

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Кате Т. Трифковић**, дипл. инг.

Одлуком бр. 35/473 од 29.09.2016. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Кате Т. Трифковић**, дипл. инг. под насловом

**„Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола“.**

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

**01.06.2015.** – Кандидат Ката Т. Трифковић, дипл. инг., предложила је тему докторске дисертације под називом: „Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола“.

**09.07.2015.** – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/309 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Кате Т. Трифковић, дипл. инг. за израду докторске дисертације под називом: „Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола“.

**17.09.2015.** – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/389 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобравању израде докторске дисертације Кати Т. Трифковић, дипл. инг., под називом: „Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола“, а за ментора ове докторске дисертације је именован др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

**19.10.2015.** – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Кате Т. Трифковић, дипл. инг., под називом: „Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола“.

**29.09.2016.** – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Београду донета је Одлука бр. 35/473 о именовању Комисије за оцену и

одбрану докторске дисертације Кате Т. Трифковић, дипл. инг., под називом: „Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола“

**06.10.2016.** – Декан Технолошко-металуршког факултета у Београду доноси Одлуку бр. 20/136 о продужењу рока за завршетак докторских студија за још два семестра школске 2016/2017. године.

Кандидат Ката Т. Трифковић, уписала је докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, школске 2010/2011. године.

## 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, Универзитета у Београду. За ментора ове докторске дисертације именован је др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду

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

## 1.2. Биографски подаци о кандидату

Кандидат **Ката (Тодор) Трифковић**, дипломирани инжењер технологије, рођена је 01.03.1986. године у Прибоју, Република Србија, где је стекла основно и средње образовање (Гимназија, природно–математички смер). Године 2005. уписала је Технолошко–металуршки факултет Универзитета у Београду, а дипломирала је 2010. године на смеру Фармацеутско инжењерство са просечном оценом 8,67, одбравивши дипломски рад на тему „Оптимизација техника имобилизације у циљу контролисаног отпуштања полифенола“. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је школске 2010/2011. године. У октобру 2012. одбранила је завршни рад под називом „Инкапсулација полифенола у хитозанске микрочестице“ са оценом 10. У оквиру докторских студија положила је све испите предвиђене студијским програмом, са просечном оценом 9,8.

Од фебруара 2011. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач-приправник, а од 2014. прелази у звање истраживач-сарадник. Ангажована је на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања из области пољопривреде и хране: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ев. број пројекта ИИИ 46010). Поред овог Ката Т. Трифковић била је учесник једног иновационог пројекта („Модуларни систем за добијање обновљиве енергије из отпадних вода и отпада у индустрији пива“), затим члан акције ФА1001 у оквиру COST Европске кооперације за науку и технологију, као и учесник у ФП7 пројекту (FP7-REGPOT 2009-1 Project Nanotech FTM, n°245916). Тренутно, учесник је два

билатерална пројекта са Републиком Хрватском („Развој минкроинкапсулисаних система и јестивих филмова са биоактивним компонентама за примену у производњи и паковању функционалних прехранбених производа“, као и „Повећање стабилности и биорасположивости активних једињења изолованих из биљака применом различитих система за њихову испоруку у организму и математичко моделовање понашања добијених препарата у *in vitro* симулацији гастроинтестиналног система“, 2016-2017) и билатералног пројекта са Републиком Италијом („Микроинкапсулисани екстракти шафрана као иновативни састојци здраве и функционалне хране“, 2016-2018). Такође, учествовала је у Ерасмус+ пројекту Србија - Грчка (Higher Education – KA107 International Mobility, 2016).

