

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију:</p> <p>12.10.2018. године, Наставно-научно веће Технолошког факултета Нови Сад, Универзитет у Новом Саду</p>
<p>2. Састав комисије са знаком 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:</p> <p>др Зоран Зековић, редовни професор, Фармацеутске технологије, 19.02.2009. године, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, ментор</p> <p>др Марија Радојковић, ванредни професор, Хемијско инжењерство, 01.05.2018. године, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, председник</p> <p>др Мирјана Посавин, редовни професор, Органска хемија, 01.01.2003. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, члан</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p>Саша, Душанка, Ђуровић</p>
<p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p>08.04.1985. године, Зрењанин, Србија</p>
<p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <p>Природно-математички факултет у Новом Саду, аналитичка хемија, Мастер хемичар</p>
<p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2012. година, Фармацеутско инжењерство</p>

5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:

-

6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:

-

III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Савремене методе екстракције коприве (*Urtica dioica* L.), састав и примена екстраката

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација садржи Кључну документацијску информацију са изводом на српском и енглеском језику. Након тога је проблематика дисертације изложена на 143 стране А4 формата са 58 слика и 42 табеле систематизованих у 6 целина:

1. Увод (стр. 1-2)
2. Теоријски део (стр. 3-51, 40 слика, 4 табеле)
3. Експериментални део (стр. 52-66)
4. Резултати и дискусија (стр. 67-122, 18 слика, 38 табела)
5. Закључци (стр. 123-125)
6. Литература (стр. 126-143)

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **Уводном делу** ове докторске дисертације је објашњена потреба за истраживањем изоловања биоактивних једињења из природних извора. Објашњена је потреба за применом нових екстракционих техника које подразумевају примену растварача који су безбедни по околину, као што је вода. Изложена је и потреба за развијањем метода пречишћавања добијених екстраката, као и потреба за развојем аналитичких техника и метода којим би се добијени производи анализирали. На крају је изложена и могућност примене екстраката као адитива у фармацеутској, а нарочито у прехранбеној индустрији, чиме би се заменила разна синтетичка једињења која су потенцијална опасност за људско здравље.

У **Теоријском делу** су приказани публиковани резултати од значаја за област истраживања и размотрене су теоријске основе проблема истраживања у четири потпоглавља. У првом потпоглављу су изложени принципи конвенционалних (хидродестилација, мацерација и Soxhlet екстракција) и неконвенционалних метода (ултразвучна, микроталасна и суперкритична) екстракције, њихове предности и недостаци, као и феномени који су заступљени током одвијања процеса. Посебна пажња је посвећена потенцијалној примени наведених техника за изоловање различитих класа биоактивних једињења из природних ресурса и добијању екстраката жељеног садржаја пажљивим одабиром процесних параметара. У другом потпоглављу је објашњен секундарни метаболизам биљака, као и синтезе обараних врста једињења (терпени, масне киселине, фенолна једињења, витамини и каротеноиди). Представљени су и објашњени биосинтетички путеви којима се добијају наведена једињења, као и њихов значај у живом свету. Треће потпоглавље је посвећено биолошкој (антиоксидативној, антимицробној и цитотоксичној) активности. Објашњени су принципи оксидативног стреса и деловања антиоксиданаса, као и механизми антимицробне и цитотоксичне активности. У последњем, четвртном потпоглављу је објашњена таксономија и распрострањеност коприве, као и преглед биоактивних једињења присутних у њеном листу, што указује на актуелност истраживања екстраката и производа на бази ове биљне врсте.

Ток експерименталног плана докторске дисертације су детаљно приказан у **Експерименталном делу**. У овом делу су прецизно објашњени експериментални поступци и јасно су дефинисане методе коришћене за обраду експерименталних података. Поред карактеризације сировине, детаљно су објашњени поступци екстракције (конвенционална, Soxhlet, дестилација воденом паром, мацерација, ултразвучна, микроталасна, субкритична и суперкритична екстракција) примењени за изоловање фенолних једињења, терпена, витамина, минерала и масних киселина. Описана је и припрема хлеба који садржи лист и екстракт коприве. Поред тога, описане су аналитичке технике примењене за хемијску карактеризацију добијених екстраката и хлеба, као и методе за одређивање њихове биолошке активности (*in vitro* антиоксидативна, цитотоксична и антимицробна активност).

Резултати и дискусија су подељени у пет потпоглавља и прате план истраживања наведен у Пријави теме. Резултате приказане прегледно у табелама и на сликама прати добро организована дискусија која је написана на разумљив начин.

