

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jovana M. Stanković

Halofitne biljne vrste – izolovanje i
karakterizacija sekundarnih metabolita

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Jovana M. Stanković

Halophytic plant species – isolation and
characterization of secondary metabolites

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentori:

dr Vele Tešević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Miroslav Novaković, naučni saradnik
Naučna ustanova Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Dejan Godevac, naučni savetnik
Naučna ustanova Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja, Univerzitet u Beogradu

dr Ljubodrag Vujisić, docent
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Zora Dajić Stevanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Beograd, 2019.

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (172053).

Mentoru prof. dr Veletu Teševiću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu zahvaljujem se na izboru interesantne teme kao i na nesebičnoj pomoći, ukazanom poverenju i korisnim savetima prilikom izrade ove teze. Mentorima dr Miroslavu Novakoviću, naučnom saradniku IHTM i dr Dejanu Gođevcu naučnom savetniku IHTM hvala na velikoj pomoći, podršci i korisnim savetima prilikom izrade naučnih radova proizašlih iz ove disertacije, izrade i pisanja same teze. Prof. dr Vlatki Vajs, naučnom savetniku IHTM i akademiku prof. dr Slobodanu Milosavljeviću, redovnom članu SANU, zahvaljujem se na korisnim savetima, pomoći i podršci. Na poseban način se zahvaljujem dr Milki Jadranin i Marini Todosijević koje su mi prenele veliki deo svog iskustva pri radu u laboratoriji, na velikoj pomoći i savetima. Docentu, dr Ljubodragu Vujisiću sam zahvalna na pomoći i savetima prilikom pisanja disertacije. Iskrenu zahvalnost dugujem prof. dr Zori Dajić-Stevanović na pomoći pri sakupljanju i determinaciji biljnog materijala, na nesebičnom pružanju znanja o halofitama i na velikoj pomoći prilikom pisanja jednog dela ove disertacije. Kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu, dr Ivani Aljančić, dr Iris Đorđević, dr Nini Todorović, dr Snežani Trifunović, dr Borisu Mandiću, dr Ivanu Vučkoviću, Dejanu Vučetiću, Katarini Simić i Stefanu Ivanoviću se zahvaljujem na savetima i podršci. Takođe zahvaljujem dr Ani Ćirić, dr Marini Soković i dr Miroslavi Stanković na stručnoj pomoći, uspešnoj saradnji i odrađenim eksperimentima za ispitivanje bioloških aktivnosti. Kolegama sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „dr Josif Pančić“, dr Nebojši Menkoviću i dr Gordani Zdunić neizmerno sam zahvalna što su mi omogućili i pomogli izradu jednog dela eksperimentalnog rada ove disertacije. Posebno se zahvaljujem kolegama iz laboratorije, Mirjani Cvetković, Gordani Krstić, Ivani Sofrenić i Bobanu Anđelkoviću na lepom druženju, pomoći i podršci u toku izrade ove disertacije. Zahvaljujem se diplomcima Ivani Ljubičić, Milici Daničić i Mariji Ćirić koji su učestovali u eksperimentalnom radu u okviru ove doktorske disertacije.

Mojim kolegama sa studija, Bobi, Stefanu, Filipu, Marku, Luki, Dragici, Jeleni, Jecki, Jovani i Dragani hvala na svim lepim trenucima i druženju. Veliku zahvalnost dugujem Igoru na nesebičnoj podršci i razumevanju. Zahvaljujem se najboljim drugaricama Radi, Maji, Jeli, Nadi i Kristini na velikoj podršci i iskrenom radovanju za svaki moj uspeh.

Posebno veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici, ocu Milošu, majci Tatijani, bratu Nenadu i sestri Eleni za neizmernu podršku, pomoć i razumevanje tokom svih ovih godina.

Ovu disertaciju posvećujem mami i tati

Autor

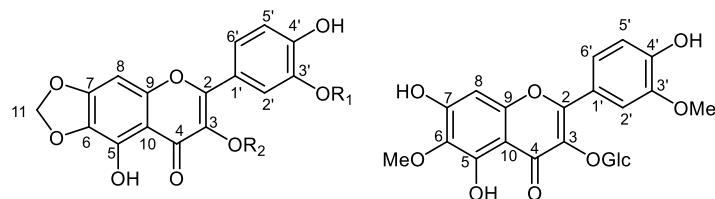
Halofitne biljne vrste – izolovanje i karakterizacija sekundarnih metabolita

Izvod

Predmet proučavanja ove doktorske disertacije su sekundarni metaboliti halofita (biljaka koje naseljavaju staništa sa visokim sadržajem soli). U Srbiji se zaslanjena staništa uglavnom javljaju na teritoriji Vojvodine. U ovom radu izolovani su i hemijski okarakterisani flavonoidni glikozidi i saponini iz halofitnih vrsta roda *Atriplex* (*A. littoralis*, *A. tatarica* i *A. prostrata*) i određena je njihova različita biološka aktivnost. Pored biljaka iz roda *Atriplex* ispitivana je halofitna biljna vrsta *Artemisia santonicum* iz koje je izolovano etarsko ulje, određen hemijski sastav i ispitana biološka aktivnost.

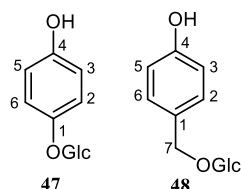
Halofitne biljne vrste se u tradicionalnoj medicini koriste u brojne svrhe kao antiseptici, diuretici, antiparazitici, antipiretici, purgativi, laksativi, za lečenje dijabetesa, visokog krvnog pritiska, astme, gihta i reumatizma. Ekstrakti i jedinjenja izolovana iz vrsta roda *Atriplex* pokazuju antioksidativnu, antimikrobnu, citotoksičnu, antiparazitsku, i insekticidnu aktivnost. Etarska ulja vrsta roda *Artemisia* su pokazala antioksidativnu, antibakterijsku, antifungalnu, antiparazitsku, hepatoprotektivnu, neuroprotektivnu i antimalarijsku aktivnost.

Vrste roda *Atriplex* su bogat izvor sekundarnih metabolita prvenstveno flavonoida, saponina i alkaloida. U okviru ove disertacije izolovano je i okarakterisano ukupno 13 jedinjenja, od kojih je 7 novih prirodnih proizvoda (**43-45, 51-54**). Iz vrste *A. littoralis* izolovano je 6 jedinjenja, četiri flavonoidna glikozida (**43-46**) i dva fenolna jedinjenja (**47, 48**). Iz *A. tatarica* izolovano je 6 jedinjenja, tri flavonoidna glikozida (**49-51**) i tri triterpenska saponina oleanolnog tipa (**52-54**). Iz etarskog ulja *Artemisia santonicum* izolovan je oksigenovani monoterpen (**55**).



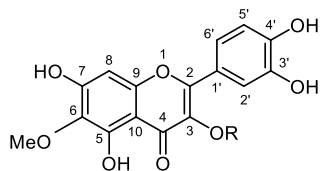
43: R₁ = H; R₂ = Glcp(2-1)-Rhap
 44: R₁ = Me; R₂ = Glcp(2-1)-Rhap
 45: R₁ = Me; R₂ = Glcp(6-1)-Rhap

46

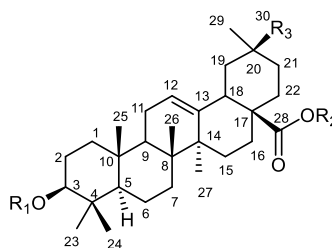


47

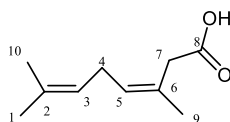
48



49: R = Glcp(2-1)-Apif
 50: R = Glcp(2-1)-Apif(5-O)-feruloyl
 51: R = Glcp(2-1)-GlcAp(2-O)-feruloyl



52: R₁ = Arap(2-1)Galp(OSO₃H), R₂ = Glcp1, R₃ = CHO
 53: R₁ = Arap(2-1)Galp(OSO₃H), R₂ = Glcp1, R₃ = CH₂OH
 54: R₁ = Arap(2-1)Galp(2-1)Glcp2, R₂ = Glcp1, R₃ = CHO



55

Za jedinjenja koja su izolovana iz *A. littoralis* (**43-48**) ispitivan je protektivni efekat na DNK humanih limfocita. Najjači efekat smanjenja pojave mikronukleusa pokazalo je jedinjenje **45**. Antibakterijska aktivnost kao i određivanje uticaja izolovanih jedinjenja (**49-54**) na proces formiranja biofilma PAO1 ispitivana su za jedinjenja koja su izolovana iz *A. tatarica*. Najbolju aktivnost prema *Micrococcus flavus* i *Pseudomonas aeruginosa* pokazalo je jedinjenje **51**, dok je prema *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* najjaču aktivnost pokazalo jedinjenje **49**. Izolovani saponini (**52-54**) imaju više izraženu aktivnost inhibicije formiranja biofilma od izolovanih flavonoidnih glikozida (**49-51**). Najbolju anti-biofilm aktivnost pokazalo je jedinjenje **52**. Metoda bioautografije je korišćena za određivanje antibakterijske aktivnosti frakcija koje su izolovane iz *A. prostrata*. Aktivnost je ispitivana na četiri

bakterijske vrste: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *M. flavus*. Saponinske frakcije su pokazale aktivnost prema svim bakterijskim sojevima, dok je flavonoidna frakcija inhibirala dejstvo *M. flavus*. Za etarsko ulje i jedinjenje **55** ispitivana je antibakterijska (mikrodiluciona i metoda bioautografije), antifungalna aktivnost i anti-quorum sensing aktivnost (AQS). Od mehanizama koji su uključeni u anti-quorum sensing ispitivani su uticaji ulja i jedinjenja **55** na proces formiranja biofilma, testovi pokretljivosti (twitching i flagella test) i uticaj na inhibiciju sinteze piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1. I izolovano etarsko ulje i jedinjenje **55** su pokazali efekte na sve testirane mehanizme uključene u AQS aktivnost, a jedinjenje **55** je pokazalo jaču antibakterijsku i antifungalnu aktivnost od etarskog ulja i komercijalnih antibiotika (streptomycin i ampicilin) i antimikotika (bifonazol i ketokonazol).

Ključne reči: Halofite, *Atriplex*, *Artemisia*, flavonoidni glikozidi, saponini, DNK protektivna aktivnost, antibakterijska, antifungalna, anti-quorum sensing aktivnost.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj: 547

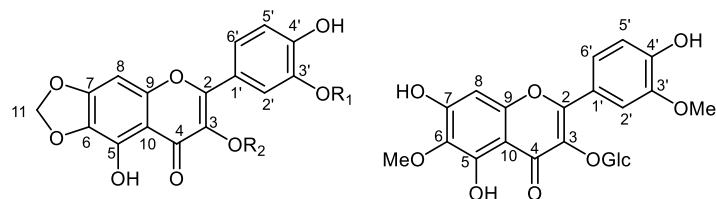
Halophytic plant species – isolation and characterization of secondary metabolites

ABSTRACT

The subject of this doctoral dissertation are the secondary metabolites of halophytes (plants wild growing at saline habitats). In Serbia such habitats are mainly found in Vojvodina. Flavonoid glycosides and saponins from halophytic species *Atriplex* (*A. littoralis*, *A. tatarica* and *A. prostrata*) were isolated, chemically characterized and their various biological activities were determined. In addition, a halophyte species from the genus *Artemisia* (*A. santonicum*) was examined. Its essential oil was isolated, the chemical composition determined and various biological activities of this were tested.

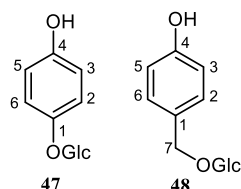
Several halophytic plant species are used in many traditional formulations as antiseptics, diuretics, antiparasitics, antipyretics, purgatives, laxatives, for the treatment of diabetes, high blood pressure, asthma, gout and rheumatism. Extracts and compounds isolated from the genus *Atriplex* show antiparasitic, insecticidal, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity. Essential oils of the genus *Artemisia* have shown antioxidant, antibacterial, antifungal, antiparasitic, hepatoprotective, neuroprotective and antimalarial activity.

Atriplex species are a rich source of secondary metabolites, primarily flavonoids, saponins and alkaloids. In this study, a total of 13 compounds were isolated and characterized by means of spectroscopic techniques (1D and 2D NMR, IR and MS). Among them seven (**43-45**, **51-54**) were the new compounds. At the same time, in the extract of *A. littoralis*, six compounds, four flavonoid glycosides (**43-46**) and two phenolic compounds (**47**, **48**) were identified. From *A. tatarica* six compounds, three flavonoid glycosides (**49-51**) and three triterpene saponins of an oleanane type (**52-54**) were isolated. An oxygenated monoterpene (**55**) was isolated from *Artemisia santonicum* essential oil.



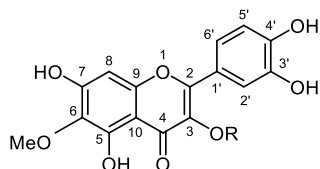
43: R₁ = H; R₂ = Glcp(2-1)-Rhap
 44: R₁ = Me; R₂ = Glcp(2-1)-Rhap
 45: R₁ = Me; R₂ = Glcp(6-1)-Rhap

46

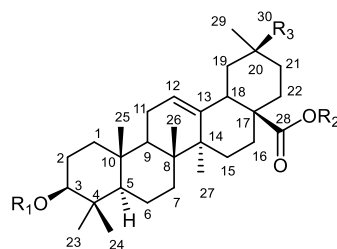


47

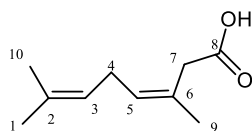
48



49: R=Glcp(2-1)-Apif
 50: R=Glcp(2-1)-Apif(5-O)-feruloyl
 51: R=Glcp(2-1)-GlcAp(2-O)-feruloyl



52: R₁=Arap(2-1)Galp(OSO₃H), R₂=Glcp1, R₃=CHO
 53: R₁=Arap(2-1)Galp(OSO₃H), R₂=Glcp1, R₃=CH₂OH
 54: R₁=Arap(2-1)Galp(2-1)Glcp2, R₂=Glcp1, R₃=CHO



55

A protective effect on human lymphocytes DNA was investigated for compounds isolated from *A. littoralis* (**43-48**). The strongest effect of reducing the occurrence of micronuclei was shown by flavonoid **45**. Antibacterial activity as well as the determination of the influence of compounds isolated from *A. tatarica* (**49-54**) on the PAO1 biofilm formation process were examined. The best activity against *Micrococcus flavus* and *Pseudomonas aeruginosa* showed compound **51**, while against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* the strongest activity was shown by compound **49**. Isolated saponins (**52-54**) exhibited a more pronounced biofilm inhibition activity than flavonoid glycosides (**49-51**). The best anti-biofilm activity showed compound **52**. The bioautography method was used to determine the antibacterial

activity of the fractions isolated from *A. prostrata*. The activity was studied on four bacterial strains: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* and *M. flavus*. Saponin fractions showed activity against all bacterial strains, while flavonoid fraction exhibited antibacterial activity only against *M. flavus*. The essential oil of *Artemisia santonicum* and its constituent **55** were tested for antibacterial (microdilution and bioautography), antifungal and anti-quorum sensing (AQS) activity. Among the mechanisms involved in AQS the effects of oil and compound **55** on the biofilm formation process, the mobility tests (twitching and flagella test), and the effect on the inhibition of the pyocyanin synthesis in *P. aeruginosa* PAO1 were examined. Both essential oil and the isolated compound **55** showed effects on all tested mechanisms involved in AQS activity. Compound **55** exhibited stronger antibacterial and antifungal activity than the essential oil, commercial antibiotics (streptomycin and ampicillin) and antimycotics (bifonazole and ketoconazole).

Key words: halophytes, *Atriplex*, *Artemisia*, flavonoid glycosides, saponins, DNA protective activity, antibacterial, antifungal, anti-quorum sensing activity.

Academic Expertise: Chemistry

Field of Academic Expertise: Organic Chemistry

UDK number: 547

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPŠTI DEO.....	2
1.1. Definicija i karakteristike halofita.....	2
1.1.1. Klasifikacija halofita.....	4
1.1.2. Zastupljenost halofita.....	4
1.1.3. Podela zaslanjenih staništa.....	5
1.1.4. Specifični mehanizmi adaptacije biljnih vrsta na stres uzrokovan povećanom koncentracijom soli	6
1.1.4.1. Mehanizam izlučivanja soli.....	7
1.1.5. Tradicionalna upotreba halofita	9
1.1.6. Bioaktivna jedinjenja u halofitama	10
1.2. Familija Amaranthaceae.....	11
1.3. Rod <i>Atriplex</i>	11
1.3.1. <i>Atriplex littoralis</i>	12
1.3.2. <i>Atriplex tatarica</i>	13
1.3.3. <i>Atriplex prostrata</i>	15
1.4. Familija Asteraceae	16
1.4.1. Rod <i>Artemisia</i>	16
1.4.2. <i>Artemisia santonicum</i>	17
1.5. Izolovana jedinjenja iz roda <i>Atriplex</i>	18
1.6. Hemijski sastav etarskih ulja <i>Artemisia</i> vrsta.....	24
1.6.1. Hemijski sastav etarskog ulja <i>Artemisia santonicum</i>	30
1.7. Biološke aktivnosti.....	31
1.7.1. Biološka aktivnost ekstrakata i etarskih ulja halofitnih biljnih vrsta	31
1.7.2. Biološka aktivnost vrsta iz roda <i>Atriplex</i>	34
1.7.3. Biološka aktivnost oleanolnih saponina i patuletinskih i kvercetagetinskih flavonoida	35
1.7.4. Biološka aktivnost etarskog ulja <i>Artemisia santonicum</i>	35
1.7.5. Antibakterijska aktivnost-metoda bioautografije.....	36
1.7.6. „Quorum sensing“	37
1.7.6.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
1.7.6.2. Formiranje biofilma	38
1.7.6.3. Testovi pokretljivosti (Twitching i flagella motility)	39
1.7.6.4. Produkcija piocijanina	39
2. NAŠI RADOVI.....	40

2.1. Jedinjenja izolovana iz biljne vrste <i>Atriplex littoralis</i>	41
2.1.1. Određivanje strukture kvercetagetin 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida-atripleksina I (43).....	41
2.1.2. Određivanje strukture 3'- <i>O</i> -metilkvercetagetin 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida – atripleksina II (44).....	48
2.1.3. Određivanje strukture 3'- <i>O</i> -metilkvercetagetin 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozida – atripleksina III (45)	53
2.1.4. Poznata jedinjenja izolovana iz <i>Atriplex littoralis</i>	58
2.2. Jedinjenja izolovana iz biljne vrste <i>Atriplex tatarica</i>	67
2.2.1. Određivanje strukture patuletin 3- <i>O</i> - β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49).....	68
2.2.2. Određivanje strukture patuletin 3- <i>O</i> -(5'''- <i>O</i> -feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (50).....	75
2.2.3. Određivanje strukture patuletin 3- <i>O</i> -(2'''- <i>O</i> -feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida – atripleksina IV (51)	81
2.2.4. Određivanje strukture β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> -(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (52).....	88
2.2.5. Određivanje strukture β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> -(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (53)	96
2.2.6. Određivanje strukture β -D-glukopiranozil-3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (54)	104
2.3. Etarsko ulje biljke <i>Artemisia santonicum</i>	112
2.3.1. Određivanje strukture izogeranilne kiseline (55).....	116
2.4. Biološke aktivnosti.....	123
2.4.1. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita	123
2.4.2. Antibakterijska aktivnost jedinjenja izolovanih iz <i>Atriplex tatarica</i>	126
2.4.3. Određivanje uticaja izolovanih jedinjenja iz <i>Atriplex tatarica</i> na proces formiranja biofilma PAO1	127
2.4.4. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti frakcija iz <i>Atriplex prostrata</i> metodom bioautografije na HPTLC pločama	128
2.4.5. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskog ulja <i>Artemisia santonicum</i> i izogeranilne kiseline - mikrodiluciona metoda	132
2.4.6. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskog ulja <i>Artemisia santonicum</i> -metodom bioautografije.....	133
2.4.7. Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskog ulja <i>Artemisia santonicum</i> -metodom bioautografije.....	134
2.4.8. Ispitivanje anti-QS aktivnosti etarskog ulja iz <i>Artemisia santonicum</i> i izogeranilne kiseline.....	135
2.4.8.1. Anti-QS aktivnost.....	135
2.4.8.2. Ispitivanje uticaja etarskog ulja iz <i>Artemisia santonicum</i> i izogeranilne kiseline na proces formiranja biofilma PAO1	136
2.4.8.3. Testovi pokretljivosti (Twitching i flagella motility)	136
2.4.8.4. Produkcija piocijanina	138

3. EKSPERIMENTALNI DEO	140
3.1. Aparati i rastvarači	140
3.2. Biljni materijal i postupak frakcionisanja ekstrakta	143
3.2.1. Biljni materijal	143
3.2.2. Ekstrakcija biljnog materijala i frakcionisanje ekstrakta <i>Atriplex littoralis</i>	144
3.2.3. Ekstrakcija biljnog materijala i frakcionisanje ekstrakta <i>Atriplex tatarica</i>	144
3.2.4. Ekstrakcija biljnog materijala i frakcionisanje ekstrakta <i>Atriplex prostrata</i>	145
3.2.5. Izolovanje etarskog ulja iz biljne vrste <i>Artemisia santonicum</i>	145
3.2.6. Analiza etarskog ulja visoko efikasnom tankoslojnom hromatografijom (HPTLC)	146
3.3. Izolovanje čistih jedinjenja	146
3.3.1. Razdvajanje butanolnog ekstrakta <i>Atriplex littoralis</i>	146
3.3.2. Razdvajanje frakcija ekstrakta <i>Atriplex tatarica</i>	148
3.3.3. Visoko efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) <i>Atriplex prostrata</i>	149
3.3.4. Hidroliza saponina i flavonoidnih glikozida	149
3.3.5. Dry flash hromatografija izolovanog ulja <i>Artemisia santonicum</i>	150
3.3.6. Spektroskopski podaci za nova jedinjenja	151
3.4. Biološke aktivnosti	152
3.4.1. Protektivni efekat jedinjenja izolovanih iz <i>Atriplex littoralis</i> na DNK humanih limfocita....	152
3.4.2. Antibakterijska aktivnost jedinjenja izolovanih iz <i>Atriplex tatarica</i>	154
3.4.3. Određivanje uticaja izolovanih jedinjenja iz <i>Atriplex tatarica</i> na proces formiranja biofilma PAO1	155
3.4.4. Antibakterijska aktivnost – metoda bioautografije	155
3.4.5. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja <i>Artemisia santonicum</i> i izogeranilne kiseline mikrodiluciona metoda	156
3.4.6. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti metodom bioautografije	157
3.4.7. Antifungalna aktivnost etarskog ulja i izogeranilne kiseline <i>Artemisia santonicum</i>	157
3.4.8. Određivanje uticaja ulja i izogeranilne kiseline na proces formiranja biofilma PAO1	158
3.4.9. Testovi pokretljivosti (twitching i flagella test)	159
3.4.10. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i izogeranilne kiseline na inhibiciju sinteze piocijanina kod <i>P. aeruginosa</i> PAO1	159
4. ZAKLJUČAK	160
Literatura	162
BIOGRAFIJA	177

Spisak simbola i skraćenica

- TLC – (Thin Layer Chromatography) tankoslojna hromatografija
- HPTLC – (High-performance Thin Layer Chromatography) visokoefikasna tankoslojna hromatografija
- UV/VIS – (Ultraviolet and Visible Spectroscopy) ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija
- DAD – Diode Array Detection detekcija nizom dioda
- IR – (Infrared Spectroscopy) infracrvena spektroskopija
- ^1H NMR – (^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) ^1H nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija
- ^{13}C NMR – (^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) ^{13}C nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija
- HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence
- HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence
- NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- ROESY – Rotating-frame Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
- COSY – Correlated Spectroscopy
- TOCSY – Total Correlated Spectroscopy
- GC/FID – (Gas Chromatography/Flame Ionization Detector) gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom
- GC/MS – (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) gasna hromatografija povezana sa masenim spektrometrom
- EI – (Electron Ionization) elektronska jonizacija
- HPLC – (High Performance Liquid Chromatography) visokoefikasna tečna hromatografija
- HRESIMS – (High Resolution ElectroSpray Ionization Mass) elektrosprej masena spektrometrija visoke rezolucije
- δ_{H} – hemijsko pomeranje u ^1H NMR spektru
- δ_{C} – hemijsko pomeranje u ^{13}C NMR spektru
- $[\text{M}-\text{H}]^-$ – deprotonovani molekul dobijen odlaskom atoma vodonika
- $J_{x,y}$ – konstanta sprezanja protona X sa protonom Y (u Hz)
- $[\alpha]_{\text{D}}$ – specifična rotacija

Δ – položaj dvostruke veze
GlcP – glukopiranozil grupa
Apif – apiofuranozil grupa
Fucp – fukopiranozil grupa
Xylp – ksilopiranozil grupa
Galp – galaktopiranozil grupa
GlcAp – glukuronopiranozil grupa
Rhap – ramnopiranozil grupa
Arap – arabinopiranozil grupa
Feruloyl – feruloil grupa
CD₃OD – deuterisani metanol
CDCl₃ – deuterisani hloroform
TMS – tetrametilsilan
BN – binuklearne ćelije
MN – mikronukleus
CBMN – (Cytokinesis Block Micronucleus Assay) mikronukleusni test blokirane citokineze
CBPI – (Cytokinesis Block Proliferation Index) proliferacioni indeks blokirane citokineze
MMC – mitomicin C
PAO1 – *Pseudomonas aeruginosa*
CC – (column chromatography) gravitaciona hromatografija na koloni
A-549 – ćelijska linija karcinoma pluća
DLD-1 – ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva
Caco-2 – ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva
HT-29 – ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva
HepG2 – ćelijska linija humanog karcinoma jetre
HCT 116 – ćelijska linija karcinoma debelog creva
AGS – ćelijska linija karcinoma želuca
MCF-7 – ćelijska linija karcinoma dojke
HT-1080 – ćelijska linija fibrosarkoma
HK/68 – virus gripa tip HK/68

H1N1 – virus gripa tip H1N1

AHL – N-acil-homoserinski laktoni

QS – Quorum Sensing

AQS – Anti-Quorum Sensing

MIK – Minimalna inhibitorna koncentracija

MBK – Minimalna baktericidna koncentracija

MFK – Minimalna fungicidna koncentracija

UVOD

Ova teza je urađena na Odeljenju za instrumentalnu analizu Centra za hemiju IHTM i Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Predmet ove disertacije je izolovanje i karakterizacija sekundarnih metabolita halofitnih biljnih vrsta roda *Atriplex* (familija Amaranthaceae) i vrste roda *Artemisia* (familija Asteraceae), kao i ispitivanje njihovih bioloških aktivnosti. Iz roda *Atriplex* ispitivane su tri vrste: *A. littoralis*, *A. tatarica* i *A. prostrata*, dok je iz roda *Artemisia* ispitivana jedna vrsta *A. santonicum*. Cilj rada je bilo pronalaženje novih, biološki aktivnih, sekundarnih metabolita iz halofita sa teritorije Srbije.

U **OPŠTEM DELU** ovog rada opisane su glavne karakteristike halofita, klasifikacija, zastupljenost, specifični mehanizmi adaptacije ovih biljnih vrsta na stres izazvan povećanom količinom soli (stres soli). Takođe je opisana tradicionalna upotreba halofita, kao i najznačajnija bioaktivna jedinjenja koja su prisutna u halofitama. Dalje su dati su podaci o Amaranthaceae i Asteraceae familiji, o rodovima *Atriplex* i *Artemisia* i botaničke karakteristike ispitivanih biljnih vrsta. Navedena su do sada izolovana jedinjenja iz roda *Atriplex*, hemijski sastav i biološke aktivnosti etarskih ulja iz *Artemisia* vrsta, biološke aktivnosti: halofita, vrsta roda *Atriplex*, saponina oleanolnog tipa i flavonoida patuletinskog i kvercetagetinskog tipa. Ukratko je opisan quorum sensing mehanizam međućelijske komunikacije i neki od virulentnih faktora *Pseudomonas aeruginosa* kao što su formiranje biofilma, testovi pokretljivosti i produkcija pigmenta piocijanina.

U delu **NAŠI RADOVI** opisan je postupak određivanja strukture flavonoidnih glikozida i saponina primenom spektroskopskih (UV, IR, 1D i 2D NMR) i spektrometrijskih (HRESIMS) tehnika. Takođe, opisano je i određivanje hemijskog sastava izolovanog ulja primenom GC/MS tehnike. Prikazani su rezultati bioloških testova izolovanih jedinjenja i etarskog ulja.

U **EKSPERIMENTALNOM DELU** date su informacije o instrumentima, hemikalijama i tehnikama koje su korišćene prilikom izolovanja, prečišćavanja jedinjenja i ispitivanja bioloških aktivnosti. Takođe, dati su podaci o prikupljanju biljnog materijala, kao i spektroskopski podaci za nova jedinjenja.

1. OPŠTI DEO

1.1. Definicija i karakteristike halofita

Biljke koje naseljavaju staništa sa visokim sadržajem soli se nazivaju halofite. Ovaj termin se odnosi, kako na biljke koje se javljaju na maritimnim zaslanjenim staništima, kao što su slane močvare i delte i priobalje, tako i unutar kontinentalnih zaslanjenih staništa (slane stepe, obale slanih jezera i drugo). Zaslanjena staništa, dakle, nisu ograničena samo na obale mora, već se mogu naći i na mnogim drugim suvim mestima unutar kontinenta, kao što su pustinje, polupustinje, stenovita područja i drugo. Ovakav tip zemljišta je zabeležen u svim klimatskim područjima i na različitim nadmorskim visinama.¹ Prema podacima FAO (Land and Plant Nutrition Management Service)² ukupna površina u svetu koje zauzimaju slatine iznosi 397×10^6 ha.¹ U Srbiji se ovakva staništa javljaju na teritoriji Vojvodine, gde zauzimaju oko 150000 ha i u malom procentu na jugu Srbije.³ Prirodna (primarna) zaslanjenost potiče od akumulacije rastvornih soli u zemljištu ili u podzemnim vodama usled spiranja sa roditeljskih minerala, čime se oslobađaju hloridi, sulfati, karbonati i bikarbonati natrijuma, magnezijuma ili kalcijuma.⁴ Pored primarne salinizacije, korišćenjem različitih agrotehničkih mera, najčešće nepravilne irigacije¹ kao i usled prekomerne ispaše, krčenja šuma u umerenim i polusušnim predelima i kontaminacije hemikalijama javlja se i sekundarna salinizacija.⁵ Usled klimatskih promena površine sekundarno zaslanjenih zemljišta se godišnje povećavaju za oko milion hektara.¹ Problem solima narušenih zemljišta, odnosno zaslanjenih staništa, postaje sve više izražen imajući u vidu klimatske promene, pre svega globalno zagrevanje, kao i primenu neadekvatnog navodnjavanja useva. Sve ovo imaće uticaja na smanjenje prinosa u poljoprivredi, ali i na povećanu distribuciju biljnih vrsta tolerantnih na soli, čime će njihova upotreba i održivo korišćenje biti sve više aktuelno.

Postoje različiti načini prilagođavanja biljaka na zaslanjena staništa, odnosno fenomen osmotskih i toksičnih efekata soli (najčešće soli natrijuma). Tako na primer, biljke koje se javljaju na ovakvim staništima tokom određenog kraćeg perioda, na primer kišne sezone, nazivaju se pseudohalofitama, jer one *de facto* izbegavaju stres soli, tj. završavaju svoj ciklus razvića pre nego što se soli koncentrišu u količini koja narušava metaboličke i fiziološke procese biljke. Za razliku od njih, euhalofite, ili prave

halofite, opstaju u uslovima visokih koncentracija soli u podlozi, a salinitet im je kao ekološki faktor i neophodan za njihovo potpuno razviće. U mnogim slučajevima, mogu se naći predstavnici istih rodova, pa čak i vrsta halofita u slanim predelima umerenog, subtropskog i tropskog pojasa. Ovakva raspodela se objašnjava salinitetom kao glavnim faktorom koji određuje karakter staništa halofita.⁶

Halofite u većini slučajeva, razvijaju plitki koren, ali se on može više razviti i razgranati u cilju boljeg ukorenjavanja u peskovitom tlu. Listovi, su uglavnom mesnati, sočni, smanjene veličine i često, po pomalo staklastog izgleda. Plodovi i semena su uglavnom lagani, jer se raznose vetrom. Halofite odlikuje i visoka elastičnost ćelijskih zidova, razvijenost tkiva za skladištenje vode (hidrenhima), zbog razblažavanja koncentrovanih soli u vakuolama, zatim mali odnos površina/zapremina listova, kao i relativno nizak sadržaj hlorofila, što je u vezi sa činjenicom da su mnoge halofite tzv. C4 biljke – biljke kod kojih je prvi proizvod fiksacije ugljenika molekul sa četiri ugljenikova atoma.^{6,7}

Povećana akumulacija natrijuma ne narušava metabolizam i odvijanje biohemijskih puteva u ćelijama i tkivima ovih biljaka. Naprotiv, halofite rastu u sredinama sa povećanom koncentracijom soli zato što dobro podnose visoke koncentracije soli, za razliku od nehalofita, odnosno glikofita. Akumulacija soli kod pravih halofita dalje dovodi do povećanja osmotskog pritiska u ćelijama biljke, a samim tim i do povećane apsorpcije vode a usled toga i karakterističnog, „sočnog“ izgleda listova.^{6,7}

Iako ove biljke često rastu u predelima sa puno vode, one vodu ne mogu da iskoriste usled previsoke koncentracije soli u zemljištu („fiziološka suša“). Generalno, biljke se ponašaju na različite načine kada je visoka koncentracija soli u pitanju. Neke u potpunosti izbegavaju, dok druge tolerišu zaslanjene podloge. Pored različitih mehanizama otpornosti na soli kod halofita, kao što su izbegavanje soli, akumulacija i razblaživanje putem sukulentnosti, zatim retranslokacija i isključivanje soli nazad u podlogu preko korena postoji i otpornost zahvaljujući razvijenim specijalnim strukturama za izlučivanje soli, kao što su slane žlezde i slane dlake. Slana zemljišta su najčešće siromašna u nutritijentima kao što su fosfor i azot, a bogata nekim jonima, kao što su najpre natrijumovi, često i magnezijumovi joni, do granica toksičnosti. Zbog ovih uslova je bitno da biljka ima razvijene različite mehanizme adaptacije. Novija

istraživanja pokazuju da su kod halofita razvijeni vrlo složeni i kompleksni mehanizmi otpornosti (**Slika 1**), počev od molekularnog nivoa, gde su određeni geni evoluirali u smeru kodiranja specifičnih jonskih transportera na ćelijskim membranama, kao i mehanizmi hvatanja slobodnih radikala i antioksidativnog stresa, produkcija specifičnih sekundarnih metabolita i drugi.⁶⁻¹⁰

1.1.1. Klasifikacija halofita

S obzirom na opštu toleranciju na stres soli, sve biljke se mogu grubo podeliti u dve glavne grupe:

a) halofite, koje mogu da izdrže čak 20% soli u zemljištu i, u većini slučajeva, uspešno rastu u uslovima sa 2-6% soli¹¹ i

b) nehalofite ili glikofite, biljke koje pokazuju različit stepen oštećenja i ograničen rast u prisustvu natrijumovih soli, obično više od 0,01%.¹

Halofite se mogu klasifikovati na više načina, ali je najznačajnija podela na osnovu sadržaja soli i na osnovu tipa staništa. Na osnovu sadržaja soli halofite se dele na:

1. Mezohalofite - biljke na staništima sa salinitetom od 0,5 do 1%
2. Mezoehalofite - biljke na staništima sa salinitetom od 5% i više
3. Euhalofite - biljke na staništima sa salinitetom od 1 do 5%.^{6,7}

Na osnovu staništa halofite se dele na:

1. Hidrohalofite - rastu na vlažnom, slanom zemljištu kao što su močvare.
2. Kserohalofite - rastu na slanom zemljištu, ali uz ograničene količine vode.¹²

1.1.2. Zastupljenost halofita

Halofite predstavljaju oko 2% svih vaskularnih biljnih vrsta. Oko polovine biljnih familija ima predstavnike halofita, a ove familije su polifiletičkog porekla. Najveći broj halofita je zastupljen u familiji Amranthaceae, podfamilija Chenopodiaceae (*Atriplex*, *Suaeda*, *Salsola*, *Camphorosma*, *Salicornia*) koja sadrži oko

550 halofitnih vrsta. Manje od 5% svih biljnih vrsta čine halofite u familijama Poaceae, Fabaceae i Asteraceae. Pored navedenih, tolerantne vrste se mogu naći i u biljnim familijama: Potamogetonaceae, Plumbaginaceae, Zygophyllaceae, Frankeniaceae, Tamaricaceae i Rhizophoraceae.^{1,13}

1.1.3. Podela zaslanjenih staništa

U sušnim i polusušnim predelima godišnja količina padavina nije dovoljna za ispiranje soli iz gornjih slojeva zemljišta, pre svega zbog visokih stopa isparavanja i gubitaka vode putem biljnog pokrivača. Prema tome, svaka podzemna voda koja se podiže na površinu kapilarnim silama ili navodnjavanjem će dovesti do akumulacije soli u zemljištu, jer prirodne vode sadrže različite količine rastvorljivih soli, najčešće hloride i sulfata.¹⁴ Taloženje soli u zemljištu postepeno se povećava usled procesa hidratacije, hidrolize, oksidacije, redukcije, rastvaranja i karbonizacije.^{1,4}

Prema Szabolcs (1989), glavni faktori koji utiču na slano zemljište u sušnim i polusušnim područjima su klima, efekti podzemnih voda, direktni efekti tla i procesi njihovog formiranja.¹⁵

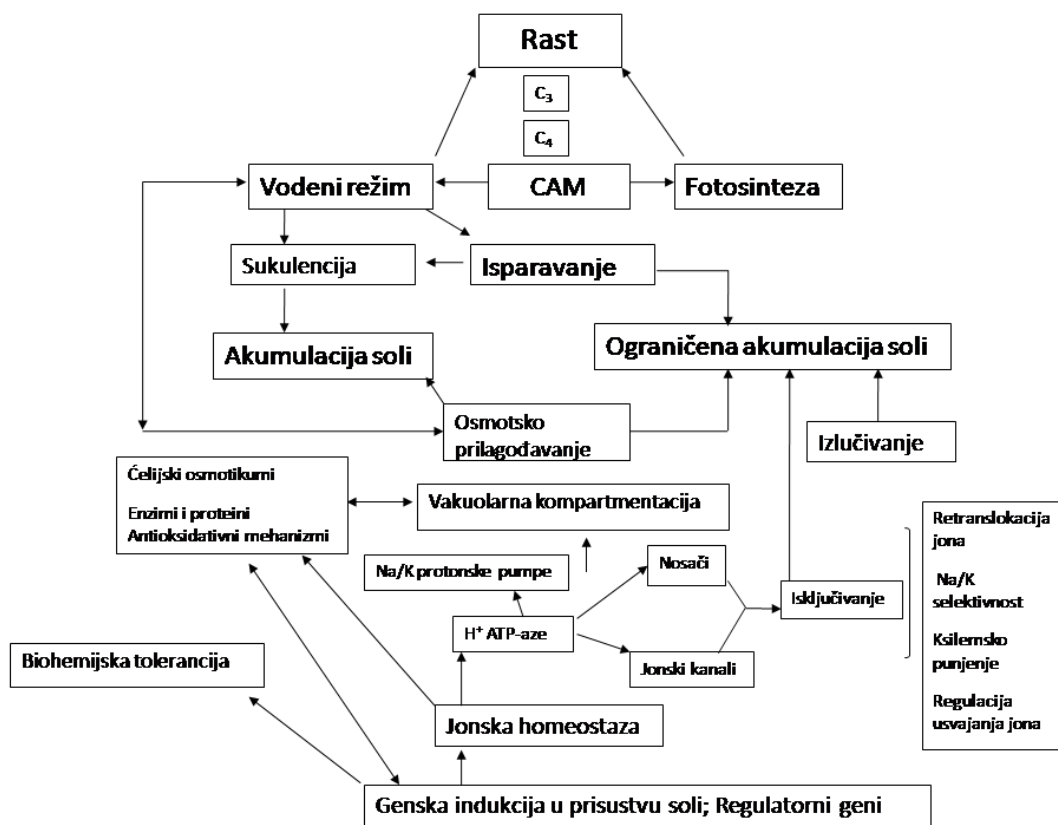
Prema Pessarakli i Szabolcs (1994), slana tla mogu se podeliti u sledeće kategorije:

1. Slana tla u sušnim i polusušnim oblastima sa visokim sadržajem natrijumovih soli (uglavnom natrijum-sulfat i natrijum-hlorid, pH neutralan);
2. Alkalna tla koja se javljaju u gotovo svim klimatskim područjima i formiraju se zbog prisutnih elektrolita sposobnih za alkalnu hidrolizu (uglavnom natrijum-karbonat i bikarbonat). Odlikuju ih visoka vrednost pH i visoki sadržaj natrijuma;
3. Gipsana tla, koja sadrže kalcijum-sulfat kao dominantnu so;
4. Tla pod uticajem prisustva soli magnezijuma, tipična za tla sa teškom teksturom sušnih, polusušnih i čak poluvlažnih regiona, i
5. Kiselinsko-sulfatna tla u plimnim površinama čije se soli sastoje uglavnom od aluminijum-sulfata i gvožđe-sulfata.^{1,5}

1.1.4. Specifični mehanizmi adaptacije biljnih vrsta na stres uzrokovan povećanom koncentracijom soli

Mehanizmi odgovora na stres uzrokovan povećanom koncentracijom soli su veoma složeni. Obligatne halofite (rastu isključivo na zaslanjenim staništima) razvile su mehanizme tolerancije uglavnom kroz sposobnost da akumuliraju soli u svojim nadzemnim, fotosintetičkim delovima. Mnoge fakultativne halofite (javljaju se kako na slatinama tako i na nezaslanjenim staništima) većinom su razvile sistem za isključivanje soli preko korena, kako bi se sprečio transport i akumulacija soli u izdancima. Adaptacije biljaka izloženih salinitetu zasnivaju se na postojanju jednog ili više od sledećih glavnih mehanizama:

1. Fenološko izbegavanje koje se odnosi na biljke koje završavaju ciklus rasta i razvika u najpovoljnijem periodu vegetacione sezone;
2. Izbegavanje soli putem isključivanja što se postiže niskom propusnošću korena za određene jone, posebno natrijuma;
3. Izbegavanje soli kroz izlučivanje, koje zavisi od prisutnih specijalnih žlezda i mehurastih dlaka;
4. Razblaživanje visoke koncentracije soli u biljnim tkivima sopstvenom sočnog „sočnošću“ i rastom, koje je, između ostalih stvari, povezano sa elastičnošću ćelijskih zidova, prisustvom krupnih vakuola i specifičnih transportera za jone na membranama tonoplasta;
5. Biohemijska tolerancija kroz adaptaciju ćelijskih organela i makromolekularnih sistema na višak soli;
6. Nutritivna tolerancija - sposobnost metaboličke upotrebe jona kalijuma i kalcijuma u cilju ublažavanja neželjenih efekata natrijumovih jona.¹

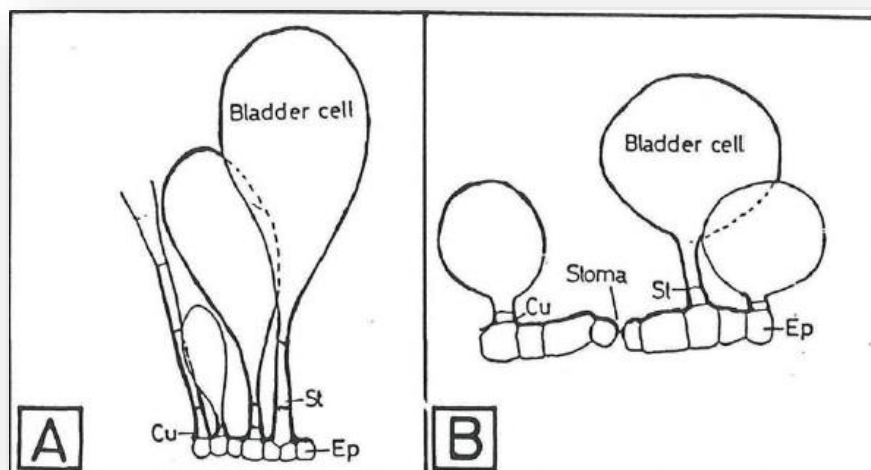


Slika 1. Mehanizmi tolerancije na povećanu koncentraciju soli u odnosu na glavne adaptivne strategije biljaka izloženih salinitetu (Slika preuzeta iz reference 1 i modifikovana)

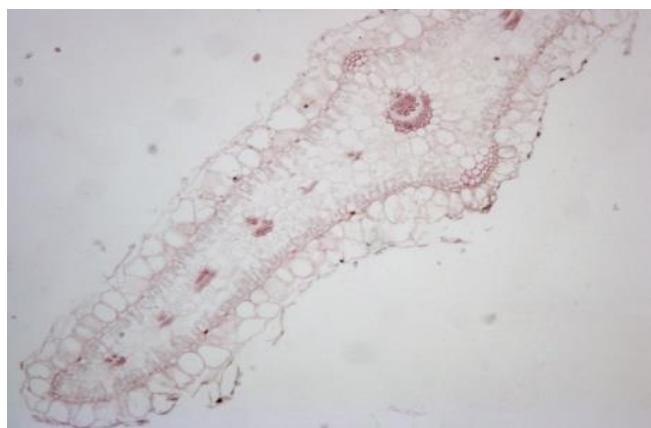
1.1.4.1. Mehanizam izlučivanja soli

Ovaj mehanizam je tipičan za vrste koje su razvile posebne karakteristike koje su uglavnom lokalizovane na epidermisu lista („slane žlezde“ i „slane dlačice (mehuraste dlake)“). Jedan od najočiglednijih pokazatelja izlučivanja soli je slana kora koja se javlja na listovima i izdancima vrsta sa „slanim žlezdama“ i „slanim dlačicama“. Ovaj tip strukture je uobičajen za mnoge halofitne rodove kao što su *Cressa* (Convolvulaceae), *Frankenia* (Frankeniaceae), *Spartina*, *Chloris*, *Aeluropus* (Poaceae), *Atriplex* (Chenopodiaceae), *Limonium*, *Plumbago*, *Armeria* (Plumbaginaceae), *Glaux* (Primulaceae), *Tamarix*, *Reamuria* (Tamaricaceae), kao i neke vrste mangrova, kao što su *Avicennia*, *Aegialitis*, *Aegiceras* i *Acanthus*.¹

Slane trihome za izlučivanje soli (**Slike 2 i 3**) verovatno su najbolje proučene u nekoliko vrsta roda *Atriplex* (Chenopodiaceae), koje su od posebnog značaja u regulaciji tolerancije na soli. One se sastoje od dve vrste ćelija, malih bazalnih, i gornjih mehurastih.¹⁶ Ove druge odumiru pošto su akumulirale dovoljnu količinu soli u vakuolama, ostavljajući koricu soli na površini lista.¹



Slika 2. Šematski prikaz mehurastih dlaka vrsta *Atriplex farinosa* (A) i *Atriplex halimus* (B) (Cu - kutikula, Ep - epidermis, St -ćelija staka, Bladder cell - mehuraste ćelije)
(Slika preuzeta iz reference 17)



Slika 3. („Slane dlake“ (bladder salt cells) na površini lista *Halimione portulacoides* (syn. *Atriplex portulacoides*) (Autorska mikrografija Katedre za agrobotaniku Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu)

Mnoge vrste roda *Atriplex* su karakteristične po prisustvu slanah mehurastih dlaka na površini mladih listova,¹⁸ koje mogu sadržati celu količinu natrijuma lista.¹⁹ Smatra se da one (u rodu *Atriplex*) predstavljaju ključnu adaptaciju na toleranciju soli za njihova prirodna staništa.^{1,20} Osim toga, listovi vrsta roda *Atriplex* često imaju srebrnkastu refleksiju zahvaljujući tankom sloju trihoma, za koje je takođe pokazano da štite tkiva lista od UV zračenja minimizujući tako nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKS).²¹

Za razliku od adaptacija na stres soli postojanjem slanah dlaka i slanah žlezda za izlučivanje soli (mnoge *Atriplex* vrste), kod mnogih terestričnih halofita, kao što je slani pelin (*Artemisia santonicum*), prisutna je tipična kseromorfna građa, kao adaptacija na fiziološku sušu (sitni, skoro igličasti listovi, nizak sadržaj vode u tkivima, ekstenzivan korenov sistem, itd), kao i niz adaptacija za isključivanje (translokaciju) soli na nivou korena.

1.1.5. Tradicionalna upotreba halofita

Halofitne biljne vrste su u nekim zemljama dobro poznate po svojoj etnofarmakološkoj upotrebi, verovatno zbog prisustva i akumulacije različitih bioaktivnih molekula – sekundarnih metabolita. Tako na primer, *Artemisia scoparia* (Asteraceae) je dobro poznata diuretička biljka, koja se koristi i za snižavanje krvnog pritiska, zaštitu jetre, normalizaciju funkcije žučne kese i eliminisanje groznice. Posедуje antibakterijsku, antiinflamatornu i antitumorsku aktivnost.⁹ *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) se koristi kao pomoćno sredstvo u lečenju glikemije kod dijabetičara.²² Pored toga, može se koristiti u lečenju unutrašnjih parazita u veterinarskoj medicini.²³ *Cakile maritima* (Brassicaceae) poseduje purgativna, digestivna i diuretička dejstva. Ova biljna vrsta se koristi u lečenju edema, žutice i za detoksikaciju pluća. *Chenopodium album* (Chenopodiaceae) je poznata biljka u narodnoj medicini zbog antiparazitskih, sedativnih, diuretičkih, hepatoprotektivnih i laksativnih svojstava.²⁴ *Crithmum maritimum* (Apiaceae) koristi se u narodnoj medicini, zbog digestivnih, diuretičkih i purgativnih svojstava kao i u lečenju skorbuta.⁹ *Eringium maritimum* (Apiaceae) predstavlja izuzetnu biljku koja ima diuretička, diaporetična i

antiparazitska svojstva. Takođe, koristiti se kao stimulan, inhibitor nastanka bubrežnog kamena i afrodisijak.²⁵ *Inula viscosa* (Asteraceae) je vrsta koja se upotrebljava u mediteranskoj narodnoj medicini zbog antiseptičkih, antipiretičkih, antiflogističkih aktivnosti, anti-dijabetičkih i antiinflamatornih efekata.^{9,26} U Jordanskoj narodnoj medicini, *I. viscosa* se koristi u lečenju anemije, bronhitisa, reumatskog bola i tuberkuloze. Takođe, ova vrsta pokazuje diuretička, ekspektorantna i antiparazitska svojstva. Pored toga, propisana je kao pomoćno lekovito sredstvo protiv steriliteta kod žena i za indukciju pobačaja.⁹ Infuz lista *Limoniastrum monopetalum* (Plumbaginaceae) je poznat u narodnoj medicini po antidizenteričnim svojstvima.⁹ *Nitraria tangutorum* (Zigophillaceae) se koristi u tradicionalnoj medicini za lečenje neurastenije, probavnih smetnji.²⁷ *Salicornia herbacea* (Chenopodiaceae) se koristi u ishrani u priobalnim područjima Koreje i kao sastojak sirćeta u Evropi. Njene primene u tradicionalnoj medicini su uglavnom ograničene na lečenje dijabetesa, gojaznosti, konstipacije i raka.²⁸ *Suaeda fruticosa* (Amaranthaceae, uključujući, tj. ranije opisane kao Chenopodiaceae) poseduje antibakterijske, hipolipidemične i hipoglikemijske aktivnosti.^{9,29} *Salsola kali* (Chenopodiaceae) je poznata po svojim efektima na hipotenziju.⁹ Ekstrakti *Tribulus terrestris* (Zigophillaceae) se tradicionalno koriste u lečenju astme, dijabetesa, hiperlipidemije, bubrežnih kamenaca, hipertenzije, nefrotoksičnosti, spermatorije, gljivičnih infekcija, poremećaja kože i jetre i kao afrodisijak.^{9,29} *Tetraena alba* (sin. *Zigophillum album*) (Zigophillaceae) se često primenjuje u lečenju astme, gihta i reumatizma.⁹ Fakultativni halofit, *Verbena officinalis* (Verbenaceae), se u srpskoj narodnoj medicini koristi kao analgetik, protiv zapaljenja i u lečenju reumatizma.^{30,31} Umereno tolerantni halofiti slanah stepskih evroazijskih staništa, kao što su *Achillea collina*, *Mentha pulegium*, a posebno *Chamomila recutita*, dobro su poznate i priznate biljne vrste, često korišćene u tradicionalnoj balkanskoj medicini.³²⁻³⁴

1.1.6. Bioaktivna jedinjenja u halofitama

Halofitne biljne vrste sadrže različite klase bioaktivnih jedinjenja kao što su: fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi (flavanoli, halkoni, flavonoidni glikozidi, izoflavonoidni glikozidi, flavonoidni sulfati), tanini, stilbeni, kumarini, karotenoidi,

alkaloidi, laktoni, alkoholi, steroli, diterpeni, triterpeni, lipopolisaharidi, voskovi. Navedene klase prirodnih proizvoda pokazuju različite biološke i terapijske efekte. Specifičnost slanih staništa uzrokuje visoku specifičnost kvalitativnog i kvantitativnog sastava sekundarnih metabolita, što halofite čini predmetom modernih istraživanja i bogatim izvorom različitih biološki aktivnih jedinjenja.^{34,35}

Kako su predmet proučavanja u ovoj doktorskoj disertaciji tri vrste roda *Atriplex* iz familije Amaranthaceae (ranije Chenopodiaceae) i jedna vrsta roda *Artemisia* iz familije Asteraceae – *Artemisia santonicum*, u narednom poglavlju prikazane su njihove glavne botaničke karakteristike.

1.2. Familija Amaranthaceae

Ova familija obuhvata oko 2500 vrsta rasprostranjenih širom sveta, mahom u severnoj hemisferi. Biljne vrste familije Amaranthaceae, na području naše zemlje se javljaju kao isključivo zeljaste, jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje biljke, naizmeničnih ili naspramnih listova, bez zalistaka. Cvetovi su jednopolni ili dvopolni, jednodomi ili dvodomi, trodelni ili petodelni, sitni, neugledni i često čašicoliki, složeni u grozdaste cvasti; listići grade jednostavni cvetni omotač, često su okriljeni i kasnije otvrdnu ili su više ili manje mesnati. Prašnika 1-5, tučak od 2-5 oplodnih listića. Oprašivanje entomofilno. Plod je orašica, po pravilu suva, ređe pomalo sočna, kod nekih rodova se otvara, kod drugih ne. Seme sitno, raznosi se vetrom.³⁶ Mnoge vrste iz familije Amaranthaceae, su obligatne halofite (*Salicornia*, *Suaeda*, *Salsola*, *Atriplex*, *Camphorosma*, *Halimione*, *Arthrocnemum*, *Halocnemum*, itd) – zato se ova familija, tj. njena podfamilija Chenopodiaceae, naziva halofitnom „*per excellence*“.

1.3. Rod *Atriplex*

Biljke roda *Atriplex* su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke celih ili usečenih, pri osnovi stabla naspramnih, na stablu naizmeničnih listova. Cvast je složen klas ili metlica sastavljena od glavičastih prostih cvasti. Cvetovi su jednopolni, jednodomi (ponekad dvodomi), sa trodelnim ili petodelnim cvetnim omotačem. Pricvetni listovi su široki, rombični ili jajasti. Prašnika ima 3-5, žiga 2. Plod

je obavijen pricvetnim listovima i sadrži horizontalno ili vertikalno postavljenu semenku.³⁶

Biljne vrste koje pripadaju rodu *Atriplex*, rasprostranjene su u Evropi, jugozapadnoj i srednjoj Aziji. U Srbiji ove halofitne biljke raširene su pretežno u Vojvodini; na svim bačkim i banatskim slatinama. Neke vrste mogu se naći na malobrojnim i ograničenim slatinama na jugu Srbije. Najčešće rastu na vlažnoj peskovitoj, glinenoj ili kamenitoj podlozi.³⁶

To su jednogodišnje zeljaste vrste ili višegodišnji manji žbunovi, goli ili slabo dlakavi. Listovi su ravni, cvetovi najčešće jednopolni. Muški cvetovi se sastoje od 5 listića cvetnog omotača i 5 prašnika. Ženski cvetovi bez perijanta ali sa dve velike trajne brakteole (priperka), sa 2 žiga.³⁷

1.3.1. *Atriplex littoralis*

A. littoralis L., (syn. *A. laciniata* auct., non L.) je uspravna, obično vrlo granata jednogodišnja biljka, do 150 cm visine. Njeni listovi su linearni do ovalno linearni, celi ili slabo nazubljeni, donji sa jasnim drškama, gornji sedeći. Cvasti dugačke, klasolike, sa listićima samo pri osnovi. Brakteole su 3-6 mm duge, trouglaste do ovalne, nazubljene ili cele, a vrh im je zašiljen ili jezičast. Naseljava morske obale i slana mesta u kontinentu.³⁷ *A. littoralis* na području naše zemlje dostiže visinu do 80 cm. To je uspravna, široko razgranata, bogato lisnata ili uska, retkih grana i skoro bezlisna dvogodišnja biljka (**Slika 4**). Stabljika je zelena ili crvenkasta, prugasta, gola ili brašnava sa vitkim granama. Listovi naizmjenični, mesnati, slabo brašnasti, s donje strane zeleni, loptaste osnove postupno sužene u kratku peteljku, tupi, usko linearni, celog ili oštro nazubljenog ruba, bez vidljivih bočnih nerava. Cvetne glomerule složene u bezlisnu rastresitu cvast.³⁶



Slika 4. *Atriplex littoralis* (banja Rusanda, Melenci, avgust 2016.)

1.3.2. *Atriplex tatarica*

A. tatarica L. (syn. *A. laciniata* i *A. tornabonii* Tineo) je nešto polegla ili uspravna jednogodišnja biljka, veoma granata, beličasta, do 150 cm visine. Njeno stablo je glatko ili uglasto (**Slika 5**). Listovi dimenzija 10×7 cm su srebrnkasti, trouglasti do rombični, nepravilno urezani, donji režanj lista je najveći. Cvast je terminalna, metličasta ili klasolika, manje ili više bezlisna. Brakteole do 7 mm, zaobljene do rombične, mrežaste nervature, postaju tvrde u donjoj polovini. Vrsta se karakteriše izrazitom heterokarpijom, u smislu različitih boja i oblika ploda – orašica. Stanište joj je od južne do jugoistočne Evrope, do istočne Rusije. Tipična je vrsta solončaka i

solonjeca, česta na peskovitom i aluvijalnom tlu, uz puteve, na obalama zaslanjenih bara i jezera, nekad i na nitrofilnim staništima.³⁷

A. tatarica na području Srbije je pogućla ili izdignuta, ređe uspravna do 1m visoka, jako granata jednogodišnja biljka, bele, tupo bradavičave stabljike. Listovi su na dugim peteljkaama, s donje (ređe s obe) strane srebrnasto ljuspasti; donji su trouglasto-kopljastog oblika, naglo suženi u peteljku, tupo ili oštro nazubljeni ili režnjeviti, a gornji su uski, izduženo kopljasti, nazubljeni. Cvetne glomerule su u bezlisnim ili samo pri osnovi lisnatim rastresitim, u gornjem delu zbijenim cvastima, obično nagnutog vrha. Brakteje su 3-7 mm duge, široko romboidalne, 3- ili 4-uglaste, zašiljenog vrha, na stranama režnjevite, nazubljene ili nenazubljene i glatke, ili fino, meko bradavičave površine. Semenka je mrko crvena, kljunasta.³⁶

Ova halofitna vrsta je česta na različitim tipovima kontinentalnih slatina, pored plitkih stajaćih voda, ređe uz puteve i naselja. U Srbiji je rasprostranjena u celoj Vojvodini, Beogradu, Nišu, Vranju i Bujanovcu.³⁶



Slika 5. *Atriplex tatarica* (Slano Kopovo, jul 2016.)

1.3.3. *Atriplex prostrata*

A. prostrata Boucher ex DC. (syn. *A. hastata*, *A. triangularis* Willd., *A. deltoidea* Bab., *A. latifolia* Wahlenb.) je uspravna do plegla biljka, stabljike do 100 cm visine. Donji listovi su joj rombični, jasno se sužavaju, a brakteole veličine 2-6 mm, nazubljene. Semena sitna. Ruderalna biljka, česta na obalama, oko močvara i slanih jezera, na peščanom tlu. Rasprostranjena svuda u Evropi, do 71° N geografske širine, pretežno u Norveškoj.³⁷

Na području Srbije *A. prostrata* je plegla, ređe uzdignuta ili uspravna, od 20-100 cm visoka, zelena ili sivobrašnasta jednogodišnja biljka (**Slika 6**). Stabljika joj je tupo bridasta, granata od osnove, a donje grane su međusobno udaljene. Listovi na gornjoj strani zeleni, na donjoj sivkasti, često crveno oivičeni. U donjem delu stabljike oni su često naspramni, a gore naizmenični; gornji i srednji su streličasto trouglasti, pri osnovi sa jednim nagore ili nadole okrenutim zubčastim završetkom, po obodu celi ili nazubljeni, a donji su streličasto kopljasti. Brakteole su duge od 5-10 mm, obično duže od ploda, rombično-jajaste, streličaste ili trouglaste. Semenke su sitne i mrke boje.³⁶

Ova halofita se javlja na vlažnoj, slabije zaslanjenoj podlozi, javlja se i uz puteve. U Srbiji je rasprostranjena u celoj Vojvodini, Beogradu, Nišu, Vranju, Šapcu.³⁶



Slika 6. *Atriplex prostrata* (banja Rusanda, Melenci, avgust 2016.)

1.4. Familija Asteraceae

To je najveća familija dikotila, sa preko 20000 vrsta koje se javljaju u svim klimatskim područjima Zemlje. To su jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, ređe drvenaste. Koren je često krtolasto zadebljao. Stabljika je jednostavna ili granata, ponekad u obliku skapusa ili okriljena. Listovi su naizmenični, ređe naspramni, bez zalistaka, celi, različito deljeni ili složeni. Familiju Asteraceae karakterišu sitni i mnogobrojni jezičasti i cevasti cvetovi sakupljeni u glavičaste cvasti koji stoje na zajedničkoj ravnoj osovinu cvasti, tako da najčešće nalikuju na pojedinačne i obično velike cvetove. Cvetovi su ili jednopolni ili češće hermafroditni, jednodomi ili dvodomi ili poligami, istog oblika ili se obodni razlikuju od onih u sredini cvasti. Plod je ahenija. Ova familija se sastoji od oko 2000 rodova.³⁸

1.4.1. Rod *Artemisia*

Rod *Artemisia* (pelini) pripada familiji Asteraceae (Compositae) i ovom rodu pripada preko 200 vrsta. Biljke ovog roda su zeljaste ili polužbunaste, višegodišnje, ređe jednogodišnje. Mogu da dostignu visinu do 200 cm. Koren im je jak, vretenast i drvenast. Stabljike su prave i male debljine, srebrnaste do beličaste boje. Listovi su naizmenično raspoređeni, jednostavno ili više puta perasto deljeni, retko celi. Glavice su male, cilindrične ili loptaste, formiraju grozdaste ili metličaste cvasti, često su viseće. Listovi involukruma poređani su poput crepova na krovu, prilegli, sa suvokožičastim obodom. Na jednoj biljci se mogu naći i muški i ženski cvetovi. Središnji su dvopolni, dok su obodni ženski. Ahenija je cilindrična ili spljoštena, bez jakih rebara. Vrste roda *Artemisia* imaju karakterističan miris i ukus. Vrste iz ovog roda rastu u stepskim oblastima Evrope, Azije, severne i srednje Amerike, a neke od vrsta se javljaju i na području naše zemlje.³⁸

1.4.2. *Artemisia santonicum*

A. santonicum L. (syn. *A. monogyna* Waldst. & Kit.). Stabla su odrvenjena pri osnovi, glatka. Donji listovi se suše i/ili opadaju pri ili pre polinacije, listovi su dvostruko ili trostruko perasto deljeni, nekad sa malim jezičkom, režnjevi do 8 mm, linearni do zarubljeni, zašiljeni na vrhu. Gornji listovi suceli ili sa 2 bazalna režnja. Glavice su na malim drškama, savijene ili uspravne u gustim metličastim cvastima, sa jasnim braktejama, involukruma, gde su spoljašnji listići omotača cvasti dlakavi do glatki, a unutrašnji mnogo duži, glatki ovalni do eliptični. Vrsta naseljava periodično vlažna do umereno suva slana ili alkalna zemljišta, u Evropi od Austrije do Kazahstana i južno do severoistočne Grčke.³⁹

Ova biljka poznata i kao slatinski pelin je višegodišnja polužbunasta biljka (**Slika 7**). Halofita je i pogoduju joj zaslanjena zemljišta, suva i vlažna alkalna mesta, pustinje i stepe, pored morskih obala. Pored zapadne, srednje i južne Evrope, ova vrsta se javlja i u kaspiskoj oblasti, srednjoj Aziji do Transbajkala i Mongolije. U Srbiji se može naći samo na području Vojvodine. Njene podvrste su *A. santonicum* subsp. *maritima* i *A. santonicum* subsp. *monogyna*.³⁸

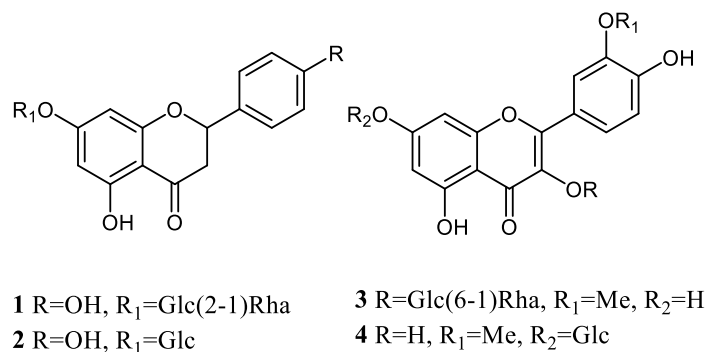


Slika 7. *Artemisia santonicum* (Slano Kopovo, jul 2016.)

