

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију</p> <p>10.02.2017. 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> <p>др Зоран Зековић, редовни професор, Фармацеутске технологије, изабран 19.02.2009. године, Технолошки факултет у Новом Саду, ментор</p> <p>др Татјана Њебовић, ванредни професор, Биохемија, изабрана 15.03.2015. године, Медицински факултет у Новом Саду, ментор</p> <p>др Сенка Видовић, доцент, Фармацеутско инжењерство, изабрана 05.09.2012. године, Технолошки факултет у Новом Саду, члан</p> <p>др Стела Јокић, ванредни професор Процесно инжењерство, изабрана 24.02.2016. године Прехрамбено-технолошки факултет у Осијеку, члан</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме:</p> <p>Јелена, Златомир, Владић</p>
<p>2. Датум рођења, општина, држава:</p> <p>05.10.1986. год., Лозница, Србија</p>
<p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <p>Медицински факултет, фармација, дипломирани фармацеут</p>
<p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>2011. 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 ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Савремене методе екстракције ртањског чаја (<i>Satureja montana L.</i>), хемијски састав и биолошка активност 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 187 странице, са 32 табеле и 19 слика. Кључна документација са изводом на српском и енглеском језику дата је на почетку докторске дисертације. Списак поглавља: 1. Увод (стр. 1-2) 2. Општи део (стр. 3-40, 4 потпоглавља, 7 слика, 5 табела) 3. Експериментални део (стр. 41-62, 8 потпоглавља, 3 слике, 1 табела) 4. Резултати и дискусија (стр. 63-130, 8 потпоглавља, 9 слика, 26 табела) 5. Закључци (стр. 131-137) 6. Литература (стр. 138-156) 7. Прилози (стр. 157-187)
V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: У Уводном делу докторске дисертације објашњена је неопходност истраживања у области лековитог биља, с обзиром на његову широку примену у фармацеутској, прехранбеној, козметичкој, пољопривредној и хемијској области. Такође, објашњен је концепт „зелених“ технологија који има за циљ постизање компромиса између еколошких и економских захтева, то јест, имплементацију технологија којом се постиже добијање производа стандардизованог високог квалитета, уз повећану ефикасност процеса и редукцију штетних утицаја на животну средину. У оквиру Уводног дела су даље наведени циљеви и сврха истраживања ртањског чаја (<i>Satureja montana, Lamiaceae</i>). Општи део докторске дисертације обухвата теоријске основе у шест потпоглавља (подцелина). Прво потпоглавље се односи на карактеризацију и таксономски положај ртањског чаја, хемијски састав, употребу и деловање, као и преглед најзначајних компоненти етарског уља ртањског чаја. На основу прегледа досадашњих истраживања указано је на значај и актуелност истраживања ове ароматичне биљне врсте. У наредној целини у оквиру Општег дела су описане савремене методе екстракције - суперкритичним угљендиоксидом и субкритичном водом. Описани су принципи поменутих иновативних екстракција, као и њихове карактеристике, предности и недостаци. Екстракције угљендиоксидом у суперкритичном стању и субкритичном водом су иновативне методе чијом применом је омогућена висока селективност и регулисање састава добијених екстраката, као и присуства процеса, уз одсуство коришћења токсичних растварача. Пружају широке могућности у изоловању високовредних биолошки активних компонента из биљних сировина. Описана је савремена технологија сушења - <i>spray drying</i> . Детаљно је описан принцип процеса сушења, уз навођење основних карактеристика. Такође, проблематика лепљивости као један од главних тешкоћа која се јавља током сушења је објашњена уз навођење најчешћих носача чијим додатком је могуће превазићи овај проблеме лепљивости током сушења, уз истовремено унапређење квалитета финалног производа.

Такође, Општи део садржи потпоглавље Оксидативни стрес у ком је дат преглед оксидативних оштећења биомолекула, као и појединих болести у чијој патогенези улогу може имати оксидативни стрес. Објашњена је улога фенола као антиоксиданата, као и значај испитивања биолошких активности екстраката на моделима животиња.