- У потпоглављу **Хемијски састав листа коприве** је дат хемијски састав листа коприве, односно садржај и састав етарског уља, садржај хлорофила и каротеноида, масних киселина и минерала који су добијени применом различитих аналитичких техника.

- У потпоглављу **Екстракције коприве и испитивање екстраката** су дати резултати прелиминарних екстракција листа коприве које су служиле за одређивање најпогоднијег растварача за даље експерименте. Затим су применом конвенционалних и неконвенционалних екстракционих метода добијени екстракти листа коприве који су даље анализирани како би се утврдио садржај фенолних једињења и биолошка активност.

- У потпоглављу **Суперкритични екстракти коприве** су дати резултати суперкритичне екстракције где је приказана кинетика екстракције која се одвијала на три различита притиска (100, 200 и 300 bar) и две температуре (40 и 60 °C). Одређен је садржај хлорофила, каротеноида и масних киселина у добијеним екстрактима, а урађена је и анализа њихове биолошке активности.

- У потпоглављу **Екстракција исцрпљеног листа коприве** дати су резултати анализе екстраката добијених од биљног материјала добијеног након суперкритичне екстракције. Екстракти су добијени употребом неконвенционалних метода (ултразвучна и микроталасна) екстракције уз воду

као екстрагенс. Добијеним екстрактима је одређен укупни садржај фенолних једињења и флавоноида, као и садржај појединачних фенолних једињења применом HPLC методе. Дати су и резултати анализе биолошке активности екстраката, где су ти резултати поређени са резултатима добијеним за екстракте полазне дроге.

- У потпоглављу **Практична примена екстраката коприве: хлеб са додатком листа и екстракта коприве** приказана је формулација хлеба са додатком листа и екстракта коприве добијеног микроталасном екстракцијом и водом као екстрагенсом. Дати су резултати текстуре, физичке, сензорске и хемијске анализе узорака хлеба, а такође су приказани резултати анализе биолошке активности хлеба.

Закључци у истоименом поглављу су изведени анализом и дискусијом добијених експерименталних резултата. Главна запажања се односе на анализу хемијског састава листа коприве и његових екстраката, њихову биолошку активност, као и практичну примену екстраката добијених микроталасном екстракцијом.

Литература обухвата 199 литературна навода сложена по редоследу цитирања у дисертацији. Избор литературе је извршен на основу актуелности и значаја за област истраживања којом се бави ова докторска дисертација.

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

M14 – Монографска студија/поглавље у књизи M12 или рад у тематском зборнику међународног значаја

1. **Durović, S.**, Šorgić, S., Popov, S., Radojković, M., Zeković, Z. Isolation and GC analysis of fatty acids: Study case of stinging nettle leaves, in: G.I. Badea, G.L. Radu (Eds.), *Carboxylic acid-Key role in life sciences*, InTech, Rijeka, 2018, pp. 69-83.

M21a – рад у међународном часопису изузетних вредности

1. Zeković, Z., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gorjanović, S., Sužnjević, D., Mašković, P., Savić, S., Radojković, M., **Durović, S.** (2017). Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques, *Industrial crops and products*, 108, 423-430.

M21 – рад у врхунском међународном часопису

1. **Durović, S.**, Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Petronijević, M., Radojković, M., Cvetanović, A., Zeković, Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches, *Journal of Functional Foods*, 32, 18-26.

M22 – рад у истакнутом међународном часопису

1. **Durović, S.**, Zeković, Z., Šorgić, S., Popov, S., Vujanović, M., Radojković, M. (2018). Fatty acid profile of stinging nettle leaves: Application of modern analytical procedures for sample preparation and analysis, *Analytical Methods*, 10(9), 1080-1087.

M34 – саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. Zeković, Z., **Durović, S.**, Čestić, S., & Radojković, M. Influence of solvent on antioxidant activity and polyphenolic profile of ultrasound-assisted extracts of stinging nettle leaves. 11. Savjetovanje hemičara i tehnologa Republike Srpske, 18-19.11.2016., Banja Luka, Republika Srpska, BIH.

