

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Александра Гаварић, мастер инж. технол.

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
1. Датум и орган који је именовao комисију  <b>18.09.2020. године, Наставно-научно веће Технолошког факултета Нови Сад, Универзитет у Новом Саду.</b>
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:  - <b>Др Зоран Зековић</b> , редовни професор, Фармацеутско инжењерство, изабран 19.02.2009. године, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, <b>председник</b> ; - <b>Др Сенка Видовић</b> , ванредни професор, Фармацеутско инжењерство, изабрана 22.06.2017. године, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, <b>ментор</b> ; - <b>Др Јелена Владић</b> , научни сарадник, Фармацеутско инжењерство, изабрана 1.08.2018. године, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, <b>члан</b> . - <b>Др Наташа Јовановић Љешковић</b> , ванредни професор, Фармацеутско-технолошке науке, изабрана 28.06.2017. године, Фармацеутски факултет Нови Сад, <b>члан</b>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
1. Име, име једног родитеља, презиме: <b>Александра, Новак, Гаварић</b>
2. Датум рођења, општина, држава: <b>5.01.1983. године, Нови Сад, Република Србија</b>
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив <b>Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Фармацеутско инжењерство, Мастер инжењер технологије</b>
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија <b>2012. година, Фармацеутско инжењерство</b>
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -

### **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Савремене методе екстракције очајнице (*Marrubium vulgare* L.) и сушење одабраних екстраката, хемијски састав и биолошке активности

### **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

Докторска дисертација кандидата Александре Гаварић изложена је у седам поглавља:

1. Увод (стр. 1-2),
2. Општи део (стр. 3-48),
3. Експериментални део (стр. 49-64),
4. Резултати и дискусија (стр. 65-109),
5. Закључци (стр. 110-113),
6. Литература (стр. 114-145),
7. Прилог (стр. 146-155).

Докторска дисертација је написана на 155 нумерисаних страница А4 формата, са 35 слика, 34 табеле и 447 литературна навода. Кључна документацијска информација је написана на српском и енглеском језику и приложена на почетку докторске дисертације.

### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

У **уводном делу** докторске дисертације објашњен је значај испитивања лековитог биља које све чешће улази у састав готових лекова и тиме редукује употребу синтетских лекова праћену нежељеним фармаколошким деловањима. Указано је на предност екстракције природних биоактивних једињења применом „зелених“ савремених метода екстракције и предност оптимизације применом експерименталног дизајна и методе одзивне површине у циљу добијања производа високог квалитета. Даље су у оквиру уводног дела наведени главни циљеви истраживања надземног дела *M. vulgare*.

**Општи део** докторске дисертације обухвата седам потпоглавља од којих се првих пет односе на опис врсте, таксономију, распрострањеност, употребу и деловање, хемијски састав и биолошке активности *M. vulgare*. Шесто потпоглавље се бави савременим екстракционим поступцима (ултразвучна екстракција, микроталасна екстракција, екстракција субкритичном водом и екстракција суперкритичним угљендиоксидом) примењеним у овој дисертацији. Након сваке описане методе екстракције наведени су и главни параметри који утичу на исту. У седмом потпоглављу је описана *spray drying* техника сушења, принцип процеса и носачи који се користе. На основу прегледа досадашњих истраживања указано је на значај и актуелност истраживања ове недовољно испитане биљне врсте.

Поглавље **Експериментални део** обухвата детаљан опис материјала и уређаја који су коришћени у експерименталним испитивањима. Описани су поступци мацерације, микроталасне екстракције, ултразвучне екстракције, екстракције суперкритичним угљендиоксидом и субкритичном водом, као и одређивање оптималних процесних параметара. Дати су детаљни услови инструменталних техника анализе (HPLC-DAD и GC-MS) које су примењене за одређивање састава течних и липофилних екстраката надземног дела *M. vulgare*.