U Srbiji, ova vrsta raste od 20 do 60 cm u visinu. Nadzemni rizom je sa busenastom lisnom rozetom bez izdanaka. Stabljika je uspravna, metličasto se grana, pustenasto je dlakava, srebrnkaste boje. Listovi su belo pustenasto dlakavi, u donjem delu stabljike imaju kratke drške, a listovi koji podupiru glavice su linearni. Cvasti su mnogobrojne, u vidu sitnih glavica, prečnika 2-3 mm, sa kratkim drškama. U glavici se nalazi 2-5 cvetova, najčešće su svi dvopolni. Obodni cvetovi su fertilni, dok su unutrašnji sterilni. Cveti od septembra do oktobra i javlja se obično na solonjecima, na staništima poznatim kao slane stepe.³⁸

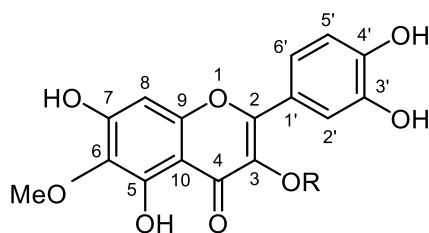
1.5. Izolovana jedinjenja iz roda *Atriplex*

Glavni sekundarni metaboliti u biljnim vrstama roda *Atriplex* su flavonoidi, saponini i alkaloidi.⁴⁰ Iz vrste *A. farinosa* ranije su izolovani flavanonski glikozidi: naringin (**1**) i naringenin-7-*O*-glukozid (**2**) i flavonolni glikozidi: izoramnetin-3-*O*-ramnozil (1→6) glukopiranozid (**3**), izoramnetin-7-*O*-glukopiranozid (**4**).⁴¹



Slika 8. Flavanon (levo) i flavonol glikozidi (desno) iz vrste *Atriplex farinosa*

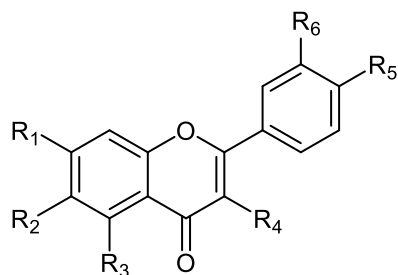
Iz vrste *A. littoralis* izolovani su patuletin-3-*O*- β -D-glukopiranozid (**5**) i acilovani flavonolni glikozid: patuletin-3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil(1''' \rightarrow 2'')- β -D-glukopiranozid (**6**).⁴⁰



5 R=Glc
6 R=Glc(2-1)-Apif(5-*O*)-feruloil

Slika 9. Flavonol glikozidi izolovani iz vrste *Atriplex littoralis*

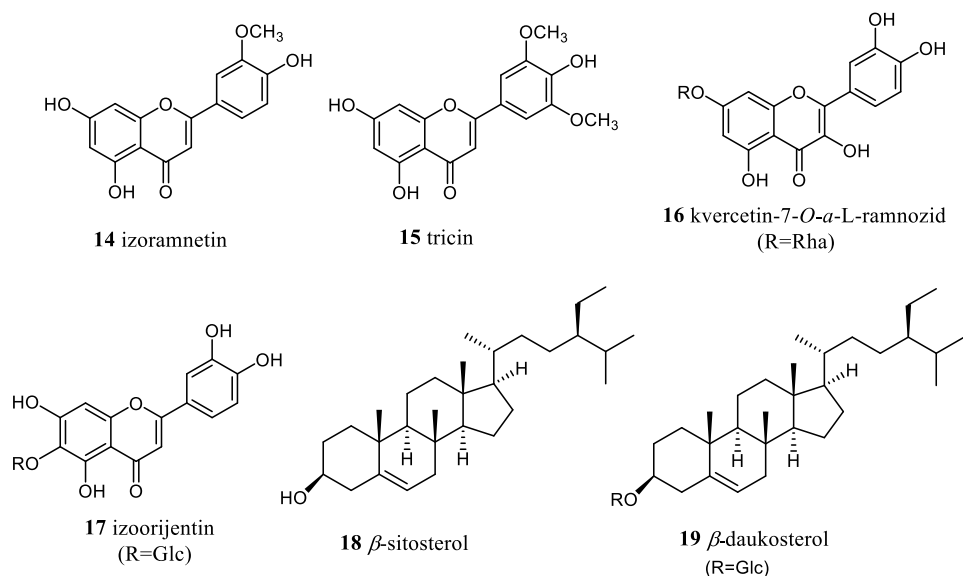
Jedinjenja: kvercetin (**12**), kempferol (**13**), kvercetin-6,4'-dimetoksi-3-ramnofruktozil (**7**), kvercetin-3,4'-dimetoksi-7-ramnofruktozil (**8**), kempferol-4'-metoksi-3-rutinozid (**9**), kempferol-7-*O*-ramnozid (**10**) i kempferol-3-*O*-7-*O*-diramnozid (**11**) su izolovana iz vrste *A. lentiformis* (**Slika 10**).⁴²



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
7 kvercetin-6,4'-dimetoksi-3-ramnofruktozil	OH	OCH ₃	OH	rha-fruc	OCH ₃	OH
8 kvercetin-3,4'-dimetoksi-7-ramnofruktozil	rha-fruc	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
9 kempferol-4'-metoksi-3-rutinozid	OH	H	OH	glc-rha	OCH ₃	H
10 kempferol-7-O-ramnozid	rha	-	OH	OH	OH	H
11 kempferol-3-O-7-O-diramnozid	rha	-	OH	rha	OH	H
12 kvercetin	OH	-	OH	OH	OH	OH
13 kempferol	OH	-	OH	OH	OH	H

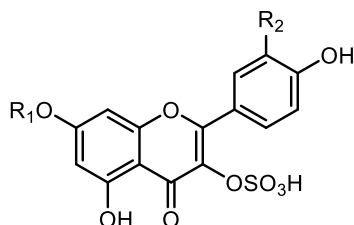
Slika 10. Jedinjenja izolovana iz vrste *Atriplex lentiformis*

Iz vrste *A. centralasiatica* su izolovani izoramnetin (**14**), triclin (**15**), kvercetin-7-*O*- α -L-ramnozid (**16**), izoorientin (**17**), β -sitosterol (**18**), β -daukosterol (**19**).⁴³



Slika 11. Flavonoidi i steroli iz vrste *Atriplex centralasiatica*

Iz vrste *A. hortensis* izolovani su flavonoidni sulfati: kvercetin 3-*O*-sulfo-7-*O*-arabinopiranozid (**20**) i kempferol 3-*O*-sulfo-7-*O*-arabinopiranozid (**21**).⁴⁴



20 kvercetin-3-*O*-sulfo-7-*O*-arabinopiranozid

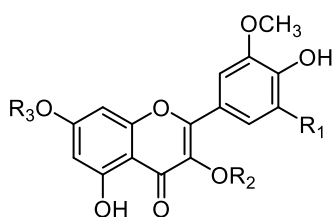
$R_1 = \text{Ara}; R_2 = \text{OH}$

21 kempferol-3-*O*-sulfo-7-*O*-arabinopiranozid

$R_1 = \text{Ara}; R_2 = \text{H}$

Slika 12. Sulfatni flavonoidni glikozidi

Iz vrste *A. halimus* izolovani su sledeći flavonolni glikozidi: 3',5'-dimetoksimiricetin-3-*O*- β -D-ksilopiranozil-7-*O*-fukopiranozil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozid (**22**), 3'-metoksikvercetin-7-*O*- β -D-fukopiranozil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -ksilopiranozid (**23**), 3'-metoksikvercetin-7-*O*- α -L-ramnopiranozil-3-*O*- α -arabinofuranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid (**24**), 3',5'-dimetoksimiricetin-7-*O*-fukopiranozil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozid (**25**).⁴⁵

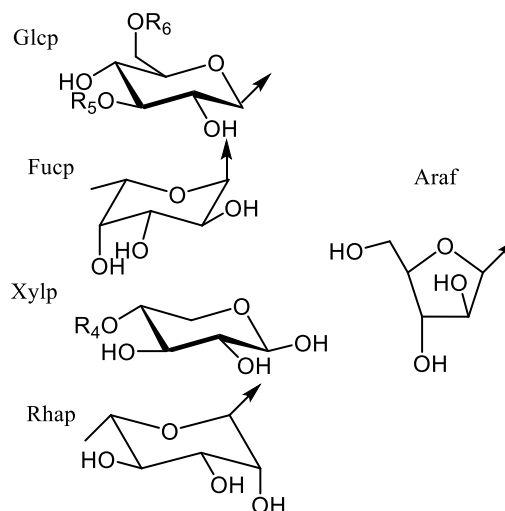


22 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{Xylp}, R_3 = \text{Glc}, R_4 = \text{H}, R_5 = \text{Fucp}, R_6 = \text{H}$

23 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Xylp}, R_3 = \text{Glc}, R_4 = \text{Xylp}, R_5 = \text{Fucp}, R_6 = \text{H}$

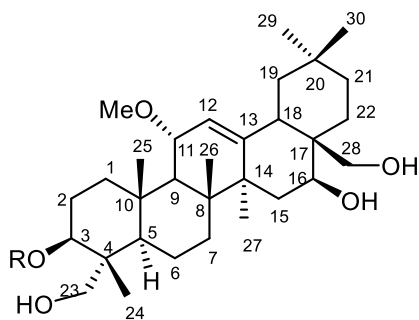
24 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Glc}, R_3 = \text{Rhap}, R_4 = \text{Xylp}, R_5 = \text{H}, R_6 = \text{Araf}$

25 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Glc}, R_4 = \text{Xylp}, R_5 = \text{Fucp}, R_6 = \text{H}$

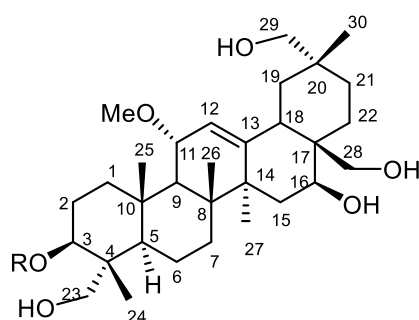


Slika 13. Flavonolni glikozidi iz vrste *Atriplex halimus*

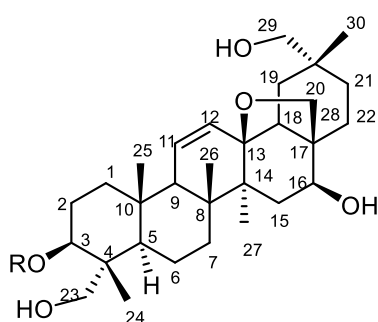
Od saponina iz vrste *A. semibaccata* izolovani su 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-11 α -metoksi-23-hidroksilongispinogenin (**26**), 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-11 α -metoksi-23,29-dihidroksilongispinogenin (**27**), 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-29-hidroksisaikogenin F (**28**) i 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-saikogenin F (**29**).⁴⁶



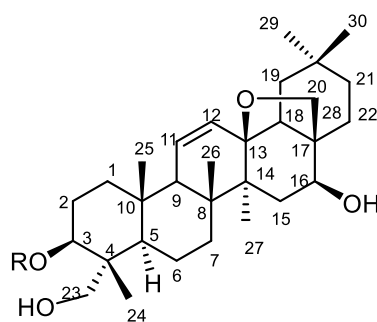
26 R=Galp(2-1)GlcP



27 R=Galp(2-1)GlcP



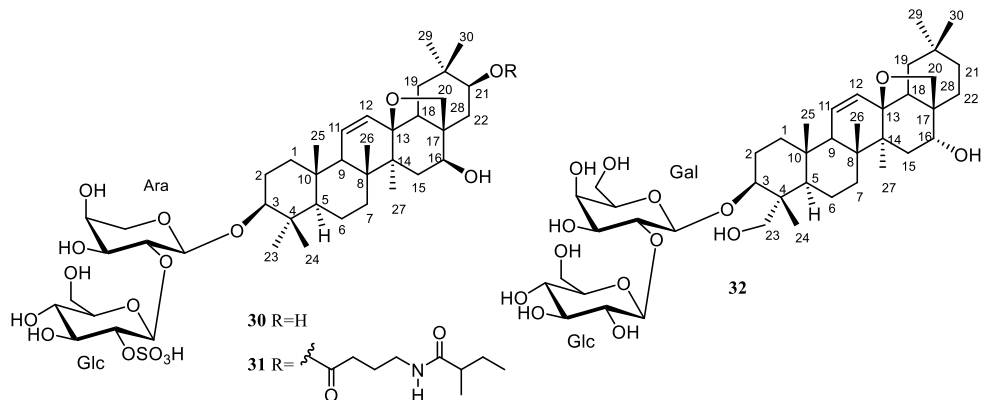
28 R=Galp(2-1)GlcP



29 R=Galp(2-1)GlcP

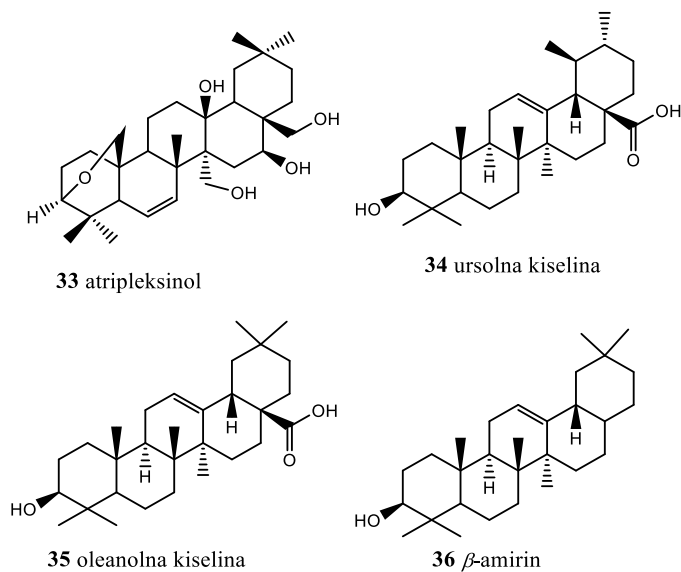
Slika 14. Saponini iz *Atriplex semibaccata*

Iz vrste *A. glauca* izolovani sledeći saponini: 13 β ,28-epoksi-16 β ,21 β -dihidroksiolean-11-en-3 β -il *O*- β -D-(2-*O*-sulfat)-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid (**30**), 13 β ,28-epoksi-16 β ,21 β -dihidroksiolean-11-en-3 β -il-*O*- β -D-(2-*O*-sulfat)-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid 21-*O*-(4-(sekbutilamido)-butanoil estar) (**31**), 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil saikogenin G (**32**).⁴⁷

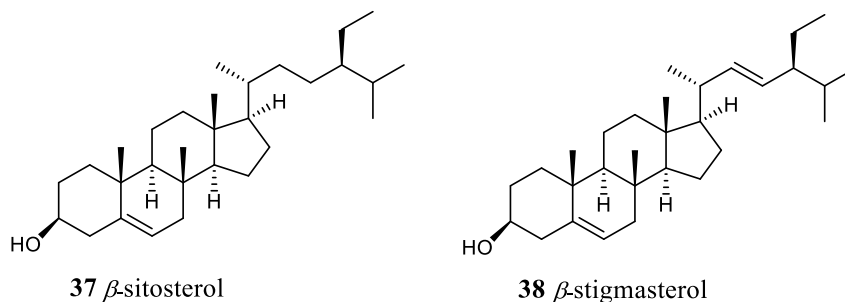


Slika 15. Saponini iz *Atriplex glauca*

Iz vrste *A. stocksii* po prvi put izolovan je pentaciklični triterpenoid atripleksinol 3,25-epoksi-13 β ,16 β ,27,28-tetrahidroksi-6-oleanen (**33**), tri poznata terpenoida, ursolna (**34**), oleanolna kiselina (**35**), β -amirin (**36**) i dva sterola, β -sitosterol (**37**) i stigmasterol (**38**).⁴⁸

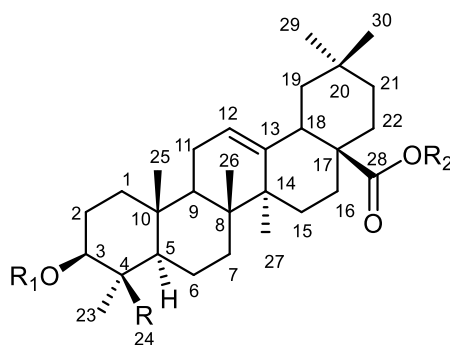


Slika 16. Pentaciklični triterpeni iz *Atriplex stocksii*



Slika 17. Steroli iz *Atriplex stocksii*

Iz vrste *A. stylosa* izolovana su tri saponina hederageniskog tipa i jedan saponin oleanolnog tipa. Izolovani saponini su: 3-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glukuronopiranozil hederagenin (**39**), 3-*O*- β -D-glukopiranozil(1 \rightarrow 3)- β -D-glukuronopiranozil hederagenin (**40**), 3-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glukuronopiranozil hederagenin 28-*O*- β -D-glukopiranozid (**41**), 3-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 3)-(β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2))- β -D-glukuronopiranozil oleanolna kiselina (**42**).⁴⁹



- 39** R=CH₂OH R₁=GlcAp(3-1)Rhap, R₂=H
40 R=CH₂OH R₁=GlcAp(3-1)GlcP, R₂=H
41 R=CH₂OH R₁=GlcAp(3-1)Rhap, R₂=GlcP
42 R=CH₃ R₁=GlcAp(3-1)Rhap/GlcAp(2-1)GlcP R₂=H

Slika 18. Saponini izolovani iz vrste *Atriplex stylosa*

1.6. Hemijski sastav etarskih ulja *Artemisia* vrsta

Etarska ulja su mirisne, isparljive, prirodne, kompleksne smeše aromatičnih biljaka. To su uglavnom proizvodi viših biljaka iz porodica Asteraceae, Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Apiaceae koji su lokalizovani u različitim delovima biljaka (koren, stablo, list, cvet, plod). Sintetišu se i lokalizuju pomoću endogenih i

egzogenih sekretornih biljnih tkiva, najčešće peltatnih i kapitatnih sekretornih trihoma. Izoluju se postupkom hidrodestilacije, destilacijom pomoću vodene pare, superkritičnom ekstrakcijom i ceđenjem.⁵⁰

U prirodi etarska ulja igraju važnu ulogu u zaštiti biljaka ispoljavajući antibakterijsko, antifungalno, antivirusno i insekticidno dejstvo. Osim toga privlače neke insekte radi oprašivanja ili odbijaju druge koji ih ugrožavaju. Međutim, njihov glavni adaptivni značaj je u prilagođavanju biljaka na kserotermna staništa – visoke temperature, nedostatak vode i jaku sunčevu insolaciju.⁵⁰

U hemijskom smislu, etarska ulja su veoma složene smeše sekundarnih metabolita među kojima su najviše zastupljeni terpeni i u manjoj meri aromatični (C6-C1 i C6-C3) i alifatični ugljovodonicima male molekulske mase. Od terpena u etarskim uljima su prisutni normoterpeni, monoterepeni, oksigenovani monoterepeni, seskviterpeni, oksigenovani seskviterpeni i diterpeni. Jak aromatični miris nekih vrsta roda *Artemisia* uglavnom je posledica visoke koncentracije isparljivih terpena, komponenata njihovih etarskih ulja, posebno u listovima i cvetovima.⁵¹

Hemijski sastav etarskih ulja vrsta roda *Artemisia* je detaljno proučavan za nekoliko vrsta iz celog sveta. Mnoge studije su pokazale da vrste roda *Artemisia* pokazuju značajne razlike u sastavu terpena u etarskim uljima. U nekim slučajevima varijacije u isparljivim komponentama ovih biljaka mogu se javiti tokom ontogeneze (vreme prikupljanja materijala). Na kvalitet i prinos etarskih ulja vrste *Artemisia* utiče sezona branja, primenjeno đubrivo, pH zemljišta, izbor i stadijum uslova sušenja, geografska lokacija, hemotip ili podvrsta, deo biljke, zatim genotip, kao i metoda ekstrakcije. U **Tabeli 1** su prikazane glavne komponente etarskih ulja iz različitih vrsta roda *Artemisia*.⁵¹

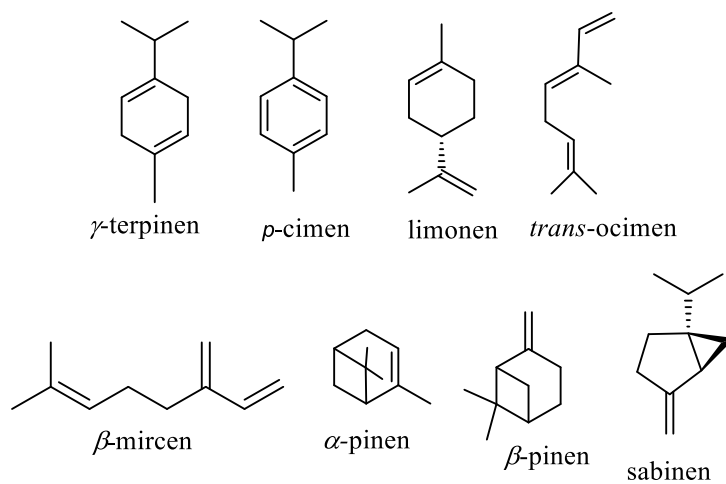
Tabela 1. Glavne komponente etarskih ulja (>10%) biljnih vrsta roda *Artemisia*^a delovi biljke: AP: nadzemni deo; F: cvet; FH: glave cvetova; L: listovi; R: koren.

Jedinjenje	Vrsta <i>Artemisia</i> ^a	Poreklo	Relativni udeo %
<i>trans</i> -anetol	<i>A. dracunculus</i> (AP)	Iran	21,1
	<i>A. dracunculus</i> (AP)	Turska	81,0
artemisia keton	<i>A. annua</i> (AP)	Egipat	14,0
	<i>A. douglasiana</i> (L)	USA	26,0
	<i>A. pontica</i> (AP)	Turska	35,6
β -bisabolol	<i>A. ordosica</i> (AP)	Kina	27,0

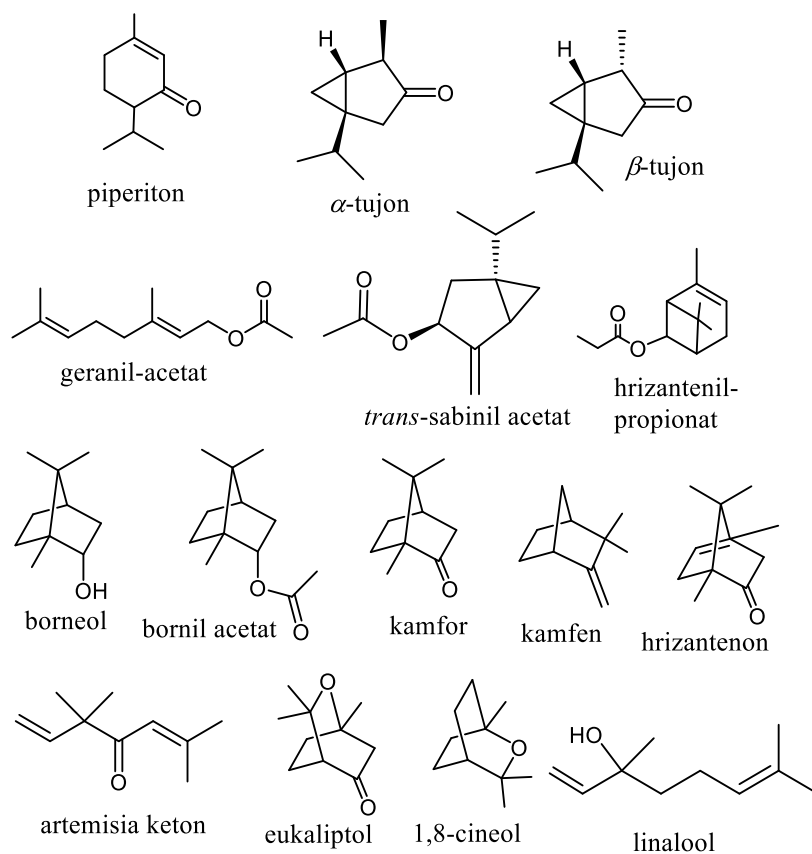
Jedinjenje	Vrsta <i>Artemisia</i> ^a	Poreklo	Relativni udeo %	
borneol	<i>A. abrotanum</i> (L)	Turska	13,5	
	<i>A. argyi</i> (F)	Kina	30,1	
	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	12,3	
	<i>A. incana</i> (AP)	Turska	18,9	
	<i>A. iwayomogi</i> (AP)	Južna Koreja	18,9	
bornil acetat	<i>A. nilagirica</i> (AP)	Indija	35,8	
	<i>A. argyi</i> (F)	Kina	29,8	
γ-kadinen	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	22,0	
	<i>A. kulbadica</i> (AP)	Iran	16,0	
α-kadinol	<i>A. ordosica</i> (AP)	Kina	26,4	
kamfen	<i>A. fragans</i> (R)	Iran	16,9	
kamfor	<i>A. absinthium</i> (AP)	Etiopija	3,7	
	<i>A. abyssinica</i> (AP)	Etiopija	31,2	
	<i>A. afra</i> (L)	Etiopija	29,1	
	<i>A. annua</i> (AP)	Litvanija	42,6	
	<i>A. annua</i> (L)	Etiopija	9,6	
	<i>A. cana</i> (AP)	Kanada	15,9	
	<i>A. douglasiana</i> (L)	USA	29,0	
	<i>A. fragans</i> (R)	Iran	67,0	
	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	40,0	
	<i>A. frigida</i> (AP)	Kanada	17,0	
	<i>A. gorgonum</i> (AP)	Afrika	28,7	
	<i>A. haussknechtii</i> (AP)	Iran	41,0	
	<i>A. incana</i> (AP)	Turska	19,0	
	<i>A. iwayomogi</i> (AP)	Južna Koreja	19,3	
	<i>A. judaica</i> (AP)	Egipat	34,5	
	<i>A. longifolia</i> (AP)	Kanada	21,0	
	<i>A. ludoviciana</i> (AP)	Kanada	37,3	
	kamfor	<i>A. rubripes</i> (L)	Kina	26,9
		<i>A. santonicum</i> (AP)	Turska	18,2
		<i>A. scoparia</i> (AP)	Južna Koreja	11,0
<i>A. sieberi</i> (AP)		Iran	19,5	
<i>A. spicigera</i> (AP)		Iran	24,6	
<i>A. spicigera</i> (AP)		Turska	34,9	
kariofilen	<i>A. lavandulaefolia</i> (AP)	Južna Koreja	16,1	
	<i>A. rubripes</i> (L)	Kina	13,3	
kariofilen oksid	<i>A. campestris</i> (AP)	Litvanija	38,8	
	<i>A. nilagirica</i> (AP)	Indija	28,6	
hamazulen	<i>A. absinthium</i> (AP)	Turska	17,8	
	<i>A. arborescens</i> (AP)	Italija	22,7	
hrizantenon	<i>A. fragans</i> (L)	Iran	23,8	
	<i>A. gorgonum</i> (AP)	Afrika	10,8	
hrizantenil propionat	<i>A. herba-alba</i> (AP)	Pakistan	40,0	
1,8-cineol	<i>A. abrotanum</i> (AP)	Turska	32,6	
	<i>A. cana</i> (AP)	Kanada	21,5	
	<i>A. distans</i> (FH)	Bugarska	16,8	
	<i>A. fragans</i> (L)	Iran	23,7	
	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	33,8	
	<i>A. frigida</i> (AP)	Kanada	23,0	
	<i>A. haussknechtii</i> (AP)	Iran	32,3	
	<i>A. incana</i> (AP)	Turska	14,5	
	<i>A. iwayomogi</i> (AP)	Južna Koreja	19,2	

Jedinjenje	Vrsta <i>Artemisia</i> ^a	Poreklo	Relativni udeo %
	<i>A. longifolia</i> (AP)	Kanada	21,5
	<i>A. ludoviciana</i> (AP)	Kanada	27,6
	<i>A. pontica</i> (AP)	Turska	22,3
	<i>A. scoparia</i> (AP)	Južna Koreja	21,5
	<i>A. spicigera</i> (AP)	Iran	23,3
	<i>A. spicigera</i> (AP)	Turska	9,5
<i>p</i> -cimen	<i>A. scoparia</i> (L)	Indija	27,0
davanon	<i>A. ludoviciana</i> (AP)	Kanada	11,5
epiglobulol	<i>A. ordosica</i> (AP)	Kina	25,6
	<i>A. lavandulaefolia</i> (AP)	Južna Koreja	13,1
eukaliptol	<i>A. rubripes</i> (L)	Kina	15,6
	<i>A. sieversiana</i> (AP)	Kina	9,2
	<i>A. biennis</i> (AP)	Kanada	40,0
farnezen	<i>A. lavandulaefolia</i> (AP)	Južna Koreja	12,3
geranil acetat	<i>A. aucheri</i> (AP)	Iran	10,7
	<i>A. campestris</i> (AP)	Litvanija	15,0
germakren D	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	14,6
<i>cis</i> -lanceol	<i>A. ordosica</i> (AP)	Kina	25,0
	<i>A. dracunculus</i> (AP)	Iran	12,4
limonen	<i>A. scoparia</i> (L)	Indija	12,4
	<i>A. annua</i> (AP)	Indija	11,9
linalool	<i>A. aucheri</i> (AP)	Iran	44,1
metil kavikol	<i>A. dracunculus</i> (AP)	Kanada	16,2
	<i>A. absinthium</i> (AP)	Kanada	10,8
β -mircen	<i>A. scoparia</i> (L)	Indija	24,1
	<i>A. biennis</i> (AP)	Kanada	34,7
<i>trans</i> -ocimen	<i>A. dracunculus</i> (AP)	Iran	20,6
9,12,15-oktadekatrienal	<i>A. capillaris</i> (AP)	Kina	34,5
fitol	<i>A. capillaris</i> (AP)	Kina	33,6
α -pinen	<i>A. mongolica</i> (AP)	Kina	12,6
	<i>A. absinthium</i> (AP)	Iran	23,8
β -pinen	<i>A. scoparia</i> (AP)	Tadžikistan	21,3
piperiton	<i>A. judaica</i> (AP)	Egipat	49,1
sabinen	<i>A. kulbadica</i> (AP)	Iran	25,1
<i>trans</i> -sabinilacetat	<i>A. absinthium</i> (AP)	Kanada	26,4
spatulanol	<i>A. argyi</i> (FH)	Kina	10,0
γ -terpinen	<i>A. scoparia</i> (L and R)	Indija	11,1
	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	19,1
α -tujon	<i>A. fukudo</i> (L)	Koreja	48,3
	<i>A. pontica</i> (AP)	Turska	30,1

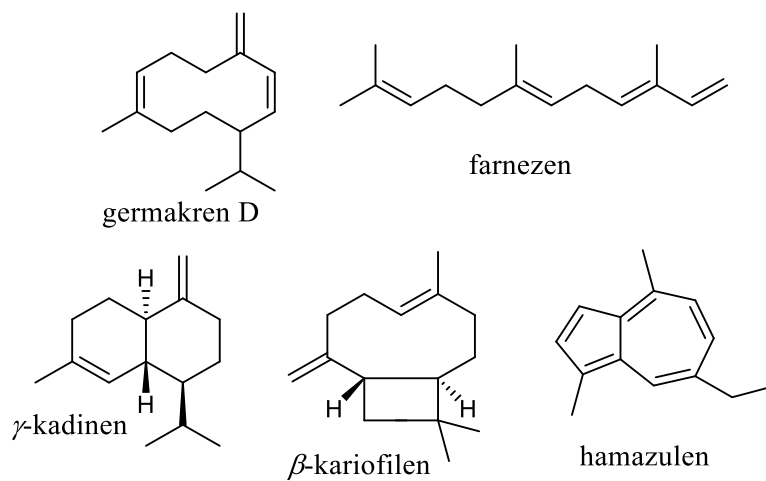
Jedinjenje	Vrsta <i>Artemisia</i> ^a	Poreklo	Relativni udeo %
β -tujon	<i>A. scoparia</i> (AP)	Iran	81,7
	<i>A. sieberi</i> (AP)	Iran	10,5
	<i>A. absinthium</i> (AP)	Iran	18,6
	<i>A. absinthium</i> (AP)	Kanada	10,1
	<i>A. arborescens</i> (AP)	Italija	45,0
	<i>A. distans</i> (FH)	Bugarska	9,8
	<i>A. frigida</i> (L)	Turska	19,1
	<i>A. fukudo</i> (L)	Koreja	12,7
	<i>A. kulbadica</i> (AP)	Iran	18,7
	<i>A. lavandulaefolia</i> (AP)	Južna Koreja	13,8
	<i>A. scoparia</i> (AP)	Iran	14,5
	<i>A. sieberi</i> (AP)	Iran	19,8
	<i>A. spicigera</i> (AP)	Iran	20,7



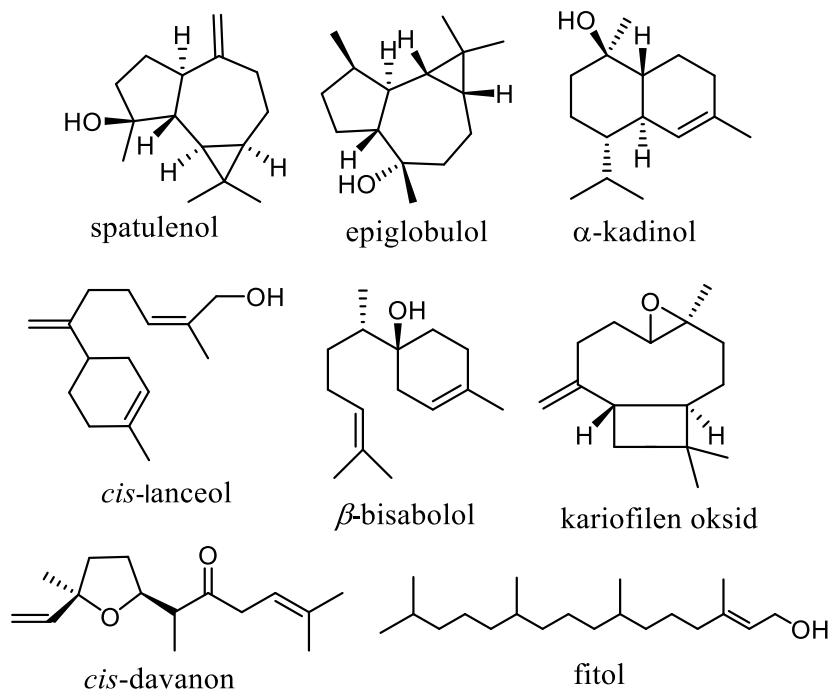
Slika 19. Monoterpeni vrsta roda *Artemisia*



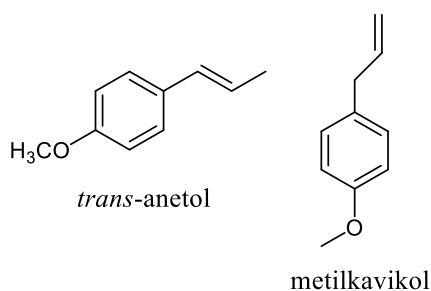
Slika 20. Oksigenovani monoterpeni vrsta roda *Artemisia*



Slika 21. Seskviterpeni vrsta roda *Artemisia*



Slika 22. Oksigenovani seskviterpeni vrsta roda *Artemisia*



Slika 23. Fenilpropanoidi vrsta roda *Artemisia*

1.6.1. Hemijski sastav etarskog ulja *Artemisia santonicum*

Prema istraživanjima koje su sproveli Kordali i saradnici zaključeno je da su u etarskom ulju *A. santonicum* oksigenovani monoterpeni najzastupljenija klasa jedinjenja (50,9%). Iz te grupe izdvajaju se kamfor (18,2%), 1,8 cineol (7,5%), α -terpineol (4,1%) i borneol (4,0%), kao glavne isparljive komponente. Dalje slede oksigenovani seskviterpeni (23,9%) među kojima su najviše zastupljeni β -eudezmol (7,2%) i kubenol (4,2%). Pored navedenih terpena identifikovani su i seskviterpenski ugljovodoni

(7,1%), aromatična jedinjenja (6,3%) i monoterpeni (3,6%).⁵² U drugom ispitivanju sastava etarskog ulja različitih *Artemisia* vrsta, najviše zastupljena komponenta u ulju *A. santonicum* bila je α -tujon (44,8%).⁵³ Istraživanje koje su sproveli Burzo i saradnici pokazalo je prisustvo kamfora (20,11%), *cis*-verbenola (19,85%) i eukaliptola (18,26%) u ulju *A. santonicum*.⁵⁴ Analiza hemijskog sastava etarskih ulja *A. santonicum* sa dva različita lokaliteta (Slano Kopovo i Trešnjevac) kao najzastupljenije komponente u ulju sa lokaliteta Slano Kopovo identifikovani su 1,8 cineol (17,64%) i linalool (12,80%), dok je u ulju sa lokaliteta Trešnjevac najzastupljenija komponenta bio davanon (47,84%).⁵⁵ Iz prikazanih rezultata može da se zaključi da su u ulju *A. santonicum* najčešće oksigenovani monoterpeni ugljovodonici glavne komponente.

1.7. Biološke aktivnosti

1.7.1. Biološka aktivnost ekstrakata i etarskih ulja halofitnih biljnih vrsta

Halofitne biljne vrste su prepoznatljive kao izvori bogati fenolnim jedinjenjima, terpenima, alkaloidima i drugim sekundarnim metabolitima, pa samim tim predstavljaju potencijalne bioaktivne vrste sa različitim biološkim efektima. Biosinteza i akumulacija polifenola i drugih sekundarnih metabolita u biljkama smatra se evolucionim odgovorom biohemijskih puteva kada se biljke nađu u nepovoljnim uslovima životne sredine kao što su povećani salinitet i suša.^{25,35,56}

Najveći broj ovih biljaka, pokazuje antioksidativnu aktivnost: *Limoniastrum guyonianum*,^{57,58} *L. monopetalum*,⁵⁹ *Cressa cretica*,⁶⁰ *Suaeda fruticosa*,^{61,62} *Eryngium maritimum*, *Crithmum maritimum*, *Cakile maritima*,^{25,59,63-65} *Limonium tetragonum*,⁶⁶ *Limonium gmelinii*,⁶⁷ *Mesembryanthemum crystallinum*, *Memecylon edule*, *Salsola kali*, *Tamarix gallica*,^{59,68-71} *Atriplex halimus*,⁷² *Reaumuria vermiculata*,⁷³ *Zygophyllum album*,⁷⁴ *Arthrocnemum macrostachyum*, *Halimione portulacoides*, *Juncus acutus*, *Plantago coronopus*,⁷⁵⁻⁷⁷ *Spergularia marina*,⁷⁸ *Statice gmelinii*, *Mentha pulegium*, *Camphorosma monspeliaca*, *Salicornia europaea*, *Suaeda maritima*, *Artemisia santonicum*, *Achillea collina* i *Aster tripolium*.³⁵ Njihova antioksidativna aktivnost potiče od sposobnosti vezivanja radikalskog kiseonika kao adaptivnog mehanizma koji

je povezan sa stresom soli, a koji uključuje enzimske (superoksid-dizmutaza, glutation peroksidaza i katalaza) i neenzimske puteve. Neenzimski putevi se odnose na biosintezu sekundarnih metabolita koji mogu da neutrališu štetne efekte slobodnih radikala.³⁵

Pored antioksidativnog potencijala, mnogi sekundarni metaboliti utiču na funkcionalnu sposobnost bakterijskih ćelija i drugih mikroorganizama. Mehanizam antimikrobnog delovanja fenolnih kiselina temelji se na pojačanoj propustljivosti membrane, što dovodi do gubitka selektivne propustljivosti i nekontrolisanog gubitka važnih biomolekula. Antimikrobno delovanje flavonoida je povezano sa delimičnim ili potpunim blokiranjem nekih funkcija ćelijske membrane i citoplazme, kao i nekih enzima važnih za proces replikacije DNK bakterija.³⁴ Terpenoidi utiču na dezintegraciju ćelijske membrane, kumarini inhibiraju ćelijsko disanje, dok tanini remete funkcionisanje membrana i enzimske aktivnosti.⁷⁹⁻⁸¹ Testiranje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja različitih vrsta *Artemisia* (*A. judaica*, *A. herba-alba* i *A. arborescens*), na nekoliko patogenih bakterija i gljiva pokazalo je da najbolju antimikrobnu aktivnost ima ulje *A. judaica*.⁸² Prilikom ispitivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava fenolnih jedinjenja i antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta *Tamarix gallica*, ekstrakt je pokazao najjaču aktivnost prema vrsti *Micrococcus luteus*.⁶⁸ Metanolni ekstrakt vrste *Limoniastrum guyonianum* pokazao je antimikrobni potencijal prema *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* i *Candida parapsilosis*, zbog efekata glavnih prisutnih jedinjenja kao što su galna, protokatehuinska, *trans*-cimetna kiselina, metil-4-hidroksibenzoat, *n*-propil-3,4,5-trihidroksibenzoat, epikatehin, naringin i miricetin.⁵⁸ Ispitivanje vrste *Frankenia laevis* pokazao je da su biljni ekstrakti koji su bogati hlorogenskom kiselinom i katehinom imali širok spektar antibakterijskog delovanja naročito prema *Micrococcus luteus* i *Salmonella enterica*.⁸³ Komparativna studija antimikrobne aktivnosti u odnosu na polarost ekstrakata *Eryngium maritimum*, *Crithmum maritimum* i *Cakile maritima* pokazala je da su svi testirani bakterijski sojevi osim *Listeria monocytogenes* bili inhibirani kao i da je hloroformski ekstrakt pokazao veću aktivnost u odnosu na metanolni.²⁵

Etarska ulja halofita pokazuju različitu aktivnost u odnosu na biljni ekstrakt. Uporedna analiza antimikrobne i antioksidativne aktivnosti etarskih ulja i acetonskih ekstrakata *Crithmum maritimum* i *Inula crithmoides* pokazala je da etarska ulja imaju

bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na acetonske ekstrakte koji su pokazali bolju antioksidativnu aktivnost, što se može povezati sa različitim sekundarnim metabolitima prisutnim u ulju (terpeni), odnosno acetonskom ekstraktu (fenolna jedinjenja).⁸⁴ Etarska ulja nekoliko *Achillea* vrsta sa visokim sadržajem hamazulena, *trans*-kariofilena i β -pinena (na primer *A. collina*), pokazala su znatnu antifungalnu aktivnost.⁸⁵ Najveća antibakterijska aktivnost ulja različitih populacija halofite *Artemisia santonicum* uočena je prema vrstama *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella typhimurium*, a najveća antifungalna aktivnost prema *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* i *Penicillium funiculosum* uočena je kod ulja sa visokim sadržajem oksigenovanih monoterpena (uglavnom 1,8 cineola).⁸⁶ Ispitivanjem sadržaja i vrste fenolnih jedinjenja kao i antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata različitih polarnosti fakultativne halofite *Artemisia campestris* uočeno je prisustvo 39 različitih sekundarnih metabolita (kumarini, flavoni, flavonoli, fenolne kiseline, seskviterpeni, flavonoidni glikozidi i dr.) koji doprinose antioksidativnoj i antimikrobnoj aktivnosti ovih ekstrakata.⁸⁷ Metanolni ekstrakti halofita *Limonium vulgare*, *Limonium angustifolium* i *Artemisia maritima* poseduju metabolite sa značajnom antimikrobnom aktivnošću naročito prema vrstama *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* i *Aspergillus brasiliensis*.³⁴

Pored antioksidativne i antimikrobne aktivnosti neke halofite pokazuju i antikancerogenu aktivnost. *n*-Heksanski i metilen-hloridni ekstrakti vrste *Reaumuria vermiculata* su pokazali značajnu antikancerogenu aktivnost protiv ćelija karcinoma pluća A-549.⁷³ Ispitivanjem biološkog potencijala halofite *Zygophyllum album*, pokazano je da ekstrakti sadrže triterpene, flavonoide i sterole koji deluju kao antikancerogena jedinjenja na karcinom pluća (A-549) i adenokarcinom debelog creva (DLD-1). Pored antikancerogene, ekstrakti su pokazali antioksidativnu i antiinflamatornu aktivnost.⁷⁴ Etarski ekstrakt *Juncus acutus* pokazao je visoku selektivnost i citotoksičnu aktivnost.⁷⁶ Kao aktivno jedinjenje identifikovan je junkunol sa selektivnim *in vitro* citotoksičnim delovanjem. Pored antioksidativne i antiinflamatorne aktivnosti, metilen-hloridni ekstrakt vrste *Suaeda fruticosa* pokazao je najveću antikancerogenu aktivnost na humani karcinom pluća (A-549) i adenokarcinom debelog creva (DLD-1, Caco-2 i HT-29).⁶¹ Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti etil-

acetatnih ekstrakata *Salicornia herbacea* pokazalo je da fitol selektivno inhibira HepG2 ćelije, dok γ -linoleinska kiselina i pentadecil-ferulat imaju snažnu antiproliferativnu aktivnost protiv HepG2 i A549 ćelija.⁸⁸ Antikancerogeni potencijal prema humanim HCT 116 i HT-29 ćelijama raka debelog creva uočen je i za ekstrakte semena *Salicornia herbacea*.⁸⁹ Ekstrakt vrste *Limonium densiflorum* sadrži *trans*-3-hidroksi cimetnu kiselinu, miricetin i izoramnetin kao glavna jedinjenja, koja mogu biti odgovorna za anti-kanceraktivnost prema karcinomu pluća (A-549) i adenokarcinomu debelog creva (DLD-1).⁹⁰ Rezultati ispitivanja ekstrakata *Tamarix gallica* i *Arthrocnemum indicum* pokazali su da njihovi ekstrakti smanjuju sintezu DNK i tako utiču na proliferaciju ćelija Caco-2.^{91,92} Heterokarpin izolovan iz vrste *Corydalis heterocarpa* pokazao je citotoksične efekte prema karcinomu želuca (AGS), debelog creva (HT-29), dojke (MCF-7) i fibrosarkoma (HT-1080).⁹³

1.7.2. Biološka aktivnost vrsta iz roda *Atriplex*

Ekstrakti različite polarnosti iz vrste *Atriplex laciniata* pokazali su antiparazitsku i insekticidnu aktivnost. Testirani su metanolni, etil-acetatni, hloroformski, heksanski, vodeni ekstrakti kao i saponinske frakcije. Antiparazitska aktivnost ekstrakata je analizirana prema crvima *Pheretima posthuma* i *Ascaridia galli*, a insekticidna aktivnost prema *Heterotermes indicola* (termiti), *Monomorium pharaonis*, *Tribolium castaneum* i *Rhyzopertha dominica*. Najveću antiparazitsku aktivnost pokazale su saponinska frakcija i hloroformski ekstrakt, a najveću insekticidnu aktivnost prema svim vrstama pokazala je saponinska frakcija.⁹⁴

Citotoksična aktivnost saponina iz *Atriplex glauca* testirana je na dve humane tumorske ćelijske linije HT-29 i HCT-116 (karcinom debelog creva). Najjaču aktivnost na obe ćelijske linije pokazao je 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil saikogenin F.⁴⁷

Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata različite polarnosti iz vrste *Atriplex halimus* najveća aktivnost uočena je za metanolni ekstrakt što se može objasniti prisustvom flavonola, glavnih sekundarnih metabolita, prisutnih u vrstama roda *Atriplex*.⁷²

1.7.3. Biološka aktivnost oleanolnih saponina i patuletinskih i kvercetagetinskih flavonoida

Pentaciklični triterpenski saponini izolovani iz *Cephalaria scoparia* pokazali su antimikrobnu aktivnost. U ovom testiranju najjaču aktivnost je imao saponin 3-*O*- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranozil-olean-12-en-28-oinska kiselina prema vrsti *Enterococcus faecalis*.⁹⁵ Ispitivanje antibakterijske i antifungalne aktivnosti steroidnih i triterpenskih saponina oleanolnog tipa iz *Paullinia pinnata* pokazalo je da veću antimikrobnu aktivnost u ovom testu imaju saponini oleanolnog tipa.⁹⁶ Triterpenski saponini iz kore *Burkea africana* pokazali su antiviralnu aktivnost ka HK/68 i H1N1.⁹⁷ Pentaciklični triterpenski glikozidi različitih vrsta roda *Medicago* pokazuju antimikrobnu, insekticidnu, alelopatsku i citotoksičnu aktivnost.⁹⁸

Kvercetagetin i patuletin izolovani iz vrste *Tagetes erecta* i *Tagetes patula* pokazali su antiproliferativnu aktivnost.⁹⁹ Patuletinski glikozidi iz vrste *Corispermum marschallii* pokazali su antiinflamatornu aktivnost,¹⁰⁰ a iz vrste *Chenopodium bonus-henricus* hepatoprotektivnu i antioksidativnu aktivnost.¹⁰¹

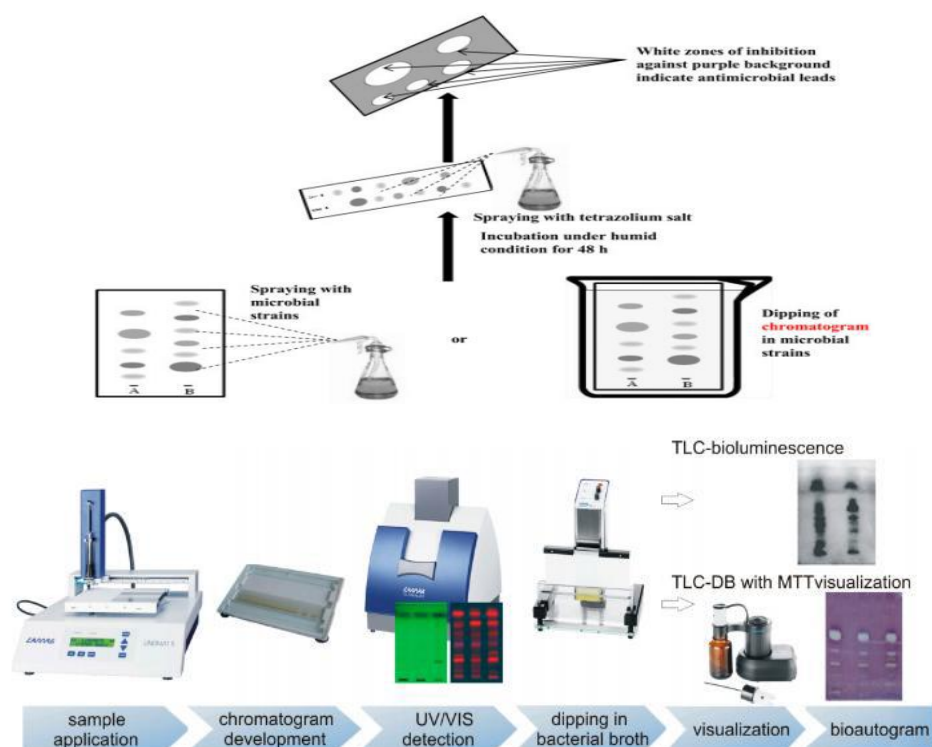
1.7.4. Biološka aktivnost etarskog ulja *Artemisia santonicum*

U dosadašnjim ispitivanjima bioloških aktivnosti etarskih ulja *Artemisia* vrsta uočene su: antioksidativna, antifungalna, antibakterijska i antihelminthska aktivnost.^{10,52,102} Ispitivanjem hemijskog sastava, antifungalne i antioksidativne aktivnosti etarskih ulja *Artemisia absinthium*, *Artemisia santonicum* i *Artemisia spicigera* uočena je korelacija između antifungalne aktivnosti i sadržaja glavnih isparljivih komponenata u uljima. Kamfor, 1,8-cineol, borneol, α -terpineol, terpinen-4-ol, bornil acetat i hrizantenol su bili glavni sastojci ulja *A. santonicum* i *A. spicigera*. Obe vrste sadrže visoki procenat oksigenovanih monoterpena i njihova ulja pokazala su slične antifungalne aktivnosti. Za razliku od ulja *A. santonicum* i *A. spicigera*, ulje *A. absinthium* je imalo slabiju antifungalnu aktivnost i manji procenat oksigenovanih monoterpena. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazalo je etarsko ulje *A. santonicum*.⁵²

Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskog ulja tri *Artemisia* vrste, uočeno je da je ulje *A. santonicum* inhibiralo rast 24 od ukupno 25 bakterijskih vrsta, ulje *A. absinthium* 15, dok je ulje *A. spicigera* inhibiralo rast samo 3 bakterijske vrste.¹⁰²

1.7.5. Antibakterijska aktivnost-metoda bioautografije

Jedna od metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti komponenata etarskog ulja je bioautografija. To je jednostavna, brza i jeftina skrining metoda za određivanje aktivnosti velikog broja jedinjenja u smešama (etarskim uljima ili ekstraktima) u cilju izolovanja onih kod kojih je uočena biološka aktivnost.¹⁰³ Ona se najčešće koristi u kombinaciji sa HPTLC tehnikom za razdvajanje komponenata etarskog ulja ili ekstrakta, čijom primenom se postiže precizno nanošenje uzoraka, maksimalna efikasnost razdvajanja, razvijanje hromatograma uz softversku kontrolu, kao i bolja osetljivost detekcije.¹⁰⁴



Slika 24. Šematski prikaz HPTLC analize kombinovane sa direktnom bioautografijom (Slika preuzeta iz reference 103)

1.7.6. „Quorum sensing“

„Quorum sensing“ (QS) predstavlja brojno zavisnu komunikaciju između mikroorganizama putem malih molekula, autoinduktora, koji utiču na promenu genske ekspresije i ponašanje mikroorganizama.¹⁰⁵ Autoinduktori se proizvode kao odgovor na promenu gustine bakterijske ćelije. Porastom gustine ćelija povećava se i koncentracija autoinduktora koji se vezuju za receptore na površini ćelije, čime se pokreće serija reakcija i aktivacija transkripcionih faktora što dovodi do ekspresije određenih gena.¹⁰⁶ Tako, *P. aeruginosa*, za međućelijsku komunikaciju unutar kolonije koristi N-acil-homoserinske laktone (AHL) kao autoinduktorne molekule.¹⁰⁷ Pored *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), kao test organizmi za ispitivanje QS-a koriste se i *Chromobacterium violaceum* (CV026), *Aliivibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Yersinia enterocolitica* etc.¹⁰⁸ QS i formiranje biofilma su mehanizmi koji su uključeni u mikrobnu patogenezu. Sve je veće interesovanje za testiranje novih prirodnih proizvoda koji inhibicijom quorum sensing-a sprečavaju bakterijske infekcije.¹⁰⁹ Formiranje biofilma, pokretljivost, pigmentacija, bioluminiscencija, produkcija toksina, degradativnih enzima i drugih metabolita neki su od brojnih virulentnih faktora *P. aeruginosa* koji su kontrolisani QS mehanizmom.¹¹⁰⁻¹¹²

1.7.6.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Za ispitivanje antiquorum sensing dejstva korišćena je *Pseudomonas aeruginosa*. Ona pripada Gram negativnim bakterijama i štetna je za domaćina nakon postizanja određene koncentracije ćelija u organizmu koja prevazilazi jačinu imunog sistema domaćina. Često se javlja u bolnicama, rizična je za pacijente sa oslabljenim imunitetom i uzročnik je brojnih upala i oboljenja kao što su bronhopneumonija, urinarne, plućne i kožne infekcije, septički šok, nozokomijalna infekcija, ulcerativni keratitis, infekcije rana i mekih tkiva.¹¹³⁻¹¹⁵

Kada bakterija formira biofilm teško je otkloniti infekciju i uništiti bakterije zato što postaju otpornije na antibiotike. Neki prirodni proizvodi mogu da poremete bakterijski biofilm i učine da bakterije postanu osetljivije na različite antibiotike.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Istraživanjem je zaključeno da je lakše ostvariti inhibiciju formiranja biofilma, nego

oštećenje već formiranog biofilma. Sprečavanjem formiranja biofilma smanjuje se mogućnost nastajanja bakterijske infekcije.¹²⁰

1.7.6.2. Formiranje biofilma

Neke vrste bakterija mogu da rastu i da se razvijaju u zajednicama na biotičkim i abiotičkim površinama formirajući biofilmove koji predstavljaju finalni mehanizam zaštite bakterija od imunog sistema domaćina i dejstva antibiotika.^{121,122} To su zapravo populacije bakterija koje su uronjene u samogenerišući egzopolisaharidni matriks i koje su vezane za određeni supstrat. Formiranje biofilma mikroorganizama inicirano je stvaranjem mikrokolonija na supstratu, sazrevanjem i daljim širenjem kolonija što ih dodatno čini otpornijim izazivačima infekcija.¹²³ Biofilm se sastoji od vode (95%), ekstracelularnog polisaharidnog matriksa u vidu gela (1-2%) i mikroorganizama koji su uronjeni u biofilm (2-5%).

Formiranje biofilma se odvija u tri faze: vezivanje, sazrevanje i disperzija. U prvoj fazi dolazi do reverzibilnog pripajanja bakterija za podlogu, nakon čega sledi ireverzibilna adhezija bakterije za supstrat pomoću specifičnih adhezina kao što su pili, flagele i površinski proteini. Sledeća je faza sazrevanja gde se vrši intenzivno umnožavanje i stvaranje ekstracelularnog, polisaharidnog matriksa koji čini najveću masu biofilma, dok je za poslednju fazu disperzije karakteristično izdvajanje planktonskih ćelija koje napuštaju klastere i formiraju nova žarišta kolonije što dovodi do širenja infekcije.¹²⁴ Takve infekcije koje nastaju usled formiranja biofilma su asimptomatske ili sa blagim simptomima. Dodatni problem u lečenju bakterijskih infekcija je nastanak rezistentnosti bakterija na uobičajeno korišćene antibiotike. Kako bi se smanjio rast infekcija izazvanih *P. aeruginosa* koristi se terapija profilaktičnim antibioticima.¹²⁵ Obzirom da uobičajene doze antibiotika nisu efikasne jer se otpornost višeslojnog biofilma prvenstveno bazira na postojanju ekstracelularnog matriksa kao fizičke barijere koji redukuje količinu antibiotika koja može da prodre u bakterijsku koloniju, doze antibiotika se moraju uvećati od 100 do 1000 puta.^{121,122} Pored matriksa, klasteri koje formiraju sami mikroorganizmi unutar biofilma predstavljaju dodatnu prepreku. Takođe, aktivacija i ekspresija određenih gena, može dovesti do sinteze brojnih virulentnih faktora koji su pod QS kontrolom.¹²⁶⁻¹²⁹ Važnu ulogu imaju fenazini

kao virulentni faktori, čija je sinteza kod *P. aeruginosa* pod kontrolom QS sistema,^{130,131} kao i sposobnost pokretljivosti kolonije *P. aeruginosa* koji doprinosi formiranju biofilma i kolonizaciji podloge od strane ove bakterije.¹³²

1.7.6.3. Testovi pokretljivosti (Twitching i flagella motility)

U zavisnosti od uslova u kojima se nalaze, bakterijske vrste poseduju različite tipove kretanja: „swarming“, „swimming“, „twitching“, „gliding“ i „sliding“.¹³³ „Swimming“ je tip kretanja koje je omogućeno rotirajućom snagom flagele u tečnoj sredini, a „twitching“ je kretanje bakterija koje je omogućeno ekstenzijom i retrakcijom pila tipa IV kojima se ostvaruje sporo kretanje ćelija koje izgleda kao trzanje. Flagele i pili omogućuju širenje kolonija sa nutritivno siromašnih na nutritivno bogata mesta i značajne su prilikom adhezije bakterije za domaćina, za formiranje biofilma i dr.¹³⁴ Smanjenje broja ovih struktura sprečava disperziju kolonija nakon iscrpljivanja nutrijenata, što može dovesti i do uništenja bakterija.

1.7.6.4. Produkcija piocijanina

P. aeruginosa procesom biosinteze proizvodi plavičasto-zeleni pigment piocijanin. Ovaj pigment ima ulogu virulentnog faktora *P. aeruginosa* i odgovoran je za početak kolonizacije bakterije *in vivo*, kao i za nastanak i dalje širenje infekcija uzrokovanih ovom bakterijom.^{135,136} Dosadašnja istraživanja su pokazala da je redukcija i potpuna inhibicija biosinteze piocijanina jako bitna za smanjenje patogenosti bakterije i poboljšanje efektivnosti odbrambenog sistema domaćina.¹³⁴

2. NAŠI RADOVI

Cilj ove doktorske teze bio je da se ispita sastav glavnih sekundarnih metabolita halofitnih biljnih vrsta roda *Atriplex* (*A. littoralis*, *A. tatarica* i *A. prostrata*) i *Artemisia* (*A. santonicum*) kao i da se ispita njihova biološka aktivnost. Navedene halofite su vrlo malo hemijski ispitivane i u literaturi je do sada objavljeno nekoliko radova u kojima su ispitani njihovi sekundarni metaboliti.⁴⁰⁻⁴⁹

U prvom koraku, ispitivani biljni material je osušen i samleven do finog praha. Iz vrste *A. santonicum* izolovano je etarsko ulje i određen njegov hemijski sastav, dok su vrste roda *Atriplex* ekstrahovane postupkom koji je detaljno opisan u Eksperimentalnom delu.

n-Butanolni ekstrakt *A. littoralis* je prečišćavan semipreparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom uz UV detekciju.

n-Butanolni ekstrakt *A. tatarica* je frakcionisan hromatografijom na koloni silika gela, dobijene frakcije su grupisane na osnovu TLC analiza (sličnih R_f vrednosti). Prečišćavanje je nastavljeno na reverzno-faznom HPLC-u.

Zbog slične polarnosti jedinjenja prisutnih u *n*-butanolnom ekstraktu *A. prostrata* frakcionisanje je započeto hromatografijom na koloni (Sephadex LH-20). Razdvajanje flavonoidnih glikozida od triterpenskih saponina postignuto je na osnovu različitih molekulskih masa ovih jedinjenja (veličina molekula). Frakcije su zatim, nakon odabira pogodnog eluenta, analizirane visoko efikasnom tankoslojnom hromatografijom.

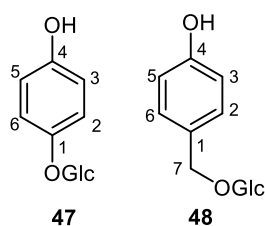
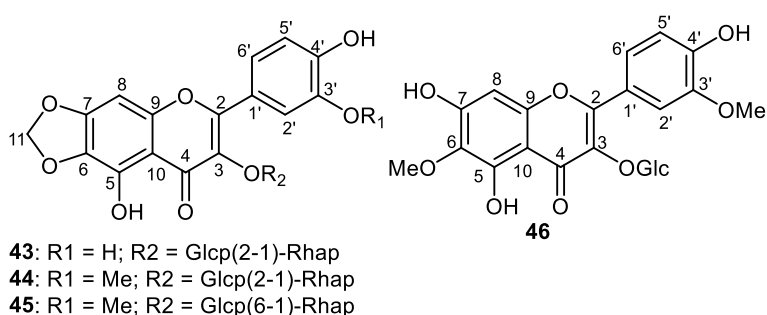
Nakon frakcionisanja i prečišćavanja ekstrakata biljaka iz roda *Atriplex* i etarskog ulja *Artemisia santonicum* ispitivane su njihove biološke aktivnosti, kao i aktivnosti izolovanih fenolnih jedinjenja, flavonoidnih glikozida i saponina.

Strukture izolovanih jedinjenja su određene tehnikama 1D (^1H i ^{13}C) i 2D (COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, HSQC i HMBC) NMR, UV i IR spektroskopije, masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRESIMS) i polarimetrijom.

U ovom odeljku prikazano je detaljno određivanje strukture izolovanih jedinjenja, njihovi NMR spektri i maseni spektralni podaci. Dodatno, hemijska pomeranja i rezultati bioloških aktivnosti su prikazani tabelarno. Ostali spektroskopski podaci su dati u Eksperimentalnom delu (poglavlje 3.3.6.).

2.1. Jedinjenja izolovana iz biljne vrste *Atriplex littoralis*

Iz *n*-butanolnog ekstrakta dobijenog nakon tečno-tečne ekstrakcije koji je dalje prečišćavan semipreparativnom reverzno-faznom hromatografijom izolovano je ukupno 6 jedinjenja među kojima su bila tri nova flavonoidna glikozida. Strukture ovih jedinjenja date su na **Slici 25** (nova jedinjenja su **43-45**), a detaljan postupak njihovog izolovanja opisan je u poglavlju 3.3.1. U ovom delu prikazani su spektri svih izolovanih jedinjenja iz *A. littoralis* na osnovu kojih je određena njihova struktura.

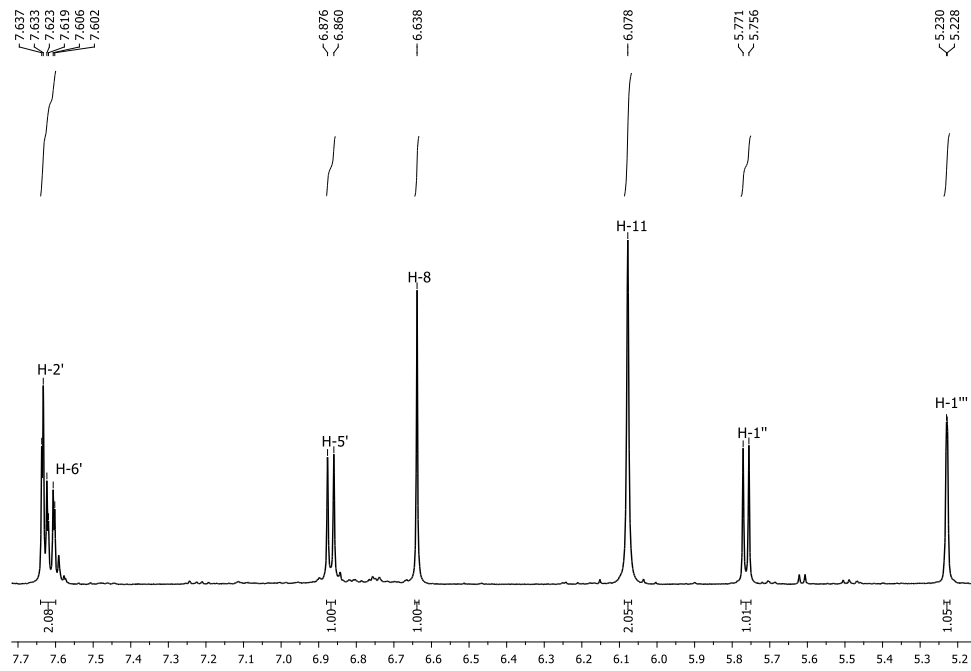


Slika 25. Strukturne formule jedinjenja izolovanih iz *A. littoralis*

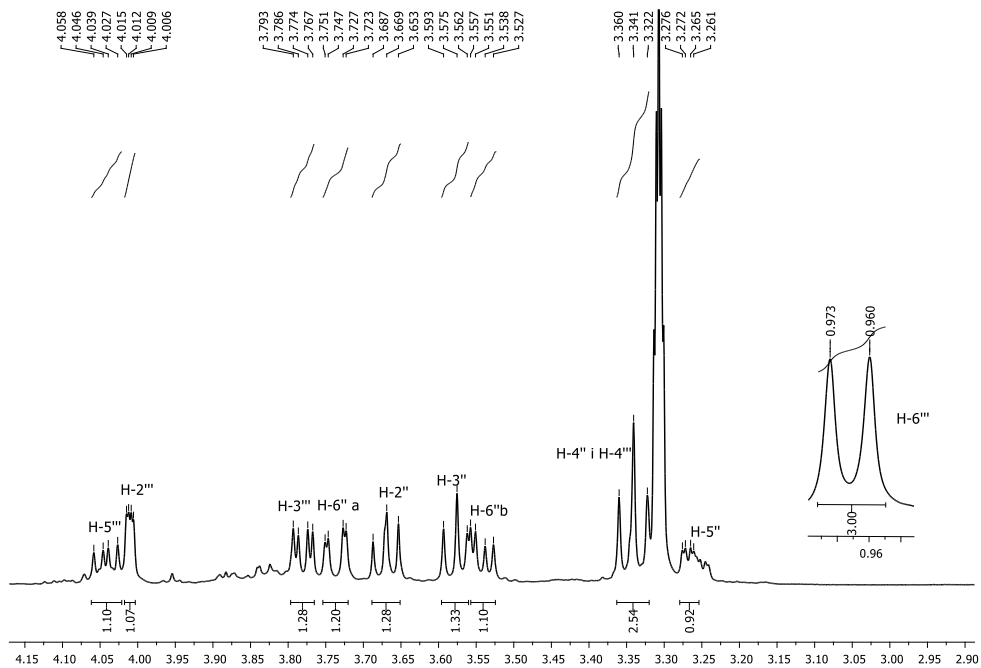
2.1.1. Određivanje strukture kvercetagetin 3-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida- atripleksina I (**43**)

Jedinjenje **43** je izolovano kao žuti prah u količini od 31,1 mg. U UV spektru ovog jedinjenja uočen je λ_{max} na 348 nm što je ukazalo na konjugovani sistem, odnosno prisustvo aromatičnih prstenova. U IR spektru zapažene su apsorpcione trake na 1565, 1478 i 828 cm^{-1} koje potiču od valencionih i deformacionih C=C aromatičnih vibracija, a intenzivne trake na 1680 i 3367 cm^{-1} ukazuju na prisustvo karbonilne i hidroksilne grupe, redom. HRESIMS spektar pokazuje deprotonovan molekulski jon na vrednosti m/z 637,1445 $[\text{M} - \text{H}]^-$, što je uz ^{13}C NMR spektar ukazalo da jedinjenje **43** ima

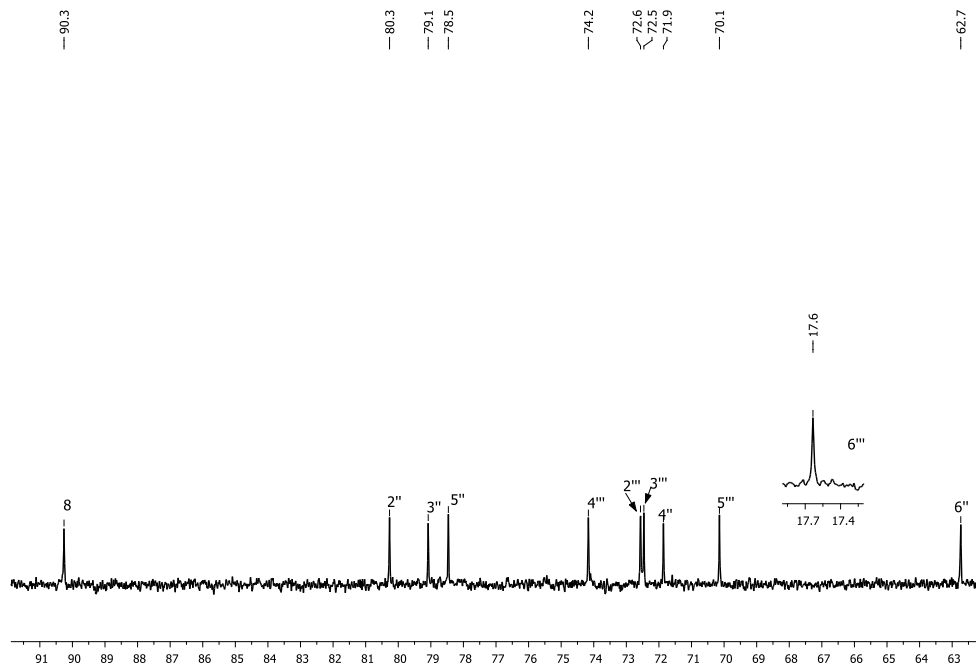
molekulska formulu $C_{28}H_{30}O_{17}$. U 1H NMR spektru u aromatičnom regionu uočena su četiri signala protona (**Tabela 2, Slika 26**). Singlet na δ_H 6,64 ppm (H-8) pripada aromatičnom prstenu A, a signali na δ_H 6,86 i 7,60-7,62 ppm pripadaju protonima H-2', H-5', H-6' B prstena flavonoida (ABX spinski sistem). Na osnovu hemijskih pomeranja signala u 1H NMR spektru i broja signala u aromatičnom delu ^{13}C NMR spektra (**Slika 29**), a poređenjem sa literaturnim podacima, zaključeno je da aglikon odgovara kvercetagetinu.¹³⁷ To je potvrđeno i dodavanjem različitih reagenasa za pomeranje talasnih dužina u UV spektru. Nakon tretiranja metanolnog rastvora jedinjenja **43** rastvorom NaOAc/H₃BO₃ došlo je do batohromnog pomeranja trake I (22 nm) čime je potvrđeno prisustvo katehola u aglikonu. Slobodna hidroksilna grupu u položaju C-5 je dokazana batohromnim pomeranjem trake I (40 nm) i trake II (18 nm) nakon dodavanja AlCl₃/HCl. Preostala UV pomeranja data su u Eksperimentalnom delu (3.3.6.). Pored pomenutih aromatičnih protona uočen je singlet na hemijskom pomeranju δ_H 6,08 ppm (H-11) koji potiče od metilendioksi grupe. Položaj ove grupe nedvosmisleno je određen na osnovu HMBC korelacija H-11/C-6, C-7 (**Slika 32**). Identifikacija monosaharida usledila je nakon kisele hidrolize pomoću 2M HCl, poređenjem retencionih vremena standarda sa vremenima monosaharida iz hidrolizata na HPLC-u sa elektrohemijским detektorom. Analizom 1H i ^{13}C NMR signala u saharidnoj oblasti uočena su dva anomerna signala δ_H/δ_C 5,77/100,4 i δ_H/δ_C 5,23/102,8 što je uputilo na dve monosaharidne jedinice: D-glukopiranozu i L-ramnopiranozu. (**Slike 26-29**). Ostali signali iz šećera su asignirani koristeći COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, i HMBC spektre, polazeći od signala anomernih protona. Relativne konfiguracije D-glukopiranoze i L-ramnopiranoze su određene pomoću NOESY korelacija (**Slika 34**) (H-1"/H-3", H-1"/H-5", H-3"/H-5", i H-2"/H-4") za glukozu, (H-3"/H-2") za ramnozu i vicinalnih konstanti kuplovanja. Vrednost vicinalne konstante za protone iz glukoze iznosi $J_{1''/2''} = 7,6$ Hz, što odgovara β -konfiguraciji D-glukopiranoze, dok je L-ramnopiranoza prisutna u α -konfiguraciji $J_{1'''/2'''} = 1,2$ Hz. Korelacije H-1"/C-3, H-2"/C-1"', i H-1'''/C-2'' u HMBC spektru (**Slika 31**) određuju položaj vezivanja disaridne jedinice za aglikon kao i tip glikozidne veze koja se ostvaruje između glukoze i ramnoze. Glikozidna veza α -L-ramnopiranozil(1→2)- β -D-glukopiranozid je potvrđena i korelacijom H-1'''/H-2'' u NOESY spektru (**Slika 34**). Ovom analizom zaključeno je da jedinjenje **43** novi prirodni proizvod nazvan atripleksin I.