## 2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Кате Т. Трифковић, дипл. инг., садржи 252 стране (од којих је 236 нумерисано) у оквиру којих се налази 7 поглавља, са укупно 54 слике, 24 табеле и 328 литературних навода. Докторска дисертација садржи: Увод, Циљ рада, Теоријски део, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. По својој форми и садржају, поднети рад задовољава све стандарде Универзитета у Београду за докторску дисертацију.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводу су образложени предмет и циљеви истраживања, као и научни допринос докторске тезе. Циљеви рада су детаљније дефинисани у посебном поглављу Циљ рада. У оквиру Теоријског дела (I поглавље) дисертације дат је литературни преглед предметне области, изложен кроз седам целина. Најпре, истакнута је важност природних антиоксиданаса, тј. биљних полифенола уз нарочит осврт на полифеноле екстракта мајчине душице (*Thymus serpyllum* L.), њихове особине, предности и недостатке који лимитирају њихову ширу примену у прехранбеним и/или фармацеутским производима. Даље, изложена је предност инкапсулације биоактивних супстанци и дат преглед најчешће коришћених техника за инкапсулацију, при чему је посебна пажња посвећена управо техникама инкапсулације коришћеним у овој докторској дисертацији. Такође, посебна целина посвећена је материјалима који су коришћени као носачи за инкапсулацију полифенола мајчине душице и умреживачима коришћеним за добијање стабилних хидрогелова. На крају, дат је увид у појам контролисаног отпуштања као једног од циљева инкапсулације, где је посебан акценат стављен на теоријске и емпиријске моделе познате у литератури који се могу користити за разјашњавање механизма апсорпције воде, тј. десорпције инкапсулираних полифенола из хидрогелова на бази хитозана.

У Експерименталном делу (II поглавље) дисертације описани су материјали и методе, према редоследу експерименталног истраживачког рада. Најпре су описане методе за припрему и карактеризацију екстракта мајчине душице, и то методе одређивања укупног садржаја полифенола у екстракту и његовог антиоксидативног капацитета, затим метода течне хроматографије под високим притиском која је коришћена за квантификовање појединачних полифенолних једињења присутних у

екстракту, као и метода коришћена за одређивање садржаја минерала. Након тога, приказане су технике коришћене за добијање хидрогелова на бази хитозана са инкапсулираним полифенолима – техника електростатичке екструзије, техника емулзионе полимеризације и техника спреј-сушења. У наставку, дат је преглед метода карактеризације добијених хидрогелова на бази хитозана са инкапсулираним полифенолима, као што су гравиметријско одређивање бубрења хидрогелова хитозана у различитим условима (у води на 25°C и у условима симулираног гастро-интестиналног тракта на 37°C), оптичка и скенирајућа електронска микроскопија, одређивање порозности хидрогелова, одређивање величине и расподеле величина честица, као и површинског наелектрисања хидрогелова. Затим, описане су методе којима се испитују могуће интеракције полимер-полимер и/или полимер-умрежавајући реагенс и/или полимер-умрежавајући реагенс-полифеноли, као и кристаличност добијених хидрогелова. Даље, приказане су методе квантитативног одређивања укупног садржаја и задржаног антиоксидативног капацитета полифенола инкапсулираних у хитозанске хидрогелове. Дат је и опис метода испитивања потенцијалне примене добијених хидрогелова за контролисано отпуштање полифенола, и то у води на 25°C и у условима симулираног гастринтестиналног тракта на 37°C. На крају, описано је како је вршено одређивање механизма транспорта воде у, односно полифенола из хидрогелова, и то коришћењем теоријских и емпиријских модела.

Резултати и дискусија приказани су у III поглављу. У првом делу тезе вршена је припрема и карактеризација екстракта мајчине душице. Одређено је да екстракт поседује висок садржај полифенолних једињења  $2,4 \pm 0,02$  mgGAE/ml екстракта, и да је његова антиоксидативна активност  $2,0 \pm 0,29$  mmol Trolox/l екстракта. Такође, идентификована су и квантификована најзаступљенија полифенолна једињења у екстракту. На крају, одређен је минерални профил екстракта, где се дошло до закључка да је водени екстракт мајчине душице богат нутритивним елементима (Ca, Mg и Na), док је садржај тешких метала знатно нижи од дозвољених концентрација, што екстракт чини погодним за примену у прехранбеним производима. У наставку тезе испитана је метода електростатичке екструзије за добијање микрочестица алгинат-хитозан са инкапсулираним полифенолима. Показало се да су добијене честице сферичне, механички стабилне, и са укупним садржајем инкапсулираних полифенола од 11,9 mgGAE/g честица. Даље, припремане су хитозанске микрочестице умрежене глутералдехидом техником емулзионе полимеризације. Испитивањем бубрења ових система дошло се до закључка да се процес апсорпције воде одвија у већој мери у условима киселе средине, тј. у условима симулираног желудачног сока, док у условима симулираног интестиналног флуида долази до скупљања честица. Такође, процес бубрења је у великој мери зависио од концентрација хитозана и глутералдехида. Поред хитозанских микрочестица умрежених глутералдехидом, припремане су и микрочестице хитозана умрежене натријум-триполифосфатом и генипином, и то техником спреј-сушења. Све добијене честице су показале велику сферичност, а величина честица је била у функцији концентрације умреживача, при чему је повећање концентрације проузроковало смањење хидродинамичког пречника микрочестица. Површинска морфологија микрочестица је била утолико неправилнија и храпавија уколико је концентрација умреживача била већа. Такође, процес инкапсулације полифенола је утицао на повећање храпавости микрочестица, што је последица таложења кристала полифенола на површини микрочестица. Анализа инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовим трансформацијама потврдила је интеракције полимер-полимер и полимер-умрежавајући реагенс и полимер-умрежавајући реагенс-полифеноли, што је била потврда успешне инкапсулације полифенола у хитозански матрикс. Стабилност спреј-сушених честица испитана је одређивањем наелектрисања

по површини методом дифракције ласерских зрака, где се показало да са повећањем концентрације умреживача долази до смањења зета-потенцијала, односно до повећања стабилности честица; сличан ефекат је запажен и након процеса инкапсулације. Утврђено је и да процес умрежења хитозана, као и процес инкапсулације полифенола доприносе повећању кристаличности хитозана. Укупан садржај полифенола у микрочестицама након инкапсулације био је висок (од 66 до 118 mgGAE/g честица), а испитивање отпуштања полифенола показало је да је количина отпуштених полифенола функција састава матрице, односно концентрација хитозана и умрежавајућег реагенса. Такође, анализа отпуштања појединачних полифенолних једињења показала је да се једињења већих молекулских маса спорије отпуштају, док је генерално отпуштање полифенола 2-4 пута веће у условима симулираног гастроинтестиналног тракта у односу на отпуштање у води. При томе, количина отпуштених укупних полифенола из микрочестица варирала је у опсегу 50-70%, што говори о томе да постоји одређена количина полифенола доступна за даље отпуштање. Применом теоријских и емпиријских модела на експериментално добијене резултате испитан је и механизам апсорпције воде, тј. десорпције полифенола из хитозанских хидрогелова. На крају поглавља Резултати и дискусија приказан је критички осврт на добијене хитозанске хидрогелове за инкапсулацију полифенола мајчине душице, где су испитивани хидрогелови међусобно упоређени са аспекта применљивости процеса на индустријском нивоу, као и у прехранбеној/фармацеутској индустрији, затим са аспекта карактеристика добијених хидрогелова и са аспекта контролисаног отпуштања инкапсулираних полифенола.

У поглављу IV таксативно су наведени најважнији закључци, изведени на основу испитивања изложених у претходним поглављима.

У поглављу V наведена је литература коришћена приликом израде докторске дисертације.

### **3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ**

#### **3.1. Савременост и оригиналност**

Докторска дисертација Кате Т. Трифковић за предмет има савремену тему истраживања која се односи на хитозанске хидрогелове за контролисано отпуштање природних антиоксиданаса, тј. полифенола. Као модел једињење у докторској дисертацији су коришћени полифеноли воденог екстракта мајчине душице (*Thymus serpyllum* L.). Генерално, полифеноли као природни антиоксиданси предмет су великог интересовања, како научне тако и шире јавности, због позитивних ефеката на људско здравље. Полифенолни екстракти су од посебног значаја, будући да формулације које садрже смеше полифенола испољавају синергистичко дејство, често јаче од дејстава појединачних полифенолних компоненти. Све већа свест потрошача о здравом начину живота, која подразумева конзумацију хране са минималним уделом синтетских састојака, као и коришћење козметичких и фармацеутских производа добијених од природних сировина и са природним адитивима, захтева унапређење постојећих и развој иновативних производа из области функционалне хране и фармације. У таквим системима полифеноли имају двоструку улогу: као природни антиоксиданси они доприносе повећању нутритивних и функционалних карактеристика производа у које

