wollgast J, Anklam E (2000b) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**, 423-447.

Yamada T, Yamada Y, Okano Y, Terashima T, Yokogoshi H (2009) Anxiolytic effects of short- and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. *J Nutr Biochem.* **20**, 948-955.

Yang W, Burkhardt B, Fischer L, Beirow M, Bork N, W+Anne EC, Wagner C, Husen B, Zeilinger K, Liu L, Nussler AK (2015) Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling. *EXCLI Journal* **14**, 1273-1290.

Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH (2006) Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem.Pharmacol.* **72**, 850-859.

Zeeb DJ, Nelson BC, Albert K, Dalluge JJ (2000) Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**, 5020-5026.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W (2016) ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid.Med.Cell Longev.* **2016**, 4350965.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* **64**, 555-559.

Zhu QY, Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH, Keen CL (2003) Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Flavan-3-ols and Dimeric Procyanidins from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 828-833.

# BIOGRAFIJA

Vanja M. Todorović je rođena 21. oktobra 1986. godine u Leskovcu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju sa diplomom „Vuk Karadžić“. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine, a diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,77. Tokom studija bila je dobitnik Studentske stipendije Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije. Stručnu praksu je obavila 2011. godine kod poslodavca “Apoteka” Beograd, nakon čega je položila državni ispit u januaru 2012. godine. Doktorske akademske studije, modul Bromatologija, upisala je školske 2011/2012. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od februara 2012. godine zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik na projektu „Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za domaće i evropsko tržište“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od februara 2015. izabrana je u istraživača saradnika, a od aprila 2017. godine zaposlena je kao asistent pri Katedri za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Učestvuje na dva tekuća COST projekta: CA16112 i CA17117. Od 17.01. do 17.03.2018. godine boravila je na Univerzitetu u Gdanjsku, Poljska, gde je uradila deo eksperimenata ove doktorske disertacije.

Autor je i koautor šest radova u časopisima međunarodnog značaja i dva rada u časopisima nacionalnog značaja. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu učestvovala je sa 31 naučnim radom koji su štampani u celini (jedan) i izvodu (30).

Član je Društva za ishranu Srbije, Sekcije za sanitarnu hemiju Saveza farmaceutskih udruženja Srbije, međunarodnih asocijacija - Institute of Food Technologists (IFT), Society of Chemical Industry (SCI), i Internacionalnog društva za čokoladu i kakao u medicini (ISCHOM).



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Вања Тодоровић

Број индекса 13/11

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање антиоксидативног и антимикуробног потенцијала какао праха и његовог утицаја на понашање мишева након краткотрајне и дуготрајне суплементације“

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

Потпис аутора

У Београду, 05.07.2018.

Вања Тодоровић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вања М. Тодоровић

Број индекса 11/13

Студијски програм Докторске академске студије - модул Броматологија

Наслов рада „Испитивање антиоксидативног и антимикробног потенцијала какао праха и његовог утицаја на понашање мишева након краткотрајне и дуготрајне суплементације“

Ментор Проф. др Слађана Шобајић

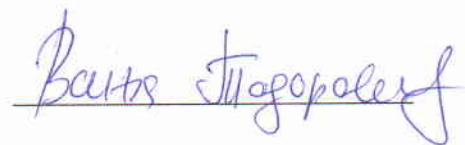
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 05.07.2018.



## Изјава о коришћењу

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

„Испитивање антиоксидативног и антимикробног потенцијала какао праха и његовог утицаја на понашање мишева након краткотрајне и дуготрајне суплементације“

која је моје ауторско дело.

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

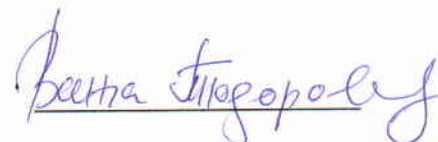
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 05.07.2018.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.