M64 – саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

1. Zeković, Z., **Đurović, S.**, Pavlić, B. Superkritična ekstrakcija lista koprive: uticaj parametara na prinos ekstrakcije i sadržaje hlorofila i karotenoida u ekstraktima. 23. *Naučno stručni skup Proizvodnja i plasman lekovitog, začinskog i aromatičnog bilja*, 30.09.2016., Bački Petrovac, Srbija, 11.
2. **Đurović, S.**, Šorgić, S., Radojković, M., Zeković, Z. Određivanje sadržaja metala u listu koprive ICP-OES metodom analize. *Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije*, 05.11.2016., Beograd, Srbija, 22.
3. **Đurović, S.**, Šorgić, S., Popov, S., Radojković, M., Vujanović, M., Pejin, B., Zeković, Z. ICP-OES analiza ekstrakata lista koprive. UNIFood Conference, 05.-06.10.2018., Beograd, Srbija.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу добијених резултата у оквиру ове докторске дисертације изведени су следећи закључци:

- Лист коприве је осушен, и испитан како би се утврдио његов хемијски састав. Нађено је да лист садржи разне класе једињења међу којима су монотерпени (линалоол, карвакрол и еугнеол), хлорофил, каротеноиди, масне киселине [палмитинска (C16:0), линолна (C18:2) и α -линоленска (C18:3) као доминантне киселине], фенолна једињења, минерали и витамини Б групе, као и витамин Ц.
- Садржај масних киселина, хлорофила и каротеноида у екстрактима је завистан од употребљене екстракционе технике и екстрагенса. Тако, у случају класичне екстракције која је рађена смешом растварача (формалдехид-етанол у односу 2:1) доминирају палмитинска (C16:0), линолна (C18:2) и α -линоленска (C18:3) киселина, док у случају Soxhlet екстракције (петрол-етар као екстрагенс) доминирају лауринска (C12:0), палмитинска (C16:0) и олеинска (C18:1) киселина. Принос укупног хлорофила је био највећи у етанолном екстракту, док је максималан садржај каротеноида остварен помоћу метилен-хлорида.
- Минерални профил листа коприве показао је да од макроелемената доминира калијум (33,90 g/kg), док је гвожђе било најзаступљенији микроелемент са садржајем од 10,97 mg/kg. Од токсичних елемената детектовани су арсен, кадмијум и олово у веома ниским концентрацијама, док жива није детектована.
- Урађене су прелиминарне екстракције листа коприве помоћу ултразвучне екстракције (УАЕ) употребом растварача различитих поларности. Добијеним екстрактима је одређен принос и испитана је њихова антиоксидативна активност. Резултати су показали да је вода најпогоднији растварач.
- Након прелиминарних екстракција урађене су Soxhlet екстракција (SE), мацерација (MAC), ултразвучна (УАЕ) и микроталасна екстракција (МАЕ). Добијеним екстрактима је одређен принос екстракције, садржај укупних фенолних (TPC) једињења и флавоноида (TFC). Анализа фенолних једињења је урађена и помоћу HPLC методе, а одређен је и минерални састав екстраката и садржај витамина. Највећи принос TPC и TFC имала је МАЕ, док је највећи садржај фенолних једињења одређен применом HPLC методе остварен Soxhlet екстракцијом (SE). Минерални састав је варирао у зависности од примењене екстракционе методе, где су се неконвенционалне (УАЕ и МАЕ) показале боље од конвенционалних. Овај закључак важи и за садржај витамина у екстрактима коприве.
- Добијени екстракти су испитани како би се утврдио њихов биолошки потенцијал, односно антиоксидативна, цитотоксична и антимикробна активност. У сва три случаја МАЕ се показала као најбоља метода екстракције, односно МАЕ екстракт је показао највећу активност.
- Суперкритична екстракција (SFE) угљен-диоксидом листа коприве рађена је на три притиска (100, 200 и 300 bar) и две температуре (40 и 60 °C). Највећи принос је добијен на 300 бар и 60 °C при густини CO₂ од 0,830 g/cm³. Резултати су показали да је на обе

