

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовао комисију</p> <p>01.06.2016. год., Наставно-научно веће Технолошког факултета у Новом Саду</p>
<p>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:</p> <ul style="list-style-type: none">– др Зоран Зековић, редовни професор, , Фармацеутске технологије, изабран 19.02.2009. године, Технолошки факултет у Новом Саду, председник – др Весна Николић, редовни професор, Органска хемијска технологија, изабрана 14.10.2013. године, Технолошки факултет у Лесковцу, члан – др Јарослава Шварц-Гајић, ванредни професор, Прехрамбено инжењерство, изабрана 27.01.2012. године, Технолошки факултет у Новом Саду, ментор
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p>Александра, Драгомир, Цветановић</p>
<p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p>27.12.1982. год., Лесковац, Србија</p>
<p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <p>Технолошки факултет Лесковац, Хемијско и биохемијско инжењерство, Дипломирани инжењер хемијског и биохемијског инжењерства</p>
<p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2009., Фармацеутска технологија</p>
<p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:</p>
<p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Оптимизација савремених екстракционих поступака за изоловање апигенина из цвета камилице (*Chamomilla recutita* L.) и карактеризација биолошке активности добијених екстраката

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.

Докторска дисертација се састоји из 7 поглавља написаних на 256 страница, А4 формата, прореда 1,5, са 40 табела и 86 слика. Кључна документација са изводом на српском и енглеском језику дата је на почетку докторске дисертације.

Списак поглавља:

1. Увод (стр. 1-3)
2. Теоријски део (стр. 4-74, 27 слика, 9 табела)
3. Експериментални део (стр. 75-102, 7 слика, 2 табеле)
4. Резултати и дискусија (стр. 103-199, 50 слика, 29 табела)
5. Закључци (стр. 200-203)
6. Литература (стр. 204-236)
7. Прилози (стр. 237-254)

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Уводни део докторске дисертације указује на тренутно актуелни тренд проналажења биолошки активних молекула природног порекла са посебним нагласком на апигенин. Наведено је да с аспекта безбедности и „зелене хемије“, екстракција водом у субкритичном стању пружа многобројне предности над осталим техникама екстракције биомолекула. На крају увода су дати предмет и циљ истраживања дисертације.

Теоријски део докторске дисертације обухвата теоријске основе и најновија научна сазнања у испитиваној области у неколико потпоглавља (целина). У оквиру прве целине (Природни полифеноли) посебни осврт дат је флавоноидима, њиховим физичко-хемијским карактеристикама и биолошком значају. Дат је опсежни преглед флавоноида присутних у цвету камилице, а као њен најзначајнији флавоноид истакнут је апигенин. Физичко-хемијске карактеристике овог флавона, његов биосинтетски пут, као и биолошка активност детаљно су описани.

У другом потпоглављу (Биолошка активност природних једињења) описани су неки од најзначајнијих ефеката полифенолних једињења. Дате су теоријске основе о слободним радикалима, антиоксидансима, као и механизми антиоксидативног деловања. Затим следи преглед литературних података о антимикробном потенцијалу природних производа са посебним акцентом на антимикробно деловање екстраката камилице, као и њених конституената. Уз дефиницију антиканцерогеног деловања, дат је осврт на ћелијски циклус и његову регулацију. С обзиром на проапоптотичко деловање апигенина и екстраката камилице, који су испитивани у овој дисертацији, описана је програмирана ћелијска смрт, односно апоптоза. Молекуларни механизми антиканцерогеног деловања биљних конституената су посебно истакнути.

У последњем потпоглављу (Екстракција лековитог биља) су презентоване теоријске основе екстракције, као и механизми који доминирају при овом процесу. Детаљније су описане неке од најатрактивнијих и најчешће примењиваних техника при екстракцији лековитог биља. Механизми, предности, нестостаци и инструментација ултразвучне, микроталасне, убрзане и суперкритичне екстракције детаљно су описани. Централно место у овом потпоглављу заузима екстракција водом у субкритичном стању. С тим у вези дат је опсежни опис саме технике и могућности њене примене на различитим пољима. Затим следи преглед литературних података о примени субкритичне воде за екстракцију биљних полифенола, а нарочито флавоноида.

Експериментални део докторске дисертације обухвата опис и припрему биљног материјала, уређаја и метода примењених у експерименталним испитивањима. Описани су поступци ултразвучне, микроталасне, Soxhlet екстракције и екстракције субкритичном водом. Услови и начини извођења хроматографских техника (танкослојна, колонска хроматографија, као и HPLC) које су биле примењене при анализи екстраката су детаљно описани. Такође, у експерименталном делу дисертације наведени су и детаљно објашњени *in vitro* и *in vivo* тестови примењени у циљу

евалуације биолошке активности екстраката камилице. За статистичку обраду експерименталних резултата и оптимизацију процеса екстракције коришћени су савремени софтверски програми, а резултати су обрађени на адекватан и валидан начин.

У поглављу **Резултати и дискусија** су приказани и дискутовани резултати до којих се дошло у овој докторској дисертацији. Резултати су прегледно дати у табелама и приказани на сликама, а дискусија резултата је јасна и концизна. Редослед приказаних резултата прати ток истраживања.

Први резултати се односе на испитивање особина полазног материјала и припрему узорка за екстракцију. Први сет експеримената је извођен са ферментисаним биљним материјалом. Применом методе одзивне површине (RSM) одређени су најповољнији услови екстракције ферментисаних цветова камилице у циљу добијања максималног приноса укупних фенола, флавоноида и највећег садржаја апигенина. Хемијски профил и биолошка активност екстраката ферментисаних цветова су испитани и дефинисани.

Други сет експеримената је извођен користећи нативне (неферментисане) цветове камилице. Применом четири различите екстракционе технике (ултразвучне, микроталасне, Soxhlet и екстракцијом субкритичном водом) јасно је уочена разлика у ефикасности поменутих техника за изолацију биолошки важних молекула. Добијени резултати су демонстрирали предност екстракције субкритичном водом, те је извршена и оптимизација овог екстракционог процеса. Утицај сваког од посматраних параметара на процес детаљно је дискутован. Применом течне хроматографије са масеном спектрометријом (UHPLC-DAD-HESI-MS/MS) одређен је хемијски профил добијених екстраката, а добијени резултати јасно показују утицај три најзначајнија параметра (температуре, притиска и модификатора) на садржај појединачних полифенолних компоненти. На крају истраживања, у оквиру докторске дисертације, детаљно је испитана биолошка активност добијених екстраката камилице. У том смислу одређен је њихов антиоксидативни капацитет, антимицробни и антипролиферативни потенцијал, као и способност да делују као инхибитори одабраних ензима.

У поглављу **Закључак**, закључци су јасно и концизно изведени из резултата и њихове дискусије, те се могу сматрати научно заснованим, као и одговарајућим постављеном циљу дисертације.

У поглављу **Литература** наводи се 362 референци које су коришћене у писању ове дисертације. Литература је цитирана на уобичајен и правилан начин, а избор референци је актуелан и примерен тематици која је проучавана.

У **Прилогу** је дат списак важнијих скраћеница коришћених у дисертацији, као и списак свих табела и слика. Дати су одабрани хроматограми који нису приказани у поглављу Резултати и дискусија.

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

Истраживања која су урађена у оквиру докторске дисертације верификована су у следећим часописима и саопштењима на скуповима међународног и националног значаја:

Рад у врхунском међународном часопису, М-21

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Zeković Z., Vulić J., Mašković P., Savić S., Četković G. (2015): Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts. *Planta*, 242, 721-732.

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mašković P., Savić S., Nikolić Lj. (2015): Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, 65, 582-591.

Рад у међународном часопису, М-24

Zeković, Z., Cvetanović, A., Pavlić, B., Švarc-Gajić, J., Radojković, M. (2014): Optimization of the polyphenolics extraction from chamomile ligulate flowers using response surface methodology. *International Journal of Plant Research*, 4, 43-50.

Рад у часопису националног значаја, М-52

Zeković Z., Cvetanović A., Pavlič B., Švarc-Gajić J., Radojković M. (2015): *The optimization of the extraction process of flavonoids from fermented chamomile ligulate flowers*. Advanced technologies, 4, 54-63.

Предавање по позиву са међународног скупа штампаног у изводу, М-31

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mašković P., Radojković M., Zeković Z. (2014): *Subcritical water extraction of biologically active compounds from natural sources*. Natural resources, green technology and sustainable development, November 2014, Zagreb, Croatia.