Експериментални део докторске дисертације обухвата опис материјала и уређаја који су коришћени у експерименталним испитивањима. Описани су поступци хидродестилације, екстракције суперкритичним угљендиоксидом, субкритичном водом, екстракција смешом етанол/вода, као и процес сушења *spray drying* технологијом. Такође, описане су хроматографске и спектофотометријске методе за одређивање састава екстраката и етарског уља, потом методе анализирања физичко-хемијских, сензорних карактеристика сувих прахова, као и њихова антиоксидативна активност и АЦЕ (ангиотензин конвертујући ензим) инхибиторна активност. Описани су поступци испитивања биолошких активности екстраката на животињским моделима, као и примењене експерименталне методе.

У поглављу **Резултати и дискусија** су приказани резултати до којих се дошло у овој докторској дисертацији. Резултати су прегледно дати у табелама, приказани на сликама и образложени на методолошки разумљив и прегледан начин. Приказ резултата прати задати циљ истраживања у оквиру докторске дисертације.

Први део резултата се односи на испитивање особина полазног материјала. Хидродестилацијом ртањског чаја је одређен садржај етарског уља и применом методе гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC/MS) и гасне хроматографије са пламено јонизујућим детектором (GC/FID) одређен је хемијски састав, односно квалитативни и квантитативни састав етарског уља.

Даље су приказани резултати истраживања утицаја екстракционих параметара, температуре 40, 50 и 60 °C и притиска 100 - 350 bar (са кораком од 25 bar) на принос и састав екстраката добијених екстракцијом суперкритичним угљендиоксидом. Хемијска карактеризација добијених екстраката је спроведена коришћењем квалитативне и квантитативне анализе (GC/MS и GC/FID). Резултати анализе CO₂ екстраката показују да су производи сложене смеше етарског уља и других екстрахованих липофилних компонената.

У наредном делу Резултата и дискусије приказани су резултати испитивања утицаја различитих предтретмана биљног материјала на принос, састав и антиоксидантну активност екстраката добијених суперкритичном екстракцијом угљендиоксида.

Анализиран је утицај процесних параметара екстракције субкритичном водом (температура и време екстракције) на садржај полифенолних компоненти и антиоксидантну активност добијених екстраката. Применом методе одзивне површине (RSM) одређени су оптимални услови екстракције субкритичном водом у циљу добијања екстракта *S. montana* са истовременим максималним садржајима фенола и флавоноида, као и највећом антиоксидантном активношћу. Применом GC/MS анализе је утврђен хемијски састав добијених екстраката.

Такође, приказани су резултати испитивања садржаја полифенолних компоненти и антиоксидантне активности екстраката добијених класичном методом екстракције и упоређени са резултатима добијеним за екстракте издвојене применом субкритичне воде.

Наредно потпоглавље садржи резултате испитивања екстраката *S. montana* добијених сушењем, применом *spray drying* технологије. Анализиран је утицај различитих концентрација малтодекстрина, који је коришћен као носач у сушењу, на физичко-хемијске, фармаколошке и сензорне карактеристике добијених сувих екстраката.

У следећем делу докторске дисертације су резултати испитивања *in vivo* биолошке активности одабраних екстраката, на моделу хепатотоксичности узроковане применом хемијског токсина. Такође, приказани су и резултати утицаја екстраката на раст Ehrlich-ових асцитних тумора

имплантираних експерименталним животињама и биохемијске параметре оксидативног стреса у туморским ћелијама. Уз табеларан приказан резултата и образложење добијених резултата, у оквиру овог дела је дат и преглед досадашњих истраживања хепатопротективних и антитуморских активности најзаступљеније компоненте екстракта - карвакрола, као и неких врста које припадају генусу *Satureja*.

У поглављу **Закључци** налазе се сумирани резултати који су проистекли из истраживања спроведених у оквиру ове докторске дисертације.

Литература садржи 306 литературна навода поређаних по абecedном реду, који су коришћене током израде докторске дисертације. Избор литературе је актуелан и примерен тематици која је проучавана у оквиру докторске дисертације.