- испитиване температуре принос растао са повећањем притиска.
- У узорцима суперкритичних екстраката су испитани садржаји хлорофила и каротеноида. Највећи садржај укупног хлорофила добијен је на 300 бар и 60 °C при густини CO₂ од 0,830 g/cm³, док је највећи садржај каротеноида на 200 бар и 60 °C при густини CO₂ од 0,724 g/cm³. Изоловању каротеноида погодује нижи притисак, док је случај код хлорофила обрнут.
 - Садржај масних киселина у SFE се показао зависним од услова екстракције. Највећи принос засићених масних киселина (SFA) је остварен на 200 бар и 60 °C при густини CO₂ од 0,724 g/cm³, док су максимални садржаји незасићених (UFA), мононезасићених (MUFA) и полинезасићених масних киселина (PUFA) остварени на 100 бар и 40 °C при густини CO₂ од 0,629 g/cm³. За издвајање SFA бољи су се показали већи притисак и температура, док за издвајање UFA, MUFA и PUFA погодују ниже вредности ових параметара.
 - Тестови антиоксидативне и цитотоксичне активности SFE екстраката показали су да највећу активност има екстракт добијен на 300 бар и 60 °C при густини CO₂ од 0,830 g/cm³, док најмању показује екстракт добијен на 100 бар и 40 °C при густини CO₂ од 0,629 g/cm³.
 - Након SFE екстракција, делимично исцрпљени биљни материјал је сакупљен и екстрахован водом помоћу UAE и MAE метода. У свим случајевима MAE екстракти су имали већи принос од UAE екстраката. Највећи принос запажен је код UAE-5 (25,20 g/100 g) и MAE-2 (32,37 g/100 g) узорака.
 - UAE и MAE екстракти делимично исцрпљене дроге су испитани ради одређивања TPC, TFC, као и фенолног профила HPLC методом. И у овом случају, као и код приноса, највећи TPC и TFC код UAE био је у узорку UAE-5 (404,50 mg CAE/g SN и 8,41 mg CE/g SN), док је код MAE то било у узорку MAE-2 (428,14 mg CAE/g SN и 12,36 mg CE/g SN). У случају HPLC анализе, највећи садржај фенолних једињења код UAE био је у узорку UAE-2 (33,562 mg/L), док је код MAE највећи принос био у узорку MAE-1 (89,942 mg/L).
 - Испитивања антиоксидативне активности показала су различите резултате што указује на то да су тестови подложни утицају различитих једињења и механизма дејства. Код теста цитотоксичне активности UAE-6 и MAE-6 екстракти су показали највећу активност према све три тестиране ћелијске линије рака.
 - Испитана је и практична примена екстракта коприве прављењем хлеба који је садржао лист (2,5% и 5,0%), MAE екстракт (2,5% и 5,0%) и њихову комбинацију. Испитани су параметри технолошког квалитета, хемијски састав хлеба и његова биолошка активност. Резултати су показали да додатак еквивалентне количине екстракта коприве не нарушава технолошки квалитет хлеба као што је то у случају додатка листа, а при томе се добија хлеб са значајним садржајем биолошки активних једињења који могу превентивно да делују на људско здравље.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални рад и резултати истраживања приказани у овој докторској дисертацији у потпуности одговарају циљевима постављеним у Пријави теме. Према томе, кандидат Саша Ђуровић је успешно спровео истраживање ове докторске дисертације. Експерименталне резултате приказане систематично, табеларно и графички, прати јасна интерпретација и одговарајућа дискусија. Резултати су упоређени са актуелним резултатим из одговарајуће научне литературе која се бави проблематиком докторске дисертације. Статистичка обрада података, математичко моделовање и оптимизација су извршени на адекватан начин. Сви изнети закључци су настали правилним и доследним тумачењем резултата. На основу тога, начин приказа и тумачења резултата истраживања ове дисертације се оцењује позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

Да, докторска дисертација је у потпуности написана у складу са планом и образложењем наведеним у Пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Да, докторска дисертација садржи све битне елементе који су неопходни за радове ове врсте.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Главни допринос науци ове докторске дисертације је у свеобухватности истраживања изоловања биоактивних једињења из природних ресурса применом конвенционалних и неконвенционалних екстракционих метода. Применом модерних аналитичких техника вршене су анализе добијених екстраката чиме је омогућено праћење утицаја метода екстракције, односно процесних параметара на састав екстраката и њихове биолошке активности.

Такође, испитана је и могућност практичне примене микроталасног екстраката за формулацију прехранбеног производа (хлеба). Припремљеном хлебу су одређене физичке, сензорске и хемијске карактеристике, а приказани су и резултати анализе биолошке активности узорака хлеба.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци нису уочени у овој докторској дисертације.

X ПРЕДЛОГ:

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију **маст. хем. Саше Ђуровића**, под насловом **„Савремене методе екстракције коприве (*Urtica dioica* L.), састав и примена екстраката“** и предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.

У Новом Саду,
27.11.2018. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

председник

др Марија Радојковић, ванредни професор
Технолошки факултет Нови Сад

ментор

др Зоран Зековић, редовни професор
Технолошки факултет Нови Сад

члан

др Мирјана Попсавин, редовни професор
Природно-математички факултет у Новом Саду