

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број захтева: 32/6-6.1.

Датум: 26.03.2019.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

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 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

Кандидат **БОЈАНА (Драган) ШПИРОВИЋ ТРИФУНОВИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Пољопривредне науке, модул Фитомедицина, пријавила је докторску дисертацију под називом: „Развој методе за истовремено одређивање присуства охратоксина А и остатака пестицида у грожђу и вину LC-MS/MS техником“

из научне области Фитомедицина.

Универзитет је дана 13.06.2017. године, својим актом 02-08 Број: 61206-2201/2-17 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«ИСТОВРЕМЕНО ОДРЕЂИВАЊЕ ОХРАТОКСИНА А И ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У ГРОЖЂУ И ВИНУ LC-MS/MS ТЕХНИКОМ»**.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 30.01.2019. године, одлуком Факултета број 32/4-6.1. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Драгица Бркић, ванредни професор, Пестициди, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Горица Вуковић, научни сарадник, Прехрамбено инжењерство, Градски завод за јавно здравље, Београд,
3. др Сања Лазић, редовни професор, Фитофармација, Универзитет у Новом Саду - Пољопривредни факултет,
4. др Љиља Торовић, ванредни професор, Фармација (Броматологија), Универзитет у Новом Саду - Медицински факултет,
5. др Драгослав Иванишевић, ванредни професор, Виноградарство, Универзитет у Новом Саду - Пољопривредни факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 26.03.2019. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/6-6.1.
Датум: 26.03.2019. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 26.03.2019. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **БОЈАНА ШПИРОВИЋ ТРИФУНОВИЋ, спец.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ИСТОВРЕМЕНО ОДРЕЂИВАЊЕ ОХРАТОКСИНА А И ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У ГРОЖЂУ И ВИНУ LC-MS/MS ТЕХНИКОМ».**

II Универзитет је дана 13.06.2017. године, актом 02-08 број 61206-2201/2-17, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Tamaš N., Dojnov B., Margetić A., Vujčić M., **Špirović B.**, Miletić N., Stević M., Vujčić Z. (2015): Resistance to common organophosphate and carbamate insecticides in *Aphis pomi* (Hemiptera: Aphididae). Fruits 70(3): 135- 142.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору проф. др Драгици Бркић, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Датум: 31.01.2019. године

Предмет: **Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације
Бојане Шпировић Трифуновић, спец. хем. наука**

Одлуком Наставно-научног већа факултета бр. 32/4-6.1. од 31.01.2019. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације кандидата Бојане Шпировић Трифуновић, специјалисте хемијских наука, под насловом: **„Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грожђу и вину LC-MS/MS техником“**. Комисија у саставу: др Драгица Бркић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду; др Горица Вуковић, научни сарадник Градског завода за јавно здравље, Београд; др Сања Лазић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду; др Љиља Торковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду и др Драгослав Иванишевић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду, на основу прегледа докторске дисертације подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Бојане Шпировић Трифуновић написана је у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, на 180 страна текста, укључујући 12 слика, 43 графика, 47 табела у тексту, 8 у прилогу, као и 206 литературних извора. Пре основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља: 1. Увод (стр. 1-4), 2. Преглед литературе (стр. 5-27), 3. Циљеви истраживања (стр. 28, 29), 4. Материјал и методе (стр. 30-48), 5. Резултати (стр. 49-97), 6. Дискусија (стр. 98-151), 7. Закључак (стр. 152-156) и 8. Литература (стр. 157-180). На крају текста дисертације налазе се Прилози, Биографија, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу. Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводном делу је указано на значај пестицида у повећању продуктивности биљне производње, али и на значај њиховог испитивања приликом одобравања активних супстанци и формулисаних производа - средстава за заштиту биља. Имајући у виду да се за пестициде примењује превентивни приступ процене ризика, активне супстанце пролазе веома детаљна испитивања физичко-хемијских, токсиколошких, екотоксиколошких и других својстава, као и одређивање максимално