Саопштење са међународног скупа штампаног у целини, М-33

Švarc-Gajić J., Cvetanović A. (2015): *The Influence of Temperature on Apigenin Extraction from Chamomile (Matricaria recutita) by Superheated Water*. International Conference on Chemical and Bioprocess Engineering, February 2015, Rio de Janeiro, Brazil.

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Adamović D., Zeković Z., Spasojević M. (2014): *Determination of apigenin and apigenin-7-O-β-glucoside in chamomile extracts*. First International Student Environmental Conference, November 2014, Novi Sad, Serbia.

Cvetanović A., Lepojević Ž., Radojković M., Zeković Z. (2013): *Volatile and non-volatile compounds in chamomile*. 3th International Congress Engineering, Environment and Materials in Processing Industry, March 2013, Jahorina, Bosnia and Herzegovina.

Саопштење са међународног скупа штампаног у изводу, М-34

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Zeković Z., Radojković M. (2015): *Subcritical water extraction - a novel extraction approach for hydrolysis and recovery of bio-potent molecules*. International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (ISPMF). June 2015, Shanghai, China.

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Mohamed Elgndi A., Vladić J., Zeković Z. (2014): *Dry Powder extract of chamomile ligulate flowers-potential source of natural spasmolytic compound*. The 18th International Congress Phytopharm, July 2014, St-Petersburg, Russia.

Mohamed Elgndi A., Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Radojković M., Zeković Z. (2014): *The influence of the preservation time on changes in characteristics of the dry extracts of autofermented chamomile ligulate flowers*. The 18th International Congress Phytopharm. July 2014, St-Petersburg, Russia.

Jukić M., Cvetanović A., Mišković K., Švarc-Gajić J., Glavaš-Obrovac Lj. (2014): *Influence of extraction methods on antiproliferative potential of chamomile flowers extracts*. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology The Interplay of Biomolecules HDBMB, October 2014, Zadar, Croatia.

Jukić M., Leović J., Cvetanović A., Mišković K., Švarc-Gajić J., Glavaš-Obrovac Lj. (2014): *Antiproliferative activity of chamomile extracts on normal and human cell*. Ist László Cholnoky Interdisciplinary Conference, May 2014, Pécs, Hungary.

Cvetanović A., Radojković M., Švarc-Gajić J., Vidović S., Zeković Z. (2013): *Optimisation of extraction of antioxidants from chamomile ligulate flowers by response surface methodology (RSM)*. The 17th International Congress Phytopharm, July 2013, Vienna, Austria.

Cvetanović A., Radojković M., Vidović S., Milošević S., Lepojević Ž., Zeković Z. (2012): *Extracts of native and autofermented chamomile ligulate flowers obtained by different extraction methods*. The 14th Ružička days, September 2012, Vukovar, Croatia.

Cvetanović A., Lepojević Ž., Radojković M., Vidović S., Milošević S., Zeković Z. (2012): *The antioxidant activity of chamomile ligulate flowers (Matricaria chamomile L.)*. 22nd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 2012, Ohrid, Republic of Macedonia.

Саопштење са националних скупова штампано у изводу, М-64

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Vulić J., Mašković P., Zeković Z., Četković G. (2015): *The evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of fermented and non-fermented chamomile flowers*. 11th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", October 2015, Leskovac, Srbija.

Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Zeković Z., Mašković P., Radojković M., Adamović D. (2015): *Antiproliferative and anti-microbial activity of chamomile extracts obtained by superheated water*. 52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, May 2015, Novi Sad, Serbia.

Cvetanović A., Švarc - Gajić J. Zeković Z., Adamović D. (2013): *The microwave extraction of phenolic compounds from chamomile ligulate flowers*. 10th Symposium "Novel technologies and economic

development", October 2013, Leskovac, Serbia.

Cvetanović A., Zeković Z., Lepojević Ž., Milošević S. (2011): *Chamomile - review of previous research*. 18th Scientific Meeting Production and Marketing of Medicinal and Aromatic Plants and Spices, Septembar 2011, Bački Petrovac, Serbia.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Екстракција ферментисаних цветова је извођена етанолом применом ултразвучне екстракције, а процес је оптимизован методом одзивне површине. Добијени екстракти су се одликовали високом концентрацијом апигенина (0,78 mg/ml).
- Екстракција нативних цветова је извођена применом Soxhlet, ултразвучне, микроталасне и субкритичне екстракције (СКВ). Применом субкритичне екстракције водом добијени су екстракти са највећим садржајем укупних фенола и флавоноида.
- Оптимизација екстракције субкритичном водом је изведена на основу садржаја апигенина. Одређени оптимални услови за екстракцију субкритичном водом подразумевали су однос дрога:растварач 1:30, брзину мешања 3 Hz, притисак 45 bar, температуру 115°C, време екстракције 30 мин, концентрацију модификатора 0,001 М. Принос апигенина остварен под оптимизованим условима је износио 13 mg/g дроге (одређен спектрофотометријском методом).
- Из екстраката добијеним под оптималним условима субкритичне екстракције водом изведена је изолација апигенина применом колонске хроматографије. Добијени апигенин је прекристалисан, а његова чистоћа је потврђена применом HPTLC-UV/VIS методе.
- Применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS методе одређен је хемијски састав екстраката добијених субкритичном водом. Утврђено је присуство флавоноида, њихових гликозида, фенолних киселина, као и других једињења полифенолне структуре. Укупан број идентификованих једињења је износио 27. У свим анализираним екстрактима апигенин је био доминантна компонента.
- Применом UHPLC-DAD-HESI-MS/MS испитан је утицај притиска, температуре и модификатора на квалитативни и квантитативни састав екстраката добијених субкритичном водом.
- Притисак је испољио значајан утицај на полифенолни садржај субкритичних водених екстраката. Садржај апигенина варирао је у зависности од вредности примењеног притиска, и кретао се у границама од 61,53 до 1.344,99 mg/kg. Концентрација његовог гликозида била је у опсегу од 4,35 до 139,22 mg/kg.
- Температура је, као што је и очекивано, условљавала значајне разлике у хемијском саставу добијених екстраката. Садржај апигенина се кретао у опсегу 230,98-1.501,25 mg/kg. Максимални принос је био остварен на температури од 115°C. Концентрације апигенин-7-О-глукозида су се кретале у границама 0,09-158,33 mg/kg.
- Коришћењем модификатора (хлороводоничне киселине) концентрације 0,001 М садржај апигенина у екстрактима се повећао до 1.700,34 mg/kg. Употреба модификатора веће концентрације водила је ка смањењу садржаја апигенина.
- Биолошки потенцијал је одређен у екстрактима нативних и ферментисаних цветова. Екстракти ферментисаних цветова су окарактерисани у погледу њихове антирадикалске, антимикробне и антипролиферативне активности. Утврђен је висок степен свих посматраних активности.
- Екстракти нативних цветова добијени субкритичном водом су показали значајно већу биолошку активност у односу на екстракте добијене другим техникама (ултразвучна, микроталасна, Soxhlet екстракција).
- Биолошка активност екстраката добијених субкритичном водом је утврђена испитивањем њихове антиоксидативне и антирадикалске активности, затим антимикробне, антипролиферативне, као и способности да делују као инхибитори одређених ензима. Испитан је утицај притиска, температуре и концентрације модификатора на биолошку активност.
- Применом седам различитих тестова, који су посматрали различите механизме деловања,

<p>детаљно је испитан антиоксидативни потенцијал одабраних СКВ екстраката. Температура је имала значајан утицај на антиоксидативну активност екстраката.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Антимикробна активност СКВ екстраката одређена је за осам микробних линија, а добијене вредности су упоређене са вредностима стандардних антибиотика (нистатином и амрацином). Остварене минималне инхибиторне концентрације кретале су се у границама 19,53-156,25 µg/ml. • Антидијабетско деловање СКВ екстраката испитано је мерењем њихове способности да инхибирају активност α-амилазе и α-глукозидазе, главних ензима у катаболизму угљених хидрата. У случају α-амилазе добијене вредности кретале су се у опсегу 0,39-0,47 mmol АЕ/g, док су у случају α-глукозидазе биле 0,09-3,98 mmol АЕ/g. Способност СКВ екстраката да инхибирају тирозиназу је била дефинисана еквивалентом којичне киселине који се кретао у опсегу 0,7-20,83 mg ЕКК/g у зависности од притиска и температуре екстракције, као и од концентрације модификатора. • Антипролиферативна активност СКВ екстраката је испитана на три различите ћелијске линије. Сви испитани екстракти су показали изузетно висок степен антипролиферативног деловања. Код екстраката добијених субкритичном водом примећена је зависност инхибиторних концентрација екстраката од садржаја апигенина. • Анти-мотилитетно деловање екстраката ферментисаних и неферментисаних цветова камилице одређено је <i>in vivo</i> експериментима на мишевима. Екстракти ферментисаних цветова су испољили већу антмотилитетну активност, што се могло повезати са већим садржајем апигенина. При већим концентрацијама екстраката испољавао се супротан ефекат.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидаткиња Александра Цветановић, дипл. инж., је у потпуности обавила истраживања која су била предвиђена планом у пријави ове дисертације. Добијени резултати су проистекли из оригинално постављених лабораторијских експеримената. Резултати истраживања су систематично и прегледно приказани, а дискусија заснована на добром познавању истраживане научне области и на најновијим научним сазнањима, те се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

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

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Докторска дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација указује на могућност примене једне од најсавременијих екстракционих техника – екстракције субкритичном водом, за изоловање фармаколошки активних компоненти из природних извора. Увидом у досадашња истраживања на пољу изолације апигенина дошло се до закључка да екстракција цветова камилице субкритичном водом није описана, те ова дисертација пружа прве информације и резултате у том погледу. Познато је да апигенин није растворан у води собне температуре, међутим, резултати дисертације демонстрирају да се подешавањем услова субкритичне екстракције дати флавор може ефикасно екстраховати. Иако камилица представља значајни извор апигенина, његова количина у овој биљци је изузетно мала. Резултати остварени у оквиру ове докторске дисертације су поред екстракције апигенина показали могућност ефикасног искоришћења хидролитичког потенцијала субкритичне воде. У дисертацији је, адекватним одабиром експерименталних услова, извођена симултана екстракција и хидролиза, односно ослобађање апигенина из његових везаних облика, што представља први описан поступак при издвајању високовредних једињења биљног порекла. Оптимизација процеса је вођена у правцу максималне конверзије везаних облика апигенина у агликон, што је у крајњем исходу резултовало добијањем екстраката богатих апигенином. Хемијски профили екстраката камилице добијених субкритичном водом су по први пут дефинисани у овој дисертацији, као и утицај различитих експерименталних услова на хемијски профил екстраката. Дисертација представља оригиналан допринос науци јер су постављене научне основе за развој здравствено-безбедних екстракционих

<p>технологија које обезбеђују повећане приносе апигенина, а који могу бити примењени у многим индустријским гранама. Посебан допринос се предвиђа при дефинисању нових формулација фармацеутских и/или прехранбених производа на бази камилице узевши у обзир безбедност примењеног растварача. Осим за издвајање апигенина, поступак субкритичне екстракције водом би се могао применити на индустријском нивоу за издвајање и других биоактивних једињења природног порекла. Мултидисциплинарност истраживања омогућује широк спектар искористивости добијених резултата.</p> <p>Научни допринос резултата истраживања потврђен је објављивањем радова у међународним часописима на SCI листи.</p>
<p>4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Недостаци дисертације нису уочени.</p>
<p>X ПРЕДЛОГ:</p> <p>На основу укупне оцене дисертације, Комисија констатује да је докторска дисертација дипл. инж. Александре Цветановић у потпуности остварила постављене циљеве истраживања. Свеобухватан истраживачки рад у домену екстракције апигенина из камилице, аналитички приступ решавању проблема, примена савремених инструменталних метода и детаљан увид у друга научна истраживања објављена у литератури су неке од карактеристика овог рада.</p> <p>Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију под називом „Оптимизација савремених екстракционих поступака за изоловање апигенина из цвета камилице (<i>Chamomilla recutita</i> L.) и карактеризација биолошке активности добијених екстраката“, кандидата дипл. инж. Александре Цветановић и предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.</p>

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Зоран Зековић, редовни професор, председник
Технолошки факултет у Новом Саду

др Весна Николић, редовни професор, члан
Технолошки факултет у Лесковцу

др Јарослава Шварц-Гајић, ванредни професор, ментор
Технолошки факултет у Новом Саду

