

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 24.05.2011. godine određeni smo za članove Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije mr Jasne Z. Ivanović, dipl. inž. tehnologije pod naslovom: „**Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**“.

Posle pregleda doktorske disertacije kandidata mr Jasne Z. Ivanović, Komisija podnosi Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ
o urađenoj doktorskoj disertaciji

1. UVOD

Naslov i obim disertacije

Doktorska disertacija mr Jasne Z. Ivanović, dipl.inž., pod naslovom „**Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**“, napisana na 125 strana, sadrži 36 slike, 54 tabele i 261 literaturnih navoda. Sadržaj teze izražen je kroz uobičajenu strukturu: *Izvod* (na srpskom i engleskom jeziku), *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključak*, *Literatura* i *Prilozi*.

Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- **21.04.2011. godine** - sednica Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta na kojoj je doneta Odluka o odobravanju predloga teme doktorske disertacije mr Jasne Z. Ivanović, dipl. inž., pod nazivom „**Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**“; za mentora ove doktorske disertacije je imenovana dr Irena Žižović, docent.
- **09.05.2011. godine** - sednica Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu, na kojoj je data saglasnost na predlog teme doktorske disertacije mr Jasne Z. Ivanović, pod nazivom **Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**“.
- **24.05.2011. godine** - sednica Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta na kojoj je doneta Odluka o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije mr Jasne Z. Ivanović, pod nazivom „**Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**“.

Mesto disertacije u naučnoj oblasti

Doktorska disertacija pripada naučnoj oblasti hemijsko inženjerstvo za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.

Biografski podaci o kandidatu

Jasna Z. Ivanović rođena je 1981. godine u Aleksincu gde je završila osnovnu i srednju školu. Tehnološko-metalurški fakultet upisala je 2000. godine i diplomirala na smeru Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo; decembra 2005. godine sa prosečnom ocenom 8,95 i ocenom 10 na diplomskom radu sa temom „Ispitivanje kinetike natriklične ekstrakcije etarskog ulja valerijane (*Valeriana officinalis* L.) i kantariona (*Hypericum perforatum* L.)“. Na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu upisala je poslediplomske studije u oblasti „Organska-hemijska tehnologija, reaktorsko inženjerstvo, prerada nafte i gasa, petrohemijska“ 2006. godine i

uspešno položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,88. Magistarsku tezu, pod nazivom „Izolacija antioksidativne frakcije iz ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) i žalfije (*Salvia officinalis* L.) natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom - optimizacija procesa“ odbranila je 2009. godine.

Jasna Z. Ivanović je u periodu 2006.-2010. godine bila angažovana na realizaciji projekta osnovnih istraživanja pod nazivom „Izolovanje, karakterizacija, biološka aktivnost i transformacija prirodnih jedinjenja i sinteza katalizatora primenom natkritičnih fluida, mikrotalasa i ultrazvuka“, koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, u zvanju istraživač-pripravnik (2006.-2009.), odnosno istraživač-saradnik (2009.-2010.), gde je radila na realizaciji više istraživačkih tema iz oblasti ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. U periodu od 2007.-2009. godine Jasna Z. Ivanović je bila angažovana na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije iz programa EUREKA pod nazivom „Funkcionalne komponente biljnog porekla za prehrambenu industriju“, a u periodu 2008.-2010. i na realizaciji projekta tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj tehnologije dobijanja proizvoda za lečenje kožnih infekcija na bazi biljnih ekstrakata“, koji je, takođe, finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Mr Jasna Ivanović je trenutno angažovana na projektima III45017 (2011.-2014.) „Funkcionalni fiziološki aktivni biljni materijali sa dodatkom vrednošću za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji“, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije, na bilateralnom projektu sa Nemačkom (2011.-2012.) „Sistematski predtretman prirodnih materijala u cilju optimalnog otpuštanja aktivnih komponenti tokom procesa natkritične ekstrakcije“ (TMF-Hamburg University of Technology) i na EUREKA projektu E!6240 PLANTCOSMEHEL (2010.-2012.) „Razvoj novih proizvoda na bazi biljnih materijala za poboljšanje zdravlja i kozmetike“ (Development of new products from plant material for health improvement and cosmetics) u saradnji Srbije sa Letonijom.

U februaru 2011. godine, mr Jasna Ivanović je prijavila doktorsku disertaciju sa temom „Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom“ na TMF-u, na Katedri za Organsku hemijsku tehnologiju, pod mentorstvom dr Irene Žižović. Kandidat govori, čita i piše engleski, a služi se nemačkim jezikom.