У **Прилогу** су дате слике које нису приказане 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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

M21 – Рад у врхунском међународном часопису:

1. Vidović, S., Vladić, J., Vaštag, Ž., Zeković, Z., Popović, L. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*, 258, 209-215.
2. Vidović, S., Zeković, Z., Marošanić, B., Todorović, M. P., & Vladić, J. (2014). Influence of pre-treatments on yield, chemical composition and antioxidant activity of *Satureja montana* extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 468-473.
3. Vladić, J., Zeković, Z., Jokić, S., Svilović, S., Kovačević, S., Vidović, S. (2016). Winter savory: supercritical carbon dioxide extraction and mathematical modeling of extraction process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 117, 89-97.
4. Vladić, J., Canli, O., Pavlić, B., Zeković, Z., Vidović, S., Kaplan, M. (2017). Optimization of *Satureja montana* subcritical water extraction process and chemical characterization of volatile fraction of extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 86-94.

M22 – Рад у истакнутом међународном часопису:

1. Vladić, J., Zeković, Z., Cvejic, A., Adamović, D., Vidović, S. S. (2014). Optimization of *Satureja montana* extraction process considering phenolic antioxidants and antioxidant activity. *Separation Science and Technology*, 49(13), 2066-2072.

M34 - Саопштење са међународног скупа штампано у изводу:

1. Vladić J., Vidović S., Zeković Z., Šumić Z., Popović L., Vaštag Z., Radojković M. Spray dry

Winter Savory Extracts: Possibility For Applications In Dietetic Supplements, 2nd Middle East Congress of the American Society for Nutrition, Dubai, UAE, Feb 2013.

2. Vladić J., Vidović S., Cvejn A., Adamović D., Zeković Z. Evaluation of *Satureja montana* extraction process, 17th International Congress Phytopharm 2013, Vienna, Austria, 8-10. Jul 2013, Book of abstracts, p. 96.
3. Horvat T, Vladić J., Vidović S., Zeković Z. Influence of pretreatment on yield, chemical composition and antioxidant activity of *Satureja montana* L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction, 6th Alumni meeting international summer schools, Novi Sad, Serbia, Septembar 2013, Book of abstracts, p. 37.
4. Zeković Z., Vladić J., Vidović S, Cvejn A., Elgndi M.A. Essential oil and supercritical extracts of *Satureja montana* L., 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 31 March to 3 April 2014, Lisboa, Portugal, Book of abstracts, p. 148.
5. Vladić J., Vidović S., Zeković Z., Elgndi M.A., Adamović D. Carvacrol and antioxidant activity of winter savory extracts obtained by SFE using carbon dioxide, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 31 March to 3 April 2014, Lisboa, Portugal, Book of abstracts, p. 150.
6. Pavlić B., Zeković Z., Vladić J., Vidović S., Cvejn A., Radosavljević R. Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Satureja montana* by response surface methodology and comparison with classical extraction techniques, Functional Food, Nutraceuticals, Natural Health Products, and Dietary Supplements (ISNFF), Istanbul, Turkey, October 2014, Book of abstracts, p. 321.
7. Vladić J., Čebović T., Vidović S., Cvejn A, Zeković Z. Hepatoprotective potential of supercritical versus spray dried extracts of *Satureja montana*, XXVIIIth International Conference on Polyphenols 2016, Vienna, Austria, 11-15 July, Book of abstracts, p. 478-479.

M64 - Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу:

1. Vladić J., Vidović S., Zeković Z., Cvejn A., Adamović D. Analiza sadržaja aromatičnih komponenti u suvim ekstraktima, 20st Meeting: Production and marketing of medicinal and aromatic plants and spices“, Bački Petrovac, 2013, Book of abstracts, 21.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове дисертације спроведена су испитивања примене савремених метода за екстракцију *S. montana* (ртањског чаја), физичко-хемијских особина добијених екстраката, као и биолошке активности одабраних екстраката у *in vivo* моделима. Добијени резултати могу се сумирати кроз следеће закључке:

- Поступком хидродестилације је издвојено етарско уље ртањског чаја, које је анализирано у погледу хемијског састава применом гасне хроматографије. Идентификовано је 20 компоненти међу којима су најзаступљенији оксидовани монотерпени и њихов представник карвакрол са релативним уделом 74,93% (GC/MS), односно 54,08% (м/м) (GC/FID), и приносом дестилације 0,51 g/100 g дроге.
- Екстракцијом суперкритичним угљендиоксидом при притисцима 100 - 350 bar (са кораком од 25 bar) и на температурама 40, 50 и 60 °C, при константном времену екстракције (4,5 h) и протоку угљендиоксида (0,194 kg/h), остварени су приноси: 1,88 - 3,09; 1,54 - 4,04 и 0,97 - 4,30% (м/м) за екстракте *S. montana* добијене при различитим притисцима и температурама 40, 50 и 60 °C. Запажено је да се са повећањем густине CO₂ повећава принос екстракције (при константној температури), услед повећања растворне моћи екстрагенса, па је највећи принос