дозвољених количина (МДК) остатака активних супстанци пестицида, које представљају максималне законски дозвољене количине остатака у пољопривредним производима, у/на храни и храни за животиње. У даљем тексту дат је преглед метода припреме и инструменталних техника за анализу узорак на остатке активних супстанци. Приказана је, затим и разлика између конвенционалне и органске пољопривредне производње, и указано је на значај виноградарства у Републици Србији. Даље је указано на могућност појаве охратоксина А (ОТА), микотоксина најчешће детектованог у грозђу и вину и наглашена су његова токсична својства за људе и животиње. Указано је на чињеницу да конзумација грозђа и вина представља значајан пут изложености људи овом микотоксину. Дат је приказ метода припреме и техника које се користе за одређивање ОТА у различитим намирницама. Наглашена је неопходност спровођења сталне контроле присуства остатака активних супстанци пестицида и ОТА у биљкама и производима биљног порекла, и чињеница да до сада није рађена њихова истовремена анализа у грозђу и вину, из конвенционалне и органске производње у Републици Србији.

Преглед литературе. Ово поглавље је подељено на три потпоглавља, са више подналова, у којима су наведени релевантни литературни подаци из области истраживања дисертације. У првом потпоглављу, **Виноградарство**, дат је осврт на значај виноградарства, као пољопривредне гране која се у последње време интензивно развија, и производње грозђа, као значајног извора шећера, полифенола, витамина и других састојака. У другом потпоглављу, **Охратоксин А**, поред основних физичко-хемијских својстава ОТА, наведене су гљиве које имају способност да га продукују, његова токсиколошка својства и механизми токсичног деловања. Затим је приказана учесталост појаве ОТА у намирницама, са посебним освртом на присуство у грозђу и вину и описане су методе припреме узорак и технике које се користе за његову идентификацију и квантификацију. У трећем потпоглављу, **Остаци пестицида**, дати су општи подаци о постављању МДК вредности и законској регулативи која се односи на њих, о методама које се користе за припрему узорак и могућности коришћења различитих метода калибрације за смањење утицаја матрикса на испитиване анализе приликом примене LC-MS технике.

Циљеви истраживања. У овом поглављу наведено је девет циљева истраживања.

Материјал и методе. Ово поглавље садржи осам потпоглавља са четири подналова. У првом потпоглављу, **Коришћене хемикалије**, дате су информације о чистоћи и произвођачима 41 активне супстанце пестицида, карбофурана d3, охратоксина А и хемикалија коришћених у изради дисертације. У другом потпоглављу, **Коришћена опрема**, дат је списак коришћене лабораторијске опреме, за припрему узорак и одређивање анализата, са основним карактеристикама. У трећем потпоглављу, **Узорковање**, описане су методе узорковања, локалитети, узорковане сорте винског грозђа (црног и белог) и узоркована сортна вина (црвена и бела). У четвртном потпоглављу, **Припрема основних и радних раствора**, описан је поступак припреме основних и радних раствора активних супстанци пестицида и ОТА коришћених за припрему серије концентрација неопходних за валидацију методе, а у петом, **Припрема узорак**, описане су методе примењене за екстракцију и пречишћавање анализата из грозђа (црног и белог) и вина (црвеног и белог). У шестом потпоглављу, **Хроматографска метода**, дати су постављени услови течног хроматографа и масеног спектрометра, коришћени за детекцију, идентификацију и квантификацију анализата. У седмом потпоглављу, **Параметри валидације**, описани су параметри неопходни за развој поуздане методе (линеарност, прецизност, тачност, поузданост, границе

детекције и мерења). На крају, у осмом потпоглављу, **Процена изложености популација**, са више поднастова, приказани су улазни елементи и методологија коришћени за процену ризика.