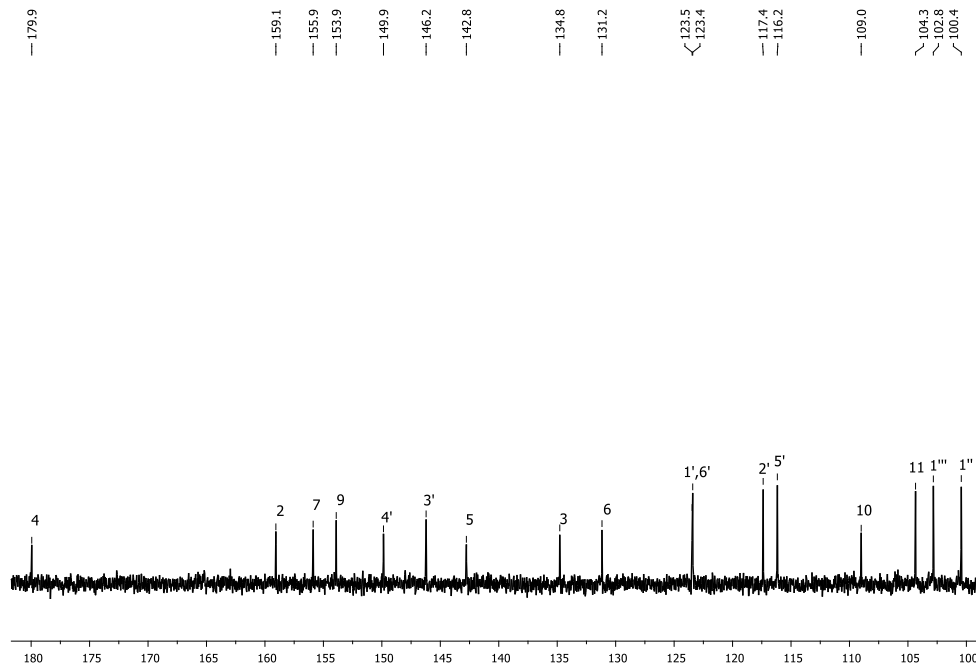
Slika 26. ^1H NMR spektar atripleksina I (**43**) – oblast 5,2-7,7 ppm



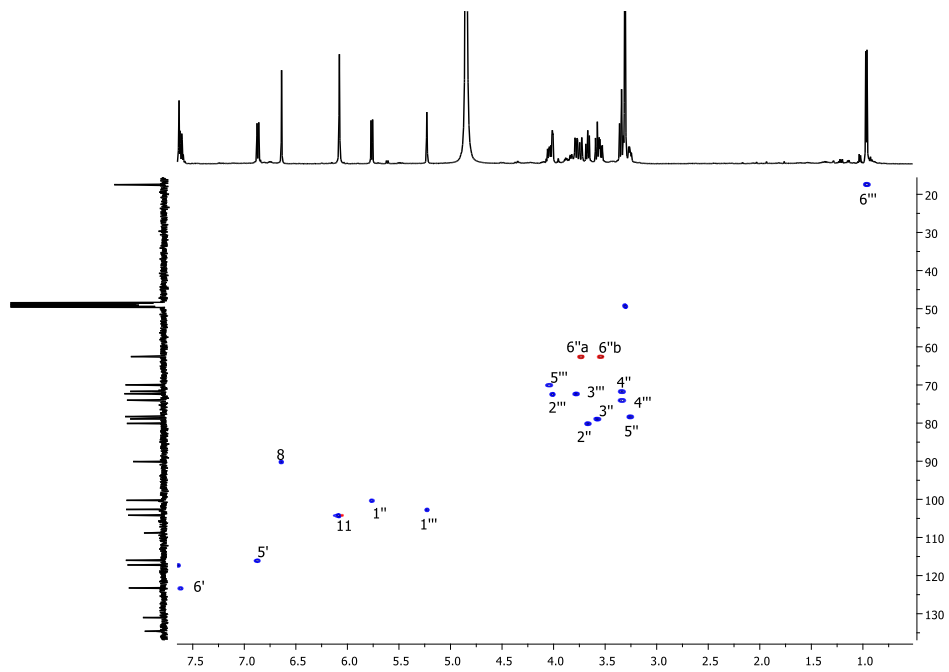
Slika 27. ^1H NMR spektar atripleksina I (**43**) – oblast 2,90-4,15 ppm



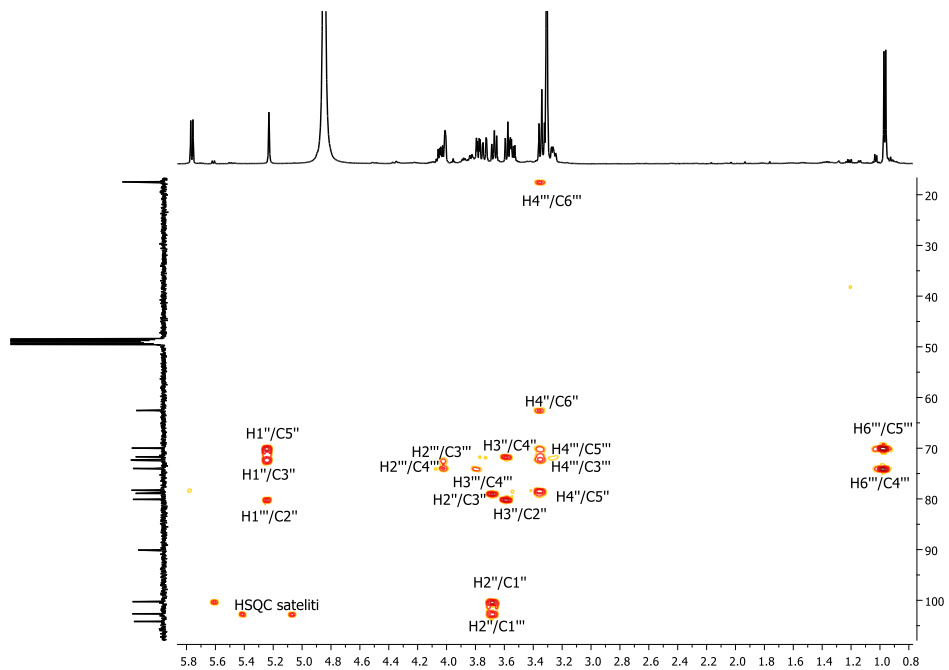
Slika 28. ^{13}C NMR spektar atripleksina I (**43**) – oblast 63-91 ppm



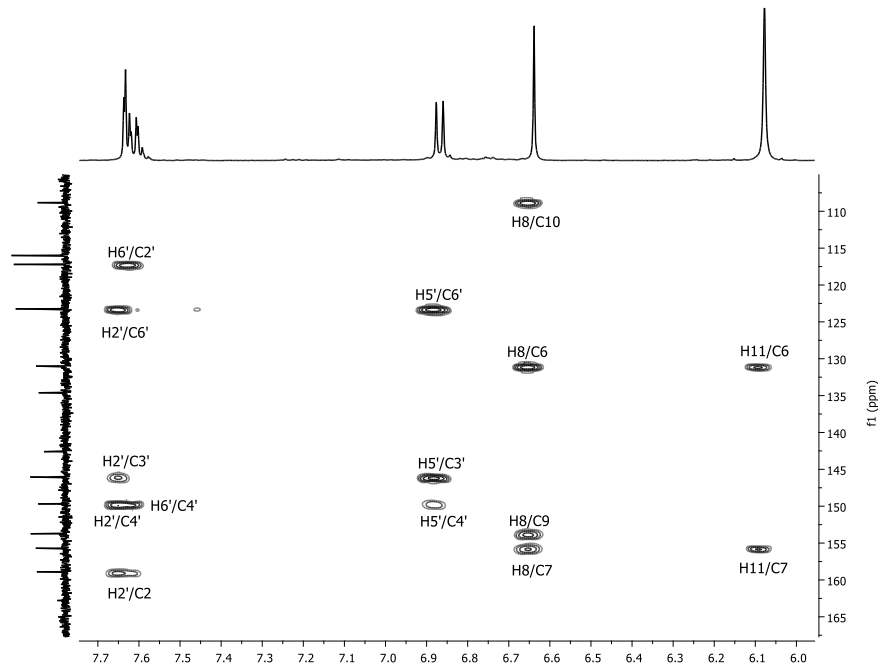
Slika 29. ^{13}C NMR spektar atripleksina I (**43**) – oblast 100-180 ppm



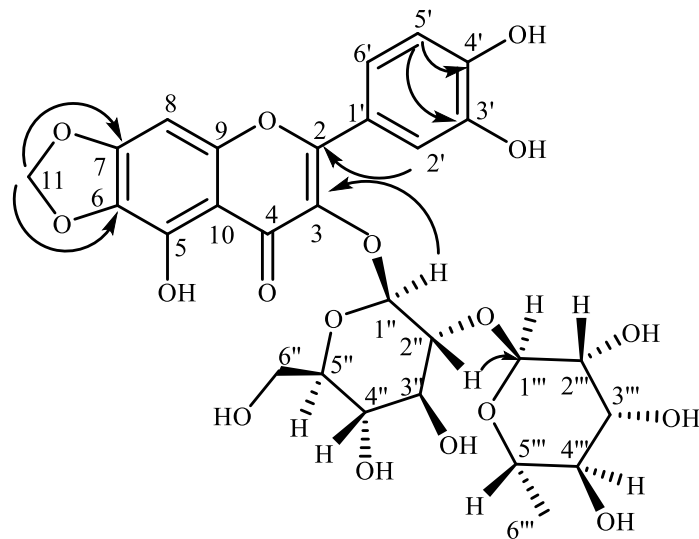
Slika 30. HSQC spektar atripleksina I (43)



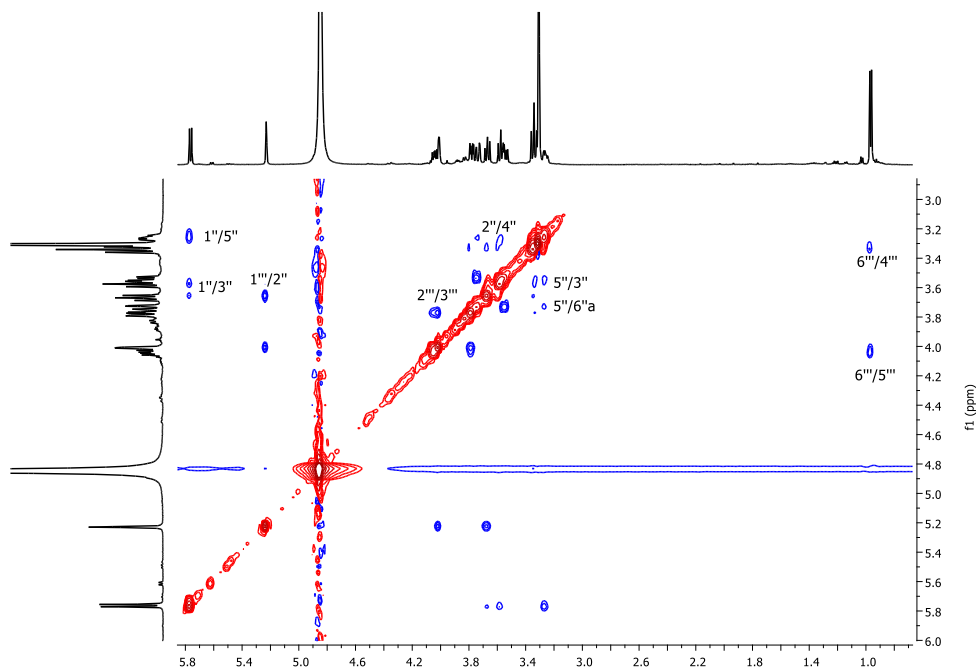
Slika 31. Deo HMBC spektra atripleksina I (43) (oblast 0,8-5,8 ppm za ^1H NMR i 15-120 ppm za ^{13}C NMR)



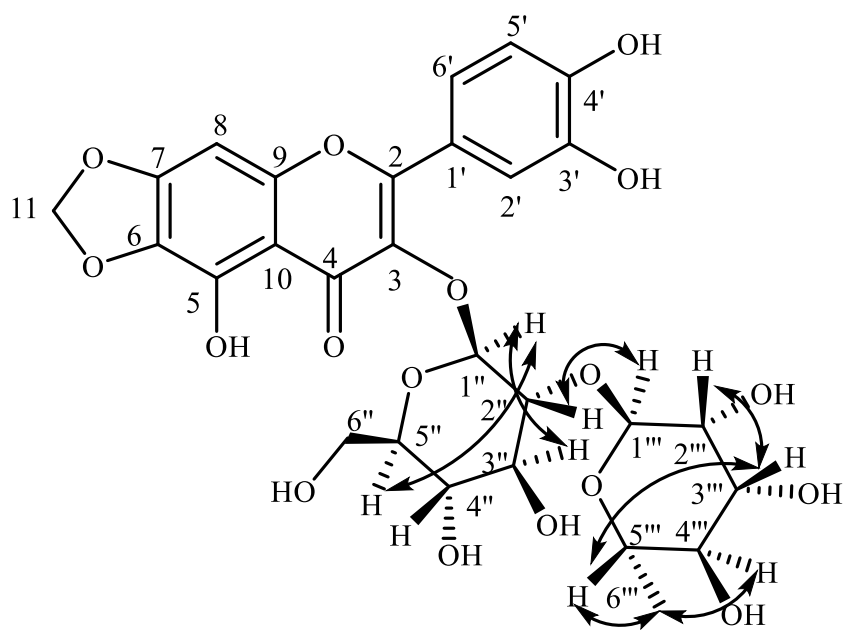
Slika 32. Deo HMBC spektra atripleksina I (**43**) (oblast 6,0-7,7 ppm za ^1H NMR i 100-170 ppm za ^{13}C NMR)



Slika 33. Ključne HMBC korelacije atripleksina I (**43**)



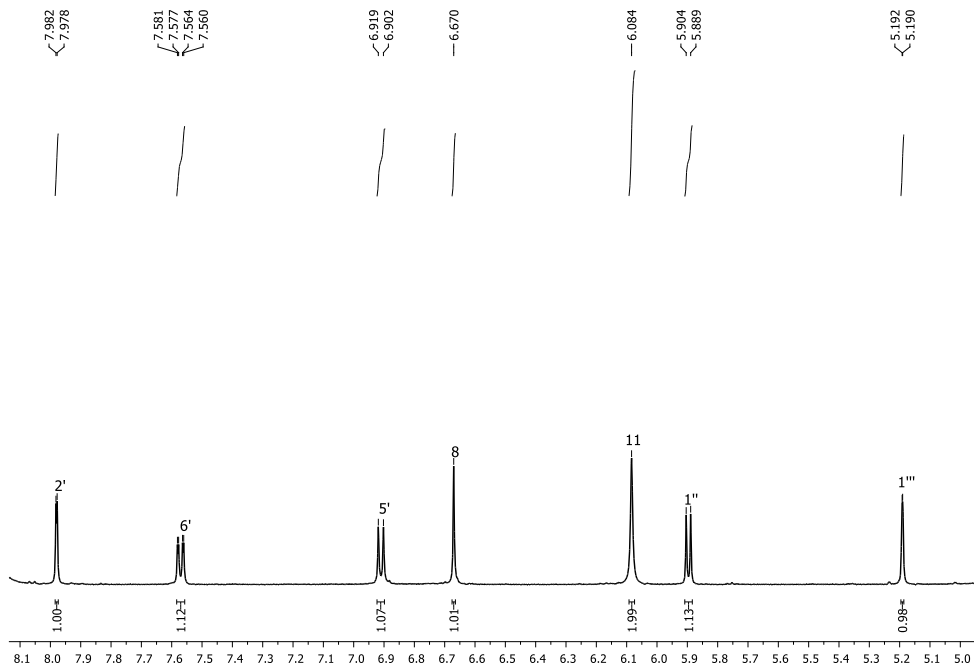
Slika 34. Deo NOESY spektra atripleksina I (**43**) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu



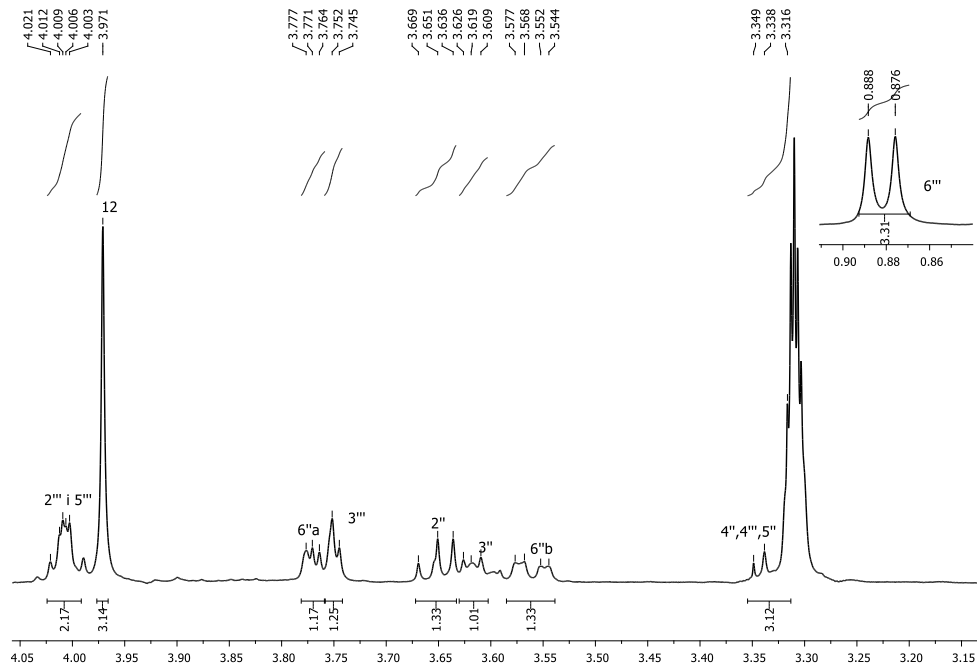
Slika 35. Ključne NOESY korelacije atripleksina I (**43**)

2.1.2. Određivanje strukture 3'-O-metilkvercetagetin 3-O- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida – atripleksina II (44)

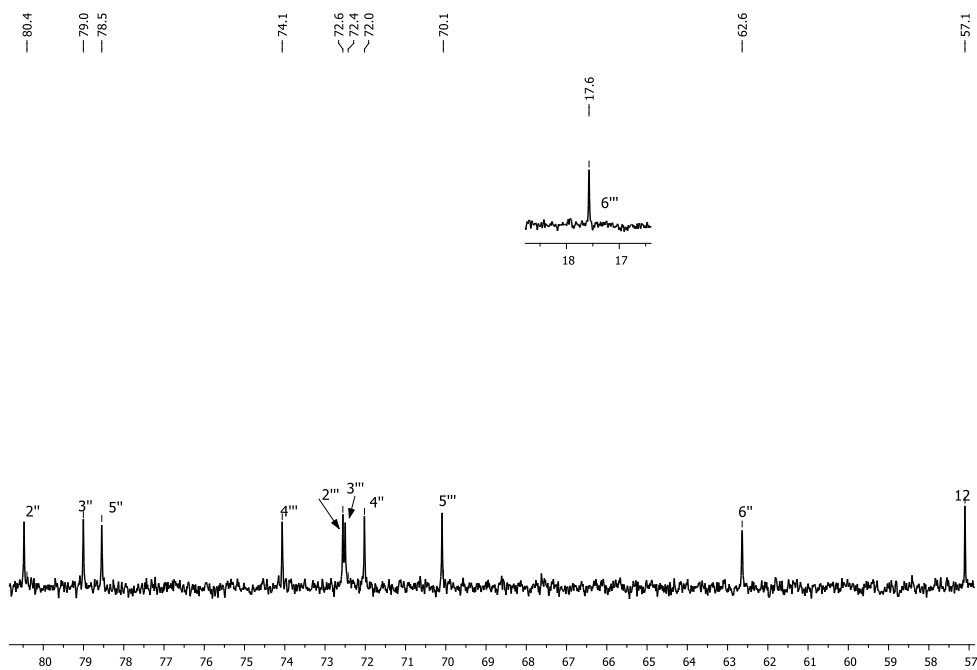
Jedinjenje **44** (**Slika 25**) je izolovano u količini od 32,9 mg u vidu žutog praha. Molekulska formula $C_{29}H_{32}O_{17}$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekuskog jona $[M - H]^-$ na m/z 651,1615. 1H i ^{13}C NMR podaci jedinjenja **44** (**Tabela 2**) su bili vrlo slični kao za jedinjenje **43**. U poređenju sa 1H i ^{13}C NMR spektrima jedinjenja **43**, uočeni su i dodatni signali: singlet na δ_H 3,97 ppm i ugljenik na δ_C 57,1 ppm (**Slike 37** i **38**) koji su ukazali na dodatnu metoksi grupu u B prstenuu odnosu na jedinjenje **43**. Položaj metoksi grupe određen je na osnovu HMBC korelacije ugljenika C-3' i protona iz metoksi grupe (3'-OCH₃/C-3') kao i iz NOESYkorelacije 3'-OCH₃/H-2' (**Slike 41** i **44**). Analizom ^{13}C spektra (**Slika 39**) u aromatičnom regionu zapaženo je prisutvo 15 signala sa sličnim hemijskim pomeranjima kao u jedinjenju **43**, što odgovara aglikonu kvercetagetina.¹³⁷ Slobodna 4'-OH je potvrđena batohromnim pomeranjem sa smanjenjem intenziteta trake I u UV spektru nakon dodavanja NaOCH₃ u metanolni rastvor jedinjenja **44**. Dodavanje AlCl₃ dovodi do batohromnog pomeranja trake I (38 nm) i trake II (18 nm), dok dodatak HCl ne dovodi do promena u pomeranju talasnih dužina. Ovim je potvrđena slobodna 5-OH grupa kao i da u jedinjenju **44** u prstenu B nije prisutna kateholska grupa. Nakon hidrolize jedinjenja **44** na HPLC-u su identifikovane D-glukoza i L-ramnoza kao u slučaju jedinjenja **43**. Asignacija protona koji potiču od monosaharida izvršena je na osnovu korelacija u COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, i HMBC spektrima. Kao i u jedinjenju **43** prisustvo β -D-glukopiranozilne i α -L-ramnopiranozilne jedinice utvrđeno je na osnovu NOESY korelacija i vrednosti vicinalnih konstanti kuplovanja. HMBC korelacija H-1"/C-3 ukazuje da je D-glukopiranoza vezana za C-3 aglikona preko kiseonika OH grupe sa C-1". Korelacije H-1"/C-2" iz HMBC spektra (**Slika 41**) ukazale su na to da je ramnoza vezana svojim C-1" za C-2" iz glukozne jedinice. Sve ovo ukazalo je na to da je jedinjenje **44** novi prirodni proizvod i nazvano je atripleksin II.



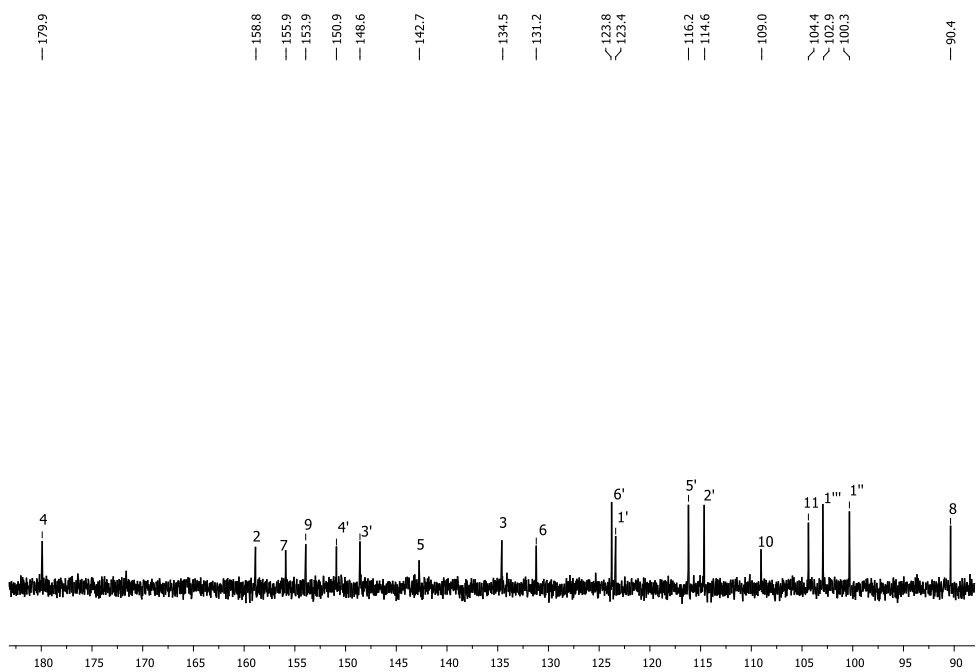
Slika 36. ^1H NMR spektar atripleksina II (**44**) – oblast 5,0-8,1 ppm



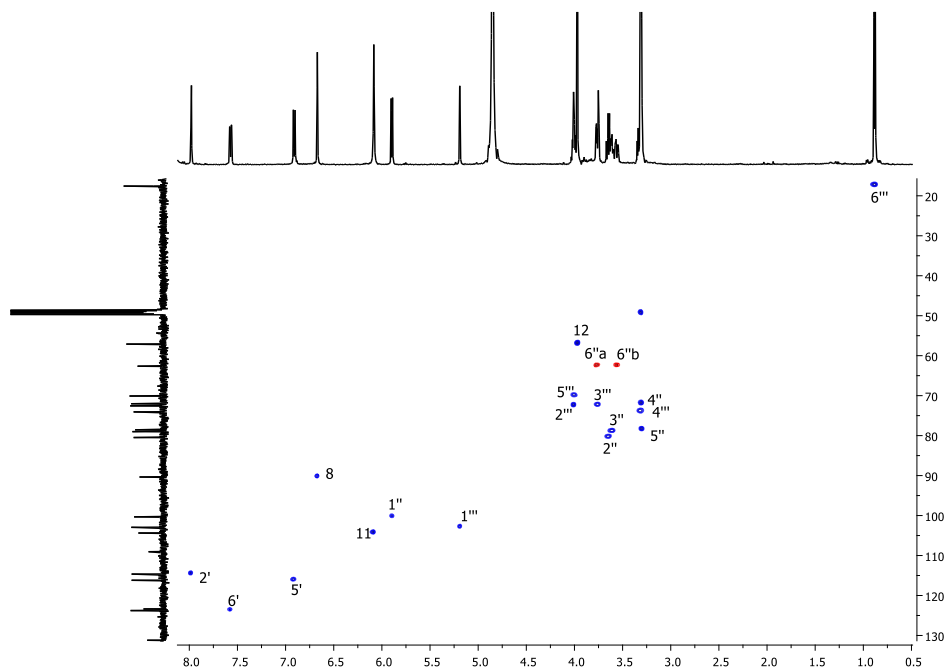
Slika 37. ^1H NMR spektar atripleksina II (**44**) – oblast 3,15-4,05 ppm



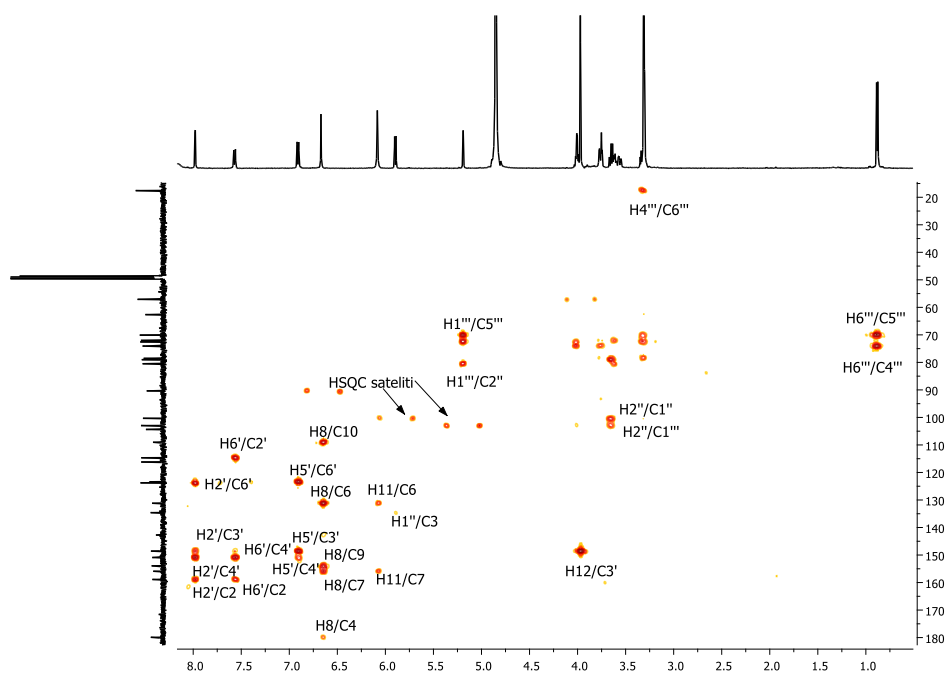
Slika 38. ^{13}C NMR spektar atripleksina II (44) – oblast 57-81 ppm



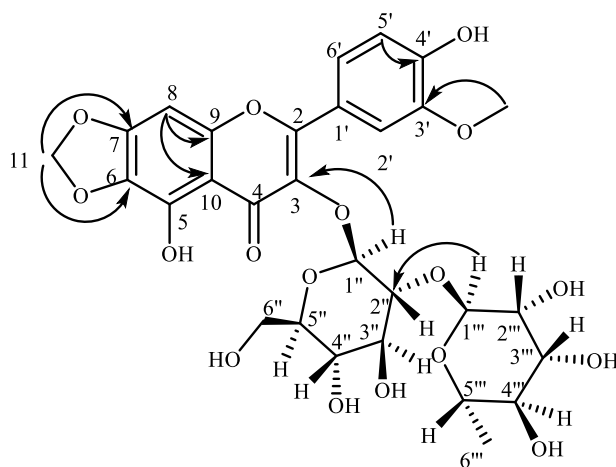
Slika 39. ^{13}C NMR spektar atripleksina II (44) – oblast 90-183 ppm



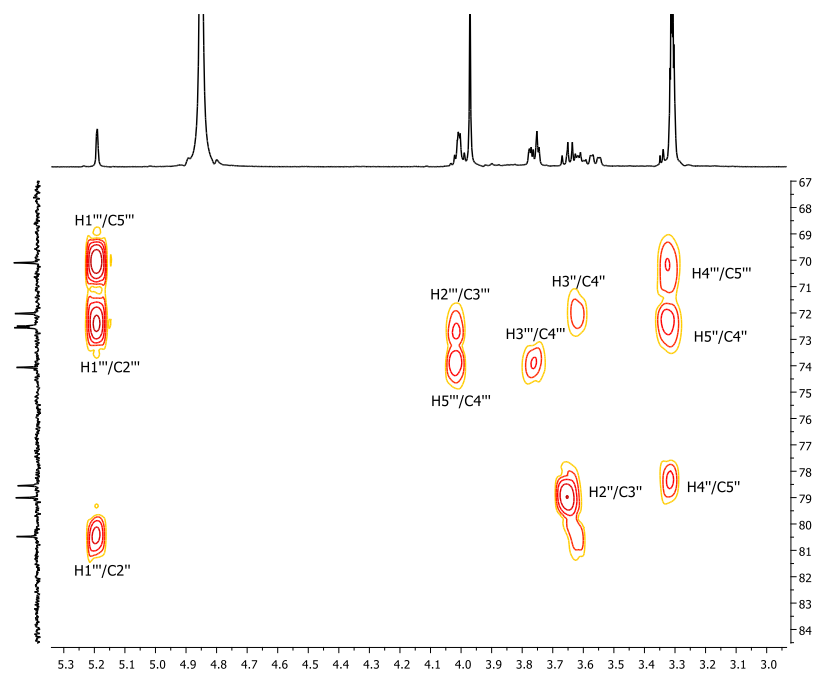
Slika 40. HSQC spektar atripleksina II (44)



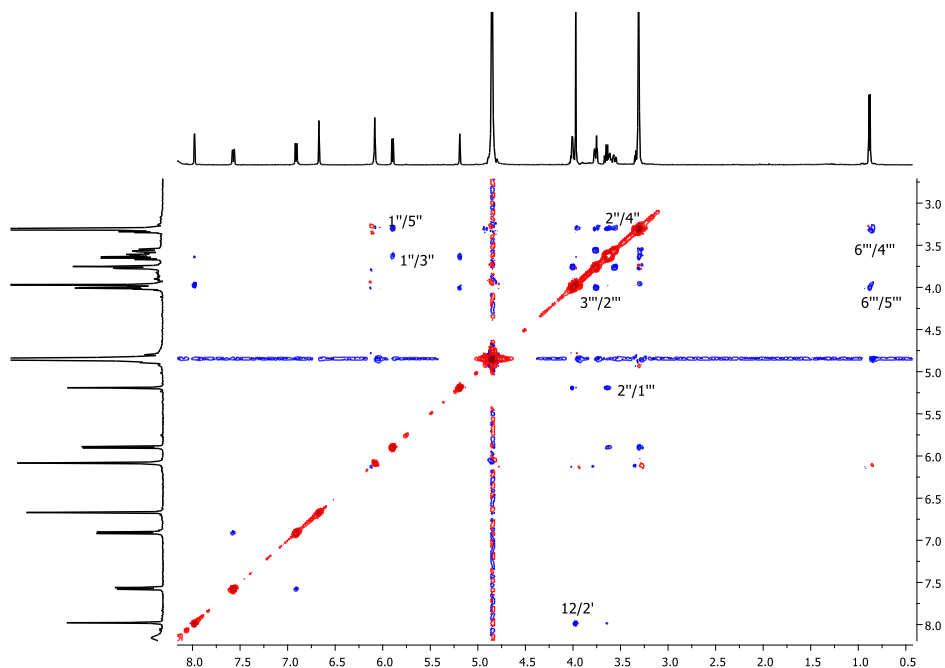
Slika 41. HMBC spektar atripleksina II (44)



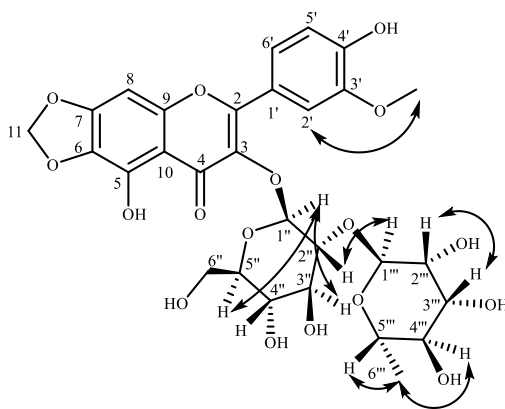
Slika 42. Ključne HMBC korelacije atripleksina II (**44**)



Slika 43. Deo HMBC spektra atripleksina II (**44**) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu



Slika 44. Deo NOESY spektra atripleksina II (**44**) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu

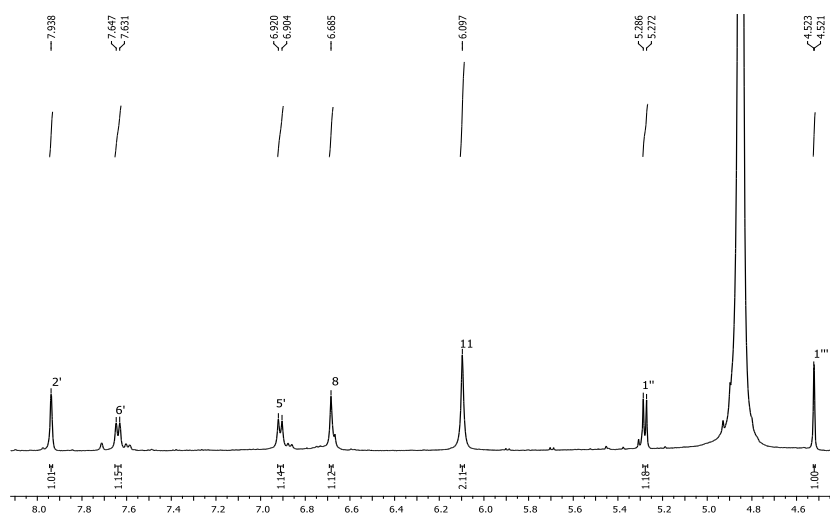


Slika 45. Ključne NOESY korelacije atripleksina II (**44**)

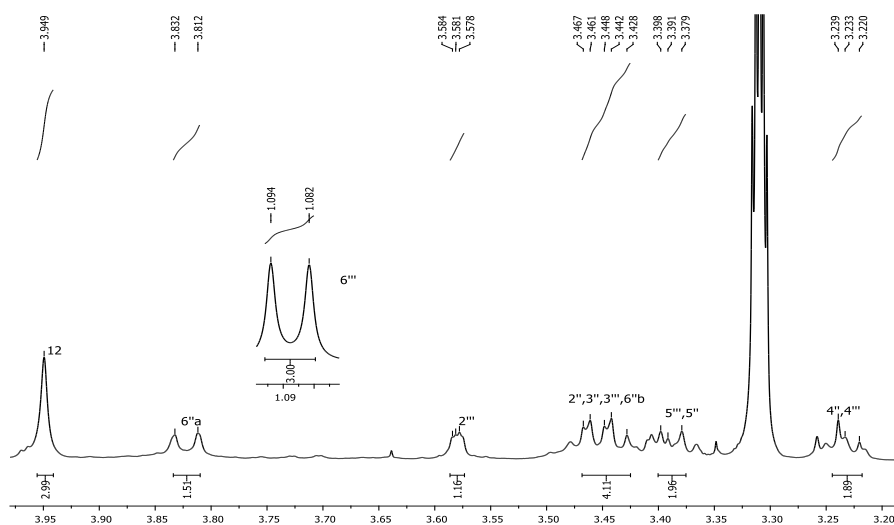
2.1.3. Određivanje strukture 3'-*O*-metilkvercetagenin 3'-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozida – atripleksina III (**45**)

Jedinjenje **45** (Slika 25) je izolovano u količini od 18,3 mg kao žuti prah. Molekulska formula $C_{29}H_{32}O_{17}$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekuskog jona $[M - H]^-$ na m/z 651,1606. Na osnovu sličnih UV i

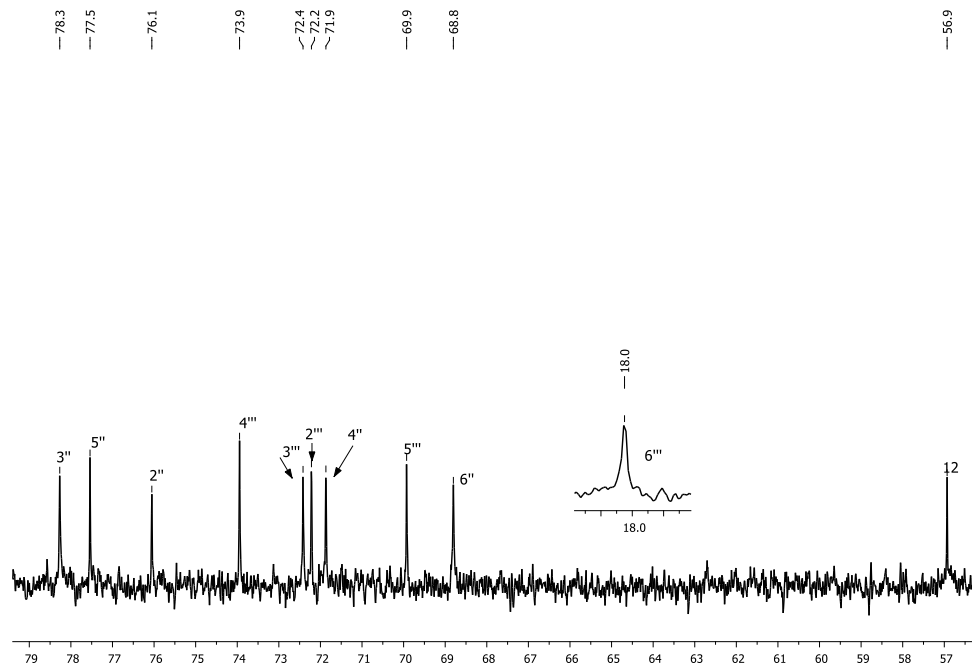
NMR spektara jedinjenja **45** i jedinjenja **44** izveden je zaključak da je izolovano jedinjenje **45** strukturni izomer jedinjenja **44**, tj. da je u jedinjenju **45** glikozidna veza (1→6) između ramnoze i glukoze, a ne (1→2) kao u jedinjenju **44**. Pomoću HPLC-a su identifikovane iste monosaharidne jedinice kao u jedinjenjima **43** i **44**. HMBC korelacije H-1"/C-3, H-6"a/C-1"" i H-6"b/C-1"" (Slika 52) kao i NOESY korelacija H-6"b/H-1"" (Slika 50) ukazale su da je L-ramnopiranoza vezana svojim C-1"" za C-6" D-glukopiranoze *O*-glikozidnom vezom, kao i da je D-glukopiranoza vezana za C-3 aglikona preko kiseonika OH grupe sa C-1". Na kraju je izveden zaključak da je jedinjenje **45** novi derivat 3'-*O*-metilkercetagina i nazvano je atripleksin III.



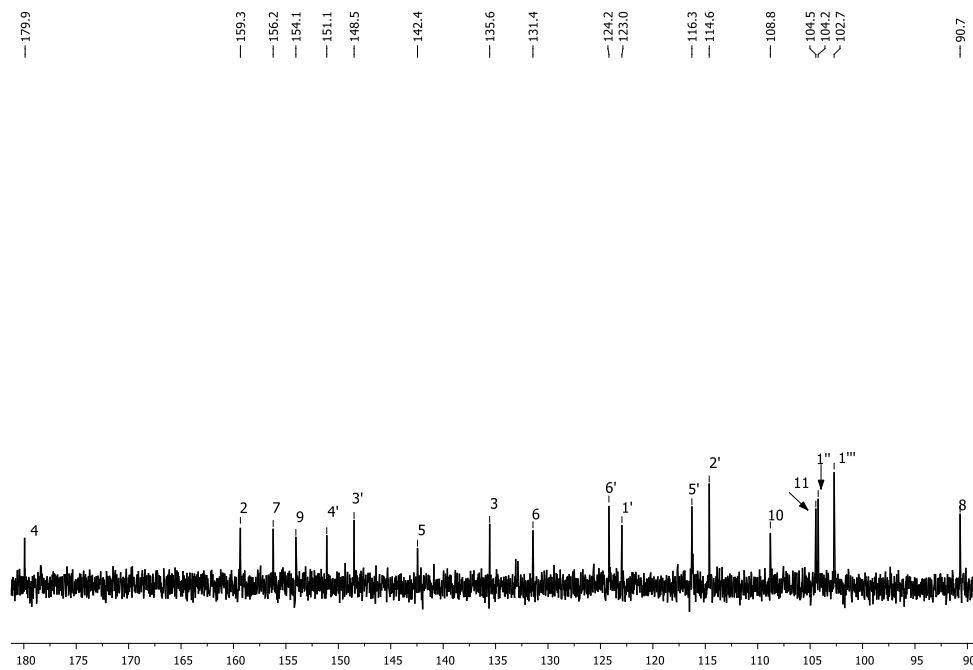
Slika 46. ^1H NMR spektar atripleksina III (**45**) – oblast 4,5-8,1 ppm



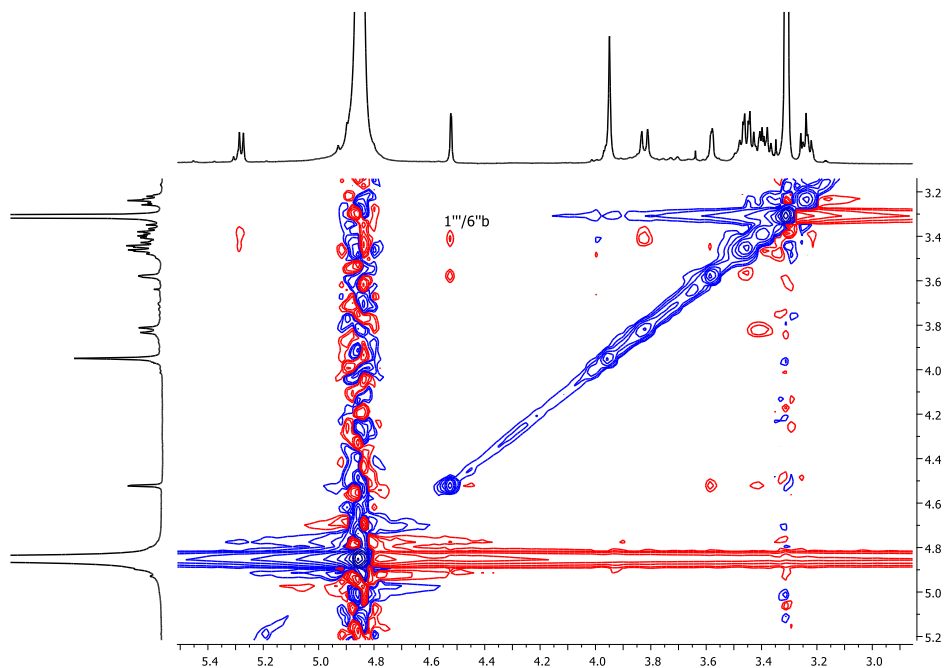
Slika 47. ^1H NMR spektar atripleksina III (**45**) – oblast 3,20-4,00 ppm



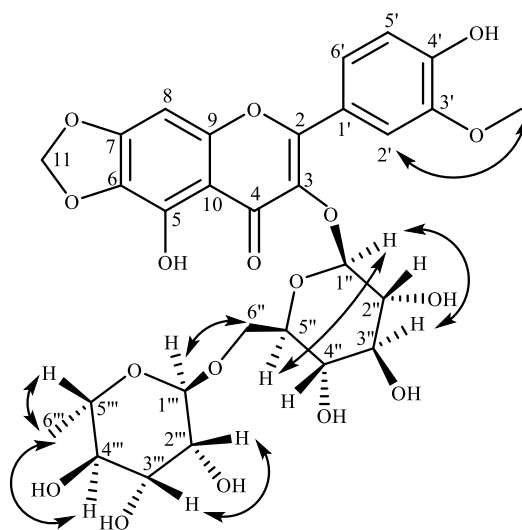
Slika 48. ^{13}C NMR spektar atripleksina III (45) – oblast 57-79 ppm



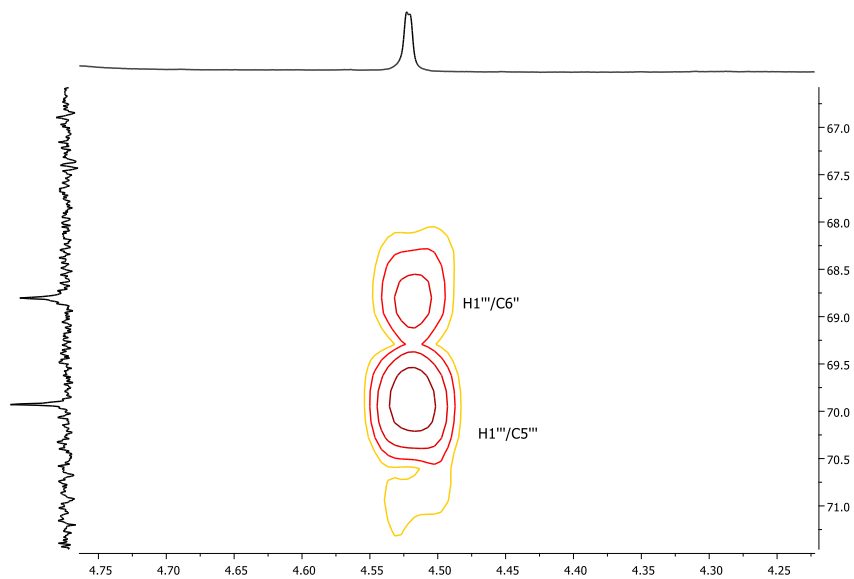
Slika 49. ^{13}C NMR spektar atripleksina III (45) – oblast 90-180 ppm



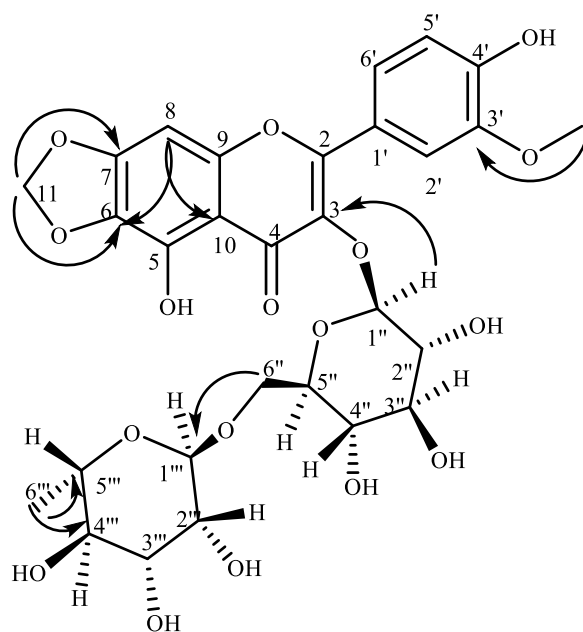
Slika 50. Deo NOESY spektra atripleksina III (45) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu



Slika 51. Ključne NOESY korelacije atripleksina III (45)



Slika 52. Deo HMBC spektra atripleksina III (45)



Slika 53. Ključne HMBC korelacije atripleksina III (45)

Tabela 2. ^{13}C i ^1H NMR podaci jedinjenja **43–45** (125,80 MHz za ^{13}C i 500,26 MHz za ^1H , CD_3OD)

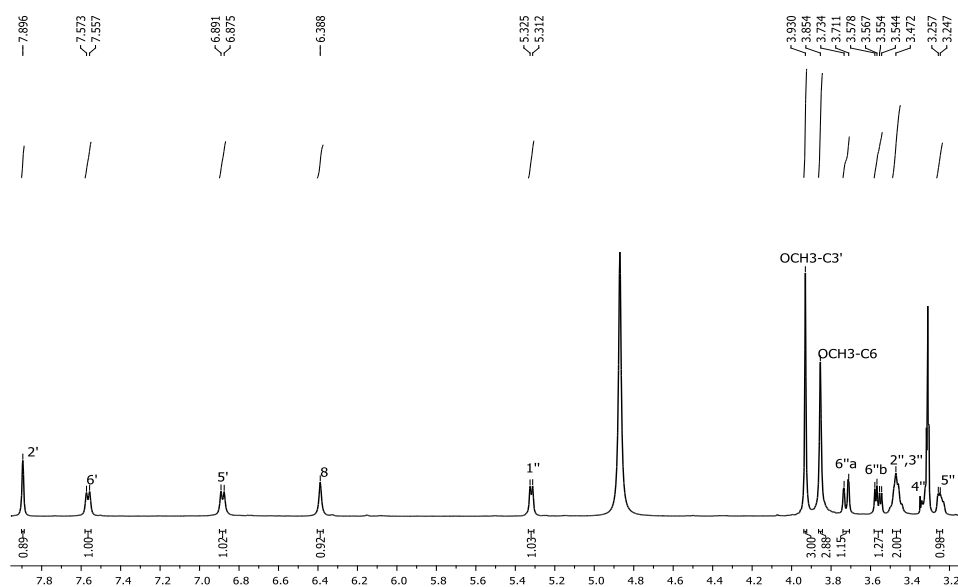
C/H	43		44		45	
	δ_{C}	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J Hz)
2	159,1		158,8		159,3	
3	134,8		134,5		135,6	
4	179,9		179,9		179,9	
5	142,8		142,7		142,4	
6	131,2		131,2		131,4	
7	155,9		155,9		156,2	
8	90,3	6,64 s	90,4	6,67 s	90,7	6,68 s
9	153,9		153,9		154,1	
10	109,0		109,0		108,8	
11	104,3	6,08 s	104,4	6,01 s	104,5	6,08 s
12	/	/	57,1	3,97 s	56,9	3,94 s
1'	123,4		123,4		122,9	
2'	117,4	7,63 d (2,0)	114,6	7,97 d (2,0)	114,6	7,94 s
3'	146,2		148,6		148,5	
4'	149,9		150,9		151,1	
5'	116,2	6,87 d (8,3)	116,2	6,91 d (8,4)	116,3	6,91 d (8,1)
6'	123,4	7,61 dd (8,3, 2,0)	123,8	7,57 dd (8,4, 2,1)	124,2	7,64 dd (7,8)
1''	100,4	5,77 d (7,6)	100,3	5,89 d (7,3)	104,3	5,28 d (7,3)
2''	80,3	3,67 dd (9,2, 7,6)	80,4	3,64 dd (7,7, 9,2)	76,1	3,47 m
3''	79,1	3,58 t (9,2)	79,0	3,61 m	78,3	3,45 m
4''	71,9	3,35 t (9,3)	72,0	3,31 m	71,9	3,23 m
5''	78,5	3,26 m	78,5	3,30 m	77,5	3,38 m
6''a	62,7	3,74 dd (12,0, 2,3)	62,6	3,77 m (4,0, 11,7)	68,8	3,82 brd (11,1)
6''b		3,55 m		3,57 dd		3,42 m
1'''	102,8	5,23 d (1,2)	102,9	5,19 d (1,6)	102,7	4,52 d (1,5)
2'''	72,6	4,02 dd (3,4, 1,2)	72,6	4,00 m	72,2	3,58 dd (3,0, 1,5)
3'''	72,5	3,79 dd (9,6, 3,4)	72,4	3,76 m	72,4	3,45 dd (3,0, 9,5)
4'''	74,2	3,35 t (9,6)	74,04	3,31 m	73,9	3,23 m
5'''	70,1	4,05 dd (6,2, 9,6)	70,1	4,00 m	69,9	3,39 m
6'''	17,6	0,97 d (6,2)	17,6	0,88 d (6,2)	18,0	1,08 d (6,2)

2.1.4. Poznata jedinjenja izolovana iz *Atriplex littoralis*

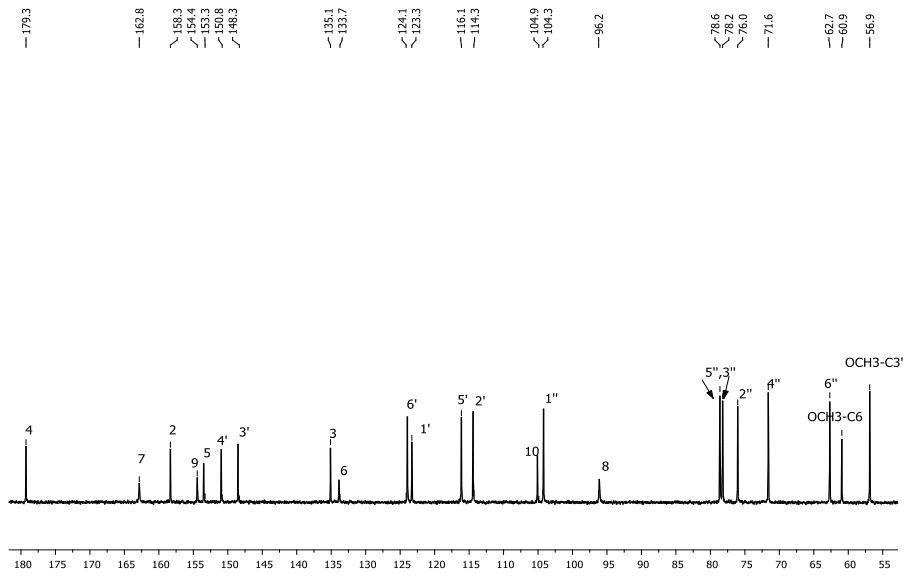
Pored novih jedinjenja (**43–45**) iz *n*-butanolnog ekstrakta semipreparativnom reverzno-faznom hromatografijom izolovana su i poznata jedinjenja, jedan flavonoidni glikozid (**46**) i dva fenolna jedinjenja (**47** i **48**).

Jedinjenje **46** izolovano je u količini od 20,9 mg (**Slika 25**). Molekulska formula $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona $[\text{M} - \text{H}]^-$ na m/z 507,1200. U ^1H NMR spektru u aromatičnom regionu uočeno je četiri signala (**Slika 54**). Singlet na δ_{H} 6,39 ppm (H-8), dva dubleta na δ_{H} 7,89 i 6,88 ppm (H-2', H-5') i dvostruki dublet na δ_{H} 7,56 ppm (H-6'). U alifatičnoj oblasti ^1H NMR spektra (**Slika 54**) uočena su dva singleta koja odgovaraju protonima iz metoksi grupa u

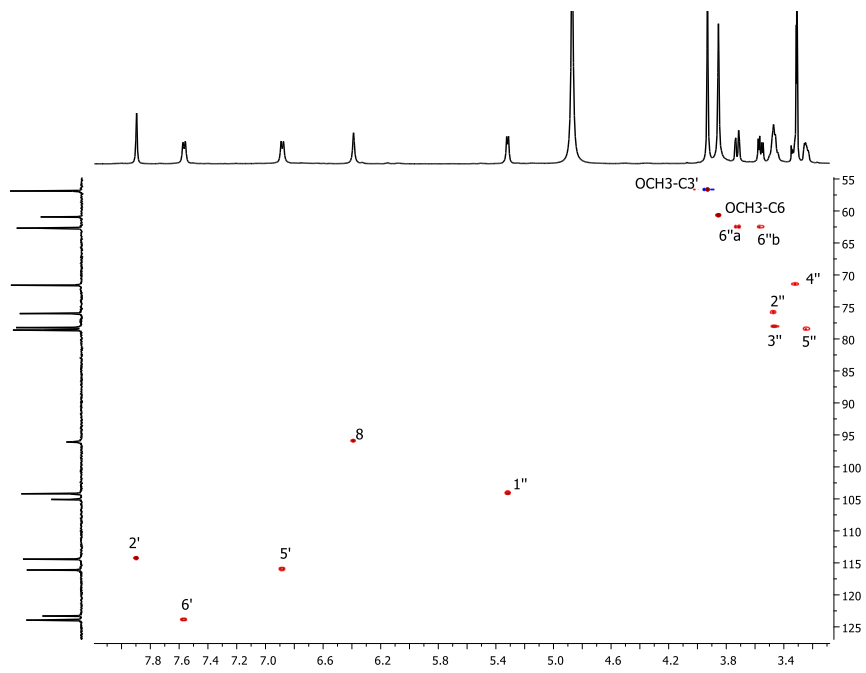
položajima C-3' i C-6 (δ_H 3,93 i 3,85 ppm). Na njihov položaj uputile su HMBC korelacije date na slikama **57** i **58**. Pored ovih signala na δ_H 5,31 ppm nalazi se dublet koji potiče od anomernog protona β -D-glukopiranoze, a ostali signali protona glukoze se nalaze u intervalu od δ_H 3,25-3,75 ppm. Analizom ^{13}C NMR spektra (**Slika 55**) zaključeno je da se u aromatičnoj oblasti nalazi 15 ugljenikovih atoma (δ_C 95-180 ppm), dok se u alifatičnom delu spektra nalazi preostalih osam signala C atoma koji pripadaju metoksi grupama i molekulu glukoze. Na osnovu poređenja sa literaturnim podacima, zaključeno je da je jedinjenje **46** spinacetin 3-O- β -D-glukopiranozid.¹³⁸



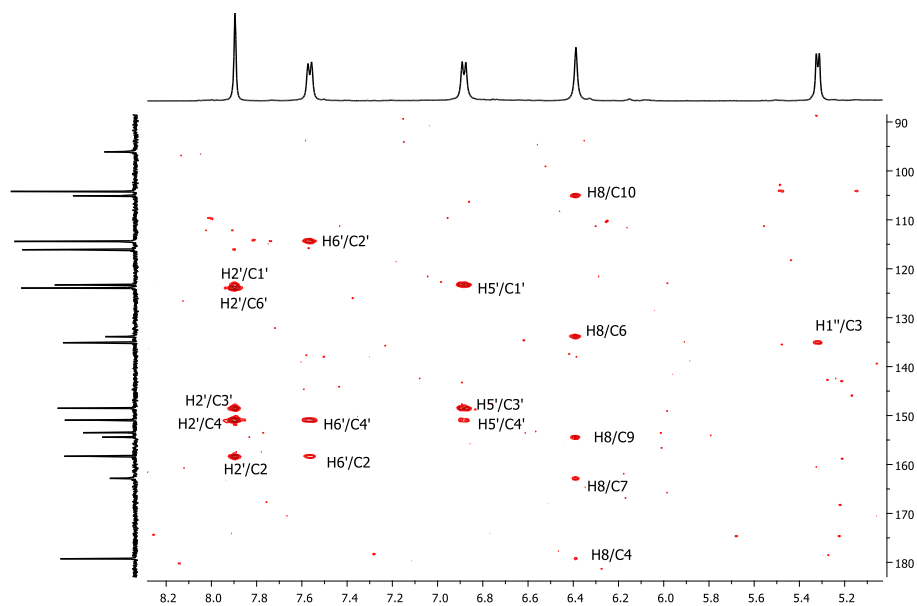
Slika 54. 1H NMR spektar spinacetin 3-O- β -D-glukopiranozida (**46**) oblast 3,2-7,9 ppm



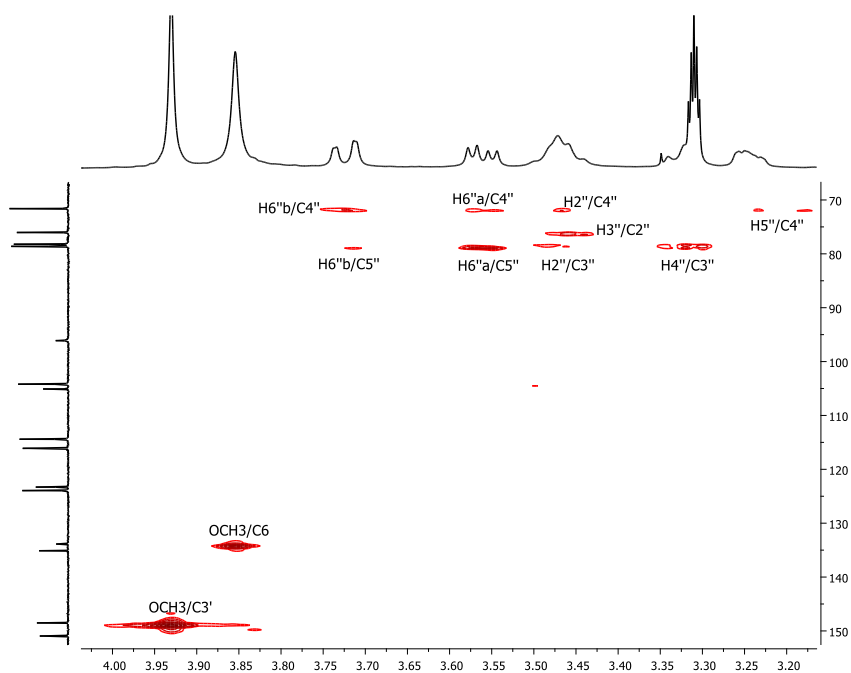
Slika 55. ^{13}C NMR spektar spinacetin 3-*O*- β -D-glukopiranozida (46) oblast 55-180 ppm



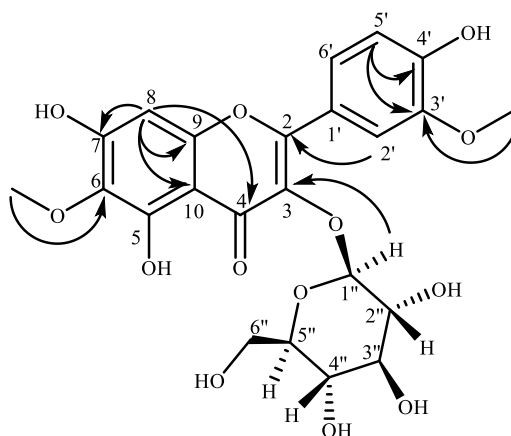
Slika 56. HSQC spektar spinacetin 3-*O*- β -D-glukopiranozida (46)



Slika 57. Deo HMBC spektra spinacetin 3-*O*- β -D-glukopiranozida (**46**) (^1H NMR 5,1-8,2 ppm i ^{13}C 90-180 ppm)

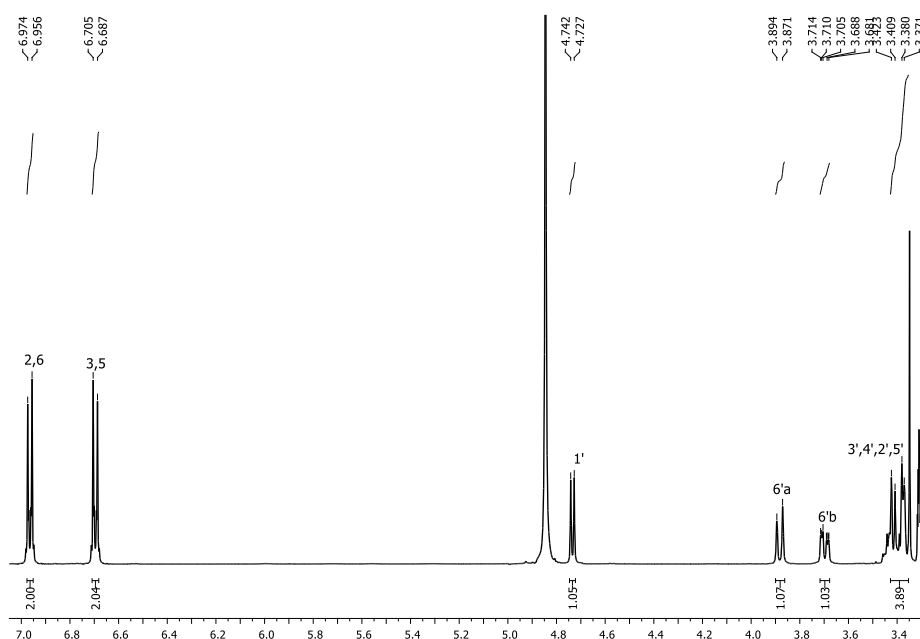


Slika 58. Deo HMBC spektra spinacetin 3-*O*- β -D-glukopiranozida (**46**) (^1H NMR 3,15-4,05 ppm i ^{13}C 70-150 ppm)

