

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ

35/373
(Број захтева)
07.12.2017.
(датум)

Образац 2
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ
НАУКА

(назив већа научне области коме се захтев упућује)

Београд, Студентски трг бр. 1

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета” број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата

АЛЕКСАНДРЕ (Арса) ЈОВАНОВИЋ, магистра фармације

КАНДИДАТ: **АЛЕКСАНДРА (Арса) ЈОВАНОВИЋ**

пријавила је докторску дисертацију под називом:

„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката“

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **27.03.2017.** године, својим актом **61206-1210/2-17**, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката“

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

АЛЕКСАНДРЕ (Арса) ЈОВАНОВИЋ

образована је на седници одржаној **21.09.2017.** године Одлуком Факултета под бр. **35/298** у саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Бранко Бугарски	Редовни професор	Хемијско инжењерство
2. Др Зорица Кнежевић-Југовић	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
3. Др Катарина Шавикин	Научни саветник	Биотехничке науке-биљна биотехнологија
4. Др Гордана Здуних	Виши научни сарадник	Биотехничке науке-биљна биотехнологија
5. Др Верица Ђорђевић	Виши научни сарадник	Хемијско инжењерство

На захтев студента, а уз сагласност ментора, декан је донео Решење број 20/125 од 29.09.2017. године о продужењу рока за завршетак студија за два семестра шк. 2017/2018. године, у складу са Статутом Универзитета у Београду и Статутом Факултета.

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **26.10.2017.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26.10.2017. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Катарина Шавикин, научни саветник Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду, др Гордана Здунић, виши научни сарадник Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду, др Верица Ђорђевић, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“** коју је поднела **Александра Јовановић**, магистар фармације и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације **Александре Јовановић**, под називом **„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“** Одлуком број: 61206-1210/2-17 од 27.03.2017. године.

Верификација научних доприноса:

Категорија M21:

1. **Александра Јовановић**, Верица Ђорђевић, Гордана Здунић, Дејан Пљевљакушић, Катарина Шавикин, Дејан Гођевац, Бранко Бугарски (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat and ultrasound-assisted techniques, *Separation and Purification Technology*, 179, 369-380, Elsevier (IF=3,299, ISSN: 1383-5866)

Категорија M23

1. **Александра Јовановић**, Верица Ђорђевић, Гордана Здунић, Катарина Шавикин, Дејан Пљевљакушић, Бранко Бугарски (2016) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity, *Хемијска индустрија*, 70 (4), 391-398, Савез хемијских инжењера (IF=0,437, ISSN: 0367-598X)

Докторска дисертација и реферат о оцени докторске дисертације достављају се на увид јавности, а по истеку рока од 30 дана, на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Александре А. Јовановић (рођ. Чанчаревић)**, магистра фармације

Одлуком 35/298 бр. од 21.09.2017. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Александре А. Јовановић (рођ. Чанчаревић)**, магистра фармације, под насловом

„Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

08.12.2016. – Кандидат Александра А. Јовановић, предложила је тему докторске дисертације под називом: „Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“.

29.12.2016. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/657 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Александре А. Јовановић за израду докторске дисертације под називом: „Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“.

23.02.2017. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/26 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Александре А. Јовановић, под називом: „Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“, док је за ментора поменуте докторске дисертације именован др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

27.03.2017. – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Александре А. Јовановић, под називом: „Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстракта“.

21.09.2017. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/298 о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Александре А. Јовановић, под називом: „Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката“.

Кандидат Александра А. Јовановић, уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2011/2012.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду. За ментора ове докторске дисертације именован је др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Ментор др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, из ове области публиковао је преко двадесет радова у часописима који су на *SCI* листи. Руководио је израдом девет одбрањених докторских дисертација, што говори о компетентности ментора да руководи израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Александра А. Јовановић (рођ. Чанчаревић), магистар фармације, рођена је 21.01.1987. у Београду, Република Србија. Основне академске студије на Фармацеутском факултету у Београду уписала је 2006. где је дипломирала у јулу 2011. са просечном оценом 9,10. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду уписала је 2011. на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством проф. др Бранка Бугарског. Испите предвиђене планом и програмом, као и завршни испит под називом „Оптимизација процеса екстракције из мајчине душице (*Thymus serpyllum*)“ на докторским студијама је положила са просечном оценом 10,00.