У поглављу **Резултати и дискусија** су приказани резултати до којих се дошло експерименталним путем у овој докторској дисертацији. Резултати су прегледно дати у табелама, приказани на сликама и образложени на методолошки разумљив и уједно информативан начин. Први приказани резултати се односе на карактеризацију биљног материјала и одређивање концентрације етанола за даљу примену у процесу екстракције биокативних једињења. За сваку од наведених екстракционих техника испитан је утицај главних параметара: ултразвучна екстракција (температура, време екстракције и снага

ултразвука), микроталасна екстракција (концентрација етанола, време екстракције и снага микроталаса) и екстракција субкритичном водом (температура, време екстракције и концентрација HCl у екстрагенту). Код течних екстраката добијених ултразвучном и микроталасном екстракцијом на оптимизованим условима утврђено је присуство хлорогенске киселине и кверцетина који нису детектовани у мацератима. Испитана је антимикуробна активност оба екстракта и утврђено да је *B. cereus* најосетљивији бактеријски сој, док је у случају квасаца *S. cerevisiae* посебно осетљив на оба екстракта. Поред ове активности испитана је и *in vitro* антихипергликемијска активност оба екстракта према  $\alpha$ -амилази и  $\alpha$ -глукозидази, при чему ултразвучни екстракт показује већу антихипергликемијску активност (50,63% инхибира  $\alpha$ -амилазу и 48,67% инхибира  $\alpha$ -глукозидазу) што се потенцијално може објаснити присуством хлорогенске киселине и кверцетина. У субкритичном екстракту, добијеном на оптималним условима, детектовано је једино присуство хидрокси метилфурфурала услед чега овај екстракт није подвргнут испитивању антимикуробне и антихипергликемијске активности. У циљу екстракције липофилних компонената *M. vulgare* примењене су дестилација етарског уља (0,05%), Soxhlet екстракција (3,23%) и екстракција суперкритичним угљендиоксидом на притисцима 100, 200 и 300 bar и температурама 40, 50 и 60 °C. Најдоминантнија компонента у свим добијеним суперкритичним екстрактима је хемотаксономски маркер марубиин који није идентификован у Soxhlet екстракту. Течни екстракти добијени ултразвучном и микроталасном екстракцијом на оптимизованим условима и мацерат су осушени *spray drying* техником (уз додатак 10 и 50% малтодекстрина) у циљу добијања стабилније форме сувог екстракта. Сувим екстрактима су одређене најзначајније физичке особине и хемијски састав као и антимикуробна и антихипергликемијска активност како би се проценила могућност њихове инкорпорације у функционалну храну, дијететске суплементе или у формулацији различитих готових производа који се примењују превентивно или ради побољшања здравља људи.

**Закључци** у истоименом поглављу, јасно су и концизно изведени из резултата и дискусије. У последњем поглављу **Литература**, наведено је 447 литературна навода који су цитирани у докторској дисертацији. Избор литературе је изведен на основу значаја и аргументованости за област истраживања којом се бави ова дисертација.

У поглављу **Прилог** су дати хроматограми и графици који нису приказани у поглављу Резултати и дискусија.

## **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Радови проистекли из истраживања у оквиру рада на докторској дисертацији:

### **M21 – Рад у врхунском међународном часопису:**

**Gavarić, A.,** Vladić, J., Ambrus, R., Jokić, S., Szabó-Révész, P., Tomić, M., ... & Vidović, S. (2019). Spray Drying of a Subcritical Extract Using Marrubium vulgare as a Method of Choice for Obtaining High Quality Powder. *Pharmaceutics*, 11(10), 523.

### **M34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу:**

**Gavarić (Cvejin) A.,** Vladić J., Pavlić B., Zeković Z., Vidović S.: Horehound: subcritical water extraction and modeling of extraction process, International Conference on Science and Technique based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF), Szeged, 2 Jun, 2016, pp. 23-23

Vladić J., **Gavarić (Cvejin) A.,** Nastić N., Vidović S.: Development of functional products based on horehound using innovative extraction technologies, 24. International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, 8-9 Oktobar, 2018, pp. 222-222

## VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове дисертације извршена су испитивања примене савремених метода екстракције (UAE, MAE, SWE и SC-CO<sub>2</sub>) за производњу течних и липофилних екстраката из надземног дела *Marrubium vulgare* L. Одабрани течни екстракти су оптимизовани и подвргнути *spray drying* техници сушења. Течни и суви екстракти су детаљно испитани по питању хемијског састава, антимикробног и *in vitro* антихипергликемијског деловања. На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Поређењем укупног приноса екстракције и приноса полифенола у течним екстрактима *M. vulgare* добијеним применом конвенционалне (мацерација) и савремених метода екстракције (UAE, MAE и SWE), закључено је да савремене технике обезбеђују већи принос екстракције (Y), већи принос укупних фенола (TP) и флавоноида (TF), као и већу антиоксидативну активност (IC<sub>50</sub>).

- У циљу селекције адекватног екстрагенса за UAE и MAE изведени су прелиминарни експерименти мацерације *M. vulgare* са различитим концентрацијама етанола (30, 50, 70 и 96%), при чему су у сваком мацерату спектрофотометријски одређене вредности TP, TF и IC<sub>50</sub>. На основу добијања максималне вредности Y, TP и TF, и минималне вредности IC<sub>50</sub>, у мацерату са 50% етанолом (MAC) као екстрагенсом ова концентрација етанола је одабрана за UAE. HPLC анализа MAC је потврдила највећи садржај фенолних киселина и флавоноида у овом екстракту. У MAC екстракту су идентификоване као доминантне следеће фенолне киселине и флавоноиди: ферулна киселина, р-кумаринска киселина, кафена киселина, рутин и хиперозид. Концентрација етанола у MAE процесу је представљала независно променљиву у опсегу 30 – 70%.

- SWE, UAE и MAE су оптимизоване коришћењем *Box-Behnken* експерименталног дизајна и методе одзивне површине. Анализа варијансе (ANOVA) и дескриптивна статистика (коэффициент детерминације, R<sup>2</sup> и коэффициент варијације, CV) су коришћене за проверу слагања модела са експерименталним подацима, при чему се може закључити да су примењени квадратни полиноми у свим случајевима представљали адекватну апроксимацију експерименталних резултата.

- Оптимални услови UAE су температура од 73,6 °C, време екстракције 40 min и снага ултразвука од 30,3 W/L, док су предвиђене вредности за испитиване одзиве Y = 16,90%; TP = 91,48 mg ЕГК/g; TF = 50,07 mg ЕК/g; IC<sub>50</sub> = 0,0181 mg/mL и EC<sub>50</sub> = 0,0564 mg/mL.

- Оптимални услови MAE су концентрација етанола од 63,8%, време екстракције 15 min и снага микроталаса 422 W, док су предвиђене вредности за испитиване одзиве Y = 15,76%; TP = 110,04 mg ЕГК/g; TF = 62,45 mg ЕК/g; IC<sub>50</sub> = 0,0191 mg/mL и EC<sub>50</sub> = 0,0545 mg/mL.

- Оптимални услови SWE су температура од 200 °C, време екстракције 20,29 min и употреба воде без додатка HCl као екстрагенса. Моделом предвиђене оптималне вредности за TP, TF и IC<sub>50</sub> су 114,07 mg ЕГК/g, 36,94 mg ЕК/g и 0,0386 mg/mL. Анализом утицаја параметара на процес екстракције може се закључити да температура представља доминантан параметар код UAE и SWE процеса, док су концентрација етанола и снага микроталаса доминантни параметри код MAE процеса.

- Течни екстракти (UAEopt, MAEopt и SWEopt) добијени на оптималним условима и MAC су подвргнути HPLC анализи, при чему су у UAEopt и MAEopt детектоване доминантне фенолне киселине и флавоноиди (кафена киселина, хлорогенска киселина, ферулна киселина, р-кумаринска киселина, кверцетин, рутин и хиперозид). Резултати HPLC анализе SWEopt су показали само HMF садржај без присуства фенолних једињења због чега суви екстракт добијен сушењем SWEopt, није подвргнут анализама одређивања инхибиторног потенцијала ензима α-амилазе и α-глукозидазе, и антимикробне активности.

- У циљу испитивања антимикробног потенцијала UAEopt и MAEopt екстраката, као и MAC одређене су MIC и MBC вредности за девет бактеријских сојева и два соја квасаца. Из добијених резултата може се закључити да је најосетљивији бактеријски сој на UAEopt и MAEopt екстракте *B. cereus*, јер MIC за оба екстракта износи 3,13 mg/mL. У случају

квасаца, *S. cerevisiae* је посебно осетљив на оба екстракта ( $MIC \leq 0,05$ ). Управо зато би се UAEорт и MAEорт екстракти потенцијално могли користити као антибактеријска средства за сој *B. cereus*, и као антифунгална средства за сој *S. cerevisiae*.