Резултати. Резултати истраживања су подељени у две целине са по четири поднастова и приказани јасно и прегледно са графиконима, сликама, табелама и текстуалним тумачењима.

У првом потпоглављу, **Оптимизација услова за одређивање охратоксина А**, приказани су резултати оптимизације масеног спектрометра потребни за поуздану и тачну идентификацију и квантификацију ОТА [m/z 404 $\rightarrow$ 239 (Fr. 105 V и CE 20 V) и m/z 404 $\rightarrow$ 221 (Fr. 120 V и CE 33 V)]. Затим су приказани резултати добијени приликом развоја методе. Линеарност одговора детектора, за калибрационе криве у ацетонитрилу, матриксама грозђа и вина и по методи стандардног додатка, је имала квадратну једначину зависности са коефицијентима корелације већим од 0,99. Утврђено је да сви матрикси утичу на сигнал ОТА; и то црно грозђе има МЕ 29,16%, бело грозђе - 10,95%, црвено вино - 47,24% и бело вино 39,49%. Границе детекције (LOD) за ОТА су биле 0,33 $\mu\text{g/kg}$ у црном грозђу и обе врсте вина, а у белом грозђу 0,5 $\mu\text{g/kg}$. Границе мерења у оба матрикса грозђа су биле 1 $\mu\text{g/kg}$, а у матриксама вина 0,5 $\mu\text{g/kg}$. Средња вредност приноса екстракције за ОТА у црном грозђу била је 91,8% уз прецизност (%RSDr 12,1), а у белом 102,9% (%RSDr 9,86). Поновљивост методе износила је за црно грозђе %RSDr 2,70, а за бело %RSDr 2,58. Средња вредност приноса екстракције за црвено вино је износила 101,5% (%RSDr 3,83), а за бело 100,7% (%RSDr 8,11), док је поновљивост за црвено вино на концентрационом нивоу од 1 $\mu\text{g/kg}$ била %RSDr 11,71, а за бело 10,76. Анализом узорака грозђа и вина утврђено је присуство ОТА само у једном сортном црвеном вину Pinot noir у концентрацији 1,17 $\mu\text{g/kg}$, испод максимално дозвољене количине у винима (2 $\mu\text{g/kg}$). На основу добијених резултата процењен је унос охратоксина А, и добијено је да је испод TWI од 120 ng/kg тм/недељно у четири разматрана сценарија. Проценат TWI за одојчад није превазишао вредност од 2%, при 95-ом перцентилу концентрације охратоксина А (за LOD вредност концентрације). За предшколску децу, максимални достигнути проценат TWI износио је 1%. У популационој групи деце узраста од 7 - 10 година, унос охратоксина А је окарактерисан са максималних 0,6% од TWI (такође за LOD вредност). У случају адолесцената и одраслих, процењени унос охратоксина А је био врло низак, што је за резултат дало максималне уделе у TWI од 0,39 и 0,26%, редом. У три од четири испитана сценарија процене уноса ОТА конзумацијом вина за одраслу популацију достигнути проценат од TWI је испод 1%, са максималних 0,15% ($< \text{LOD} = \text{LOD}$). Чак и у најконзервативнијем сценарију, који у обзир узима само контаминирани узорке, достигнуто је мање од 2% од TWI, што је пре свега узроковано ниском конзумираном количином вина. У другом потпоглављу, **Оптимизација услова за одређивање остатака активних супстанци пестицида**, приказани су услови масеног спектрометра и постављене временски сегментисане хроматографске методе. Калибрационе криве за већину пестицида у мобилној фази, матриксама грозђа и вина и по методи стандардног додатка су показале добру линеарну, односно квадратну зависност са коефицијентима корелације $>0,99$. Најлошију линеарност је показао зоксамид у белом вину ($R^2=0,1018$) за калибрацију методом стандардног додатка и ипродион према калибрацији у матриксу у црвеном вину ($R^2=0,904$). Утврђен је велики утицај матрикса грозђа и вина на већину испитиваних активних супстанци пестицида, при чему највећи позитиван матрикс ефекат црвено вино има на ипродион (300%), а бело на трифлумизол (87,6%), док највећи утицај на смањење сигнала црвено вино има на флуквинконазол (-900%) и бело на спироксамин (-862,1%). Граница мерења за све активне супстанце је постављена на нивоу од 0,01 mg/kg. Границе детекције су биле у опсегу од 1 - 8,99 $\mu\text{g/kg}$. За највећи

број пестицида LOD вредности су мање од 5 µg/kg, што су значајно ниже вредности у односу на постављене МДК вредности за пестициде. Принос екстракције у црном грожђу је за 75,6%, у белом за 51,2%, у црвеном вину за 46,3%, а у белом за 56,1% активних супстанци пестицида био између 70 и 120%. Већина пестицида је у сва четири матрикса на најнижим нивоима обогаћивања имала вредности приноса екстракције ≤ 70%. Вредности приноса екстракције су израчунате на основу калибрације у матриксима узорака, јер је циљ био показати изузетно изражен утицај матрикса, како грожђа тако и вина, на испитиване анализе. Треба нагласити да ова врста матрикса обилује шећерима, танинима и пигментима који имају изузетно неповољан утицај на хроматографску колону и на процесе јонизације у јонском извору. Да би се избегао неповољан утицај матрикса и корекција добијених резултата за вредности приноса екстракције, концентрација детектованих пестицида је одређена методом стандардног додатка. У свим узорцима црног винског грожђа, укључујући и узорке из органске производње, детектовани су остаци пестицида; детектовано је 19 пестицида, међу којима је најзаступљенији био тебуконазол. Дифеноконазол је детектован у концентрацијама преко МДК (3,0 mg/kg) вредности. У белом винском грожђу детектовано је 15 пестицида. Пестициди су детектовани и у 50% узорака белог грожђа из органске производње. Најчешће детектован пестицид у белом грожђу је металаксил, затим пропиконазол и тебуконазол, који су били заступљени у концентрацијама изнад МДК (0,3 и 1,0 mg/kg, редом). У свим узорцима црвеног вина је детектовано 10 активних супстанци пестицида, при чему ниједан пестицид није детектован у концентрацији преко МДК вредности, а најчешће детектована активна супстанца у црвеном вину је пириметанил. У 12 сортних белих вина детектовано је 10 активних супстанци; пропиконазол и тебуконазол су детектовани у концентрацијама преко препоручене МДК вредности, а остаци нису детектовани једино у узорцима сортног белог вина Панонија из органске производње. Присуство остатака пестицида у грожђу у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за популацију у Републици Србији, осим у случају црног грожђа са остацима дифеноконазола (28,706 mg/kg) и тебуконазола (1,25 и 4,585 mg/kg, у црном и белом грожђу редом), чији унос представља неприхватљив ризик за одојчад, адолесценте и одрасле. Присуство остатака активних супстанци пестицида у вину у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за одраслу популацију у Републици Србији.

Дискусија. Дискусија је подељена на два потпоглавља, са више подналова. У првом, *Анализа охратоксина А*, дискутовани су резултати добијени за примену QuEChERS методе за припрему узорака грожђа и вина за одређивање ОТА и поређени са релевантним подацима других аутора. Остварен је циљ формирања методе која једним поступком пречишћавања и инструменталног одређивања омогућава истовремену квантификацију охратоксина А и остатака активних супстанци пестицида у грожђу и вину. До сада на нашим просторима нема објављених радова који укључују оваква истраживања. Оваквом припремом узорака је избегнута употреба скувих имуноафинитетних колона, број узорака који се могу анализирати у току једног дана се дупло повећава, а смањује се утрошена количина растварача и потрошног материјала, а самим тим и цена анализе. Такође, добијене масе фрагментационих јона су у сагласности са могућим путевима деградације и могу се користити за поуздану идентификацију и квантификацију ОТА. Дискутовани су и резултати добијени поређењем примене метода екстерне калибрације и методе квантификације помоћу интерног стандарда. Употреба методе екстерне калибрације дала је добре коефицијенте корелације и добре приносе екстракције, што такође смањује цену, јер се анализа може радити и без обележеног интерног стандарда. Охратоксин А није детектован у грожђу преко вредности границе детекције јер клима у Републици Србији није погодна за

развој гљива које га продукују, што је и потврђено приликом поређења са резултатима других аутора. Процењен је унос ОТА преко грозђа и добијено је да унос ОТА преко грозђа представља прихватљив ризик за све узрасне групе (одојчад, децу претшколског узраста, децу 7 - 10 година, адолесценте и одрасле) у нашој земљи. У једном узорку црвеног вина ОТА је детектован испод максималне законски дозвољене вредности. Вино конзумирају само одрасли, и на основу добијених резултата процењено је да вино доприноси 1,21% од тоталног недељног уноса. Када се саберу доприноси уносу охратоксина А преко вина и грозђа, одрасла популација достиже 0,5% TWI, посматрано при просечним концентрацијама охратоксина А.

У другом потпоглављу, *Анализа остатака активних супстанци пестицида*, детаљно су анализирани и дискутовани добијени резултати за развијену LC-MS/MS методу. Код LC-MS/MS технике постојање МЕ зависи од тога да ли су у екстракту присутна једињења која ће утицати на количину анализата, који ће се јонизовати у MS/MS спектрометру. С обзиром да су аналити у конкуренцији са коелуирајућим честицама за добијање наелектрисања у јонском извору најчешће долази до смањења сигнала анализата, или до утицаја компоненти матрикса на отпуштање јона из капљица електроспреја у гасну фазу, што доводи до промене површинског напона капљица. Компоненте матрикса могу утицати и на померање сигнала интерног стандарда, чиме долази до промена у резултатима за све анализате. Због свега наведеног коришћена је калибрација методом стандардног додатка да би се избегле последице утицаја матрикса на одговоре анализата. У анализираних 250 узорака црног и белог винског грозђа, укључујући и грозђе из органске пољопривредне производње, детектовани су остаци 20 активних супстанци пестицида. Добијене вредности су биле веће од законски дефинисаних максимално дозвољених количина (МДК) за винско грозђе за следеће активне супстанце: дифеноконазол, пропиконазол и тебуконазол. У 160 анализираних узорака црвеног и белог сортног вина детектовано је 13 активних супстанци пестицида. Пропиконазол и тебуконазол су детектовани у количинама које су веће од МДК вредности за вино. Дискутовани су и резултати добијени за нађене активне супстанце пестицида детектоване у грозђу и вину и њихова судбина у процесу винификације. На основу добијених концентрација за остатке активних супстанци пестицида уочено је да допринос црног грозђа толеришућем дневном уносу превазилази 1% само у случају дифеноконазола, који достиже високе вредности: 38,7%, 19,3%, 11,6%, 7,5% и 5,1%, редом за одојчад, предшколску децу, децу (7 - 10 г.), адолесценте и одрасле. У случају белог грозђа, допринос дифеноконазола је знатно нижи, у распону од 0,5% (одрасли) до 4,0% (одојчад), а следе тебуконазол, ципродинил и пропиконазол (опсег 0,4 - 3,0%, 0,17 - 1,3%, 0,13 - 1,0%, редом), док су за све остале детектоване активне супстанце доприноси толеришућем дневном уносу испод 1% у свакој од популационих група. Такође, при конзумирању црног грозђа акутна референтна доза за дифеноконазол (0,16 mg/kg) прекорачена је чак 6 (адолесценти), односно 4 пута (одрасли), док за одојчад прекорачење износи 21%. У групи предшколске деце и деце узраста 7 - 10 година унос дифеноконазола достиже 61% и 37% акутне референтне дозе, редом. Уочено је и да унос тебуконазола прекорачује акутну референтну дозу: преко црног грозђа у групи адолесцената (145%), односно преко белог грозђа за одојчад, адолесценате и одрасле (103%, 532% и 361%, редом). При процени уноса пестицида преко црвеног вина од 10 ml/дан, ниједан од детектованих пестицида не достиже ни 0,1% толеришућег дневног уноса. Посматрањем конзумирања једне чаше вина дневно (200 ml), одговарајуће вредности за ципродинил би износиле 0,7% и 1,6% толеришућег дневног уноса. У најгорем сценарију (максимална концентрација пестицида и конзумација 0,2 l вина/дан), унос металаксила се приближава вредности од 1% толеришућег дневног уноса (0,98%). Када је посматрано бело вино, просечна и максимална концентрација

дифеноконазола су резултовале са по 0,3% и 1,2%, односно 6,9% и 23,5% толеришућег дневног уноса, у сценарију ниског и умереног уноса, редом. Комбинацијом максималних концентрација и умереног уноса, уочено је да ципродинил, диметоморф, миклобутанил и пропиконазол доприносе 2,4%, 1,2%, 1,1% и 1,1% од толеришућег дневног уноса, редом. Највиши проценат за акутне референтне дозе добијен је за дифеноконазол преко белог вина (9,3%), а затим за тебуконазол 5,6% преко белог, односно 2,7% црвеног вина.

Закључак. Ово поглавље садржи правилно изведене закључке који у потпуности произилазе из добијених резултата. Развијена је и оптимизована мултирезидуална инструментална метода која је осетљива, селективна и поуздана за испитивање остатака 41 активне супстанце пестицида и ОТА у грожђу и вину. Избегнута је употреба имуноафинитетних колона за припрему узорка за анализу ОТА, омогућена припрема 24 узорка грожђа/вина дневно за анализу остатака пестицида и ОТА, чиме се штеди време, смањује употреба растварача и потрошног материјала, а самим тим смањује и цена анализе. Калибрационе криве за ОТА у ацетонитрилу, матриксама грожђа и вина и по методи стандардног додатка имале су квадратну једначину зависности са коефицијентима корелације већим од 0,99. Матрикс ефекат црног грожђа на одговор ОТА је 29,16% и утиче на повећање сигнала ОТА, а МЕ белог грожђа од -10,95% на смањење сигнала. Црвено вино доводи до смањења сигнала ОТА (-47,24%,) док бело вино доводи до повећања сигнала (39,49%). Добијене вредности за LOD на нивоу од 0,33 µg/kg у црном грожђу и црвеном и белом вину и 0,5 µg/kg у белом грожђу омогућавају поуздану детекцију ОТА, као и LOQ на нивоу од 1 µg/kg у грожђу и 0,5 µg/kg у вину. Вредности приноса екстракције и прецизности за ОТА у оба матрикса грожђа и вина су задовољиле критеријум Уредбе 401/2006. Ни у једном узорку грожђа није детектован ОТА изнад LOD вредности. На основу добијених резултата процењен је унос ОТА преко грожђа. Добијени резултати показују да унос ОТА преко грожђа представљају прихватљив ризик за све узрасне групе (одојчад, децу претшколског узраста, децу 7 - 10 година, адолесценте и одрасле) у Републици Србији. Охратоксин А је детектован само у вину Pinot noir, добијеном од грожђа зараженог фитопатогеном гљивом *B. cinerea*, што представља 3,1% од укупно анализираних узорка. Вино конзумирају само одрасли, а на основу добијених резултата процењено је да вино доприноси 1,21% од TWI у уносу ОТА на недељном нивоу. Калибрационе криве за већину пестицида у мобилној фази, матриксама грожђа и вина и по методи стандардног додатка су показале добру линеарну, односно квадратну зависност са коефицијентима корелације >0,99. Утврђен је значајан матрикс ефекат грожђа и вина на одговор детектора за већину активних супстанци пестицида. Границе детекције и мерења су постављене на довољно ниским вредностима концентрација да омогуће поуздану детекцију и квантификацију остатака пестицида. Вредности приноса екстракције и прецизности за већину активних у оба матрикса грожђа и вина су задовољиле критеријум SANTE/11813/2017 документа (70 - 120%; %RSD≤20%). У свим узорцима црног винског грожђа, укључујући и узорке из органске производње детектовани су остаци активних супстанци пестицида; детектовано је укупно 19 супстанци, међу којима је најзаступљенији био тебуконазол. Дифеноконазол је детектован у концентрацијама преко МДК (3,0 mg/kg) вредности. У 80% анализираних узорка белог грожђа детектовано је 15 активних супстанци, а остаци су детектовани и у 50% узорка белог грожђа из органске производње. Пропиконазол (85,7% узорка) и тебуконазол (30% узорка) су били заступљени у количинама изнад МДК (0,3 и 1,0 mg/kg, редом). У свим узорцима црвеног вина је детектовано 10 активних супстанци пестицида, при чему ниједан пестицид није детектован у концентрацији преко МДК вредности. Најчешће детектована активна супстанца у црвеном вину је пириметанил, а

остаци нису детектовани једино у узорцима белог вина Панонија из органске производње. У осталих 12 сортних белих вина, укључујући и органско детектовано је 10 активних супстанци, при чему су пропиконазол и тебуконазол детектовани у концентрацијама преко МДК вредности. У процесу добијања црвеног вина смањене су концентрације азоксистробина, боскалида, диметоморфа, пириметанила, пираклостробина и тебуконазола, а концентрације ципродинила, металаксила и фенхексамида повећане. Концентрације боскалида и диметоморфа су веће у белом вину него у белом грожђу, а концентрације металаксила, ципродинила, дифеноконазола, крезоксим метила, миклобутанила, пропиконазола, пириметанила и тебуконазола су мање. Од црног винског грожђа три сорте са локалитета Мала Сугубина, две са локалитета Радмиловац и Умчари и једна са локалитета Голобок би биле проглашене здравствено неисправним због концентрација дифеноконазола преко МДК вредности. Од белог винског грожђа по једна сорта са локалитета Копљари, Мала Сугубина, Доње Злегиње, Заклопача, Страгари и Сремски Карловци би такође били здравствено неисправни због концентрација пропиконазола и тебуконазола преко МДК вредности. Добијени резултати указују на неопходност сталне контроле ових производа, без обзира на њихово порекло тј. да ли су из органске или конвенционалне производње. Такође, због детекције остатака активних супстанци пестицида у узорцима из органске производње, закључено је да је неопходно постојање заштитног појаса између конвенционалних и органских засада. У овом истраживању је утврђено одсуство ОТА у грожђу и вину из конвенционалне и органске производње што може бити последица климатских фактора и присуства пестицида у конвенционалној производњи. Период зрења је карактерисало време без падавина и без великих осцилација у температури. Такође, на биљкама и плодовима нису биле уочене појаве болести (осим код сорти Ризлинг рајнски - Радмиловац и Бургундац црни - Страгари). Присуство остатака пестицида у грожђу у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за популацију у Републици Србији, осим у случају црног грожђа са остацима дифеноконазола (28,706 mg/kg) и грожђа са остацима тебуконазола (1,25 и 4,585 mg/kg, у црном и белом грожђу редом), чији унос представља неприхватљив ризик за одојчад, адолесценате и одрасле. Присуство остатака активних супстанци пестицида у вину у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за одраслу популацију у Републици Србији. На основу процене акутног уноса пестицида преко вина за одраслу популацију највише вредности су добијене за дифеноконазол унет из белог вина (9,3%), затим за тебуконазол 5,6% из белог и 2,7% из црвеног вина.