забележен при условима 350 bar (60 °C), док је најмањи при 100 bar (60 °C). Поређењем са приносом оствареним приликом класичне методе (хидродестилације) издвајања етарског уља (0,95%), евидентна је предност употребе суперкритичне екстракције угљендиоксидом.

- Суперкритични екстракти су испитани у погледу хемијског састава применом GC/MS анализе. Утврђено је присуство 22 компоненте које припадају групама: монотерпенси угљоводоници, оксидовани монотерпени, сесквитерпени и алифатични угљоводоници. Оксидовани монотерпени су заступљени са највећим релативним уделом: 59,98 - 83,46%, 61,61 - 82,23 и 62,77 - 83,33% у екстрактима добијеним при различитим притисцима и на температурама 40, 50 и 60 °C. Најзаступљенији конституент екстраката је карвакрол чији је релативни удео у опсегу 54,30 - 79,61%. Следећа најзаступљенија компонента суперкритичних екстраката је *p*-цимен (3,64 - 10,24%). Друге компоненте које су присутне у екстрактима са ниским релативним уделом су: борнеол, транс-кариофилен, кариофилен-оксид, γ -терпинен и линалоол.
- Применом GC/FID методе анализе утврђен је квантитативни садржај најдоминантнијег конституента у екстрактима. Екстракт са највећим садржајем карвакрола је добијен при условима 350 бар и 50 °C (60,82%), док је највећи принос карвакрола остварен при притисцима 325 и 350 бар и температури 60 °C и износио је 2,4 g/100 g дроге. Применом угљендиоксида на већим притисцима се остварује ефикаснија екстракција карвакрола из дроге, као и производња екстраката са већим садржајима карвакрола.
- Ради испитивања могућности побољшања приноса екстракције, добијања екстраката са већом концентрацијом жељених компоненти, као и са унапређеном антиоксидантном активношћу, примењени су различити предтретмани биљног материјала непосредно пре екстракције суперкритичним угљендиоксидом. Биљни материјал је предтретиран: (1) водом, (2) етанолом, (3) ултразвуком и (4) угљендиоксидом под притиском. Вршено је поређење са контролном пробом, која је добијена при истим условима екстракције (100 bar, 40 °C), али без примене предтретмана.
- Приноси екстракција *S. montana* када су примењени различити предтретмани су били у интервалу 1,68 - 2,35% (m/m). Предтретмани водом и етанолом су утицали на повећање приноса екстракције за 25 и 17% у односу на контролну пробу, док су предтретмани ултразвуком и угљендиоксидом при високом притиску, довели до смањења приноса екстракције. Додатно, имајући у виду физиолошку безбедност и ниску цену воде, повећање садржаја влаге у материјалу (предтретман водом) пре екстракције се чини изузетно адекватним поступком за повећање приноса екстракције *S. montana*. Установљено је да се применом свих предтретмана обезбеђује већи релативни удео карвакрола у екстрактима. Најповољнији утицај на садржај карвакрола у екстрактима је забележен код предтретмана ултразвуком - садржај карвакрола је увећан за 27,69% у односу на контролну пробу.
- Потврђено је да је ултразвучни предтретман најадекватнији избор за добијање екстраката са највећим садржајем карвакрола (66,46%), док је приближан садржај утврђен код екстракта предтретираног угљендиоксидом под притиском (66,10%). Међутим, највећи принос екстракције карвакрола из 100 g дроге постигнут је применом етанола и воде као предтретмана. Применом етанола постигнута је ефикаснија екстракција карвакрола за 41,43% у односу на E0, док је у односу на предтретмане угљендиоксидом и ултразвуком екстракција спешена за 22,50 и 26,83%.
- Утицај предтретмана на остале компоненте присутне у екстрактима (*p*-цимен, борнеол, транс-кариофилен) је био супротан од утицаја на карвакрол, па је применом предтретмана значајно смањен њихов садржај. Предтретман водом којим се обезбеђује највећи принос екстракције, као и релативни удео карвакрола у екстракту, најнеповољније је утицао на поменуте компоненте, па је у овом екстракту и изостало присуство појединих липофилних компоненти. Имајући у виду знатно већу хидрофобност ових компоненти у односу на карвакрол, јасно је зашто повећање влаге у материјалу утиче позитивно на карвакрол, док за остале липофилне компоненте није одговарајуће.
- Утврђено је да предтретмани утичу негативно на антиоксидантну активност екстраката, па је најнижа IC₅₀ вредност забележена у контролној проби. С обзиром да је садржај карвакрола најнижи у контролној проби, може се закључити да овај монотерпен није кључни носилац дејства екстраката, већ да је за то одговорно и присуство мање заступљених компоненти (које су у највећем релативном уделу присутне у контролној проби). Стога, синергистичко деловање

конституената екстраката је задужено за испољавање антиоксидантне екстраката *S. montana*. Поређењем са IC_{50} вредностима познатих антиоксиданата, може се констатовати да екстракти *S. montana* имају потенцијал примене као природни антиоксиданти.

- Применом субкритичне воде уз варирање температуре (79,15 - 220,5 °C) и времена екстракције (5,9 - 34,1 мин) при константном притиску 30 bar, добијени су екстракти *S. montana*. Екстракти су испитани у погледу садржаја укупних фенола и флавоноида, као и антиоксидантне активности. Применом методе одзивне површине извршена је оптимизација параметара екстракционог процеса, ради утврђивања услова екстракције којима се обезбеђује добијање екстракта *S. montana* са високим садржајем фенола, флавоноида и високим антиоксидантним капацитетом. Утврђено је да се екстракцијом субкритичном водом температуре 200 °C и времена екстракције 20,8 мин, обезбеђује производња екстракта *S. montana* са садржајем фенола 11,24 g GAE/100 g, садржајем флавоноида 6,84 g CE/100 g и IC_{50} вредношћу 2,8 µg/mL.
- Применом GC/MS методе је испитан хемијски састав испарљиве фракције екстраката *S. montana* добијених субкритичном водом. Утврђено је присуство карвакрола у опсегу 14,677 - 25,487 mg/100 g). Највећи садржај је остварен применом субкритичне воде при условима 100 °C/10мин. Утврђено је да се са повећањем температуре процеса смањује садржај карвакрола у екстрактима, као и са повећањем времена екстракције. Поређењем са приносом карвакрола у екстрактима добијеним суперкритичним угљендиоксидом, евидентно је да је угљендиоксид у суперкритичном стању адекватнији екстрагенс за производњу екстраката богатих карвакролом у односу на субкритичну воду.
- Осим карвакрола, утврђено је присуство тимокинона, конституента за који су утврђене веома значајне фармаколошке активности. Утврђени садржај тимокинона у екстрактима је био 0,648 - 3,327 mg/100 g дроге. Запажено је да се са повећањем температуре процеса и времена екстракције његов садржај повећава у екстрактима, па је највећи забележен у екстракту добијеном на 220 °C и 20 мин. Имајући у виду да: (1) тимокинон није био присутан у етарском уљу (изолованом процесом хидродестилације), као ни у екстрактима добијеним суперкритичним угљендиоксидом; (2) конверзија карвакрола у тимокинон је научно потврђена; (3) утицаји параметара процеса на садржаје карвакрола и тимокинона су супротни, то јест ниже температуре и време екстракције погодују карвакролу, док више температуре и дуже време екстракције погодују тимокинону и (4) приликом екстракције субкритичном водом може доћи до стварања нових антиоксиданата, претпоставка је да тимокинон није био присутан у почетном биљном материјалу, већ је генерисан током екстракције субкритичном водом, конверзијом из карвакрола. Стога је установљено да је одабиром параметара екстракције субкритичном водом могуће производити екстракте *S. montana* жељеног састава, то јест са високим садржајем полифенолних компоненти, уз присуство липофилних фармаколошки изузетно значајних конституената (карвакрола и тимокинона).
- Ради евалуације потенцијалне предности примене субкритичне воде у односу на класичну методу екстракције, добијени су екстракти *S. montana* уз варирање концентрације екстрагенса (етанол/вода) и температуре процеса (време екстракције 120 мин). У добијеним екстрактима су утврђени садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидантна активност екстраката и установљена је предност примене субкритичне воде у погледу сва три испитивана одговора. Додатно, краће време екстракције, уз ниску цену воде и безбедност примене у односу на етанол (који је скупљи и запаљив растварач) јасно указују на предност примене субкритичне воде и потребу за имплементацијом ове технологије у производне процесе, као адекватне замене постојећих конвенционалних метода екстракције.
- Применом класичне методе екстракције (смешом етанол-вода) добијен је течни екстракт ртањског чаја. Ради добијања сувог екстракта (праха) ртањског чаја, течни екстракт је сушен *spray drying* технологијом сушења. Испитан је утицај различитих концентрација носача (10, 30 и 50%) на карактеристике добијених сувих екстраката.
- Сушење је са све три концентрације малтодекстрина било успешно и запажено је да се додатком малтодекстрина повећава принос процеса, услед повећања садржаја чврсте материје у напојној смеси. У свим екстрактима је садржај влаге био мањи од 5%, чиме је испуњен захтев квалитета сувих екстраката. Хигроскопност сувих екстраката је мерена након 48 h и 7 дана излагања екстраката средини са високим релативном влажношћу. Највећи проценат апсорбоване влаге је забележен у сувом екстракту са најнижим садржајем малтодекстрина. С