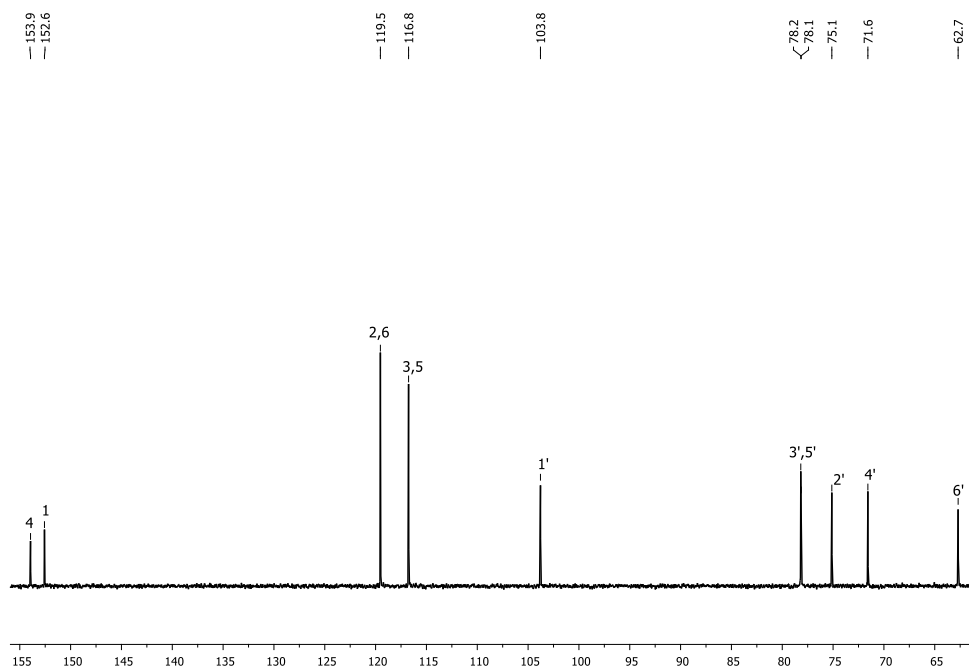


Slika 59. Ključne HMBC korelacije spinacetin 3-*O*- β -D-glukopiranozida (**46**)

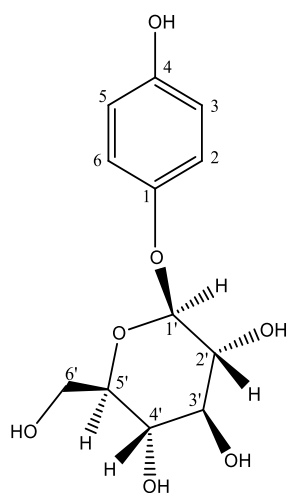
Jedinjenje **47** (**Slika 25**) izolovano je u količini od 12,0 mg. Molekulska formula $C_{12}H_{16}O_7$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona $[M - H]^-$ na m/z 271,0817. Analiza 1H NMR i ^{13}C NMR spektara (**Slike 60** i **61**) ukazala je da jedinjenje **5** pripada grupi fenolnih jedinjenja. U aromatičnom delu 1H NMR spektra uočena su dva dubleta AA'BB' spinskog sistema (**Slika 60**). Analizom saharidne oblasti 1H i ^{13}C NMR spektara i poređenjem sa literaturnim podacima zaključeno je da je u jedinjenju prisutna β -D-glukopiranoza. Spektroskopski podaci za jedinjenje **47** slažu se sa literaturnim i odgovaraju strukturi arbutina.¹³⁹



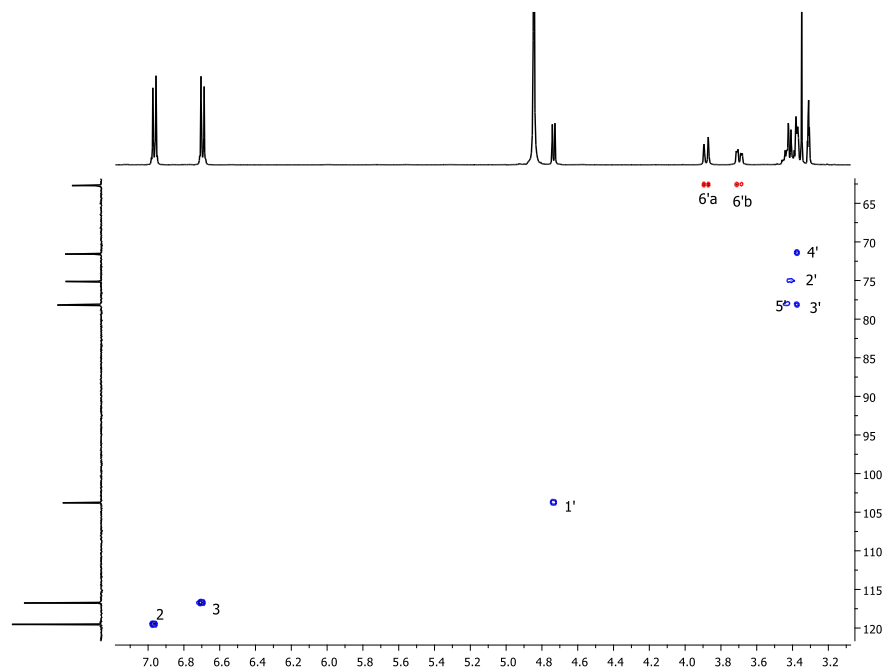
Slika 60. 1H NMR spektar arbutina (**47**)



Slika 61. ^{13}C NMR spektar arbutina (**47**)

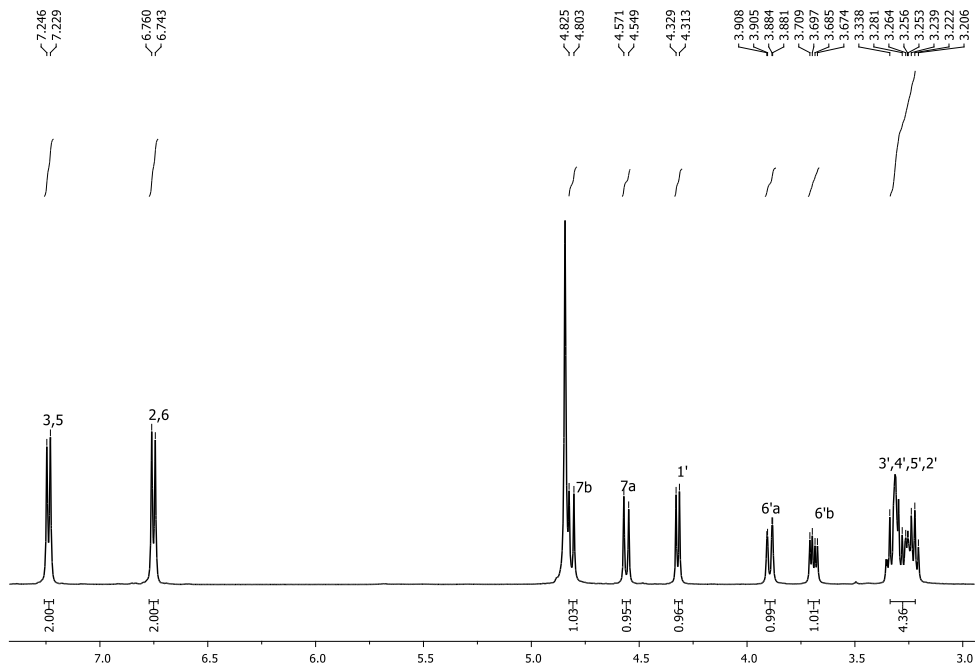


Slika 62. Strukturna formula arbutina (**47**)

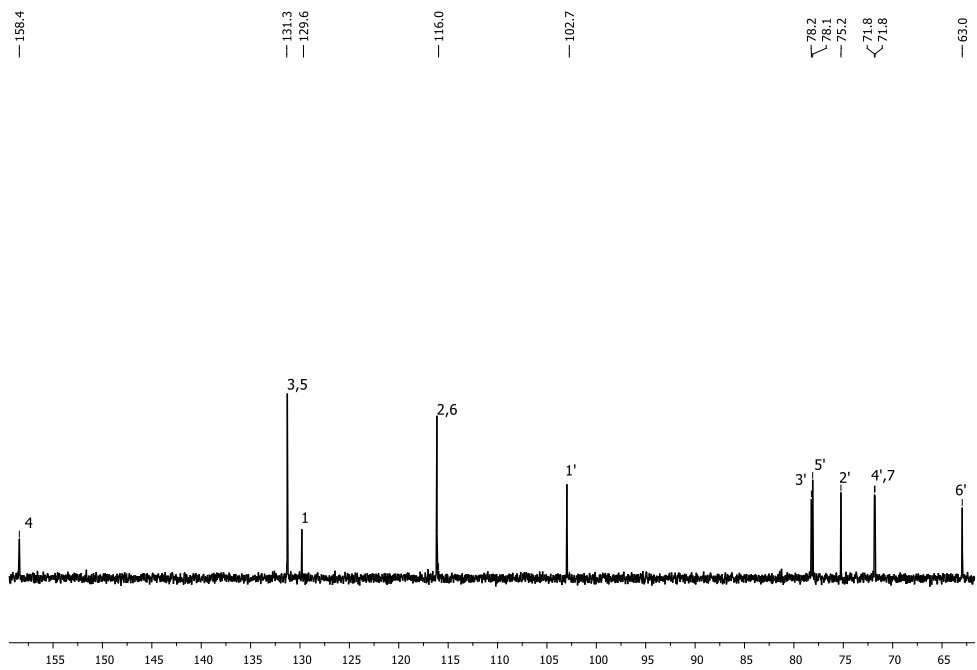


Slika 63. HSQC spektar arbutina (**47**)

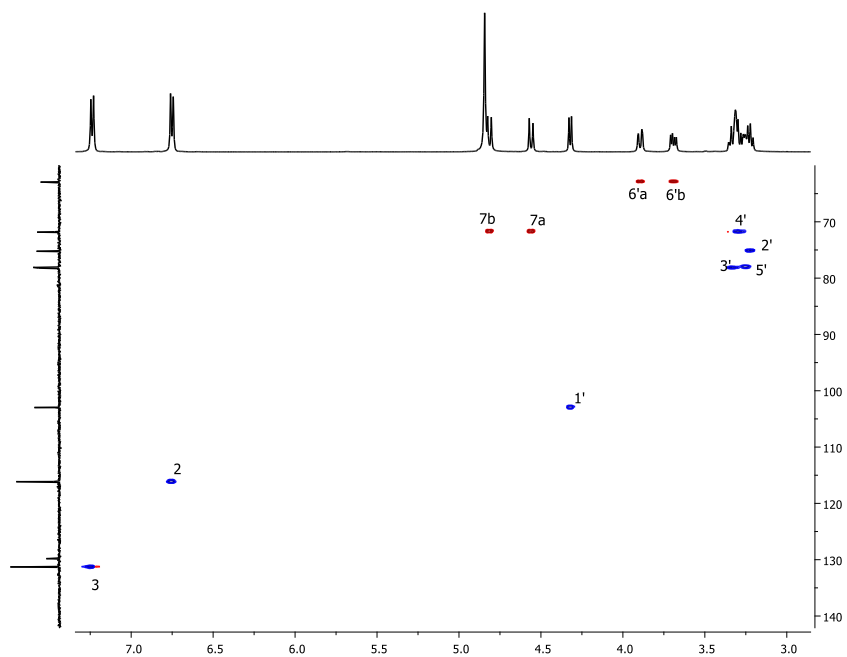
Jedinjenje **48** (**Slika 25**) izolovano je u količini od 15,1 mg. Molekulska formula $C_{13}H_{18}O_7$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona $[M - H]^-$ na m/z 285,0983. NMR spektri jedinjenja **6** su bili veoma slični NMR spektrima arbutina (**5**). Uočene su male razlike: pojava singleta integrala 2 na δ_H 4,81 ppm u 1H NMR spektru (**Slika 64**), dodatni signal ugljenika na δ_C 71,8 ppm (**Slika 65**), kao i razlika u masi od 14 Da u odnosu na arbutin. Na osnovu ovih podataka zaključeno je da jedinjenje **48** ima dodatnu metilensku grupu između β -D-glukopiranoze i benzenovog prstena, i da njegova struktura odgovara 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozidu, jedinjenju koje je ranije opisano u literaturi.¹⁴⁰



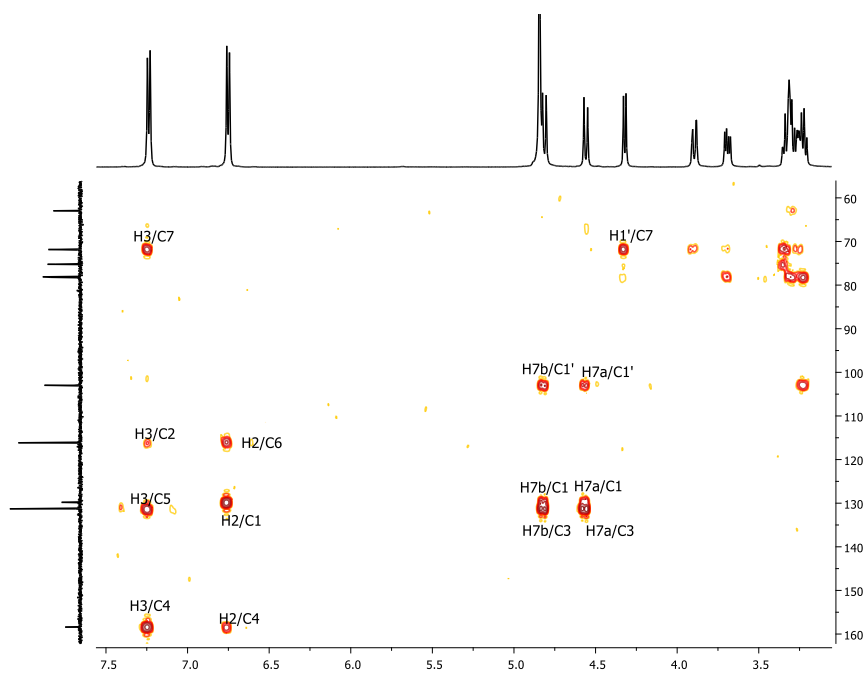
Slika 64. ^1H NMR spektar 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozida (**48**)



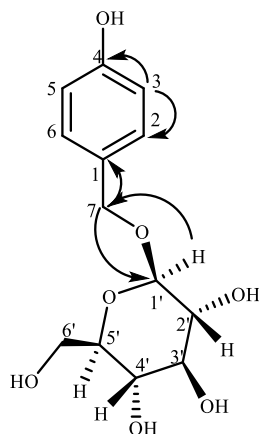
Slika 65. ^{13}C NMR spektar 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozida (**48**)



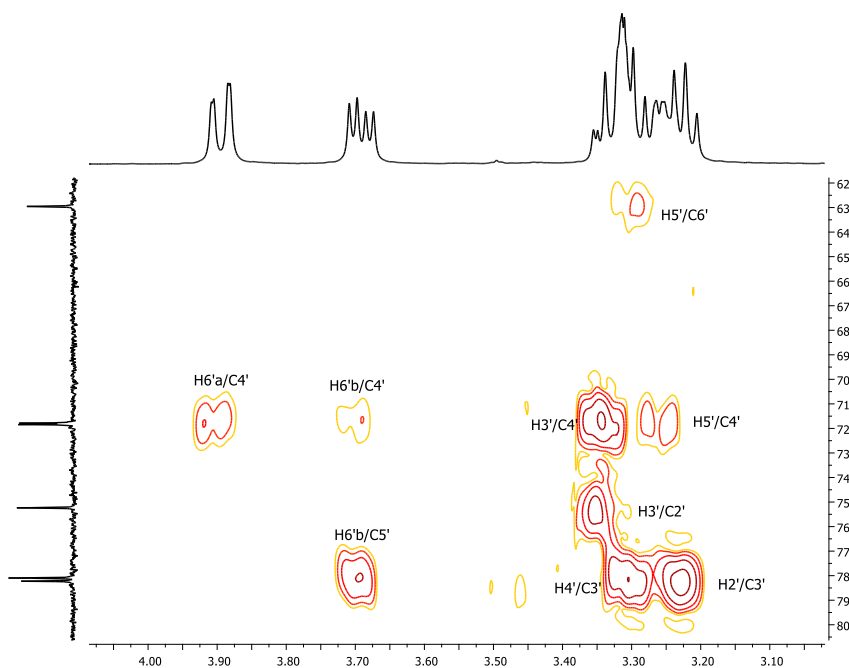
Slika 66. HSQC spektar 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozida (**48**)



Slika 67. HMBC spektar 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozida (**48**)



Slika 68. Ključne HMBC korelacije 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozida (**48**)

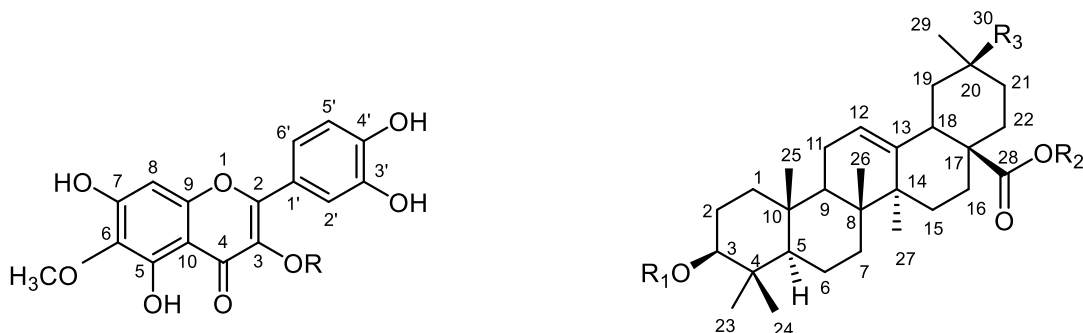


Slika 69. Deo HMBC spektra 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozida (**48**) koji se odnosi na signale iz glukoze

2.2. Jedinjenja izolovana iz biljne vrste *Atriplex tatarica*

Iz *n*-butanolnog ekstrakta *A. tatarica* razdvajanjem hromatografijom na gravitacionoj koloni silika gela i semipreparativnom reverzno-faznom hromatografijom izolovano je ukupno 6 jedinjenja među kojima je jedan nov flavonoidni glikozid i tri nova triterpenska saponina. Strukture ovih jedinjenja date su na **Slici 70**, a detaljan

postupak njihovog izolovanja opisan je u poglavljima 3.2.3. i 3.3.2. U ovom delu prikazani su spektri svih izolovanih jedinjenja iz *A. tatarica* na osnovu kojih je određena njihova struktura.



49: R=Glc(2-1)-Apif
50: R=Glc(2-1)-Apif(5-*O*)-feruloil
51: R=Glc(2-1)-GlcAp(2-*O*)-feruloil

52: R₁=Arap(2-1)Galp(OSO₃H), R₂=Glc1, R₃=CHO
53: R₁=Arap(2-1)Galp(OSO₃H), R₂=Glc1, R₃=CH₂OH
54: R₁=Arap(2-1)Galp(2-1)Glc2, R₂=Glc1, R₃=CHO

Slika 70. Strukturne formule jedinjenja izolovanih iz *A. tatarica*

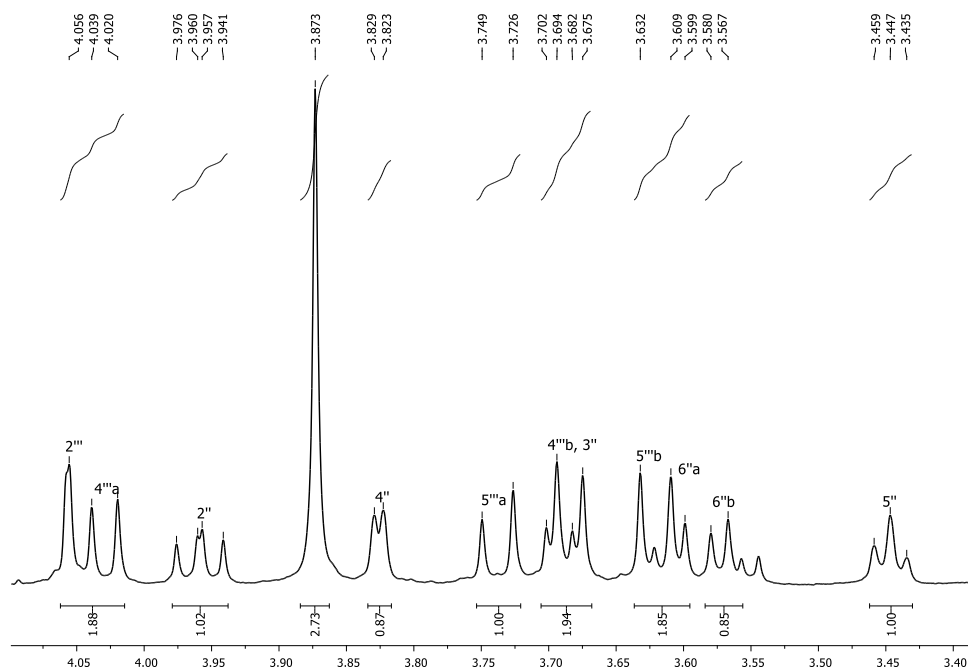
Zajednička strukturna karakteristika flavonoidnih glikozida (**49-51**) izolovanih iz *A. tatarica* je prisustvo patuletina kao aglikona za koji su šećerne jedinice povezane *O*-glikozidnom vezom za C-3.

Jedinjenja (**52-54**) pripadaju grupi triterpenskkih saponina oleanolnog tipa (**Slika 70**). Na osnovu karakteristične promene hemijskog pomeranja signala C-3 i C-28 u odnosu na slobodan aglikon određeno je mesto vezivanja šećernih jedinica za sapogenin, kao i da izolovani saponini pripadaju grupi bidesmozidičnih saponina.

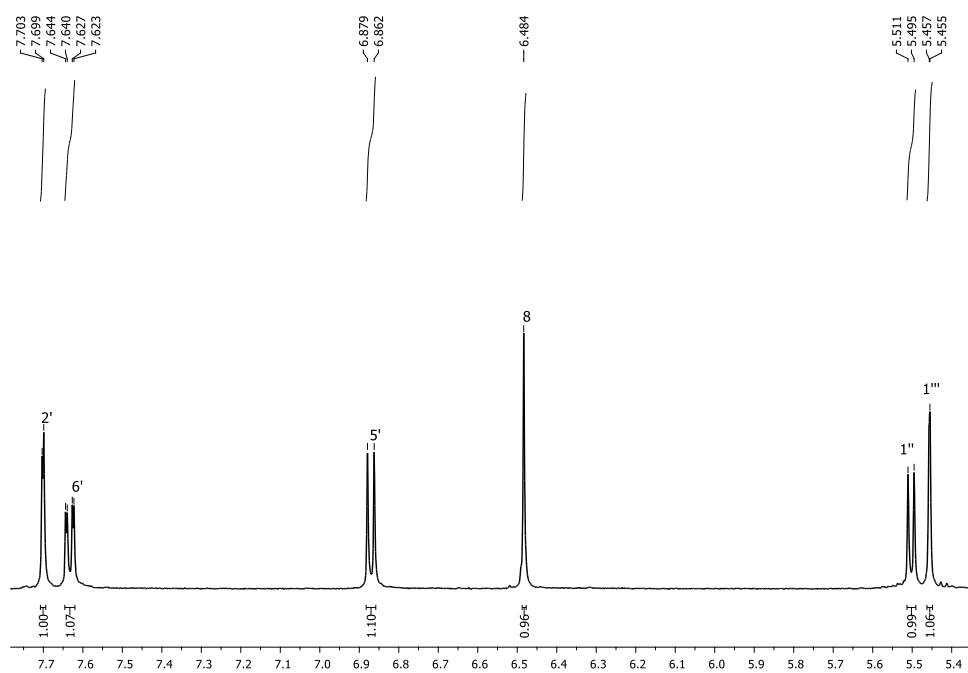
2.2.1. Određivanje strukture patuletin 3-*O*-β-D-apiofuranozil(1→2)-β-D-glukopiranozida (**49**)

Jedinjenje **49** (**Slika 70**) je izolovano u količini od 6,6 mg u obliku žutog praha. Molekulska formula C₂₇H₃₀O₁₇ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona [M – H][–] na *m/z* 625,1406. UV spektar ovog jedinjenja je pokazao karakteristike 3-OH supstituisanih flavonola. Položaji slobodnih hidroksilnih grupa u položajima C-3', C-4', C-5 i C-7 su pretpostavljeni nakon dodavanja reagenasa UV pomeranja. Prisustvo katehola (prsten B) je potvrđeno

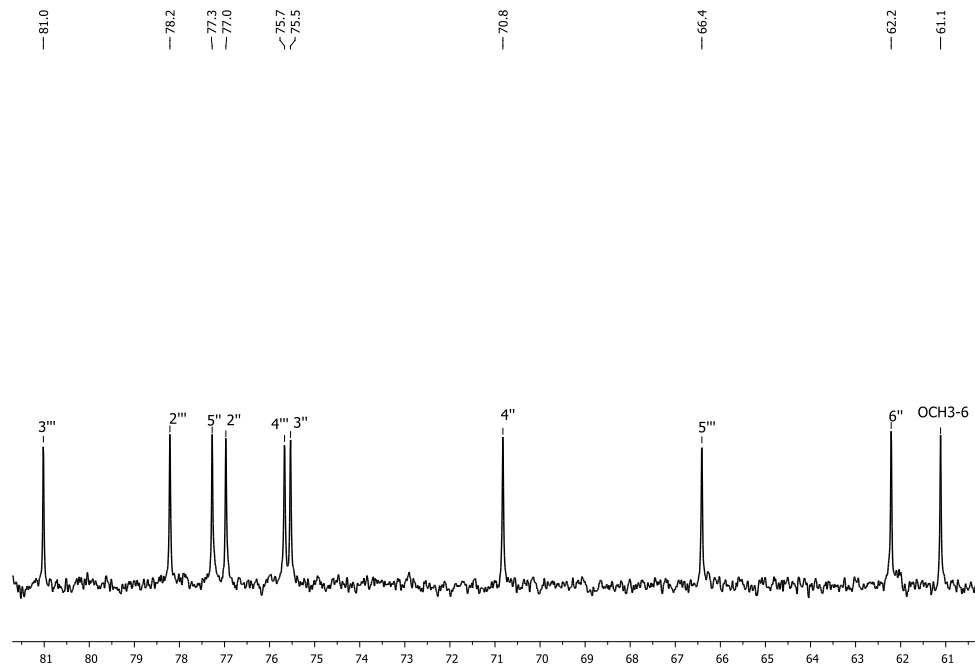
batohromnim pomeranjem trake I (24 nm) nakon dodavanja NaOAc/H₃BO₃ metanolnom rastvoru jedinjenja **49**. Dodavanjem AlCl₃/HCl metanolnom rastvoru jedinjenja **49** primećeno je batohromno pomeranje trake I (52 nm) i trake II (13 nm), što je dokaz za prisustvo hidroksilne grupe u položaju C-5. Hidroksilna grupa u položaju C-7 potvrđena je nakon dodavanja NaOAc batohromnim pomeranjem trake II (15 nm). U ¹H NMR spektru (**Slika 72**) uočeni signali na δ_H 7,69 ppm (H-2', d, $J=2,0$ Hz), 7,64 ppm (H-6', dd, $J=2,1; 8,5$ Hz), 6,87 ppm (H-5', d, $J=8,5$ Hz), δ_H 3,87 ppm (OMe-6, s) i δ_H 6,48 ppm (H-8, s) ukazali su da je kao aglikon u jedinjenju **49** prisutan patuletin.¹⁴¹ Anomerni proton na δ_H 5,49 ppm (d, $J=7,7$ Hz) pripisan je β -D-glukopiranozi (koja je zajedno sa β -D-apiofuranozom potvrđena nakon kisele hidrolize jedinjenja i poređenjem sa standardima pomoću HPLC metode za monosaharide). Položaj glukoze je određen na osnovu HMBC korelacije anomernog protona glukoze i C-3 aglikona (H-1"/C-3, **Slika 76**). Da je ona β -glikozidnom vezom vezana za aglikon, potvrdile su NOESY korelacije H-1", H-3"/H-5" (**Slika 79**). Dublet na δ_H 5,46 ppm ($J=1,3$ Hz) potiče od apioze koja je takođe u β konformaciji (**Slika 72**). Glikozidna veza u disaharidnoj jedinici određena je iz HMBC korelacije protona H-2" glukoze i anomernog ugljenika C-1" apioze (**Slika 77**). Analizom ¹³C NMR i HSQC spektara (**Slike 73 i 75**) uočen je signal (δ_C 81 ppm) koji nije korelisan ni sa jednim protonom, na osnovu čega je zaključeno da je u pitanju tercijarni ugljenik koji pripada β -D-apiofuranozi (C-3"). Osim toga u HSQC spektru su uočeni signali dve metilenske grupe (CH₂-4" i CH₂-5") što je dodatna potvrda da je u jedinjenju **49** prisutna apioza. HMBC korelacije protona H-1", H-5" sa ugljenikom C-3" potvrdile su da je hidroksimetil grupa C-5" vezana za C-3" (**Slike 76 i 77**). Poređenjem sa literaturnim podacima utvrđeno je da je jedinjenje **49** patuletin 3-O- β -D-apiofuranozil(1→2)- β -D-glukopiranozid poznato jedinjenje prethodno izolovano iz biljne vrste *Spinacia oleracea*.¹⁴¹



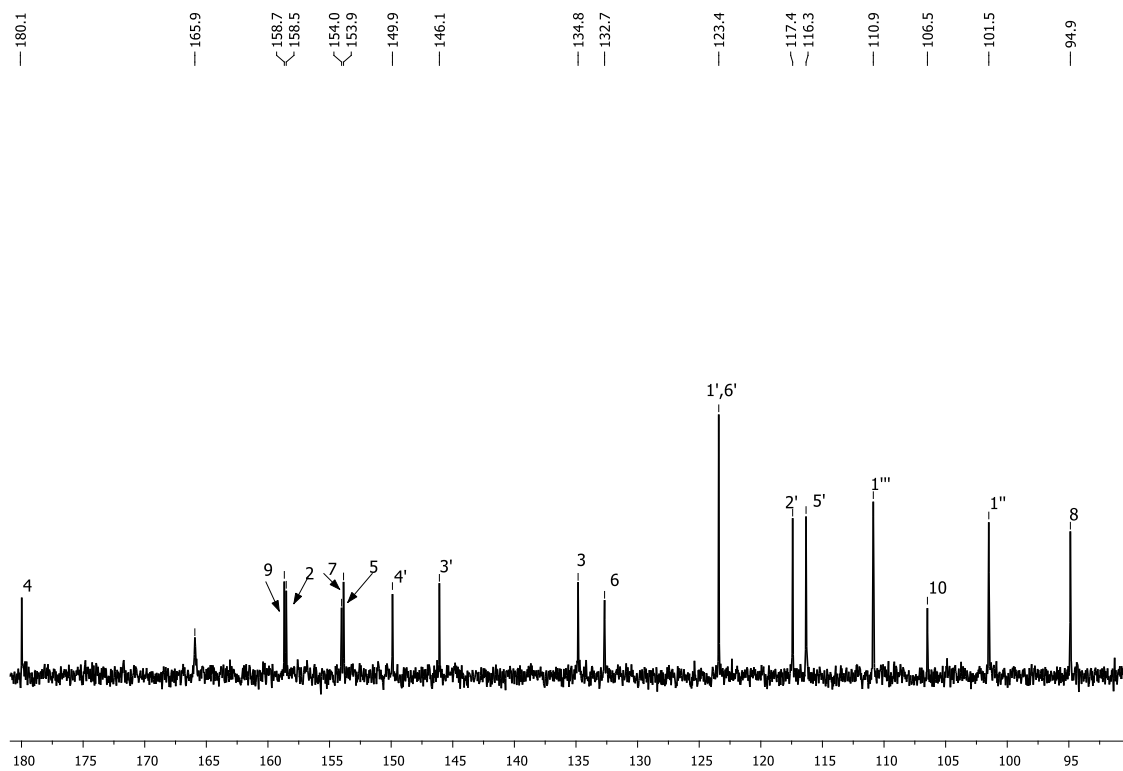
Slika 71. ^1H NMR spektar patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49) – oblast 3,40-4,10 ppm



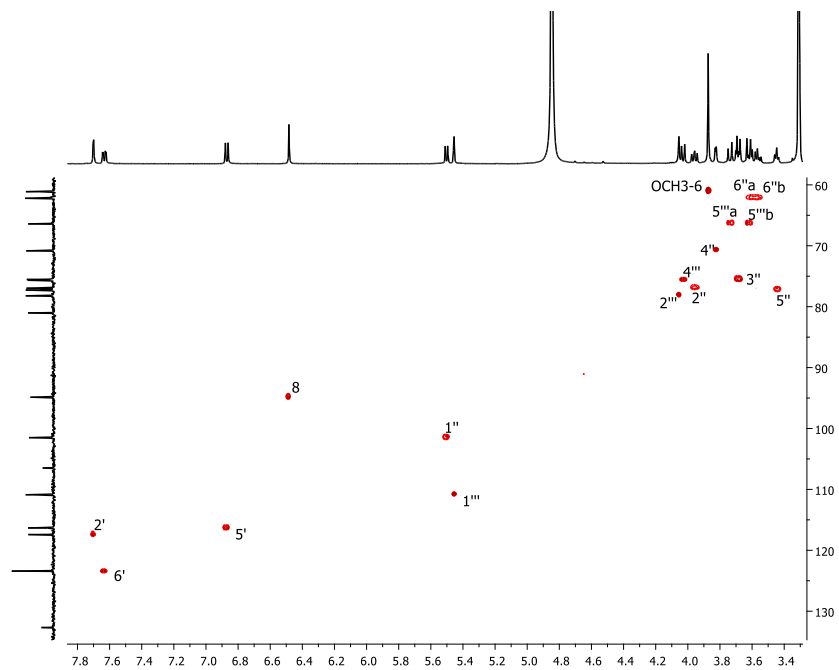
Slika 72. ^1H NMR spektar patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49) – oblast 5,40-7,75 ppm



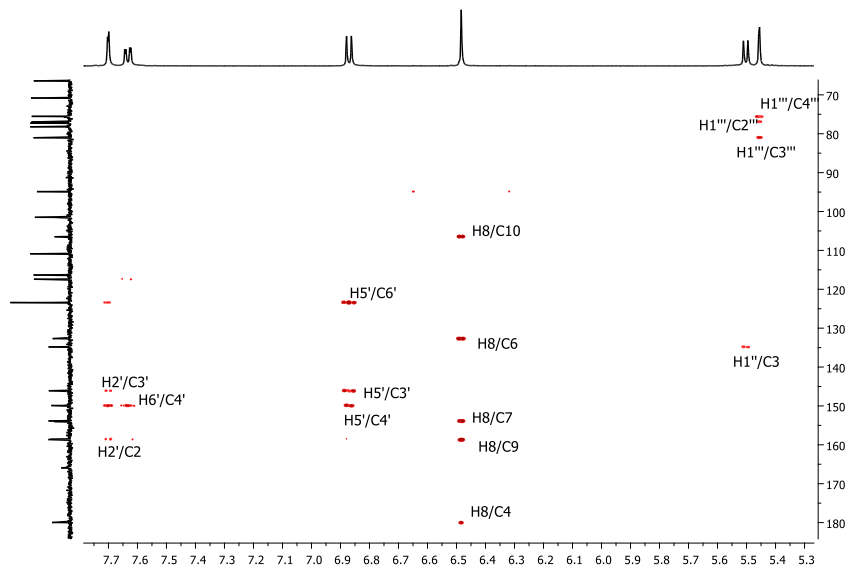
Slika 73. ^{13}C NMR spektar patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49) – oblast 61-81 ppm



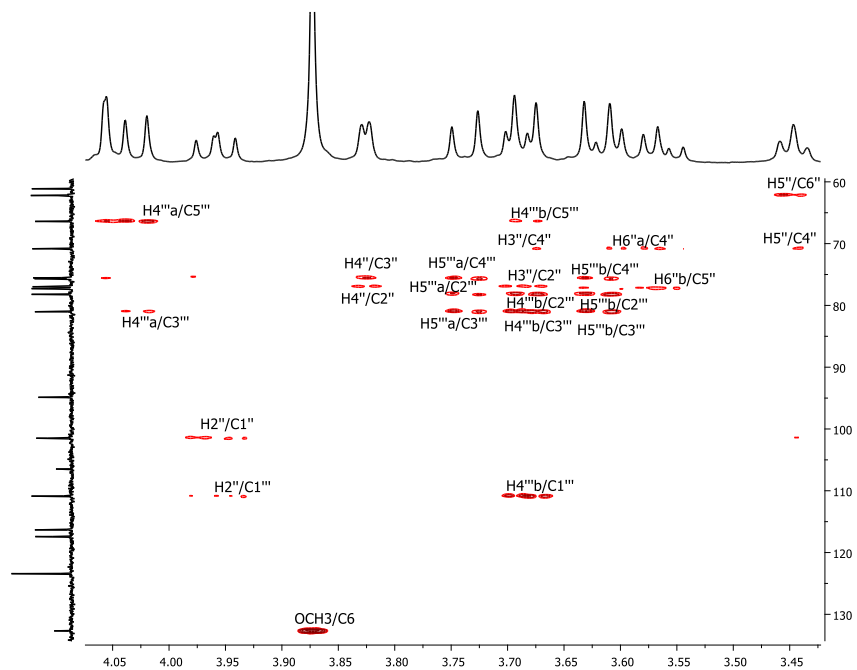
Slika 74. ^{13}C NMR spektar patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49) – oblast 90-180 ppm



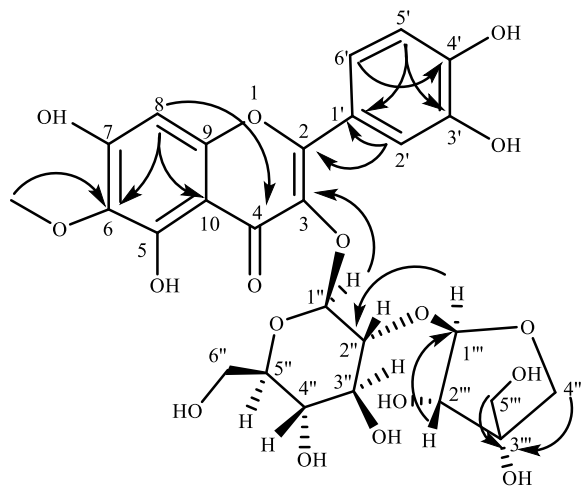
Slika 75. HSQC spektr patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49)



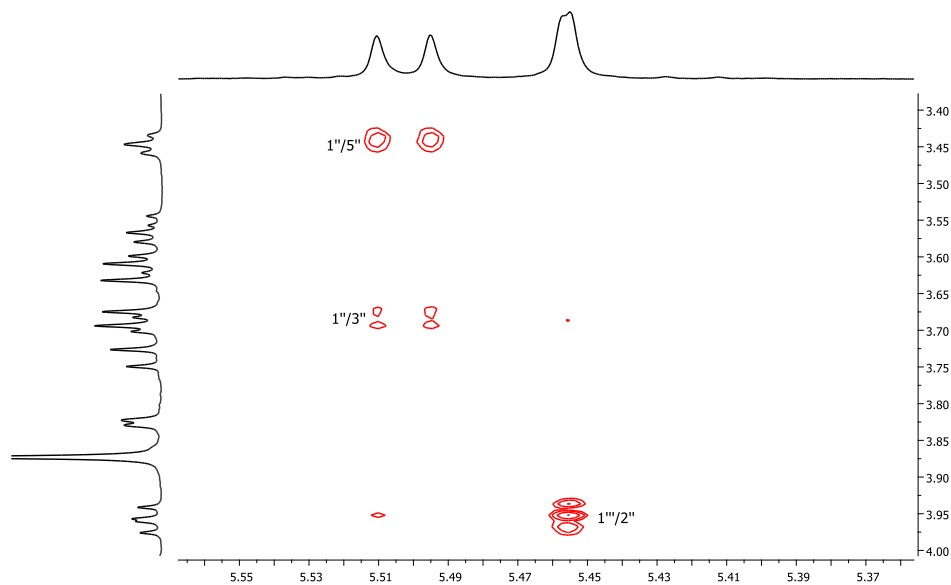
Slika 76. Deo HMBC spektra patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (49) (^1H NMR 5,30-7,75 ppm i ^{13}C 70-180 ppm)



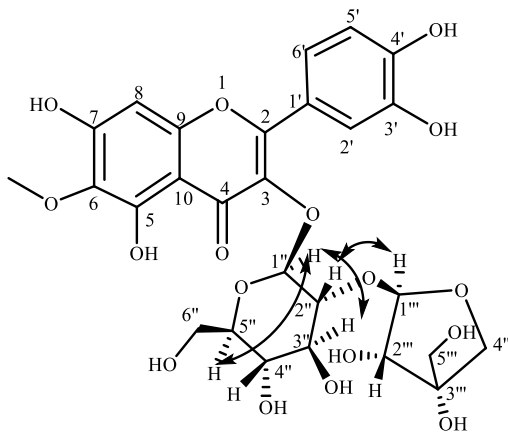
Slika 77. Deo HMBC spektra patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**49**) (^1H NMR 3,40-4,10 ppm i ^{13}C 60-135 ppm)



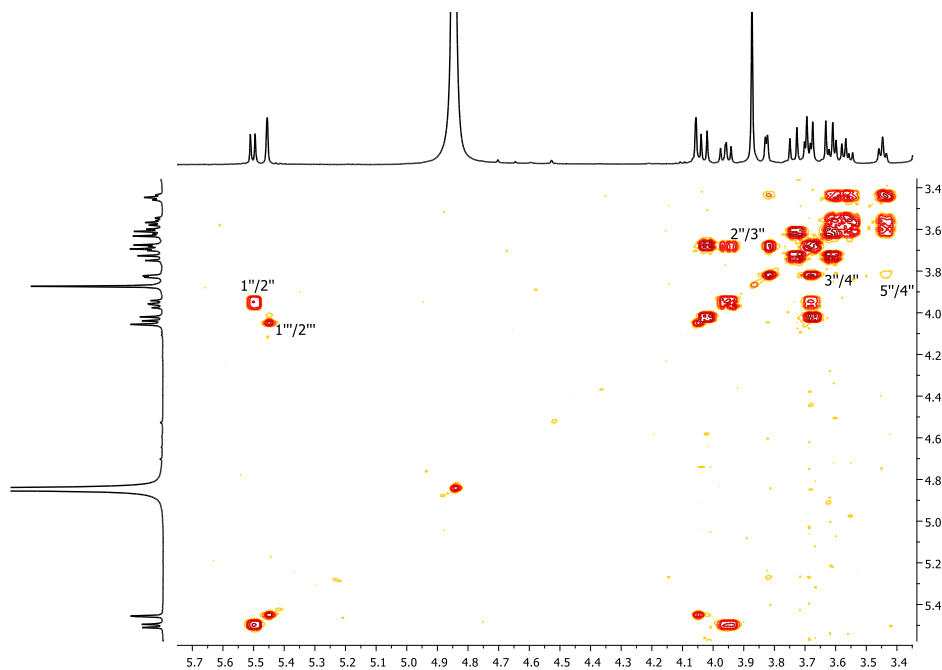
Slika 78. Ključne HMBC korelacije patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**49**)



Slika 79. Deo NOESY spektra patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**49**) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu



Slika 80. Ključne NOESY korelacije patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**49**)

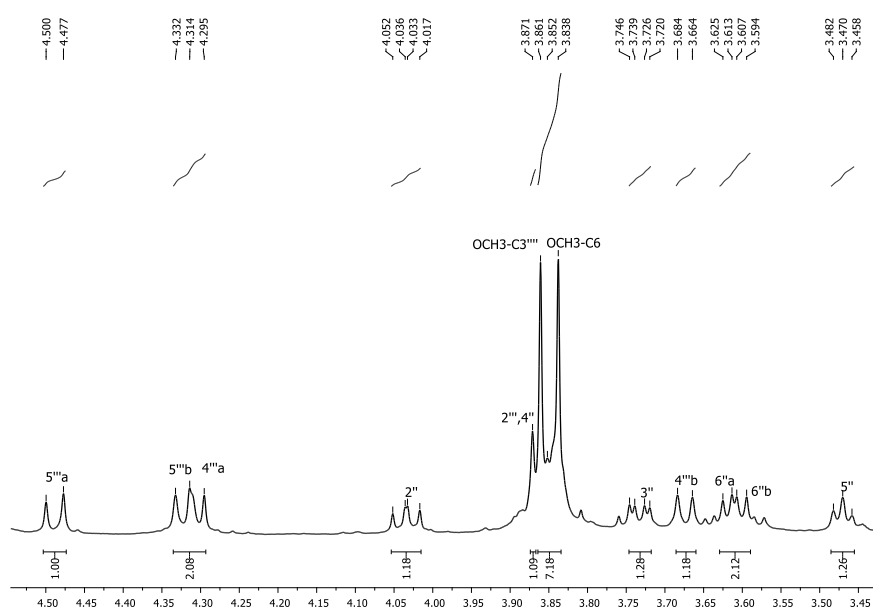


Slika 81. Deo COSY spektra patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**49**) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu

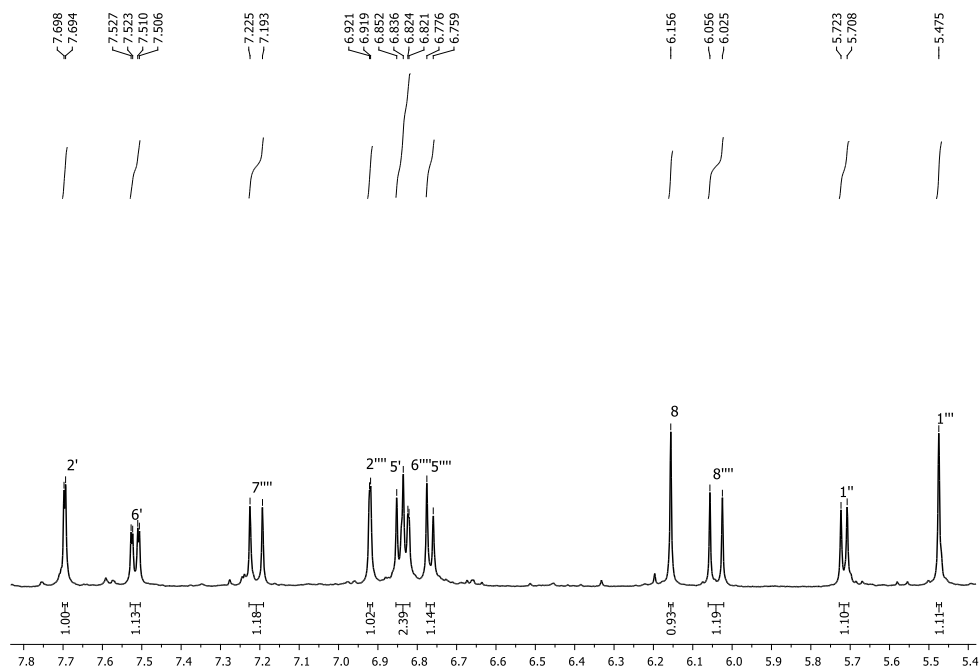
2.2.2. Određivanje strukture patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**)

Jedinjenje **50** (Slika 70) je izolovano u količini od 5,0 mg u vidu žutog praha. Molekulska formula $C_{37}H_{38}O_{20}$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona $[M - H]^-$ na m/z 801,1893. U UV spektru jedinjenja **50** uočeni su slični absorpcioni maksimumi kao za jedinjenje **49**, koji su karakteristični za 3-OH supstituisane flavonole. Kao i kod prethodno izolovanog jedinjenja slobodne hidroksilne grupe u položajima C-3', C-4', C-5 i C-7 su određene nakon dodavanja reagenasa UV pomeranja. Na osnovu hemijskih pomeranja signala u 1H i ^{13}C NMR spektrima (Tabela 3, Slike 83-85) zaključeno je da je u jedinjenju **50** kao aglikon prisutan patuletin.⁴⁰ Konstanta sprežanja od 1,3 Hz dubleta anomernog vodonika na δ_H 5,47 ppm karakteristična je za β -konfiguraciju pentoze, a konstanta sprežanja od 7,8 Hz dubleta drugog anomernog vodonika na δ_H 5,72 ppm za β -konfiguraciju heksozne jedinice. Poređenjem NMR podataka jedinjenja **49** i **50** (Slike 82-85, Tabela 3) utvrđeno je da je i u jedinjenju **50** prisutna disaharidna jedinica β -D-apiofuranosil- β -D-

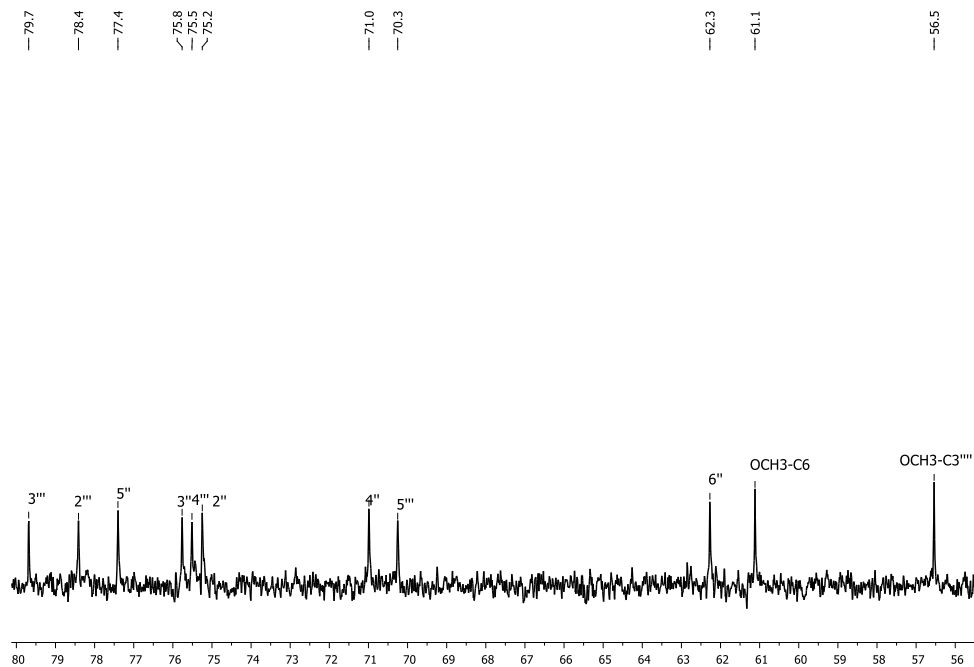
glukopiranoza. HMBC korelacije H-1"/C-3 i H-1"/C-2" (**Slika 88**) ukazale su na to da je apiozna jedinica vezana svojim C-1" za C-2" glukozne jedinice, a da je glukoza vezana svojim C-1" za C-3 patuletina. Pored signala koji potiču od patuletina i monosaharidnih jedinica, u ¹H NMR spektru uočeni su dubleti na δ_H 6,06 ppm (H-8""), odnosno δ_H 7,22 ppm (H-7""), sa konstantom spreznja od 15,8 Hz što je ukazalo na *E* konfiguraciju dvostruke veze (**Slika 83**). Daljom analizom u aromatičnoj oblasti ¹H NMR spektra uočeni su protoni na δ_H 6,92 ppm (d, *J* = 2,0 Hz, H-2""), δ_H 6,83 ppm (dd, *J* = 8,0; 1,5 Hz, H-6"" i δ_H 6,76 ppm (d, *J* = 8,1 Hz, H-5"")) kao i singlet na hemijskom pomeranju 3,86 ppm koji se odnosi protone iz metoksi grupe u položaju C-3"". U poređenju sa literaturom navedeni signali su karakteristični za feruloil grupu (**Tabela 3, Slike 83 i 85**). U odnosu na jedinjenje **49** u ¹H i ¹³C NMR spektrima jedinjenja **50** uočene su razlike u hemijskim pomeranjima protona CH₂-5"" i ugljenika C-5"" (**Tabela 3**), što je ukazalo da je feruloil ostatak estarskom vezom povezan za apiozu u položaju C-5"". Ovo je potvrđeno na osnovu HMBC korelacije karbonilnog ugljenikovog atoma C-9"" iz feruloil grupe sa protonima H-5"" iz apioze (**Slika 88**). Svi navedeni spektroskopski podaci su se složili sa literturnim. Zaključeno je da je **50**, patuletin 3-*O*-(5""-*O*-feruloil)-β-D-apiofuranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozid, poznato jedinjenje prethodno izolovano iz *A. littoralis*.⁴⁰



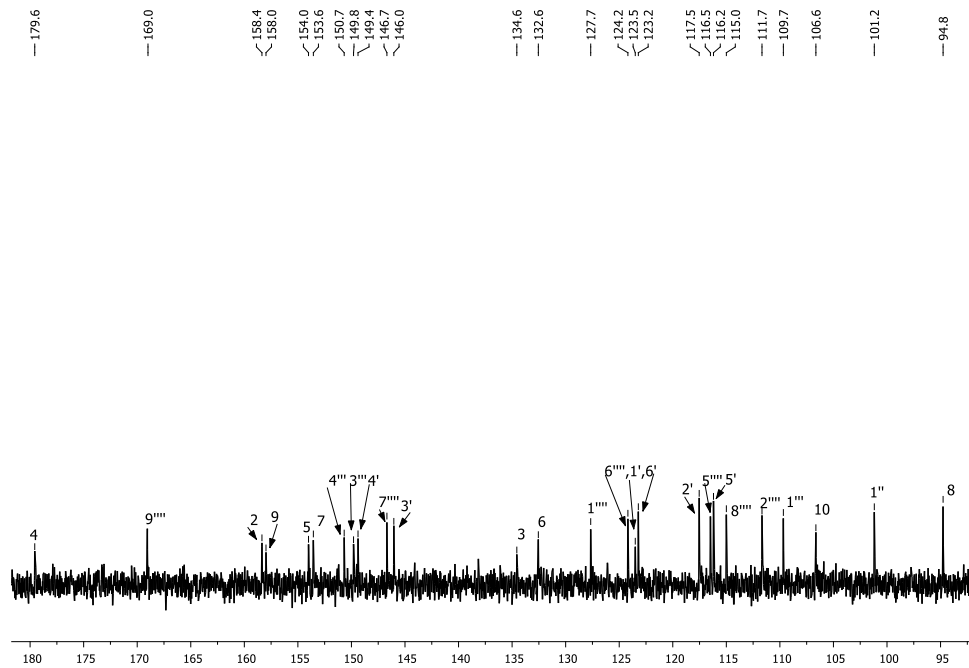
Slika 82. ¹H NMR spektar patuletin 3-*O*-(5""-*O*-feruloil)-β-D-apiofuranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozida (**50**) – oblast 3,40-4,50 ppm



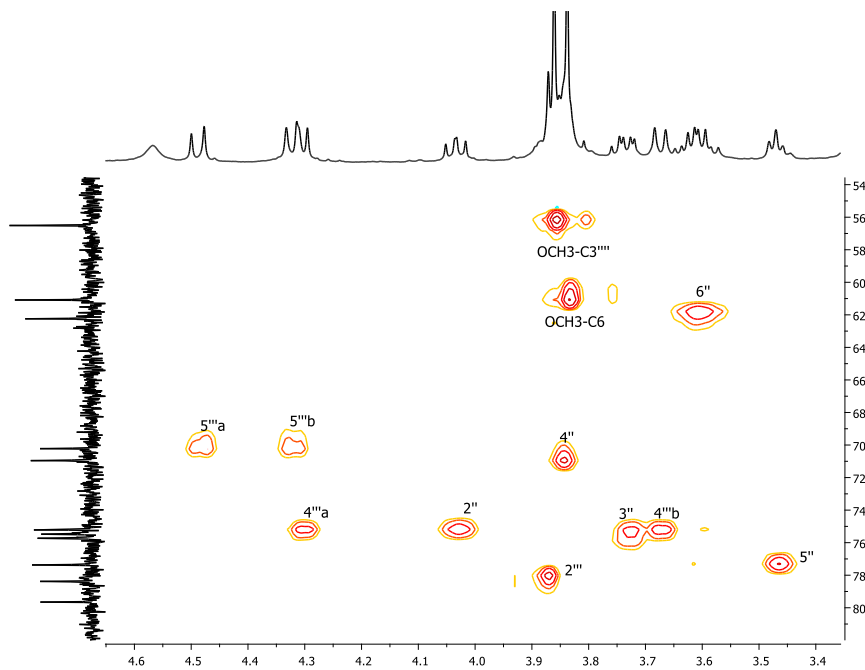
Slika 83. ^1H NMR spektar patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**) – oblast 5,4-7,8 ppm



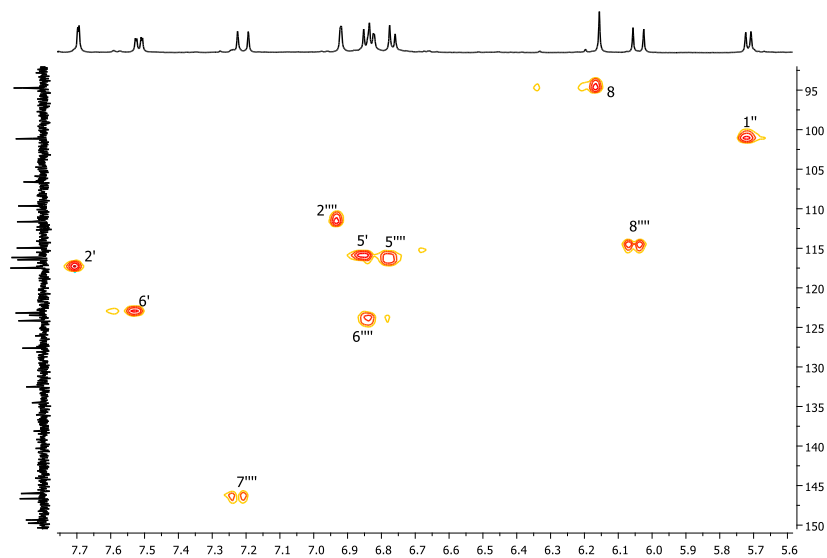
Slika 84. ^{13}C NMR spektar patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**) – oblast 56-80 ppm



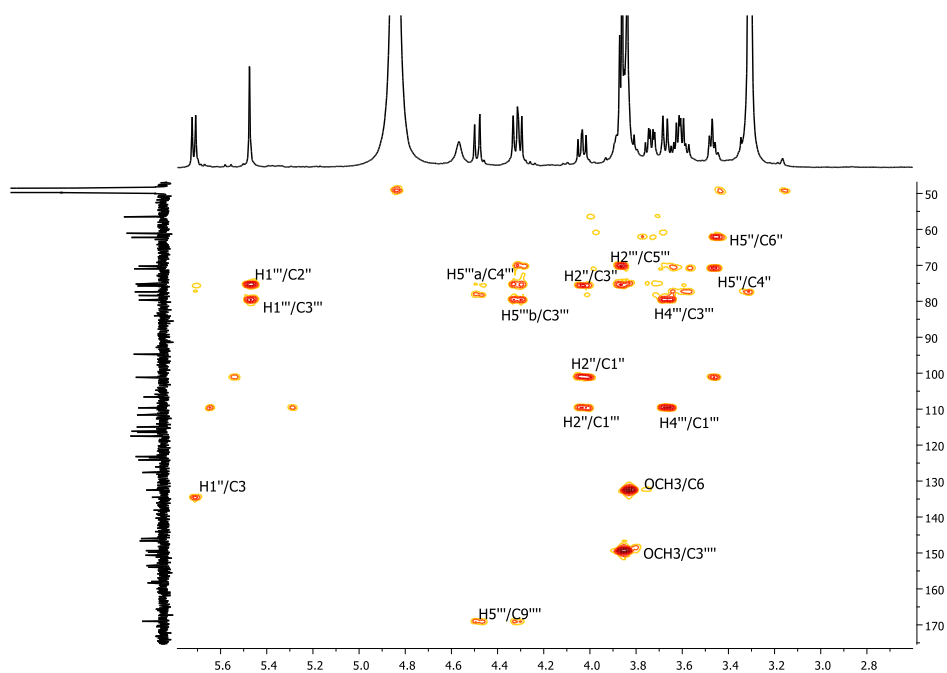
Slika 85. ^{13}C NMR spektar patuletin 3-*O*-(5''''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**) – oblast 90-180 ppm



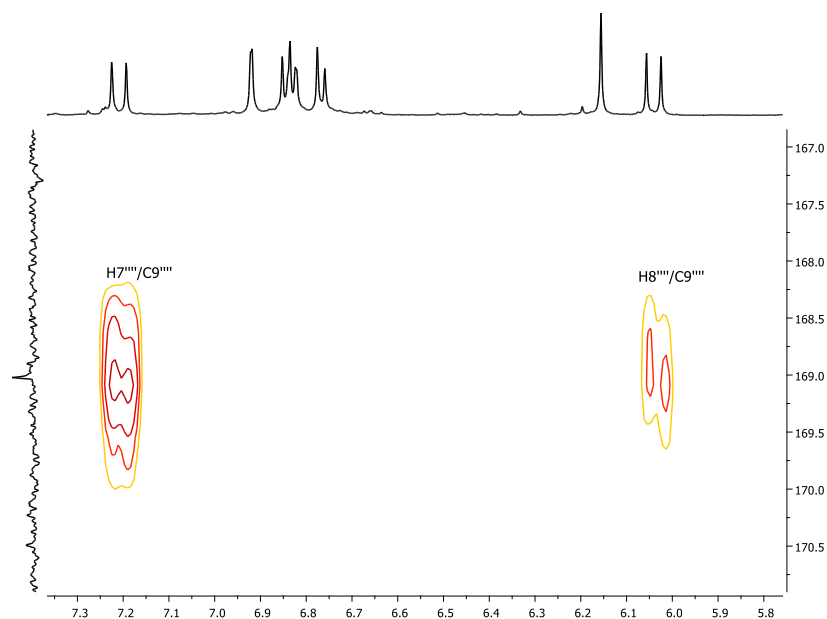
Slika 86. Deo HSQC spektra patuletin 3-*O*-(5''''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**) (^1H NMR 3,4-4,6 ppm i ^{13}C NMR 54-82 ppm)



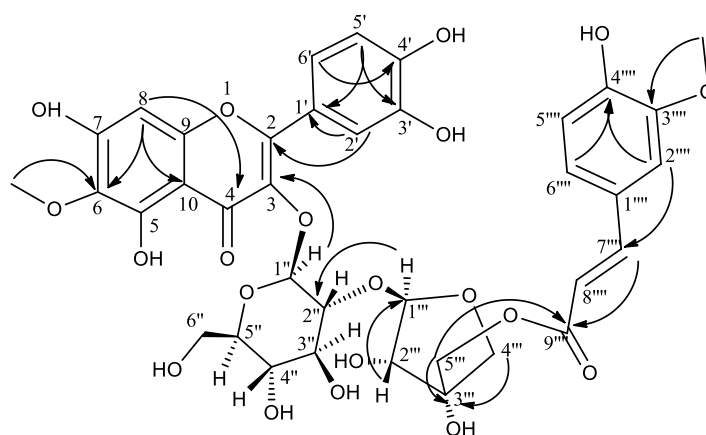
Slika 87. Deo HSQC spektra patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**) (^1H NMR 5,60-7,75 ppm i ^{13}C NMR 93-150 ppm)



Slika 88. Deo HMBC spektra patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**) (^1H NMR 2,6-5,8 ppm i ^{13}C NMR 50-175 ppm)



Slika 89. Deo HMBC spektra patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**)

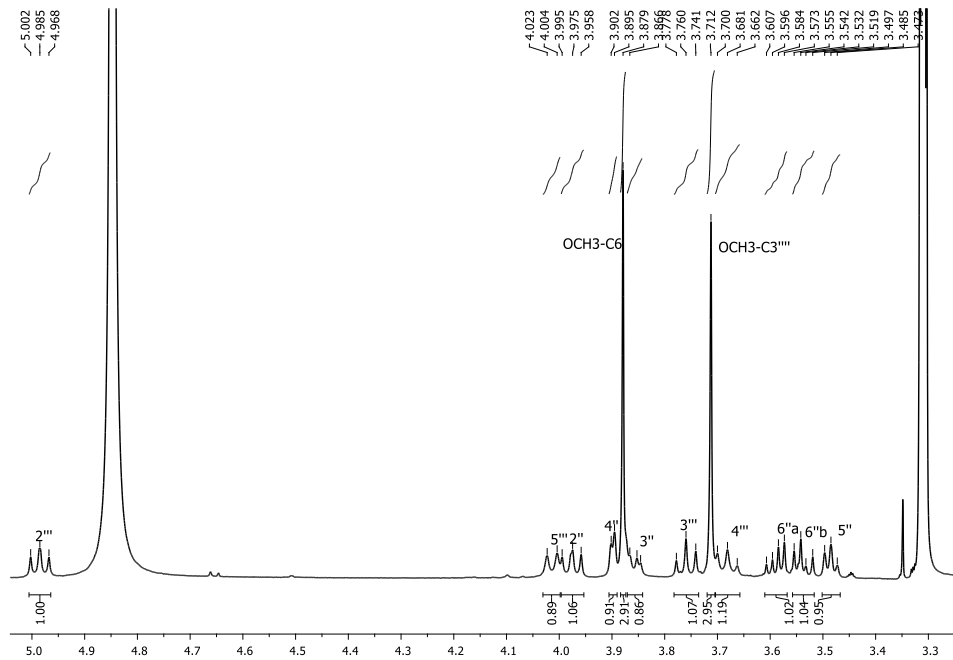


Slika 90. Ključne HMBC korelacije patuletin 3-*O*-(5'''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**50**)

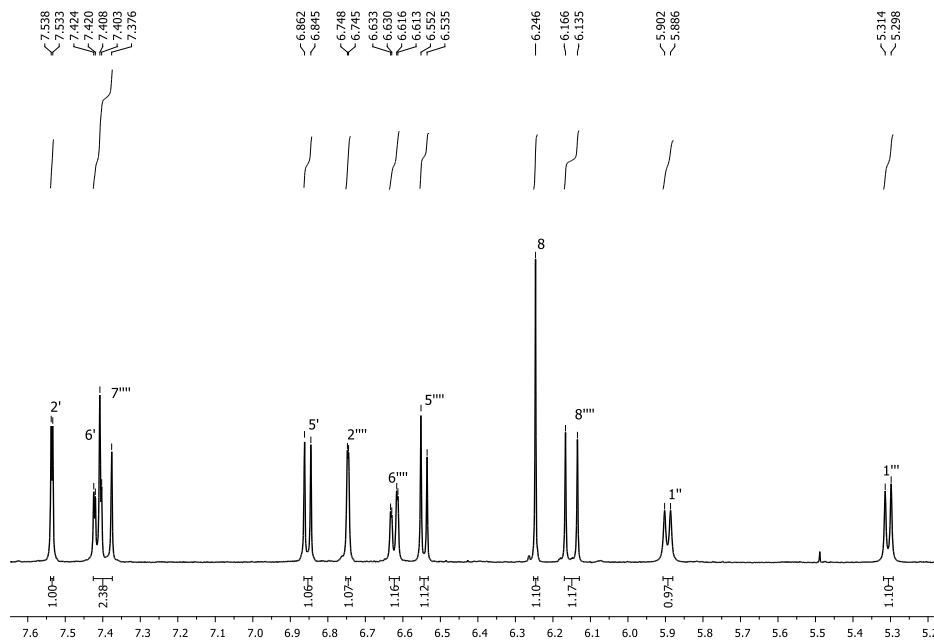
2.2.3. Određivanje strukture patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida – atripleksina IV (51)

Jedinjenje **51** (Slika **70**) je izolovano kao žuti prahu količini od 1,9 mg. U UV spektru jedinjenja **51** uočeni su slični absorpcioni maksimumi kao kod jedinjenja **49** i **50**. Trake na 1651 i 3417 cm^{-1} uočene u IR spektru odgovarale su valencionim vibracijama karbonilne i hidroksilne grupe. U HRESIMS spektru deprotonovani jon $[M - H]^-$ na m/z 845,1795 je ukazao na molekulsku formulu $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{O}_{22}$. Slobodne hidroksilne grupe u položajima C-3', C-4', C-5 i C-7 su potvrđene nakon dodatka reagensa sa UV pomeranja i dobijeni podaci se nalaze u Eksperimentanom delu. ^1H i ^{13}C NMR podaci jedinjenja **51** (Tabela 3, Slike 91-94) su slični kao kod jedinjenja **50**. Patuletin, glukozil i feruloil grupe su prepoznati poređenjem NMR podataka jedinjenja **51** sa istim za jedinjenja **49** i **50** koji su prethodno detaljno opisani. Razlika koja je uočena se odnosi na signale druge monosaharidne jedinice. Umesto β -D-apiofuranoze koja je prisutna u jedinjenjima **49** i **50**, nalazi se β -D-glukuronska kiselina, što je dokazano na osnovu razlike u MS i NMR spektrima. HMBC korelacija (H-1''/C-3) je ukazala da je glukoza povezana za C-3 patuletina. Veza između β -D-glukopiranozil i β -D-glukuronopiranozil ostatka je određena na osnovu HMBC korelacije anomernog protona glukuronil ostatka i drugog ugljenikovog atoma glukoze (H-1'''/C-2''). Korelacija H-2'''/C-9'''' u HMBC spektru ukazala je na način vezivanja feruloil i β -D-glukuronopiranozil grupe (Slika 99). Hemijska pomeranja signala koji pripadaju glukozi su ista kao kod jedinjenja **49** i **50** (Tabela 3). Karboksilna grupa (C-6''') iz β -D-glukuronopiranozil ostatka je dokazana na osnovu HMBC korelacija sa protonima H-4''' i H-5'''. NOE korelacije između protona H-1''' i H-5''' sa protonom H-3''' su potvrdile položaje aksijanih protona, odnosno relativnu konfiguraciju glukuronil ostatka (Slike 96 i 99). Dubleti na δ_{H} 6,15 ppm (H-8''''), odnosno δ_{H} 7,39 ppm (H-7''''), sa konstantom sprežanja od 15,9 Hz, uputili su na *E* dvostruku vezu (Slika 92). Pored ovih signala u ^1H NMR spektru uočeni su protoni na δ_{H} 6,74 ppm (d, $J = 1,5$ Hz, H-2), δ_{H} 6,62 ppm (dd, $J = 8,3; 2,2$ Hz, H-6), δ_{H} 6,54 ppm (d, $J = 8,1$ Hz, H-5) i δ_{H} 3,71 ppm (s, OMe), koji su karakteristični za feruloil ostatak (Tabela 3, Slika 92). Na osnovu svih spektroskopskih podataka jedinjenje **51**, patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-

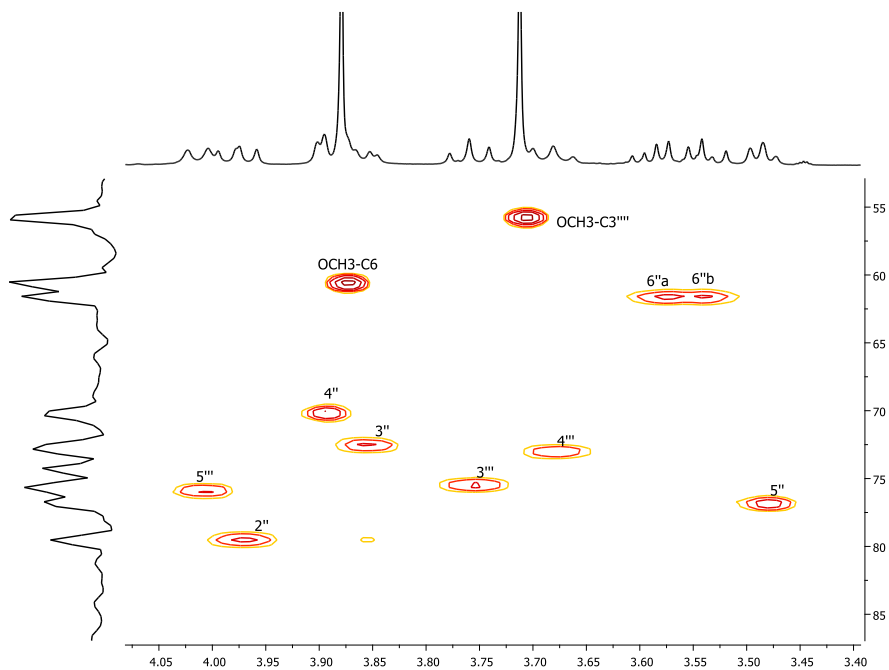
glukuronopiranozil(1→2)- β -D-glukopiranozid, je okarakterisano kao novi prirodni proizvod i nazvano je atripleksin IV.



