

Универзитет у Београду
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
Бр. 927/3
04-12-2023 год.
БЕОГРАД

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Наставно-научно веће

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације Марка Јовића, мастер хемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 9. 11. 2023. године, одређени смо у Комисију за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације Марка Јовића, мастер хемичара под насловом:

**„Развој методологије засноване на директној биоаутографији за анализу
биолошки активних компонената из природних производа“**

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад **Марка Јовића**, Комисија подноси Наставно-научном већу Хемијског факултета, следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци о кандидату

Марко Јовић је рођен 23. априла 1997. године у Пожаревцу, Република Србија. Основну школу „Дуде Јовић“ у Жабарима и Пожаревачку гимназију – природно-

математички смер у Пожаревцу је завршио са одличним успехом. Основне академске студије на студијском програму Хемија на Хемијском факултету Универзитета у Београду уписао је школске 2016/17. године. Одбраном Завршног рада под насловом „Детекција антимикробне активности, на примеру екстракта оригана, применом високо-ефикасне танкослојне хроматографије – директне биоаутографије“ при Катедри за аналитичку хемију и просечном оценом 8,80 дипломирао је 2020. године стичући звање дипломирани хемичар.

Мастер академске студије на студијском програму Хемија на Хемијском факултету Универзитета у Београду уписао је школске 2020/21. године. Одбраном Завршног рада под насловом „Танкослојна хроматографија са биолошким и биохемијским методама дериватизације“ при Катедри за аналитичку хемију и просечном оценом 10,00 дипломирао је 2021. године стичући звање мастер хемичар.

Докторске академске студије на студијском програму Хемија на Хемијском факултету уписао је школске 2021/22. године при Катедри за аналитичку хемију под менторством ван. проф. др Јелене Трифковић. Од маја 2022. запослен је на Иновационом центру Хемијског факултета у Београду д.о.о. у звању истраживач-приправник. У оквиру свог рада, Марко се бави истраживањем природних производа, анализом хране, планарном хроматографијом, биоаутографијом (антимикробни, ензимски и антиоксидативни есеји) и хеометријом.

У школској 2022/23. био је ангажован као сарадник за извођење лабораторијских вежби на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, за курс Органска хемија (студијски програм Фитомедицина), а у школској 2023/24. је такође ангажован на Пољопривредном факултету за извођење лабораторијских вежби на истом студијском програму за курс Опште и неорганске хемије.

Члан је Српског хемијског друштва и Клуба младих хемичара Србије од 2021.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Марко Јовић је коаутор два научна рада публикована у међународним часописима са SCI листе (M22 - 1, M23 – 1), једног саопштења са међународног скупа штампаног у изводу (M34) и четири саопштења са скупа националног значаја штампаних у изводу (M64):

M22 – Истакнути међународни часопис

Jović, M., Agatonović-Kustrin, S., Ristivojević, P., Trifković, J., Morton, D.
Bioassay-Guided Assessment of Antioxidative, Anti-Inflammatory and Antimicrobial
Activities of Extracts from Medicinal Plants via High-Performance Thin-Layer
Chromatography
(2023) *Molecules*, 28(21), 7346.
DOI:10.3390/molecules28217346

M23 – Међународни часопис

Jović, M., Ristivojević, P., Živković-Radovanović, V., Andrić, F., Dimkić, I., Milojković-
Opsenica, D., Trifković, J.
Statistical analysis-based green planar chromatographic methodology for the quality
assessment of food supplements: a case study on *Origanum vulgare* L. commercial products
(2023) *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 28(21), Published online: 30
11. 2023.
DOI:10.1007/s00764-023-00261-0

M34 – Саопштење са међународног скупа штампаног у изводу

Mila Č. Lazović, **Marko D. Jović**, Ivica Z. Dimkić, Dušanka M. Milojković Opsenica, Petar
M. Ristivojević, Jelena Đ. Trifković, Potential application of green extracts rich in phenolics for
innovative functional foods: Natural deep eutectic solvents as medium for isolation of
biocompounds from berries. XXII Congress EuroFoodChem, Belgrade, Serbia, 14-16 June
2023, Book of abstracts PP 84, p. 209, ISBN 978-86-7132-083-2.