обзиром да је ниска хигроскопност особина због које се малтодекстрин сматра ефикасним носачем, очекивано је да се повећањем његове концентрације смањује хигроскопност сувих екстраката. Запажено је да се насипна запремина повећава са количином додатог малтодекстрина, као и да се повећањем количине носача повећава вредност WSI и смањује WAI, што је оправдано повећаним присуством малтодекстрина који се лако раствара у води.

- У добијеним сувим екстрактима је одређен садржај укупних фенола и укупних флавоноида и запажено је да се додатком најмање концентрације малтодекстрина у напојну смешу обезбеђује прах са највећим садржајем полифенолних компоненти. Поступком хидродестилације је из сувих екстраката изоловано етарско уље, које је испитано применом гасне хроматографије. Најзаступљенија компонента етарског уља је била карвакрол, са највећим уделом у екстракту сушеним са 10% малтодекстрина, што упућује на закључак да са повећањем концентрације носача долази до „разблажења“ и смањења садржаја како полифенолних компоненти, тако и карвакрола у изолованом етарском уљу.
- У погледу биолошких активности, испитане су антиоксидантна и АСЕ инхибиторна активност сувих екстраката. Утврђено је да екстракт са 10% малтодекстрина испољава најјачу антиоксидантну активност, што је у корелацији са највећим садржајем полифенолних компоненти, као и садржајем уља богатог карвакролом. Такође, исти екстракт, као и екстракт са 30% малтодекстрина испољавају приближно исту АСЕ инхибиторну активност, у односу на екстракт са 50% малтодекстрина, стога се могу разматрати као помоћна средства код хипертензије.
- Извршена је сензорна евалуација сувих екстраката кроз оцењивање мириса и укуса, од стране 50 волонтерки. Више од 52% волонтерки је оценило прахове као прихватљиве за даљу употребу као састојка прехранбених производа, то јест као пријатног мириса. Хладни раствор екстраката је оцењен као прихватљив за примену од стране више од 71% волонтерки. Анализом резултата је установљено да прихватљивост екстраката за употребу расте са повећањем процента малтодекстрина у њима.
- За испитивање *in vivo* активности екстраката одабрана су два екстракта *S. montana*: (1-SFE) екстракт добијен екстракцијом суперкритичним угљендиоксидом (услови екстракције: 350 bar, 50 °C) у ком је установљен највећи садржај карвакрола и (2-SDE) суви екстракт добијен *spray drying* технологијом сушења са најнижом концентрацијом малтодекстрина (10%) за коју је утврђено да је најадекватнији за добијање сувог екстракта *S. montana* са највећим садржајем полифенолних компоненти, садржајем етарског уља и у погледу антиоксидантне и АСЕ инхибиторне активности. Осим тога, овај екстракт испуњава и остале физичко-хемијске параметре, којима се осигурава квалитет. Оба екстракта су испитана у погледу антиоксидантне активности у *in vitro* моделу помоћу DPPH теста, и установљен је значајнији антиоксидантни учинак сувог екстракта у односу на суперкритични екстракт.
- Испитан је утицај екстраката *S. montana* у систему оштећења јетре индукованог применом угљентетрахлорида. У циљу утврђивања потенцијалног протективног утицаја екстраката испитан је садржај хепатичне ДНК, хидроксипролина и билирубина, као и активност серумских параметара AST и ALT, пре и након интоксикације са угљентетрахлоридом. Такође, испитан је утицај екстраката *S. montana* на активност антиоксидантних ензима код оксидативног стреса индукованог применом угљентетрахлорида. У поређењу са контролном групом екстракти су без значајне разлике у међусобном деловању успели да супримирају штетне ефекте примењеног хепатотоксина, заштите јетру од оксидативног оштећења и одрже нивое антиоксидантне заштите (ензимске и неензимске). С обзиром да није уочена корелација са антиоксидантном активношћу у *in vitro* условима, као ни са садржајем карвакрола у екстрактима, може се претпоставити да је хепатопротективни учинак резултат синергистичког деловања конституената екстраката.
- Испитан је утицај екстраката *S. montana* (концентрације 1 и 5%) на ћелије Ehrlich-овог асцитног тумора (ЕАС), примењених као претретман, третман и постретман. Анализиран је утицај на поједине ћелијске параметре и на антиоксидантни статус ћелија Ehrlich-овог асцитног тумора. Установљено је да примењени екстракти не показују цитотоксичну, нити цитостатску активност, с обзиром да се упркос смањењу запремине асцитеса број малигнућих ћелија увећава. Само SFE екстракти су, примењени као третман, довели до благе редукције (статистички незначајне) броја ћелија, указујући на свој потенцијални онкостатски ефекат. Кроз анализу