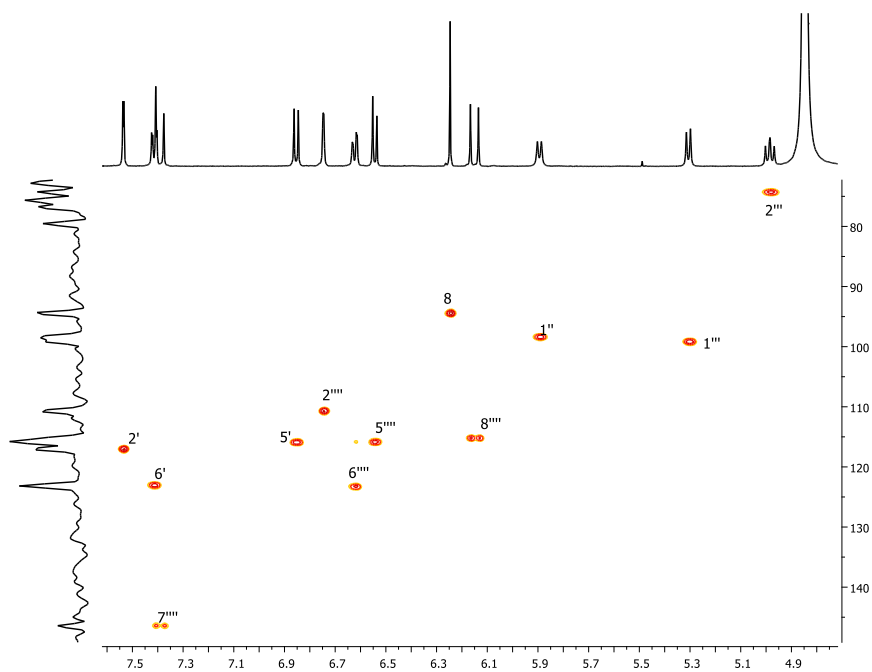
Slika 91. ^1H NMR spektar patuletin 3- O -(2'''- O -feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1→2)- β -D-glukopiranozida (**51**) – oblast 3,3-5,0 ppm



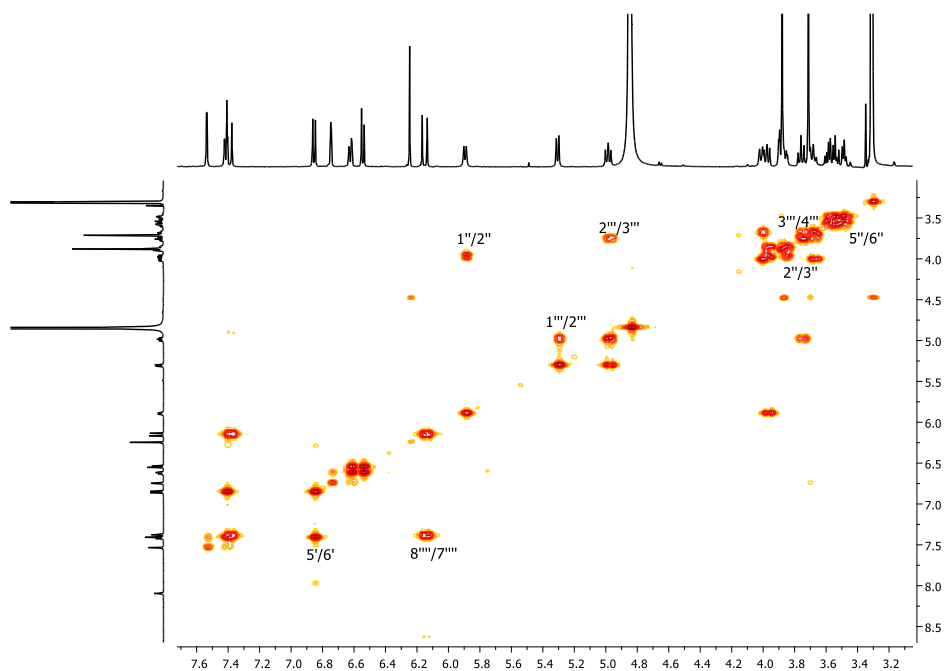
Slika 92. ^1H NMR spektar patuletin 3- O -(2'''- O -feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1→2)- β -D-glukopiranozida (**51**) – oblast 5,2-7,6 ppm



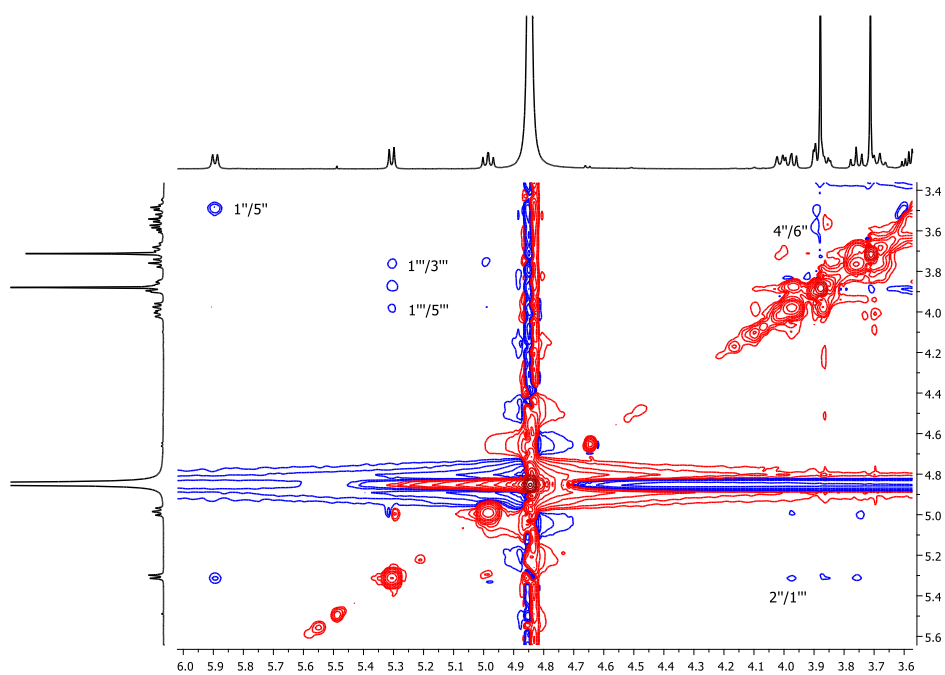
Slika 93. Deo HSQC spektra patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**51**) (^1H NMR 3,40-4,05 ppm i ^{13}C 55-85 ppm)



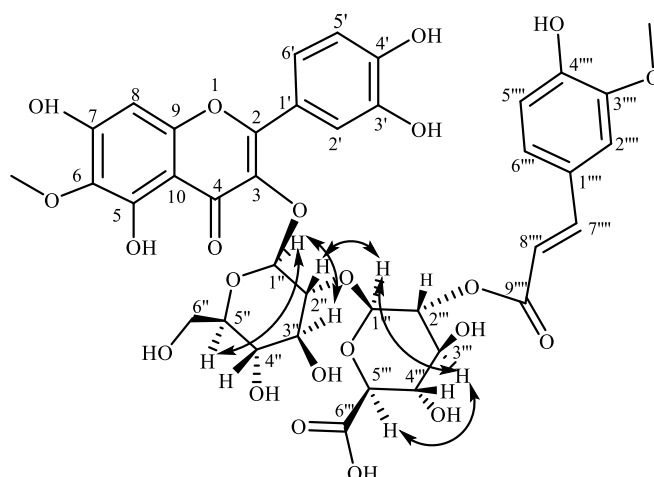
Slika 94. Deo HSQC spektra patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**51**) (^1H NMR 4,7-7,6 ppm i ^{13}C 70-150 ppm)



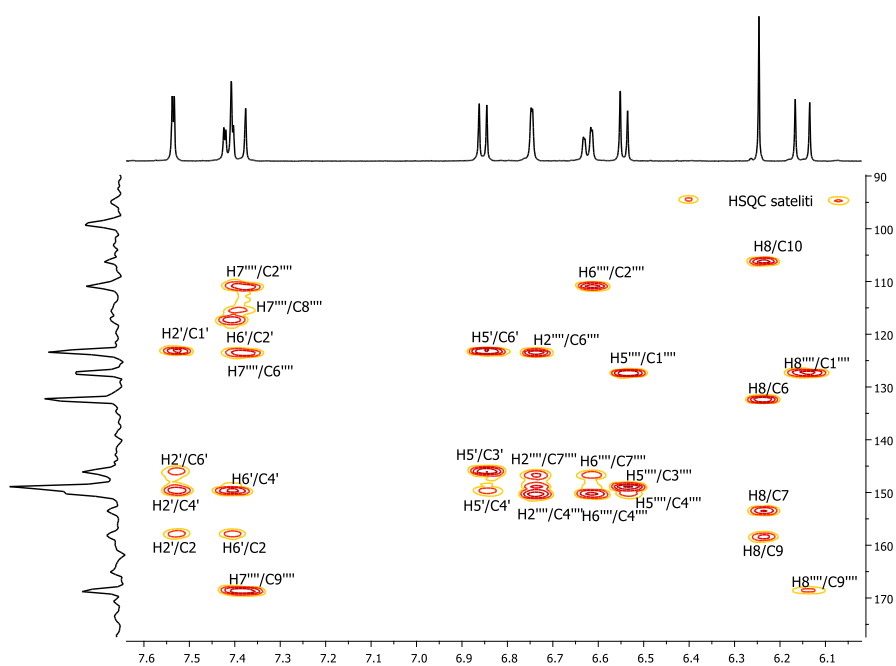
Slika 95. COSY spektar patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**51**)



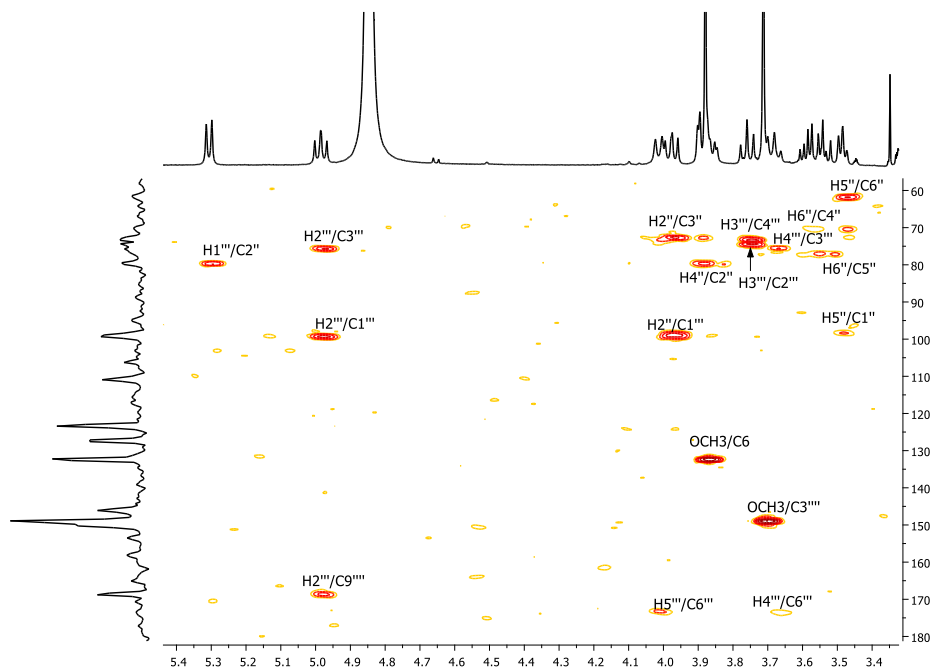
Slika 96. Deo NOESY spektra patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**51**) koji se odnosi na disaharidnu jedinicu



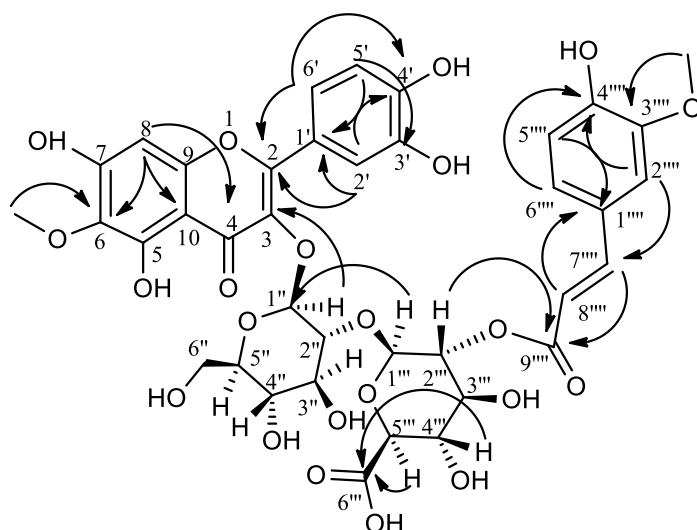
Slika 97. Ključne NOESY korelacije patuletin 3-*O*-(2''-*O*-feruloil)-β-D-glukuronopiranozil(1→2)-β-D-glukopiranozida (**51**)



Slika 98. Deo HMBC spektra patuletin 3-*O*-(2''-*O*-feruloil)-β-D-glukuronopiranozil(1→2)-β-D-glukopiranozida (**51**) (¹H NMR 6,0-7,6 ppm i ¹³C 90-175 ppm)



Slika 99. HMBC spektar patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**51**) (^1H NMR 3,3-5,4 ppm i ^{13}C 60-180 ppm)



Slika 100. Ključne HMBC korelacije patuletin 3-*O*-(2'''-*O*-feruloil)- β -D-glukuronopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozida (**51**)

Tabela 3. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **49-51** (125,80 MHz za ^{13}C i 500,26 MHz za ^1H ,

Metanol-*d*4)

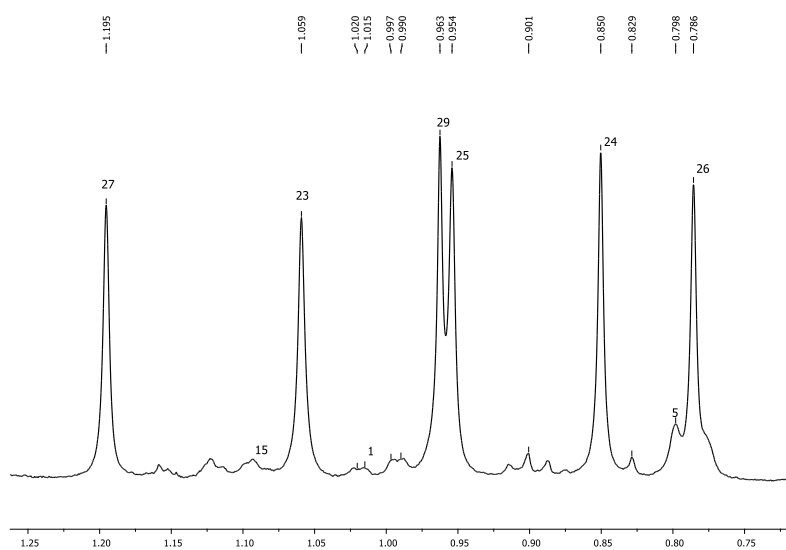
C/H	49		50		51	
	δ_{C}	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J u Hz)
2	158,5	/	158,3	/	158,4	/
3	134,8	/	134,4	/	134,6	/
4	180,0	/	179,5	/	179,7	/
5	153,8	/	154,0	/	153,8	/
6	132,7	/	132,5	/	132,5	/
7	154,0	/	153,5	/	153,5	/
8	94,9	6,48 s	94,8	6,15 s	94,8	6,25 s
9	158,6	/	157,9	/	157,9	/
10	106,5	/	106,8	/	106,4	/
1'	123,5	/	123,4	/	123,4	/
2'	117,4	7,69 d (2,0)	117,5	7,69 d (2,0)	117,4	7,53 d (2,0)
3'	146,1	/	146,0	/	146,0	/
4'	149,9	/	149,3	/	149,8	/
5'	116,3	6,87 d (8,5)	116,0	6,84 d	116,2	6,85 d (8,5)
6'	123,4	7,64 dd (2,1, 8,5)	123,0	7,51 dd (2,0, 8,5)	123,4	7,41 dd (2,2, 8,3)
6-OMe	61,1	3,87 s	61,0	3,84 s	61,1	3,88 s
Glc ^a						
1''	101,5	5,49 d (7,7)	101,0	5,72 d (7,8)	98,8	5,90 d (7,9)
2''	76,9	3,95 dd (8,0, 9,5)	75,1	4,04 dd (8,0, 9,5)	79,9	3,97 dd (1,0, 10,0)
3''	75,5	3,69 m	75,6	3,72 m	73,0	3,85 m
4''	70,8	3,82 d (3,0)	70,8	3,85 m	70,6	3,89 m
5''	77,3	3,44 t (6,0)	77,3	3,45 t (6,0)	77,3	3,49 t (6,0)
6''a		3,60 m,		3,63 m,		3,60 m,
6''b	62,2	3,57 m	62,1	3,57 m	62,1	3,54 m
Api ^b						
1'''	110,8	5,46 d (1,3)	109,5	5,47d (1,3)		
2'''	78,2	4,06 d (1,3)	78,3	3,87 m		
3'''	81,0	/	79,5	/		
4'''a		4,03 d (9,5),		4,29 m,		
4'''b	75,6	3,70 d (9,5)	75,3	3,66 d (9,5)		
5'''a		3,73 d (11,5)		4,49 m,		
5'''b	66,4	3,63 d (11,5)	70,1	4,32 d (11,2)		
GlcAp ^c						
1''''					99,6	5,30 d (8,0)
2''''					74,8	4,99 dd (9,1, 8,2)
3''''					75,9	3,75 t (9,1)
4''''					73,4	3,69 m
5''''					76,4	4,01 d (9,5)
6''''					173,3	/
feruloil						
1'''''			127,5	/	127,5	/
2'''''			111,6	6,92 d (2,0)	111,1	6,74 d (1,5)
3'''''			149,4	/	149,1	/
4'''''			149,8	/	150,4	/
5'''''			116,4	6,76 d (8,1)	116,3	6,54 d (8,1)
6'''''			124,2	6,83 dd (1,5, 8,0)	123,6	6,62 dd (2,2, 8,3)
7'''''			146,6	7,22 d (15,8)	146,7	7,39 d (15,9)
8'''''			115,0	6,06 d (15,8)	115,6	6,15 d (15,9)
9'''''			169,0	/	168,7	/
3-OMe			56,4	3,86 s	56,2	3,71 s

^aGlc^a – glukopiranozil ^bApi^b – apiofuranozil ^cGlcAp – glukuronopiranozil

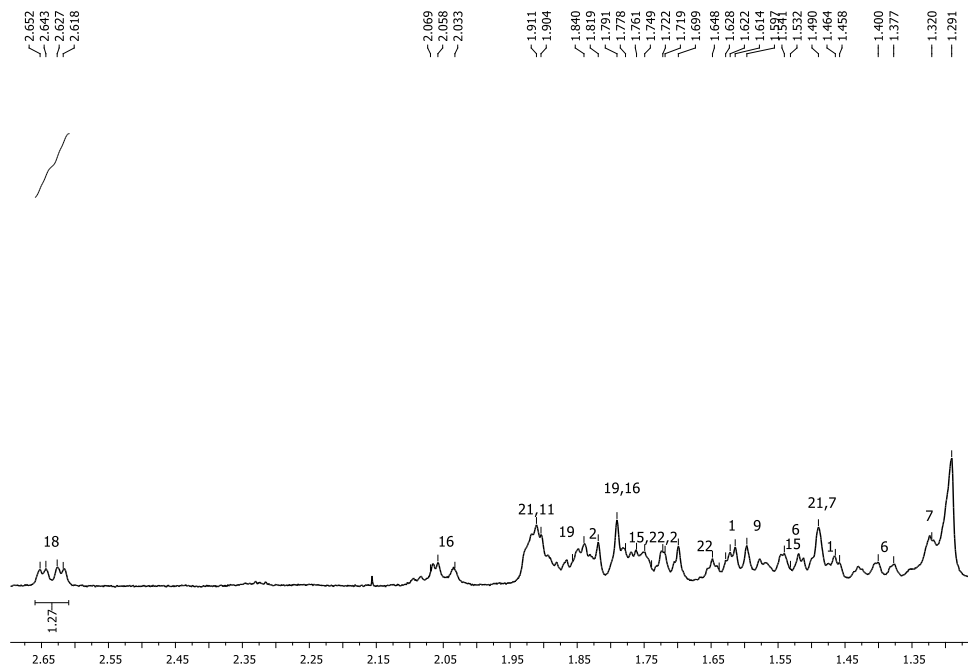
2.2.4. Određivanje strukture β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozil-30-al-olean-12-en-28-oata (52)

Jedinjenje **52** (Slika **70**) je izolovano u količini od 6,6 mg u obliku belog amorfnog praha. Molekulska formula $C_{47}H_{74}O_{21}S$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekuskog jona $[M - H]^-$ na m/z 1005,4381. U 1H NMR spektru jedinjenja **10** uočeno je 6 singleta metil grupa na δ_H 0,78, 0,85, 0,95, 0,96, 1,06 i 1,19, kiseonični metinski proton na δ_H 3,16 ppm (dd, $J = 4,3, 11,9$ Hz), vinilni proton na δ_H 5,33 ppm, i aldehidni proton na δ_H 9,45 ppm (Slike **101-103**). Analiza ^{13}C NMR spektra potvrdila je prisustvo dvostruke veze (δ_C 124,7 ppm, 144,5 ppm), estarskog (δ_C 169,0 ppm) i aldehidnog (δ_C 208,0 ppm) karbonilnog ugljenika (Slika **106**) u jedinjenju **52**. U poređenju sa literaturom, izolovano jedinjenje **52** pripada grupi saponina sa skeletom oleanolne kiseline.¹⁴² Na osnovu broja signala anomernih ugljenika u ^{13}C NMR spektru određen je broj monosaharidnih jedinica. Preko HSQC korelacija utvrđen je položaj anomernih protona u 1H NMR spektru: δ_H/δ_C 4,55/105,4; 4,79/102,5 i 5,35/95,9, što je ukazalo na tri monosaharidne jedinice (Tabela **4**, Slika **110**). Analizom hidrolizata na HPLC-u i poređenjem sa standardima, kao i korišćenjem COSY i HSQC spektara dokazane su β -D-glukopiranoza (Glc1), β -D-galaktopiranoza (Galp), i α -L-arabinopiranoza (Arap) (Tabela **4**, Slika **110**). Na osnovu vrednosti vicinalnih konstanti kuplovanja za galaktozu i glukožu ($^3J_{H1/H2}$ 7–8 Hz) i arabinozu ($^3J_{H1/H2}$ 6,5 Hz) određena je β -konfiguracija D-galaktopiranoze i D-glukopiranoze, kao i α -konfiguracija L-arabinopiranoze. HMBC korelacije između anomernog signala na δ_H 4,55 ppm (α -L-Arap) i C-3 na δ_C 91,2 ppm kao i korelacija između anomernog protona na δ_H 4,79 ppm (H-1_{Galp}) i C-2_{Arap} na δ_C 79,4 ppm su nedvosmisleni dokazi da je disaharidna jedinica β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)-L-arabinopiranoza povezana za C-3 aglikona preko C-1_{Arap} (Slika **114**). Signal anomernog protona i ugljenika na δ_H/δ_C 5,35/95,9 odgovara β -D-glukopiranozi (Glc1) koja je vezana za aglikon estarskom vezom za karboksilnu grupu C-28. Ovo je potvrđeno korelacijom u HMBC spektru između anomernog protona H-1_{Glc1} (δ_H 5,35 ppm) i ugljenika C-28 (δ_C 177,5 ppm) iz aglikona (Slika **114**). NOESY korelacije H-3/H-1_{Arap}, H-2_{Arap}/H-1_{Galp} i H-26/H-1_{Glc1} su potvrdile veze između aglikona i šećernih jedinica, kao i glikozidnu vezu u disaharidnoj jedinici (Slika **107**). Položaji aksijalnih protona u šećerima su dokazani na osnovu sledećih korelacija: H-

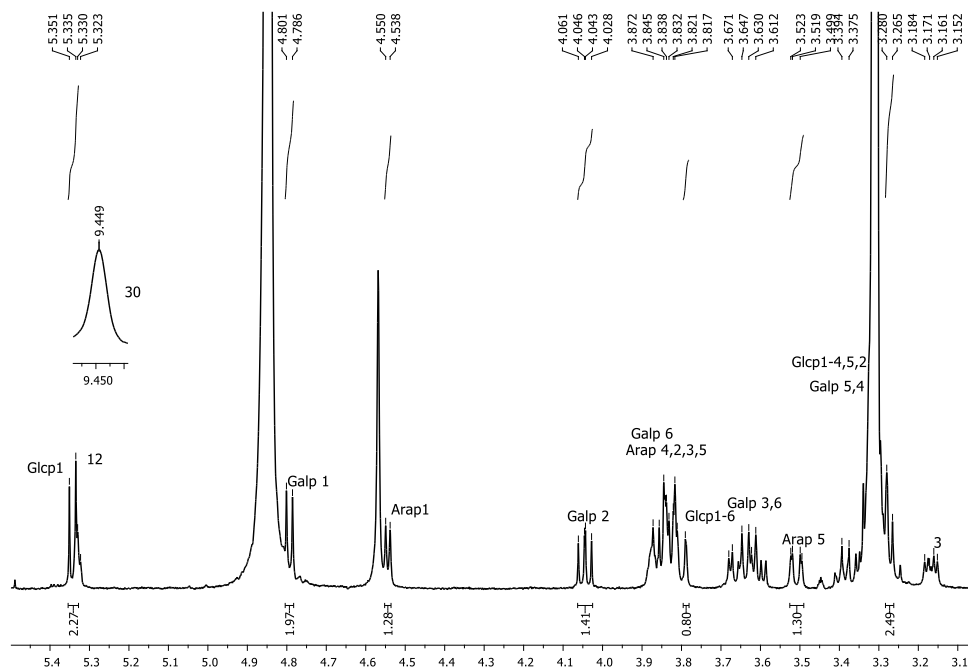
$1_{\text{Arap}}/\text{Me-23}$, $\text{H-1}_{\text{Arap}}/\text{H-3}_{\text{Arap}}$, $\text{H-1}_{\text{Arap}}/\text{H-5}_{\text{Arap}}$, $\text{H-1}_{\text{GlcP1}}/\text{H-3}_{\text{GlcP1}}$, $\text{H-1}_{\text{GlcP1}}/\text{H-5}_{\text{GlcP1}}$, $\text{H-1}_{\text{GalP}}/\text{H-3}_{\text{GalP}}$, $\text{H-1}_{\text{GalP}}/\text{H-5}_{\text{GalP}}$ u NOESY spektru (**Slika 107**). Takođe, stereochemija u jedinjenju **52** je određena pomoću NOESY korelacija. Konstante sprežanja $J = 11,9$ i $4,3$ Hz ukazuju da je proton H-3 aksijalno orijentisan. Na osnovu korelacija protona H-5 i H-9 sa protonom H-3 u NOESY spektru zaključeno je da su ovi protoni α orijentisani (**Slika 107**). NOESY korelacije Me-24/Me-25, Me-25/Me-26 određuju β -orijentaciju ovih metil grupa, odnosno korelacija Me-27/Me-29 α -orijentaciju metil grupa, kao i na *trans* vezivanje D prstena i C prstena aglikona (**Slika 108**). Prisustvo sulfatne grupe u jedinjenju **52** određeno je iz HRESIMS spektra. Na osnovu veće mase za 80 jedinica od očekivane za nesulfonovani šećer $[\text{M}(\text{OSO}_3\text{H})-\text{M}(\text{OH})=80]$ kao i dobro poklapanje jona $[\text{M}-\text{H}+2]$ sa teorijskom vrednošću ukazuje da je umesto hidroksilne vezana sulfatna grupa (28,0% eksp, 22,7% izračunato). Položaj sulfatne grupe je određen na osnovu promene hemijskih pomeranja protona H-2_{GalP} ($\sim 0,5-0,7$ ppm) i ugljenika C-2_{GalP} (8-10 ppm) u odnosu na hemijsko pomeranje kada je vezana hidroksilna grupa. U poređenju sa literaturnim vrednostima za slične saponine izolovane iz biljne vrste *Fagonia indica* zaključeno je da se sulfatna grupa nalazi u položaju C-2_{GalP} .¹⁴² Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju, pa je zaključeno da je β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oat (**52**) novi bidesmozidični saponin.



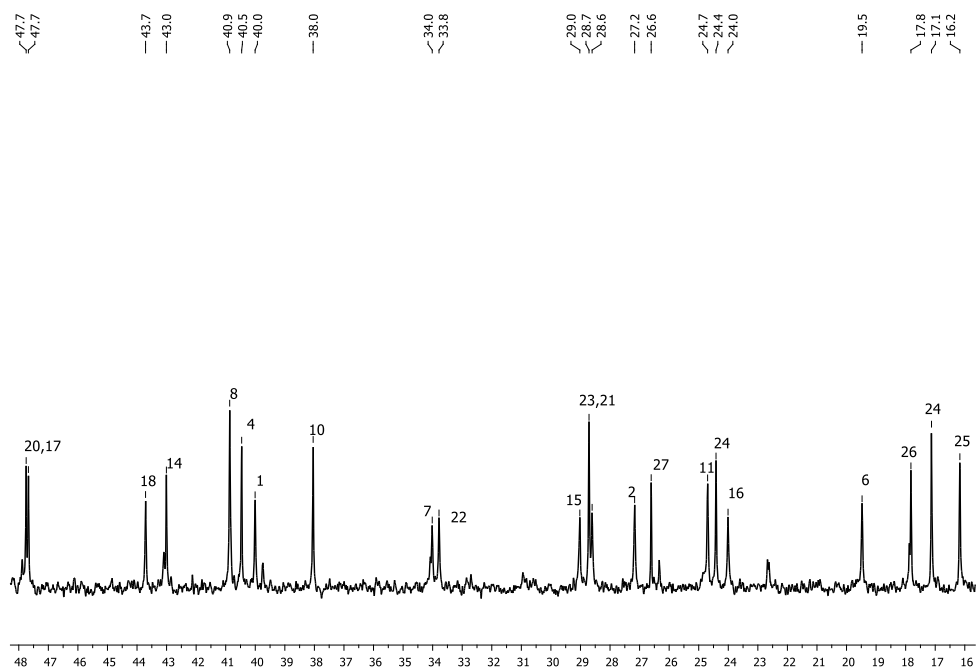
Slika 101. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**) – oblast 0,75-1,25 ppm



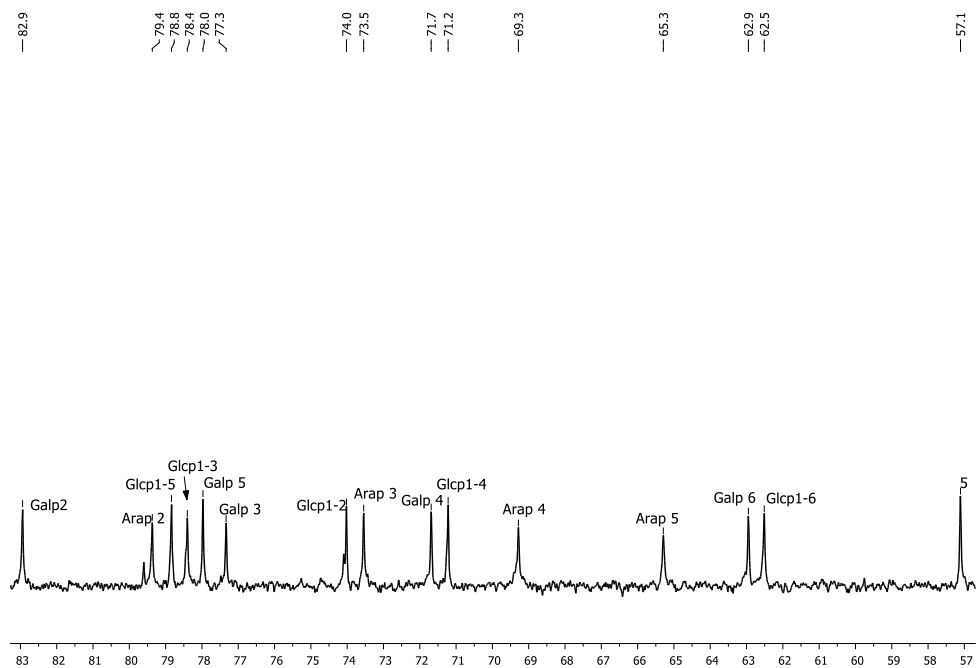
Slika 102. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**) – oblast 1,30-2,65 ppm



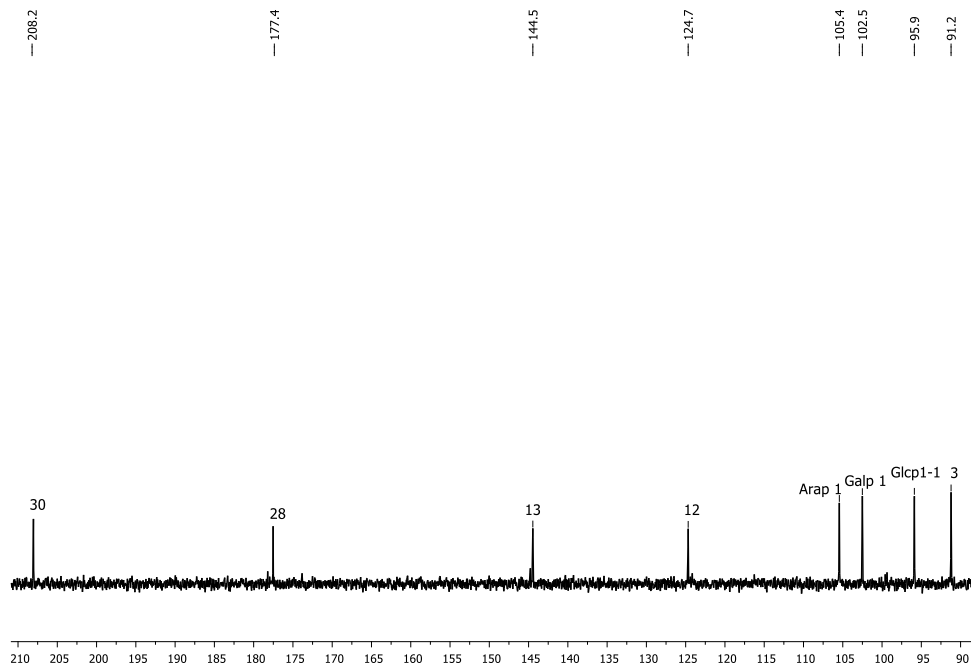
Slika 103. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**) – oblast 3,1-5,4 ppm



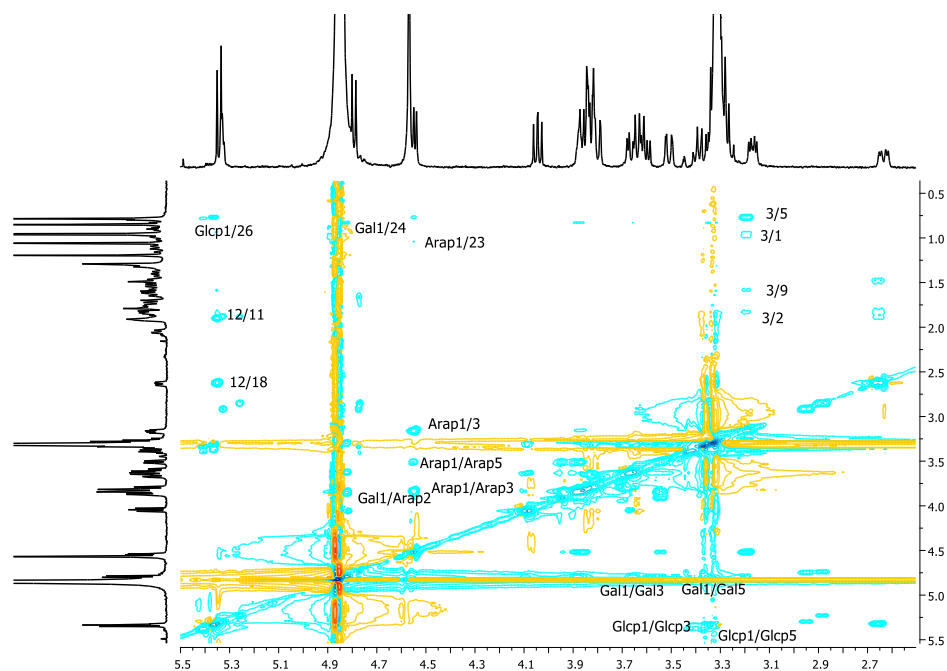
Slika 104. ^{13}C NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**) – oblast 16-48 ppm



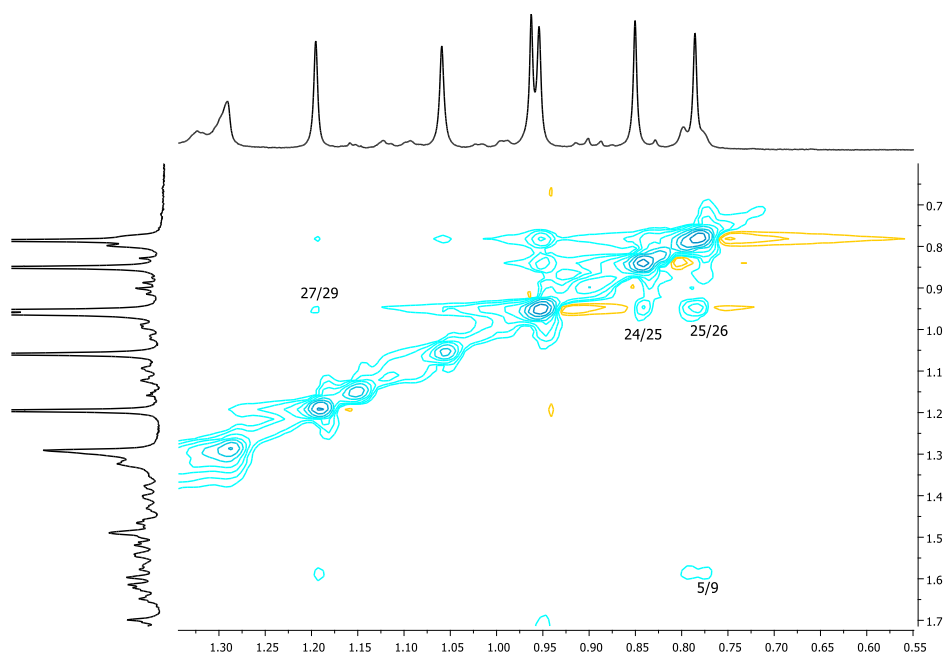
Slika 105. ^{13}C NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**) – oblast 57-83 ppm



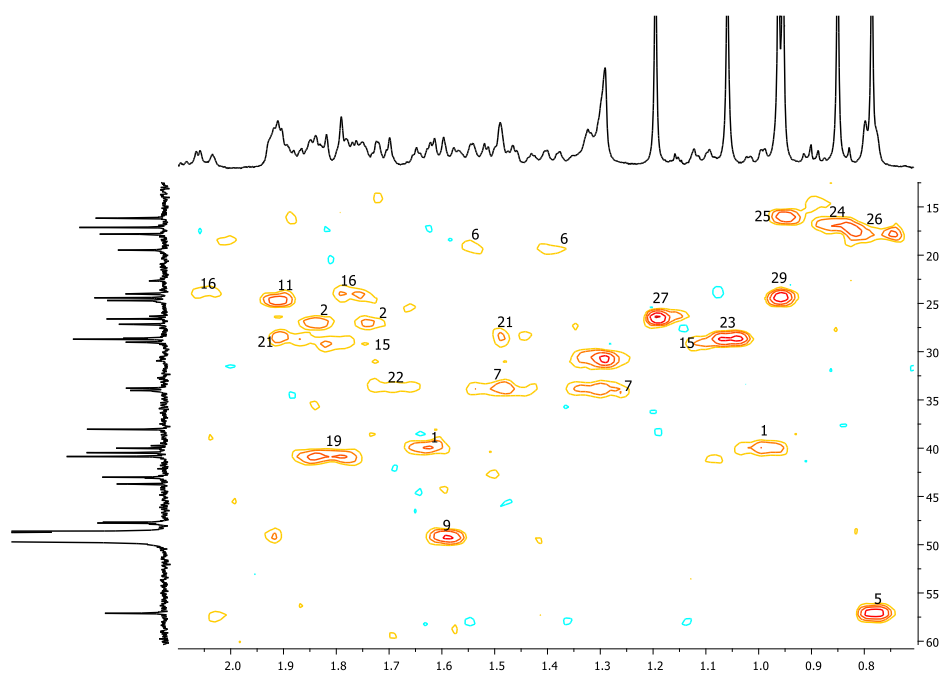
Slika 106. ^{13}C NMR spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**) – oblast 90-210 ppm



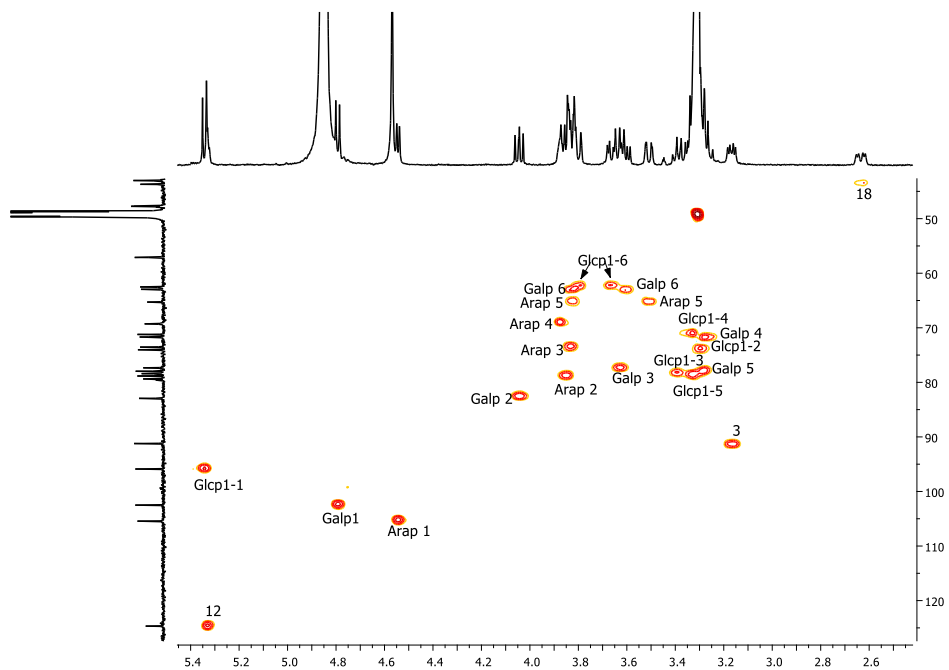
Slika 107. Deo NOESY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**)



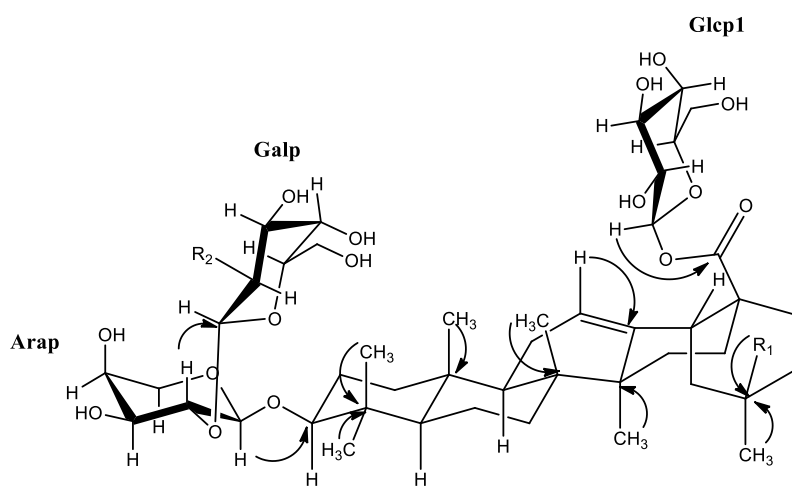
Slika 108. Deo NOESY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**)



Slika 109. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**)

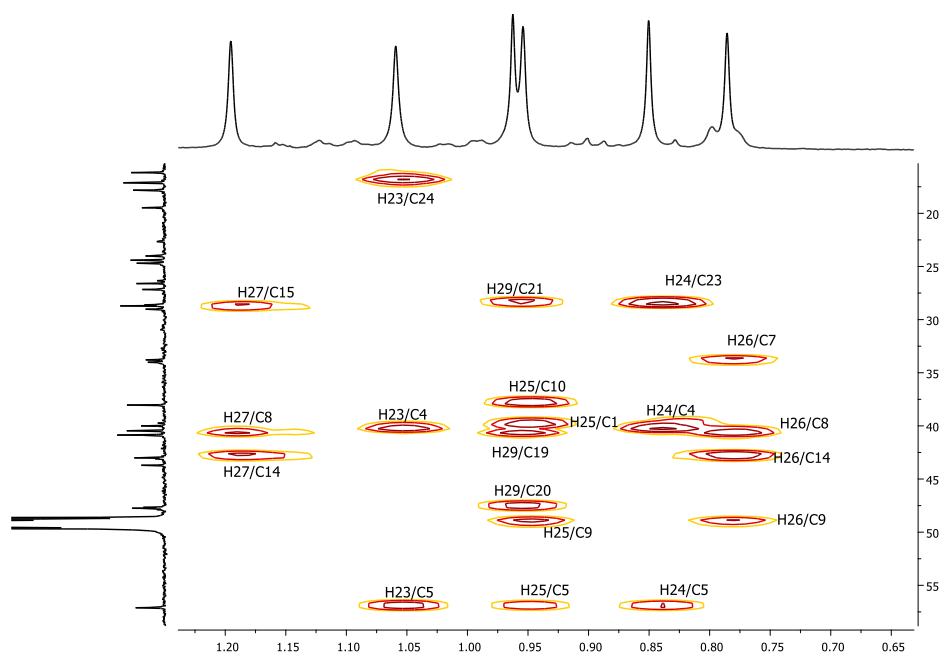


Slika 110. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozil-3-O-olean-12-en-28-oata (**52**)

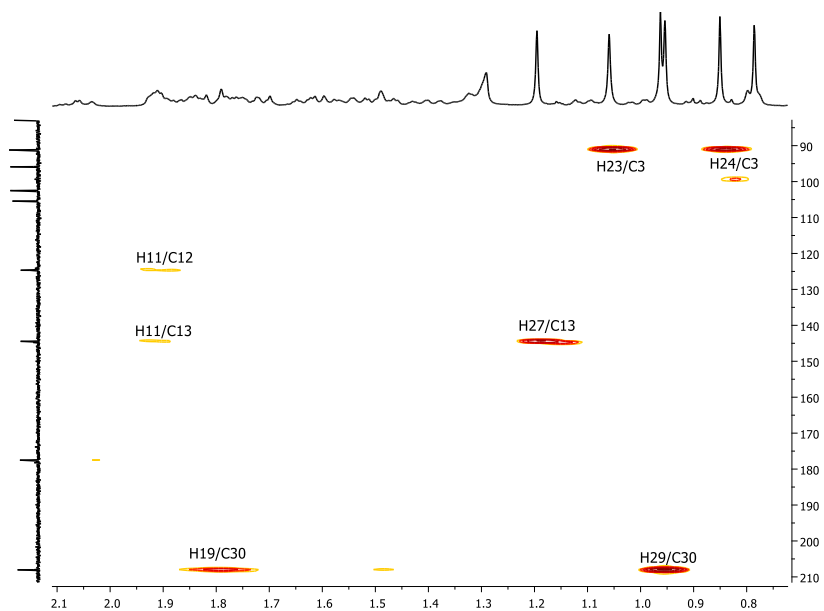


52 $R_1=CHO$, $R_2=OSO_3H$; **53** $R_1=CH_2OH$, $R_2=OSO_3H$; **54** $R_1=CHO$, $R_2=Glc2$

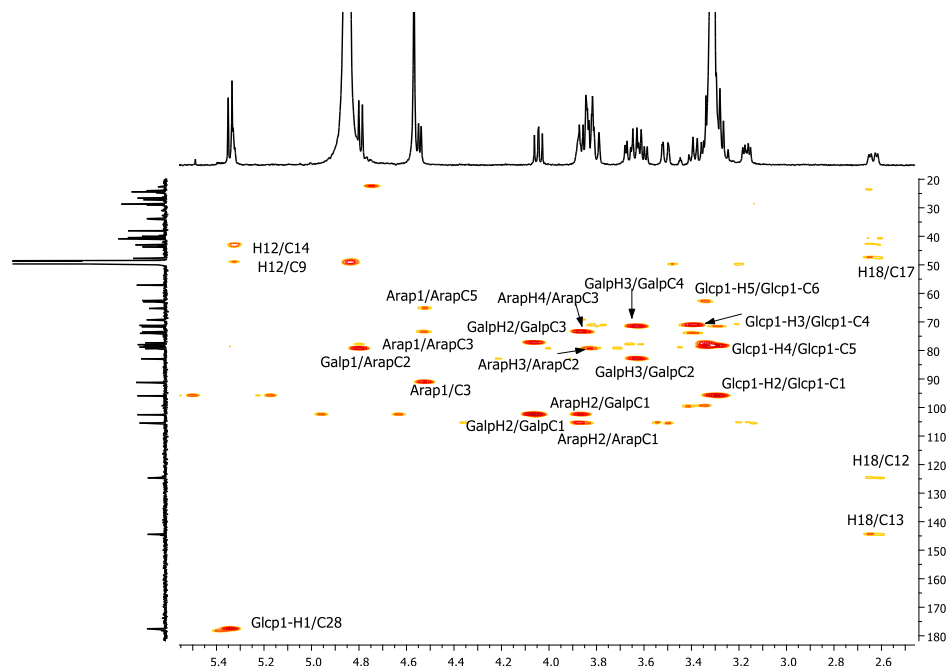
Slika 111. Ključne HMBC korelacije za jedinjenja **52-54**



Slika 112. Deo HMBC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**)



Slika 113. Deo HMBC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**)

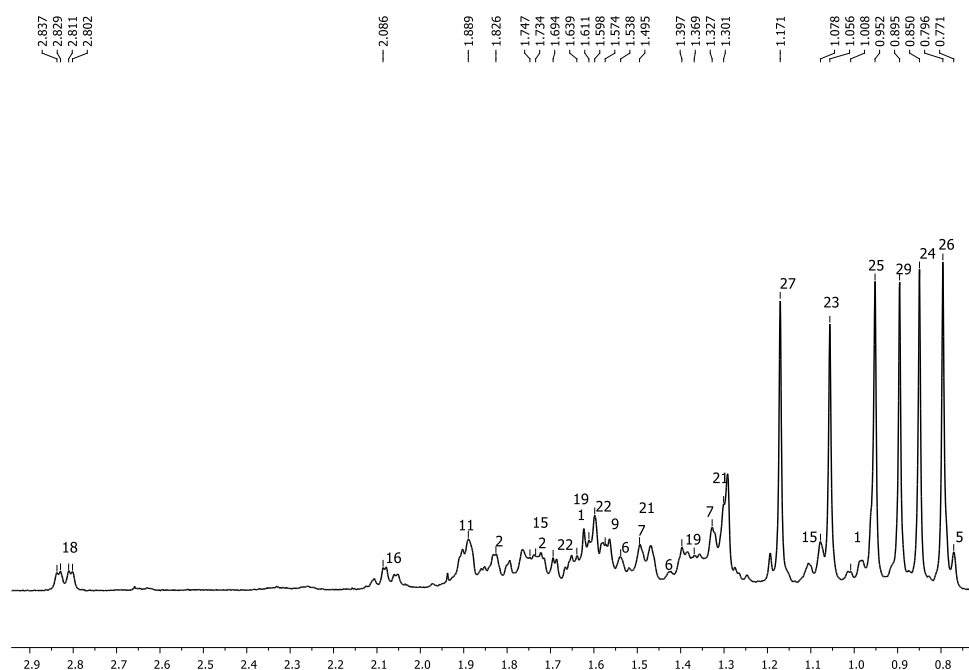


Slika 114. Deo HMBC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**)

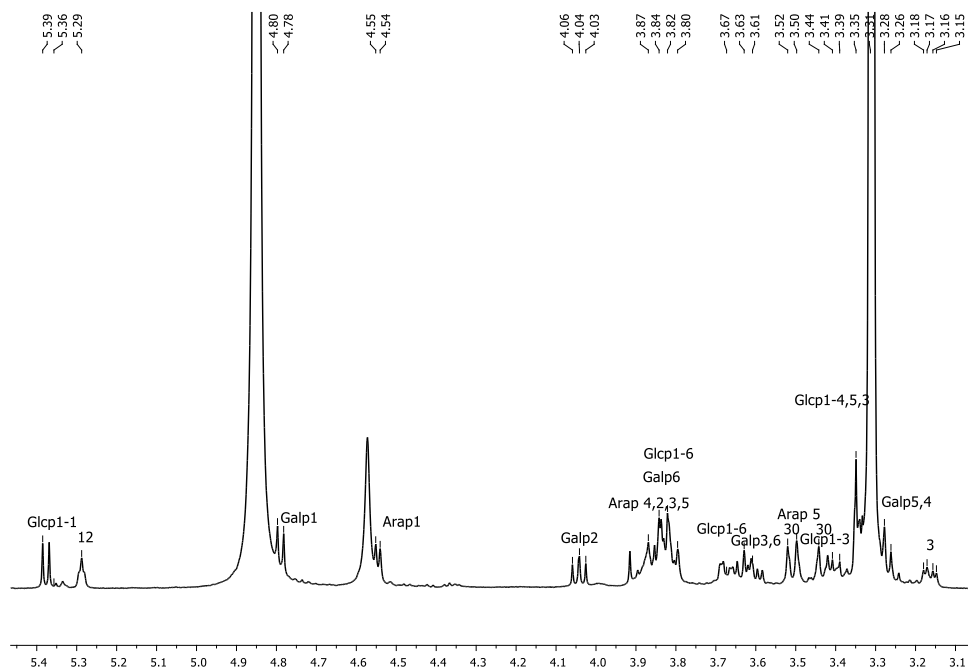
2.2.5. Određivanje strukture β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)

Jedinjenje **53** (**Slika 70**) je izolovano u količini od 1,6 mg u obliku belog amorfno praša. Molekulska formula $C_{47}H_{76}O_{21}S$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona $[M - H]^-$ na m/z 1007,4552. U poređenju sa literaturom i spektroskopskim podacima za jedinjenje **52** zaključeno je da i jedinjenje **53** pripada tipu saponina sa oleanolnim skeletom.¹⁴² 1H i ^{13}C NMR (HSQC) spektri ovog jedinjenja su bili veoma slični spektrima jedinjenja **52** (**Slike 115-118**). Jedina razlika u strukturi ovih jedinjenja je supstituent u položaju C-20, gde se umesto aldehidne grupe koja je prisutna u jedinjenju **52** nalazi hidroksimetil grupa. Signali protona i ugljenika iz hidroksimetil grupe su uočeni u 1H odnosno ^{13}C NMR spektrima na δ_H/δ_C 3,44; 3,50/66,4 (**Tabela 4, Slike 116 i 118**). Položaj CH_2OH je određen na osnovu HMBC (H-30/C-29, C-20, Me-29/C-20) i ROESY (H-18, H-19, H-21, H-22, H-29/H-30) korelacija (**Slike 119, 120 i 123**). Na osnovu analize 1H i ^{13}C NMR (HSQC) spektara ovog jedinjenja (**Slike 115-118**) i poređenjem sa NMR spektrima jedinjenja **52**

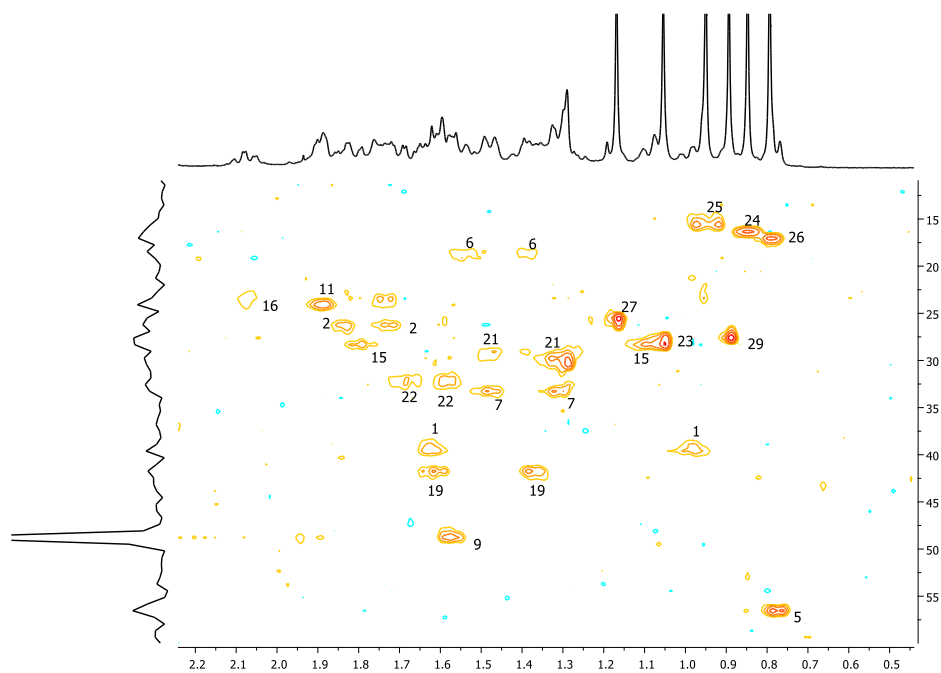
zaključeno je da se u ovom saponinu nalaze iste šećerne jedinice (**Tabela 4**). Iste HMBC i ROESY korelacije kao u jedinjenju **52** su potvrdile veze između aglikona i monosaharidnih jedinica, glikozidnu vezu u disaridnoj jedinici i položaje metil grupa. Prisustvo sulfatne grupe u jedinjenju **53** određeno je iz HRESIMS spektra i na osnovu slaganja hemijskih pomeranja signala protona H-2_{Galp} i ugljenika C-2_{Galp} sa pomeranjima u jedinjenju **52**. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju, pa je zaključeno da je β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oat (**53**) novi bidesmozidični saponin.



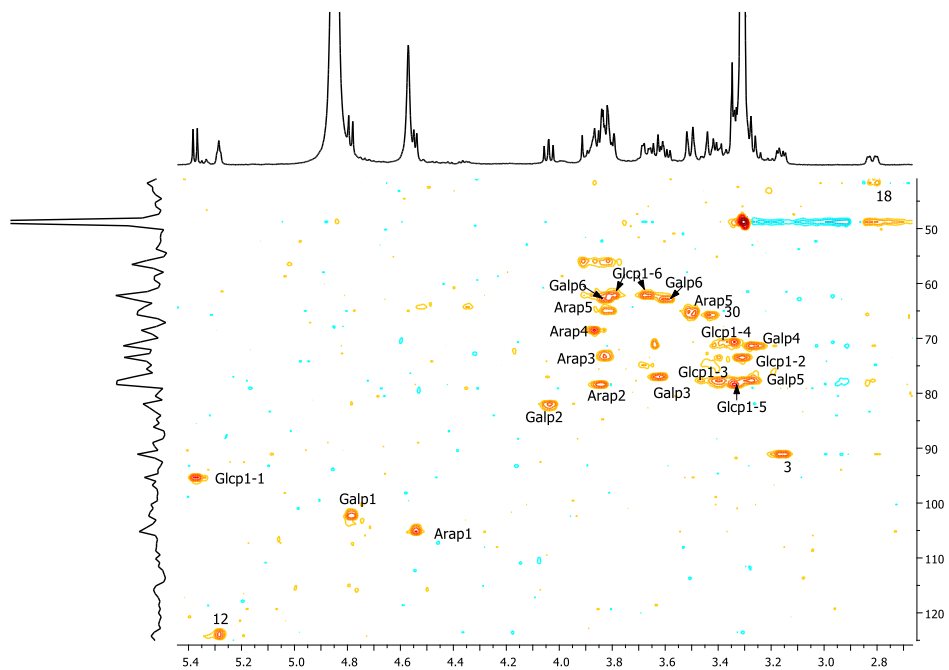
Slika 115. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**) – oblast 0,75-2,90 ppm



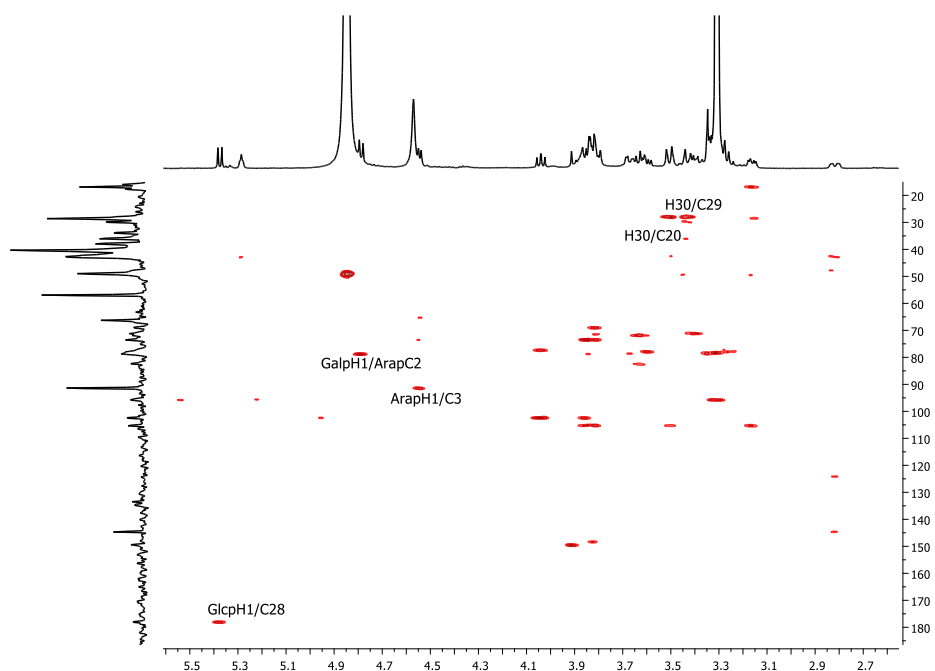
Slika 116. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**) – oblast 3,1-5,4 ppm



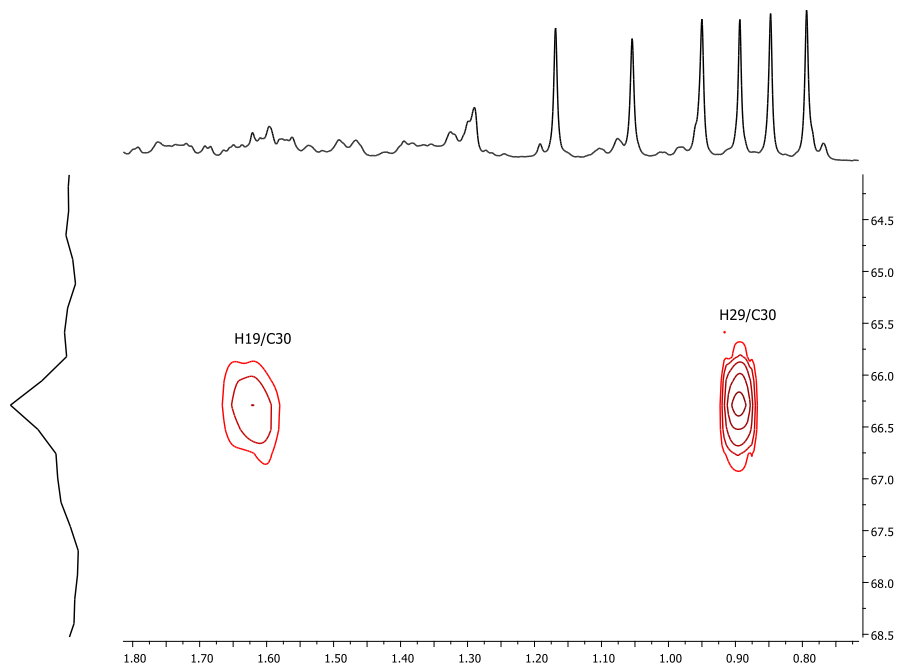
Slika 117. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



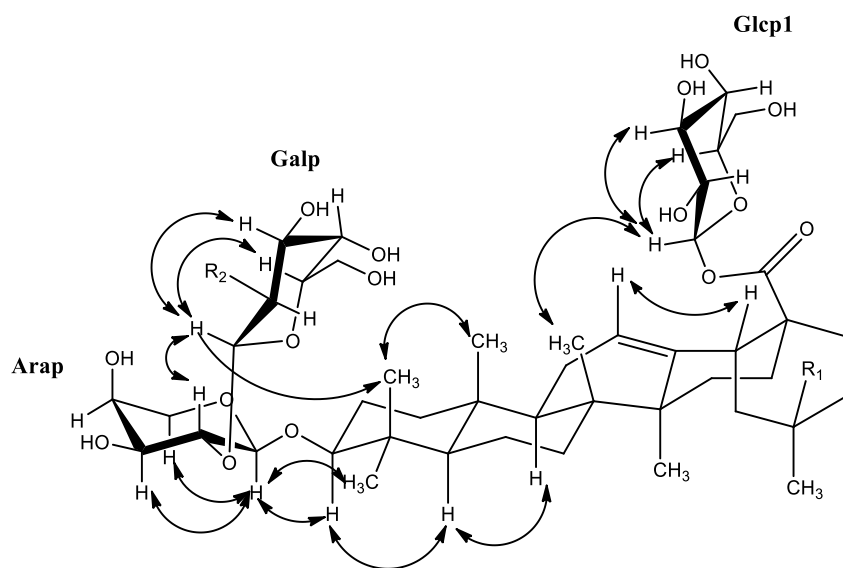
Slika 118. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



Slika 119. Deo HMBC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)

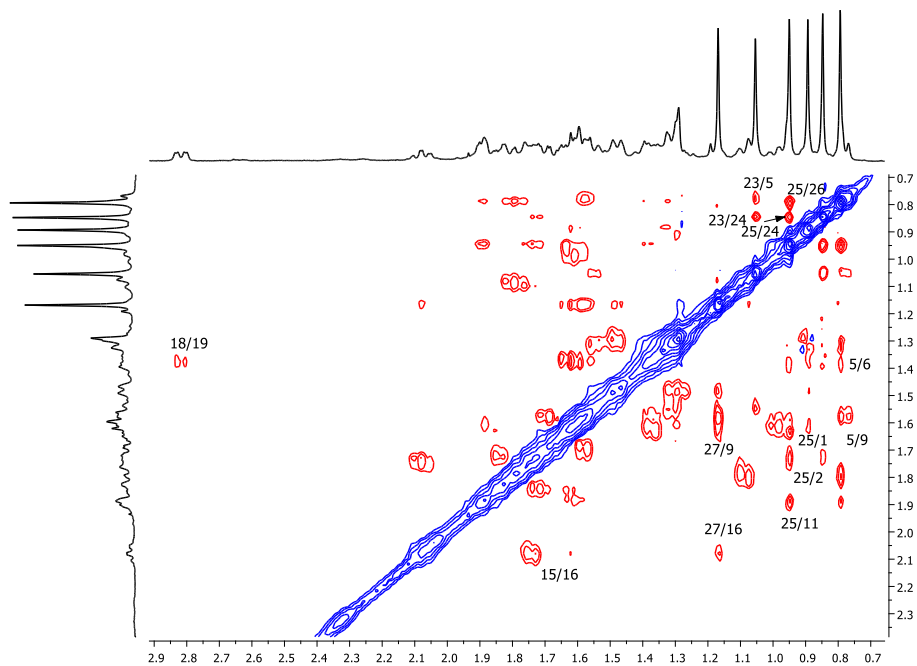


Slika 120. Deo HMBC spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)

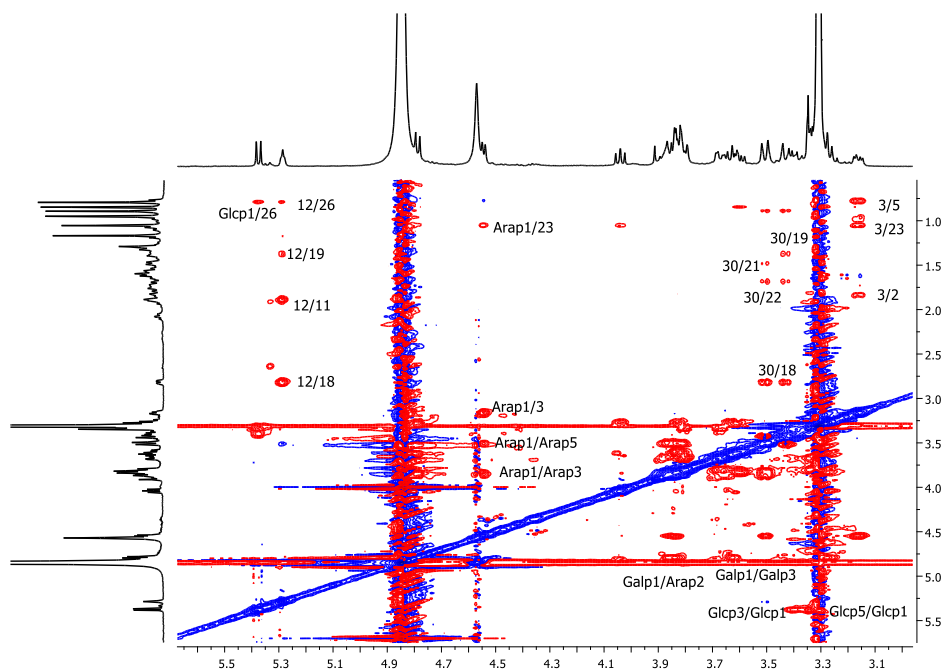


52 $R_1=CHO$, $R_2=OSO_3H$; **53** $R_1=CH_2OH$, $R_2=OSO_3H$; **54** $R_1=CHO$, $R_2=Glc2$

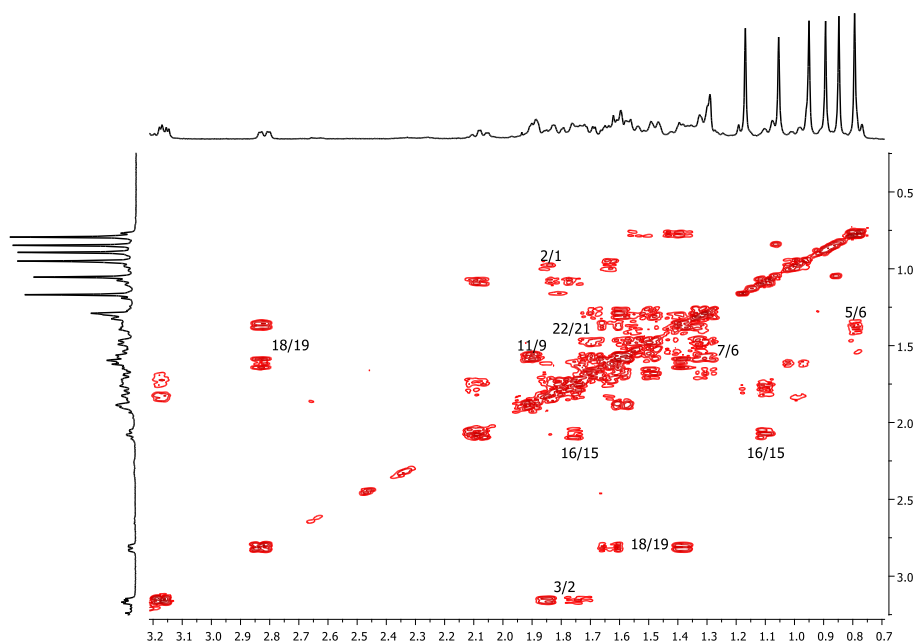
Slika 121. Ključne NOESY korelacije za jedinjenja **52-54**



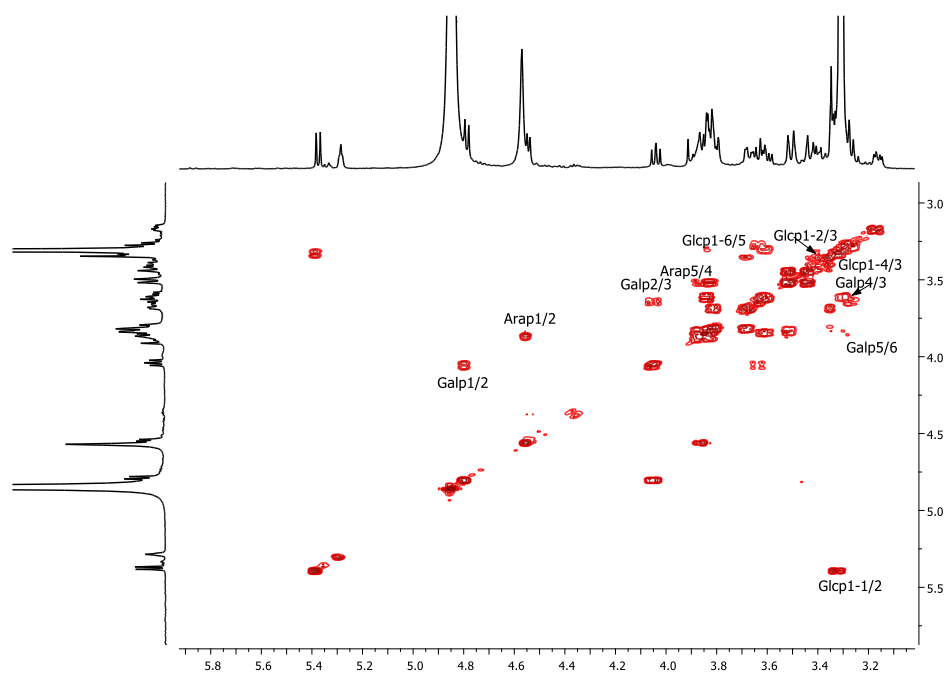
Slika 122. Deo ROESY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



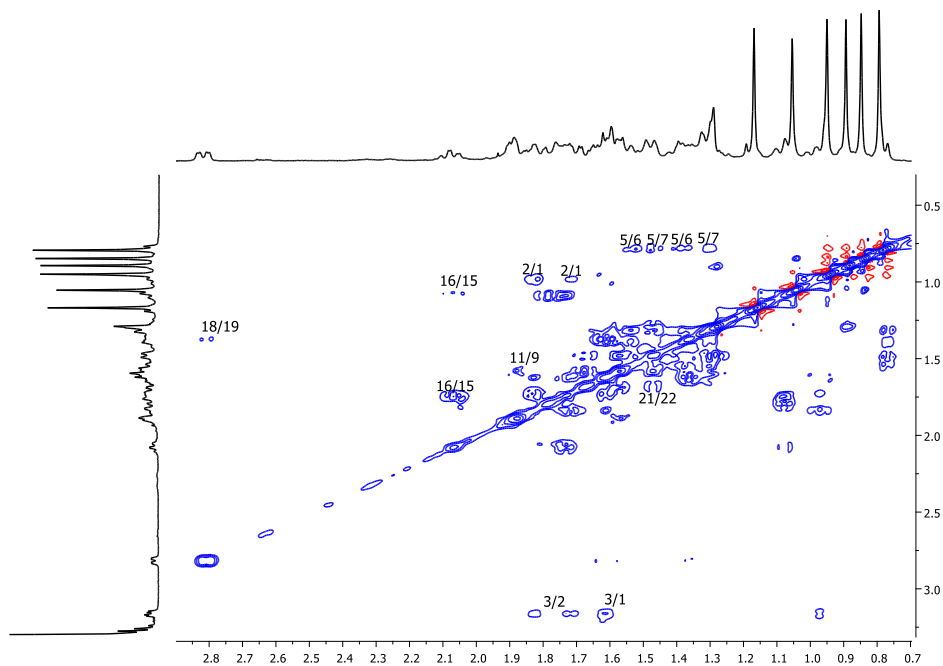
Slika 123. Deo ROESY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



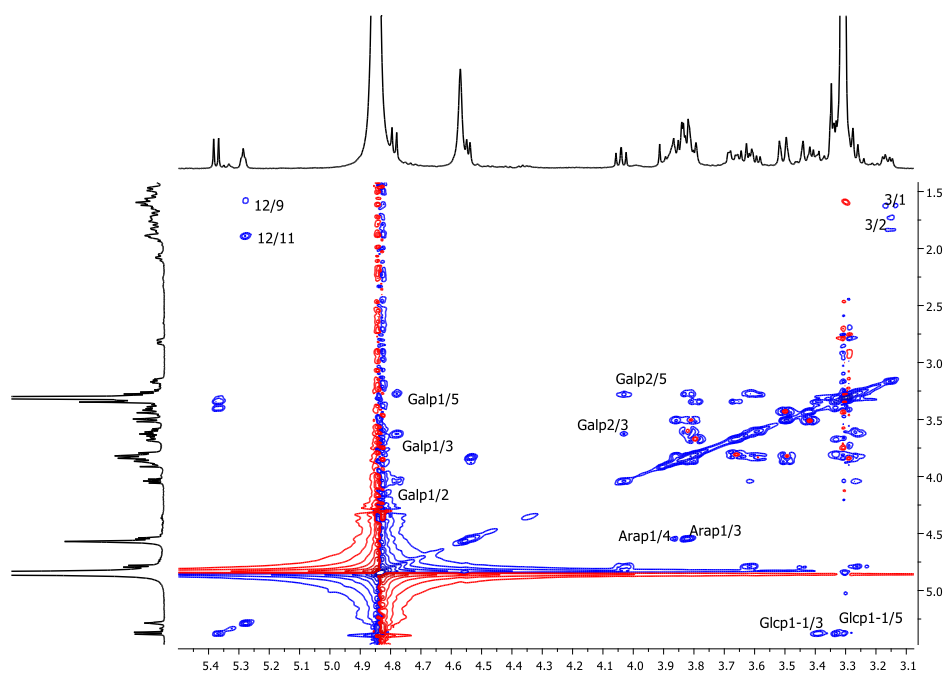
Slika 124. Deo COSY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



Slika 125. Deo COSY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



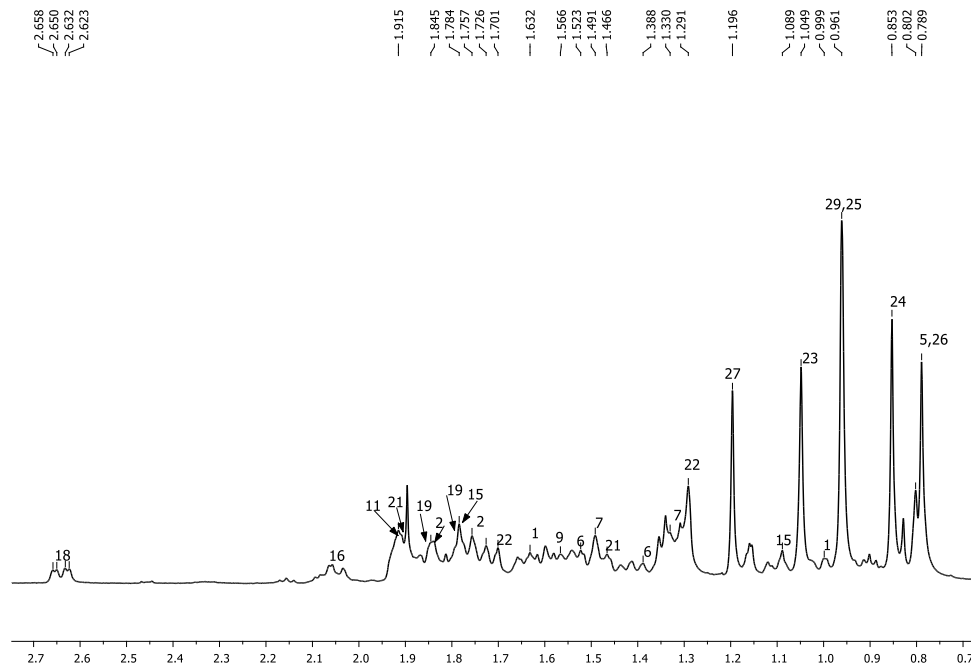
Slika 126. Deo TOCSY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozil-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)



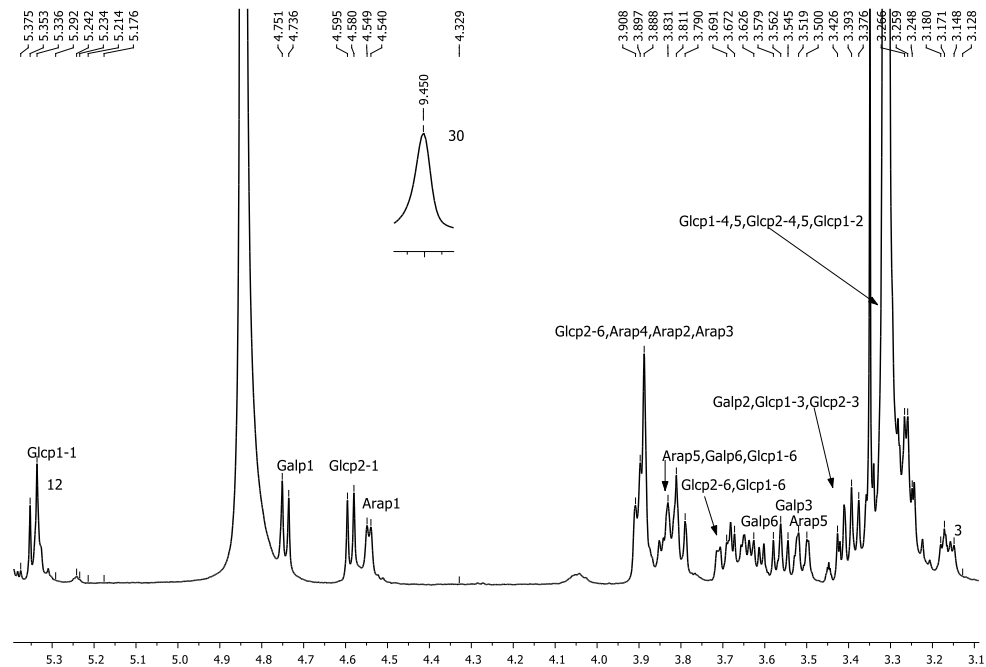
Slika 127. Deo TOCSY spektra β -D-glukopiranozil-3-O-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil)
(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozil-30-hidroksi-olean-12-en-28-oata (**53**)

2.2.6. Određivanje strukture β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (54)

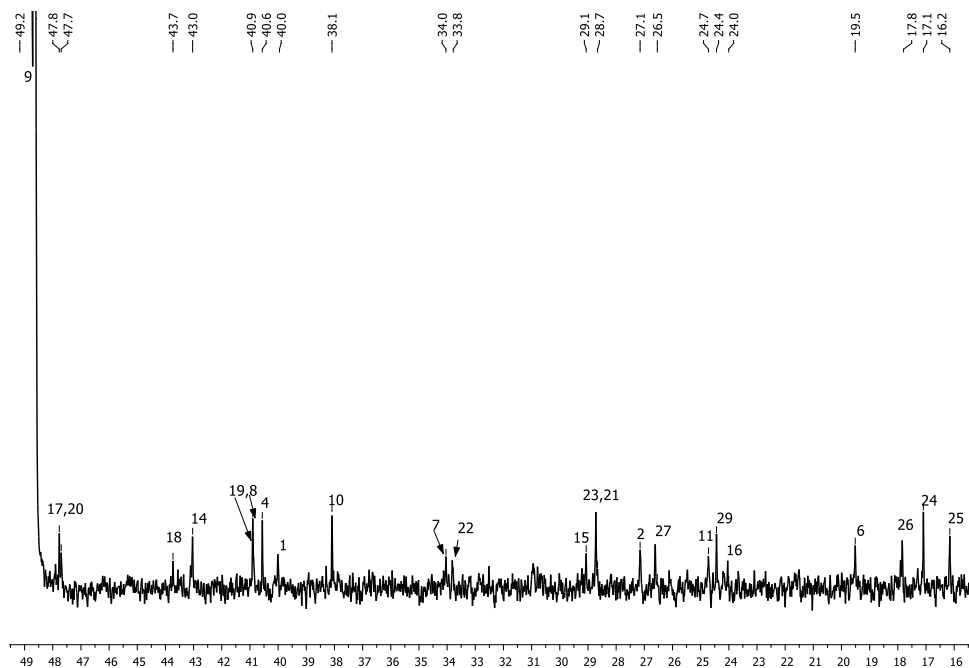
Jedinjenje **54** (Slika **70**) je izolovano u količini od 2,9 mg u obliku belog amorfnog praha. Molekulska formula $C_{53}H_{84}O_{23}$ je dobijena iz HRESIMS spektra na osnovu deprotonovanog molekuskog jona $[M - H]^-$ na m/z 1087,5321. Poređenjem 1H i ^{13}C NMR spektara ovog jedinjenja sa jedinjenjem **52** utvrđeno je da je skelet aglikona isti kao u jedinjenju **52**. Uočeni su singleti (δ_H 0,8-1,20 ppm) koji potiču od 6 metil grupa, dvostruki dublet (δ_H 3,17 ppm) koji se odnosi na kiseonični metinski proton, olefinski proton na δ_H 5,33 ppm kao i singlet aldehidnog protona na δ_H 9,45 ppm (Tabela **4**, Slike **128** i **129**). U ^{13}C spektru signal oksigenovanog ugljenika javlja se na δ_C 91,4 ppm, signali na δ_C 124,7 ppm, 144,4 ppm ukazuju na dvostruku vezu, dok se signali na δ_C 177,5 ppm i 208,0 ppm odnose na estarski odnosno aldehidni karbonilni ugljenik redom (Tabela **4**, Slika **132**). Analizom saharidne oblasti u 1H i ^{13}C NMR spektrima uočena su 4 anomerna signala na δ_H/δ_C 4,54/105,3, 4,74/103,3, 5,34/95,9 i 4,59/106,0 što ukazuje na četiri monosaharidne jedinice (Tabela **4**, Slike **129**, **131** i **132**). U poređenju sa jedinjenjem **52** umesto sulfatne grupe u položaju C-2_{Galp} vezana je dodatna D-glukopiranoza (Glc_{p2}) što je određeno na osnovu HRESIMS spektra i molekulske formule. HMBC korelacije H-1_{Glc_{p2}}/C-2_{Galp} i hemijsko pomeranje H-2_{Galp} na δ_H 3,41 ppm u poređenju sa jedinjenjem **52** potvrdile su položaj Glc_{p2} i glikozidnu vezu D-glukopiranozil(1 \rightarrow 2)-D-galaktopiranoze. Veza između anomernog protona galaktoze i C-2 arabinoze je potvrđena HMBC korelacijom (H-1_{Galp}/C-2_{Arap}) (Slika **136**). Kao i u jedinjenjima **52** i **53** gde je disaharidna jedinica vezana za C-3 aglikona, korelacijama u HMBC spektru H-3/C-1_{Arap} i H-1_{Arap}/C-3 je dokazano da je i trisaharidna jedinica vezana za C-3 aglikona. Izuzev različitog hemijskog pomeranja H-2_{Galp} i C-2_{Galp} svi ostali signali šećera u 1H i ^{13}C NMR spektrima se poklapaju sa onim u jedinjenju **52**. Kako u literaturi nema podataka o ovom jedinjenju zaključeno je da je β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oat (**54**) novi bidesmozidični saponin.



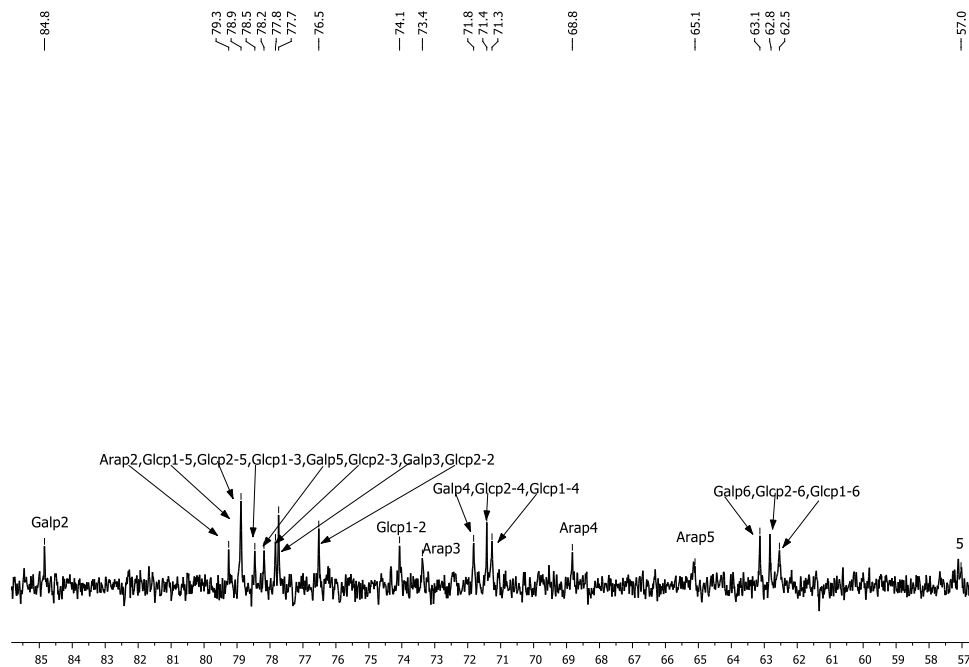
Slika 128. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) – oblast 0,7-2,7 ppm



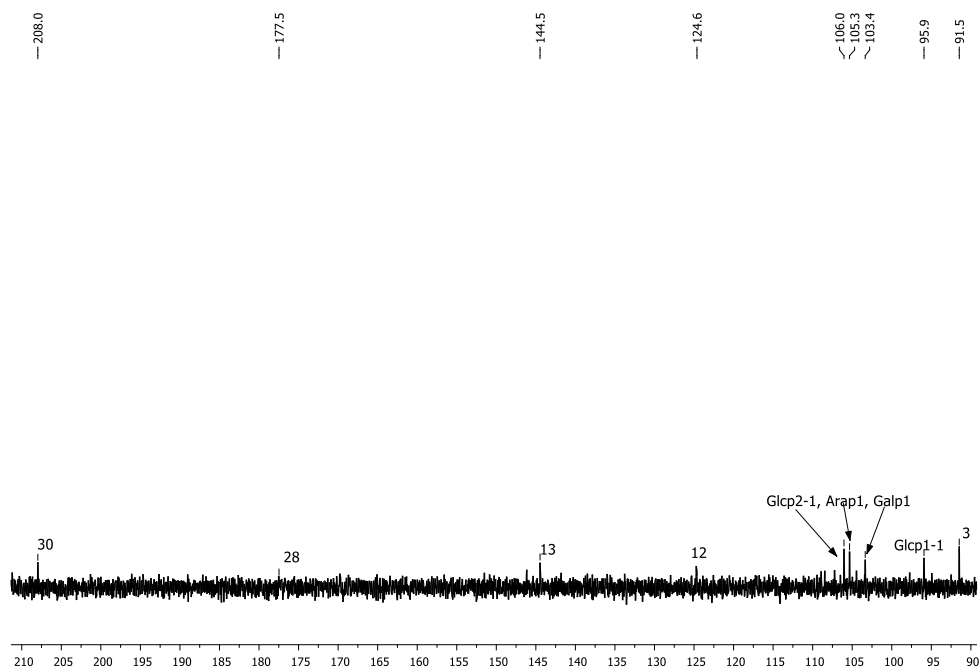
Slika 129. ^1H NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) – oblast 3,1-5,35 ppm



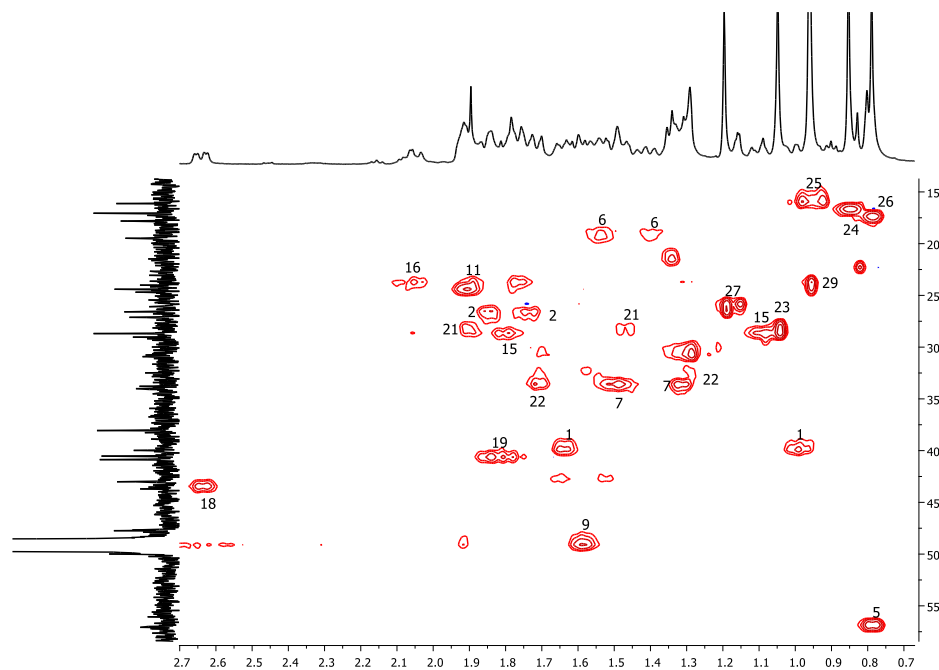
Slika 130. ^{13}C NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) – oblast 16-49 ppm



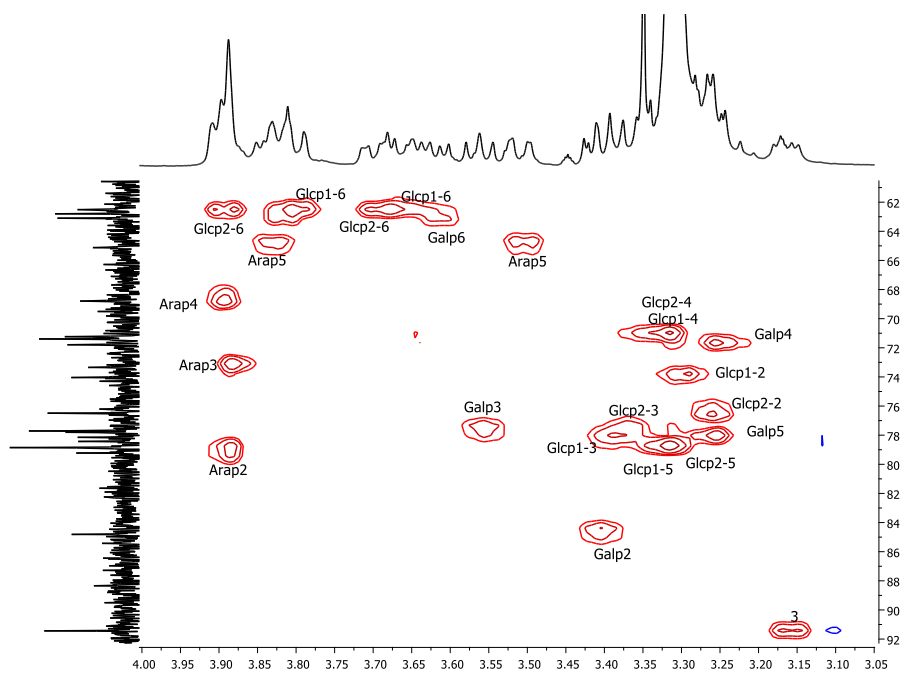
Slika 131. ^{13}C NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) – oblast 57-85 ppm



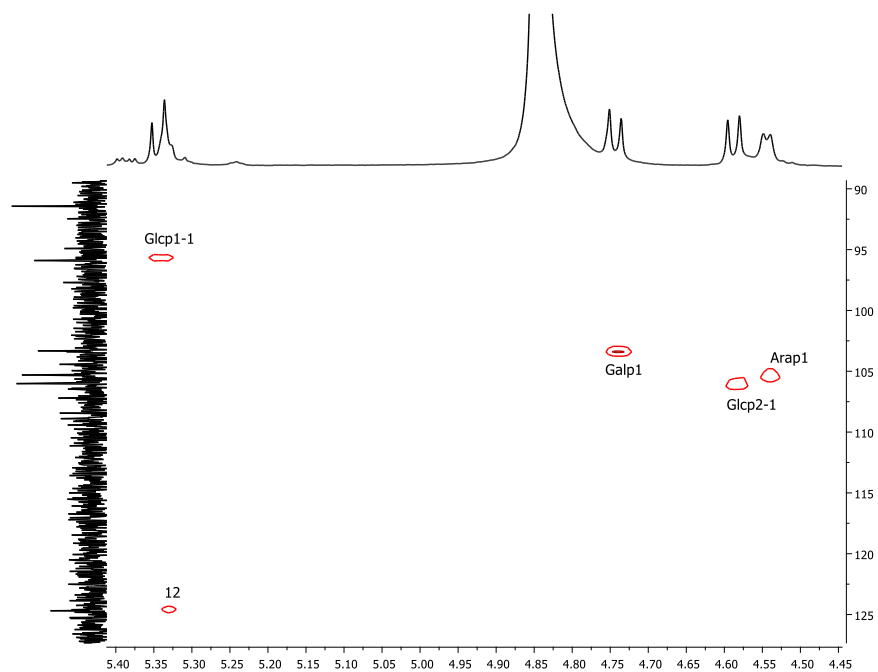
Slika 132. ^{13}C NMR spektar β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) – oblast 90-210 ppm



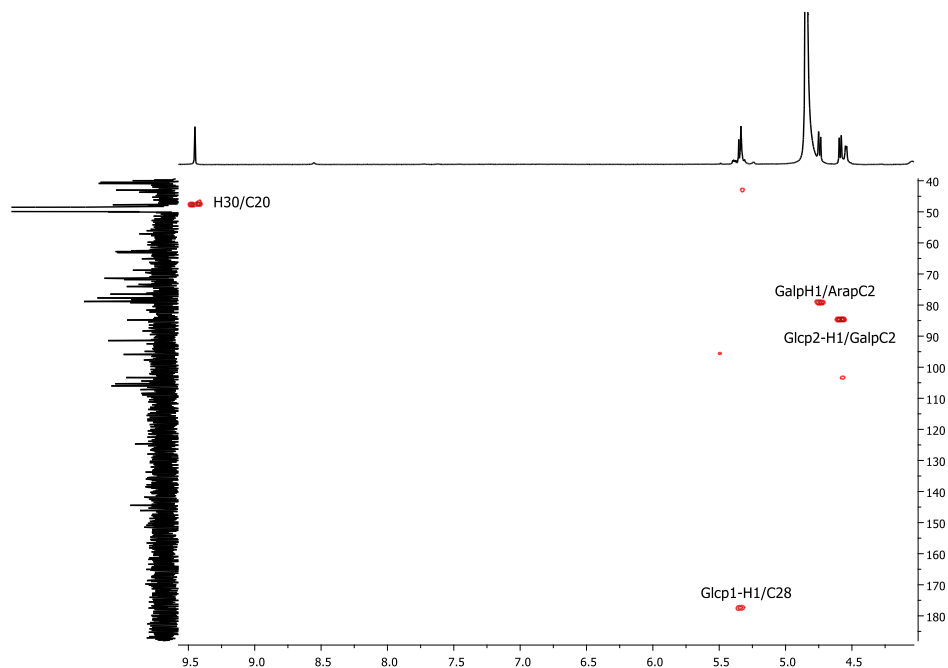
Slika 133. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) koji se odnosi na aglikon



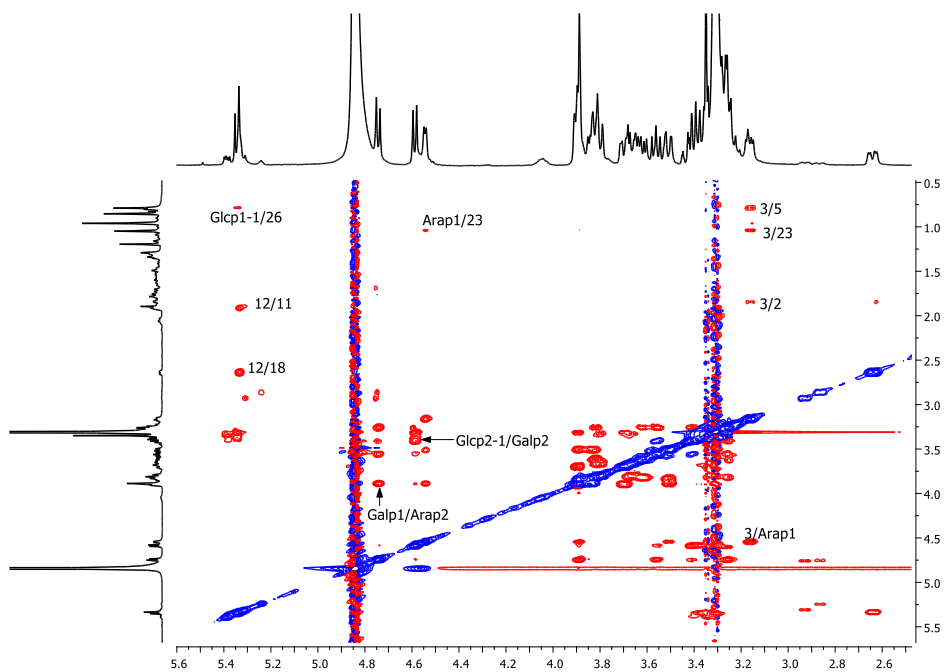
Slika 134. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**) koji se odnosi na šećerne jedinice



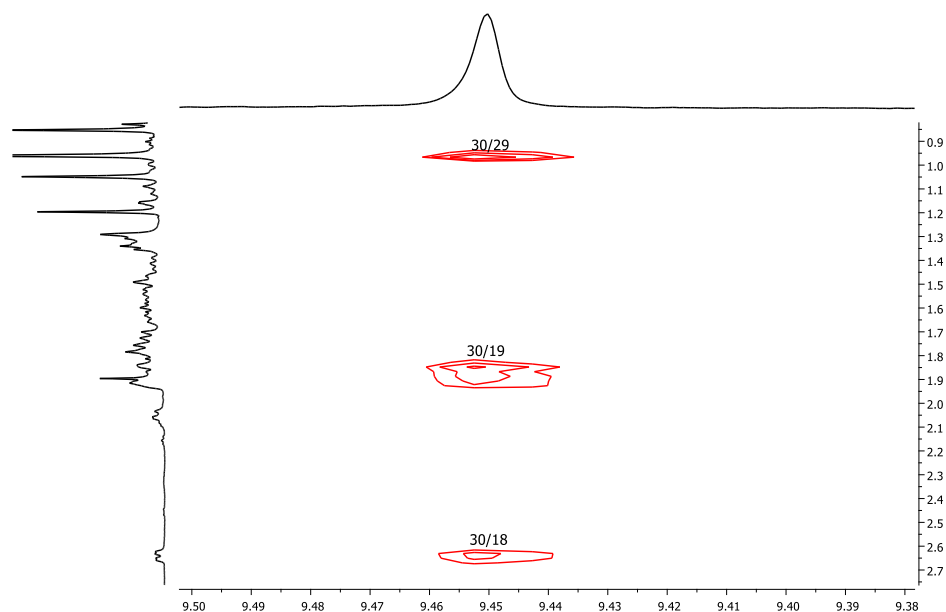
Slika 135. Deo HSQC spektra β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**)



Slika 136. Ključne korelacije u HMBC spektru β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozil-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**)



Slika 137. Deo ROESY spektra β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozil-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**)



Slika 138. Ključne korelacije u ROESY spektru β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**54**)

Tabela 4. ¹³C i ¹H NMR podaci za jedinjenja **52-54** (125,80 MHz za ¹³C i 500,26 MHz za ¹H, Metanol-*d*4)

C/H	52		53		54	
	δ_C	δ_H (J u Hz) ^a	δ_C	δ_H (J u Hz) ^a	δ_C	δ_H (J u Hz) ^a
1	40,0	1,00 m, 1,63 m	39,8	1,00 m, 1,63 m	40,0	1,00 m, 1,63 m
2	27,1	1,73 m, 1,83 m	28,4	1,73 m, 1,84 m	27,1	1,74 m, 1,85 m
3	91,2	3,16 dd (4,3, 11,9)	91,5	3,17 dd (4,5, 11,5)	91,4	3,17 dd (4,5, 11,5)
4	40,5	-	40,2	-	40,5	-
5	57,1	0,78 m	57,0	0,77 m	57,1	0,80 m
6	19,5	1,39 m, 1,54 m	18,5	1,40 m, 1,53 m	19,5	1,40 m, 1,52 m
7	34,0	1,32 m, 1,49 m	33,9	1,33 m, 1,49 m	34,0	1,32 m, 1,49 m
8	40,9	-	40,8	-	40,9	-
9	49,2	1,59 m	49,0	1,57 m	49,1	1,58 m
10	38,0	-	38,1	-	38,1	-
11	24,7	1,91 m	24,5	1,88 m	24,7	1,91 m
12	124,7	5,33 m	124,3	5,30 t (3,0)	124,7	5,33 m
13	144,5	-	144,6	-	144,4	-
14	43,0	-	42,9	-	43,0	-
15	29,0	1,10 m, 1,75 m	28,7	1,08 m, 1,74 m	29,1	1,09 m, 1,79 m
16	24,0	1,79 m, 2,06 m	24,1	2,08 m	24,0	2,06 m
17	47,7	-	47,8	-	47,8	-
18	43,7	2,64 dd (13,3, 4,9)	42,2	2,82 dd (13,5, 4,5)	43,7	2,64 dd (13,5, 4,5)
19	40,9	1,80 m, 1,85 m	42,8	1,38 m, 1,62 m	40,9	1,79 m, 1,85 m
20	47,8	-	36,1	-	47,7	-
21	28,6	1,49 m, 1,90 m	29,9	1,31 m, 1,49 m	28,7	1,47 m, 1,91 m
22	33,8	1,66 m, 1,73 m	32,7	1,59 m, 1,69 m	33,8	1,30 m, 1,69 m

C/H	52		53		54	
	δ_C	δ_H (J u Hz) ^a	δ_C	δ_H (J u Hz) ^a	δ_C	δ_H (J u Hz) ^a
23	28,7	1,06 s	28,4	1,05 s	28,7	1,05 s
24	17,1	0,85 s	16,7	0,85 s	17,1	0,85 s
25	16,2	0,95 s	15,8	0,95 s	16,1	0,95 s
26	17,8	0,78 s	17,7	0,80 s	17,8	0,80 s
27	26,6	1,19 s	26,3	1,17 s	26,6	1,20 s
28	177,5	-	178,1	-	177,5	-
29	24,4	0,96 s	28,0	0,89 s	24,4	0,96 s
30	208,0	9,45 s	66,4	3,44 m, 3,50 m	207,9	9,45 s
Arap ^b						
1	105,4	4,55 d (6,2)	105,0	4,55 d (6,2)	105,3	4,54 d (6,2)
2	79,4	3,85 m	78,6	3,85 m	79,2	3,89 m
3	73,5	3,83 m	73,3	3,83 m	73,4	3,88 m
4	69,3	3,87 m	68,8	3,87 m	68,8	3,90 m
5	65,3	3,51 dd (2,0, 12,2), 3,83 m	65,1	3,51 dd (2,0, 12,2), 3,82 m	65,1	3,51 dd (2,0, 12,2) 3,83 m
Galp ^c						
1	102,5	4,79 d (7,6)	102,3	4,79 d (7,6)	103,3	4,74 d (7,6)
2	82,9	4,04 dd (7,9, 8,8)	82,4	4,04 dd (7,9, 8,8)	84,8	3,41 m
3	77,3	3,63 t (8,8)	77,2	3,63 t (8,8)	77,7	3,56 t (8,8)
4	71,7	3,26 m	71,7	3,26 m	71,8	3,25 m
5	78,0	3,28 m	77,8	3,29 m	78,2	3,26 m
6	62,9	3,61 dd (6,2, 11,8) 3,82 dd (6,2, 11,8)	63,0	3,60 dd (6,2, 11,8) 3,83 (6,2, 11,8)	63,1	3,62 dd (6,2, 11,8) 3,82 dd (6,2, 11,8)
Glc1 ^d						
1	95,9	5,35 d (8,0)	95,6	5,38 d (8,0)	95,9	5,34 d (8,0)
2	74,0	3,30 t	73,8	3,32 m	74,1	3,30 m
3	78,4	3,39 t (9,0)	78,2	3,40 t (9,0)	78,4	3,39 t (9,0)
4	71,2	3,33 m	71,0	3,34 m	71,2	3,33 m
5	78,8	3,33 m	78,5	3,34 m	78,9	3,33 m
6	62,5	3,67 dd (2,0, 12,2) 3,79 m	62,3	3,67 dd (2,0, 12,2) 3,81 m	62,5	3,67 dd (2,0, 12,2) 3,80 m
Glc2 ^e						
1					106,0	4,59 d (7,6)
2					76,5	3,26 m
3					77,8	3,37 t (9,0)
4					71,4	3,31 m
5					78,9	3,31 m
6					62,8	3,69 m 3,90 dd (2,0, 12,2)

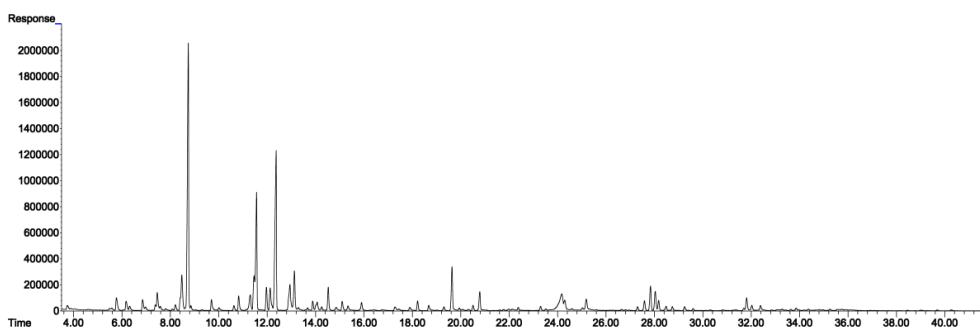
^aJ konstanta spreznja u Hz ^bArap – arabinopiranozil ^cGalp – galaktopiranozil ^dGlc1 – glukopiranozil 1 ^eGlc2 – glukopiranozil 2

2.3. Etarsko ulje biljke *Artemisia santonicum*

Etarsko ulje *A. santonicum* je dobijeno hidroddestilacijom na aparaturi po Klevendžeru. Iz 620 g osušenog biljnog materijala, dobijeno je ukupno 1331 mg ulja žute boje, što iznosi 0,21% (w/w) u odnosu na suvi biljni materijal. Kvalitativna i kvantitativna analiza sastava etarskog ulja urađena je pomoću gasne hromatografije sa plamenojonizujućim detektorom (GC/FID) i kombinacije gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS). Postupak izolovanja i hromatografisanja etarskog ulja opisan je u Eksperimentanom delu.

Identifikacija svih jedinjenja je određena poređenjem masenih spektara jedinjenja sa spektrima iz NIST (verzija 11) i Adams (verzija 4) biblioteka masenih spektara i poređenjem retencionih indeksa sa retencionim indeksima iz Adams biblioteke. Retencioni indeksi analiziranih jedinjenja dobijeni su na osnovu retencionih indeksa *n*-alkana serije (C8–C36) pod istim hromatografskim uslovima.¹⁴³

Zastupljenost komponenti je izražena kao relativni procenti površina pika u FID hromatogramu (**Slika 139**). Dobijeni rezultati su dati u **Tabeli 5**.



Slika 139. GC/FID hromatogram etarskog ulja *Artemisia santonicum*

Tabela 5. Sastav^a etarskog ulja *Artemisia santonicum*

	Jedinjenje	RI^b	Rt^c(min)	Sadržaj %^a
1	1,2,5,5-tetrametil-1,3-ciklopentadien	817	3,741	0,4
2	ni	868	4,599	0,1
3	triciklen	906	5,489	0,2
4	α -tujen	914	5,579	0,2
5	α -pinen	921	5,771	1,1
6	kamfen	936	6,171	0,8
7	tuja-2,4(10)-dien	942	6,315	0,4
8	sabinen	966	6,852	0,8
9	β -pinen	971	6,972	0,3
10	1,8-dehidro cineol	985	7,379	0,3
11	mezitilen	991	7,457	1,3
12	jomogi alkohol	996	7,580	0,4
13	α -felandren	999	7,808	0,2
14	ni	1006	8,081	0,1
15	α -terpinen	1010	8,206	0,5
16	1,2,4-trimethylbenzen	1015	8,425	0,6
17	<i>p</i> -cimen	1016	8,473	2,8
18	1,8-cineol	1022	8,739	18,8
19	santolina alkohol	1026	8,848	0,3
20	ni	1036	9,300	0,1
21	γ -terpinen	1046	9,698	0,9
22	<i>cis</i> -sabinen hidrat	1056	10,006	0,3
23	artemisia alkohol	1070	10,623	0,4
24	ni	1074	10,821	0,9
25	ni	1082	11,137	0,1
26	linalool	1091	11,298	1,6
27	filifolon	1094	11,455	2,6
28	<i>cis</i> -tujon	1097	11,559	8,4
29	<i>trans</i> -tujon	1110	11,969	1,6
30	isoforon	1111	12,123	2,0
31	hrizantenon	1117	12,367	13,3
32	<i>trans</i> -sabinol	1131	12,938	2,9
33	kamfor	1136	13,124	3,0
34	<i>p</i> -menta-1,7-dien-8-ol	1140	13,290	0,4
35	ni	1147	13,583	0,1
36	sabina keton	1150	13,669	0,2
37	pinokarvon	1155	13,881	0,6
38	borneol	1160	14,014	0,2
39	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1155	14,063	0,5
40	santolinil acetat	1159	14,253	0,2

	Jedinjenje	RI^b	Rt^c(min)	Sadržaj %^a
41	terpinen-4-ol	1171	14,522	1,5
42	tuj-3-en-10-al	1178	14,848	0,4
43	α -terpineol	1185	15,098	0,7
44	mirtenal	1191	15,338	0,4
45	verbenon	2004	15,898	0,8
46	kumin aldehid	1237	17,278	0,4
47	karvon	1240	17,441	0,2
48	piperiton	1250	17,891	0,3
49	<i>cis</i> -hrizantenil acetat	1258	18,215	0,7
50	<i>p</i> -menta-1,8-dien-3-on	1268	18,673	0,5
51	ni	1276	19,013	0,1
52	bornil acetat	1277	19,303	0,3
53	<i>trans</i> -sabinil acetat	1285	19,636	3,3
54	terpinen-4-ol acetat	1296	19,940	0,2
55	karvakrol	1300	20,076	0,2
56	ni	1305	20,307	0,1
57	ni	1310	20,505	0,4
58	filifolid A	1316	20,783	1,4
59	ni	1319	20,935	0,1
60	ni	1334	21,607	0,1
61	piperitenon	1338	21,759	0,1
62	izogeranilna kiselina	1343	21,993	0,2
63	α -terpinil acetat	1345	22,127	0,1
64	ni	1348	22,205	0,1
65	ni	1352	22,371	0,2
66	eugenol	1359	22,504	t
67	α -kopaen	1368	23,296	0,3
68	ni	1373	23,510	0,1
69	β -burbonen	1381	23,689	0,1
70	ni	1391	24,172	3,3
71	(<i>Z</i>)-Jasmon	1394	24,293	1,0
72	ni	1401	24,587	0,1
73	ni	1411	25,028	0,2
74	(<i>E</i>)-kariofilen	1415	25,184	1,2
75	α -humulen	1449	26,641	0,1
76	(<i>E</i>)- β -farnezen	1453	26,803	t
77	dehidro sesvicineol	1464	27,303	0,3
78	ni	1471	27,586	0,6
79	germakren D	1479	27,837	1,8
80	β -selinen	1482	28,033	1,6
81	hrizantenil pentanoat	1486	28,174	0,8
82	biciklogermakren	1494	28,480	0,4
83	ni	1501	28,742	0,3

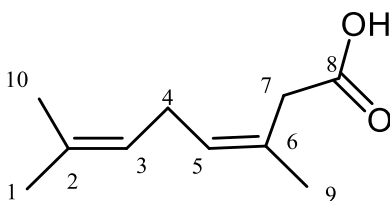
	Jedinjenje	RI ^b	Rt ^c (min)	Sadržaj % ^a
84	ni	1512	29,247	0,3
85	δ -kadinen	1516	29,597	0,1
86	ni	1534	30,304	0,1
87	ni	1550	30,818	0,1
88	ni	1562	31,359	0,1
89	ni	1571	31,691	0,2
90	spatulenol	1574	31,810	1,1
91	kariofilen oksid	1580	32,023	0,5
92	ni	1587	32,382	0,6
93	ledol	1599	32,842	0,1
94	ni	1604	33,073	0,1
95	ni	1607	33,172	0,1
96	ni	1609	33,282	0,1
97	ni	1619	33,636	0,1
98	ni	1624	33,855	0,2
99	γ -eudesmol	1627	33,952	0,1
100	ni	1634	34,183	0,1
101	<i>epi</i> - α -murolol	1638	34,359	0,1
102	α -kadinol i ni	1651	34,824	0,1
103	ni	1655	34,962	0,1
104	ni	1662	35,251	0,1
105	2,4-dimetiletar-floroacetofenon	1671	35,552	0,1
106	ni	1672	35,633	0,1
107	mustakon	1675	35,748	0,1
108	ni	1677	35,883	0,1
109	ni	1764	39,008	0,1
110	ni	1782	39,684	0,1
111	ni	1798	40,263	0,1

^aRelativni procenat površine pika u FID hromatogramu; ^bRI: Kovačevi retencioni indeksi na nepolarnoj HP-5 MSI koloni; ^cRt: Retenciono vreme; t (jedinjenja prisutna u količini manjoj od 0,1 %); ni: neidentifikovana jedinjenja

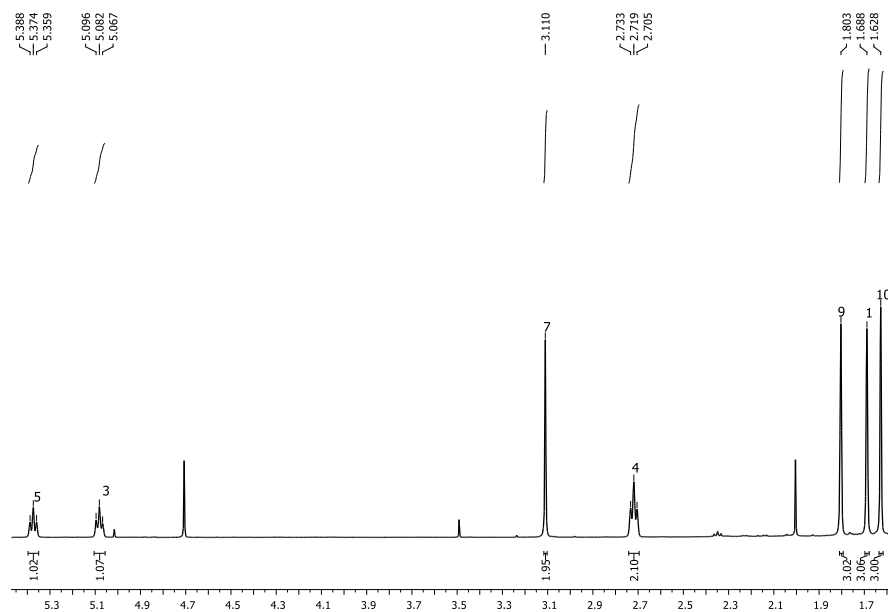
Identifikovano je ukupno 75 komponenti, što predstavlja 90,1% etarskog ulja biljke. Najzastupljenija klasa jedinjenja su oksigenovani monoterpeni (67,5%). Iz ove klase najzastupljeniji su 1,8-cineol (18,8%), hrizantenon (13,3%), *cis*-tujon (8,4%), *trans*-sabinil acetat (3,3%) i kamfor (3,3%). Od ostalih ugljovodonika prisutni su: monoterpeni (8,2%), seskviterpeni (5,6%), oksigenovani seskviterpeni (3,3%) i normonoterpeni (2,6%). Za etarsko ulje *A. santonicum* karakterističan je visok sadržaj oksigenovanih monoterpena, ali su kao glavne komponente ulja identifikovani kamfor i *cis*-tujon.^{53,102}

2.3.1. Određivanje strukture izogeranilne kiseline (55)

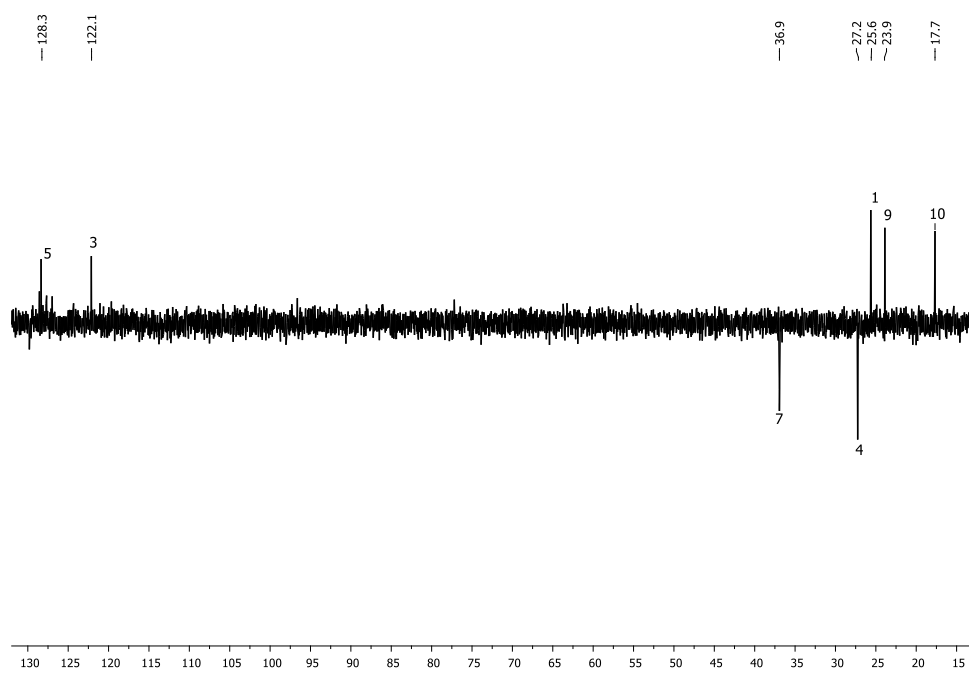
Etarsko ulje je frakcionisano „dry flash“ hromatografijom na koloni silika gela (postupak frakcionisanja dat je u Eksperimentalnom delu) nakon čega je izolovano jedinjenje **55** u količini od 1,15 mg. Struktura jedinjenja (**Slika 140**) određena je pomoću 1D (^1H , DEPT) i 2D NMR spektroskopije (COSY, NOESY, HMBC, HSQC). U ^1H NMR spektru uočeni su sledeći signali: tri singleta na hemijskim pomeranjima δ_{H} 1,63, 1,69, 1,80 ppm koji ukazuju na prisustvo tri metil grupe (H-10, H-1, H-9), dva tripleta na δ_{H} 5,08 ppm (H-3) i 5,37 ppm (H-5) sa konstantom sprezanja $J = 7,2$ Hz koji pripadaju olefinskim protonima, triplet na δ_{H} 2,72 ppm (H-4) i singlet na δ_{H} 3,11 ppm (H-7) koji potiču od dva metilenska protona (**Tabela 6, Slika 141**). Korelacije u HSQC spektru su omogućile određivanje hemijskih pomeranja protonizovanih ugljenikovih atoma (**Tabela 6 i Slika 143**). Položaj kvaternernih ugljenikovih atoma (C-2, C-6 i C-8) je utvrđen na osnovu HMBC korelacija protona H-10, H-1 i H-4 sa ugljenikom C-2, protona H-4 i H-9 sa ugljenikom C-6 i protona H-7 sa ugljenikom C-8 (**Slike 146 i 147**). NOESY korelacije H-4/H-7 i H-5/H-9 su ukazale na *Z* konfiguraciju $\Delta^{5,6}$ dvostruke veze, a korelacija H-4/H-10 ukazuje na *Z* konfiguraciju $\Delta^{2,3}$ dvostruke veze (**Slika 144**). Ostale HMBC i NOESY korelacije prikazane su u **Tabeli 6**. Poređenjem sa literaturnim podacima utvrđeno je da je jedinjenje **55** retko ispitivano jedinjenje prisutno samo u nekim etarskim uljima i poznato je u literaturi kao izogeranilna kiselina.^{144,145}



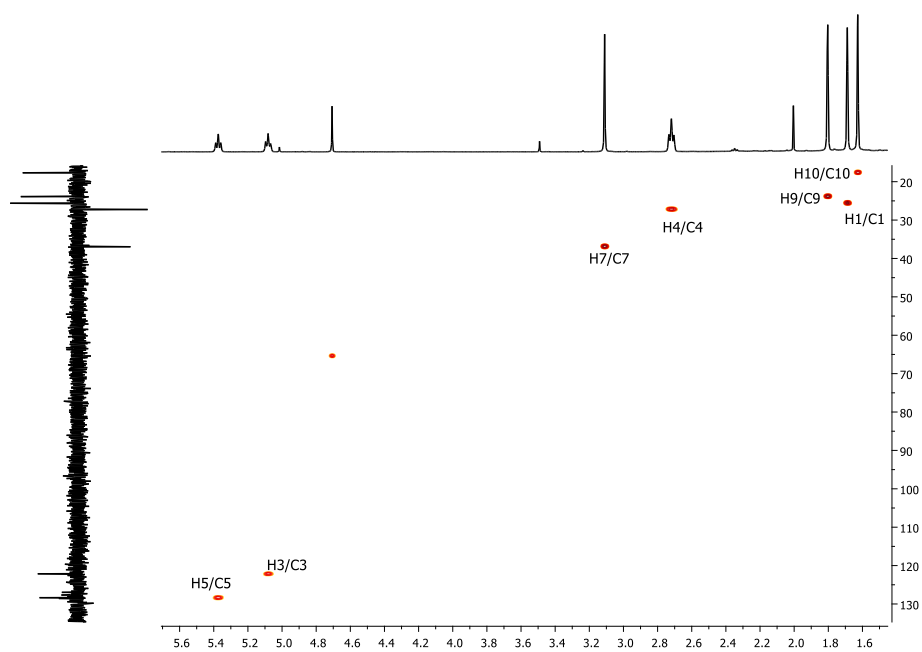
Slika 140. Strukturna formula izogeranilne kiseline (**55**)



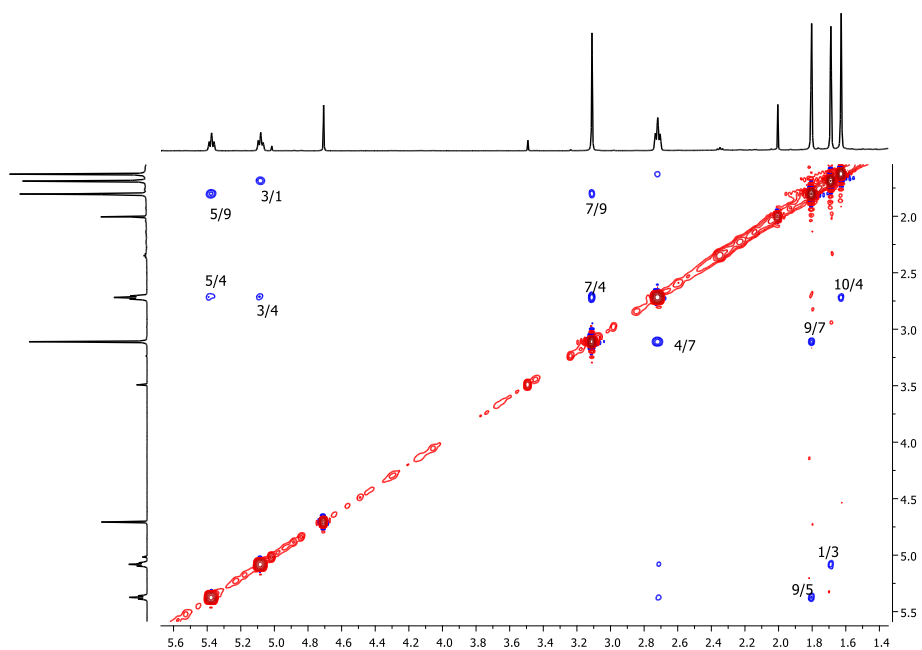
Slika 141. ^1H NMR spektar izogeranilne kiseline (**55**)



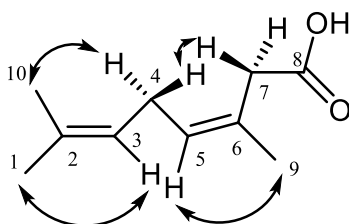
Slika 142. DEPT spektar izogeranilne kiseline (**55**)



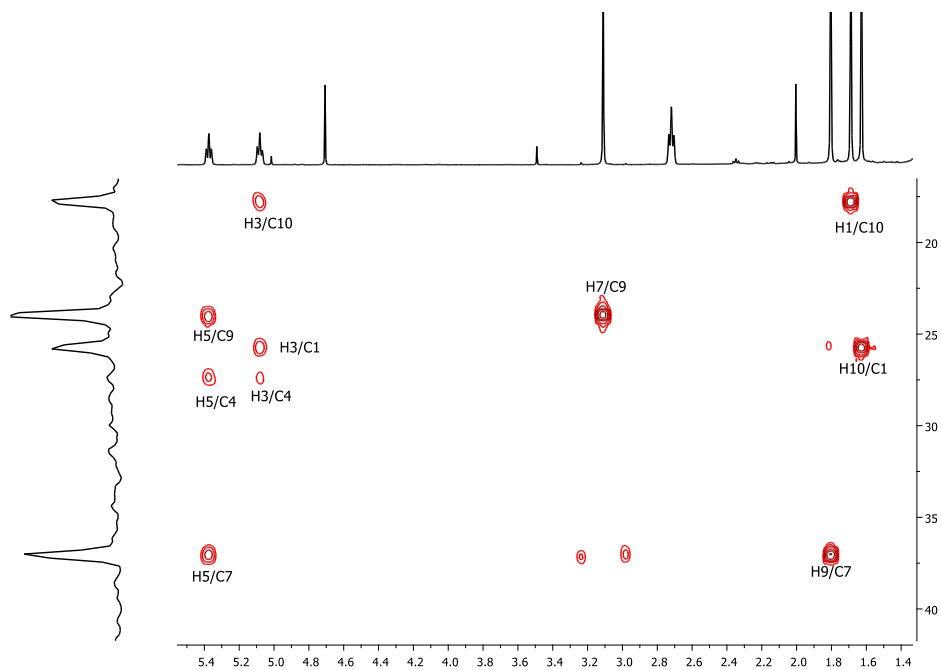
Slika 143. HSQC spektar izogeranilne kiseline (55)



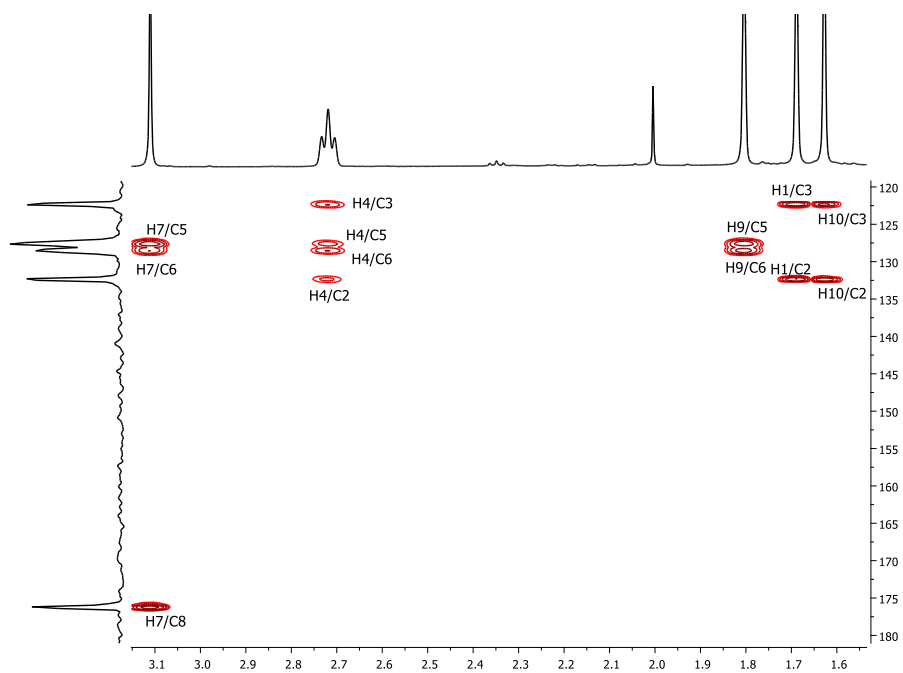
Slika 144. NOESY spektar izogeranilne kiseline (55)



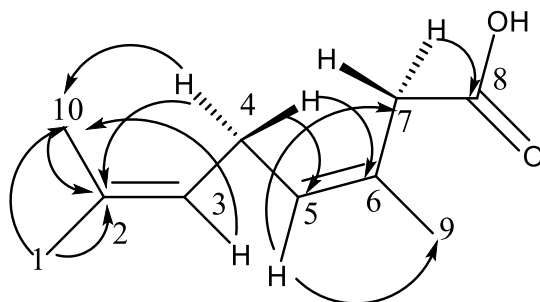
Slika 145. Ključne NOESY korelacije izogeranilne kiseline (55)



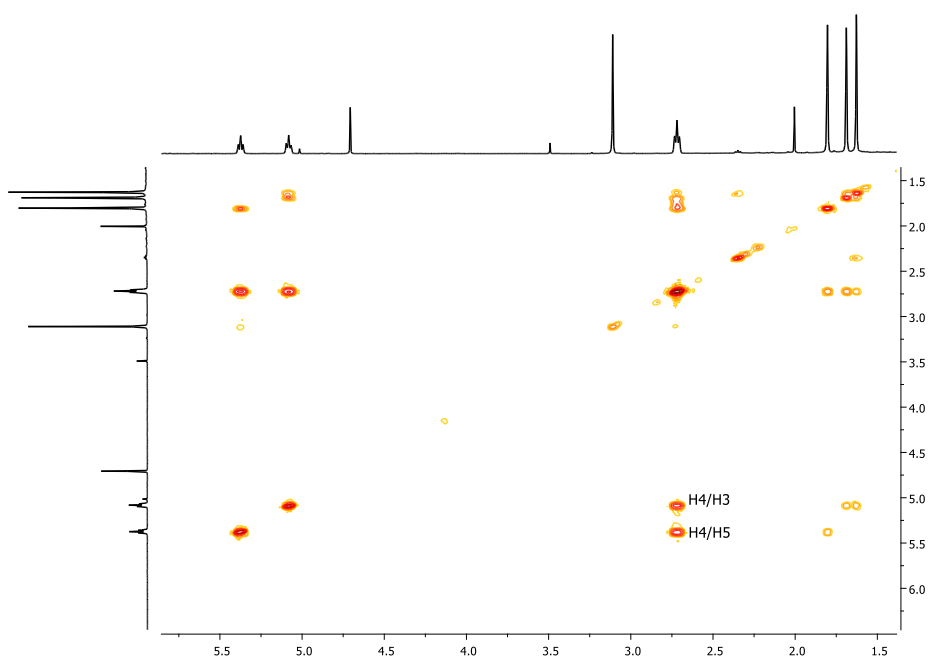
Slika 146. Deo HMBC spektra izogeranilne kiseline (55)



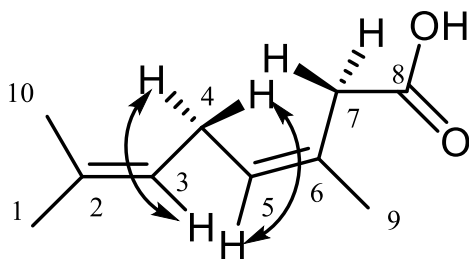
Slika 147. Deo HMBC spektra izogeranilne kiseline (55)



Slika 148. Ključne HMBC korelacije izogeranilne kiseline (55)



Slika 149. COSY spektar izogeranilne kiseline (55)

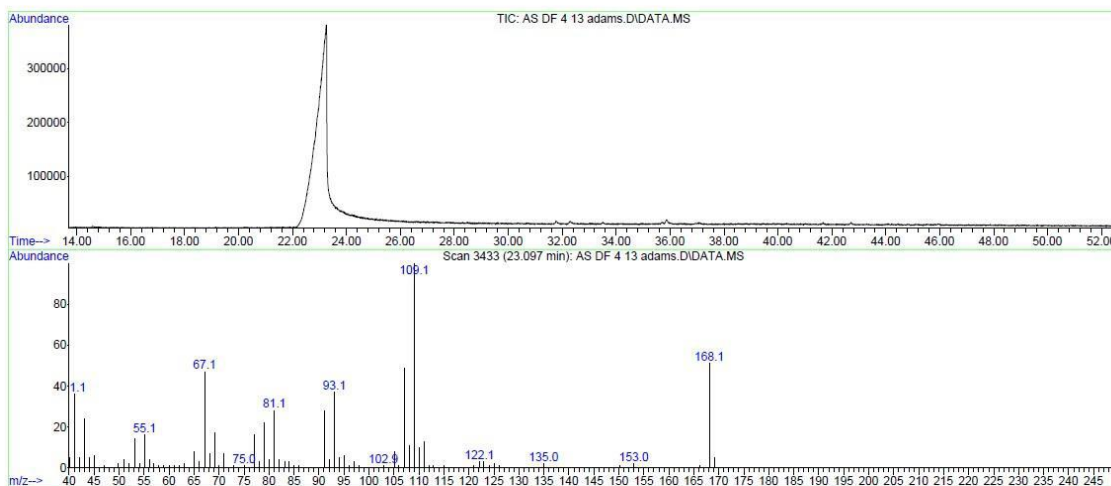


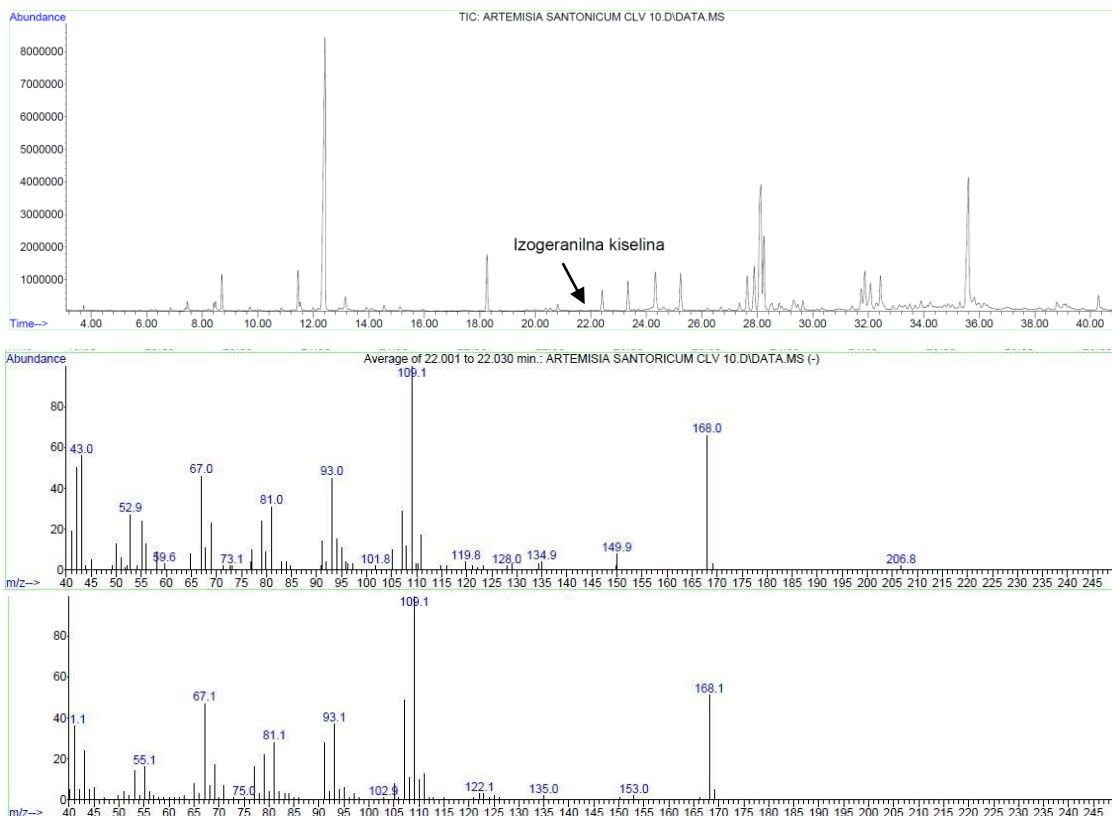
Slika 150. Ključne COSY korelacije izogeranilne kiseline (55)

Tabela 6. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenje **55** (125,80 MHz za ^{13}C i 500,26 MHz za ^1H , CDCl_3)

	^1H , δ (mult, J u Hz)	^{13}C , δ	NOESY	HMBC
1	1,69 s	25,6	H-3	C-10
2	/	133,7	/	H-10, H-1, H-4
3	5,08 t, (7,1)	122,1	H-1, H-4	C-10, C-4, C-1
4	2,72 t, (7,1)	27,2	H-10,H-7, H-5,H-3	C-3,C-5, C-6, C-2
5	5,37 t, (7,2)	128,3	H-9, H-4	C-9, C-4, C-7
6	/	129,8	/	H-9, H-4
7	3,11 s	36,9	H-9, H-4	C-5,C-6
8		177,6	/	H-7
9	1,80 s	23,9	H-7, H-5	C-7
10	1,63 s	17,7	H-4	C-4

U EI masenom spektru detektovan je molekulski jon na m/z 168 ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2^+$, **Slika 151**). Osnovni jon je uočen na m/z 109 ($\text{C}_8\text{H}_{13}^+$) koji nastaje gubitkom radikala CH_2COOH . Ostali fragmentacioni joni su uočeni na m/z 93 (C_7H_9^+), 81 (C_6H_9^+), 67 (C_5H_7^+) i 55 (C_4H_7^+). Pik (Rt 21,993 min) sa navedenim fragmentacionim jonima se takođe uočava u masenom hromatogramu etarskog ulja (**Slike 139 i 152**) na osnovu čega je potvrđeno da je izogeranilna kiselina komponenta etarskog ulja biljke *A. santonicum*.

**Slika 151.** GC/MS hromatogram izogeranilne kiseline (gore) i EI maseni spektar izogeranilne kiseline (dole)



Slika 152. GC/MS hromatogram etarskog ulja *Artemisia santonicum* (gore); EI maseni spektar pika na $R_t=22,02$ min iz GC/MS hromatograma etarskog ulja (u sredini) i EI maseni spektar izolovane izogeranilne kiseline (dole)

2.4. Biološke aktivnosti

Protektivni efekat na DNK humanih limfocita ispitivan je za jedinjenja (43-48) koja su izolovana iz *A. littoralis* (43-48). Antibakterijska aktivnost kao i određivanje uticaja izolovanih jedinjenja (49-54) na proces formiranja biofilma PAO1 ispitivana su za jedinjenja koja su izolovana iz *A. tatarica* (49-54). Metoda bioautografije je korišćena za određivanje antibakterijske aktivnosti frakcija koje su izolovane iz *A. prostrata*. Za etarsko ulje i jedinjenje 55 ispitivana je antibakterijska (mikrodiluciona i metoda bioautografije) i antifungalna aktivnost, uticaj ulja i jedinjenja 55 na proces formiranja biofilma, testovi pokretljivosti (twitching i flagella test) i uticaj na inhibiciju sinteze piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1.

2.4.1. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita

Za određivanje protektivnog efekta jedinjenja (43-48) na DNK humanih limfocita korišćena je metoda ekspresije mikronukleusa blokirane citokineze (cytokinesis block micronucleus – CBMN).¹⁴⁶ Mikronukleusi su mala odvojena jedra koja sadrže hromosome ili njihove fragmente, a nastaju kao posledica oštećenja hromozoma nakon tretiranja fizičkim (zračenje) ili hemijskim agensima (npr. mitomicin C).¹⁴⁷ Metoda za detekciju mikronukleusa u perifernim limfocitima koju su razvili Kantriman i Hedl,¹⁴⁸ a koja je kasnije unapređena razvojem CBMN metode je pouzdana za praćenje štetnih uticaja agenasa na hromosome čoveka. Po ovoj metodi, u ćelijsku kulturu kao agens (inhibitor polimerizacije aktina) koji sprečava deobu ćelije dodaje se citohalazin B. Oštećenje hromozoma je indukovano γ zračenjem (2 Gy) binuklearnih humanih limfocita. Posle zračenja (2-19h) testirani su protektivni efekti jedinjenja (43-48).¹⁴⁹ Učestalost mikronukleusa (MNI) beležena je u binuklearnim ćelijama i izračunat je proliferacioni indeks blokiranja citokineze (CBPI, **Tabela 7**).^{150,151}

Kao pozitivna kontrola korišćen je amifostin WR-2721, radioprotektant, derivat fosforilovanog cisteamina koji se metaboliše alkalnom fosfatazom do aktivnog sulfhidrilnog jedinjenja sposobnog za „hvatanje“ slobodnih radikala (nastalih štetnim zračenjem) i na taj način sprečava ćelijska oštećenja.¹⁵² Mitomicin C (MMC), alkilujući

agens koji izaziva oštećenja na molekulu DNK i stvaranje mikronukleusa, korišćen je kao negativna kontrola.^{153,154}

Ozračeni limfociti su tretirani amifostinom WR-2721 (pozitivna kontrola) u koncentraciji od 4,7 μM što je izazvalo smanjenje broja mikronukleusa za 9% u poređenju sa kontrolnom ozračenom kulturom limfocita (100%) u koju nije dodat amifostin. Ozračene kulture limfocita su tretirane jedinjenjima (**43-45**) u koncentracijama 0,8, 1,5, 3,1 μM . Najjaču aktivnost je pokazalo jedinjenje **45** koje je izazvalo smanjenje broja mikronukleusa za 31% (c = 0,8 μM), 28% (c = 1,5 μM), 23% (c = 3,1 μM) u poređenju sa kontrolnom kulturom ozračenih limfocita bez dodatih izolovanih jedinjenja. Utvrđeno je da jedinjenja **44** i **45** pokazuju efekte koji su slični ili slabiji od efekata ozračenih kontrolnih ćelijskih kultura. Tretman limfocita jedinjenjem **46** u koncentracijama 1,0, 2,0, 4,0 μM dovodi do smanjenja učestalosti mikronukleusa za 22,5%, 24%, 19% redom. Jedinjenje **48** u koncentracijama 1,8, 3,5, 7,0 μM pokazuje smanjenje učestalosti mikronukleusa za 14,5%, 15%, 13%, redom. Tretman jedinjenjem **47** pokazuje slabiji efekat u odnosu na kontrolne netretirane ćelije. Mitomicin C (negativna kontrola) u koncentraciji od 3 μM , pokazao je porast broja mikronukleusa za 23,5% u odnosu na kontrolne ćelije. Svi navedeni rezultati su prikazani u **Tabeli 7**.

Efekat jedinjenja (**43-48**) na ćelijsku proliferaciju proveren je pomoću proliferacionog indeksa blokirane citokineze (CBPI) (**Tabela 7**).

Analizom odnosa struktura/aktivnost uočeno je da jedinjenje **45**, koje pripada grupi flavonoidnih glikozida, pokazalo najjači efekat smanjenja frekvencije mikronukleusa, dok je fenolno jedinjenje **47** pokazalo najslabiju aktivnost.

Tabela 7. Učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji i na 1000 pregledanih BN ćelija, procenat binuklearnih ćelija, proliferacioni indeks, distribucija MN po ćeliji i frekvencija MN u odnosu na kontrolnu grupu određivani u ćelijskoj kulturi humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijama jedinjenja iz *A. littoralis*

Jedinjenje (μM)	MN/BN ćeliji ^a	CBPI ^b	% BN ćelija sa MN ^c	MN/1000 BN ćelija ^d	Frekvencija MN ^e (%)	Distribucija MN					
	(s.v. \pm SE) ^a	(s.v. \pm SE) ^b	(s.v. \pm SE) ^c	(s.v. \pm SE) ^d	(s.v. \pm SE) ^e	0	1	2	3	4	5
Kontrola	1,2 \pm 0,03	1,6 \pm 0,1	15,5 \pm 0,6	183,0 \pm 9,6	100%	1050,5	160,5	28,8	3,0	0,3	0
Amifostin (4,7)	1,2 \pm 0,02	1,6 \pm 0,1	13,9 \pm 0,7	166,0 \pm 0,7	90,7%	1013,3	135,5	23,5	4,0	0,3	0
MMC (3,0)	1,3 \pm 0,02	1,6 \pm 0,1	17,9 \pm 0,2 ^{f,g}	226,1 \pm 3 ^{f,g}	123,5%	1029,3	177,8	35,8	7,5	2,3	0,5
Jedinjenje 43(0,8)	1,2 \pm 0,03	1,7 \pm 0,1	15,1 \pm 0,5 ^h	181 \pm 9,9 ^h	98,9%	1011,3	146,5	31	1,8	0,5	0
Jedinjenje 43(1,5)	1,3 \pm 0,02	1,7 \pm 0,1	14,1 \pm 0,6 ^h	178,8 \pm 10,9 ^h	97,7%	986,3	126	25,3	3,5	0,5	0,3
Jedinjenje 43(3,1)	1,2 \pm 0,02	1,7 \pm 0,1	15,3 \pm 0,8	187,0 \pm 8,3 ^h	102,2%	993	146	28,3	4,5	1	0
Jedinjenje 44(0,8)	1,2 \pm 0,03	1,7 \pm 0,1	14,4 \pm 0,4 ^h	172,0 \pm 6,9 ^h	94,0%	1013,8	108	20	2,8	0,5	0
Jedinjenje 44(1,5)	1,2 \pm 0,02	1,7 \pm 0,1	14,1 \pm 0,5 ^h	170,9 \pm 6,8 ^h	93,4%	999,3	127,3	28	3,8	0,3	0
Jedinjenje 44(3,1)	1,2 \pm 0,03	1,8 \pm 0,1	14,3 \pm 0,4 ^h	175,3 \pm 7,8 ^h	95,8%	993	133,5	28,3	3,8	0,5	0
Jedinjenje 45(0,8)	1,2 \pm 0,01	1,6 \pm 0,1	11,2 \pm 0,4 ^{f,h}	126,6 \pm 4,8 ^{f,g,h}	69,2%	791	82,5	15	1,8	0	0
Jedinjenje 45(1,5)	1,2 \pm 0,03	1,6 \pm 0,1	10,8 \pm 0,7 ^{f,h}	131,3 \pm 9,2 ^{f,h}	71,7%	983	99,8	19,3	2,8	0,5	0
Jedinjenje 45(3,1)	1,2 \pm 0,02	1,6 \pm 0,1	11,7 \pm 0,6 ^{f,h}	141,4 \pm 6,5 ^h	77,3%	1015	108,5	22,5	3	0,3	0
Jedinjenje 46(1,0)	1,2 \pm 0,03	1,6 \pm 0,1	12,1 \pm 0,5 ^{f,h}	141,8 \pm 5,3 ^{f,h}	77,5%	1017,3	120,5	19,8	2,0	0	0
Jedinjenje 46(2,0)	1,2 \pm 0,01	1,6 \pm 0,1	11,7 \pm 0,7 ^{f,h}	139,3 \pm 7,9 ^h	76,1%	1018,3	112,5	20,8	2,3	0	0
Jedinjenje 46(4,0)	1,2 \pm 0,02	1,6 \pm 0,1	12,3 \pm 0,6 ^{f,h}	148,0 \pm 9,1 ^h	80,9%	1004	115,3	22,5	2,5	0,5	0
Jedinjenje 47(1,8)	1,3 \pm 0,02	1,7 \pm 0,1	15,1 \pm 0,1 ^h	191,2 \pm 3,4 ^h	104,5%	991,3	137	34	5,3	0,8	0
Jedinjenje 47(3,7)	1,3 \pm 0,02	1,8 \pm 0,1	15,0 \pm 0,1 ^h	189,3 \pm 4,4 ^h	103,4%	970	130,5	36,3	3,5	0,8	0
Jedinjenje 47(7,4)	1,2 \pm 0,02	1,6 \pm 0,1	15,8 \pm 0,7	197,2 \pm 6,6 ^h	107,8%	1026,3	151,3	36,8	4,5	0,5	0
Jedinjenje 48(1,8)	1,2 \pm 0,04	1,7 \pm 0,1	13,1 \pm 0,7 ^h	156,4 \pm 4,1 ^h	85,5%	1013	128,8	21,3	2,3	0,5	0,5
Jedinjenje 48(3,5)	1,2 \pm 0,02	1,8 \pm 0,1	13,1 \pm 0,4 ^h	155,7 \pm 4,6 ^h	85,1%	1012,5	128	21	3,5	0,3	0
Jedinjenje 48(7,0)	1,2 \pm 0,02	1,7 \pm 0,1	13,6 \pm 0,4 ^h	159,2 \pm 5,3 ^h	87,0%	1015,3	137,3	19	3	0,8	0

^aMN/BNćeliji: učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji. ^bCBPI: proliferacioni indeks blokirane citokineze ^c% BN ćelija sa mikronukleusima. ^dMN/1000BN ćelija: učestalost mikronukleusa u 1000 binuklearnih ćelija (ispitivana za svaku konc.). ^eFrekvencija MN %: učestalost MN u odnosu na kontrolu. Razlika je smatrana statistički značajnom između podataka parova i izvedena je analizom varijanse (One-way ANOVA) kojoj je sledio Tukey test. Statistička razlika je smatrana značajnom za $p < 0,01$. ^fU poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajna razlika $p < 0,01$. ^gU poređenju sa amifostinom – WR 2721, statistički značajna razlika $p < 0,01$; ^hU poređenju sa mitomicinom C, statistički značajna razlika $p < 0,01$.

2.4.2. Antibakterijska aktivnost jedinjenja izolovanih iz *Atriplex tatarica*

Za određivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) korišćena je modifikovana mikrodiluciona metoda.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Postupak je opisan u Eksperimentalnom delu (3.4.2.). Izolovana jedinjenja (**49-54**) i komercijalni antibiotici (streptomycin i ampicilin) testirani su na odabrane Gram pozitivne (*Listeria monocytogenes* NCTC 7973 i *Micrococcus flavus* ATCC 10240) i Gram negativne (*Escherichia coli* ATCC 35210 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bakterije.

Ispitivana jedinjenja su pokazala minimalnu inhibitornu aktivnost u opsegu 295,5 – 1988,1 µM, dok je opseg minimalnih baktericidnih koncentracija za jedinjenja iznosio 472,8 – 2485,1 µM. Što se tiče testiranih bakterija pojedinačno, vrednosti antibakterijskog potencijala jedinjenja iznose redom; na soj *M. flavus* **51**>**50**>**49**>**52**>**54**; prema soju *L. monocytogenes* **49**>**51**>**50**>**54**>**52**; prema soju *P. aeruginosa* **51**>**50**>**49**>**53**>**54**>**52**; prema soju *E. coli* **49**>**52**>**50**>**51**>**54**. Najjaču antibakterijsku aktivnost pokazalo je jedinjenje **51** sa inhibitornom vrednošću od 295,5 µM na testirane sojeve *M. flavus* i *P. aeruginosa*, a jedinjenje **49** sa MIK vrednostima od 639,0 µM i 399,4 µM redom na *L. monocytogenes* i *E. coli*. Jedinjenje **54** je pokazalo najslabiji antibakterijski potencijal na *M. flavus* (MIK 919,1 µM) i *E. coli* (MIK 919,1 µM), a jedinjenje **52** na *L. monocytogenes* (MIK 1988,1 µM) i *P. aeruginosa* (MIK 994,0 µM) (**Tabela 8**). Poređenjem sa inhibitornim koncentracijama streptomicina (344,2 µM) i ampicilina (344,2 µM) sa jedinjenjem **51** uočena je bolja aktivnost na *M. flavus* i *P. aeruginosa* od oba standarda. Jedinjenje **49** je pokazalo sličnu inhibitornu aktivnost kao i streptomycin (344,2 µM) na *E. coli*, a slabiju na *L. monocytogenes*. Na osnovu rezultata koji su prikazani u **Tabeli 8** može da se uoči da su najosetljiviji sojevi bakterija *M. flavus* i *P. aeruginosa*, dok je *L. monocytogenes* bila najotpornija bakterija.

Tabela 8. Minimalna inhibitorna (MIK) i baktericidna koncentracija (MBK) testiranih jedinjenja (μM)

Bakterija		49	50	51	52	53	54	Streptomycin	Ampicilin
<i>Micrococcus flavus</i>	MIK	399,4	311,7	295,5	596,4	- ^a	919,1	344,2	716,3
	MBK	639,0	623,4	472,8	1192,8		1378,7	516,3	1146,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIK	639,0	935,2	886,5	1988,1	- ^a	1148,9	344,2	1146,1
	MBK	1198,1	1246,9	1182,0	2485,1		1838,2	516,3	1432,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIK	399,4	311,7	295,5	994,0	496,0	689,3	344,2	2149,0
	MBK	639,0	623,4	472,8	1192,8	744,0	1378,7	516,3	3581,7
<i>Escherichia coli</i>	MIK	399,4	498,7	591,0	497,0	- ^a	919,1	344,2	716,3
	MBK	639,0	623,4	1182,0	596,4		1378,7	516,3	1432,7

^a nije testirano na navedene bakterije zbog nedovoljne količine izolovanog jedinjenja **53**

Ako se uporede strukture izolovanih jedinjenja (**49-54**) sa antibakterijskom aktivnošću uočava se da bolje aktivnosti pokazuju jedinjenja **49-51** (Slika 70), odnosno da je kod izolovanih saponina (**52-54**) slabije izražena antibakterijska aktivnost u odnosu na flavonoidne glikozide. Takođe, može da se primeti da je jedinjenje **51** pokazalo prema sojevima *M. flavus* i *P. aeruginosa* bolju odnosno sličnu aktivnost u poređenju sa jedinjenjima **49** i **50**, na osnovu čega se zaključuje da prisustvo feruloil grupa u jedinjenjima **50** i **51** ima pozitivan uticaj na antibakterijsku aktivnost prema navedenim sojevima. Međutim, na *L. monocytogenes* i *E. coli* jedinjenja **50** i **51** pokazuju slabiju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa jedinjenjem **49**, koje nema u strukturi feruloil grupu, pa je zaključak da na ove bakterije negativno deluje prisustvo feruloil grupe. Ako se uporede rezultati aktivnosti za saponine uočava se da je prema sojevima *M. flavus* i *E. coli* bolju aktivnost pokazao sulfonovani saponin (**52**), dok je na sojeve *P. aeruginosa* i *L. monocytogenes* jaču aktivnost pokazalo jedinjenje **54** (nesulfonovani saponin).

2.4.3. Određivanje uticaja izolovanih jedinjenja iz *Atriplex tatarica* na proces formiranja biofilma PAO1

Testirana jedinjenja (**49-54**) su pokazala aktivnost sprečavanja formiranja biofilma *P. aeruginosa* („anti-biofilm activity“) u sub-letalnim koncentracijama 0,5, 0,25 i 0,125 od MIK vrednosti (Tabela 9). Sva ispitivana jedinjenja su smanjila formiranje biofilma u koncentraciji 0,5 od MIK vrednosti u opsegu 20,07–58,06%.

Jedinjenja **51**, **52** i **53** pokazala su aktivnost i u najnižoj koncentraciji (0,125 od MIK vrednosti). Iz dobijenih rezultata uočeno je da je od testiranih jedinjenja najbolju anti-biofilm aktivnost pokazalo jedinjenje **52** čiji procenat inhibicije iznosi 56,63% za koncentraciju (0,5 od MIK-a), 45,88% (0,25 od MIK-a) i 7,17% (0,125 od MIK-a). Dalje slede jedinjenja **49** (58,06% i 12,19%) i **54** (53,14% i 39,43%) koja inhibiraju formiranje biofilma u koncentraciji 0,5 odnosno 0,25 MIK vrednosti redom. Poređenjem sa streptomycinom i ampicilinom koji sprečavaju formiranje biofilma u svim testiranim subMIK koncentracijama u opsegu 52,46–89,31% i 58,94–85,24% zaključeno je da jedinjenja **49**, **52** i **54** u koncentraciji 0,5 MIK vrednosti imaju sličnu aktivnost kao streptomycin i nešto slabiju nego ampicilin.

Na osnovu ovih rezultata (**Tabela 9**) uočeno je da izolovani saponini (**52-54**) imaju više izraženu aktivnost inhibicije formiranja biofilma od izolovanih flavonoidnih glikozida (**49-51**).

Table 9. Efekti izolovanih jedinjenja na inhibiciju formiranja biofilma *P. aeruginosa* (PAO1)

Jedinjenje	Inhibicija formiranja biofilma ^b		
	0,5MIK (%±SE)	0,25MIK (%±SE)	0,125MIK (%±SE)
49	58,06±0,37	12,19±0,65	NE ^a
50	20,07±0,26	4,30±0,12	NE ^a
51	43,01±0,65	26,16±0,36	1,79±0,03
52	56,63±1,67	45,88±0,67	7,17±0,05
53	26,52±0,43	21,86±0,37	12,54±0,13
54	53,41±0,56	39,43±0,65	NE ^a
Ampicilin	65,28±0,65	58,94±0,46	85,24±0,37
Streptomycin	52,46±0,46	74,57±0,36	89,31±0,43

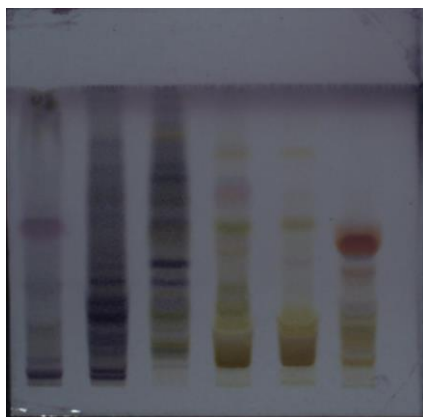
^aNE – nema aktivnost

^bVrednosti za formiranje biofilma su izračunate: $(A_{620} \text{ kontrola} - A_{620} \text{ uzorak}) / (A_{620} \text{ kontrola}) \times 100$. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SE.

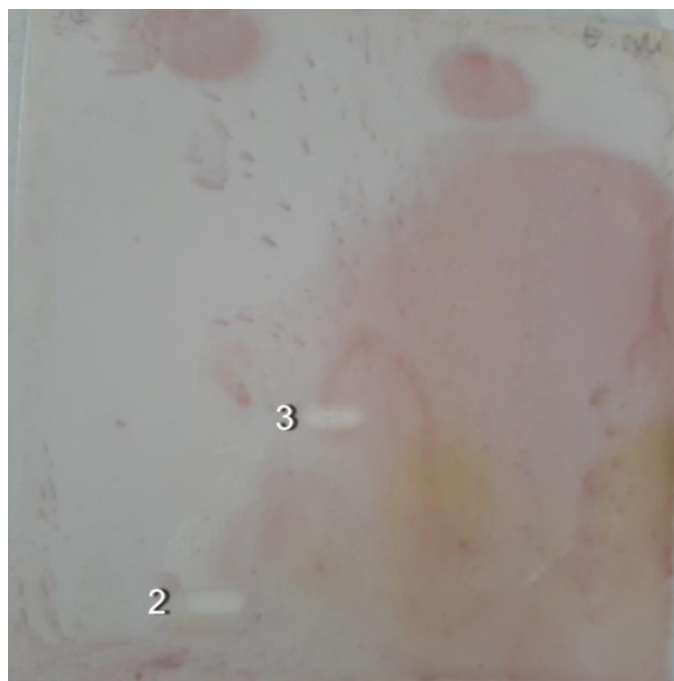
2.4.4. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti frakcija iz *Atriplex prostrata* metodom bioautografije na HPTLC pločama

n-Butanolne frakcije izolovane iz biljne vrste *A. prostrata* najpre su prečišćene na koloni Sephadexa LH-20 (postupak opisan u Ekperimentalnom delu), a zatim je metodom bioautografije na HPTLC pločama određivana njihova antibakterijska

aktivnost. Za HPTLC analizu odabrano je šest frakcija (1, 3, 5, 8, 9 i 12) čija je aktivnost ispitivana na četiri vrste bakterija: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *M. flavus*. Frakcije su rastvorene u metanolu u koncentraciji 100 mg/mL i nanete na ploču u zapremini od 3 μ L. Prve tri trake su saponinske frakcije (1, 3 i 5), a preostale tri flavonoidne (8, 9 i 12). HPTLC ploče su razvijene u sistemu CHCl_3 :MeOH:H₂O (20:11:2 v/v) i izazvane anizaldehidnim reagensom.

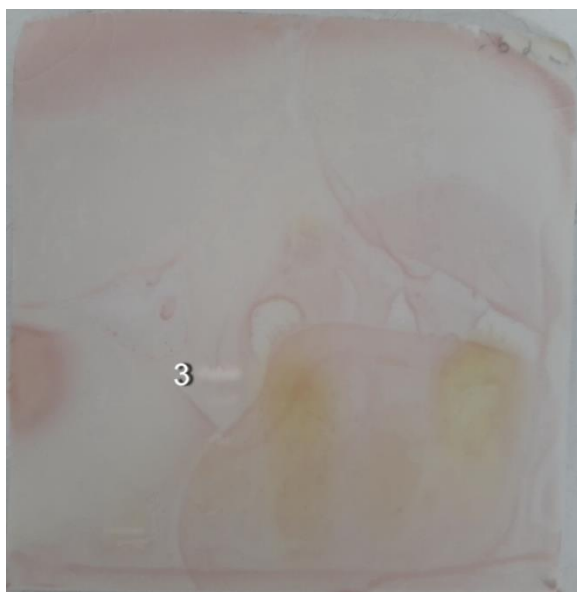


Slika 153. HPTLC ploča sa nanetim frakcijama *A. prostrata* izazvana anizaldehidnim reagensom

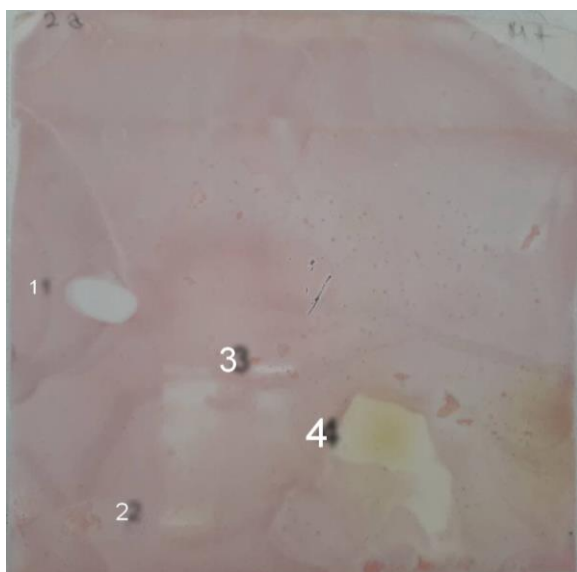


Slika 154. HPTLC ploča sa nanetim frakcijama *A. prostrata* izazvana bakterijskom suspenzijom *E. coli* (bele mrlje)

Na ploči koja je izazvana suspenzijom *E. coli* (**Slika 154**) uočene su dve zone: zona 2 koja potiče od aktivnog jedinjenja iz frakcije 3 (traka 2 na ploči) i zona 3 koja potiče od aktivnog jedinjenja iz frakcije 5 (traka 3 na ploči). Na ploči koja je izazvana suspenzijom *L. monocytogenes* (**Slika 155**) uočena je zona 3 koja potiče od jedinjenja iz frakcije 5 (traka 3).

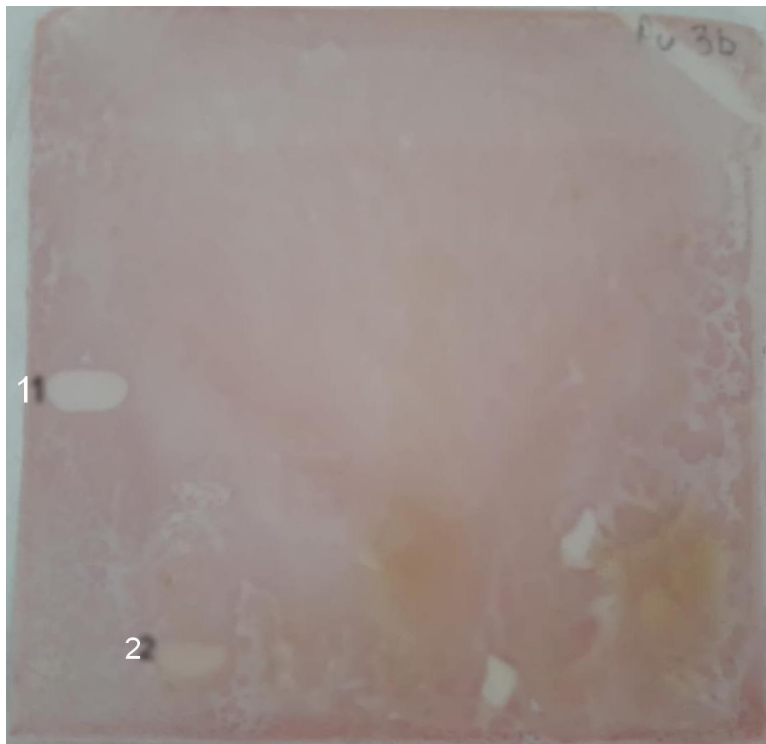


Slika 155. HPTLC ploča sa nanetim frakcijama *A. prostrata* izazvana bakterijskom suspenzijom *L. monocytogenes*



Slika 156. HPTLC ploča sa nanetim frakcijama *A. prostrata* izazvana bakterijskom suspenzijom *M. flavus*

Na ploči koja je izazvana suspenzijom *M. flavus* (**Slika 156**) uočene su četiri zone: zona 1 koja potiče od aktivnog jedinjenja iz frakcije 1 (traka 1 na ploči), zona 2 koja potiče od aktivnog jedinjenja iz frakcije 3 (traka 2 na ploči), zona 3 koja potiče od jedinjenja iz frakcije 5 (traka 3), zona 4 koja potiče od jedinjenja iz frakcije 8 (traka 4).



Slika 157. HPTLC ploča sa nanetim frakcijama *A. prostrata* izazvana bakterijskom suspenzijom *P. aeruginosa*

Na ploči koja je izazvana suspenzijom *P. aeruginosa* (**Slika 157**) uočene su dve zone: zona 1 koja potiče od aktivnog jedinjenja iz frakcije 1 (traka 1 na ploči) i zona 2 koja potiče od aktivnog jedinjenja iz frakcije 3 (druga traka na ploči).

Na osnovu rezultata koji su dobijeni metodom bioautografije ukupno je uočeno četiri zone. Zona 4 koja potiče od bakterijske aktivnosti jedinjenja iz frakcije 8 javlja se samo na ploči koja je izazvana *M. flavus*, na osnovu čega može da se zaključi da flavonoidna frakcija inhibira dejstvo ove bakterije, dok na ostale bakterije ne deluje. Saponinske frakcije 1, 3, 5 su pokazale aktivnost na sve četiri bakterije.

2.4.5. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskog ulja *Artemisia santonicum* i izogeranilne kiseline - mikrodiluciona metoda

Za određivanje antibakterijske aktivnosti ulja i izogeranilne kiseline korišćena je mikrodiluciona metoda (postupak opisan u Eksperimentalnom delu).^{155,156} Ulje je ispitivano na 8 različitih bakterijskih vrsta, a izogeranilna na 4 vrste (**Tabela 10**). Komercijalni antibiotici, ampicilin i streptomycin su korišćeni kao kontrole.

Na osnovu dobijenih rezultata (**Tabela 10**) uočeno je da etarsko ulje pokazuje antibakterijsku aktivnost u opsegu koncentracija 2-25 mg/mL, sa najvišom aktivnošću na *B. cereus* i *P. aeruginosa* sa MIK vrednošću od 2 mg/mL i 4 mg/mL redom. U odnosu na ulje izogeranilna kiselina pokazuje jaču antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije u opsegu koncentracija 0,05-0,075 mg/mL. Poređenjem sa streptomycinom i ampicilinom ulje ima slabiju aktivnost, dok izogeranilna kiselina pokazuje jaču aktivnost od antibiotika prema ispitivanim bakterijama (**Tabela 10**).

Tabela 10. Minimalna inhibitorna (MIK) i baktericidna koncentracija (MBK) etarskog ulja *Artemisia santonicum* i izogeranilne kiseline

Bakterija	Etarsko ulje	Izogeranilna kiselina	Streptomycin	Ampicilin
	MIK MBK mg/mL	MIK MBK mg/mL	MIK MBK mg/mL	MIK MBK mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	15±2 50±3	/ ^a	0,04±0,003 0,10±0,006	0,25±0,008 0,40±0,009
<i>Bacillus cereus</i>	2±0,1 4±0,2	/ ^a	0,10±0,005 0,20±0,006	0,25±0,006 0,40±0,008
<i>Micrococcus flavus</i>	25±4 50±5	0,05 0,10	0,20±0,006 0,30±0,008	0,25±0,005 0,40±0,005
<i>Listeria monocytogenes</i>	15±6 50±3	0,05 0,10	0,20±0,006 0,30±0,005	0,40±0,005 0,50±0,006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4±0,3 6±0,3	0,075 0,10	0,20±0,003 0,30±0,002	0,75±0,008 1,25±0,040
<i>Salmonella typhimurium</i>	25±4 50±6	/ ^a	0,15±0,004 0,30±0,006	0,40±0,003 0,75±0,003
<i>Escherichia coli</i>	6±0,5 12±0,4	0,05 0,10	0,20±0,004 0,30±0,006	0,25±0,002 0,50±0,030
<i>Enterobacter cloacae</i>	6±0,4 12±0,6	/ ^a	0,25±0,006 0,50±0,008	0,40±0,003 0,75±0,020

^a / aktivnost izogeranilne kiseline nije ispitana na date sojeve zbog nedovoljne količine

2.4.6. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskog ulja *Artemisia santonicum*-metodom bioautografije

U ovom radu je korišćena metoda direktne bioautografije u kojoj se HPTLC ploče nakon razvijanja i uklanjanja mobilne faze sušenjem, prskaju suspenzijom bakterija i inkubiraju u parnoj komori na 37 °C tokom 24 h. Za lokalizovanje i vizualizaciju antibiotika obično se koriste tetrazolijumove soli koje dehidrogenaze živih mikroorganizama pretvaraju u intenzivno obojene formazane. Antimikrobna sredstva ubijaju bakterije na HPTLC ploči tako da se boja ne proizvodi na mestima antibakterijskih tačaka već se formiraju zone inhibicije koje su bele boje u odnosu na ružičastu pozadinu.¹⁰³ Nakon izazivanja 3% vodenim rastvorom *p*-jodonitrotetrazolijum ljubičastog, ploče se ostave da stoje još 3h i na kraju izazovu prskanjem 70% etanolom kako bi se zaustavio rast bakterija. Analiza etarskog ulja visoko efikasnom tankoslojnom hromatografijom (HPTLC) detaljno je opisana u Eksperimentalnom delu.

U ovom eksperimentu HPTLC ploče su prskane suspenzijama Gram negativnih (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i Gram pozitivnih (*L. monocytogenes* i *M. flavus*) bakterija. Na **Slici 158** uočena je bela zona na roze pozadini, koja se odnosi na antibakterijsku aktivnost izogeranilne kiseline. Izmerena R_f vrednost je iznosila 0,08.



Slika 158. HPTLC bioautografija: TLC etarskog ulja, a-izazvana anizaldehidom, b- suspenzijom *E. coli*, c- suspenzijom *P. aeruginosa*, d- suspenzijom *L. monocytogenes*, e- suspenzijom *M. flavus*

HPTLC - bioautografija je ukazala na aktivnost izogeralnilne kiseline kao glavnog antibakterijskog agensa sa izuzetnim antimikrobnim, antibiofilm, anti-quorum aktivnostima, iako je zastupljena kao minorna komponenta u etarskom ulju (0,2%) *A. santonicum*.

2.4.7. Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskog ulja *Artemisia santonicum*-metodom bioautografije

Za određivanje antifungalne aktivnosti ulja i izogeralnilne kiseline korišćen je mikrodilucioni metod (postupak opisan u Eksperimentalnom delu).^{155,156} Prilikom ispitivanja ulja korišćeno je osam fungalnih vrsta, dok je zbog nedovoljne količine izogeralnilna kiselina testirana na četiri. Rezultati su prikazani u **Tabeli 11**. Etarsko ulje pokazuje antifungalnu aktivnost u opsegu koncentracija 3-12 mg/mL, sa najvišom aktivnošću na *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum* i *Penicillium verrucosum*. Poređenjem sa antimikoticima, bifonazolom i ketokonazolom

etarsko ulje ima slabiju aktivnost. Izogeranilna kiselina sa MIK vrednostima od 0,05 mg/mL na *Aspergillus fumigatus* i *Penicillium ochrochloron* i 0,075 mg/mL na *Aspergillus niger* i *Penicillium verrucosum* pokazala je jaču aktivnost u odnosu na ulje, bifonazol i ketokonazol.

Tabela 11. Minimalna inhibitorna (MIK) i fungicidna koncentracija (MFK) etarskog ulja i izogeranilne kiseline iz *Artemisia santonicum*

Gljiva	Etarsko ulje	Izogeranilna kiselina	Bifonazol	Ketokonazol
	MIK	MIK	MIK	MIK
	MFK mg/mL	MFK mg/mL	MFK mg/mL	MFK mg/mL
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6±0,3 12±0,2	0,050 0,10	0,15±0,004 0,20±0,005	0,20±0,006 0,50±0,005
<i>Aspergillus versicolor</i>	6±0,3 12±0,4	/ ^a	0,10±0,006 0,20±0,005	0,20±0,003 0,50±0,005
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3±0,6 6±0,5	/ ^a	0,15±0,008 0,20±0,009	1,50±0,050 2,00±0,060
<i>Aspergillus niger</i>	12±3 25±4	0,075 0,10	0,15±0,006 0,20±0,007	0,20±0,004 0,50±0,006
<i>Trichoderma viride</i>	3±0,4 6±0,6	/ ^a	0,15±0,009 0,20±0,003	1,00±0,050 1,00±0,060
<i>Penicillium funiculosum</i>	3±0,3 9±0,4	/ ^a	0,20±0,004 0,25±0,005	0,20±0,004 0,50±0,003
<i>Penicillium ochrochloron</i>	5±0,8 6±0,6	0,050 0,10	0,20±0,006 0,25±0,006	2,50±0,200 3,50±0,300
<i>Penicillium verrucosum</i>	3±0,2 9±0,3	0,075 0,10	0,10±0,006 0,20±0,008	0,20±0,005 0,30±0,003

^a / aktivnost izogeranilne kiseline nije ispitana na date sojeve zbog nedovoljne količine

2.4.8. Ispitivanje anti-QS aktivnosti etarskog ulja iz *Artemisia santonicum* i izogeranilne kiseline

2.4.8.1. Anti-QS aktivnost

Anti-QS aktivnost etarskog ulja iz *A. santonicum* i izogeranilne kiseline na virulentnost soja *P. aeruginosa* PAO1 procenjena je „twitching“ i „flagella“ testom koji određuje promenu struktura za kretanje, čime je onemogućena disperzija kolonija, testom kojim se meri smanjenje produkcije pigmenta piocijanina (koji je faktor virulentnosti) i određivanjem inhibicije formiranja biofilma pod uticajem ulja i izogeranilne kiseline. Rezultati testova prikazani su u **Tabelama 12, 13 i 14.**

2.4.8.2. Ispitivanje uticaja etarskog ulja iz *Artemisia santonicum* i izogeranilne kiseline na proces formiranja biofilma PAO1

Minimalne inhibitorne koncentracije na *P. aeruginosa* određene su mikrodilucionom metodom i za etarsko ulje MIK je bio 4,00 mg/mL, a za izogeranilnu kiselinu 0,075 mg/mL. Efekat inhibicije formiranja biofilma *P. aeruginosa* testiran je na nižim vrednostima od MIK-a (0,5 MIK, 0,25 MIK, i 0,125 MIK). U koncentraciji 0,125 MIK-a etarsko ulje inhibira formiranje biofilma 42,54%, dok koncentracija 0,25 MIK vrednosti pokazuje aktivnost inhibicije 1,52 %. Ulje u koncentraciji 0,5 MIK-a nije uticalo na formiranje biofilma, u odnosu na izogeranilnu kiselinu koja je u toj koncentraciji pokazala najbolju aktivost (46,77%). Streptomycin i ampicilin su pokazali najveću aktivnost u koncentraciji 0,125 MIK-a (**Tabela 12**). Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da izogeranilna kiselina ima veći potencijal za inhibiciju formiranja biofilma nego etarsko ulje, ali slabiji u odnosu na streptomycin i ampicilin.

Tabela12. Efekti etarskog ulja i izogeranilne kiseline na inhibiciju formiranja biofilma *P. aeruginosa* (PAO1)

Uzorak	Inhibicija formiranja biofilma*		
	0,5MIK (%±SE)	0,25MIK (%±SE)	0,125MIK (%±SE)
Etarsko ulje	-	1,52±0,62	42,54±2,77
Izogeranilna kiselina	46,77±0,82	34,82±0,32	18,41±0,19
Ampicilin	65,28±0,65	58,94±0,46	85,24±0,37
Streptomycin	52,46±0,46	74,57±0,36	89,31±0,43

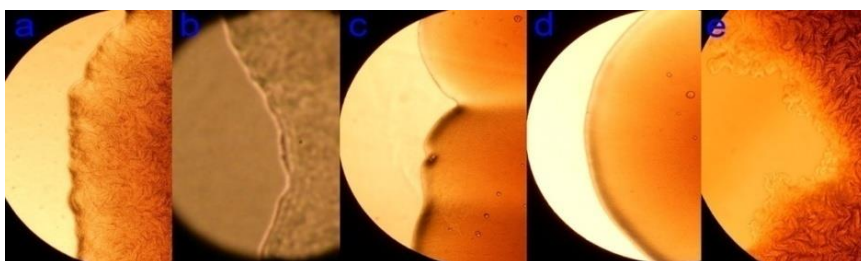
*Vrednosti za inhibiciju formiranja biofilma su izračunate: $(A_{620} \text{ kontrola} - A_{620} \text{ uzorak}) / (A_{620} \text{ kontrola}) \times 100$. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SE. - nije aktivan

2.4.8.3. Testovi pokretljivosti (Twitching i flagella motility)

Testovi pokretljivosti izvedeni su kako bi se utvrdio potencijal ulja i izogeranilne kiseline na kretanje PAO1. Nakon 24 h inkubacije sa subinhibitorskom koncentracijom ulja i izogeranilne kiseline (subMIK), opisan je: dijametar kolonije koji ukazuje na stepen širenja kolonije, a posredno i na pokretljivost, boja kolonije koja je pod normalnim okolnostima zelena usled produkcije pirocjanina. Pod dejstvom inhibitornih supstanci kolonija blede usled smanjene produkcije ovog pigmenta. Isto

tako, posle 24 h inkubacije posmatrane su ivice kolonije pod svetlosnim mikroskopom i utvrđena je promena u broju flagela pod dejstvom ulja i izogeranilne kiseline (**Tabela 13**).

Kontrolna PAO1 kolonija koja je rasla neometano na hranljivoj podlozi dostigla je dijametar 29,34 mm, a ivice kolonije su bile neravne usled postojanja niza pila što se može uočiti na **Slici 159e**. Zelena boja kolonije ukazuje na značajnu produkciju pigmenta piocijanina. Ulje i izogeranilna kiselina su efikasno inhibirali širenje kolonije na šta ukazuje dijametar kolonija PAO1 koji je iznosio 11,00 mm u prisustvu ulja (**Slika 159a**) i 10,67 mm u prisustvu izogeranilne kiseline (**Slika 159b**). Antibiotici streptomycin i ampicilin takođe su efikasno inhibirali disperziju kolonije PAO1: uz streptomycin, PAO1 kolonija je dostigla dijametar 6,00 mm (**Slika 159d**), dok je uz ampicilin ova vrednost iznosila 8,33 mm (**Slika 159c**). Boja kolonije je promenjena potpuno: od zelene kod kontrole PAO1 do potpuno bele kod ulja, izogeranilne kiseline i antibiotika, što indirektno ukazuje na smanjenje produkcije piocijanina. Posmatranjem ivica kolonija PAO1 koje su inkubirane uljem i izogeranilnom kiselinom pod mikroskopom, uočene su skoro okrugle, glatke i pravilne ivice kolonija, a flagele su potpuno smanjene i po veličini i po broju (**Slike 159a i 159b**). Smanjenje dijametra kolonije, uz parametre kao što su broj pila i boja kolonije koja indikuje prisustvo pigmenta piocijanina mogu preliminarno ukazati da ulje i izogeranilna kiselina efikasno utiču na neke QS faktore koji omogućuju PAO1 disperziju i virulentnost.



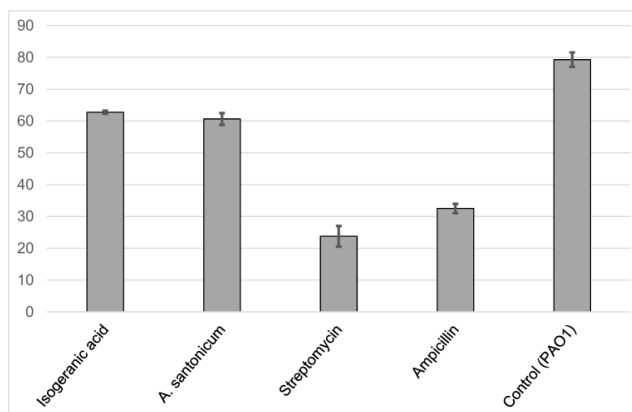
Slika 159. Izgled površine kolonija *P. aeruginosa* pod svetlosnim mikroskopom uvećano $\times 100$. Bakterijske kolonije u prisustvu 0,5 MIK ulja i izogeranilne kiseline (**a** i **b**); Kolonija *P. aeruginosa* u prisustvu ampicilina (0,5 MIK) ukazuje na redukciju pila (**c**); Kolonija *P. aeruginosa* u prisustvu streptomicina ukazuje na redukciju pila (**d**); *P. aeruginosa* u odsustvu ulja i izogeranilne kiseline sa neravnim ivicama kolonija usled postojanja pila (**e**).

Tabela 13. Efekti etarskog ulja i izogeranilne kiseline na rast i strukturu kolonije PAO1

Agensi	Prečnik kolonije (mm ± SD)	Prečnik pila (μm)	Boja kolonije	Ivice kolonije na mikroskopu
Etarsko ulje	11,00±2,65	-	bela	redukovane pile
Ampicilin	8,33±1,53	-	bela	redukovane pile
Streptomycin	6,00±1,73	-	bela	redukovane pile
Izogeranilna kiselina	10,67±1,15	-	bela	redukovane pile
Kontrola (PAO1)	29,34±3,05	96-160	zelena	brojne pile

2.4.8.4. Produkcija piocijanina

Smanjena produkcija piocijanina uočena je kod testiranog ulja (60,6%) i izogeranilne kiseline (62,8%) u odnosu na kontrolu gde je produkcija iznosila 79,3%. Streptomycin i ampicilin su smanjili produkciju piocijanina u većoj količini 23,8% i 32,5%, na osnovu čega može da se zaključi da etarsko ulje i izogeranilna kiselina pokazuju slabiju inhibitornu aktivnost u poređenju sa komercijalnim antibioticima (Slika 160, Tabela 14).



Slika160. Produkcija piocijanina u prisustvu izogeranilne kiseline, ulja, streptomicina, ampicilina i kontrole *P. aeruginosa* (PAO1) testiranih u subMIK (mg/mL).

Tabela 14. Produkcija piocijanina

Izogeranilna kiselina	62,8 %	0,5
Etarsko ulje	60,6 %	1,9
Streptomycin	23,8 %	3,3
Ampicilin	32,5 %	1,5
Kontrola (PAO1)	79,3 %	2,3

Etarsko ulje *A. santonicum* i izogeranilna kiselina su pokazali antibakterijsku, antifungalnu, antibiofilm i anti-quorum aktivnost. Ulje i izogeranilna kiselina su pokazali efekte na sve testirane mehanizme uključene u AQ sensing. Inhibicija formiranja biofilma, uticaj na pokretljivost flagela, smanjenje prečnika kolonije, promena boje kolonije i smanjenje produkcije piocijanina *P. aeruginosa* ukazuju da se ulje i izogeranilna kiselina mogu koristiti za prevenciju rasta bakterija, naročito *P. aeruginosa*.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparati i rastvarači

Za snimanje UV/VIS spektara korišćeni su: GBC Cintra 40 spektrofotometar i tečni hromatograf LC/DAD Agilent Technologies 1100.

IR spektri snimani su na uređaju Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR ATR tehnikom.

Za snimanje NMR spektara korišćen je Bruker 500 Avance III (500 MHz za ^1H i 125 MHz za ^{13}C) NMR spektrometar i deuterisani rastvarači: hloroform (CDCl_3), i metanol (CD_3OD). Kao interni standard korišćen je tetrametil-silan (TMS).

Za određivanje specifične rotacije, $[\alpha]_D^{20}$, korišćen je polarimetar AUTOPOL[®]IV, Rudolph Research Analytical, a kao rastvarač metanol.

Za GC i GC/MS analize korišćen je gasni hromatograf Agilent 7890A opremljen split/spitless injektorom, koji je pomoću tehnologije kapilarnog protoka povezan na dva detektora: plameno-jonizacioni (FID) i kvadrupolni maseni detektor 5975 inert XL EI/CI MSD. Tokom analize korišćena je nepolarna HP-5 MSI kapilarna kolona ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$). Temperatura pećnice je linearno povećavana od 60 do 315 °C brzinom od 3 °C/min i zadržana na 315 °C poslednjih 5 min analize. Temperatura injektora bila je 250 °C, FID detektora 300 °C, noseći gas je bio He (1,0 mL/min na 210 °C). Injekciona zapremina je bila 1 μL , a split odnos 3:1. Maseni spektri su snimani tehnikom elektronske jonizacije (70 eV) u opsegu m/z 40–550.

Reverzno fazna visokoeфикасна tečna hromatografija, RP-HPLC korišćena za izolovanje i prečišćavanje jedinjenja je rađena na tečnom hromatografu Agilent Technologies 1100 Series opremljenom DAD detektorom i autosemplerom, a kolona koja je korišćena bila je Zorbax Eclipse XDB-C18 (i.d. 9,4 mm \times 250 mm, 5 μm).

Tečno hromatografsko–maseno spektrometrijske analize (LC/MS) urađene su na tečnom hromatografu Agilent Technologies 1200 Series opremljenom DAD detektorom i autosemplerom povezanim sa Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom, za razdvajanje i identifikaciju u metanolu rastvorljivih komponenti, kao i za snimanje ESI masenih spektara visoke rezolucije. Korišćena mobilna faza bila je: 0,2% $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1, 0,2 mL/min. Maseni spektri su snimani u pozitivnom i

negativnom modu u sledećim uslovima: napon kapilare 4000 V, temperatura gasa 350 °C, protok gasa za sušenje 12 L/min, pritisak nebulajzera 45 psi, napon fragmentora 140 V, opseg masa 100–3200 *m/z*. Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassHunter Workstation software.

Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija, HPTLC rađena je na CAMAG HPTLC sistemu, koji se sastoji od Linomata 5, ADC 2 automatske komore za razvijanje i TLC vizualizatora. Korišćene su HPTLC (gotove aluminijumske HPTLC silica gel 60 F₂₅₄, Merck) ploče.

Kolonska hromatografija na suvom stubu silika gela (dry-flash) rađena je na sloju silika gela čestica <0,08 mm (Merck), a korišćena je za razdvajanje i prečišćavanje etarskog ulja.

Hromatografija na koloni silika gela 60, CC (Silica gel 60, 0,063–0,200 mm, 70–230 mesh, ASTM, Merck) i hromatografija na koloni sefadeksa (Sephadex LH-20, Sigma Aldrich) korišćene su za početno razdvajanje i frakcionisanje.

Analitička tankoslojna hromatografija, TLC (aluminijumske ploče AL TLC silica gel 60 F₂₅₄, Merck), korišćena je za izbor najpogodnijeg eluenta i praćenje toka dry-flash hromatografije i hromatografije na koloni. Pločice su analizirane pod UV lampom, a zatim razvijane koncentrovanom sumpornom kiselinom i zagrevane.

Za pripremu sirovih ekstrakata i izolovanje jedinjenja korišćeni su rastvarači analitičke čistoće, dodatno prečišćeni destilacijom i pre upotrebe sušeni anhidrovanim kalcijum-hloridom ili natrijum-sulfatom. Za GC, GC/MS, HPLC i LC/MS korišćeni su rastvarači HPLC čistoće.

Standardi D-glukoze, D-galaktoze, D-glukuronske kiseline, L-arabinoze, L-ramnoze su komercijalni proizvodi (Tokyo Chemical Industry, TCI, Belgium).

Anizaldehid-sumporni sprej reagens napravljen je neposredno pre korišćenja po proceduri (Wagner et al., 1984).¹⁵⁸ Kao sprej reagens za bioautografiju korišćen je 3% vodeni rastvor *p*-jodonitrotetrazolijum ljubičastog (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijumhlorid, Sigma Aldrich).

Za određivanje protektivnog efekta na DNK humanih limfocita korišćeni su:

- Amifostin (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina (98%)) je komercijalni proizvod kompanije Marligen-Biosciences, USA

- Mitomicin C je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Beč, Austrija
- RPMI 1640 Medium je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Beč, Austrija
- Fitohemaglutinin je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Austrija
- Citohalasin B je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Beč, Austrija
- Sredstvo za bojenje slajdova alkalni Giemsa (2%) je komercijalni proizvod kompanije Sigma-Aldrich, Beč, Austrija

Za određivanje antibakterijske aktivnosti korišćene su Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (klinički izolat), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) i Gram-pozitivne bakterije: *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Bacillus cereus* (klinički izolat) *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973) *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632) deponovane u Mikološkoj laboratoriji Odeljenja za biljnu fiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Za testiranje antifungalne aktivnosti uzete su sledeće gljive: *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus fumigates* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112), *Trichoderma viride* (IAM 5061), i *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane).

Pseudomonas aeruginosa (PAO1) korišćen u ovoj studiji, kao test organizam za ispitivanje AQS aktivnosti, nalazi se deponovan u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Bakterija je gajena na 37 °C na LB podlozi.

Hranljiva podloga za bakterije (mikrodiluciona metoda) bila je Tryptic Soy Broth; Biolife Italiana S.r.l., Milano, Italija.

Hranljiva podloga za gljive (mikrodiluciona metoda) bila je Malt agar.

Za formiranje biofilma korišćen je Luria-Bertani (LB) medijum (1% w/v NaCl, 1% w/v tryptone, 0.5% w/v ekstrakt kvasca).

Tabela 15. Sastav korišćenih hranljivih podloga

Triptic Soya Agar/Broth (TSA; TSB)	Luria Bertani Broth/Agar (LB/LA)	Malt agar (MA)
Kazein 15 g	Tripton 10 g	Sladni ekstrakt 50 g
Pepton 5 g	Ekstrakt kvasca 5g	Agar 15 g
Natrijum hlorid 5 g	Natrijum hlorid 10 g	Destilovana voda 1L
Agar 15 g	Destilovana voda 1L	
K ₂ HPO ₄ 1L		
Destilovana voda 1L		

Korišćeni komercijalni fungicidi bili su Bifonazol (Srbolek, Beograd, Srbija) i Ketokonazol (Zorka farma, Šabac, Srbija).

Korišćeni komercijalni antibiotici bili su Streptomycin (Sigma P 7794) i Ampicilin (Panfarma, Beograd, Srbija).

3.2. Biljni materijal i postupak frakcionisanja ekstrakta

3.2.1. Biljni materijal

Biljne vrste su sakupljene na slatinama na dve lokacije u Vojvodini. Sve navedene vrste je identifikovala prof. dr Zora Dajić Stevanović i herbarijumski primerici su deponovani u herbarijumu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu.

Tabela 16. Biljne vrste

Biljna vrsta	Lokacija	Godina
<i>Atriplex littoralis</i>	banja Rusanda, Melenci	Avgust 2012
<i>Atriplex prostrata</i>	banja Rusanda, Melenci	Avgust 2016
<i>Atriplex tatarica</i>	Slano Kopovo	Jul 2016
<i>Artemisia santonicum</i>	Slano Kopovo	Avgust 2016 i 2017

3.2.2. Ekstrakcija biljnog materijala i frakcionisanje ekstrakta *Atriplex littoralis*

Biljni materijal mase 125 g je osušen na vazduhu, samleven i ekstrahovan sa 375 mL metanola 24 h, uz prvih sat vremena u ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija je ponovljena još dva puta na isti način, ekstrakti su spojeni, upareni i dobijeno je 12 g ekstrakta. Ekstrakt je rastvoren u vodi (75 mL) i odmašćen dodavanjem dihlormetana (75 mL). Vodeni sloj je ekstrahovan *n*-butanolom (3 × 75 mL). *n*-Butanolni ekstrakt je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom i uparen na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeno je 2,0 g *n*-butanolnog ekstrakta, koji je dalje frakcionisan semi-preparativnom HPLC hromatografijom.

3.2.3. Ekstrakcija biljnog materijala i frakcionisanje ekstrakta *Atriplex tatarica*

Biljni materijal mase 105 g je osušen na vazduhu, samleven i ekstrahovan sa 500 mL metanola 24 h, uz prvih sat vremena u ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija je ponovljena još dva puta na isti način, ekstrakti su spojeni, upareni i dobijeno je 18,9 g ekstrakta. Ekstrakt (17,9 g) rastvoren je u dejonizovanoj vodi (100 mL) i odmašćen dodavanjem dihlormetana (3 × 100 mL). Vodeni sloj je potom ekstrahovan *n*-butanolom (3 × 100 mL). *n*-Butanolni ekstrakt je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, uparen na rotacionom vakuum-uparivaču i dobijeno je 3,2 g ekstrakta. Potom je *n*-butanolni ekstrakt (1,94 g) rastvoren u metanolu i frakcionisan kombinacijom izokratnog i gradijentnog eluiranja na stubu silika gela dimenzija 35 × 4,5 cm. Početni elucioni sistem bio je CHCl₃:MeOH:H₂O = 20:10:1, a nakon toga je postepeno povećavana polarnost povećanjem udela metanola i vode. Tok hromatografije dat je u **Tabeli 17**. Dobijeno je 352 frakcije od po približno 15 mL. Istovremeno sa razdvajanjem, analitička tankoslojna hromatografija (TLC) je korišćena kako bi se frakcije spojile na osnovu istih ili sličnih R_f vrednosti. Kao eluent pri TLC analizama korišćen je sistem CHCl₃:MeOH:H₂O u različitim odnosima. Na taj način je broj od 352 početne frakcije sveden na 37 spojenih frakcija i rastvarač uparen na rotacionom vakuum-uparivaču.

Tabela 17. Tok kolonske hromatografije prilikom razdvajanja *n*-butanolnog ekstrakta *Atriplex tatarica*

Broj frakcije	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O
1-107	20:10:1
108-207	20:11:1,5
208-249	20:11:2
250-263	20:12:2,5
264-286	20:12:3
287-349	20:16:4
350-352	100% metanol

3.2.4. Ekstrakcija biljnog materijala i frakcionisanje ekstrakta *Atriplex prostrata*

Biljni materijal mase 243 g je osušen na vazduhu, samleven i ekstrahovan sa 750 mL metanola 24 h, uz prvih sat vremena u ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija je povovljena još dva puta na isti način. Metanolni ekstrakti su spojeni, procedeni i upareni na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeno je 20,8 g ekstrakta. Ekstrakt je rastvoren u dejonizovanoj vodi (100 mL) i odmašćen dodavanjem dihlormetana (3 × 100 mL). Vodeni sloj je potom ekstrahovan *n*-butanolom (3 × 250 mL). *n*-Butanolni ekstrakt je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, uparen na rotacionom vakuum-isparivaču i dobijeno je 2,61 g ekstrakta. Potom je celokupna količina dobijenog ekstrakta rastvorena u metanolu i frakcionisana na koloni Sephadex-a LH-20 dimenzija 18 × 5,5 cm. Eluiranje je vršeno čistim metanolom i dobijeno je 112 frakcija. Slične frakcije su spojene na osnovu TLC hromatografije i sličnih R_f vrednosti i dobijeno je 14 frakcija. Sistem CHCl₃:MeOH:H₂O = 20:10:2 je korišćen kao eluent za TLC.

3.2.5. Izolovanje etarskog ulja iz biljne vrste *Artemisia santonicum*

Etarsko ulje biljne vrste *A. santonicum* izolovano je hidrodestilacijom (3 h) pomoću aparature po Clevenger-u. Postupak hidrodestilacije je izveden šest puta (620 g biljnog materijala), dobijeno je ukupno 1331 mg ulja, što je 0,21% (w/w) u odnosu na suvi biljni materijal.

3.2.6. Analiza etarskog ulja visoko efikasnom tankoslojnom hromatografijom (HPTLC)

Etarsko ulje (50 μ L) rastvoreno je u metanolu (1 mL) i nanešeno na HPTLC silika gel 60 F₂₅₄ ploču, dimenzija 10 \times 10 cm. Ulje je naneto u obliku trake, u alikvotima 2 μ L, 4 μ L, 8 μ L. Pozicija prve trake je bila udaljena sa leve strane 1,50 cm i odozdo 0,80 cm. Rastojanje između traka bilo je 1,54 cm. Nakon nanošenja uzorka, ploče su potopljene u kadu (ADC2 CAMAG) zasićenu sistemom za razdvajanje: toluen/etil acetat (92:8 v/v). Vreme razvijanja ploče bilo je 20 min, a put razdvajanja je 8cm. Nakon odvajanja mobilna faza je uklonjena sa ploče sušenjem u struji hladnog vazduha 4 min. Četiri ploče su korišćene za bioautografiju, a jedna ploča je izazvana anizaldehidnim reagensom kako bi se odredio položaj traka. Razvijena ploča je uronjena u etanolno-anizaldehidni reagens pomoću CAMAG chromatogram immersion device III uređaja i zatim zagrevana 5 min. do 100 °C, dok trake nisu postale vidljive.

3.3. Izolovanje čistih jedinjenja

3.3.1. Razdvajanje butanolnog ekstrakta *Atriplex littoralis*

Razdvajanje *n*-butanolnog ekstrakta rađeno je semipreparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom na HPLC sistemu *Agilent Technologies* 1100. Korišćena je kolona Zorbax XDB-C18 (250 \times 9,4 mm; 5 μ m), na 25 °C, pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija je vršena na tri talasne dužine 270, 350, 215 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem koji se sastojao od 0,2% rastvora mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B). Na slici 161 je prikazan HPLC hromatogram butanolnog ekstrakta *A. littoralis*. Ovim razdvajanjem dobijeno je 10 frakcija (ALB_-1 – 8). Iz frakcija (ALB_4 – 31,103 mg), (ALB_5 – 32,913 mg) i (ALB_6 – 18,293 mg) izolovana su nova jedinjenja (**43-45**). Pored gore navedenih flavonoidnih glikozida, izolovani su spinacetin-3-*O*- β -D-glukopiranozid (**46**) (frakcija ALB_3 – 20,920 mg), arbutin (frakcija ALB_-1/1-12,0 mg) i 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozid (frakcija ALB_00/1 – 15,121 mg) jedinjenja koja su ranije u literaturi već opisana.

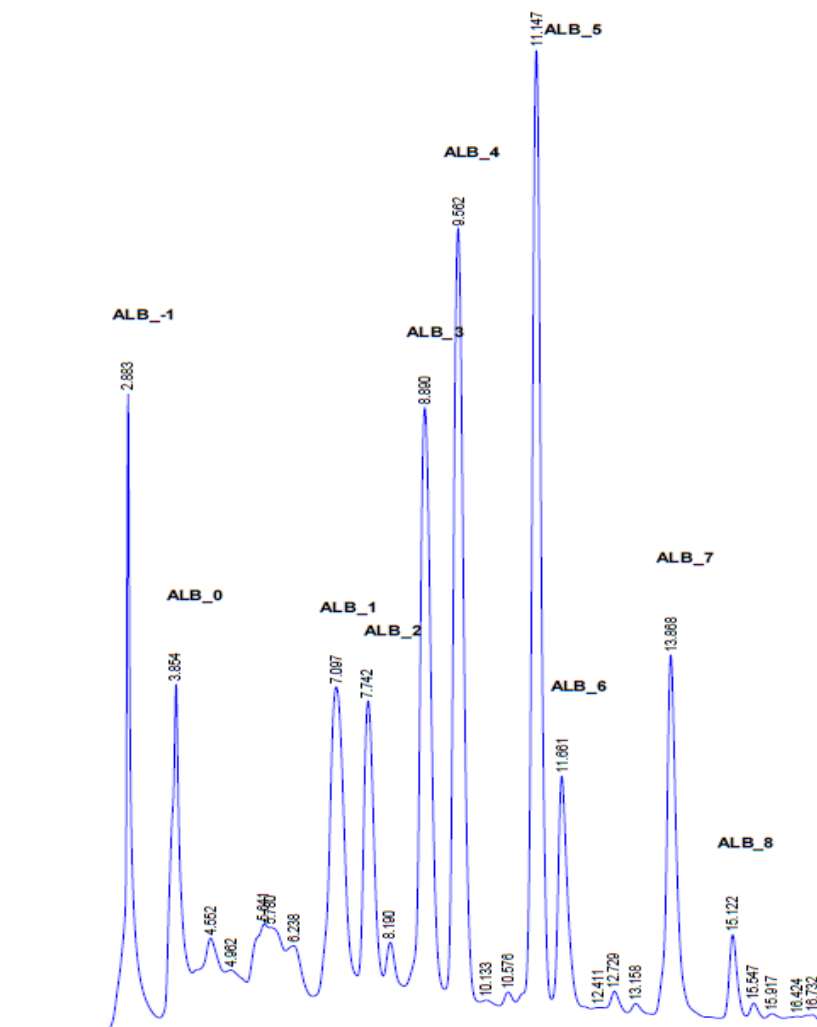
Tabela 18. HPLC program za frakcionisanje butanolnog ekstrakta *Atriplex littoralis* (ALB_PREP_M)

Vreme (min)	0	15	18	20
% B	20	36	70	100

Jedinjenja **47**(arbutin) i **48** (4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozid) su dodatno prečišćena po HPLC programu koji je naveden u **Tabeli 19**.

Tabela 19. HPLC program za prečišćavanje jedinjenja **47** i **48** (ALB00_PREP_M)

Vreme (min)	0	5	14	20	25	30	31
% B	2	2	9	9	20	30	2



Slika 161. Tečni hromatogram butanolnog ekstrakta *Atriplex littoralis*

3.3.2. Razdvajanje frakcija ekstrakta *Atriplex tatarica*

Razdvajanje *n*-butanolnih frakcija sa gravitacione kolone rađeno je semipreparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom na HPLC sistemu *Agilent Technologies* 1100. Korišćena je kolona Zorbax XDB-C18 (250 × 9,4 mm; 5 μm), na 25 °C, pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija je vršena na sledećim talasnim dužinama: 210, 260, 280, 320 i 340 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem koji se sastojao od 0,2% rastvora mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B). Za izolovanje čistih flavonodnih glikozida prečišćene su sledeće frakcije AT_TA_BU28, 29, 30, 33, 35 sa gravitacione kolone. U **Tabeli 20** prikazan je HPLC program za prečišćavanje flavonoidnih glikozida.

Tabela 20. HPLC program za prečišćavanje flavonoidnih glikozida (PROANTO_PREP_M)

Vreme (min)	0	20	28	30	35	36	41
% B	5	16	40	99	99	5	5

Ovim razdvajanjem iz frakcija 33 (29,8 mg) i 35 (89,7 mg) izolovano je jedinjenje **49** (35-3, 33-2 –6,65 mg). Iz frakcija 28-30 (66,3 mg) i 33 izolovano je jedinjenje **50** (28-8, 33-4 –5 mg). Pored jedinjenja 35-3 izolovanog iz frakcije 35, iz iste frakcije nakon dodatnog prečišćavanja 35-4 izolovano je jedinjenje **51**. U **Tabeli 21** prikazan je HPLC program za izolovanje jedinjenja **51** (35-4-1 – 1,9 mg).

Tabela 21. HPLC program za izolovanje jedinjenja **51**

Vreme (min)	0	25	26	31
% B	10	20	10	10

Za izolovanje čistih saponina prečišćene su frakcije AT_TA_BU20 i AT_TA_BU23 sa gravitacione kolone. U **Tabeli 22** prikazan je HPLC program za izolovanje saponina. Kao mobilna faza korišćen je sistem koji se sastojao od vode (A) i acetonitrila (B). Detekcija je vršena na sledećim talasnim dužinama: 210, 254, 205, 280 nm. Iz frakcije AT_TA_BU20 (93,5 mg) izolovano je jedinjenje **12** (20-5 – 2,9 mg),

dok su jedinjenja **52** (23-13 – 6,6 mg) i **53** (23-11 – 1,6 mg) izolovana iz frakcije AT_TA_BU23 (51,6 mg).

Tabela 22. HPLC program za izolovanje saponina (SAPONINI_PREP_M)

Vreme (min)	0	15	18	20
% B	5	50	100	5

3.3.3. Visoko efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) *Atriplex prostrata*

Frakcije 1, 3, 5, 8, 9, 12 sa Sephadex kolone su rastvorene u metanolu, konačna koncentracija je iznosila 100 mg/mL. Na HPTLC silika gel 60 F₂₅₄ ploče, dimenzija 10 × 10 cm nanešeno je u obliku trake po 3 µL svake frakcije.

Pozicija prve trake je bila udaljena sa leve strane 1,50 cm i odozdo 0,80 cm. Rastojanje između traka bilo je 1,54 cm. Nakon nanošenja uzoraka, ploče su potopljene u kadu (ADC2 CAMAG) zasićenu sistemom za razdvajanje: korišćen je sistem CHCl₃:MeOH:H₂O (20:11:2 v/v). Vreme razvijanja ploče je 20 min, a put razdvajanja je 8cm. Nakon odvajanja mobilna faza je uklonjena sa ploče sušenjem u struji hladnog vazduha 5 min. Četiri ploče su korišćene za bioautografiju, a jedna ploča je izazvana anizaldehidnim reagensom kako bi se odredio položaj traka. Razvijena ploča je uronjena u etanolno-anizaldehidni reagens pomoću CAMAG chromatogram immersion device III uređaja i zatim zagrevana 5 min do 100 °C, dok trake nisu postale vidljive.

3.3.4. Hidroliza saponina i flavonoidnih glikozida

Jedinjenja **43 – 54** (1,0 mg) su hidrolizovana pomoću 2 M HCl (1,0 mL) na 100 °C 30 min. Nakon hlađenja svaka smeša je neutralisana do pH 7 sa zasićenim rastvorom NaHCO₃, filtrirana kroz HPLC 0.45 µm filter, i analizirana tečnom hromatografijom na Dionex ICS 3000 DP LC uređaju sa elektrohemijским detektorom (radna elektroda je od zlata, referentna je Ag/AgCl) pri protoku 0,7 mL/min. Standardni rastvori D-glukoze, D-galaktoze, D-glukuronske kiseline, L-arabinoze i L-ramnoze su pripremljeni

rastvaranjem u dejonizovanoj vodi u koncentracijama 20 µg/mL i dodavanjem 70 mg NaCl (ista količina NaCl koja nastaje u uzorcima posle neutralizacije). Monosaharidi u jedinjenjima su dokazani poređenjem sa retencionim vremenima standarda. U **Tabeli 23** je dat program korišćen za analizu monosaharida. Kao mobilna faza korišćen je sistem koji se sastojao od 600 mM rastvora NaOH (A), 600 mM rastvora NaOAc (B) i dejonizovane vode (C).

Tabela 23. HPLC program za analizu monosaharida

Vreme (min)	0	5	5,1	12	12,1	20	20,1	30
% A	15	15	15	15	15	15	20	20
% B	/	/	2	2	4	4	20	20
% C	85	85	83	83	81	81	60	60

3.3.5. Dry flash hromatografija izolovanog ulja *Artemisia santonicum*

Etarsko ulje je frakcionisano dry flash hromatografijom na koloni silika gela (100 g Merck, < 0.08 mm) dimenzija 300 × 32 mm. Kolona je ekvilibrirana mobilnom fazom (750 mL) toluen:etil acetat (70:30 v/v). Etarsko ulje (m = 812 mg) je razblaženo mobilnom fazom (1:1) pre nanošenja na kolonu silika gela. Eluirano je izokratno, dobijeno je 25 frakcija, zapremine oko 10 mL. Frakcije 7 i 8 su spojene i rastvarač uparen na rotacionom vakuum uparivaču bez zagrevanja i dalje prečišćene na drugoj dry flash koloni silika gela dimenzija 300 × 32 mm. Eluirano je smešom toluen:etil acetat (98:2 v/v) od 1-32 frakcije, a zatim je povećana polarnost na (95:5 v/v) od 33-40 frakcije. Dobijeno je 40 frakcija zapremine oko 10 mL. Poslednje dve frakcije su spojene, uparene na rotacionom vakuum uparivaču bez zagrevanja i dalje prečišćene na trećoj dry flash silika gel koloni dimenzija (85 × 20 mm). Eluirano je izokratno smešom rastvarača heksan:etil acetat (85:15 v/v) i dobijeno je 19 frakcija zapremine oko 3 mL. Izogeranilna kiselina (1,15 mg) izolovana je nakon spajanja i uparavanja frakcija (13-19) na rotacionom vakuum uparivaču bez zagrevanja.

3.3.6. Spektroskopski podaci za nova jedinjenja

U ovom poglavlju dati su spektroskopski podaci za nova jedinjenja **43**, **44**, **45**, **51**, **52**, **53**, **54**.

Atriplexin I (43): žuti prah; $[\alpha]_D^{22} - 87$ (*c* 1,0 MeOH); UV λ_{max} , (MeOH) 260, 274, 350; (NaOMe), 276, 388, (AlCl₃), 280, 300sh, 428, (AlCl₃ + HCl), 278, 390, (NaOAc), 266, 274, 350; (NaOAc + H₃BO₃), 264, 290sh, 372; IR ν_{max} 3367, 2936, 1680, 1622, 1565, 1511, 1478, 1395, 1346, 1257, 1217, 1128, 1101, 1072, 1019, 828 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci, dati u **Tabeli 2**; HRESIMS *m/z* 637,1445 [M - H]⁻ (izračunato C₂₈H₃₀O₁₇-H 637,1410).

Atriplexin II (44): žuti prah; $[\alpha]_D^{22} - 82$ (*c* 1,0 MeOH); UV λ_{max} , (MeOH) 240, 270, 346 nm, 270, 392 (NaOMe), 244, 268, 286, 382(AlCl₃), 244, 268, 286, 378 (AlCl₃ + HCl), 260, 278, 346 (NaOAc), 260, 278, 348 (NaOAc + H₃BO₃); IR ν_{max} 3428, 2936, 1681, 1621, 1566, 1514, 1478, 1392, 1346, 1257, 1217, 1128, 1101, 1072, 1019, 828, 799 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci, dati u **Tabeli 2**; HRESIMS *m/z*: 651,1615 [M - H]⁻ (izračunato C₂₉H₃₂O₁₇-H 651,1567).

Atriplexin III (45): žuti prah; $[\alpha]_D^{22} - 22$ (*c* 1,0 MeOH); UV λ_{max} , (MeOH) 240, 270, 346 nm, 270, 394 (NaOMe), 246, 270, 286, 384 (AlCl₃); 246, 270, 286, 384 (AlCl₃ + HCl), 260, 280, 348 (NaOAc), 260, 280, 348 (NaOAc + H₃BO₃); IR ν_{max} 3428, 2936, 1680, 1621, 1565, 1514, 1478, 1392, 1346, 1256, 1216, 1130, 1101, 1072, 1020, 828 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci, dati u **Tabeli 2**; HRESIMS *m/z* 651,1606 [M - H]⁻ (izračunato C₂₉H₃₂O₁₇-H 651,1567).

Atriplexin IV (51): žuti prah; $[\alpha]_D^{22} - 75$ (*c* 2,0, MeOH); UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 254sh (4,23), 272 (4,16), 354 (4,28); (NaOMe), 272 (4,27), 388 (4,43); (AlCl₃), 277 (4,44), 328 (4,37), 400 (4,13); (AlCl₃ + HCl), 275 (4,45), 301sh (4,46), 331 (4,40), 372sh (4,32), 395sh (4,28); 411sh (4,13), (NaOAc), 274 (4,27), 329 (4,29), 382sh (4,04); (NaOAc + H₃BO₃), 267 (4,43), 333 (4,32), 380 (4,22) nm; IR ν_{max} 3417, 2958, 1700, 1651, 1601, 1516, 1471, 1372, 1297, 1271, 1200, 1182, 1068, 816, cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci, dati u **Tabeli 3**; HRESIMS *m/z* 845,1795 [M - H]⁻ (izračunato C₃₈H₃₈O₂₂-H 845,1782).

Atriplexogenin I (52): amorfni prah; $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ 12 (*c* 1,2, MeOH): IR ν_{max} 3414, 2930, 1731, 1648, 1456, 1387, 1371, 1258, 1226, 1074, 1031, 996, 817 cm^{-1} ; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci, dati u **Tabeli 4**; HRESIMS m/z 1005,4381 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (izračunato $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{21}\text{S}-\text{H}$ 1005,4371).

Atriplexogenin II (53): amorfni prah; $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ 6 (*c* 1,0, MeOH): IR ν_{max} 3360, 2926, 1723, 1629, 1598, 1515, 1454, 1373, 1256, 1172, 1071, 1030, 996, 817 cm^{-1} ; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci, dati u **Tabeli 4**; HRESIMS m/z 1007,4552 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (izračunato $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{21}\text{S}-\text{H}$ 1007,4527).

Atriplexogenin III (54): amorfni prah; $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ 19 (*c* 1,8, MeOH): IR ν_{max} 3337, 2924, 1732, 1588, 1455, 1360, 1258, 1172, 1075, 1028, 613 cm^{-1} ; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci, dati u **Tabeli 4**; HRESIMS m/z 1087,5321 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (izračunato $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{23}-\text{H}$ 1087,5331).

3.4. Biološke aktivnosti

3.4.1. Protektivni efekat jedinjenja izolovanih iz *Atriplex littoralis* na DNK humanih limfocita

Uzorci venske krvi su sakupljeni pomoću heparizovanih sterilnih vakutejnera od 5 zdravih muških osoba. Od svake osobe su uzeta dva alikvota po 5 mL krvi, u skladu sa srpskim zdravstvenim i etičkim propisima i etičkom kodeksu Svetskog medicinskog udruženja (Helsinška deklaracija 1964 revidirana 2002).

Prikupljeni uzorci krvi su postavljeni u kontejnere od pleksiglasa u polje unutar zračenja i ozračeni korišćenjem ^{60}Co , izvora γ zraka. Uzorci krvi su ozračeni na sobnoj temperaturi i postavljeni u ćelijske kulture 2 h nakon zračenja. Istovremeno su dodavana i izolovana jedinjenja **43-48**. Doza zračenja je bila 2 Gy (terapeutska doza), a brzina doze je bila 0,45 Gy/min.

Za pripremu mikronukleusa (MN) korišćena je metoda blokirane citokineze.¹⁴⁶ Kulture limfocita su tretirane rastvorima izolovanih jedinjenja (**43-48**) u opsegu koncentracija 0,8–7,4 μM . U jednu od ćelijskih kultura dodat je amifostin WR-2721 (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina (98%); MarligenBiosciences, USA), u

koncentraciji od 4,7 µg/mL koji je služio kao pozitivna kontrola, dok je ćelijska kultura u koju je dodat mitomicin C (3 µM u fosfatnom puferu) služila kao negativna kontrola. Izdvojeno je približno 2×10^6 limfocita iz krvi i prebačeno u 5 mL RPMI-1640 medijuma sa 15% telećeg seruma i 2,4 µg/mL fitohemaglutinina (Invitrogen-Gibco-BRL, USA). Nakon 1h inicijacije ćelijske stimulacije, dodati su rastvori ispitivanih jedinjenja (43-48).

Sve kulture uključujući Amifostin i Mitomicin C su inkubirane u termostatu na 37 °C. Tretman kultura sa jedinjenjima je trajao 19 h, a zatim su sve kulture isprane čistim medijumom, prebačene u 5 mL svežeg RPMI 1640 medijuma (RPMI-1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES; Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) i inkubirane dodatnih 48 h. Citohalasin B (Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) u koncentraciji 6 µg/mL je dodat uzorcima i inkubacija je nastavljena još 24 h. Nakon 72 sata inkubacije, ćelije su prikupljene centrifugiranjem i isprane fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), a zatim hipotoničnim rastvorom (0,56% KCl + 0,9% NaCl, 1:1) na 37 °C. Ćelijske suspenzije su fiksirane smešom metanol/sirćetna kiselina 3:1, ispirane tri puta fiksatorom i nanošene na čist slajd. Na vazduhu osušeni slajdovi boje se alkalnim 2 %-tnim rastvorom Giemsa (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) boje. Za analizu mikronukleusa je prebrojano najmanje 1000 binuklearnih ćelija (BN) po uzorku i pojava mikronukleusa je beležena po kriterijumima Kantrimena i Hedla.¹⁴⁸ Efekti jedinjenja (1-6) na proliferaciju ćelija su određeni preko proliferacionog indeksa blokirane citokineze (CBPI).¹⁵¹

$$CBPI = [(MI + 2MII + 3(MIII + MIV)]/N$$

gde MI–IV predstavlja broj ćelija sa jednim do četiri nukleusa, a N broj pregledanih ćelija. Kriterijumi za selekciju binuklearnih ćelija i identifikaciju mikronukleusa uzeti su sa veb sajta „HUMN project website“ (<http://www.humn.org>). Rezultati za svaki uzorak su izraženi kao učestalost mikronukleusa na 1000 ćelija.

Statistička analiza je urađena pomoću softverskog paketa Origin verzije 7,0. Statistički značaj razlike između parova podataka je određen analizom varijanse (One-way ANOVA) za kojom je sledio Tukey test. Statističke razlike su smatrane značajnim pri $p < 0.01$ i $p < 0.05$.

3.4.2. Antibakterijska aktivnost jedinjenja izolovanih iz *Atriplex tatarica*

Za određivanje antibakterijskog dejstva ispitivanih jedinjenja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije korišćena je modifikovana mikrodiluciona metoda.^{155,156} Korišćene su dve Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) i dve Gram-pozitivne bakterije: *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240). U ovom testu su ispitivana jedinjenja (49-54).

Prekonoćne kulture ($1,0 \times 10^9$ ćelija/mL) dobijene su gajenjem testiranog bakterijskog soja tokom 24 h na 37 °C u 2 mL tečne hranljive podloge (Tryptic Soy Broth – TSB, Torlak). Suspenzije bakterija (inokulumi) podešene su sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije $1,0 \times 10^6$ ćelija/mL i čuvane na 4 °C do upotrebe.

Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije (MIK i MBK) su određene serijskim razblaženjima korišćenjem mikrotitar ploča sa ravnim dnom sistem sa 96-bunarčića. U bunarčice sterilnih ploča sipa se tečni medijum, zatim se dodaju jedinjenja koja se testiraju i na kraju suspenzije bakterija. Nakon dodavanja suspenzije bakterija mikrotitracione ploče se inkubiraju na 37 °C u toku 24 h. Blank kolona sadrži samo medijum, dok druga kolona sadrži medijum i inokulume kako bi se ispratio rast bakterija bez uticaja testiranih jedinjenja. Posle inkubacije definišu se MIK vrednosti, kao najniže koncentracije koje su rezultovale inhibicijom rasta bakterija. Da bi se odredilo odsustvo rasta bakterija (MBK vrednost) iz bunarčića gde nije zabeležen rast bakterija uzeto je 10 µL inokulisane podloge u 100 µL sterilne hranljive podloge i inkubirano tokom 24 h na 37 °C. Koncentracija koja dovodi do smrtnosti 99,5% bakterija u odnosu na kontrolnu probu uzeta je za MBK. Radi lakše vizualizacije rezultata u bunarčice je dodato po 40 µl indikatorske ljubičaste *p*-jodonitrotetrazolijum (INT, I 8377–Sigma, SAD) boje. Nakon dva sata inkubacije na 37 °C rast bakterija je potvrđen u bunarčićima čiji je sadržaj postao obojen intenzivnom crveno-ljubičastom bojom, u bunarčićima gde nije došlo do promene boje nije utvrđen rast bakterija (Tsukatani, 2012)¹⁵⁶. Komercijalni antibiotici, Ampicilin i Streptomycin su korišćeni kao pozitivne kontrole. Za poređenje intenziteta boje korišćeni su kontrolni bunarčići u kojima je omogućen neometani rast bakterija.

3.4.3. Određivanje uticaja izolovanih jedinjenja iz *Atriplex tatarica* na proces formiranja biofilma PAO1

Pseudomonas aeruginosa (PAO1) korišćen u ovoj studiji se nalazi deponovan u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Bakterija je gajena na 37 °C na LB podlozi.

Efekat ispitivanih jedinjenja u različitim koncentracijama (u rasponu od 0,5, 0,25 i 0,125 MIK) na sposobnost formiranja biofilma testiran je na polistirenskim mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom sa 96 bunarčića, po metodi Spoering i Lewis,¹⁵⁹ sa nekim modifikacijama. U svaki bunarčić ploče stavljeno je po 100 µL hranljive podloge, zatim je dodato po 100 µL subMIK koncentracije ispitivanih jedinjenja (49–54) i na kraju po 100 µL prekonocne kulture PAO1 ($1,0 \times 10^8$ ćelija po mL). Posle 24 h inkubacije na 37 °C ploča je isprana dva puta sterilnim PBS-om (pH 7,4) i osušena na vazduhu i fiksirana metanolom (10 min). Da bi se odredila masa biofilma ploča je tretirana 0,1% rastvorom boje kristal violet (iz seta za bojenje po Gramu, Bio-Merieux, Francuska). Nakon 10 min boja je odstranjena iz bunarčića i ploče su osušene tokom 10 minuta. U svaki bunarčić je dodato po 100 µL 96% etanola da bi se resuspendovala boja. Sadržaj bunarčića je homogenizovan, a apsorbancu očitana na 625 nm na Elisa čitaču (Sunrisetm-Tecan ELISA, Mannedorf, Švajcarska). Rezultati su prikazani kao procenat inhibicije formiranja biofilma u odnosu na kontrolu: Eksperiment je izveden u triplikatu i ponovljen dva puta, a vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardna greška.

3.4.4. Antibakterijska aktivnost – metoda bioautografije

Metodom bioautografije na HPTLC pločama testiran je antibakterijski potencijal frakcija izolovanih iz biljne vrste *A. prostrata* (Horvath i sar., 2010).¹⁶⁰ Korišćene su komercijalne HPTLC silika gel 60 F₂₅₄ aluminijske ploče (Merck, Nemačka). Izolovane frakcije su rastvorene u metanolu (100 mg/mL) nanete na ploču dimenzija 10 × 10 cm, a zatim su ploče potopljene u zasićenu kadu (ADC2 CAMAG), korišćen je

sistem CHCl₃:MeOH:H₂O (20:11:2 v/v). Posle 20 min razvijanja ploče je, mobilna faza je uklonjena sa ploče sušenjem u struji hladnog vazduha 5 min. Ploče su prskane suspenzijama 4 različite bakterije (*Escherichia coli* ATCC 35210, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Micrococcus flavus* ATCC 10240. odgovarajuće koncentracije ($1,0 \times 10^8$ ćelija/mL), inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Nakon inkubacije ploče su prskane 3% rastvorom boje ljubičasta *p*-jodonitrotetrazolijum-hlorid i ponovo inkubirane tokom 3 h. Da bi se zaustavio rast mikroorganizama nakon druge inkubacije ploče su prskane 70% rastvorom etanola. Zone inhibicije rasta testiranih bakterija javljaju se kao jasne nebojene zone u odnosu na roze obojenu podlogu koja potiče od formazana (označava oblasti rasta mikroorganizama).¹⁶⁰

3.4.5. Antibakterijska aktivnost etarskog ulja *Artemisia santonicum* i izogeranilne kiseline mikrodiluciona metoda

Za određivanje antibakterijske aktivnosti etarskog ulja korišćene su sledeće bakterije: Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (klinički izolat), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), i Gram-pozitivne bakterije: *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), i *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632). *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *L. monocytogenes* (NCTC 7973) i *M. flavus* (ATCC 10240) su korišćene za određivanje antibakterijske aktivnosti izogeranilne kiseline. Za utvrđivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) ulja i izogeranilne kiseline korišćena je modifikovana mikrodiluciona metoda¹⁵⁵ u mikrodilucionim pločama sa ravnim dnom, 96 sistem. Postupak opisan u poglavlju 3.4.2. Streptomycin (Sigma-Aldrich S6501) i Ampicillin (Sigma-Aldrich A9393) su korišćeni kao pozitivne kontrole (1 mg/mL).

3.4.6. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti metodom bioautografije

U poglavlju 3.2.6. opisan je postupak nanošenja ulja i razvijanja HPTLC ploča. Nakon ukljanjanja mobilne faze ploče su osušene i izazvane sveže napravljenim bakterijama ($1,0 \times 10^6$ CFU/mL) na hranljivoj podlozi (Tryptic Soy Broth; Biolife Italiana S.r.l., Milano-Italia). Ploče su inkubirane u parnoj komori na 37 °C 24 sata i izazvane 3% vodenim rastvorom *p*-jodonitrotetrazolijum ljubičastog, ostavljene da stoje još 3h i poprskane 70% etanolom kako bi se zaustavio rast bakterija. Inhibicije rasta mikroba uočavaju se kao jasne zone u odnosu na roze pozadinu, pa su određene njihove R_f vrednosti.¹⁶⁰ U eksperimentu su upotrebljene Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), i Gram-positivne bakterije: *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) i *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973).

3.4.7. Antifungalna aktivnost etarskog ulja i izogeranilne kiseline *Artemisia santonicum*

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti ulja korišćeno je osam gljiva: *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 9197), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112), *Trichoderma viride* (IAM 5061), i *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane), dok je za određivanje aktivnosti izogeranilne kiseline korišćeno četiri gljive: *A. niger*, *A. fumigatus*, *P. ochrochloron*, *P. verrucosum*. Mikromicete su deponovane u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Sojevi su presejavani jednom mesečno na čvrstoj malt-agar hranljivoj podlozi (MA, Torlak, Srbija) i skladišteni na 4 °C.¹⁶¹ Korišćena je modifikovana mikrodiluciona metoda.¹⁵⁵ Spore gljiva su isprane sa površine agar ploča sterilnim 0,85% slanim rastvorom koji sadrži 0,1% Tveen 80 (v/v). Suspenzija spora podešena je sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije $1,0 \times 10^5$ ćelija/mL. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) rađeno je tehnikom serijskog razblaživanja koristeći mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića. Etarsko ulje i izogeranilna

kiselina su rastvorene u 5% DMSO (1 mg/ml) i dodavani malt medijumu sa inokulumom. Ploče su inkubirane 72 h na 25 °C. Najniže koncentracije gde nije bilo vidljivog rasta gljiva (na binokularnom mikroskopu) definisane su kao MIK. Fungicidne koncentracije (MFK) su određene serijskom reinokulacijom: u 100 µL sterilne podloge (MA) dodato je 10 µL inokulisane podloge iz bunarčića gde nije zabeležen rast gljiva i inkubirano 72 h na 25 °C. Najniža koncentracija bez vidljivog rasta je definisana kao MFK, što ukazuje da te koncentracije uzoraka dovode do 99,5% smrtnosti gljiva u odnosu na početni inokulum. 5% DMSO je korišćen kao negativna kontrola (medijum, DMSO i inokulum), a kao pozitivne kontrole su upotrebljavani komercijalni fungicidi, bifonazol i ketokonazol. Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni tri puta.

3.4.8. Određivanje uticaja ulja i izogeranilne kiseline na proces formiranja biofilma PAO1

Pseudomonas aeruginosa (PAO1) korišćen u ovoj studiji se nalazi deponovan u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Bakterija je gajena na 37 °C na LB podlozi. Efekat različitih subinhibitornih koncentracija etarskog ulja (0,125 – 0,5 MIK; MIK = 4,0 mg/mL) i izogeranilne kiseline (0,125 – 0,5 MIK; MIK = 0,075 mg/mL) na formiranje biofilma testiran je na polistirenskim mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom sa 96 bunarčića kao što je opisano u poglavlju 3.4.3. Apsorbanca je očitana na 625 nm na Elisa čitaču (Sunrisetm-Tecan ELISA, Mannedorf, Švajcarska). Rezultati su prikazani kao procenat inhibicije formiranja biofilma u odnosu na kontrolu: Eksperiment je izveden u triplikatu i ponovljen dva puta, a vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardna greška.

$$[(\text{OG kontrola} - \text{OG uzorak}) / \text{OG kontrola}] \times 100$$

OG-optička gustina ili apsorbanca

3.4.9. Testovi pokretljivosti (twitching i flagella test)

Testovi pokretljivosti „**twitching i flagella**“ su izvedeni prema metodi koju su opisali O’Toole i Kolter (1998 a i b) i Sandy i Foong-Yee (2012).^{134,162,163} Etarsko ulje i izogeranilna kiselina zapremine po 50 μ L (0,5 subMIK 2,00 mg/mL i 0,0375 mg/mL) pomešani su sa 10 mL rastopljenog MH agar medijuma i naneti na površinu preko već ohlađene LB podloge u Petri kutiji. Prekonoćna kultura PAO1 je inkubirana na 37 °C u toku 24 h i naneta (1 μ L) na podlogu, a zatim inkubirana još tri dana na sobnoj temperaturi. Posle druge inkubacije, merene su zone pokretljivosti i opisivane morfološke karakteristike – ivice kolonija, pomoću binokularnog mikroskopa (Leika, tip 020-518.500 DM LS, Nemačka).

3.4.10. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i izogeranilne kiseline na inhibiciju sinteze piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1

Inhibicija sinteze pigmenta piocijanina ispitivana je metodom koju su razvili Sandy i Foong-Yee (2012).¹⁶² Optička gustina (OG_{600nm}) prekonoćne kulture PAO1 podešena je na vrednost 0,2. Ulje i izogeranilna kiselina u subinhibitornim koncentracijama (0,5 MIK: 2,00 mg/mL i 0,0375 mg/mL) dodati su inokulumu (4,75 mL) i suspenzija je inkubirana 24 h na 37 °C. Suspenzija je ekstrahovana sa 3 mL hloroforma i hloroformskoj fazi dodata je hlorovodonična kiselina (1 mL, 0,2 M HCl). Ekstrahovanom sloju roze boje gde se nalazi pigment piocijanin izmerena je apsorbanca na 520 nm (Shimadzu UV1601, Japan). Streptomycin (Sigma P 7794) je korišćen kao pozitivna kontrola. Eksperiment je izveden u triplikatu i ponovljen dva puta, a vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardna greška. Inhibicija sinteze piocijanina pod uticajem ulja i izogeranilne kiseline u odnosu na kontrolni inokulum određena je primenom sledećeg obrasca:

$$\% I = (OG_{520}/OG_{600} \times 100)$$

4. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije hemijski su ispitane tri halofitne vrste roda *Atriplex* i jedna vrsta roda *Artemisia*. Prikazani su postupci izolovanja, prečišćavanja sekundarnih metabolita i detaljno je opisana njihova hemijska karakterizacija 1D (^1H i ^{13}C) i 2D (COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, HSQC i HMBC) NMR tehnikama, UV i IR spektroskopijom, masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRESIMS) i polarimetrijom.

Iz biljne vrste *A. littoralis* izolovana su tri nova flavonoidna derivata kvercetagetinskog tipa (atripleksin I, II, III, **43-45**), jedan poznati flavonoidni glikozid, spinacetin 3-*O*- β -D-glukopiranozid (**46**) i dva poznata fenolna jedinjenja, arbutin (**47**) i 4-hidroksibenzil- β -D-glukopiranozid (**48**). Za ova jedinjenja po prvi put je ispitan i opisan protektivni efekat na DNK humanih limfocita. Najbolju aktivnost, smanjenje pojave mikronukleusa, pokazao je atripleksin III (**45**).

Iz vrste *A. tatarica* izolovan je jedan nov flavonoid patuletinskog tipa, atripleksin IV, dva poznata flavonoida patuletinskog tipa, patuletin 3-*O*- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid (**49**) i patuletin 3-*O*-(5''-*O*-feruloil)- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid (**50**), ali po prvi put izolovana iz ove biljne vrste, i tri nova pentaciklična triterpenska saponina oleanolnog tipa, β -D-glukopiranozil-3-*O*-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oata (**52**), β -D-glukopiranozil-3-*O*-(2-sulfo- β -D-galaktopiranozil) (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-hidroksi-olean-12-en-28-oat (**53**), β -D-glukopiranozil-3-*O*- β -D-glukopiranozil(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid-30-al-olean-12-en-28-oat (**54**). Za ovih šest jedinjenja ispitana je antibakterijska aktivnost na četiri različite bakterijske vrste (*Micrococcus flavus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*) mikrodilucionom metodom i njihov uticaj na proces formiranja biofilma bakterije *P. aeruginosa*. Atripleksin IV je pokazao najbolju aktivnost prema *M. flavus* i *P. aeruginosa*, a jedinjenje **49** je pokazalo najjaču aktivnost prema *L. monocytogenes* i *E. coli*. Pentaciklični triterpensi saponini (**52-54**) su imali bolju aktivnost inhibicije formiranja biofilma od izolovanih patuletinskih derivata. Najbolju anti-biofilm aktivnost je pokazao sulfatni saponin (**52**).

Kombinacija visokoefikasne tankoslojne hromatografije i bioautografije je korišćena za određivanje bioloških aktivnosti frakcija koje su izolovane iz *Atriplex prostrata*. Saponinske frakcije su pokazale antibakterijski potencijal prema svim ispitivanim bakterijskim sojevima (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *M. flavus*, dok je flavonoidna frakcija inhibirala samo dejstvo *M. flavus*.

Iz *Artemisia santonicum* izolovano je etarsko ulje, određen njegov hemijski sastav i relativni udeo komponenata korišćenjem GC/FID i GC/MS tehnika. Najzastupljenija jedinjenja bili su oksigenovani monoterpenski ugljovodonici, od kojih se izdvajaju 1,8-cineol (18,8%), hrizantenon (13,3%), *cis*-tujon (8,4%), *trans*-sabinilacetat (3,3%) i kamfor (3,3%). Izolovano etarsko ulje je pokazalo antibakterijsku, antifungalnu, antibiofilm i „antiquorum sensing“ aktivnost. Primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije sa bioautografijom detektovana je aktivnost ulja, ali i bioaktivnog jedinjenja iz ulja. Kao ubedljivo najaktivnija komponenta iz ulja je izolovana izogeranilna kiselina i potvrđena je njena antimikrobna aktivnost koja je izraženija od aktivnosti samog etarskog ulja i komercijalnih antibiotika (streptomycin i ampicilin) i antimikotika (bifonazol i ketokonazol).

U okviru ove doktorske teze je po prvi put ispitan sastav sekundarnih metabolita halofitnih biljaka sa naših prostora. Kako izolovana jedinjenja pripadaju fenolnim i triterpenskim grupama sekundarnih metabolita rezultati ispitivanja predstavljaju doprinos u boljem razumevanju taksonomskog statusa ovih biljnih vrsta. S obzirom na pokazanu biološku aktivnost, ispitane biljne vrste predstavljaju potencijalno nov izvor aktivnih sekundarnih metabolita.

Literatura

1. Dajić, Z. (2006) Salt stress – salinity and tolerance mechanisms in plants. In: Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Jenardhan Reddy K. (Eds.) Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 41–99.
2. FAO Land and Plant Nutrition Management Service (n.d.). Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. Retrieved November, 3, 2003 from <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.html>
3. Vasin J., Belić M., Nešić Lj., Ninkov J., Škorić Zeremski T. (2010) *Savremena poljoprivredna tehnika* **36**, 220-227.
4. Richards L.A. (1954) Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Agriculture Handbook, 60. US Department of Agriculture, USA.
5. Pessarakli M., Szabolcs I. (1994) Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. In Pessarakli M. (Eds.) Handbook of Plant and Crop Stress. MarcelDekker, New York, pp. 1-15.
6. Waisel Y. (1972) Biology of Halophytes, Academic press, New York.
7. <http://www.biologydiscussion.com/plants/halophytes-classification-and-characters-of-halophytes-with-diagram/6932>.
8. OhD H., Dassanayake M., Bohnert H.J., Cheeseman J.M. (2012) Life at the extreme: lessons from the genome, *Genome Biol* **13**, 241.
9. Ksouri R., Ksouri W.M., Jallali I., Debez A., Magne C., Hiroko I., Abdelly C. (2012) Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit Rev Biotechnol* **32**, 289–326.
10. Daraban I.N., Arsene G.G., Turcus V., Ardelean A. (2013) Assessment on bioeconomical potential for medicinal plants in salty meadows from the Aradului plain (W. Romania). *Studia Univ VG, SSV* **23**, 71-78.
11. Strogonov B.P. (1964) Physiological basis of salt tolerance in plants. Academy of Science USSR and Davey and Co, New York, USA.
12. Zhao K., Hai F., Ungar I.A. (2002) Survey of halophyte species in China. *Plant Sci* **163**, 491-498.

13. Aslam R., Bostan N., Amen N., Maria M., Safdar W. (2011) A critical review on halophytes: Salt tolerant plants. *J Med Plant Res* **5**, 7108-7118.
14. Kamphorst A., Bolt G.H. (1976) Saline and sodic soils. In Bolt G.H., Bruggenwert M.G.M. (Eds.) *Soil chemistry: A. basic elements*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Netherlands, pp. 171-191.
15. Szabolcs I. (1989) *Salt-affected soils*. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
16. Osmond C.B., Bjorkman O., Anderson D.J. (1980) *Physiological processes in plant ecology. Towards a synthesis with Atriplex*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
17. Salama F.M., El-Naggar S.M., Ramadan T. (1999) Salt glands of some halophytes in Egypt. *Phyton* (Horn Austria) **39**, 91-105.
18. Breckle S.W., Freitas H., Reimann C. (1990) Sampling *Atriplex* bladders: a comparison of methods. *Plant Cell Environ* **13**, 871-873.
19. Jeschke W.D., Stelter W. (1983) Ionic relation of Garden Orache, *Atriplex hortensis* L.: Growth and ion distribution at moderate salinity and function of bladder hairs. *J Exp Bot* **34**, 795-810.
20. Freitas H., Breckle S.W. (1992) Importance of bladder hairs for the salt tolerance of field grown *Atriplex* species from a Portuguese salt marsh. *Flora* **187**, 283-297.
21. Koyro H.W., Khan M.A., Lieth H. (2011) Halophytic crops: A resource for the future to reduce the water crisis? *Emir J Food Agric* **23**, 001-016.
22. Day C. (1990) Hypoglycaemic compounds from plants. In: Bailey C.J., Flatt P.R. (eds.) *New Antidiabetic Drugs*. Smith-Gordon, London, UK, pp. 267.
23. Bayoumi M.T., El-Shaer H.M. (1992) Impact of halophytes on animal health and nutrition. In: Squires, V.R., Ayoub A.T. (eds.) *Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 267.
24. Fournier P. (1999) *Plantes medicinales*. CME, Luxembourg, pp. 369.
25. Meot-Duros L., Le Floch G., Magne C. (2008) Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *J Ethnopharmacol* **116**, 258–262.
26. Lauro L., Rolih C. (1990) Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait. *Boll Soc Ital Biol Sper* **66**, 829–834.

27. Duan J.A., Williams I.D., Che C.T., Zhou R.H., Zhao S.X. (1999) Tangutorine: A novel 13-carboline alkaloid from *Nitraria tangutorum*. *Tetrahedron Lett* **40**, 2593–2596.
28. Bang M.A., Kim H.A., Cho Y.J. (2002) Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary hamcho powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **31**, 840–846.
29. Qasim M. Gulzar S. Khan A. (2011) Halophytes as medicinal plants. In: Ozturk M., Mermut A.R., Celik A. (eds.) *Urbanisation, land use, land degradation and environment*. Daya Publishing House, Delhi, India, pp. 330–343.
30. Jarić S., Popović Z., Mačukanović-Jocić M., Djurdjević L., Mijatović M., Karadžić B., Mitrović M., Pavlović P. (2007) An ethnobotanical study of the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol* **111**, 160–175.
31. Guarrera P.M., Forti G., Marignoli S. (2005) Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J Ethnopharmacol* **96**, 429–444.
32. Dajić Stevanović Z., Petrović M., Ačić S. (2014) Ethnobotanical knowledge and traditional use of plants in Serbia in relation to sustainable rural development. In: Pieroni A., Quave C.L. (eds.) *Ethnobotany and Biocultural Diversities in the Balkans*. Springer, New York, pp. 229–252.
33. Dajić Stevanović Z., Ačić S., Luković M., Zlatković I., Vasin J., Topisirović G., Šilc U. (2016) Classification of continental halophytic grassland vegetation of Southeastern Europe. *Phytocoenologia* **46**, 317–331.
34. Dajić Stevanović Z., Stanković M.S., Stanković J., Janačković P., Stanković M. (2019) Use of halophytes as medicinal plants: Phytochemical diversity and biological activity. In: Hasanuzzaman M., Shabala S., Fujita M. (Eds) *Halophytes and Climate Change: Adaptive Mechanisms and Potential Uses*. CABI, Boston, USA, pp. 343–368.
35. Stanković S.M., Petrović M., Gođevac D., Stevanović Dajić Z. (2015) Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *J Arid Environ* **120**, 26–32.

36. Slavnić Z. Genus *Atriplex*. In: Josifović M. (Eds.). Flora of Republic of Serbia III; Serbian Academy of Science and Art; Belgrade, 1972: 30–38.
37. Tutin T.G., Burges N.A., Chater O.A., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. (1993) Flora Europaea, Vol. 1, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
38. Gajić M. Genus *Artemisia*. In: Josifović M. (Eds.). Flora of Republic of Serbia VII; Serbian Academy of Science and Art; Belgrade, 1975: 121–128.
39. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. (1976) Flora Europaea, Vol. 4, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge University Press, Cambridge.
40. Bylka W. (2004) A new acylated flavonol diglycoside from *Atriplex littoralis*. *Acta Physiol Plant* **26**, 393–398.
41. Al-Jaber N.A.A., Mujahid T.G., Al-Hazmi H.M.G. (1991) Flavonoids from *Atriplex farinosa*. *J King Saud Univ* **2**, 163–167.
42. Awaad A.S., Maitland D.J., Donia Ael R., Alqasoumi S.I., Soliman G.A. (2012) Novel flavonoids with antioxidant activity from a Chenopodiaceous plant. *Pharm Biol* **50**, 99–104.
43. Zhang Y., Zhao Y.M. (2005) Studies on the chemical constituents of *Atriplex centralasiatica*. *Zhongguo-Zhong-Yao-Za-Zhi* **30**, 679–81.
44. Bylka W., Stobiecki M., Frański R. (2001). Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. *Acta Physiol Plant* **23**, 285–290.
45. Clausera M., Dall'Acqua S., Loib M.C., Innocenti G. (2013) Phytochemical investigation on *Atriplex halimus* L. from Sardinia. *Nat Prod Res*, 1940–1944.
46. Shaker K.H., Dockendorff K., Seifert K.Z. (2003) Triterpenoid Saponins from *Atriplex semibaccata*. *Z Naturforsch C* **58**, 485–489.
47. Jabrane A., Jannet H.B., Miyamoto T., Tanaka C., Mirjolet J.F., Duchamp O., Harzallah-Skhiri F., Lacaille-Dubois M.A. (2011) Glucosides A–C, three saikosaponins from *Atriplex glauca* L. var. *ifiniensis* (Caball) Maire. *Magn Reson Chem* **49**, 83–89.
48. Siddiqui B.S., Ahmed, S., Ghiasuddin, Khan M.A.U. (1994) Triterpenoids of *Atriplex stocksii*. *Phytochemistry* **37**, 1123–1125.

49. El-Sayed, Mortada M. (1998) Study of the saponin content of *Atriplex stylosa* Viv. and its molluscicidal effect. *Bull Pharm Sci Assiut Univ* **21**, 237–243.
50. Franz C., Novak J. Sources of Essential Oils. In: Baer K.H.C., Buchbauer G.(2016) Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 39-83.
51. Abad M.J., Bedoya L.M., Apaza L., Bermejo P. (2012) The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules***17**, 2542-2566.
52. Kordali S., Cakir A., Mavi A., Kilic H., Yildirim A. (2005) Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *J Agric Food Chem* **53**, 1408–1416.
53. Badea M.L., Delian E. (2014) In vitro antifungal activity of the essential oils from *Artemisia* spp. L. on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rom Biotech Lett* **19**, 9345-9352.
54. Burzo I., Ciocarlan V.B., Delian E., Dobrescu A., Badulescu L. (2008) Researches regarding the essential oil composition of some *Artemisia* L. species. *Analele stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" Iasi, Tomul LIV, fasc. 2, s.II a. Biologie vegetala*, 86-91.
55. Vuletić A. Essential oil composition of halophyte *Artemisia santonicum* L. (Asteraceae) from different habitats. Master's Thesis.
56. Selmar D., Kleinwachter M. (2013) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Ind Crop Prod* **42**, 558-566.
57. Trabelsi N., Oueslati S., Falleh H., Waffo-Teguo P., Papastamoulis Y., Merillon J.M., Abdelly C., Ksouri R. (2012) Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chem* **135**, 1419–1424.
58. Bouzidi A., Benzarti A., Arem A.E., Mahfoudhi A., Hammami S., Gorcii M., Mastouri M., Hellal N.A., Mighri Z. (2016) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial effects of Tunisian *Limoniastrum guyonianum* Durieu ex Boiss extracts. *Pak J Pharm Sci* **29**, 1299–305.
59. Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. (2008) Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C R Biol* **331**, 865–873.
60. Sunita P., Jha S., Pattanayak, S.P. (2011) Anti-inflammatory and *in vivo* antioxidant activities of *Cressa cretica* Linn a halophytic plant. *Middle East J Sci Res* **8**, 129–140.

61. Oueslati S., Ksouri R., Falleh H., Pichette A., Abdelly C., Legault J. (2012) Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forsk. *Food Chem* **132**, 943–947.
62. Oueslati S., Ksouri R., Pichette A., Lavoie S., Girard-Lalancette K., Mshvildadze V., Abdelly C., Legault J. (2014) A new flavonol glycoside from the medicinal halophyte *Suaeda fruticosa*. *Nat Prod Res* **28**, 960–966.
63. Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol Biochem* **45**, 244–249.
64. Atia A., Barhoumi Z., Mokded R., Abdelly C., Smaoui A. (2011) Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *J Med Plant Res* **5**, 3564–3571.
65. Pereira C.G., Barreira L., da Rosa Neng N., Nogueira J.M.F., Marques C., Santos T.F., Varela J., Custodio L. (2017a) Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food Chem Toxicol* **107**, 581–589.
66. Lee J., Kong C.S., Jung M., Wan Hong J., Young L.S., Seo Y. (2011) Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. *Biotechnol Bioprocess Eng* **16**, 992–999.
67. Korulkina L.M., Shults E.E., Zhusupova G.E., Abilov Zh.A., Erzhanov K.B., Chaudri M.I. (2004) Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii* I. *Chem Nat Compd* **40**, 465–471.
68. Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaie K., Bakrouf A., Magne C., Abdelly C. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol* **47**, 2083–2091.
69. Falleh H., Ksouri R., Medini F., Guyot S., Abdelly C., Magne C. (2011a) Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Ind Crops Prod* **34**, 1066–1071.
70. Falleh H., Oueslati S., Guyot S., Dali B.A., Magne C., Abdelly C., Ksouri R. (2011b) LC/ESI-MS/MS characterisation of procyanidins and propelargonidins

responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Food Chem* **127**, 1732–1738.

71. Rodrigues M.J., Gangadhar K.N., Vizetto-Duarte C., Wubshet S.G., Nyberg N.T., Barreira L., Varela J., Custodio L. (2014) Maritime halophyte species from southern Portugal as sources of bioactive molecules. *Mar Drugs* **12**, 2228–2244.

72. Benhammou N., Bekkara F.A., Kadifkova-Panovska T. (2009) Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C R Chim* **12**, 1259–1266.

73. Karker M., Falleh H., Msaada K., Smaoui A., Abdelly C., Legault J., Ksouri R. (2016) Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the medicinal halophyte *Reaumuria vermiculata*. *EXCLI Journal* **15**, 297–307.

74. Ksouri W.M., Medini F., Mkadmini K., Legault J., Magne C., Abdelly C., Ksouri R. (2013) LC-ESI-TOF-MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. *Food Chem* **139**, 1073–80.

75. Behery F.A., Naeem Z.E., Maatooq G.T., Amer M.M., Ahmed A.F. (2013) A novel antioxidant phenanthrenoid dimer from *Juncus acutus* L. *Nat Prod Res* **2**, 155–63.

76. Rodrigues M.J., Gangadhar K.N., Vizetto-Duarte C., Wubshet S.G., Nyberg N.T., Barreira L., Varela J., Custodio L. (2014) Maritime halophyte species from southern Portugal as sources of bioactive molecules. *Mar Drugs* **12**, 2228–2244.

77. Pereira C.G., Custodio L., Rodrigues M.J., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Carlier J., Costa M.C, Varela J., Barreira L. (2017b) Profiling of antioxidant potential and phytoconstituents of *Plantago coronopus*. *Braz J Biol* **77**, 632–641.

78. Kim H.S., Kim J.A., Karadeniz F. Ahn, B.N., Kong C.S. (2014) Radical scavenging and anti-inflammatory effects of the halophyte *Spergularia marina* Griseb. *Z Naturforsch CJ Biosci* **69**, 425–433.

79. Cushine T.P.T., Lamb A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **26**, 343–356.

80. Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 564–582.

81. Lou Z., Wang H., Zhu S., Ma C., Wang Z. (2011) Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci* **76**, 398–403.

82. Janačković P., Novaković J., Soković M., Vujisić Lj., Giweli A.A., Dajić Stevanović Z., Marin P.D. (2015) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *A. herba-alba* and *A. arborescens* from Libya. *Arch Biol Sci* **67**, 455–466.
83. Jdey A., Falleh H., Jannet B.S., Mkadmini H.K., Dauvergne X., Ksouri R., Magne C. (2017) Phytochemical investigation and antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase performances of six medicinal halophytes. *S Afr J Bot* **112**, 508–514.
84. Jallali I., Zaouali Y., Missaoui I., Smeoui A., Abdelly C., Ksouri R. (2014) Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chem* **15**, 1031–1038.
85. Dajić Stevanović Z., Pljevljakušić D., Ristić M., Šoštarić I., Kresović M., Simić I., Vrbničanin S. (2015a) Essential oil composition of *Achillea millefolium* agg. populations collected from saline habitats in Serbia. *J Essential Oil Bear Pl* **18**, 1343–1352.
86. Dajić Stevanović Z., Pljevljakušić D., Soković M., Glamočlija J., Stanković M., Rančić D., Todorović I., Petrović M., Gavrilović M., Janacković P. (2015b) Essential oil of the halophyte *Artemisia santonicum*: tissue localization, chemical characterization and biological activity. The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (oral presentation), April 22–25th, 2015, Antalya - Turkey. Abstract book, p. 73.
87. Megdiche-Ksouri W., Trabelsi N., Mkadmini K., Bourgou S., Noumi A., Snoussi M., Barbria R., Tebourbi O., Ksouri R. (2015) *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind Crops Prod* **63**, 104–113.
88. Wang X., Zhang M., Zhao Y., Wang H., Liu T., Xin Z. (2013) Pentadecyl ferulate, a potent antioxidant and antiproliferative agent from the halophyte *Salicornia herbacea*. *Food Chem* **141**, 2066–2074.
89. Kang S., Kim D., Lee B.H., Kim M.R., Chiang M., Hong J. (2011) Antioxidant properties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea*) seed extracts on human intestinal cells. *Food Sci Biotechnol* **20**, 115–122.
90. Medini F., Bourgou S., Lalancette K.G., Snoussi M., Mkadmini K., Cote I. Abdelly C., Legault J., Ksouri R. (2015) Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory,

and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *S Afr J Bot* **99**, 158–164.

91. Boulaaba M., Mkadmini K., Tsolmon S., Han J., Smaoui A., Kawada K., Ksouri R., Isoda H., Abdelly C. (2013a) In vitro antiproliferative effect of *Arthrocnemum indicum* extracts on Caco-2 cancer cells through cell cycle control and related phenol LC-TOF-MS identification. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1-11.

92. Boulaaba M., Tsolmon S., Ksouri R., Han J., Kawada K., Smaoui A., Abdelly C., Isoda H. (2013b) Anticancer effect of *Tamarix gallica* extracts on human colon cancer cells involves Erk1/2 and p38 action on G2/M cell cycle arrest. *Cytotechnology* **65**, 927–936.

93. Kong C.S., Kim Y.A., Kim H., Seo Y. (2016) Evaluation of a furochromone from the halophyte *Corydalis heterocarpa* for cytotoxic activity against human gastric cancer (AGS) cells. *Food Funct* **7**, 4823–4829.

94. Kamal Z., Ullah F., Ahmad S., Ayaz M., Sadiq A., Imran M., Ahmad S., Rahman F.U., Zeb A. (2017) Saponins and solvent extracts from *Atriplex laciniata* L. exhibited high anthelmintic and insecticidal activities. *J Tradit Chin Med* **37**, 599-606.

95. Sarıkahya N.B., Kirmizigül S. (2010) Antimicrobial Triterpenoid Glycosides from *Cephalaria scoparia*. *J Nat Prod* **73**, 825–830.

96. Lunga P.K., Qin X.J., Yang X.W., Kuate J.R., Du Z.Z., Gatsing D. (2014) Antimicrobial steroidal saponin and oleanane-type triterpenoid saponins from *Paullinia pinnata*. *BMC Complement Altern Med* **14**, 369.

97. Mair C.E., Grienke U., Wilhelm A., Urban E., Zehl M., Schmidtke M., Rollinger J.M. (2018) Anti-Influenza Triterpene Saponins from the Bark of *Burkea africana*. *J Nat Prod* **81**, 515–523.

98. Tava A., Pinarosa A. (2006) Chemical and Biological Activity of Triterpene Saponins from *Medicago* Species. *Nat Prod Commun* **1**, 1159-1180.

99. Alvarado-Sansininea J.J., Sanchez-Sanchez L., Lopez-Munoz H., Escobar M.L., Flores-Guzman F., Tavera-Hernandez R., Jimenez-Estrada M. (2018) Quercetagenin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules* **23**, 2579-2596.

100. Pawłowska K., Czerwinska M.E., Wilczek M., Strawa J., Tomczyk M., Granica S. (2018) Anti-inflammatory Potential of Flavonoids from the Aerial Parts of *Corispermum marschallii*. *J Nat Prod* **81**, 1760–1768.
101. Kokanova-Nedialkova Z., Nedialkov P., Kondeva-Burdina M., Simeonova R., Tzankova V., Aluani D. (2017) *Chenopodium bonus-henricus* L. – A source of hepatoprotective flavonoids. *Fitoterapia* **118**, 13–20.
102. Dadasoglu F., Kotan R., Cakir A., Cakmakci R., Kordali S., Ozer H., Karagoz K., Dikbas N. (2015) Antibacterial activities of essential oils, extracts and some of their major components of *Artemisia* spp. L. against seed-borne plant pathogenic bacteria. *Fresen Environ Bull* **24**, 2715-2724.
103. Choma I.M., Jesionek W. (2015) TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography* **2**, 225-238.
104. Dewanjee S., Gangopadhyay M., Bhattacharya N., Khanra R., Dua T.K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *J Pharm Anal* **5**, 75-84.
105. Raffa R.B., Iannuzzo J.R., Levine D.R., Saeid K.K., Schwartz R.C., Sucic N.T., Terleckyj O.D., Young J.M. (2005) Bacterial communication (“Quorum Sensing”) via ligands and receptors: A novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 417-423.
106. Novick R.P. (2005) Interrupters on the bacterial party line. *Nat Chem Biol* **1**, 321–322.
107. Koh C.L., Sam C.K., Yin W.F., Tan L.Y., Krishnan T., Chong Y.M., Chan K.G. (2013) Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors* **13**, 6217-6228.
108. Bjarnsholt T. (2013) The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl* **121**, 1–51.
109. Aloush V., Navon-Venezia S., Seigman-Igra Y., Cabili S., Carmeli Y. (2006) Multidrug – Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 43-48.
110. Rocha-Estrada J., Aceves-Diez A., Guarneros G., de la Torre M. (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 913-923.

111. Singh B.N., Singh B.R., Singh R.L., Prakash D., Sarma B.K., Singh H.B. (2009) Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food Chem Toxicol* **47**, 778-786.
112. Truchado P., López-Gálvez F., Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Allende A. (2009) Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem* **115**, 1337-1344.
113. Driscoll J.A., Brody S.L., Kollef M.H. (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **3**, 351-368.
114. Lewis S., Camper A., Ehrlich G., Costerton J., Davies D. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140-1154.
115. Markou P., Apidianakis Y. (2013) Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 115.
116. Ilić-Tomić T., Soković M., Vojnović S., Ćirić A., Veljić M., Nikodinović-Runić J., Novaković M. (2017) Diarylheptanoids from *Alnus viridis* ssp. *viridis* and *Alnus glutinosa*: Modulation of Quorum Sensing Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Planta Med* **83**, 117–125.
117. Mileski S.K., Trifunović S.S., Ćirić D.A., Šakić M.Ž., Ristić S.M., Todorović M.N., Matevski S.V., Marin D.M., Tešević V.V., Džamić M.A. (2017) Research on Chemical Composition and Biological Properties Including Antiquorum Sensing Activity of *Angelica pancicii* Vandas Aerial Parts and Roots. *J Agri Food Chem* **65**, 10933–10949.
118. Pejin B., Iodice C., Tommonaro G., De Rosa S., Stanimirović B., Ćirić A., Glamočlija J., Nikolić M., Soković M. (2014) Further in vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of the Marine Sesquiterpene Hydroquinone Avarol. *Curr Pharm Biotechnol* **15**, 583–588.
119. Pejin B., Ćirić A., Glamočlija J., Nikolić M., Soković M. (2015) In vitro anti-quorum sensing activity of phytol. *Nat Prod Res* **29**, 374–377.
120. Bavington C., Page C. (2005) Stopping Bacterial Adhesion: A Novel Approach to Treating Infections. *Respiration* **72**, 335–344.
121. Costerton J.W., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**, 2137-2142.

122. Høiby N., Ciofu O., Johansen H.K., Song Z.J., Moser C., Jensen P.Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T. (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* **3**, 55-65.
123. Gutiérrez-Barranquero J.A., Reen F.J., McCarthy R.R., O’Gara F. (2015) Deciphering the role of coumarin as a novel quorum sensing inhibitor suppressing virulence phenotypes in bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 3303-3316.
124. Sauer K., Rickard A.H., Davies D.G. (2007) Biofilms and biocomplexity. *Microbe* **2**, 347-353.
125. Reid G. (1999) Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int J Antimicrob Agents* **11**, 223-226.
126. Bassler B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**, 582-587.
127. Camara M., Williams P., Hardman A. (2002) Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* **2**, 667-676.
128. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
129. Lewis K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 999-1007.
130. Lau G.W., Hassett D.J., Ran H., Kong F. (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* **10**, 599-606.
131. Price-Whelan A., Dietrich L.E.P., Newman D.K. (2006) Rethinking B secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol* **2**, 71-78.
132. Shrouf J.D., Chopp D.L., Just C.L., Hentzer M., Givskov M., Parsek M.R. (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**, 1264-1277.
133. Kearns DB. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**, 634-644.
134. O’Toole G.A., Kolter R. (1998b). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304.
135. Dietrich L.E., Price-Whelan A., Petersen A., Whiteley M., Newman D.K. (2006) The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **61**, 1308-1321.

136. El-Fouly M.Z., Sharaf A.M., Shahin A.A.M., El-Bialy H.A., Omara A.M.A. (2015) Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sci* **8**, 36-48.
137. Parejo I., Bastida J., Viladomat F., Codina C. (2005) Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. *Phytochemistry* **66**, 2356–2362.
138. Merfort I., Wendisch D. (1987) Flavonoid glycoside from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Planta Med* **53**, 434–437.
139. Zhong X.N., Otsuka H., Ide T., Hirata E., Takushi A., Takeda Y. (1998) Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry* **49**, 2149–2153.
140. Shimoda K., Katsuragi H. (2010) Enzymatic resolution of (*RS*)-1-phenylalkyl β -D-glucosides to (*R*)-1-phenylalkyl β -primeverosides and (*S*)-1-phenylalkyl β -D-glucosides via plant xylosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry* **21**, 2060–2065.
141. Aritomi M., Komori T., Kawasaki T. (1986) Flavonol glycosides in leaves of *Spinaciaoleracea*. *Phytochemistry* **25**, 231–234.
142. Kanwal N., Adhikari A., Hameed A., Hafizur R.M., Musharraf S.G. (2017) Isolation and characterization of non-sulfated and sulfated triterpenoid saponins from *Fagonia indica*. *Phytochemistry* **143**, 151–159.
143. Van den Dool H., Kratz P.D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* **11**, 463-467.
144. Weyerstahl P., Kaul V.K., Weirauch M., Marschall-Weyerstahl H. (1987) Volatile constituents of *Artemisia vestita* oil. *Planta Med* **53**, 66-72.
145. Asfaw N, Storesund H.J., Aasen A.J., Skattebol L. (2003) Constituents of the essential oil of *Laggera tomentosa* Sch. Bip. Ex Oliv. etHiern endemic to Ethiopia. *J Essent Oil Res* **15**, 102–105.
146. Fenech M., Morley A.A. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* **285**, 35-44.
147. Hoegstedt B., Karlsson A. (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res* **156**, 229–232.

148. Countryman P.I., Heddle J.A. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* **41**, 321-332.
149. Gođevac D., Stanković J., Novaković M., Anđelković B., Dajić-Stevanović Z., Petrović M., Stanković M. (2015) Phenolic Compounds from *Atriplex littoralis* and Their Radiation-Mitigating Activity. *J Nat Prod* **78**, 2198–2204.
150. Lorge E., Hayashi M., Albertini S., Kirkland D. (2008) Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test I. Theoretical aspects. *Mutat Res* **655**, 1–3.
151. Surralles J., Xamena N., Creus A., Catalan J., Norppa H., Marcos R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **341**, 169-184.
152. Grochová D., Šmardová J. (2007) The antimutagenic and cytoprotective effects of amifostine: the role of p53, *J Appl Biomed* **5**, 171-178.
153. Ortiz R., Cortes L., Gonzalez C., Lopez L., Perez P., Cortes E., Betancourt M. (1997) Analysis of mitomycin c- induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. *Environ Mol Mutagen* **30**, 363-370.
154. Roncada T., Vicentini V.E.P., Mantovani M.S. (2004) Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicol in Vitro* **18**, 617-622.
155. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 8th ed. CLSI publication M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
156. Tsukatani T., Suenaga H., Shiga M., Noguchi K., Ishiyama M., Ezoe T., Matsumoto K. (2012) Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J Microbiol Methods* **90**, 160–166.
157. Rasheda K., Ćirić A., Glamočlija J., Calhelha R.C., Ferreira I.C.F.R., Soković M. (2014) Antimicrobial and cytotoxic activities of *Alnus rugosa* L. aerial parts and identification of the bioactive components. *Ind Crops Prod* **59**, 189–196.

158. Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M. (1984) *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
159. Spoering A.L., Lewis K. (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* **183**, 6746–6751.
160. Horváth G., Jám bor N., Végh A., Böszörményi A., Lemberkovics É., Héthelyi É., Kovács K., Kocsis B. (2010) *Flavour Frag J* **25**, 178-182.
161. Booth C. (1971) Fungal culture media. In: Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.) *Methods in microbiology*. Academic Press, London.
162. Sandy S.M., Foong-Yee T. (2012) Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Malays J Microb* **8**, 11-20.
163. O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998a). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**, 449-461.

BIOGRAFIJA

Jovana (Miloš) Stanković je rođena 26. oktobra 1989. godine u Beogradu. Osnovnu školu je završila u Kovinu, a srednju hemijsko-medicinsku, smer farmaceutski tehničar u Vršcu. Školske 2008/2009. upisala se na Hemijski fakultet u Beogradu, a diplomirala je 18. septembra 2012. Master studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju kod mentora prof. dr Veleta Teševića i dr Dejana Gođevca upisala je u oktobru 2012. godine i završila ih 30. septembra 2013. godine sa ocenom 10. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju kod mentora prof. dr Veleta Teševića i dr Miroslava Novakovića upisala je školske 2013/2014. godine.

Od 1. novembra 2013. zaposlena je u Centru za hemiju NU IHTM kao istraživač pripravnik, a od 22. aprila 2016. kao istraživač saradnik. Od 2013. godine uključena je na projekat br. 172053 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (2011–), a od 2015–2020. godine angažovana je na projektu međuakademijske saradnje između Bugarske akademije nauka (BAN) i Srpske akademije nauka i umetnosti (SANU) „Sekundarni metaboliti divlje-rastućih i kultivisanih biljaka sa potencijalnom biološkom aktivnošću”. U toku 2016–2017. godine učestvovala je na projektu naučno-tehnološke bilateralne saradnje sa Biotehničkim fakultetom Univerziteta u Ljubljani, pod nazivom: „Metabolomičke promene u voću i povrću izazvane tretmanima nakon berbe”, a u toku 2017/2018. na projektu naučno-tehnološke bilateralne saradnje sa Univerzitetom u Crnoj Gori pod nazivom „The effect of heavy metals on the altering of medicinal plant metabolism”. Učesnik je na projektu naučno-tehnološke bilateralne saradnje sa Univerzitetom u Bolonji (2019–2021.), pod nazivom „Metabolomic approach for the determination of herbs and spices fraud”, kao i međunarodnog (OPCW) projekta pod nazivom „Razvoj automatizovanih GC-MS i LC-MS metoda zasnovanih na mikroekstrakciji na pakovanom sorbentu (MEPS) za potrebe OPCW testova stručnosti laboratorija, kao i terenskih analiza”.

U okviru svog naučno istraživačkog rada bavi se hemijom sekundarnih metabolita biljaka, spektroskopskim i hromatografskim tehnikama analize organskih jedinjenja, kao i biološkim dejstvima hemijskih jedinjenja i biljnih ekstrakata. Do sada je objavila jedan naučni rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), kao i jedanaest radova u međunarodnom časopisu (M23) i dva rada u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24). Osim toga, koautor je dva poglavlja u knjizi (M14), dva rada u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51), osam radova u časopisu nacionalnog značaja (M52) i jednog rada u naučnom časopisu (M53), kao i pet saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampanih u celini (M33), četrnaest saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampanih u izvodu (M34) i tri saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a):

1. **Jovana Stanković**, Dejan Gođevac, Vele Tesević, Zora Dajić-Stevanović, Ana Cirić, Marina Soković, Miroslav Novaković. (2019) Antibacterial and Antibiofilm Activity of Flavonoid and Saponin Derivatives from *Atriplex tatarica* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 82(6), 1487-1495.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.8b00970>(IF 4,257)

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21):

1. Dejan Gođevac, **Jovana Stanković**, Miroslav Novaković, Boban Anđelković, Zora Dajić-Stevanović, Milica Petrović, Miroslava Stanković. (2015) Phenolic compounds from *Atriplex littoralis* and their radiation-mitigating activity. *Journal of Natural Products* 78(9), 2198-2204.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b00273>(IF 3,662)

Poglavlje u monografiji međunarodnog značaja (M14):

1. Zora Dajić-Stevanović, Milan Stanković, **Jovana Stanković**, Peđa Janačković, Miroslava Stanković (2019) Use of halophytes as medicinal plants: Phytochemical diversity and biological activity. In: Hasanuzzaman M., Shabala S., Fujita M. (Eds) *Halophytes and Climate Change: Adaptive Mechanisms and Potential Uses*. CABI, Boston, USA, pp. 343-368.
<https://doi/10.1079/9781786394330.0343>

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34):

1. Dejan Gođevac, **Jovana Stanković**, Boban Anđelković, Milka Jadranin, Milica Petrović, Vlatka Vajs, Slobodan Milosavljević, Zora Dajić Stevanović. New Flavonoids from *Atriplex littoralis* L. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf (INCPU), 3-6 November 2013, Bansko, Bulgaria, Book of Abstracts, PP40.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Станковић

Број индекса ДХ22/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Халофитне биљне врсте - изоловање и карактеризација секундарних метаболита

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Jovana Stanković

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Станковић

Број индекса ДХ22/2013

Студијски програм доктор хемијских наука

Наслов рада Халофитне биљне врсте – изоловање и карактеризација
секундарних метаболита

Ментори проф. др Веле Тешевић и др Мирослав Новаковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Jovana Stanković

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Халофитне биљне врсте – изоловање и карактеризација секундарних

метаболита

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално(CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада(CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада(CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима(CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

Jovana Stanković

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.