Од децембра 2011. запослена је као истраживач приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, ИИИ 46010. Звање истраживач сарадник стекла је у октобру 2015. Такође, као истраживач укључена је у билатерални пројекат са Словенијом, под називом „Липозоми обложени биополимерима као нови системи за доставу природних фенолних компонената“, 2016/2017.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Александре А. Јовановић, магистра фармације, садржи 204 стране (од којих је 188 страна нумерисано), у оквиру којих се налази 7 поглавља, 32 слике, 29 табеле, 219 литературних навода и 3 прилога. Докторска дисертација садржи: Увод, Циљ истраживања, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак, Литературу и Прилоге. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском

језику. По свом облику и садржају, поднети рад задовољава све стандарде за докторску дисертацију Универзитета у Београду.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводу је прво описана биљна врста *Thymus serpyllum* L. (мајчина душица), коришћена у оквиру ове докторске дисертације, кроз приказивање њених ботаничких карактеристика, традиционалну примену и фармаколошки значај. Затим су описани полифеноли, као најзначајни секундарни метаболити поменуте биљне врсте, са посебним акцентом на њихову антиоксидативну, антимикробну и спазмолитичну активност. Потом су детаљно објашњени процеси екстракције и инкапсулације екстракта, уз осврт на факторе који утичу на поменуте процесе, као и методе и материјали које се примењују.

У оквиру Циља истраживања наведени су сви циљеви докторске дисертације: оптимизација процеса екстракције полифенола из хербе мајчине душице, хемијска и биолошка карактеризација екстракта и инкапсулација екстракта у желатинске микрочестице.

Експериментални део је обухватио све материјале и методе коришћене у истраживачком раду: методе екстракције (мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима), методе одређивања садржаја укупних полифенола, флавоноида, шећера и пептида, методу течне хроматографије-масене спектроскопије (*LC/DAD/MS*) и течне хроматографије високих перформанси (*HPLC/DAD*), методе испитивања антиоксидативне активности (*ABTS*, *DPPH* и тест инхибиције оксидативне деградације β -каротена), антимикробне активности на *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* и *Candida albicans* (микродилуциони тест) и спазмолитичне активности (тест на изолованом илеуму пацова), методе инкапсулације (лиофилизација и спреј сушење), методу инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (*FTIR*), методу одређивања расподеле величина честица и зета потенцијала, скенирајућу електронску микроскопију (*SEM*), методе одређивања насипне густине и растворљивости екстракта и инкапсулата, диференцијалну скенирајућу калориметрију (*DSC*), испитивање кинетике отпуштања полифенола у Францовој дифузионој ћелији и статистичку анализу.

У поглављу Резултати и дискусија, прво су приказани резултати оптимизације процеса екстракције полифенола из хербе мајчине душице. Анализом резултата утврђено је да се највећи принос полифенола у екстрактима добијеним мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучном сондом постиже применом степена уситњености биљног материјала од 0,3 mm, односа дрога:растварач 1:30 и 50% етанола. У екстрактима добијеним у ултразвучном купатилу највећи принос полифенола је остварен применом величине честица 0,3 mm, односа дрога:растварач 1:30 и времена екстракције од 30 минута. Екстракти добијени у микроталасном реактору имали су највећи принос полифенола применом односа дрога:растварач 1:23 и 48% етанола након 87 секунди. Принос укупних полифенола применом различитих метода екстракције пратио је следећи тренд: микроталаси > ултразвучна сонда > повишена температура > ултразвучно купатило > мацерација. Употребом *LC/DAD/MS* методе у одабраном екстракту врсте *T. serpyllum* идентификовано је девет полифенолних компонената, класификованих у две групе: деривати кафене киселине (хлорогенска, кафена, розмаринска и салвианолна киселина К и I) и флавоноиди (6,8-ди-С-глукозилапигенин, 6-хидроксилутеолин 7-О-глукозид, лутеолин 7-О-глукуронид и апигенин-глукуронид). *HPLC/DAD* метода је показала да у одабраним течним екстрактима мајчине душице као најдоминантнија фенолкарбоксилна киселина била је розмаринска киселина, праћена салвианолном киселином К и I. Са аспекта концентрације флавоноида у течним екстрактима, највећи садржај су имали деривати лутеолина (лутеолин 7-О-глукуронид и 6-