- Испитан је *in vitro* инхибиторни потенцијал течних екстраката (UAEорт, MAEорт и MAC) за ензиме  $\alpha$ -амилазу и  $\alpha$ -глукозидазу. Инхибиторни потенцијал течних екстраката *M. vulgare* за  $\alpha$ -амилазу ( $\alpha$ -AIP) има следећи редослед: UAEорт > MAEорт > MAC. Према резултатима, UAEорт и MAEорт показују сличну инхибиторну активност према  $\alpha$ -амилази (50,63% и 48,58%, редом), која је значајно већа у односу на MAC (21,38%). Потпуна инхибиција  $\alpha$ -амилазе изражена преко еквивалента акарбозе за UAEорт, MAEорт и MAC износи 81,37; 75,69 и 0,33  $\mu\text{g/mL}$ . Може се закључити да UAEорт инхибира  $\alpha$ -амилазу обезбеђујући  $\alpha$ -AIP вредност блиску вредности коју обезбеђује акарбоза (80  $\mu\text{g/mL}$ ). Инхибиторни потенцијал за  $\alpha$ -глукозидазу ( $\alpha$ -GIP) је слабији у поређењу са  $\alpha$ -амилазом, и има следећи редослед: UAEорт > MAC > MAEорт. Као у случају  $\alpha$ -амилазе, UAEорт показује највећу антихипергликемијску активност (48,67%) што се потенцијално може објаснити присуством хлорогенске киселине (33,11  $\mu\text{g/mL}$ ) и кверцетина (34,88  $\mu\text{g/mL}$ ). Потпуна инхибиција  $\alpha$ -глукозидазе изражена преко еквивалента акарбозе за UAEорт, MAEорт и MAC износи 26,10; 18,60 и 22,18  $\mu\text{g/mL}$ . Може се закључити да UAEорт инхибира  $\alpha$ -глукозидазу обезбеђујући  $\alpha$ -GIP вредност блиску вредности коју обезбеђује акарбоза (27  $\mu\text{g/mL}$ ).

- Екстракција липофилних једињења је извршена конвенционалном (*Soxhlet* екстракција) и савременом ( $\text{SC-CO}_2$ ) екстракционом техником, и упоређен је укупан принос екстракције и хемијски састав екстраката. У суперкритичним екстрактима је утврђено присуство 10 – 20 компоненти у зависности од услова испитиваних параметара, док је у *Soxhlet* екстракту идентификовано 11 компоненти без присуства марубиина. Процент укупних идентификованих компоненти у суперкритичним екстрактима је варирао у зависности од примењеног притиска и температуре и кретао се у опсегу од 65,66 – 89,41% за 100 bar; 76,39 – 80,66% за 200 bar и 61,98 – 92,26% за 300 bar. Компоненте идентификоване у екстрактима могу се класификовати у следеће групе: оксидовани монотерпени, сесквитерпенски угљоводоници, алифатични угљоводоници, масне киселине и дитерпени. На основу добијених резултата, екстракти *M. vulgare* 100/40 и 100/50 су имали највише сесквитерпенских угљоводоника (40,29 и 23,40%), при чему је екстракт 100/40 изразито богатији сесквитерпенима.

- У циљу превазилажења недостатака течних форми производа, спроведено је испитивање могућности примене сушења *spray drying* техником за трансформацију течних екстраката *M. vulgare* (UAEорт, MAEорт и MAC) у суве екстракте, односно прашове. Сувим екстрактима су дефинисане најзначајније физичке и хемијске особине, као и биолошка активност. Може се закључити да када се UAEорт и MAEорт користе као напојне смеше, *spray drying* процес је ефикасан тек након додатка 50% MD, док је код мацерата без обзира на концентрацију додатог MD процес сушења ефикасан. HPLC анализа сувих екстраката *M. vulgare* (P MAC-10, P MAC-50, P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50) је извршена у циљу одређивања садржаја доминантних фенолних киселина, као и поређења хемијског састава пре и након *spray drying* процеса. Може се закључити да су течни екстракти значајно богатији у погледу фенолних киселина и флавоноида у односу на своје суве аналоге.

- Иако је одређен антимикуробни потенцијал за свих шест сувих екстраката, детаљно су анализирани суви екстракти добијени са мањим садржајем малтодекстрина (P MAC-10, P UAE-10 и P MAE-10). За већину испитиваних Gr- бактеријских сојева сва три сува екстракта показују дупло интензивнију активност у односу на своје течне аналоге. У случају Gr+ бактерија, P MAE-10 је потентнији према *S. aureus* и *B. subtilis* а за остале сојеве је показао једнаку активност као течни MAEорт екстракт. P MAC-10 је дупло потентнији за све испитиване Gr+ сојеве осим за *B. cereus* где је око 16-пута потентнији и *B. subtilis* где је

око 4-пута потентнији у односу на течни мацерат.

- Суви екстракти (P MAC-10, P MAC-50, P UAE-10, P UAE-50, P MAE-10, P MAE-50) нису показали антихипергликемијско деловање највероватније услед деградације хлорогенске киселине и кверцетина, који су носиоци инхибиције ензима  $\alpha$ -амилазе и  $\alpha$ -глукозидазе, приликом сушења *spray drying* техником. Садржај хлорогенске киселине у P UAE-10 и P MAE-10 се преполовио након сушења, док се садржај кверцетина смањио за 42,6% код P UAE-10 односно за 36,9% код P MAE-10.

### **VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Резултати истраживања у оквиру докторске дисертације кандидата Александре Гаварић су јасно и концизно приказани, табеларно и у виду графикона. Сваки табеларни и графички приказ резултата је поткрепљен детаљном дискусијом добијених резултата, уз поређење са релевантним литературним подацима. Закључци су изведени коректно у складу са добијеним резултатима и дискусијом. На основу претходно наведеног, Комисија позитивно оцењује начин приказа и тумачења резултата истраживања.

### **IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Докторска дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Докторска дисертација садржи све неопходне елементе за разумевање обрађене теме и добијених резултата.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Традиционална примена надземног дела *M. vulgare* указује на велики биолошки потенцијал који није у потпуности искоришћен ако се узме у обзир скроман број регистрованих биљних препарата. Такође, за поједина фармаколошка деловања постоје контрадикторни резултати у различитим објављеним радовима. У том смислу, постојала је оправдана потреба за детаљном идентификацијом биолошки активних једињења у анализираним узорцима и испитивањем антимикробне и антихипергликемијске активности. Дисертација представља оригиналан допринос науци јер су систематичним приступом испитане, оптимизоване и поређене различите савремене екстракционе технике од којих је претходно једино микроталасна екстракција експлоатисана и циљу добијања марубина, док ултразвучна екстракција, екстракција субкритичном водом и суперкритичним угљендиоксидом до сада нису коришћене за експлоатацију ове биљне врсте. Значајан научни допринос дисертације огледа се и у примени у субкритичне екстракције водом под следећим условима: температура 160 °C, време екстракције 30 min и вода уз додатак 1,50% HCl као екстрагенс, за издвајање канцерогеног једињења НMF из биљног матрикса, те се применом ове савремене "зелене" екстракционе технике и други узорци могу ослободити овог једињења. Додатно, најдоминантнија компонента у свим добијеним суперкритичним екстрактима је хемотаксономски маркер марубин, који није идентификован у *Soxhlet* екстракту, а поседује бројна фармаколошка деловања. Техника сушења *spray drying* није до сада коришћена за превођење течних екстраката *M. vulgare* у суве екстракте који су показали изузетну антимикробну активност неколико пута интензивнију у поређењу са својим течним аналозима.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци нису уочени у овој докторској дисертацији.

**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Полазећи од позитивне оцене докторске дисертације Александре Гаварић, мастер инж. технол., под називом „Савремене методе екстракције очајнице (*Marrubium vulgare* L.) и сушење одабраних екстраката, хемијски састав и биолошке активности“, Комисија предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана овог рада.

У Новом Саду, 23.09.2020. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

---

Председник

**др Зоран Зековић**, редовни професор

Технолошки факултет Нови Сад

---

Члан - ментор

**др Сенка Видовић**, ванредни професор

Технолошки факултет Нови Сад

---

Члан

**др Јелена Владић**, научни сарадник

Технолошки факултет Нови Сад

---

Члан

**др Наташа Јовановић Љешковић**, ванредни професор

Фармацеутски факултет Нови Сад