

## ЗАХТЕВ

### за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ : **ПЕТАР (МИЛОМИР) РИСТИВОЈЕВИЋ**

студент докторских студија на студијском програму **ХЕМИЈА**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

#### **Одређивање хемијског састава, антиоксидативних и антимикуробних својстава прополиса топола типа из различитих региона Србије**

из научне области **ХЕМИЈА - АНАЛИТИЧКА ХЕМИЈА**

Универзитет је дана 27. 02. 2014. својим актом под бр. 61206-818/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

#### **Одређивање хемијског састава, антиоксидативних и антимикуробних својстава прополиса топола типа из различитих региона Србије**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 16. 01. 2014. године одлуком факултета под бр. 28/2, у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослена
1.	др Душанка Милојковић Опсеница	редовни професор	Хемија - Аналитичка хемија	Хемијски факултет
2.	др Живослав Тешић	редовни професор	Хемија - Аналитичка хемија	Хемијски факултет
3.	др Славиша Станковић	ванредни професор	Биологија - микробиологија	Биолошки факултет
4.	др Небојша Недић	доцент	Пољопривреда - биотехнологија	Пољопривредни факултет

**Наставно-научно веће Хемијског факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана 11. 12. 2014. године.**

ДЕКАН ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

проф.др Бранимир Јованчићевић

На основу члана 43. Статута Хемијског факултета чланови Наставно-научног већа Хемијског факултета су дана **11. 12. 2014.** године донели следећу

## О Д Л У К У

28/7

### Члан 1.

Прихвата се Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације **Петра (Миломир) Ристивојевића**, дипломираног хемичара, под насловом: **"Одређивање хемијског састава, антиоксидативних и антимицробних својстава прополиса топола типа из различитих региона Србије"**.

### Члан 2.

Састав комисије за оцену и одбрану: **др Душанка Милојковић Опсеница**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ментор, **др Живослав Тешић**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, **др Славиша Станковић**, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и **др Небојша Недић**, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

### Члан 3.

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној дана **27.02.2014.** године дало сагласност на предлог теме докторске дисертације.

### Члан 4.

#### **а) Радови објављени у врхунским часописима међународног значаја (M21)**

1. Petar Ristivojević, Filip Lj. Andrić, Jelena Đ. Trifković, Irena Vovk, Ljubiša Ž. Stanisavljević, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opсеница, Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts, *Journal of Chemometrics* (2014), **28 (4)** 301–310.
2. Gertrud E. Morlock, Petar Ristivojevic, Elena S. Chernetsova, Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and Direct Analysis in Real Time mass spectra for profiling of natural products like propolis, *Journal of Chromatography A* (2014), (1328) 104– 112.
3. Ristivojević P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž, Milojković-Opсеница, D.Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC–LTQ OrbiTrap MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis. (2014) *Phytochemical analysis*, DOI 10.1002/pca.2544, *Article in press*.

### Члан 5.

Одлуку, Извештај комисије и Захтев доставити надлежном органу Универзитета у Београду. Одлуку доставити члановима Комисије, докторанту и Архиви Факултета.

ДЕКАН ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

---

проф. др Бранимир Јованчићевић

## **Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet**

### **Nastavno-naučno veće**

**Predmet:** Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Petra Ristivojevića, istraživača-saradnika Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu, d.o.o.

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 16. januara 2014. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Petra Ristivojevića, istraživača-saradnika Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu, d.o.o., prijavljene pod naslovom:

**„Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije“**

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo sledeći

### **IZVEŠTAJ**

#### **A. Prikaz sadržaja disertacije**

Doktorska disertacija Petra Ristivojevića pod navedenim naslovom napisana je na 169 strana A4 formata (prored 1,5), sadrži 57 slika (od toga tri u Prilogu), 21 tabelu (od toga dve u Prilogu). Rad obuhvata sledeća poglavlja: 1. Uvod (3 strane), 2. Opšti deo (35 strane), 3. Eksperimentalni deo (13 strana), 4. Naši radovi (87 strana), 5. Zaključak (3 strane), 6. Literatura (11 strana, 109 citata) i 7. Prilog (17 strana). Pored navedenog, rad sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku (po dve strane), sadržaj, zahvalnicu i biografiju Kandidata sa listom radova i saopštenja.