Литература. На правилан начин цитирано је 206 литературних извора, који су актуелни и у потпуности одговарају тематици која је проучавана у дисертацији.

Прилози. У укупно 8 приказаних прилога, представљених у 8 табела, налазе се додатни подаци од значаја за боље разумевање ове дисертације.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Бојане Шпировић Трифуновић, специјалисте хемијских наука, под насловом: „Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грожђу и вину LC-MS/MS техником“, представља оригиналан научни рад, који је у сагласности са одобреним планом за израду дисертације. Добијени резултати представљају значајан допринос науци, али и струци, имајући у виду да је развијена метода за истовремено одређивање ОТА и остатака пестицида у грожђу и вину, избегнута употреба имуноафинитетних колона, омогућена припрема 24 узорка грожђа/вина, чиме се штеди време, смањује употреба растварача и потрошног материјала, а самим тим смањује и

цена анализе. Добијени резултати указују на неопходност контроле намирница ради заштите здравља потрошача како од микотоксина, тако и од остатака активних супстанци пестицида. По први пут код нас добијени су резултати о присуству охратоксина А у грожђу и вину из органске и конвенционалне пољопривредне производње, као и о изложености потрошача овом микотоксину. Такође, урађена је анализа остатака пестицида у узорцима грожђа и вина из различитих виноградарских подручја у Републици Србији. На основу добијених резултата урађена је процена изложености потрошача остацима пестицида и процена ризика. Указано је на неопходност сталне контроле ових производа, без обзира на њихово порекло тј. да ли су из органске или конвенционалне производње, као и на неопходност постојања заштитног појаса између конвенционалних и органских засада.

Имајући све наведено у виду, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Бојане Шпировић Трифуновић, специјалисте хемијских наука, под насловом: „Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грожђу и вину LC-MS/MS техником“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да усвоји позитивну оцену ове докторске дисертације и тиме омогући кандидату да је пред истом Комисијом јавно брани.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Драгица Бркић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област - Пестициди)

др Горица Вуковић, научни сарадник
Градски завод за јавно здравље, Београд
(ужа научна дисциплина - Прехрамбено инжењерство)

др Сања Лазић, редовни професор
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област - Фитофармација)

др Љиља Торковић, ванредни професор
Универзитет у Новом Саду, Медицински факултет
(ужа научна област - Фармација (Броматологија))

др Драгослав Иванишевић, ванредни професор
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област - Виноградарство)

Прилог:

Објављен рад Бојане Шпировић Трифуновић, специјалисте хемијских наука, у научном часопису на SCI листи:

Tamaš N., Dojnov B., Margetić A., Vujčić M., Špirović B., Miletić N., Stević M., Vujčić Z. (2015): Resistance to common organophosphate and carbamate insecticides in *Aphis pomi* (Hemiptera: Aphididae). Fruits 70(3): 135- 142.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 31.01.2019. год.

Након прегледа извештаја о провери оригиналности, достављеног од старне Универзитетске библиотеке, а на основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, који се примењује од 01.10.2018. године, ментори докторске дисертације кандидата Бојане Шпировић Трифуновић, спец. хем. наука, под насловом: **„Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грозђу и вину LC-MS/MS техником“**, доносе следећу

О Ц Е Н У

Извештај Универзитетске библиотеке о провери оригиналности докторске дисертације под насловом: **„Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грозђу и вину LC-MS/MS техником“**, кандидата Бојане Шпировић Трифуновић, спец. хем. наука, указује да је поменута дисертација оригинални научни рад кандидата, те да се, у складу с тим, прописани поступак за њену одбрану може наставити.

Ментори:

др Драгица Бркић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
(ужа научна област - Пестициди)

др Горица Вуковић, научни сарадник
Градски завод за јавно здравље, Београд
(ужа научна дисциплина - Прехрамбено инжењерство)