хидроксилутеолин 7-О-глукозид), праћени апигенин-глукуронидом. Највећи садржај 6-хидроксилутеолин 7-О-глукозида, лутеолин 7-О-глукуронида, кафене, салвианолне киселине К, розмаринске и салвианолне киселине I, одређен је у течном екстракту добијеном ултразвучном сондом. У одабраним лиофилизованим екстрактима мајчине душице компонента са највећим садржајем била је розмаринска киселина, праћена лутеолин 7-О-глукуронидом. Леофилизован екстракт добијен мацерацијом имао је највећи садржај 6-хидроксилутеолин 7-О-глукозида, лутеолин 7-О-глукуронида, кафене, розмаринске и салвианолне киселине (К и I). Способност екстраката *T. serpyllum* добијених различитим методама екстракције, да неутралишу слободни ABTS радикал, следи тренд: микроталаси >> мацерација, повишена температура и ултразвучни таласи. При неутрализацији DPPH радикала тренд је био следећи: микроталаси >> ултразвучни таласи > мацерација и повишена температура. Додатно, највећу ефикасност у супресији оксидативне деградације β-каротена показао је екстракт добијен микроталасима > мацерација и ултразвучна сонда > повишена температура и ултразвучно купатило. Одабрани лиофилизовани екстракти мајчине душице су показали антибактеријску активност против свих испитаних бактеријских сојева (*B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* и *Y. enterocolitica*). Са аспекта антимикотичног ефекта, екстракти су инхибирали раст соја *C. albicans* у релативно високој концентрацији, док ниједан екстракт није показао фунгицидно дејство у испитаним концентрацијама. Сви испитани лиофилизовани екстракти мајчине душице показали су значајну спазмолитичну активност на изолованом илеуму пацова, на дозно-зависан начин, у моделу спонтаних контракција и контракција изазваних ацетилхолином и калијум хлоридом. Најбољи спазмолитични ефекат у сва три експериментална модела показао је екстракт добијен мацерацијом. Поменути екстракт остварио је и редукацију контракција индукованих баријум хлоридом и калцијум хлоридом, тако да се може извести закључак да екстракт мајчине душице остварује спазмолитично дејство блокадом Ca^{2+} канала и спречавањем уласка Ca^{2+} јона у глатку мишићну ћелију. У свим испитаним методама екстракције процес лиофилизације је дао статистички значајно већи принос желатинских инкапсулата, у поређењу са спреј сушењем. Ипак, на зидовима циклона уређаја за спреј сушење примећено је мање задржавање желатинских инкапсулата, у поређењу са чистим екстрактима. Код инкапсулираних екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и у ултразвучном купатилу, процес лиофилизације је очувао већи проценат полифенола него метода спреј сушења. Леофилизовани инкапсулати су поседовали већи садржај флавоноида у поређењу са спреј осушеним паралелама. Највећи садржај укупних шећера је забележен у екстракту добијеном микроталасима, у обе методе сушења, с тим што је проценат био значајно виши након спреј сушења у односу на лиофилизацију. Поменути екстракт имао је статистички значајно већи принос пептида, након обе технике сушења, с тим што је проценат био виши након лиофилизације. Траке FTIR спектра лиофилизованих и спреј осушених екстраката указују на присуство угљених хидрата, полисахарида, полифенола, флавоноида, монотерпена и карбоксилата. FTIR спектри желатинских инкапсулата показали су готово искључиво траке које потичу од желатина, што указује на ефикасно обавијање активних компонената екстраката и самим тим њихову бољу заштиту. Приликом неутрализације ABTS радикала, лиофилизовани инкапсулати екстраката добијених мацерацијом, повишеном температуром и ултразвучном сондом поседовали су већи антиоксидативни капацитет у односу на спреј осушене паралеле. Према резултатима добијеним у DPPH тесту, инкапсулација у желатин је довела до тога да не постоји статистички значајна разлика између антиоксидативног капацитета инкапсулираних екстраката осушених различитим техникама. Величина честица спреј осушених желатинских инкапсулата екстраката била је далеко мања и униформност значајно већа него код лиофилизованих паралела. У случају свих инкапсулираних екстраката апсолутна вредност зета потенцијала је била статистички значајно већа након лиофилизације него након спреј сушења, што указује на бољу стабилност лиофилизованих узорака. Процес лиофилизације је дао честице неправилног облика, док је спреј сушење формирало честице сферичног и псеудо-сферичног облика, са

неравном површином. Насипна густина спреј осушених инкапсулата екстраката била је статистички значајно већа у односу на насипну густину њихових лиофилизованих паралела, док је растворљивост била значајно мања. DSC анализа је показала да се код лиофилизованих желатинских инкапсулата ендотермни пикови налазе на вишим температурама, посебно код екстракта добијеног повишеном температуром, те се може закључити да су поменути узорци термички стабилнији у односу на спреј осушене. У свим узорцима након процеса спреј сушења вредности промене енталпије биле су веће него након лиофилизације, што указује на присуство стабилизирајућих интеракција између инкапсулираних компонената и носача, тј. желатина. Приликом праћења кинетике отпуштања полифенола на собној температури, код лиофилизованог желатинског инкапсулата забележен је већи отпор преносу масе и последично мање ослобађање полифенола, док је при температури од 37°C отпор био већи код спреј осушеног инкапсулата, уз ослобађање мање количине полифенола у односу на лиофилизовану паралелу.