2. OPIS DISERTACIJE

Struktura i sadržaj disertacije

Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

Doktorska disertacija mr Jasne Z. Ivanović sadrži sedam celina: *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključci*, *Literatura* i *Priloge*, kao i izvode na srpskom i engleskom jeziku.

U *Izvodu* disertacije navedeni su predmet i ciljevi istraživanja, kao i metode koje su bile primenjene. Navedeni su osnovni rezultati istraživanja koji se odnose na analizu i optimizaciju različitih procesa izolacije aktivnih komponenti iz biljnog materijala za primenu u farmaceutskoj i/ili kozmetičkoj industriji, kao i na njihov hemijski sastav i antibakterijsku aktivnost.

U *Uvodu* je istaknut značaj istraživanja u oblasti izolacije prirodnih supstanci sa antibakterijskim dejstvom obzirom da je problem multirezistencije bakterija na antibiotike i pored postojanja preko dve stotine vrsta antibiotika na svetskom tržištu lekova dostigao svoj vrhunac. Dat je kratak osvrt na metode izolacije aktivnih komponenti iz biljnog materijala uz konstataciju da su u pogledu antibakterijske aktivnosti do danas najviše ispitana etarska ulja dobijena postupkom hidroddestilacije. Navedeni su ciljevi doktorske disertacije.

U *Teorijskom delu* su navedena neka od dosadašnjih saznanja o antibakterijskoj aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata iz biljnog materijala. Istaknuta je važnost iznalaženja novih i poboljšanja postojećih metoda za izolaciju antibakterijski aktivnih prirodnih supstanci obzirom da je poslednjih godina problem multirezistencije bakterija na antibiotike dostigao vrhunac aktuelnosti. Opisani su savremeni procesi za izolaciju biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala, sa posebnim osvrtom na proces natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom. Dat je i opis matematičkih modela sa najvećom primenom u simulaciji procesa ekstrakcije, kako natkritičnim fluidima, tako i organskim rastvaračima. U okviru Teorijskog dela date su i osnovne jednačine eksergijske analize neophodne za procenu energetske efikasnosti različitih procesa ekstrakcije. Teorijski deo sadrži i opis metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata.

U *Eksperimentalnom delu* detaljno je opisana metodologija rada. Dat je detaljan opis korišćenih aparatura, instrumenata i postupaka za izolaciju ekstrakata, njihovu hemijsku analizu i analizu antibakterijske aktivnosti. Detaljno su opisani matematički modeli koji se koriste za opisivanje procesa ekstrakcije i procenu koeficijenata prenosa mase i difuzije. Prikazane su i metode određivanja termodinamičkih parametara neophodnih za eksergijsku analizu procesa.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* je podeljeno na devet delova.

U prvom delu su analizirani prinosi ostvareni različitim postupcima izolacije biološki aktivnih komponenti iz odabranog bilja familije Lamiaceae (ruzmarin, žalfija, timijan i origano), lovora, karanfilica, anđelike, divizme, chinacee, nevena, aloe i lišaja *Usnea barbata*.

U drugom delu poglavlja, analizirani su hemijski sastavi ekstrakata i etarskih ulja sa umerenim i jakim antibakterijskim dejstvom. Utvrđeno je da natkritični ekstrakti izolovani iz lišaja *U. barbata*, koji su pokazali najjače antibakterijsko dejstvo na ispitivane sojeve stafilokoka (uključujući meticilin rezistentne sojeve), enterokoka i streptokoka, sadrže znatno veći procenat usninske kiseline (do 60 %) od ekstrakata dobijenih ekstrakcijama sa etanolom (do 4 %). U etarskim uljima i natkritičnim ekstraktima timijana i origana identifikovan je visok sadržaj timola i karvakrola, respektivno, dok je u natkritičnom ekstraktu karanfilića najzastupljenija komponenta bio eugenol.