утицаја екстраката на антиоксидантни статус малигнух ћелија може се претпоставити да су ћелије биле изложене јачем или слабијем оксидативном стресу услед примене екстраката, и да је време апликације екстраката изузетно значајно. Међутим, узимајући у обзир утицај испитиваних екстраката на број малигнух ћелија, само SFE екстрактима примењеним у третману се може приписати онкостатска активност, док се остали не могу разматрати као антитуморски агенси.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидаткиња Јелена Владић је успешно и у потпуности спровела истраживања која су била предвиђена планом датим у пријави ове докторске дисертације. Резултати испитивања су систематично, јасно и прегледно приказани и интерпретирани. Детаљним тумачењем резултата и њиховим упоређивањем са резултатима других аутора објављених у научној литератури изведени су одређени закључци који се односе на савремене методе екстракција (суперкритичним угљендиоксидом и субкритичном водом) *S. montana*, потом сушење применом *spray drying* технологије, и испитивање биолошких активности екстраката у *in vivo* моделима. Стога се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

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 представља оригиналан допринос науци јер су систематичним приступом испитани процеси добијања екстраката ртањског чаја применом савремених „зелених“ метода екстракције. Такође је испитан процес добијања екстраката применом иновативне методе сушења. Осим тога, анализа биолошких активности у *in vivo* моделима пружа значајан научни резултат и допринос рационалној фитотерапији, јер пружа могућност примене екстраката ртањског чаја у фитопрепаратима и интензивнију употребу ове широко распрострањене гајене лековите и ароматичне биљке.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, Комисија констатује да је докторска дисертација Јелене Владић у потпуности остварила постављене циљеве истраживања. Свеобухватан истраживачки рад у домену екстракције ртањског чаја, аналитички приступ решавању проблема, примена савремених инструменталних метода и детаљан увид у друга научна истраживања објављена у литератури су неке од карактеристика овог рада.

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију под називом „Савремене методе екстракције ргањског чаја (*Satureja montana* L.), хемијски састав и биолошка активност добијених екстраката“, кандидата Јелене Владић и предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Стела Јокић, ванредни професор,
Прехрамбено-технолошки факултет Осиек

др Сенка Видовић, доцент,
Технолошки факултет у Новом Саду

др Татјана Ћебовић, ванредни професор
Медицински факултет у Новом Саду

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