M64 – Саопштења са скупа националног значаја штампаних у изводу

Marko D. Jović, Vukosava M. Živković-Radovanović, Petar M. Ristivojević, Jelena Đ.
Trifković, HPTLC based approach for assessment of antibacterial effects of selected *Lamiaceae*
family plants. 9th Conference of Young Chemists of Serbia, Novi Sad, Serbia, 4 November
2023, Book of Abstracts, PFC PP 14.

Mila Č. Lazović, Đurđa D. Krstić, **Marko D. Jović**, Jelena Đ. Trifković, Phenolic and multi-
elemental profiles as a tool for quality assessment of Serbian blackberry wines. 9th Conference

of Young Chemists of Serbia, Novi Sad, Serbia, 4 November 2023, Book of Abstracts, PFC PP 13.

Jelena Đ. Trifković, Petar M. Ristivojević, Vukosava M. Živković-Radovanović, **Marko D. Jović**, Detection of antibacterial compounds in tinctures of plants from the *Asteraceae* family using HPTLC-bioautography. 59th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, 9-10 June 2023, Book of Abstracts, AH-10.

Marko D. Jović, Vukosava M. Živković-Radovanović, Petar M. Ristivojević, Jelena Đ. Trifković, Evaluation of antifungal activity of *Origanum vulgare* L. extracts against *Candida albicans* using HPTLC-direct bioautography. 8th Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, 29 October 2022, Book of Abstracts, AC PP 18.

Marko D. Jović, Petar M. Ristivojević, Filip Lj. Andrić, Đurđa D. Krstić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Jelena Đ. Trifković, Authenticity assessment of honeydew honey based on phytochemical profile. 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, 9-10 June 2022, Book of Abstracts, AH-4.

Jelena Đ. Trifković, **Marko D. Jović**, Petar M. Ristivojević, Filip Lj. Andrić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Vukosava M. Živković-Radovanović, Statistical analysis based green planar chromatographic methodology for quality control of food supplements: case study on *Origanum vulgare*. 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Veli Lošinj, Croatia, 5-8 October 2021, Book of Abstracts, P-148.

B. Образложење теме

1. Научна област – Хемија

Ужа научна област – Аналитичка хемија

2. Предмет рада

Предмет истраживања предвиђен овом докторском дисертацијом јесте развој методологије засноване на биоаутографским методама која би се користила за анализу биолошки активних компонената из природних производа.

Развој методологије засноване на биоавтографији биће спроведено кроз три дела истраживања:

1. Развој нових и модификација у литератури описаних биоавтографских метода за идентификацију метаболита са израженом биолошком активношћу присутних у модел системима (лековито биље, зачинско биље, медљиковац различитог биљног порекла, морски сунђери).

Биоавтографија представља *in vitro* есеј којим се детектују индивидуални инхибитори микроорганизама, ензима и слободних радикала из сложених биолошких матрикса. Метода се заснива на раздвајању једињења из екстракта применом танкослојне хроматографије и накнадне дериватизације хемијским или биолошким реагенсима у циљу детекције антимикробних и антиоксидативних компонената, инхибитора ензимске активности и једињења са другим биолошким ефектима (Marston, 2011). У оквиру дисертације планирана је оптимизација параметара хроматографског система у циљу повећања ефикасности раздвајања компонената смеше, кроз одабир стационарне и мобилне фазе, као и оптимизација реагенса за дериватизацију, која укључује оптимизацију активности бактерије, ензима или слободног радикала и супстрата за добијање биолошког одговора. Након биоавтографије планирана је структурна карактеризација биолошки активних једињења применом савремених инструменталних метода.

2. Идентификацију фармакофора најактивнијих једињења применом молекулског моделовања и разумевање механизма дејства најактивних једињења.

Виртуелно профилисање засновано на уочавању сличности између молекулских електростатичких потенцијала на површини молекула (σ профила) са израженом активношћу и ћелијских рецептора, омогућило би објашњење антимикробних и антиоксидативних ефеката или ензимску активност испитиваних једињења.

3. Примену хеометријских метода за обраду података добијених након биоавтографских есеја у циљу провере аутентичности и контроле квалитета природних производа.

Процена аутентичности и контрола квалитета, нарочито у случајевима када треба дефинисати специфичне маркере са значајним нивоом поузданости, олакшана је комбиновањем аналитичке методологије са хеометријским приступом. У раду је планирана примена различитих хеометријских техника у циљу добијања поузданих математичких модела за процену биљног порекла и параметара квалитета.

3. Научни циљ истраживања

До данас је идентификовано више стотина хиљада секундарних метаболита, при чему је само мали део детаљније испитан. Највећу примену ови молекули су нашли у фармацеутској индустрији, али се користе и у козметичкој, прехранбеној и индустрији парфема. Истраживања су показала да секундарни метаболити могу имати значајну улогу у лечењу разних инфекција и других болести, попут дијабетеса, карцинома и генетских обољења, због чега представљају активне компоненте многих фармацеутских препарата (Urbain i Simões-Pires, 2014). Међутим, услед комплексног састава природних производа, као и великог броја секундарних метаболита различите структуре и поларности, неопходан је развој ефикасних аналитичких метода које би омогућиле идентификацију и квантификацију ових једињења и пружиле информације о њиховим својствима.

Високо-ефикасна танкослојна хроматографија (*HPTLC*) има широку примену у анализи секундарних метаболита. Информације о структури раздвојених компонената добијају се спрезањем *HPTLC*-а са инструменталним методама, попут масене спектрометрије (*MS*), нуклеарно магнетно-резонантне спектроскопије (*NMR*), инфрацрвене спектрометрије са Фуријевом трансформацијом (*FTIR*), итд. (Jeppesen i Powers, 2023; Móricz i Ott, 2016). Хроматографско профилисање је уобичајена метода за процену квалитета и аутентичности природних производа. Овакав приступ се заснива на скупу карактеристичних хроматографских сигнала који се третирају као јединствени „отисак прста“. Спрезањем са хеометријом, хроматографско профилисање се може користити за идентификацију карактеристичних хемијских маркера, карактеризацију и класификацију производа различитог порекла и свеобухватну процену квалитета природних производа (Donno i sar., 2016). *HPTLC* се показала као подједнако ефикасна техника за профилисање сложене смеше метаболита као високо-ефикасна течна хроматографија (*HPLC*) и гасна хроматографија (*GC*) (Krstić i sar., 2022). У поређењу са поменутиим хроматографским методама, нуди истовремену

анализу до 20 узорака за кратко време и могућност примене великог броја растварача различите поларности комбинованих у једну мобилну фазу. Јединствена карактеристика *HPTLC*-а је да спрезањем са биолошким и хемијским методама дериватизације може пружити информације о биоактивним компонентама сложених узорака, односно њиховом антибактеријским, антифунгалним, антиоксидативним и другим потенцијалима (Choma i Jesionek, 2015; Kowalska i Sajewicz, 2022). Поред тога, узимајући у обзир високу цену опреме, утрошак времена и енергије у анализи применом хроматографских метода у колони, оптимизација биоаутографије може значајно допринети метаболичком профилисању природних производа, контроли квалитета, као и у потрази за биоактивним једињењима за потребе фармацеутске индустрије, а да при томе својим бројним предностима смањи употребу ресурса и утрошак времена неопходних у раду са конвенционалним аналитичким методама.

Научни циљ ове дисертације је да се анализом метаболита из неколико различитих природних производа оптимизује поступак детекције антимикуробних и антиоксидативних агенаса, као и инхибитора активности ензима важних за метаболизам човека. Предложени поступак представљао би алтернативу конвенционалним хемијским и биолошким методама у анализи секундарних метаболита. Додатно, у оквиру дисертације испитаће се могућност примене молекулског моделовања и хеометријских метода за обраду података у циљу одабира најактивнијих једињења, разумевања механизма њихове активности и примене у анализи квалитета.

4. Методе истраживања

У циљу екстракције секундарних метаболита биће коришћена метода екстракције потпомогнута ултразвуком и метода мацерације. Као екстракциона средства послужиле, по литератури, најчешће коришћени органски растварачи за ове сврхе.

Једињења из припремљених екстраката са антимикуробном, антиоксидативном и активношћу према ензимима биће детектована применом директне биоаутографије након *HPTLC* раздвајања. Ово подразумева наношење суспензија микроба, раствора ензима и радикалских агенаса директно на плочу са раздвојеним компонентама екстраката.

У циљу идентификације екстрахованих једињења у узорцима, осим *HPTLC* анализе праћене обрадом слике хроматограма, биће коришћена ултра-ефикасна течна хроматографија са хибридним масеним детектором високе резолуције који комбинује линеарни трап-квадрупол и орбитрап масени анализатор (*UHPLC-LTQOrbiTrapXL*), *NMR* и *FTIR*, док ће за квантификацију фенолних једињења бити коришћен *UHPLC* са ултравиолетним детектором са више диода (*DAD*) и масеним детектором са три анализатора – троструки квадрупол (*QQQ*, triplequadrapol, *UHPLC-DADMS/MS*). Саржај укупних фенолних једињења, флавоноида и антиоксидативне активности биће одређена применом *UV/Vis* спектрофотометрије. Антимикробна активност ће бити одређена конвенционалним *in vitro* методама (одређивање минималне инхибиторне концентрације и агар дифузиони тест).

У раду ће бити коришћена колекција Грам-позитивних (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, *Styphyloloccus aureus* ATCC 6538, meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932) и Грам-негативних (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) бактеријских изолата. Ензимски есеји ће бити изведени на α -амилази и циклооксигенази-1, док ће антиоксидативна активност бити испитана применом 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (*DPPH*) радикала.

Молекулско моделовање применом специјализованог софтвера биће коришћено за идентификацију фармакофора једињења са израженом активношћу. Статистичке методе попут мултиваријантне анализе и анализе разлике рангова спрегнуте са биоаутографским тестовима, биће коришћене у циљу провере аутентичности, односно одређивања биљног порекла, као и за проверу квалитета природних производа.

5. Актуелност проблематике

Имајући у виду да резистенција на лекове и потреба за новим терапијским средствима представљају данас све већи изазов, развој биоаутографије, *in vitro* есеја којим се детектују индивидуални инхибитори микроорганизама, ензима и слободних радикала из сложених биолошких матрикса, пружио би стратешки приступ испитивању нових потенцијалних лекова из природних производа, попут биљака, морских организама и микроорганизама. У поређењу са конвенционалним хемијским и биолошким методама испитивања, предности

ове технике огледају се у комбиновању хроматографског раздвајања, детекције и биолошког есеја у једној анализи, омогућавајући тако истовремено одвајање и идентификацију биоактивних једињења.

С друге стране, биоаутографија у комбинацији са хеометријским методама могла би да обезбеди алтернативни, бржи и јефтинији приступ контроли квалитета животних намирница у односу на конвенционалне методе које се користе у испитивању аутентичности. Контрола квалитета животних намирница представља незаобилазан корак у провери безбедности, нутритивне вредности и усклађености прехранбених производа са утврђеним стандардима и прописима.

Будући да савремени трендови у аналитичкој хемији теже оптимизацији и примени зелених метода, тренутни научни подухвати који се фокусирају на унапређење директне биоаутографије имају за циљ развој зеленијег, ефикаснијег и свеобухватног поступка анализе природних производа. Применом овакве методологије значајно би била смањена употреба еколошки-неприхватљивих аналитичких техника током којих се троше велике количине органских растварача и које су енергетски захтевне. .

6. Очекивани резултати

Кандидат Марко Јовић ће у оквиру ове докторске дисертације:

- Оптимизовати поступак екстракције и услове хроматографског раздвајања *HPTLC*-ом секундарних метаболита из одабраних природних производа (лековите биљке из традиционалне медицине, морски сунђери из Јадранског мора, медљиковац различитог ботаничког порекла, зачинско биље заступљено у свакодневној исхрани);
- Применити хемијске методе дериватизације у циљу визуализације различитих класа једињења присутних у природним производима након раздвајања *HPTLC*-ом;
- Развити директну биоаутографију (антимикробни есеји на хуманим патогенима, антиоксидативни и ензимски есеји);
- Развити методу за квантификацију и поређење антимикробних и антиоксидативних ефеката, као и инхибиторне активности према ензимима, засноване на софтверској обради слика хроматограма и изразити поменуте активности у односу на стандардне супстанце;

- Применити *UV/Vis* спектрофотометрију за одређивање садржаја фенолних једињења и антиоксидативне активности, и добијене резултате упоредити са резултатима квантификације ових параметара на *HPTLC*-у;
- Структурно окарактерисати компоненте са израженом активношћу применом масене спектрометрије високе резолуције, *NMR*-а и *FTIR*-а;
- Применити ултра-ефикасну течну хроматографију у циљу квантификације екстрахованих једињења;
- Применити *in vitro* микробиолошке методе, попут одређивања минималне инхибиторне концентрације и агар дифузионог теста за одређивање антимикуробне активности екстраката, и добијене резултате упоредити са резултатима оптимизованих биоаутографских есеја;
- Идентификовати фармакофоре најактивнијих једињења применом молекулског моделовања;
- Применити хеометријске методе за обраду података у циљу примене биоаутографије у процени аутентичности животних намирница и додатака храни.

7. Литература

Choma, I., & Jesionek, W. (2015). Chapter 11. Effects-Directed Biological Detection. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography* (pp. 279–312). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417223-4.00011-X>

Donno, D.; Boggia, R.; Zunin, P.; Cerutti, A. K.; Guido, M.; Mellano, M. G.; Prgomet, Z.; Beccaro, G. L. Phytochemical Fingerprint and Chemometrics for Natural Food Preparation Pattern Recognition: An Innovative Technique in Food Supplement Quality Control. *Journal of Food Science and Technology* **2015**, 53 (2), 1071-1083. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2115-6>.

Jeppesen, M. J.; Powers, R. Multiplatform Untargeted Metabolomics. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2023**. <https://doi.org/10.1002/mrc.5350>.

Kowalska, T.; Sajewicz, M. Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules* **2022**, 27 (19), 6607. <https://doi.org/10.3390/molecules27196607>.

Krstić, Đ.; Tosti, T.; Đurović, S.; Fotirić Akšić, M.; Đorđević, B.; Milojković-Opsenica, D.; Andrić, F.; Trifković, J. Primary Metabolite Chromatographic Profiling As a Tool for Chemotaxonomic Classification of Seeds from Berry Fruits. *Food Technology and Biotechnology* **2022**, 60 (3), 406-417. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.03.22.7505>.

Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (19), 2676–2683. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>

Móricz, Á.M.; Ott, P. Conventional and Modern bioassays—detection, Isolation, Identification. *Forced-Flow Layer Chromatography* **2016**, 347-395. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420161-3.00006-x>.

Urbain, A.; Simões-Pires, C. A. (2014). Thin-Layer Chromatography of Plants, with Chemical and Biological Detection Methods. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; American Cancer Society, pp 1–22. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9907>.

Г. Закључак

На основу свих елемената изложених у овом Извештају, Комисија сматра да ће планирана истраживања пружити значајан допринос у детекцији и карактеризацији биолошки активних једињења. Такође, резултати дисертације би могли да допринесу стандардизацији методологије засноване на директној биоаутографији у анализи природних производа. Комисија сматра да планирана истраживања прате актуелне трендове у аналитичкој хемији.

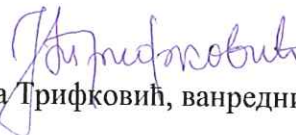
Сагласно Закону о високом образовању и Статуту Хемијског факултета, сматрамо да кандидат Марко Јовић, студент докторских студија, испуњава све потребне услове за одобравање израде докторске дисертације. На основу тога, Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да Марку Јовићу, мастер хемичару, одобри израду докторске дисертације под насловом:

„Развој методологије засноване на директној биоаутографији за анализу биолошки активних компонената из природних производа“

За ментора се предлаже проф. др Јелена Трифковић, ванредни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета. Списак радова предложеног ментора из којег се може видети да испуњава услове из Стандарда за акредитацију студијских програма докторских студија дат је у Прилогу.

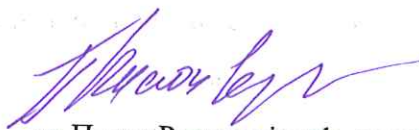
У Београду, 4.12.2023.

Комисија:



др Јелена Трифковић, ванредни професор

Универзитет у Београду - Хемијски факултет



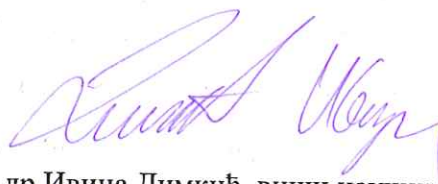
др Петар Ристивојевић, доцент

Универзитет у Београду - Хемијски факултет



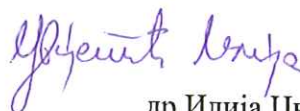
др Вукосава Живковић-Радовановић, виши научни сарадник

Универзитет у Београду - Хемијски факултет



др Ивица Димкић, виши научни сарадник

Универзитет у Београду – Биолошки факултет



др Илија Цвијетић, доцент

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Прилог: Изабрани радови предложеног ментора проф. др Јелена Трифковић

1. Lazović, M., Cvijetić, I., Jankov, M., Milojković-Opsenica, D., **Trifković, J.**, Ristivojević, P., (2023). COSMO-RS in prescreening of Natural Eutectic Solvents for phenolic extraction from *Teucrium chamaedrys*. *Molecular Liquids*, 387, 122649.
2. Krstić, Đ. D., Ristivojević P. M., Gašić U. M., Lazović M., Fotirić Akšić, M. M., Milivojević J., Morlock G. E., Milojković-Opsenica, D. M., **Trifković J. Đ.**, (2023). Authenticity assessment of cultivated berries via phenolic profiles of seeds. *Food Chemistry*, 402, 134184.
3. Vasić, V., Đurđić, S., Tosti, T., Radoičić, A., Lušić, D., Milojković-Opsenica, Tešić, Ž., **Trifković, J. Đ.**, (2020). Two aspects of honeydew honey authenticity: Application of advance analytical methods and chemometrics. *Food Chemistry*, 305, 125457.
4. Vasić, V., Gašić, U., Stanković, D., Lušić, D., Vukić-Lušić, D., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž. and **Trifković, J.** (2019). Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. *Food chemistry*, 274, 629-641.
5. Ristivojević, P, **Trifković, J.**, Vovk, I, Milojković-Opsenica, D. (2017), Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin, *Talanta*, 162, 72–79.
6. Dimkić, I, Ristivojević, P, Janakiev, T, Berić, T, **Trifković, J.**, Milojković-Opsenica, D, Stanković, S. (2016), Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis, *Industrial Crops and Products*, 94, 856-871.