U trećem delu poglavlja Rezultati i diskusija prikazani su rezultati ispitivanja u uslovima *in vitro* antibakterijske aktivnosti izolovanih etarskih ulja i ekstrakata na sojeve bakterija koje izazivaju zapaljenske infekcije kože i sluzokože i/ili mogu izazvati kvarenje hrane, uključujući i sojeve stafilokoka koje su rezistentne na meticilin (MRSA sojevi), kao i vankomicin rezistentne enterokoke (VRE sojevi). Utvrđeno je da su ekstrakti lišaja *U. barbata*, a pre svega natkritični ekstrakti, pokazali najjače antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve bakterija od svih ostalih ispitanih etarskih ulja i ekstrakata. Dokazano je da je od trinaest ispitanih sojeva, natkritični ekstrakt iz lišaja *U. barbata*, izolovan na 30 MPa i 40°C, imao jače antibakterijsko delovanje od ampicilina na osam sojeva, na tri soja je imao jače dejstvo od eritromicina i na jedan soj je delovao jače od penicilina. Antibakterijsko delovanje pomenutog natkritičnog ekstrakta *U. barbata* je bilo jače i od čiste usninske kiseline na jedanaest od ukupno trinaest ispitanih sojeva, što je potvrdilo sinergijski efekat ostalih komponenti prisutnih u natkritičnom ekstraktu. Pored toga, ovaj natkritični ekstrakt je pokazao izuzetno jaku antibakterijsku aktivnost na dvanaest sojeva meticilin rezistentnih stafilokoka. Pored lišaja *U. Barbata*, utvrđeno je da je i timijan (*Thymus vulgaris*) značajna sirovina za izolaciju etarskih ulja i ekstrakata sa jakim antibakterijskim delovanjem na bakterije koje izazivaju kožne infekcije i/ili kvarenje hrane. Ekstrakti timijana imali su jače antibakterijsko delovanje na ispitivane sojeve bakterija od ekstrakata ruzmarina i žalfije. Umereno do jako antibakterijsko dejstvo su pokazali i izolati origana. Izolati anđelike i divizme pokazali su umereno antibakterijsko dejstvo na ispitivane sojeve.

U četvrtom delu je, na osnovu prenetovanih rezultata ispitivanja antibakterijske aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja, izvršen izbor sirovina i postupaka za dobijanje ekstrakata sa najjačim antibakterijskim dejstvom na izabrane sojeve.

U petom delu poglavlja je analizirana antibakterijska aktivnost smeša najaktivnijih ekstrakata (lišaja, timijana i anđelike). Ustanovljeno je da ne postoji sinergijski efekat u posmatranim smešama, ali da je moguće dodatkom ekstrakta lišaja znatno poboljšati antibakterijsku aktivnost ekstrakata timijana i anđelike.

Šesti deo poglavlja Rezultati i diskusija je posvećen kinetici, optimizaciji i matematičkom modelovanju procesa natkritične ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom. Proces ekstrakcije antibakterijski najaktivnijeg ekstrakta u ovom istraživanju – ekstrakta lišaja *U. barbata*, optimizovan je sa aspekta predtretmana sirovine. Ustanovljeno je da je optimalan predtretman – predtretman natkritičnim fluidom kao varijacija pritiska od 15 MPa do atmosferskog pritiska. Pomenutim predtretmanom ne postiže se samo ušteda natkritičnog fluida, već se ostvaruju i veći prinosi koje nije moguće postići iz sirovine koja je bila podvrgnuta samo mehaničkom predtretmanu (mlevenjem). U skladu sa tim, matematičkim modelovanjem procesa natkritične ekstrakcije iz *U. barbata*, dobijene su veće vrednosti rastvorljivosti u natkritičnom fluidu i koeficijenta prenosa mase u čvrstoj fazi; kao i manji udeo teško dostupne frakcije ekstrakta za slučaj procesa sa predtretmanom natkritičnim fluidom. Pored procesa natkritične ekstrakcije iz *U. barbata*, u ovom delu su prikazani i rezultati analiza kinetike natkritične ekstrakcije iz ruzmarina, žalfije i timijana. Matematički modeli koji su korišćeni u analizi kinetike natkritične ekstrakcije, pre svega model Sovove i model na bazi sekrecionih struktura, dobro opisuju eksperimentalne rezultate sa odstupanjima od eksperimentalnih rezultata reda veličine 10^{-4} - 10^{-3} . Pomenuti modeli su uspešno primenjeni na određivanje parametara kojima se opisuje rastvorljivost ekstrakata i prenos mase u natkritičnom fluidu i čvrstoj fazi.

Sedmi deo poglavlja je posvećen analizi kinetike i matematičkom modelovanju procesa ekstrakcija etanolom. Analizom kinetike etanolnih ekstrakcija iz timijana i matematičkim modelovanjem ovih procesa pokazalo se da primena ultrazvuka pozitivno utiče na brzinu prenosa mase (opisane odgovarajućim koeficijentima difuzije) kako u fazi ispiranja tako i tokom spore ekstrakcije. Kod ekstrakcija iz timijana sa etanolom na poluindustrijskom nivou, pokazalo se da povećanje temperature pozitivno utiče na povećanje brzine prenosa mase u fazi spiranja ekstraktibilnih materija sa površine razorenih biljnih ćelija, pa samim tim i na povećanje ukupnog prinosa ekstrakata. Uporednom analizom koeficijenata difuzije za ekstrakciju u aparaturi po Soksletu na temperaturi od 80,5 °C iz timijana i za ekstrakcije na poluindustrijskom nivou sa mešanjem koje su izvedene na istoj i na nižoj temperaturi (40 °C), može se zaključiti da je mešanje imalo više uticaja na brzinu prenosa mase od povećanja temperature. Pored analize kinetike ekstrakcija etanolom iz timijana, prikazani su rezultati analize kinetike i matematičkog modelovanja ekstrakcije etanolom iz origana i divizme.

Osmi deo poglavlja je posvećen eksergijskoj analizi različitih postupaka ekstrakcije. Utvrđeno je da energetski zahtevi procesa ekstrakcije bioaktivnih substanci iz biljnog materijala zavise kako od primenjene tehnike (metoda ekstrakcije, predtretman biljnog materijala) tako i od vrste biljnog materijala. Dobijene vrednosti korisnog rada i gubitaka eksergije bile su značajno veće za proces natkritične ekstrakcije u poređenju sa ekstrakcijama sa etanolom. Do rasipanja energije kod natkritične ekstrakcije dolazi usled oslobađanja ugljenik(IV)-oksida u atmosferu. Ovaj gubitak se može smanjiti njegovim vraćanjem u proces, što je uobičajna praksa kod procesa natkritičnih ekstrakcija u poluindustrijskim i industrijskim uslovima. U slučaju ekstrakcije sa etanolom, gubitak

eksergije se može smanjiti finijim mlevenjem biljnog materijala ($d_p < 0,200$ mm) ili primenom predtretmana sa natkritičnim fluidom.

Deveti, i poslednji deo poglavlja Rezultati i diskusija, posvećen je simultanoj natkritičnoj ekstrakciji iz odabranih mešavina biljnog materijala. Prikazani rezultati ispitivanja kinetike simultane natkritične ekstrakcije iz biljnih mešavina karanfilić/origano i karanfilić/timijan ukazali su na njene prednosti u odnosu na proces natkritične ekstrakcije iz čistog karanfilca sa aspekta povećanja brzine ekstrakcije. Pokazalo se da prisustvo origana ili timijana u polaznoj smeši biljnog materijala omogućava značajno povećanje (do dva puta) brzine ekstrakcije na početku procesa natkritične ekstrakcije. U isto vreme udeo origana (10 %) ili timijana (16 %) u polaznoj smeši biljnog materijala ima zanemarljiv uticaj na totalni prinos ekstrakata u poređenju sa natkritičnom ekstrakcijom iz čistog karanfilića. Obe biljke (origano i timijan) sadrže jedinjenja koja su najvećim delom rastvorena već u toku postizanja radnih uslova u ekstraktoru. Na osnovu rezultata analize kinetike simultane natkritične ekstrakcije iz datih biljnih mešavina i hemijskih analiza utvrđeno je da se karvakrol i timol ponašaju kao kosolventi koji modifikuju rastvaračku moć natkritičnog ugljenik(IV)-oksida. Ovaj efekat dovodi do povećanja rastvorljivosti težih i manje rastvorljivih jedinjenja prisutnih uglavnom u karanfiliću (eugenol, *trans*-kariofilen i eugenol acetat). Prisustvo origana ili timijana u polaznoj smeši biljnog materijala omogućava postizanje zadovoljavajućih prinosa ekstrakata (i do 90 % od onoga postignutog kod natkritične ekstrakcije iz čistog karanfilića) sa oko 70 % manjom potrošnjom natkritičnog fluida, što može biti od značaja za industrijsku proizvodnju.

Na osnovu prikazanih rezultata izvedeni su *Zaključci* u kojima su koncizno izneti postignuti rezultati, a koji su u skladu sa postavljenim ciljevima disertacije.

Na kraju rada su dati spisak korišćene literature i prilogi.

3. OCENA DISERTACIJE

Savremenost, originalnost i značaj

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji pružaju nova saznanja o postupcima za dobijanje biljnih ekstrakata sa jakim i umerenim antibakterijskim dejstvom. Rezultati istraživanja takode su doprineli identifikaciji novih, do sada neistraženih ili nedovoljno istraženih ekstrakata iz biljnog materijala sa antibakterijskom aktivnošću. Obzirom da je poslednjih godina, problem multirezistencije bakterija na antibiotike i pored postojanja preko dve stotine vrsta antibiotika na svetskom tržištu lekova, dostigao vrhunac aktuelnosti, istraživanja u pravcu izolacije prirodnih supstanci sa snažnim antibakterijskim dejstvom su savremena i značajna.

Ovom disertacijom je pokazano da su lišaj *Usnea barbata* i timijan (koji nisu do sada proučavani u dovoljnoj meri) značajne sirovine za dobijanje ekstrakta sa jakim antibakterijskim dejstvom. Pokazano je da na osnovu dobijenih vrednosti MIC natkritični ekstrakt *U. barbata* na određene sojeve bakterija jače deluje od ampicilina, eritromicina i penicilina. Pri tome je dokazan sinergistički efekat ostalih komponenti prisutnih u natkritičnom ekstraktu, što je nova činjenica jer je do sada antibakterijski efekat ekstrakata iz raznih vrsta lišajeva pripisivan isključivo usninskoj kiselini, te se ona u čistom stanju dodavala u preparate farmaceutske industrije. U okviru disertacije je izvršena optimizacija procesa dobijanja natkritičnog ekstrakta *U. barbata* koja je omogućila smanjenje potrošnje natkritičnog fluida i postizanje većih prinosa.

Procesi dobijanja ekstrakata iz timijana sa snažnim antibakterijskim dejstvom su detaljno analizirani, i prvi put su kroz ovu disertaciju objavljeni podaci o koeficijentima difuzije u pomenutim procesima.

U okviru ove disertacije, prvi put je analiziran proces simultane natkritične ekstrakcije iz biljnih mešavina karanfilić/origano i karanfilić/timijan. Postignuti rezultati pokazuju da je moguće optimizovati proces natkritične ekstrakcije iz karanfilića sa aspekta uštede natkritičnog fluida dodatkom origana, odnosno timijana polaznoj smeši, a bez negativnog dejstva na prinos i hemijski sastav proizvoda.

Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U naučnoj literaturi danas se može naći dosta podataka o antibakterijskoj aktivnosti etarskih ulja izolovanih hidrodestilacijom iz gore navedenih biljnih vrsta [Food Control 21 (2010) 1199-1218; Int. J. Food Microbiol. 94 (2004) 223-253]. S druge strane, postoji malo podataka o antibakterijskoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata [Ciência e Tecnologia de Alimentos 28 (2008) 463-469; Comptes Rendus Chimie 7 (2004) 629-633; LWT-Food Science and Technology, 42 (2009) 220-227] ili njihovih čistih komponenti [Phytomed. 14 (2007) 508-516]. Rezultati ovih studija pokazali su da natkritični ekstrakti ruzmarina, origana, lovora i žalfije deluju na Gram-pozitivne bakterije i neke vrste gljivica. U literaturi gotovo ima malo podataka o antibakterijskom dejstvu ekstrakata izolovanih iz lišaja *U. barbata* (Weckesser i sar. [Phytomed. 14 (2007) 508-516]). U pomenutom radu, autori su naveli jako dejstvo komercijalnog natkritičnog ekstrakta lišaja *U. barbata* koji je sadržao 4 % usninske kiseline, kao i natkritičnih ekstrakata ruzmarina i žalfije na široki spektar sojeva bakterija i gljivica koje izazivaju kožne infekcije.

U stručnoj literaturi postoji izuzetno malo podataka o antibakterijskoj aktivnosti mešavina ekstrakata [Meat Sci. 81 (2009) 686-692] ili mešavina etarskih ulja [United States Patent Application, 20090285886, 2009] i

antibakterijskoj aktivnosti mešavina natkritičnih ekstrakata i/ili ekstrakata dobijenih različitim postupcima sa etarskim uljima [Vet. Glasnik 64 (2010) 65-74]. U literaturi nema podataka o simultanoj natkritičnoj ekstrakciji iz biljnih mešavina i samim tim ni o njihovoj antibakterijskoj aktivnosti.

Analiza primenjenih naučnih metoda i njihova adekvatnost za sprovedeno istraživanje

Naučne metode korišćene u istraživanju i opisane u ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su za izolaciju ekstrakata iz biljnog materijala, analizu kinetike ekstrakcija, kao i ispitivanje hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti izolovanih ekstrakata.

U cilju ispitivanja kinetike i mogućnosti optimizacije procesa izolacije ekstrakata sa antibakterijskom aktivnošću izveden je niz ekstrakcija sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom na laboratorijskom postrojenju Autoclave Engineers SCE Screening System; ekstrakcije sa etanolom i smešom etanol/voda izvedene su u aparaturi po Soksletu, dok je za ultrazvučne ekstrakcije korišćeno ultrazvučno kupatilo Bandelin Sonorex RK 52. Za dobijanje etarskih ulja pomoću hidrodestilacije korišćena je aparatura po Klevendžeru.

Za modelovanje procesa natkritične ekstrakcije korišćeni su odgovarajući matematički modeli zasnovani na diferencijalnom bilansu mase, kao i model zasnovan na analogiji sa prenosom toplote. Modeli zasnovani na Drugom Fikovanom zakonu korišćeni su za određivanje koeficijenta difuzije u čvrstoj fazi za procese ekstrakcija sa etanolom. Za rešavanje jednačina navedenih matematičkih modela korišćen je softverski paket Microsoft Fortran PowerStation 4.0.

Antibakterijska aktivnost dobijenih ekstrakata, njihovih mešavina kao i pojedinačnih aktivnih komponenti na sojeve *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Bacillus* vrste i *E.coli* ispitana je *in vitro* primenom makrodilucione ili mikrodilucione metode u bujonu.

Hemijske analize etarskih ulja i natkritičnih ekstrakata u cilju identifikacije i kvantifikacije aktivnih komponenti izvedene su primenom analitičke gasne hromatografije (GC/FID) i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC/MS). Sadržaj usninske kiseline utvrđen je metodom tečne hromatografije (HPLC).

Ocena primenljivosti i verifikacije ostvarenih rezultata

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji pružaju nova saznanja o postupcima izolacije prirodnih antibakterijskih agenasa iz biljnog materijala, pre svega iz lišaja *Usnea barbata* i timijana. Obzirom na povećanu rezistenciju sve većeg broja bakterija na komercijalne antibiotke, zahtevi za primenom prirodnih supstanci kao antibakterijskih agenasa su u porastu.

U radu su prezentovane mogućnosti optimizacije procesa natkritične ekstrakcije sa aspekta povećanja brzine i prinosa ekstrakta. Brzina ekstrakcije i povećanje prinosa kod natkritične ekstrakcije iz lišaja *U. Barabata*, koji se pokazao kao značajna sirovina za dobijanje jakih prirodnih antibakterijskih agenasa, mogu se povećati primenom odgovarajućeg predtretmana biljnog materijala natkritičnim fluidom. Takođe, na primeru natkritične ekstrakcije iz karanfilića, pokazano je da se kosolventski efekat i povećanje brzine ekstrakcije, može ostvariti dodatkom drugih biljnih sirovina (origana ili timijana). Ovi rezultati su značajni i mogu imati primenu u procesima natkritične ekstrakcije na industrijskom nivou.

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti izolovanih etarskih ulja i ekstrakata na ispitane sojeve bakterija koje izazivaju kožne infekcije i /ili kvarenje hrane ukazuju na mogućnost njihove primene u farmaceutskoj, ili kao aditiva u prehrambenoj industriji.

Ocena sposobnosti kandidata za samostalan naučni rad

Kandidat je tokom izrade doktorske disertacije pokazao izuzetnu naučno-istraživačku sposobnost za samostalni naučni rad. Sistematičnost u koncipiranju rada, pripremi i vođenju eksperimenata, kao i u analizi rezultata, ukazuju na to da kandidat Jasna Z. Ivanović poseduje sposobnost i kvalitet koji su potrebni za samostalni rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u sledećem:

- identifikacija novih biljnih ekstrakata kao prirodnih antibakterijskih agenasa (antibakterijsko dejstvo biljnih vrsta prethodno nije ispitano ili je ispitano u nedovoljnoj meri) i definisanje postupaka za njihovo dobijanje;

- karakterizacija biljnih ekstrakata i etarskih ulja u pogledu sadržaja aktivnih komponenti i antibakterijskog delovanja na patogene i/ili bakterije koje utiču na kvarenje hrane u cilju njihove dalje primene u formulacijama preparata za lečenje kožnih infekcija i/ili primene u prehrambenoj industriji;
- optimizacija procesa natkritične ekstrakcije sa aspekta uštede natkritičnog fluida i postizanja većih prinosa u cilju dobijanja prirodnih supstanci jakog antibakterijskog dejstva iz biljnog materiala;
- ispitivanje uticaja kosolventskog efekta u prisustvu pojedinih biljnih sirovina (njihovih glavnih komponenti) kod procesa simultane natkritične ekstrakcije u cilju povećanja brzine ekstrakcije i smanjenja potrošnje natkritičnog fluida;
- simulacija procesa ekstrakcije natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom i organskim rastvaračima odgovarajućim matematičkim modelima u cilju kvantifikovanja parametara kojima se opisuje prenos mase u procesu.

Kritička analiza rezultata istraživanja

Ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata izolovanih različitim postupcima ekstrakcije bila su polazna osnova za izbor najboljih sirovina i tehnologija za dobijanje prirodnih antibakterijskih agenasa. Kao najznačajnije sirovine pokazali su se lišaj *U. barbata* i list timijana. Pored njih, i origano i karanfilić su identifikovani kao vredne sirovine za izolaciju antibakterijskih supstanci. Utvrđeno je da je procesom natkritične ekstrakcije moguće izolovati ekstrakte *U. barbata* sa najjačim antibakterijskim delovanjem i najvećim udelom aktivne komponente, usninske kiseline. Ekstrakcijama sa etanolom su, takođe, dobijeni ekstrakti sa jakim antibakterijskom aktivnošću iz timijana. Ekstrakti dobijeni iz karanfilića, origana, timijana i njihovih mešavina su, takođe, pokazali jako antibakterijsko delovanje. Iz tog razloga, u radu je detaljno analizirana kinetika natkritične ekstrakcije iz pomenutih sirovina, kao i kinetika ekstrakcija sa etanolom iz timijana.

Kandidat je definisao optimalan način izvođenja ekstrakcije natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom iz lišaja *U. barbata* u cilju postizanja većeg prinosa, ali nije analizirao eventualan uticaj ovog povećanja na antibakterijsku aktivnost ekstrakta. Takođe, kandidat je dokazao da pomenuti ekstrakt ima jače dejstvo od usninske kiseline na veći broj sojeva, pa bi se dalja istraživanja mogla voditi u pravcu identifikacije i izolacije ostalih aktivnih komponenti prisutnih u ekstraktu. U radu je prikazan veliki broj ispitivanja *in vitro* antibakterijske aktivnosti izolovanih ekstrakata. Dalje smernice za rad bi svakako bila ispitivanja *in vivo* antibakterijskog dejstva, kao i analiza citotoksičnosti ekstrakata u cilju njihove dalje primene u praksi.

Očekivana primena rezultata u praksi

Stručni i praktični doprinos su, na laboratorijskom nivou definisani, postupci izolacije funkcionalnih ekstrakata iz biljnog materijala sa jakim antibakterijskim delovanjem koji bi se dalje primenjivali u formulacijama proizvoda za lečenje zapaljenskih infekcija kože i sluzokože, ili kao prirodni prehrambeni aditivi. U vezi sa tim poželjno je da ekstrakti imaju snažno antibakterijsko dejstvo i na sojeve bakterija rezistentnih na postojeće komercijalne antibiotike, pre svega na sojeve meticilin rezistentnih *Staphylococcus aureus* (MRSA), što jeste slučaj sa natkritičnim ekstraktom lišaja *U. barbata*.

Objavljeni naučni radovi i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije

Deo rezultata ove doktorske disertacije kandidat je prezentovao naučnoj javnosti u zemlji i inostranstvu publikovanjem: jednog rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), dva rada u međunarodnom časopisu (M23), jednog rada u međunarodnom časopisu verifikovanom posebnom odlukom (M24), dva rada u vodećem nacionalnom časopisu (M51) i dva saopštenja na međunarodnom skupu štampana u celini (M33).

Radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu - M21

1. **Jasna Ivanovic**, Irena Zizovic, Mihajlo Ristic, Marko Stamenic, Dejan Skala, [The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction](#), The Journal of Supercritical Fluids, 55 (2011) 983-991. ISSN: 0896-8446 (IF=2,639) Engineering, Chemical 15/128.

Rad u međunarodnom časopisu - M23

1. **J. Ivanovic**, D. Misic, M. Ristic, Olivera Pesic, I. Zizovic, Supercritical CO₂ Extract and Essential Oil of Bay (*Laurus nobilis* L.)-Chemical Composition and Antibacterial Activity, Journal of Serbian Chemical Society, 75 (2010) 395-404. ISSN: 0352-5139 (IF=0,820) Chemistry, Multidisciplinary 87/140
2. Mišić Dušan, Ašanin Ružica, **Ivanović Jasna**, Žižović Irena, Investigation of antibacterial activity of supercritical extracts of plants, as well as of extracts obtained by other

technological processes on some bacteria isolated from animals, Acta Veterinaria, 59 (2009) 557-568. ISSN: 0567-8315 (IF=0,179). Veterinary Sciences 118/142.

Рад у часопису међународног значаја верификованом посебном одлуком - M24

1. **Jasna Ivanović**, Irena Žižović, Slobodan Petrović, Dejan Skala, Analysis of different processes of extraction: yield of extracts obtained from Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) and Sweet bay (*Laurus nobilis* L.) and exergy analysis of applied processes, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly 15 (2009) 271-278. ISSN: 1451-9372.

Рад у водећем националном часопису - M51

1. D. Mišić, I. Žižović, **J. Ivanović**, Antibakterijsko delovanje mešavina ekstrakata usnee, timijana i anđelike dobijenih različitim tehnološkim procesima protiv nekih vrsta bakterija značajnih za veterinarsku medicinu, Veterinarski glasnik 64 (2010) 65-74. ISSN: 0350-2457
2. D. Mišić, J. Nišavić, Irena Žižović, **J. Ivanović**, Antibakterijsko delovanje i citotoksični efekat natkritičnog ekstrakta timijana i ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije, Veterinarski glasnik, 63 (2009) 17-27. ISSN: 0350-2457

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini -M33

1. **Ivanovic J.**, Zizovic I., Stamenic M., Skala D., Supercritical CO₂ extraction of oregano and clove buds-synergistic kinetic effect and chemical composition. The 12th European Meeting on Supercritical Fluids, Graz, Austria, 9-12 May, 2010.P6, Full text on USB
2. D. Misić, **J. Ivanovic**, I. Zizovic. Antibacterial activity of supercritical *Usnea barbata* extract against staphylococci, streptococci and enterococci originated from animals. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 10-13 April 2010. Book of Abstracts: P1246. Citation: Clinical Microbiology and Infection. Volume 16 Supplement No. 2, Page S349.

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Kratak osvrt na disertaciju u celini

Na osnovu svega iznetog Komisija smatra da urađena doktorska disertacija mr Jasne Z. Ivanović, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom „**Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**”, predstavlja originalni naučni i stručni doprinos u oblasti ekstrakcija funkcionalnih biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala za primenu u farmaceutskoj i/ili prehrambenoj industriji. Ovom doktorskom disertacijom kandidat je dao značajan naučni doprinos u oblasti hemijskog inženjerstva, što je potvrđeno objavljivanjem rada u vrhunskom međunarodnom časopisu u oblasti hemijskog inženjerstva, kao i u navedenim časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Komisija smatra da urađena doktorska disertacija kandidata mr mr Jasne Z. Ivanović pod nazivom „**Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom**” u potpunosti ispunjava sve zahtevane kriterijume i da je kandidat ispoljio izuzetnu naučno-istraživačku sposobnost u svim fazama izrade ove disertacije.

Predlog Komisije Nastavno-naučnom veću

Na osnovu kvaliteta, obima i originalnosti dobijenih rezultata kao i njenog naučnog doprinosa, Komisija pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju i predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da ovaj izveštaj prihvati i zajedno sa urađenom doktorskom disertacijom učini dostupnim na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku, a nakon završetka procedure pozove kandidata mr Jasnu Z. Ivanović, na usmenu odbranu disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

U Beogradu 13.06.2011.

ČLANOVI KOMISIJE:

dr **Irena Žižović**, docent
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr **Dejan Skala**, redovan profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr **Dušan Mišić**, docent
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

dr **Slobodan Petrović**, redovan profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr **Vlada Veljković**, redovan profesor
Tehnološki fakultet, Leskovac, Univerzitet u Nišu