U **Uvodu** je dat kraći osvrt na oblast istraživanja i temu rada. Kao cilj istraživanja ove doktorske disertacije navedeno je sistematsko ispitivanje hemijskih, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava srpskog propolisa primenom različitih hromatografskih, spektroskopskih, elektrohemijskih i hemometrijskih metoda. Na osnovu dobijenih rezultata planirano je utvrđivanje veze između glavnih konstituenata ispitivanih uzoraka srpskog propolisa i njihovog botaničkog i geografskog porekla. Takođe, jedan od ciljeva ove teze je da se poređenjem karakteristika propolisa iz Srbije, Hrvatske, Slovenije i Nemačke, uspostave kriterijumi za pouzdanu procenu autentičnosti evropskog propolisa.

U **Opštem delu** kandidat ukratko navodi opšte pojmove o sastavu, hemijskim i biološkim karakteristikama propolisa, podeli propolisa prema botaničkom i geografskom poreklu, kao i kontroli kvaliteta propolisa. Pored toga, kandidat je ukratko opisao principe analitičkih metoda za određivanje hemijskog sastava propolisa, posebno visokoefikasnih hromatografskih metoda uključujući visokoefikasnu tankoslojnu hromatografiju, ultraefikasnu tečnu hromatografiju kuplovanu sa masenom spektrometrijom i direktnu analizu u realnom vremenu. Takođe su ukratko prikazane ciklična voltometrija, spektrofotometrijske metode kontrole kvaliteta propolisa, kao i indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom. Opisane su multivarijantne hemometrijske metode primenjivane u okviru ove teze. U poslednjem delu Opšteg dela prikazane su metode za određivanje antimikrobne aktivnosti propolisa kao što su: disk-difuziona metoda, esej za određivanje minimalne inhibitorne aktivnosti i bioautografija.

Poglavlje **Naši radovi** se sastoji iz šest celina u okviru kojih Kandidat predstavlja rezultate svojih istraživanja. U prvom delu su navedeni rezultati ispitivanja fenolnog profila srpskog propolisa. Kandidat je zatim poredio fenolni profil srpskog sa slovenačkim, hrvatskim i nemačkim propolisom kao tipičnim predstavnikom zapadnoevropskog propolisa. Nakon toga je primenjena multivarijantna hemometrijska analiza u cilju potvrde prisustva dva varijeteta propolisa. Razvijen je postupak prevođenja slike hromatograma u matricu podataka i primena multivarijantnih metoda na dobijenu matricu. Drugi deo Naših radova obuhvata spektrofotometrijsko i elektrohemijsko ispitivanje propolisa, u cilju verifikacije prisustva dva tipa evropskog propolisa. U trećem delu je prikazana uporedna analiza uzoraka propolisa i ekstrakata pupoljaka topole primenom ultraefikasne tečne

hromatografije spregnute sa Orbitrap masenom spektrometrijom. Definisane su sličnosti i razlike između dva varijeteta propolisa. Multivarijantna analiza je primenjena na kvantifikovane vrednosti fenola iz srpskog propolisa i masene signale dobijene direktnom analizom u realnom vremenu nemačkog propolisa. Pored toga, određen je sadržaj ukupnih fenola u srpskom propolisu, ukupnih flavonoida, antioksidativna aktivnost propolisa, kao i sadržaj esencijalnih i toksičnih elemenata. U poslednjem delu je ispitana antimikrobna aktivnost srpskog propolisa primenom disk-difuzione metode, esejom za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije i bioautografije. Multivarijantne metode su primenjene radi utvrđivanja sličnosti i razlika između dva varijeteta propolisa i predviđanja komponenta odgovornih za datu antimikrobnu aktivnost.

U okviru poglavlja **Eksperimentalni deo** Kandidat daje detaljan opis reagenasa, eksperimentalnih procedura i multivarijantnih statističkih postupaka korišćenih u okviru doktorske disertacije.

U poglavlju **Zaključak** sumirani su i prokomentarisani rezultati dobijeni u okviru doktorske disertacije.

Navedena **Literatura** (109 citata) obuhvata radove iz oblasti istraživanja i iscrpno pokriva sve delove disertacije.