се додају, а поред тога могу деловати и као природни конзерванси, штитећи остале осетљиве компоненте прехранбених и/или фармацеутских производа од оксидације, на тај начин продужавајући рок трајања производу. Међутим, већина полифенолних једињења је осетљива на светлост, присуство кисеоника и високу температуру, као и на варијације рН у гастро-интестиналном тракту, те стога често долази до губитка њихове антиоксидативне активности. Такође, проблем представља и мала биорасположивост полифенолних једињења. Управо из наведених разлога неопходно је развити адекватне системе за инкапсулацију полифенола.

Инкапсулација представља један од начина да се превазиђу недостаци полифенола попут њихове осетљивости, тј. да се полифеноли заштите, затим да се повећа биорасположивост полифенола, да се омогући њихово контролисано отпуштање на циљаном месту дејства и да се уопштено омогући шира примена полифенола у прехранбеним и фармацеутским производима. За инкапсулацију полифенола могу да се користе хидрогелови на бази хитозана који се могу припремати различитим техникама. Када се бира адекватна техника припреме хидрогелова, мора се имати на уму могућност увећања размера процеса, како би предложена техника била применљива и на индустријском нивоу. Управо из тог разлога су у овој докторској дисертацији поред техника које су применљивије у процесима мањих размера, као што је техника електростатичке екструзије, испитане и технике које су адекватне и за индустрију, и то техника емулзионе полимеризације и техника спреј-сушења. Такође, да би се испоштовали строги прописи који регулишу употребу материјала и умреживача у прехранбеној и фармацеутској индустрији, коришћени материјали за инкапсулацију су биокомпатибилни и нетоксични. Такође, испитани су не само стандардни умреживачи, какав је глутералдехид, већ и савремени тзв. „*food-grade*“ умреживачи, као што су натријум-триполифосфат и генипин. Стога, овако добијени системи могу се примењивати како у прехранбеној, тако и у фармацеутској индустрији. Сам процес инкапсулације полифенола је извођен на два начина (1) поступком „*in-situ*“ инкапсулације, где се формирање мреже хидрогела и инкапсулација полифенола симултано одвијају, и (2) тзв. поступком „*post-loading*“-а, где се најпре врши припрема хидрогелова (тзв. „*ready-made support*“), а потом инкапсулација полифенола.

Да би се стекао увид у то шта се дешава са хидрогеловима хитозана са инкапсулираним полифенолима након конзумације и да ли предложени системи имају потенцијал за примену у системима са контролисаним отпуштањем полифенола, у овој докторској дисертацији је испитиван процес отпуштања тј. десорпције полифенола. Поред анализе отпуштања полифенола у води, рађено је и отпуштање полифенола у симулираним условима гастроинтестиналног тракта, и то у условима вештачке плувачке, затим симулираног желудачног сока (рН 2,2) и на крају симулираног интестиналног флуида (рН 6,8). Такође, вршена је и процена механизма преноса полифенола, како би се што боље окарактерисали добијени системи, а у циљу адекватног пројектовања процеса инкапсулације полифенола. Резултати ове докторске дисертације дају увид не само научној јавности, већ и индустријском сектору о потенцијалу хидрогелова на бази хитозана са инкапсулираним полифенолима за примену као функционалних адитива прехранбеним и фармацеутским производима. На тај начин се може допринети повећању квалитета и нутритивне вредности постојећих производа или формулацији иновативних производа. 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 проблематике.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације кандидата Кате Т. Трифковић, цитирано је 328 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 потенцијал хидрогелова на бази хитозана са инкапсулираним полифенолима мајчине душице за примену у прехранбеној и 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 дисертације су доказани одговарајућим експериментима, као и савременим аналитичким инструменталним мерењима према оригиналним или модификованим методама из литературе. Најпре је вршена карактеризација полазног екстракта мајчине душице (*Thymus serpyllum* L.), одређивањем укупног садржаја полифенола (спектрофотометријом у ултра-љубичастој области - ФС методом), затим идентификацијом и квантификавањем конкретних полифенолних једињења присутних у екстракту (течном хроматографијом под високим притиском), као и одређивањем садржаја минерала (методом индуковано спрегнуте плазме са масеном спектрометријом). На крају, процењен је антиоксидативни капацитет екстракта коришћењем спектрофотометријске методе (АВТS). Хидрогелови на бази хитозана припремани су коришћењем три технике - електростатичка екструзија, емулзиона полимеризација и спреј-сушење, уз коришћење различитих умреживача - јони калцијума, глутералдехид, натријум-триполифосфат и генипин. Сам процес инкапсулације је извођен на два начина (1) поступком „*in-situ*“ инкапсулације, где се формирање мреже хидрогела и инкапсулација полифенола симултано одвијају, и (2) тзв. „*post-loading*“ поступком, где се најпре врши припрема хидрогелова (тзв. „*ready-made support*“), а потом инкапсулација полифенола. Карактеризација добијених хидрогелова рађена је у циљу одређивања профила бубрења (гравиметријска метода), затим њиховог облика (оптичка микроскопија) и површинске морфологије (скенирајућа електронска микроскопија), порозности (ВЕТ метода), величине честица и расподеле величина, као и наелектрисања на површини честица (ласерске дифракционе технике). Такође, испитиване су интеракције полимер-полимер и/или полимер-умрежавајући реагенс и/или полимер-умрежавајући реагенс-полифеноли (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовим трансформацијама), а процењен је и утицај умрежавања и инкапсулације полифенола на кристаличност хитозана (рендгенска дифракциона анализа). Механичке карактеристике хидрогелова на бази хитозана су испитане на савременом уређају за тестирање механичких карактеристика материјала AG-X plus Universal Testing Machine, у режиму компресије и коришћењем методе посебно прилагођене овој врсти узорака. Даље, хидрогелови на бази хитозана са инкапсулираним полифенолима су затим тестирани у смислу одређивања укупног садржаја полифенола (спектрофотометријски - ФС методом и течном хроматографијом

под високим притиском), као и проценом задржаног антиоскидативног капацитета инкапсулираних полифенола (ABTS метода). На крају, вршено је испитивање потенцијалне примене добијених хидрогелова за контролисано отпуштање полифенола (спектрофотометријски - FC методом и течном хроматографијом под високим притиском).

Дифузионе карактеристике хитозанских хидрогелова су посебно испитане. Наиме, бубрење (односно апсорпција воде) и отпуштање (односно десорпција) полифенола су испитивани у различитим условима температуре и рН. Експериментално добијени подаци су потом упоређени са неколико теоријских, полу-емпиријских и емпиријских модела (Ritger-Peppas, Higuchi, Baker-Lonsdale, Verens-Hopfenberg, Burst effect, Peppas-Sahlin, Weibull i Peleg model), како би се предвидело понашање хидрогелова при бубрењу, односно отпуштању полифенола и утврдио механизам преноса.

### 3.4. Применљивост остварених резултата

Након поређења резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације са до сада објављеним резултатима других истраживачких група, закључили смо да је остварен значајан допринос у развоју нових система за инкапсулацију полифенола на бази хидрогелова хитозана који омогућавају продужено отпуштање активне компоненте. Системи описани у овој тези имају велики потенцијал примене, од примене у функционалним прехранбеним производима, преко формулације нових прехранбених производа, па до примене у фармацеутским производима. Поред тога, на основу резултата тезе се може предложити адекватан избор технике припреме хидрогелова како би процес могао да се изводи у индустријским размерама (техника емулзионе полимеризације или спреј-сушења), као и адекватан избор умреживача који омогућава добро умрежавање хитозана, а при томе је дозвољен за употребу у храни и има нижу цену (натријум-триполофосфат).

### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спроводећи иновативна истраживања током израде докторске дисертације, кандидат Ката Т. Трифковић, дипл. инг. испољила је изузетну стручност у реализацији експеримената кроз модификацију и оптимизацију примењених техника и метода, као и кроз анализу и начин приказивања резултата. Током својих истраживања, спроведених врло одговорно и зрело, испољила је како самосталност у раду, систематичност и креативност, тако и критичност. Током докторских студија, Ката Т. Трифковић се истицала способношћу да на прави начин представи и у потпуности објасни све аспекте бројних експерименталних резултата до којих је долазила како у самосталном тако и у тимском раду. Стручном и аналитичном приступу у постављању и спровођењу експеримента и истраживања посебно је допринео изразито развијен инжењерски приступ који Ката Т. Трифковић константно показује у свом раду. На основу бројних постигнутих резултата и изузетног залагања, те доприноса развоју науке, Комисија је мишљења да кандидат Ката Т. Трифковић, дипл. инг. поседује све неопходне квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

## 4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

### 4.1. Приказ остварених научних доприноса

Резултати до којих се дошло у оквиру ове дисертације дају значајан научни допринос у развоју хидрогелова хитозана са контролисаним/продуженим ослобађањем полифенола. Такође, резултати овог рада у целини дају научни допринос испитивању феномена инкапсулације полифенола у хидрогелове, као што су механизам настајања честица добијених различитим техникама, затим интеракција између носача и активних компоненти, као и између носача и умреживача и активних компоненти, али и других феномена који утичу на ефикасност инкапсулације и активност инкапсулираних полифенола. Специфични научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове докторске дисертације се огледају у:

- ~ карактеризацији екстракта мајчине душице (*Thymus serpyllum* L.);
- ~ оптимизацији процеса инкапсулације полифенола мајчине душице у хитозанске хидрогелове припремљене техникама електростатичке екструзије, емулзионе полимеризације и спреј-сушења;
- ~ идентификовању интеракција полимер-полимер и/или полимер-умрежавајући реагенс и/или полимер-умрежавајући реагенс-полифеноли;
- ~ утврђивању кинетике бубрења хитозанских хидрогелова и дефинисању њиховог понашања у различитим условима рН и температуре;
- ~ процени утицаја процеса инкапсулације на укупан садржај и антиоксидативну активност полифенола инкапсулираних у хидрогелове;
- ~ процени утицаја који инкапсулирана полифенолна једињења испољавају на матрикс;
- ~ утврђивању кинетике отпуштања инкапсулираних полифенола у различитим условима рН и температуре, тј. у води (25°C) и у симулираним условима гастроинтестиналног тракта (37°C);
- ~ утврђивању кинетике отпуштања појединачних полифенолних компоненти екстракта, у зависности од њихове молекулске масе и хемијске структуре;
- ~ одређивању механизма апсорпције воде, тј. десорпције полифенола из хитозанских хидрогелова.

### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања која су изведена у овој докторској дисертацији конципирана су на основу претходно дефинисаних циљева и детаљне анализе литературе из области инкапсулације полифенолних једињења као природних антиоксиданаса, у различите микрочестичне системе. Иако је инкапсулација полифенолних једињења област науке која је последњих деценија доживела експанзију у броју радова, ипак се већина досадашњих истраживања фокусира на есенцијална уља биљака или метанолне/етанолне екстракте, док је нешто мањи број студија посвећен воденим екстрактима биљака, посебно мајчине душице. Такође, предност ове докторске дисертације јесте и чињеница да је коришћен екстракт мајчине душице, а не појединачна полифенола једињења, будући да често екстракти испољавају јаче позитивно дејство на људски организам, захваљујући синергистичком дејству полифенолних једињења присутних у екстракту.

Како би се екстракт мајчине душице могао са сигурношћу применити као функционални адитив храни, неопходно је првенствено урадити његову карактеризацију. У те сврхе у овој дисертацији је одређен укупан садржај полифенола мајчине душице, његова антиоксидативна активност, а идентификована су и квантификована најзаступљенија полифенолна једињења екстракта. Такође, одређен је и његов минерални састав, да би се потврдило да концентрације тешких метала на прелазе дозвољене вредности.

Најпре су хидрогел микрочестице алгинат-хитозан добијене техником електростатичке екструзије, која омогућава контролисану производњу микрочестица жељених димензија. Након тога, за добијање микрочестица коришћене су методе емулзионе полимеризације и спреј-сушења, као технике које је могуће применити у увећаним размерама процеса, тј. на индустријском нивоу. Као умрежавајући реагенс коришћен је прво глутералдехид, који има изузетне способности умрежавања хитозана. Међутим, како је концентрација глутералдехида дозвољена за примену у прехранбеној индустрији лимитирана, следећи корак у овој дисертацији била је замена глутералдехида умрежавајућим реагенсима који су сигурни за употребу у прехранбеној и фармацеутској индустрији. У те сврхе коришћени су натријум-триполифосфат и генипин. Сам процес инкапсулације полифенола је извођен на два начина (1) поступком „*in-situ*“ инкапсулације, где се формирање мреже хидрогела и инкапсулација полифенола симултано одвијају, и (2) тзв. поступком „*post-loading*“-а, где се најпре врши припрема хидрогелова (тзв. „*ready-made support*“), а потом инкапсулација полифенола.

Све добијене честице биле су сферичне, при чему се показало да је морфологија површине микрочестица функција њиховог састава, односно концентрација хитозана и умреживача. Сам процес умрежавања хитозана потврђен је идентификацијом интеракција хитозан-умрежавајући реагенс. Даље, показано је да управо степен умрежења хитозана утиче на профил бубрења добијених хидрогелова, а да је бубрење израженије у условима симулираног гастроинтестиналног тракта. Укупан садржај полифенола у микрочестицама био је у распону од 66 до 118 mgGAE/g честица (садржај полифенола у полазном екстракту је био 2,4 mgGAE/ml екстракта, односно 48,0 mgGAE/g суве дроге), у зависности од технике којом су микрочестице добијане и умреживача који је том приликом коришћен. Такође, интеракције полимер-умрежавајући реагенс-полифеноли потврдили су присуство полифенолних једињења екстракта у хитозанској матрици. Испитавања утицаја процеса умрежавања, а потом и инкапсулације на физичка својства хитозана, тј. на његову кристаличност показала су да долази до повећања кристаличности услед присуства умреживача, односно полифенола. Даље, стабилност микрочестица је испитана са аспекта концентрације умреживача, где се показало да са повећањем концентрације умреживача долази до повећања стабилности хитозанских микрочестица, као и са аспекта присуства полифенола у микрочестицама, где је примећено да присуство полифенола повећава стабилност микрочестица.

Резултати кинетике отпуштања полифенола показују да се полифеноли знатно спорије отпуштају из микрочестица добијених техникама емулзионе полимеризације и спреј-сушења, у поређењу са микрочестицама добијеним електростатичком екструзијом. Даље, отпуштање полифенола је знатно спорије у условима симулираног гастроинтестиналног тракта (до 360 min), за разлику од отпуштања полифенола у води где се највећи проценат полифенола отпусти у првих 120 min. Кинетика отпуштања конкретних полифенолних једињења зависи и од њихове молекулске масе, па се тако једињења мање молекулске масе брже отпуштају. Такође, хемијска структура полифенолног једињења утиче на отпуштање, па тако једињења која у својој структури

поседују већи број хидроксилних група се отпуштају у мањем проценту, будући да су ковалентним и водоничним везама јаче везана за хитозанску матрицу. Генерално, кинетика отпуштања полифенола је функција величине микрочестица, степена умрежења полимерне матрице, садржаја и хемијске структуре инкапсулираних полифенола, као и кинетике бубрења микрочестица. Количина укупно отпуштених полифенола варира у опсегу 50-70%, што говори о томе да постоји одређена количина полифенола доступна за даље отпуштање. Имајући у виду да су хитозанске микрочестице мукоадхезивне и деградабилне у условима дебелог црева преостали полифеноли могу бити отпуштени у дужим временским периодима у дебелом цреву.

Испитивање механизма отпуштања, тј. десорпције полифенола из хитозанских микрочестица и поређењем експерименталних података са теоријским и емпиријским моделима доступним у литератури, дошло се до закључка да се десорпција полифенола одвија по различитим механизмима за различите полифенолне компоненте, али да су доминантни механизми преноса дифузија по Првом Фиковом закону, или комплексни механизам отпуштања инкапсулираних полифенола.

Као и свако добро изведено истраживање и ово је отворило нове правце за даља истраживања у смислу дизајнирања иновативних (тзв. „интелигентних“) система за инкапсулацију полифенолних једињења мајчине душице, ради постизања још бољег контролисаног отпуштања ових компоненти, а са циљем добијања јединственог комерцијалног система који би био погодан за примену како у већем броју прехранбених и фармацеутских производа, тако и за инкапсулацију других биоактивних супстанци.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Ката Т. Трифковић је резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштавањем радова на међународним скуповима. Резултати досадашњег научно-истраживачког рада кандидата у овој области приказани су публикавањем 1 (једног) рада у међународном часопису изузетне вредности (ознака групе M20: врста резултата M21a, 1 рад), затим 1 (једног) рада у врхунском међународном часопису (ознака групе M20: врста резултата M21, 1 рад), као и 3 (три) рада објављена у зборницима скупова међународног значаја штампана у целини и изводу (ознака групе M30: врста резултата M33, 2 рада; M34, 1 рад).

## Списак радова који су резултат истраживања у оквиру докторске дисертације

### Категорија M21a:

1. **Trifković K**, Milašinović N, Djordjević V, Kalagasidis Krušić M, Knežević-Jugović Z, Nedović V, Bugarski B. (2014) Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols, *Carbohydrate Polymers*, 111, 901–907. (**IF=3,916**) (ISSN: 0144-8617)

### Категорија M21:

1. **Trifković K**, Milasinović N, Djordjević V, Zdunić G, Kalagasidis Krušić M, Knežević-Jugović Z, Šavikin K, Nedović V, Bugarski B. (2015) Chitosan crosslinked microparticles with encapsulated polyphenols: Water sorption and release properties, *Journal of Biomaterials Applications*, 30(5), 618–631. (**IF=2,764**) (ISSN: 0885-3282)

### Категорија M33:

1. **Trifković KT**, Milašinović N, Kalagasidis Krušić M, Knežević-Jugović Z, Milosavljević N, Djordjević V, Bugarski B. FT-IR spectroscopy characterization of gelatin/chitosan hydrogels for encapsulation of polyphenols from *Thymus Serpyllum* L. IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“, CD proceedings pp. 326-335, 04.03-06.03. 2015, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, DOI: 10.7251/EEMSR1501326T, ISBN 978-99955-81-18-3
2. **Trifković KT**, Milašinović NZ, Isailović BD, Kalagasidis Krušić MT, Đorđević VB, Knežević-Jugović ZD, Bugarski BM. Encapsulation of *Thymus Serpyllum* L. aqueous extract in chitosan and alginate-chitosan microbeads, Book of Abstracts and Full Papers, 6<sup>th</sup> Central European Congress on Food 2012, May 23-26, 2012, Novi Sad, Srbija pp.1052-1058, Published by: University of Novi Sad, Institute of Food Technology Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia, ISBN 978-86-7994-027-8.

### Категорија M34:

1. **Trifković KT**, Nikola Z. Milašinović, Melina T. Kalagasidis Krušić, Verica B. Djordjević, Knežević-Jugović ZD, Nedovic VA, Bugarski BM. Encapsulation of *Thymus serpyllum* L. aqueous extract in chitosan microbeads, International COST conference, Action FA1001, 15-16 October 2012, Lunteren, The Netherlands.

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата **Кате Т. Трифковић, дипл. инг.**, под насловом „**Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола**“ представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног значаја. Предмет и циљеви који су постављени су јасно наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да докторска дисертација под називом „**Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола**“ у потпуности испуњава све захтеване критеријуме као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове 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 **Кате Т. Трифковић, дипл. инг.** 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, 17.10.2016. године

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

---

Др Бранко Бугарски, редовни професор  
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор  
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Верица Ђорђевић, виши научни сарадник  
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Виктор Недовић, редовни професор  
Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет

---

Др Никола Милашиновић, доцент  
Криминалистичко-полицијске академије