У поглављу Закључак таксативно су наведени најважнији закључци изведени из испитивања изложених у претходним поглављима.

Након тога, у поглављу Литература наведене су све референце коришћене током израде и писања докторске дисертације.

Затим у поглављу Прилози достављен је извод из списка биљака безбедних за људску употребу (*Food and Drug Administration*), графички приказ садржаја укупних полифенола мајчине душице екстрахованих различитим растварачима (30, 50, 70 и 96% етанол и вода) и хроматограми одабраних течних екстраката мајчине душице.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Докторска дисертација кандидата Александре А. Јовановић, магистра фармације, за предмет има савремену тему истраживања која се односи на оптимизацију процеса екстракције полифенола из хербе мајчине душице, хемијску карактеризацију и биолошке активности екстраката, као и њихову инкапсулацију у желатин. Биљке синтетишу и складиште велики број различитих биохемијских производа, попут протеина, шећера, витамина, влакана, етарских уља и полифенолних једињења који данас налазе широку примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији, због чега се биљке називају „хемијским златним рудницима“. Будући да је већину поменутих метаболита биљака веома скупо или чак немогуће синтетисати у лабораторији, најбоља опција за њихово издвајање и концентрисање јесте екстракција из природних извора. Оптимизација процеса екстракције представља први корак у добијању максималног приноса активних принципа из биљних извора, као безбедне и природне алтернативе синтетским компонентама. Фактори који значајно утичу на принос екстрахованих полифенола јесу карактеристике биљног материјала (услови узгајања, период сакупљања, део биљке, степен уситњености биљне дроге), однос дрога:растварач, врста растварача, време екстракције, температура, притисак, рН, као и изабрана метода екстракције. Будући да се полифенолне компоненте разликују по својој структури, није могуће установити стандардизовану процедуру која ће омогућити екстракцију већине полифенола из сваког биљног извора. Зато оптимизација процеса екстракције представља есенцијални корак у изоловању полифенолних једињења, због њихове структурне и физичко-хемијске разноврсности у различитим природним изворима. У овој докторској дисертацији коришћене су традиционалне (мацерација и екстракција на повишеној температури) и савремене методе екстракције полифенола из хербе мајчине душице (екстракција ултразвучним таласима и микроталасима). Микроталасна екстракција, као иновативна метода екстракције, дала је највећи принос како полифенола и флавоноида,