U **Prilogu** su dati eksperimentalni podaci dobijeni u okviru proučavanja opisanih u poglavlju Naši radovi.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Do sada se smatralo da Evropski propolis pripada propolisu topola tipa, koji je jedinstven za područje Severne Amerike, Azije, Evrope i Novog Zelanda. Na osnovu vizuelnog posmatranja dobijenih HPTLC hromatograma srpskog propolisa mogu se razlikovati dva botanički različita tipa propolisa. Podrobnija ispitivanja, odnosno poređenje srpskog sa slovenačkim, hrvatskim i nemačkim propolisom HPTLC metodom takođe pokazuje dva varijeteta propolisa. Na osnovu navedenog je zaključeno da postoje dva podtipa evropskog propolisa topola tipa Multivarijantna analiza primenjene na slike

HPTLC hromatograma srpskog, slovenačkog, hrvatskog i nemačkog propolisa potvrđuju rezultate dobijene njihovim vizuelnim ispitivanjem. Sedamdeset pet fenolnih jedinjenja je identifikovano u oba tipa srpskog propolisa primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije sa Orbitrap masenom detekcijom. Prema našim saznanjima, osam jedinjenja je identifikovano prvi put u propolisu i pupoljcima topole. Spektrofotometrija i ciklična voltometrija pojedinačno i u kombinaciji sa multivarijantnim metodama potvrđuju prisustvo dva tipa propolisa. Dalje, upoređen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida dva tipa propolisa, oranž i plavog. Utvrđeno je da oranž tip ima veći antioksidativni kapacitet. Parametri izvedeni iz ciklične voltometrije potvrđuju rezultate dobijene spektrofotometrijom. Na osnovu ispitivanja antimikrobnog dejstva propolisa prema različitim sojevima bakterija kao što su *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC23023, *Listeria monocytogenes* ATCC19111, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140 i *Shigella flexneri* ATCC 9199, može se zaključiti da se propolis može koristiti kao prirodni antibiotik. Pri tome je pokazano da je antimikrobni efekat ispitivanih uzoraka propolisa izraženiji prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama. Poređenjem fenolnog HPTLC profila i bioautografske analize propolisa utvrđeno je fenoli kao što su krizin, kvercetin, kempferol, *p*-kumarinska i kofeinska kiselina najviše doprinose efektu na navedene sojeve bakterija.

Na osnovu rezultata dobijenih sistematskim ispitivanjem statistički značajnog broja uzoraka, može se zaključiti da srpski propolis pripada evropskom propolisu topola tipa. Takođe je utvrđeno da postoje dva podtipa evropskog propolisa čijoj je karakterizaciji dat značajan doprinos.

### **C. Uporedna analiza rezultata Kandidata sa rezultatima iz literature**

U okviru ove doktorske disertacije je po prvi put sistematski proučen hemijski sastav, antioksidativna i antimikrobna svojstva srpskog propolisa. Utvrđeno je da ispitivani uzorci pripadaju evropskom propolisu topola tipa za koji se smatralo da ima jedinstvene karakteristike. Međutim, ranija istraživanja ukazuju na postojanje dva botanički različita varijeteta rumunskog i nemačkog propolisa. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima iz

ove teze koji potvrđuju prisustvo dva podtipa srpskog, slovenačkog i hrvatskog propolisa. S obzirom da je biološka aktivnost propolisa uslovljena prisutnim fenolnim jedinjenjima, ispitivanje fenolnog profila uzoraka propolisa iz različitih regiona je predmet velikog broja istraživanja. U okviru ove disertacije su, između ostalog, identifikovana sedamdeset četiri fenolna jedinjenja u ekstraktima srpskog propolisa primenom i ekstraktima topole. Osim supstanci identifikovanih u uzorcima evropskog propolisa topola tipa i opisanih u literaturi, u okviru ove teze je identifikovano osam novih fenolnih supstanci kao što su fenolni gliceridi: kofeoil-glicerid, trikumaroil-glicerid, dva izomera kumaroil feruoil-glicerida, dikofeoil kumaroil-glicerid, dikofeoil feruoil-glicerid, polimetoksiflavon tangeritin i glikozid apigetrin.

Istovremenom analizom ekstrakata pupoljaka topole definisana su fenolna jedinjenja karakteristična za oba varijeteta propolisa. Poređenje rezultata dobijenih za sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnu aktivnost sa literaturnim podacima, pokazuje sličnost između srpskog propolisa i uzoraka propolisa topola tipa iz drugih regiona. Pored toga, u okviru ove teze je pokazano da je antimikrobno dejstvo ekstrakata srpskog propolisa izraženije prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama, što je u saglasnosti sa ranije utvrđenim rezultatima opisanim u literaturi.

#### **D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije**

##### **M 21 – Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja:**

1. Petar Ristivojević, Filip Lj. Andrić, Jelena Đ. Trifković, Irena Vovk, Ljubiša Ž. Stanisavljević, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts, *Journal of Chemometrics* (2014), 28 (4) 301–310.
2. Gertrud E. Morlock, Petar Ristivojevic, Elena S. Chernetsova, Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and Direct

Analysis in Real Time mass spectra for profiling of natural products like propolis, *Journal of Chromatography A* (2014), (1328) 104– 112.

3. Ristivojević P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž, Milojković-Opsenica, D. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC–LTQ OrbiTrap MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis. (2014) *Phytochemical analysis*, DOI 10.1002/pca.2544, *Article in press*.

#### **M 34 - Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu:**

1. G.E. Morlock, P. Ristivojevic, E.S. Chernetsova “Combined use of planar chromatography and Direct Analysis in Real Time mass spectrometry for characterization of propolis samples by multivariate data analysis”; Joint Conference of German Mass Spectrometry Society and Polish Mass Spectrometry Society, Poznań, Poland, 04.-07.03.2012: P 329.

2. Chernetsova, P. Ristivojevic, G.E. Morlock “Characterization of propolis using planar chromatography, Direct Analysis in Real Time mass spectrometry and multivariate data analysis” 8th Winter Symposium on Chemometrics, Drakino, Russia, 27.02.- 02.03.2012: E.S.

3. P. Ristivojević, J.Trifković, F. Andrić, N.Nedić, D.Milojković-Opsenica, Determination of phenolic compounds in propolis from Serbia by UPLC-LTQOrbitrap MS-MS, Belgrade Food International Conference, Food, health and well being, Belgrade, 26-28 November, 2012, p1.21.

4. Dimkić I., Ristivojević P., Berić, T., Dragojević M., Jovanović T., Stanković S., Antibacterial potential of serbian propolis from different regions against most common pathogens, Belgrade Food International Conference, Food, health and wellbeing, Belgrade, 26-28 November, 2012, P 2.14.

5. Stanković, S., Dimkić, I., Ristivojević, P., Berić, T., Draganić, V.D., Fira, Đ., 2013. Bacteriostatic and bactericidal effect of Serbian propolis against pathogenic bacteria. 5th FEMS Congress of European Microbiologists, July 21-25, Leipzig, Germany, 2013, 2353.



6. P. Ristivojević, F. Lj. Andrić, J. Đ. Trifković, I. Dimikić, S. Stanković, Ž.Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Planar chromatography and multivariate image analysis in classification and modeling of antioxidative and antimicrobial activity of propolis extracts. Conferentia Chemometrica, September 8-11, 2013, Sopron, Hungary, Book of abstracts, P01.

7. Ivica Dimkić, Petar Ristivojević, Tanja Berić, Slaviša Stanković, Dušanka Milojković-Opsenica, 2014. Application of indirect bioautography for the study of Serbian propolis. International Symposium on Bee Product 3<sup>rd</sup> edition - Annual meeting of the International Honey Commission (IHC), Opatija, Croatia, Book of Abstracts, 113.

#### **M 64 – Radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu:**

P. Ristivojević, U. Gašić, T. Tosti, A. Radoičić, Lj. Stanisavljević, D. Milojković-Opsenica, Evaluation of total polyphenolics, flavonoids and scavenging capacity of the DPPH radical in Serbian propolis, 50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 14 i 15. jun 2012, AH P4, p.17.

#### **E. Zaključak**

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji pod naslovom „Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije“ kandidat, Petar Ristivojević, diplomirani hemičar-master, uspešno odgovorio na sve postavljene zadatke koji se tiču ispitivanja hemijskih, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava srpskog propolisa primenom različitih hemijskih i bioloških tehnika. Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru tri rada štampana u vrhunskim međunarodnim naučnim časopisima (kategorije M21) i 8 saopštenja štampanih u izvodu od čega 7 na skupovima međunarodnog značaja.

Komisija smatra da rezultati objavljeni u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos ne samo karakterizaciji srpskog propolisa, koji do sada nije bio sistematski ispitivan, već i uopšte karakterizaciji evropskog propolisa takozvanog topola tipa. Istovremeno Komisija smatra da se ova disertacija uklapa u savremene trendove analitičke hemije dajući značajan doprinos teoriji i praksi analize fitohemikalija primenom različitih hromatografskih, spektroskopskih kao i hemometrijskih metoda.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Petra Ristivojevića prihvati i odobri njenu odbranu.

Beograd,  
7. 11. 2014. godine.

Komisija:

dr Dušanka Milojković-Opsenica, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Živoslav Tešić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Slaviša Stanković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Nebojša Nedić, docent  
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet