

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Наталије Чутовић

Одлуком 35/42 бр. од 14.03.2024. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену докторске дисертације кандидата Наталије Чутовић под насловом

Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче

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

Кандидаткиња Наталија Чутовић уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Хемијско инжењерство, школске 2021/2022.

23.03.2023. – Кандидаткиња Наталија Чутовић предложила је тему докторске дисертације под називом: „Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче“.

11.05.2023. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је Одлука бр. 35/101 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Наталије Чутовић за израду докторске дисертације под називом: „Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче“.

29.06.2023. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је Одлука бр. 35/154 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Наталије Чутовић, под називом: „Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче“, док су за менторе поменуте докторске дисертације именовани проф. др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Александра А. Јовановић, научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП.

10.07.2023. – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Наталије Чутовић, под називом: „Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче“.

14.03.2024. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/42 о именовану Комисије за оцену докторске дисертације Наталије Чутовић, под називом: „Оптимизација екстракције латица *Paeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација у носаче“.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство и ужој научној области Хемијско инжењерство, за које је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Ментори, проф. др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Александра А. Јовановић, научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП су на основу дугогодишњег учешћа у наставно-научном процесу, као и на основу остварених научних и стручних публикација у потпуности компетентни да руководе израдом докторске дисертације кандидата Наталије Чутовић, мастер инжењера технологије и студента докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Наталија М. Чутовић, мастер инжењер технологије, рођена је 26.02.1997. године у Чачку. Основну школу „др Драгиша Мишовић“ завршила је у Чачку, док је средње образовање стекла у Чачку, завршивши природно-математички смер Гимназије у Чачку, у јуну 2016. године.

Дипломирала је у септембру 2020. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, на смеру Органска хемијска технологија, у оквиру студијског програма Хемијско инжењерство, са просечном оценом 9,55. Мастер студије је наставила на истом студијском програму, одбравивши завршни мастер рад у септембру 2021. под руководством проф. др Александра Маринковића, редовног професора Катедре за органску хемију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

Докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијско изборно подручје - хемијско инжењерство уписала је у октобру 2021. године под руководством проф. др Бранка Бугарског и др Александре А. Јовановић. Положила је све испите предвиђене планом и програмом студијског програма и одбранила завршни испит под називом „Биолошке активности екстракта латица *Paeonia tenuifolia* L. и њихова потенцијална примена на кожи“.

У Институту за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, у Одсеку за Пољопривредна истраживања и развој, запослила се у мају 2022. године и исте године је стекла звање истраживач приправник. Одлуком Научног већа Института у новембру 2023. године стекла је звање истраживач сарадник.

Као резултат рада на докторској дисертацији, кандидат је објавио два научна рада у врхунским међународним часописима (M21), један научни рад у националном часопису међународног значаја (M24), као и једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Наталије Чутовић, мастер инжењера технологије, садржи 146 страна (од којих је 133 страна нумерисано), у оквиру којих се налази 5 поглавља, 29 слика, 14 табела и 293 литературна навода. Докторска дисертација садржи: Увод, Циљ истраживања, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу. 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 дат општи преглед рода *Paeonia* L., а потом и врсте *Paeonia tenuifolia* L. (степски божур) чије латице су коришћене у оквиру ове докторске дисертације, кроз приказивање њених ботаничких и орнаменталних карактеристика, као и традиционалне примене и фармаколошког значаја. Затим су описана полифенолна једињења, као најзначајни секундарни метаболити биљака, са посебним акцентом на њихову антиоксидативну, антимикуробну и антибиофилм активност, праћену њиховом способношћу да поспеше зарастање рана, врше супресију адхезије и инвазије бактеријских сојева на имортализованим хуманим кератиноцитима (НаСаТ ћелијама), уз дискусију о њиховој цитотоксичности. Потом су детаљно објашњени процеси екстракције и инкапсулације екстраката, уз осврт на факторе који утичу на поменуте процесе, као и методе и материјали који се примењују.

У оквиру Циља истраживања наведени су сви циљеви докторске дисертације: оптимизација процеса екстракције полифенола из латица степског божура, хемијска и биолошка карактеризација екстраката и инкапсулација екстраката у липозоме, биополимерне филмове и/или у системе липозом-биополимерни филм.

Експериментални део је обухватио све материјале и методе коришћене у истраживачком раду: методе екстракције (мацерација, екстракција ултразвучном сондом и екстракција потпомогнута микроталасима), методе одређивања садржаја укупних полифенола и флавоноида, методе хемијске карактеризације екстраката – хибридна масена спектрометрија (UHPLC-LTQ-Orbitrap MS) и циљна квантитативна анализа активних једињења ултрависоко ефикасном течном хроматографијом (UHPLC/MS), методе испитивања антиоксидативне активности (ABTS, DPPH, CUPRAC и FRAP тестови), антимикуробне активности на *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Proteus vulgaris*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* и *Candida albicans* (микродилуциони и диск дифузиони тестови) и антибиофилм активност, испитивање цитотоксичности узорака и њиховог ефекта на капацитете адхезије и инвазије *Staphylococcus lugdunensis* на НаСаТ ћелијама, *in vitro* испитивање ефекта узорака на зарастање рана, методе инкапсулације (припрема липозома и биополимерних филмова), одређивање степена инкапсулације, методу инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), методу одређивања величине честица, зета потенцијала и индекса полидисперзије липозома, скенирајућу електронску микроскопију (SEM), методе одређивања реолошких својстава липозома (густина, површински напон и вискозитет), испитивање садржаја воде и механичких својстава биополимерних филмова, испитивање кинетике отпуштања полифенола из носача у Францовој дифузионој ћелији и статистичку анализу.

У поглављу Резултати и дискусија, прво су приказани резултати оптимизације процеса екстракције полифенола из латица степског божура. Анализом резултата утврђено је да се највећи принос полифенола у екстрактима добијеним употребом метанола као екстракционог агенса постиже методом екстракције ултразвуком, док је у случају водених екстраката, највећи принос ових једињења био у случају мацерације. Принос укупних полифенола применом различитих метода екстракције пратио је следећи тренд: микроталаси > ултразвучна сонда > мацерација. Употребом UHPLC-LTQ-Orbitrap MS методе у одабраном екстракту латица *P. tenuifolia* идентификоване су 83 компоненте, класификоване у пет група: фенолне киселине (39 једињења), флавоноидни гликозиди и агликони (19 једињења),

антоцијани и антоцијанидини (11 једињења), терпенски деривати (11 једињења), као и остала једињења (овој групи припадају 3 једињења која није могуће сврстати ни у једну другу групу). UHPLC/MS метода која је коришћена у циљу квантификације одређених компонената присутних у екстракту је показала да се у течним екстрактима латица степског божура као најдоминантнија фенолна киселина јавља елагинска киселина, праћена *p*-кумаринском киселином. Са аспекта концентрације флавоноидних гликозида и агликона у течним екстрактима, највиши садржај је имао изорхамнетин. Водени екстракти латица *P. tenuifolia* добијени екстракцијом ултразвучном сондом показали су највећу способност да неутралишу слободне ABTS радикале. При неутрализацији DPPH• радикала најбољу активност су такође показали водени екстракти добијени екстракцијом ултразвуком. Додатно, највећу ефикасност у редукцији јона бакра (II) у тровалентни облик показао је екстракт добијен мацерацијом, уз употребу воде као екстракционог агенса, док је у случају редукције гвожђа (II), најефикаснији био водени екстракт добијен екстракцијом ултразвуком. Екстракти латица степског божура су показали антибактеријску активност против свих испитаних бактеријских сојева (*S. lugdunensis*, *S. aureus* и *P. vulgaris*). Са аспекта антифунгалног ефекта, екстракти су инхибирали раст свих тестираних гљивичних сојева (*C. albicans*, *C. kefyr* и *C. krusei*) у релативно ниској концентрацији, а сви екстракти су показали и фунгицидно дејство у испитаним концентрацијама. Сви екстракти латица степског божура који су подвргнути испитивању у тесту инхибиције формирања бактеријског биофилма *S. lugdunensis* показали су значајну активност на дозно-зависан начин. Због повољног дејства против бактерије *S. lugdunensis*, екстракти латица сакупљених на Гуленовцима су испитани са аспекта њиховог дејства на супресију адхезије и инвазије ове бактерије на површини NaCaT ћелија, при чему су сви екстракти сем метанолног мацерата имали задовољавајуће дејство на супресију адхезије, а сви су инхибирали инвазију патогена у дубље слојеве. С друге стране, екстракти нису показали цитотоксичност према NaCaT ћелијама, чак су неки од њих довели до пролиферација ћелија. Екстракти који су показали позитиван ефекат на пролиферацију ћелија даље су подвргнути испитивању њиховог *in vitro* дејства на зарастање рана на NaCaT ћелијама, при чему је водени мацерат латица из Гуленоваца показао највећу ефикасност. У свим испитаним методама екстракције, латице степског божура сакупљене у Гуленовцима дале су статистички значајно боље резултате у биолошким тестовима, у поређењу са друга два локалитета (Делиблатска пешчара и Панчево). Како су екстракти латица степског божура сакупљеног у Гуленовцима показали најбољи биолошки потенцијал, они су даље инкапсулирани у липозоме, биополимерне филмове и систем липозом-биополимерни филм. Липозоми су преваходно били подвргнути испитивањима степена инкапсулације, стабилности, као и реолошких својстава, а резултати су показали да се липозоми са најпогоднијим својствима добијају употребом Фосфолипона као фосфолипидне смеше. Тестови антиоксидативне, антимицробне и антибиофилм активности су показали да највиши степен активности показују липозоми припремљени употребом Фосфолипона, што је испраћено и резултатима анализа на NaCaT ћелијама, где су исти липозоми дали најбоље резултате. С друге стране, биополимерни филмови и систем липозом-биополимерни филм окарактерисани су са аспекта садржаја воде и механичких својстава, а резултати су показали да најбоље физичке карактеристике поседује филм у који је инкапсулирано 0,4 g екстракта латица степског божура. Анализом морфолошких својстава биополимерних филмова и система липозом-биополимерни филм јасно се могло видети да је инкорпорација липозома, али и чистих екстраката у филмове била ефикасна, при чему није дошло до нарушавања њихове структуре, а уз то су добијени филмови били хомогене структуре. Структурна својства чистог екстракта латица, липозома, биополимерних филмова и система липозом-биополимерни филм анализирана су употребом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом при чему је доказано да је екстракт ефикасно инкапсулиран у сваку врсту носача. Овај закључак је могуће донети на основу смањења интензитета пикова карактеристичних за сам екстракт (губитак пикова на 1203 и 1606 cm⁻¹), што указује на то да су липозоми инкорпорирани у структуру биополимерног матрикса. Приликом праћења

кинетику отпуштања полифенола на температури људске коже (37°C), највећи отпор преносу масе забележен је у случају система липозом-биополимерни филм, док је најмањи отпор уочен код липозома припремљених употребом Phosal 53 МСТ фосфолипидне смеше, што је последично довело до ослобађање веће количине полифенола у односу на остале инкапсулате.

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.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Докторска дисертација кандидата Наталије Чутовић, мастер инжењера технологије, за предмет има савремену тему истраживања која се односи на оптимизацију процеса екстракције полифенола из латица степског божура, хемијску карактеризацију и биолошке активности екстраката, као и њихову инкапсулацију у липозоме и биополимерни филм, а затим у системе липозом-биополимерни филм. Биљке имају способност да синтетишу и складиште велики број различитих биолошки активних производа, као што су протеини, шећери, витамини, влакана, етарска уља и полифенолна једињења који данас налазе широку примену у прехранбеној, козметичкој 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 компоненти из биљних извора, као безбедне и природне алтернативе за синтетске компоненте. Фактори који значајно утичу на принос екстрахованих полифенола јесу карактеристике биљног материјала (услови узгајања, период сакупљања, део биљке), однос дрога:растварач, врста растварача, време екстракције, температура, притисак, а уз то и сама метода екстракције. Будући да се полифенолне компоненте разликују по својој структури, није могуће установити стандардизовану методу која ће допринети екстракцији већине полифенола из сваког биљног извора. Зато оптимизација процеса екстракције представља изузетно важан корак у изоловању полифенолних једињења, због њихове структурне и физичко-хемијске разноврсности. У овој докторској дисертацији коришћене су традиционална (мацерација) и савремене методе екстракције полифенола из латица степског божура (екстракција ултразвучним таласима и микроталасима). Такође, варирани су фактори од интереса како би се испитао њихов утицај на садржај полифенола у екстрактима (локалитет прикупљања биљне сировине, врста растварача). Полифеноли, који представљају велику групу секундарних метаболита биљака, испољавају свој антиоксидативни, антиинфламаторни, антимикуробни, антихипертензивни, вазодилататорни, кардиопротективни, спазмолитични, антиканцерогени, антиалергијски и анксиолитични потенцијал. Због тога је у овој докторској дисертацији испитан антиоксидативни и антимикуробни капацитет екстраката степског божура, цитотоксичност екстраката на НаСаТ ћелије, њихов потенцијал да поспеше зарастање рана, као и способност супресије адхезије и инвазије бактерије *S. lugdunensis* на НаСаТ ћелије. С обзиром на чињеницу да полифенолна једињења могу да утичу на слободне радикале, али и на раст и метаболизам одређених микроорганизама, у зависности од структуре и концентрације, применом UHPLC-LTQ-Orbitrap MS и UHPLC/MS метода урађена је хемијска карактеризација добијених екстраката степског божура. Нестабилност полифенола у току процеса производње, дистрибуције и чувања намирница, као и услед дејства спољних услова (температура, влажност ваздуха, кисеоник, светлост), ограничава

њихову активност и потенцијалне корисне ефекте на здравље људи. Инкапсулацијом полифенола у одговарајуће носаче долази до превазилажења поменутих недостатака, побољшања њихове биорасположивости и повећања полувремена елиминације. Наиме, савремене технике инкапсулације полифенола подразумевају спреј сушење, инкапсулацију у липозоме, наноинкапсулацију, лиофилизацију, инкапсулацију изливањем из раствора, емулзификацију, коацервацију, ко-кристализацију, инклузионо комплексирање, екструзију, као и многе друге методе. Пролипозомна метода представља једноставну и модерну технику припреме липозома код којих је унутрашња, водена, фаза одвојена од спољашње двослојном мембраном, структурно сличној ћелијској. Због припреме липозома на собној температури, обезбеђује се очување термолабилних једињења присутних у почетној сировини, док присуство водене фазе доприноси олакшаним даљим испитивањима и употреби. Припрема биополимерних филмова изливањем из раствора представља технику превођења течног узорка у суви облик, која може бити примењена на широк спектар материјала, како у прехранбеној, тако и у фармацеутској индустрији, за добијање лековитих сировина, ексципијенаса или капсула. Фосфолипиди, захваљујући својој доброј мешљивости са липофилним компонентама екстракта, физичко-хемијским и функционалним карактеристикама представљају добар избор материјала приликом микроинкапсулације пролипозомном методом. Поред тога, водена фаза присутна у липозомима интерагује са полифенолним компонентама преко водоничних веза и хидрофобних интеракција. Додатно, карбоксиметил-целулоза, коришћена за методу изливања филма из раствора, у поређењу са другим биополимерима поседује боље карактеристике везане за ефикасну инкапсулацију жељене компоненте, захваљујући високом нивоу емулзификације, високој стабилности и тенденцији стварања густе мреже након сушења. Из тих разлога, у овој докторској дисертацији су испитани утицаји различитих техника инкапсулације на екстракте латица степског божура и на њихове биолошке активности. Резултати докторске дисертације дају увид научној јавности и индустријском сектору о потенцијалу екстракта латица степског божура као антиоксидативних, антимикуробних и антибиофилм агенаса, као и потенцијалних инхибитора адхезије и инвазије бактеријског соја *S. lugdunensis* на NaCaT ћелије, агенаса који нису цитотоксични и повољно делују на зарастање рана, са идејом шире примене екстракта латица степског божура и њихових инкапсулата, који могу да допринесу квалитету и унапређеној вредности већ постојећих производа, уз замену синтетских агенаса од којих се многи 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 проучаване и испитане проблематике.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У докторској дисертацији Наталије Чутовић, мастер инжењера технологије, студента докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, наведене су 290 библиографске јединице које су релевантне у области истраживања и указују на значај испитиване проблематике. У оквиру литературних навода налазе се, углавном, референце новијег датума. Такође, може се уочити и присуство референци старијег датума у којима се налазе основе поставке из теорије на којима се истраживање заснива. Сходно овоме, може се извести закључак да су истраживања која су приказана у наведеним референцама била од користи приликом постављања методологије експерименталног рада, анализе и дискусије добијених резултата.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Резултати који су приказани у оквиру ове докторске дисертације су добијени одговарајућим експериментима, применом савремених препаративних и аналитичких инструменталних метода, према оригиналним или модификованим процедурама из литературе. Полифенолни екстракти латица степског божура добијени су применом три технике екстракције: мацерација, екстракција ултразвучном сондом и микроталасима. Садржај полифенола и флавоноида у добијеним екстрактима утврђен је индиректним спектрофотометријским методама. Хемијска карактеризација метанолног мацерата из Гуленоваца урађена је применом UHPLC-LTQ-Orbitrap MS, док је квантификација циљаних компоненти извршена применом UHPLC/MS методе. Антиоксидативна активност испитана у ABTS, DPPH, CUPRAC и FRAP тестовима. Антимикробна активност на три бактеријска и три гљивична соја испитана је применом микродилуционог теста, док је антибактеријска активност додатно била праћена испитивањем антибиофилм потенцијала одређених екстраката. Цитотоксичност, способност екстраката да поспеше зарастање рана, као и способност да инхибирају адхезију и инвазију бактерије *S. lugdunensis* испитане су на NaCaT ћелијама. Екстракт који је показао најбољи биолошки потенцијал инкапсулиран је у липозоме, биополимерне филмове и системе липозом-биополимерни филм. Добијени липозоми су окарактерисани са аспекта степена инкапсулације, стабилности, реолошких својстава, антиоксидативне, антимикробне и антибиофилм активности, цитотоксичности, дејстава липозома на *in vitro* миграцију NaCaT ћелија и инхибицију адхезије и инвазије бактерије *S. lugdunensis* на NaCaT ћелије. Биополимерни филмови су анализирани са аспекта садржаја влаге, механичких својстава, као и морфолошких карактеристика (SEM). Сви инкапсулати окарактерисани су применом FTIR спектроскопије (хемијске карактеристике). Испитивање кинетике отпуштања полифенола из липозома, филмова и система липозом-биополимерни филм урађено је у 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. Применљивост остварених резултата

Оптимизацијом процеса екстракције латица степског божура добијене су комбинације варијанси 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, антифунгална и антибиофилм активност, као и њихова цитотоксичност, потенцијал да поспеше зарастање рана на људској кожи (*in vitro*) и изврше супресију адхезије и инвазије бактеријских сојева на NaCaT ћелијама, што отвара пут екстрактима латица степског божура да буду примењени у фармацеутској и козметичкој индустрији, у циљу замене синтетских агенаса. Инкапсулацијом екстраката у липозоме, биополимерни филм и систем липозом-биополимерни филм остварена је боља стабилност полифенолних компонената, као и њихово модификовано (продужено) ослобађање. Инкапсулати полифенолних екстраката усколисног божура који су описани у овој докторској дисертацији имају велики потенцијал за примену у фармацеутским и козметичким производима.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спроводећи иновативна истраживања приликом израде докторске дисертације, кандидаткиња Наталија Чутовић, мастер инжењер технологије, показала је изузетну

самосталност у реализацији експеримената кроз модификацију примењених процедура и метода, као и кроз анализу и начин представљања добијених резултата. Током својих истраживања, које је спровела са високим нивоом одговорности и самосталности, показала је систематичност, креативност, али и критичност према свом раду. Током докторских студија, Наталија Чутовић се истицала способношћу да на прави начин сагледа, представи и у потпуности растумачи бројне резултате добијене током експерименталног рада. На основу бројних постигнутих резултата, како оних везаних за докторску дисертацију, тако и оних истраживања ван докторске дисертације, али и изузетног залагања, те доприноса развоју науке, Комисија је мишљења да кандидаткиња Наталија Чутовић 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:

- разумевању механизма различитих процеса екстракције: мацерација, екстракција ултразвучном сондом, као и екстракција потпомогнута микроталасима;
- одабиру најпогоднијег локалитета за сакупљање латица степског божура и одговарајућег растварача у различитим методама екстракције, којима се добијају екстракти са највећим садржајем полифенола;
- хемијској карактеризацији добијених екстраката латица степског божура, чиме су добијене прве информације о хемијском саставу латица степског божура са територије Републике Србије;
- испитивању и потврди антиоксидативне, антимикробне и антибиофилм активности екстраката латица степског божура, праћене анализом њихове цитотоксичности, *in vitro* испитивањем дејства екстраката на зарастање рана, као и испитивању ефеката на капацитете адхезије и инвазије *S. lugdunensis* на NaCaT ћелијама уз разумевање механизма свих спроведених биолошких тестова;
- указивању на ефикасности пролипозомне и методе изливања филма из раствора за припрему липозома, односно биополимерног филма и система липозом-биополимерни филм коришћењем природних, биоразградивих, нетоксичних, економски прихватљивих и комерцијално доступних сировина;
- добијању информација о биолошким активностима добијених инкапсулата, са становишта њиховог антиоксидативног, антимикробног и антибиофилм потенцијала, цитотоксичности према NaCaT ћелијама, *in vitro* ефекту инкапсулата на зарастање рана, као и о дејству на капацитете адхезије и инвазије бактерије *S. lugdunensis* на површину NaCaT ћелија;
- добијању прецизних података везаних за облик и величину честица липозома, површинско наелектрисање и стабилност у току времена складиштења од шездесет дана;
- добијању егзактних информација везаних за структурна својства и потенцијалне интеракције између носача и активних супстанци екстраката латица степског божура;
- добијању поузданих информација везаних за морфологију биополимерних филмова и система липозом-биополимерни филм;
- одређивању кинетике отпуштања полифенола из липозома, биополимерног филма, као и система липозом-биополимерни филм;
- доприносу у формулисању и физичко-хемијској карактеризацији комплексног система липозом-биополимерни филм, који је, као такав, погодан за примену у фармацеутској

и козметичкој индустрији, а који може обезбедити ефекат контролисаног и продуженог отпуштања полифенола латица степског божура.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања везана за оптимизацију процеса екстракције латица степског божура, у оквиру ове докторске дисертације, показала су да је највећи принос полифенола у екстрактима латица са два локалитета (Гуленовци и Панчево) добијен екстракцијом потпомогнутом микроталасима, уз употребу метанола као екстракционог агенса. Екстракти латица из Делиблатске пешчаре имали су највиши садржај полифенола када су припремљени методом екстракције микроталасима, али уз употребу воде као екстракционог медијума. Ова докторска дисертација представља свеобухватну студију о утицају различитих локалитета за сакупљање биљног материјала, метода екстракције и екстракционих медијума на принос полифенолних једињења латица степског божура, са циљем да се постигне најефикаснији процес екстракције и последично повећање садржаја полифенола у екстрактима. Хемијска карактеризација екстраката показала је присуство 83 компоненте, подељене у пет група: фенолне киселине, флавоноидни гликозиди и агликони, антоцијани и антоцијанидини, терпенски деривати, као и остала једињења, која поседују значајан антимикуробни, антиоксидативни, антибиофилм и пролиферативни потенцијал. Применом четири различита антиоксидативна теста, микродилуционим тестом на три бактеријска и три гљивична соја, тестом дејства на формирање биофилма бактерије *S. lugdunensis*, као и испитивањем цитотоксичности екстракта, њихове способности да инхибирају адхезију и инвазију бактерије *S. lugdunensis* на NaCaT ћелије и да *in vitro* поспеше зарастање рана, потврђене су поменуте биолошке активности, уз разумевање механизма свих поменутих биолошких активности. Екстракти латица сакупљених у Гуленовцима показали су се као најактивнији у свим извршеним биолошким тестовима.

FTIR спектри липозомалних инкапсулата екстраката показали су готово искључиво траке које потичу од фосфолипидних смеша, што указује на ефикасну инкапсулацију активних компонената екстраката и самим тим њихову бољу заштиту. У случају биополимерних филмова и система липозом-биополимерни филм могли су се приметити пикови који потичу од самог екстракта латица, што указује на потенцијално изливање одређене количине екстракта на површину биополимерног филма. Студија стабилности липозома показала је да је величина честица најмања у случају липозома припремљених употребом фосфолипидне смеше Phosal MCT 53, док је највиша апсолутна вредност зета потенцијала уочена код липозома сачињених од Phosal SA 75, што указује на њихову бољу стабилност наспрам друге две врсте липозома. Резултати биолошких тестова спроведених на липозомима (антиоксидативна, антимикуробна и антибиофилм активност, тест цитотоксичности и способности инхибиције адхезије и инвазије бактерије *S. lugdunensis* на NaCaT ћелије, као и *in vitro* поспешивање зарастања рана) показали су да је Фосфолипон најпогоднија фосфолипидна смеша за припрему липозома који показују добар биолошки потенцијал. Тестови антимикуробне активности биополимерних филмова и система липозом-биополимерни филм показали су да су филмови у које је инкапсулирано 0,4 g екстракта латица најактивнији у супресији тестираних патогена, док систем липозом-биополимерни филм не показује активност, што је могуће приписати споријој дифузији активних компонената. Анализом морфолошких својстава биополимерних филмова и система липозом-биополимерни филм јасно се могло видети су добијени компактни униформни биополимерни филмови, код којих није дошло до нарушавања структуре липозома. Структурна својства чистог екстракта латица и свих инкапсулата анализирана су употребом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом при чему је доказано да је екстракт ефикасно инкапсулиран у сваку врсту носача. Овај закључак је могуће донети на основу смањења интензитета пикова карактеристичних за сам екстракт што имплицира њихову успешну инкорпорацију у носач. Резултати кинетике отпуштања указују да је

дифузија полифенола из система липозом-биополимерни филм најспорија, односно инкорпорација липозома са инкапсулираним екстрактом у биополимерни филм је узроковала повећање отпора од чак 6 пута, док је у случају липозома на бази Фосфолипона повећање отпора дифузији било 3,4 пута, у односу на чист екстракт. На основу добијених резултата може се закључити да све припремљене врсте инкапсулата (липозоми, биополимерни филмови и систем липозом-биополимерни филм) обезбеђују контролисано и продужено отпуштање полифенола латица степског божура. На основу свих добијених резултата тестова биолошке активности, утврђено је да је сам екстракт латица степског божура најпогодније инкапсулирати у липозоме на бази Фосфолипона, без њихове даље инкорпорације у биополимерни филм, због додатног успоравања дифузије полифенолних једињења. Досадашња истраживања и добијени резултати отворили су врата новим експериментима, попут испитивања утицаја екстракта латица степског божура на активност ензима и туморске ћелије, као и развијања нових система са контролисаним отпуштањем полифенола латица степског божура, за потенцијалну примену у фармацеутској или козметичкој индустрији.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидаткиња Наталија Чутовић, мастер инжењер технологије и студент докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду 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 4 публикације, од тога два (2) рада у часописима међународног значаја од којих су оба (2) рада публикована у врхунском међународном часопису (M21); један (1) рад у национални часопису међународног значаја (M24) и једно (1) саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34).

Списак научних радова и саопштења који су произашли као резултат рада кандидаткиње на докторској дисертацији:

Категорија M21:

1. **Čutović, N.**, Marković, T., Kostić, M., Gašić, U., Prijić, Ž., Ren, X., Lukić, M., Bugarski, B., 2022. Chemical profile and skin-beneficial activities of the petal extracts of *Paeonia tenuifolia* L. from Serbia. *Pharmaceutics*, 15(12), p.1537. <https://doi.org/10.3390/ph15121537>. ISSN: 1424-8247. IF₂₀₂₁=5,215
2. **Čutović, N.**, Marković, T., Carević, T., Stojković, D., Bugarski, B., Jovanović, A.A., 2023. Liposomal and liposomes-film systems as carriers for bioactives from *Paeonia tenuifolia* L. petals: physicochemical characterization and biological potential. *Pharmaceutics*, 15(12), p.2742. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122742>. ISSN: 1999-4923. IF₂₀₂₂=5,4

Категорија M24:

1. **Čutović, N.**, Marković, T., Žugić, A., Batinić, P., Bugarski, B., Jovanović, A., 2023. Antioxidant activity of *Paeonia tenuifolia* L. petal extract-loaded liposomes. *Lekovite sirovine*, 43(1), e167C. <https://doi.org/10.61652/leksir2343e167C>. ISSN: 2560-3965

Категорија M34:

1. **Čutović, N.**, Marković, T., Carević, T., Stojković, D., Bugarski, B., Jovanović, A., 2023. Evaluation of the anti-inflammatory potential of *Paeonia tenuifolia* L. petal extract. Twenty-

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу података и резултата који су претходно представљени, Комисија закључује да докторска теза кандидаткиње Наталије Чутовић представља значајан допринос у научној области којој припада, што је подржано радовима објављеним у реномираним међународним часописима. Предмет и циљеви који су дефинисани у извештају за оцену научне заснованости теме су остварени. Стога, Комисија је мишљења да предметна докторска дисертација задовољава све неопходне критеријуме, као и да је кандидат током научно-истраживачког рада показао висок степен самосталности, креативности и одговорности. Имајући у виду обим, сложеност и научни допринос постигнутих резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и да га заједно са поднетом докторском дисертацијом кандидаткиње Наталије Чутовић под насловом: „Оптимизација екстракције латица *Raeonia tenuifolia* L., биолошки ефекти на кожи и имобилизација екстраката у носаче“ изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду, као и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 11.04.2024. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

Проф. др Рада Пјановић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд

Др Марко Стаменић, доцент,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, Београд

Др Татјана Марковић, научни саветник,
Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Београд

Др Дејан Стојковић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,
Институт од националног значаја за Републику Србију