тако и шећера и пептида, статистички значајно виши него код осталих испитаних техника екстракције. Такође, варирани су фактори од интереса како би се испитао њихов утицај на садржај полифенола у екстрактима (степен уситњености, однос дрога:растварач, врста растварача и време екстракције). Додатно, у циљу добијања комбинације фактора који ће дати највећи принос екстракције коришћене су статистичке алатке анализа варијансе (*one-way ANOVA*) и експериментални дизајн (*full factorial design* и *central composite design*). Важно је напоменути да су применом експерименталног дизајна испитане интеракције између фактора, са циљем да се постигне најефикаснија оптимизација процеса екстракције и последично повећање садржаја полифенола у екстрактима. Полифеноли, као велика група секундарних метаболита биљака, испољавају антиоксидативни, антимикуробни, антихипертензивни, антиаритмијски, вазодилататорни, кардиопротективни, спазмолитични, антиинфламаторни, антиканцерогени, антиалергијски и анксиолитични ефекат. Стога у докторској дисертацији испитан је антиоксидативни и антимикуробни капацитет екстракта мајчине душице, као и спазмолитична активност на моделу изолованог илеума пацова. С обзиром на то да полифенолне компоненте могу да утичу на слободне радикале, као и на раст и метаболизам микроорганизама, у зависности од своје структуре и концентрације, применом *LC/DAD/MS* и *HPLC/DAD* метода урађена је хемијска карактеризација добијених екстракта мајчине душице. Нестабилност полифенола у току процеса производње, дистрибуције и чувања намирница, као и у условима гастроинтестиналног тракта (различит рН, ензими, присуство других нутријената), ограничава њихову активност и потенцијалне корисне ефекте на здравље људи. Поред тога, полифеноли су веома осетљиви на факторе спољашње средине попут температуре, кисеоника и светлости. Инкапсулацијом полифенола долази се до превазилажења поменутих недостатака, ублажавања горког укуса полифенола и побољшања њихове биорасположивости и полувремена елиминације. Наиме, технике инкапсулације полифенола подразумевају спреј сушење, инкапсулацију у липозоме, наноинкапсулацију, лиофилизацију, емулзификацију, коацервацију, ко-кристализацију, инклузионо комплексирање, екструзију, као и многе друге методе. Леофилизација представља савремену методу сушења у вакууму, при веома ниским температурама, обезбеђујући очување термолабилних једињења присутних у почетној сировини, док низак садржај влаге у крајњем производу гарантује микробиолошку стабилност и трајно конзервирање производа. Спреј сушење представља технику превођења течног узорка у суви прах, која може бити примењена на широк спектар материјала, како у прехранбеној, тако и у фармацеутској индустрији, за добијање лековитих сировина, ексципијенаса или микрокапула. Протеини захваљујући свом амфифилном карактеру, физичко-хемијским и функционалним карактеристикама представљају добар избор материјала приликом микроинкапсулације спреј сушењем. Поред тога, протеини интерагују са полифенолним компонентама преко водоничних веза и хидрофобних интеракција. Желатин, као протеин растворан у води, има способност да формира зид микрочестице током спреј сушења. Додатно, у поређењу са малтодекстрином, малтозом и манитолом, желатин поседује боље карактеристике везане за ефикасну инкапсулацију жељене компоненте, захваљујући високом нивоу емулзификације, високој стабилности и тенденцији стварања густе мреже након спреј сушења. Из тих разлога, у овој докторској дисертацији су испитани утицаји различитих техника сушења на екстракте мајчине душице и на њихову инкапсулацију у желатин. Резултати докторске дисертације дају увид научној јавности и индустријском сектору о потенцијалу екстракта мајчине душице као антиоксидативних, антимикуробних и спазмолитичних агенаса, са идејом шире примене сувих екстракта мајчине душице и њихових желатинских инкапулата, који могу да допринесу квалитету и нутритивној вредности већ постојећих производа, уз замену синтетских адитива који се сматрају токсичним и канцерогеним. На основу опсежног прегледа литературе, може се закључити да се истраживања у оквиру ове докторске дисертације уклапају у светске трендове и указују на значај и актуелност проучавање проблематике.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације Александре А. Јовановић, магистра фармације, цитирано је 219 литературних навода који су омогућили да се прикаже стање у испитиваној области, као и актуелност проблематике. Савремена истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су омогућили добар увид у потенцијалну примену инкапсулираних полифенола како у прехранбеној, тако и у фармацеутској индустрији. На основу пажљиве анализе резултата приказаних у научној литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из наведене литературе која је коришћена у истраживању, уочава се изузетно велико познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове докторске дисертације су добијени одговарајућим експериментима, применом савремених аналитичких инструменталних метода, према оригиналним или модификованим процедурама из литературе. Полифенолни екстракти мајчине душице добијени су применом пет техника екстракције: мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима. Садржај полифенола, флавоноида, шећера и пептида у добијеним екстрактима одређен је индиректним спектрофотометријским методама. Хемијска карактеризација одабраних екстраката урађена је применом *LC/DAD/MS* и *HPLC/DAD* метода, док је антиоксидативна активност испитана у *ABTS*, *DPPH* и тесту инхибиције оксидативне деградације β -каротена. Антимикробна активност на седам бактеријских и једном гљивичном соју испитана је применом микродилуционог теста, а спазмолитична активност на пет експерименталних модела контракција изолованог илеума пацова. Добијање сувих екстраката мајчине душице и инкапсулација екстраката у желатин извршена је применом метода лиофилизације и спреј сушења. Карактеризација добијених сувих екстраката и желатинских инкапсулата екстраката извршена је кроз одређивање садржаја укупних полифенола, флавоноида, шећера и пептида, затим применом следећих метода: *FTIR* (хемијске карактеристике), дифракције ласерске светлости (расподела величина честица и зета потенцијал), *SEM* (морфолошке карактеристике), фармакопејске процедуре за одређивање насипне густине и растворљивости и *DSC* (термичке карактеристике). Испитивање кинетике отпуштања полифенола из сувих екстраката и желатинских инкапсулата екстраката урађено је у стандардној Францовој дифузионој ћелији уз одређивање коефицијената дифузије и отпора преносу масе полифенола. Статистичка обрада свих података урађена је применом статистичког софтвера *STATISTICA 7.0*.

3.4. Примењивост остварених резултата

Оптимизацијом процеса екстракције хербе мајчине душице добијене су комбинације фактора које у различитим техникама екстракције дају екстракте са највећим садржајем полифенола. Приказане процедуре се могу применити у индустријским условима за добијање већих количина екстраката богатих полифенолима. Испитивањем биолошких ефеката екстраката утврђена је антиоксидативна, антибактеријска и спазмолитична активност, што отвара пут екстрактима мајчине душице у прехранбену, фармацеутску и козметичку индустрију, у циљу замене синтетских агенаса. Инкапсулацијом екстраката у желатин остварена је боља стабилност полифенолних компонената, као и њихово модификовано (продужено) ослобађање. Инкапсулати полифенолних екстраката мајчине душице описани у

овој докторској дисертацији имају велики потенцијал примене у функционалним прехранбеним и фармацеутским производима.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спровodeћи иновативна истраживања током израде докторске дисертације, кандидат Александра А. Јовановић, магистар фармације, показала је изузетну стручност у реализацији експеримената кроз модификацију и оптимизацију примењених процедура и метода, као и кроз анализу и начин представљања резултата. Током својих истраживања, спроведених врло одговорно и зрело, испољила је како самосталност у раду, систематичност и креативност, тако и критичност. Током докторских студија, Александра А. Јовановић се истицала способношћу да на прави начин представи и у потпуности објасни све аспекте бројних експерименталних резултата. На основу бројних постигнутих резултата и изузетног залагања, те доприноса развоју науке, Комисија је мишљења да кандидат Александра А. Јовановић поседује све неопходне квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове докторске дисертације се огледају у:

- Ј разумевању механизма различитих процеса екстракције: мацерација, екстракција на повишеној температури, у ултразвучном купатилу, ултразвучном сондом и микроталасима
- Ј дефинисању комбинације процесних параметара у различитим методама екстракције, којима се добијају екстракти мајчине душице са највећим садржајем полифенола
- Ј оптимизацији фактора од интереса у микроталасној екстракцији, која је дала екстракте са највећим приносом полифенола, флавоноида, шећера и пептида, као и највећим антиоксидативним капацитетом, у односу на остале испитане методе екстракције
- Ј хемијској карактеризацији добијених екстраката мајчине душице
- Ј испитивању и потврди антиоксидативне, антимикробне и спазмолитичне активности екстраката мајчине душице, уз разумевање механизма спазмолитичног ефекта на моделу изолованог илеума пацова
- Ј испитивању утицаја дехидратације у току процеса лиофилизације на хемијску структуру полифенола, шећера и пептида
- Ј испитивању утицаја термичког третмана приликом спреј сушења на хемијску структуру полифенола, шећера и пептида
- Ј указивању на предности лиофилизације као методе инкапсулације, у односу на спреј сушење
- Ј доприносу у конципирању и карактеризацији желатинских инкапсулата екстраката мајчине душице, који су погодни за примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији
- Ј потврди да се инкапсулацијом екстраката у желатин постиже повећање стабилности полифенолних компонената и њихово модификовано (продужено) ослобађање кроз матрицу желатина
- Ј дефинисању коефицијената дифузије полифенола кроз желатинске микрокапсуле и дефинисању отпора који даје желатинска честица, са циљем дефинисања кинетике отпуштања полифенола из овог система

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања везана за оптимизацију процеса екстракције хербе мајчине душице, у оквиру ове докторске дисертације, показала су да се највећи принос полифенола у екстрактима добијеним мацерацијом, екстракцијом на повишеној температури и ултразвучном сондом постиже применом степена уситњености 0,3 mm, односа дрога:растварач 1:30 и 50% етанола. Екстракти добијени у ултразвучном купатилу имали су највећи принос полифенола применом величине честица 0,3 mm, односа дрога:растварач 1:30 и времена екстракције од 30 минута. Екстракти добијени микроталасном екстракцијом показали су највећи садржај полифенола применом односа дрога:растварач 1:23 и 48% етанола након 87 секунди. Екстракти из микроталасног реактора поседовали су највећу количину полифенола, флавоноида, шећера и пептида, у односу на екстракте добијене у осталим испитаним техникама екстракције. Ова докторска дисертација представља свеобухватну студију о утицају различитих процесних параметара и метода екстракције на принос полифенолних једињења мајчине душице, уз испитивање интеракција између фактора, са циљем да се постигне најефикаснија оптимизација процеса екстракције и последично повећање садржаја полифенола у екстрактима.

Хемијска карактеризација екстракта показала је присуство девет полифенолних компонената: хлорогенска, кафена, розмаринска и салвианолна киселина К и I, 6,8-ди-С-глукозилапигенин, 6-хидроксилутеолин 7-О-глукозид, лутеолин 7-О-глукуронид и апигенин-глукуронид, који представљају једињења са значајном антиоксидативном, антимикуробном и спазмолитичном активношћу. Применом три различита антиоксидативна теста, микродилуционим тестом на седам бактеријских и једном гљивичном соју и тестовима на изолованом илеуму пацова, потврђене су поменуте биолошке активности, уз разумевање механизма спазмолитичне активности. Екстракт добијен микроталасима показао је највећи антиоксидативни капацитет и најбољу антимикуробну активност против *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*, као и највећу бактерицидну активност против *S. enteritidis*. Екстракт добијен мацерацијом остварио је највећи антибактеријски ефекат против *B. cereus* и бактерицидни ефекат против *S. aureus*, као и најбољу спазмолитичну активност на моделу изолованог илеума пацова.

FTIR спектри желатинских инкапсулата екстракта показали су готово искључиво траке које потичу од желатина, што указује на ефикасно обавијање активних компонената екстракта и самим тим њихову бољу заштиту. Величина честица спреј осушених инкапсулата је била далеко мања и униформност значајно већа него код лиофилизованих паралела. У случају свих инкапсулираних екстракта апсолутна вредност зета потенцијала је била статистички значајно већа након лиофилизације него након спреј сушења, што указује на бољу стабилност лиофилизованих узорака. Процес лиофилизације је дао честице неправилног облика, док је спреј сушење формирало честице сферичног и псеудо-сферичног облика, са неравном површином. Зато је насипна густина спреј осушених инкапсулата била статистички значајно већа у односу на насипну густину њихових лиофилизованих паралела, док је растворљивост била значајно мања. DSC анализа је показала да се код лиофилизованих желатинских инкапсулата ендотермни пикови налазе на вишим температурама, те се може закључити да су поменути узорци термички стабилнији у односу на спреј осушене. У свим узорцима након процеса спреј сушења вредности промене енталпије биле су веће него након лиофилизације, што указује на присуство стабилизирајућих интеракција између инкапсулираних компонената и носача, тј. желатина. Резултати кинетике отпуштања указују да је дифузија полифенола из желатинских микрокапсула спорија, односно код спреј осушеног инкапсулата желатин је узроковао повећање отпора за 69-94%, док је код лиофилизованог инкапсулата повећање отпора дифузији било скоро 3 пута, у односу на чист екстракт. На основу добијених резултата може се закључити да желатинске микрокапсуле обезбеђују контролисано и продужено отпуштање полифенола мајчине душице. Приликом праћења кинетике отпуштања полифенола у Францовој дифузионој ћелији, на собној

температури, код лиофилизованог инкапсулата забележен је већи отпор преносу масе и последично мање ослобађање полифенола, док је при температури од 37°C отпор био већи код спреј осушеног инкапсулата, уз ослобађање мање количине полифенола у односу на лиофилизовану паралелу. Карактеризацијом лиофилованих и спреј осушених екстраката мајчине душице и њихових желатинских инкапсулата, утврђено је да процес лиофилизације има неколико предности у односу на спреј сушење: већи принос сувог производа, већи проценат очуваних полифенолних компонената, посебно флавоноида, виша апсолутна вредност зета потенцијала, боља термичка стабилност и дуже ослобађање полифенола из инкапсулата на собној температури. Са друге стране, спреј сушењем настају мале, униформне честице, бољих морфолошких карактеристика и веће насипне густине, уз појаву стабилизирајућих интеракција између желатина као носача и инкапсулираних компонената.

Досадашња истраживања и добијени резултати отворили су врата новим експериментима, попут испитивања утицаја екстраката мајчине душице на активност ензима и туморске ћелије, као и развијања нових система са контролисаним отпуштањем полифенола мајчине душице попут липозома и сложених липозоми-алгинат система.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Александра А. Јовановић, магистар фармације, резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила је објављивањем радова у часописима међународног и националног значаја, као и саопштавањем радова на међународним скуповима. Резултате свог досадашњег научноистраживачког рада у оквиру докторске дисертације објавила је у укупно 9 публикација, од тога два (2) рада у часописима међународног значаја од којих један (1) рад публикован у врхунском међународном часопису (M21) и један (1) рад публикован у међународном часопису (M23); један (1) рад у часопису националног значаја (M52); четири (4) саопштења са међународних скупова штампаних у целини (M33) и два (2) саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34).

