

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU HEMIJSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 8. marta 2012. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Tamare D. Lazarević-Pašti, diplomiranog biohemičara, istraživača saradnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, pod naslovom: **„Primena oksidacije organo-tiofosfatnih pesticida u metodama za njihovu detekciju na bazi inhibicije acetilholinesteraze“**. Komisija je pregledala doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija Tamare Lazarević-Pašti sadrži 142 strane teksta sa 49 slika, 29 tabela i 7 shema i čine je: Uvod (2 strane), Opšti deo (41), Materijal i metode (12), Rezultati i diskusija (63), Zaključak (2), Literatura (19) sa 206 navoda i Prilozi (3). Disertacija ima Rezime na srpskom i engleskom jeziku, Listu skraćenica, Sadržaj i Biografiju autora.

U **Uvodu** Kandidatkinja navodi značaj i široku upotrebu organofosfatnih pesticida, njihovu štetnost po okolinu i čoveka, kao i činjenicu da su okso-forme organofosfata toksičnije od tio-formi. Kao ciljevi doktorske disertacije navedeni su utvrđivanje optimalnih uslova za oksidaciju organo-tiofosfata, u prisustvu enzima mijeloperoksidaze i elektrohemijski generisanih halogena, radi povećanja osetljivosti acetilholinesteraznog testa za detekciju organofosfata. Pored toga, Kandidatkinja kao jedan od ciljeva postavlja primenu ovako modifikovane metode za određivanje organofosfata u realnim uzorcima.

U **Opštem delu** ukratko su prikazane opšte odlike pesticida i struktura organofosfatnih jedinjenja. Zatim je data struktura i mehanizam delovanja acetilholinesteraze, kao i mehanizam inhibicije acetilholinesteraze sa organofosfatima. Dat je pregled metoda za detekciju organofosfata (konvencionalnih i pomoću biosenzora), pregled postupaka za oksidaciju organofosfata pomoću neorganskih supstanci, enzima i elektrohemijskim tretmanima. Na kraju ovog dela prikazani su reakcioni mehanizam i struktura enzima mijeloperoksidaze.

Materijal i metode sadrže detaljan opis eksperimentalnih procedura korišćenih u okviru doktorske disertacije.

U delu **Rezultati i diskusija** Kandidat daje pregled i diskusiju dobijenih rezultata u šest celina. U prvom delu prikazani su rezultati inhibicije native acetilholinesteraze komercijalnim tio- i okso-oblicima organofosfata. U drugom delu prikazana je optimizacija uslova za prevođenje organo-tiofosfata u odgovarajuće okso-oblike u prisustvu enzima mijeloperoksidaze. Treći deo sadrži rezultate primene elektrohemijski generisanih hlora, broma i joda za oksidaciju organofosfata. U četvrtom delu Kandidatkinja poredi efikasnost enzimске i elektrohemijske metode za oksidaciju organofosfata, kao modifikacije u acetilholinesteraznom testu za njihovo određivanje.

Peti deo opisuje primenu modifikovanog acetilholinesteraznog testa za određivanje organofosfata u realnim uzorcima, dok je u šestom delu prikazano određivanje organofosfata u protočnim sistemima (FIA metoda) nakon oksidacije.

U **Zaključku** Kandidatkinja sumira dobijene rezultate i njihovu diskusiju.

U poglavlju **Literatura** (206 citata) navedeni su radovi iz oblasti istraživanja koji iscrpno pokrivaju sve delove disertacije.

B. KRATKI OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Enzim acetilholinesteraza inhibiran je sledećim organofosfatima: diazinon, diazokson, malation, malaokson, hlörpirifos, hlörpirifos-okson, azinfos-metil, azinfos-metil-okson, forat i forat-okson. Za ispitivane organofosfate određene su IC_{50} vrednosti. U cilju snižavanja granice detekcije metode određivanja organofosfata acetilholinesteraznim testom primenjena je oksidacija organo-tiofosfata.

Diazinon, malation, hlörpirifos, azinfos-metil i forat su oksidovani u prisustvu enzima mijeloperoksidaze, pri čemu je utvrđeno da su optimalni uslovi za dejstvo enzima: 50 μM H_2O_2 , 100 nM mijeloperoksidaza u reakcionoj smeši, čija pH vrednost iznosi 6, inkubacija na sobnoj temperaturi (25 °C) u toku 10 minuta. Proizvodi oksidacije su identifikovani kao odgovarajući oksoni pomoću UPLC i GC/MS analize. Pokazano je da su oksoni dobijeni na ovaj način stabilni tokom 1h.

Oksidacija organofosfata u prisustvu mijeloperoksidaze pod utvrđenim optimalnim uslovima primenjena je kao modifikacija acetilholinesteraznog testa za detekciju organofosfata. Na taj način dobijene su IC_{50} vrednosti od 2,5 do 1000 puta manje nego za neoksidovane organofosfate. Određene su i granice detekcije za svaki ispitivani organofosfat: $1,17 \times 10^{-7}$ M za diazinon, $3,40 \times 10^{-9}$ M za malation, $6,61 \times 10^{-7}$ M za hlörpirifos, $6,53 \times 10^{-8}$ M za azinfos-metil i $1,85 \times 10^{-7}$ M za forat. Utvrđeno je da se u prisustvu mijeloperoksidaze najefikasnije oksiduje malation, a zatim slede diazinon, hlörpirifos, forat i azinfos-metil. Kada se svi ispitivani organo-tiofosfati nađu u smeši, ispoljavaju antagonistički efekat.

Diazinon, malation, hlörpirifos, azinfos-metil i forat oksidovani su i pomoću elektrohemijски generisanih hlora, broma i joda. Utvrđeno je da je oksidacija najefikasnija pri inkubaciji organofosfata sa bromom tokom 15 minuta. Proizvodi oksidacije su identifikovani pomoću UPLC analize.

Indirektna elektrohemijска oksidacija organo-tiofosfata primenjena je kao modifikacija u acetilholinesteraznom testu, pri čemu su dobijene IC_{50} vrednosti 400 do 10000 puta manje od onih za neoksidovane organofosfate. Granice detekcije za svaki ispitivani organo-tiofosfat, dobijene pri ovoj modifikaciji testa, su $1,74 \times 10^{-8}$ M za diazinon, $2,50 \times 10^{-9}$ M za malation, $1,30 \times 10^{-8}$ M za hlörpirifos, $4,38 \times 10^{-9}$ M za azinfos-metil i $3,28 \times 10^{-8}$ M za forat.

Upoređen je efekat enzimske i elektrohemijсke oksidacije kao modifikacija acetilholinesteraznog testa i nađeno je da su IC_{50} vrednosti 100 do 1000 puta niže kada

se organo-tiofosfati oksiduju elektrohemijski. S tim u skladu, granice detekcije dobijene primenom elektrohemijske oksidacije organo-tiofosfata su za red veličine niže od onih koje se dobijaju pri enzimskoj oksidaciji. Oksidacija organo-tiofosfata pomoću elektrogenerisanih halogena je i ekonomičnija u odnosu na enzimsku. Ipak, oksidacija u prisustvu mijeloperoksidaze kraće traje, jednostavnija je za izvođenje, a ostali proizvodi koji nastaju u procesu su neškodljivi po okolinu. Ova metoda je i pogodnija za terensko izvođenje analiza.

Uvođenjem imobilizovane acetilholinesteraze i protočnog sistema u test postignuto je sniženje nivoa detekcije organo-tiofosfata za još jedan red veličine.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Po prvi put u literaturi, organofosfatni pesticidi su prevedeni iz tio- u okso-oblike pomoću enzima mijeloperoksidaze, što je potvrđeno primenom HPLC i GC/MS. Utvrđeni su optimalni uslovi za izvođenje oksidacije, a limit detekcije metode je na ovaj način spušten za red veličine u odnosu na podatke iz literature koji se odnose na oksidaciju organo-tiofosfata u prisustvu enzima.

Organo-tiofosfatni pesticidi oksidovani su pomoću elektrohemijski generisanih halogena u vodenoj sredini, što je prvi put opisano u literaturi. Jod je prvi put upotrebljen za oksidaciju organo-tiofosfata. U poređenju sa anodnim tretmanima koji za cilj imaju snižavanje granica detekcije organofosfata, ranije opisanim u literaturi, prikazana metoda indirektno elektrohemijske oksidacije organofosfata ima za prednost visoku efikasnost (granice detekcije su skoro iste onima za čiste okso-forme i praktično limitirane granicom detekcije acetilholinesteraznog testa), dok u odnosu na iste pruža mogućnost efikasne oksidacije uzoraka relativno malih zapremina (reda 1 mL).

Testiranje realnih uzoraka je, takođe, prvi put izvedeno modifikovanim acetilholinesteraznim testom uz enzimsku oksidaciju uzoraka.

Enzimska oksidacija upotrebljena je uspešno kao modifikacija testa za detekciju organofosfata u protočnom sistemu, što do sada nije opisano u literaturi. Na ovaj način, nivo detekcije metode je spušten za još jedna red veličine u odnosu na literaturne podatke.

D. OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DISERTACIJE

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M₂₁)

1. T.Lazarević – Pašti, T.Momic, A.Onija, Lj.Vujisic, V.Vasic, Myeloperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides as a pre-step in their

determination by AChE based bioanalytical methods, *Microchimica Acta* 170 (2010), 289-297 (IF₂₀₀₉=2,648, Chemistry, Analytical 17/70)

2. T.Lazarević – Pašti, M.Čolović, J.Savić, T.Momic, V.Vasic, Oxidation of diazinon and malathion by myeloperoxidase, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100 (2011) 140-144. (IF₂₀₁₀=1,503, Entomology 22/83)
3. T. Lazarević-Pašti, B. Nastasijević, V. Vasić, Oxidation of chlorpyrifos, azinphos-methyl and phorate by myeloperoxidase, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101 (2011) 220–226 (IF₂₀₁₀=1,503, Entomology 22/83)

Rad u međunarodnom časopisu (M₂₃)

1. T. Lazarević-Pašti, V. Vasić, Oxidation of Diazinon for the Sensitive Detection by Cholinesterase-Based Bioanalytical Method, *Journal of environmental protection and ecology* 12 (2011) 1168-1173 (IF₂₀₁₀=0,178, Environmental Sciences 193/193)

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₃)

1. T.Lazarević - Pašti, T.Momić, V.Vasić, Oxidation of some organophosphate pesticides with enzyme myeloperoxidase, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 21-24 2010. Belgrade, Serbia, Proceedings, Vol 1, p. 328

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M₃₄)

1. T.Lazarević-Pašti, V.Vasić, Oxidation of diazinon for the sensitive detection by cholinesterase based bioanalytical methods, Sustainable Development in Southeast Europe, June 16-20 2009, Tekirdag-Istanbul, Turkey, Programme & Abstracts Book, p. 57.
2. T.Lazarević-Pašti, V.Vasić, Enzyme oxidation of organophosphorous pesticides as a pre-step in determination by AChE based bioanalytical methods, 4th International workshop on „Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring“, October 01-03 2009, Tangier, Morocco, Book of Abstracts, p. 30.
3. T.Lazarević-Pašti, Lj.Vujisić, V.Vasić, Myeloperoxidase-mediated oxidation of organophosphorous pesticides, 4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, November 4-6 2009, Prague, Book of Abstracts, p.436.
4. T. Lazarević-Pašti, V. Vasic, MPO mediated oxidation of diazinon as a pre-step in determination of organophosphates in food samples by AChE based bioanalytical

method, 1st FCUB-ERA Workshop, Food safety and Health Effects of Food, Belgrade, January 31 – February 1, 2011, Book of Abstracts, p. 51.

E. ZAKLJUČAK

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji pod naslovom „**Primena oksidacije organo-tiofosfatnih pesticida u metodama za njihovu detekciju na bazi inhibicije acetilholinesteraze**“ Kandidatkinja, Tamara Lazarević-Pašti, uspešno rešila postavljene zadatke koji se odnose na oksidaciju organo-tiofosfatnih pesticida enzimskom i elektrohemijomskom metodom u cilju snižavanja granice detekcije acetilholinesteraznog testa za detekciju organofosfata. Komisija smatra da rezultati objavljeni iz ove doktorske disertacije predstavljaju značajan i originalni naučni doprinos unapređenju metoda za detekciju organofosfatnih pesticida, i da imaju fundamentalni biohemijski, ali i biotehnološki značaj.

Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru četiri rada štampana u međunarodnim naučnim časopisima (tri u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M₂₁, a jedan u časopisu kategorije M₂₃), jednog saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampanog u celini i četiri naučna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu.

Na osnovu svega izloženog Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Tamare Lazarević-Pašti pod naslovom „**Primena oksidacije organo-tiofosfatnih pesticida u metodama za njihovu detekciju na bazi inhibicije acetilholinesteraze**“ prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora biohemijskih nauka.

Beograd, 19.03. 2012.

Komisija:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u
Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke „Vinča“

dr Miroslav M. Vrvic, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u
Beogradu