Списак радова који су резултат истраживања у оквиру докторске дисертације

Категорија M21

1. **Александра Јовановић**, Верица Ђорђевић, Гордана Здункић, Дејан Пљевљакушић, Катарина Шавикин, Дејан Гођевац, Бранко Бугарски (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques, *Separation and Purification Technology*, 179, 369-380, Elsevier (IF=3,299, ISSN: 1383-5866)

Категорија M23

1. **Александра Јовановић**, Верица Ђорђевић, Гордана Здункић, Катарина Шавикин, Дејан Пљевљакушић, Бранко Бугарски (2016) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity, *Хемијска индустрија*, 70 (4), 391-398, Савез хемијских инжењера (IF=0,437, ISSN: 0367-598X)

Категорија M52

1. **Александра Чанчаревић (Јовановић)**, Бранко Бугарски, Катарина Шавикин, Гордана Здункић (2013) Biological activity and ethnomedicinal use of *Thymus vulgaris* and

Категорија М33

1. **Александра Јовановић**, Гордана Здунић, Катарина Шавикин, Нада Ђујић, Катарина Букара, Стева Левић, Бранко Бугарски (2015) Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Thymus serpyllum*, *IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, 444-452, DOI: 10.7251/EEMSR1501444J, 4-6. март 2015. Јахорина, Босна и Херцеговина (ISBN: 978-99955-81-18-3)
2. **Александра Јовановић**, Гордана Здунић, Катарина Шавикин, Радослава Правилковић, Верица Ђорђевић, Бојана Исаиловић, Бранко Бугарски (2015) Effects of solvent and degree of fragmentation on total polyphenols and antioxidant activity of *Thymus serpyllum* extracts, *IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, 453-459, DOI: 10.7251/EEMSR1501453J, 4-6. март 2015. Јахорина, Босна и Херцеговина (ISBN: 978-99955-81-18-3)
3. Бугарски Бранко, Ђорђевић Верица, Трифковић Ката, Костић Ивана, Исаиловић Бојана, Букара Катарина, **Јовановић Александра**, Правилковић Радослава, Недовић Виктор (2015) Trends in encapsulation technologies for delivery of bioactive compounds, *IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, CD proceedings (PL-04-E), 48-50, 4-6. март 2015. Јахорина, Босна и Херцеговина (ISBN: 978-99955-81-18-3)
4. **Александра Јовановић**, Предраг Петровић, Ката Трифковић, Верица Ђорђевић, Стева Левић, Душан Мијин, Бранко Бугарски (2017) Characterisation of lyophilized wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) extracts and their antioxidant activity, *V International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, 1487-1501, DOI: 10.7251/EEMSR15011487J, 15-17. март 2017. Јахорина, Босна и Херцеговина (ISBN: 978-99955-81-21-3)

Категорија М34

1. **Александра Јовановић**, Предраг Петровић, Гордана Здунић, Катарина Шавикин, Бранко Бугарски (2015) Polyphenolic content and antioxidant activity of *Thymus serpyllum* extracts depending on extraction conditions, *THIRD CONGRESS OF SERBIAN SOCIETY FOR MITOCHONDRIAL AND FREE RADICAL PHYSIOLOGY, Redox medicine*, 26, 25.09.-26.09.2015. Београд, Србија (ISBN: 978-86-912893-3-1)
2. **Александра Јовановић**, Верица Ђорђевић, Гордана Здунић, Катарина Шавикин, Ката Трифковић, Јелена Јовановић, Виктор Недовић, Бранко Бугарски (2015) Ultrasound Extraction of Polyphenolic Compounds from *Thymus serpyllum*, *29th EFFoST International Conference, Food Science Research and Innovation: Delivering sustainable solutions to the global economy and society*, 1386, 10-12. новембар 2015. Атина, Грчка (ISBN: 978-618-82196-1-8)

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата **Александре А. Јовановић (рођ. Чанчаревић)**, магистра фармације, под насловом **"Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката"** представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног и домаћег значаја. Предмет и циљеви који су постављени јасно су наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да докторска дисертација под називом **"Оптимизација процеса екстракције хербе *Thymus serpyllum* L., биолошке активности и инкапсулација екстраката"** у потпуности испуњава све захтеване критеријуме, као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати овај Реферат, пружи на увид јавности поднету докторску дисертацију кандидата **Александре А. Јовановић**, магистра фармације, у законом предвиђеном року, као и да Реферат упути Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 6.10.2017.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Бранко Бугарски, Универзитет у
Београду, Технолошко-металуршки факултет

Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, Универзитет
у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Катарина Шавикин, научни саветник,
Институт за проучавање лековитог биља
„Др Јосиф Панчић“, Београд

др Гордана Здунић, виши научни сарадник,
Институт за проучавање лековитог биља
„Др Јосиф Панчић“, Београд

др Верица Ћорђевић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет