



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Амина М. Гусинац

**АНАЛИЗА ХЕМИЈСКОГ САСТАВА И
БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ
СЕКУНДАРНИХ МЕТАБОЛИТА БИЉНЕ
ВРСТЕ *BARBAREA VULGARIS*
(BRASSICACEAE)**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Amina M. Gusinac

**ANALYSIS OF THE CHEMICAL
COMPOSITION AND BIOLOGICAL
ACTIVITY OF *BARBAREA VULGARIS*
(BRASSICACEAE)**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2025.



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:											
Идентификациони број, ИБР:											
Тип документације, ТД:	монографска										
Тип записа, ТЗ:	текстуални/графички										
Врста рада, ВР:	докторска дисертација										
Аутор, АУ:	Амина М. Гусинац										
Ментори, МН:	Иван Палић, Милан Декић										
Наслов рада, НР:	Анализа хемијског састава и биолошке активности секундарних метаболита биљне врсте <i>Barbarea vulgaris</i> (Brassicaceae)										
Језик публикације, ЈП:	српски										
Језик извода, ЈИ:	српски										
Земља публикација, ЗП:	Србија										
Уже географско подручје, УГП:	Србија										
Година, ГО:	2025.										
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт										
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.										
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страница/цитата/табела/слика/графика/прилога)	9 поглавља, 172 стране, 213 цитата, 9 табела, 29 слика, 6 шема, 41 прилог										
Научна област, НО:	Хемија										
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија										
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Barbarea vulgaris</i> , Brassicaceae, аутолизат, етарско уље, деградациони производи глукозинолата, хемотаксономија, биолошка активност, GC-MS, NMR, хроматографија										
УДК	581.192 : [582.683.2 : 577.121] (043.3)										
Чува се, ЧУ:	библиотека										
Важна напомена, ВН:	Експериментални рад ове докторске дисертације реализован је у Лабораторији за органску анализу и синтезу на Департману за хемију Природно-математичког факултета у Нишу, Универзитета у Нишу, као и у Лабораторији за биоорганску хемију Државног Универзитета у Новом Пазару.										
Извод, ИЗ:	Докторска дисертација је усмерена на проучавање фитохемијског састава биљне врсте <i>Barbarea vulgaris</i> са подручја Србије, представника породице Brassicaceae познате по изузетној интраспецијској хемијској варијабилности. Иако је ова врста раније била предмет бројних истраживања, популације са нашег простора остају недовољно описане, што овом раду даје значај у ширем контексту фитохемије и хемотаксономије. Посебан акценат стављен је на глукозинолате – метаболите који имају важну улогу у одбрамбеним механизмима биљака и представљају потенцијални извор фармацеутски и нутритивно вредних једињења. Истраживање обухвата изоловање и анализу етарског уља и аутолизата <i>B. vulgaris</i>, идентификацију деградационих производа глукозинолата, као и изоловање или синтезу једињења од интереса ради њихове хемијске и биолошке карактеризације. Комбинацијом савремених аналитичких техника (GC-FID, GC-MS, NMR, UV-Vis, IR) и биолошких тестова испитивана су антимикробна, антиинфламаторна и антиоксидативна својства добијених молекула. Научни допринос рада огледа се у употпуњавању знања о хемијској варијабилности домаћих популација <i>B. vulgaris</i>, идентификацији потенцијално нових хемотипова, као и у добијању једињења која могу послужити као основ за развој нових биоактивних агенаса.										
Датум прихватања теме, ДП:	29.10.2025.										
Датум одбране, ДО:											
Чланови комисије, КО:	<table> <tr> <td>Председник:</td><td>др Зоран Марковић, професор емеритус</td></tr> <tr> <td>Члан:</td><td>др Марко Младеновић, доцент и виши научни сарадник</td></tr> <tr> <td>Члан:</td><td>др Мирјана Грујовић, виши научни сарадник</td></tr> <tr> <td>Члан, ментор:</td><td>др Иван Палић, ванредни професор</td></tr> <tr> <td>Члан, ментор:</td><td>др Милан Декић, ванредни професор</td></tr> </table>	Председник:	др Зоран Марковић, професор емеритус	Члан:	др Марко Младеновић, доцент и виши научни сарадник	Члан:	др Мирјана Грујовић, виши научни сарадник	Члан, ментор:	др Иван Палић, ванредни професор	Члан, ментор:	др Милан Декић, ванредни професор
Председник:	др Зоран Марковић, професор емеритус										
Члан:	др Марко Младеновић, доцент и виши научни сарадник										
Члан:	др Мирјана Грујовић, виши научни сарадник										
Члан, ментор:	др Иван Палић, ванредни професор										
Члан, ментор:	др Милан Декић, ванредни професор										



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:											
Identification number, INO:											
Document type, DT:	monograph										
Type of record, TR:	textual/graphic										
Contents code, CC:	doctoral dissertation										
Author, AU:	Amina M. Gusinac										
Mentor, MN:	Ivan Palić, Milan Dekić										
Title, TI:	Analysis of the chemical composition and biological activity of <i>Barbarea vulgaris</i> (Brassicaceae)										
Language of text, LT:	Serbian										
Language of abstract, LA:	English										
Country of publication, CP:	Serbia										
Locality of publication, LP:	Serbia										
Publication year, PY:	2025.										
Publisher, PB:	author's reprint										
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.										
Physical description, PD: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendices)	9 chapters, 172 pages, 213 references, 9 tables, 29 figures, 6 schemes, 41 appendices										
Scientific field, SF:	Chemistry										
Scientific discipline, SD:	Organic chemistry and biochemistry, organic synthesis										
Subject/Key words, S/KW:	<i>Barbarea vulgaris</i> , Brassicaceae, autolysate, essential oil, glucosinolate degradation product, chemotaxonomy, biological activity, GC-MS, NMR, chromatography										
UC	581.192 : [582.683.2 : 577.121] (043.3)										
Holding data, HD:	library										
Note, N:	The experimental work of this doctoral dissertation was carried out in the Laboratory of Organic Analysis and Synthesis at the Department of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, as well as in the Laboratory of Bioorganic Chemistry of the State University of Novi Pazar.										
Abstract, AB:	The doctoral dissertation is focused on investigating the phytochemical composition of <i>Barbarea vulgaris</i> from Serbia, a member of the Brassicaceae family known for its remarkable intraspecific chemical variability. Although this species has previously been the subject of numerous studies, populations from our region remain insufficiently described, which highlights the importance of this research within the broader context of phytochemistry and chemotaxonomy. Special emphasis is placed on glucosinolates – metabolites essential in plant defense, recognized as a potential source of pharmaceutically and nutritionally valuable compounds. The research includes the isolation and analysis of essential oil and autolysates of <i>B. vulgaris</i>, identification of glucosinolate degradation products, as well as the isolation or synthesis of selected compounds for their chemical and biological characterization. Using modern analytical techniques (GC-FID, GC-MS, NMR, UV-Vis, IR) in combination with biological assays, the antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties of the obtained molecules were evaluated. The scientific contribution of this work lies in expanding the knowledge of chemical variability within local populations of <i>B. vulgaris</i>, identifying potentially new chemotypes, and obtaining compounds that may serve as a basis for the development of new bioactive agents.										
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	October 29 th , 2025.										
Defended on, DE:											
Defended Board, DB:	<table> <tr> <td>President:</td><td>PhD Zoran Marković, Professor emeritus</td></tr> <tr> <td>Member:</td><td>PhD Marko Mladenović, Assistant Professor and Senior Research Associate</td></tr> <tr> <td>Member:</td><td>PhD Mirjana Grujović, Senior Research Associate</td></tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td><td>PhD Ivan Palić, Associate Professor</td></tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td><td>PhD Milan Dekić, Associate Professor</td></tr> </table>	President:	PhD Zoran Marković, Professor emeritus	Member:	PhD Marko Mladenović, Assistant Professor and Senior Research Associate	Member:	PhD Mirjana Grujović, Senior Research Associate	Member, Mentor:	PhD Ivan Palić, Associate Professor	Member, Mentor:	PhD Milan Dekić, Associate Professor
President:	PhD Zoran Marković, Professor emeritus										
Member:	PhD Marko Mladenović, Assistant Professor and Senior Research Associate										
Member:	PhD Mirjana Grujović, Senior Research Associate										
Member, Mentor:	PhD Ivan Palić, Associate Professor										
Member, Mentor:	PhD Milan Dekić, Associate Professor										

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Иван Палић, ванредни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет у Нишу, Департман за хемију др Милан Декић, ванредни професор, Државни Универзитет у Новом Пазару, Департман за природно-математичке науке
Наслов:	Анализа хемијског састава и биолошке активности секундарних метаболита биљне врсте <i>Barbarea vulgaris</i> (Brassicaceae)
Резиме:	Докторска дисертација је усмерена на проучавање фитохемијског састава биљне врсте <i>Barbarea vulgaris</i> са подручја Србије, представника породице Brassicaceae познате по изузетној интраспецијској хемијској варијабилности. Иако је ова врста раније била предмет бројних истраживања, популације са нашег простора остају недовољно описане, што овом раду даје значај у ширем контексту фитохемије и хемотаксономије. Посебан акценат стављен је на глукозинолате – метаболите који имају важну улогу у одбрамбеним механизмима биљака и представљају потенцијални извор фармацеутски и нутритивно вредних једињења. Истраживање обухвата изоловање и анализу етарског уља и аутолизата <i>B. vulgaris</i>, идентификацију деградационих производа глукозинолата, као и изоловање или синтезу једињења од интереса ради њихове хемијске и биолошке карактеризације. Комбинацијом савремених аналитичких техника (GC-FID, GC-MS, NMR, UV-Vis, IR) и биолошких тестова испитивана су антимикробна, антиинфламаторна и антиоксидативна својства добијених молекула. Научни допринос рада огледа се у употпуњавању знања о хемијској варијабилности домаћих популација <i>B. vulgaris</i>, идентификацији потенцијално нових хемотипова, као и у добијању једињења која могу послужити као основ за развој нових биоактивних агенаса.
Научна област:	Хемија
Научна дисциплина:	Органска хемија и биохемија, органске синтезе
Кључне речи:	<i>Barbarea vulgaris</i> , Brassicaceae, аутолизат, етарско уље, деградациони производи глукозинолата, хемотаксономија, биолошка активност, GC-MS, NMR, хроматографија
УДК:	581.192 : [582.683.2 : 577.121] (043.3)
CERIF класификација:	P 003 Хемија, P 004 Биохемија, метаболизам, P 390 Органска хемија, P 300 Аналитичка хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD, Ivan Palić, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Chemistry PhD, Milan Dekić, State University of Novi Pazar, Department of Sciences and Mathematics
Title:	Analysis of the chemical composition and biological activity of <i>Barbarea vulgaris</i> (Brassicaceae)
Abstract:	The doctoral dissertation is focused on investigating the phytochemical composition of <i>Barbarea vulgaris</i> from Serbia, a member of the Brassicaceae family known for its remarkable intraspecific chemical variability. Although this species has previously been the subject of numerous studies, populations from our region remain insufficiently described, which highlights the importance of this research within the broader context of phytochemistry and chemotaxonomy. Special emphasis is placed on glucosinolates – metabolites essential in plant defense, recognized as a potential source of pharmaceutically and nutritionally valuable compounds. The research includes the isolation and analysis of essential oil and autolysates of <i>B. vulgaris</i>, identification of glucosinolate degradation products, as well as the isolation or synthesis of selected compounds for their chemical and biological characterization. Using modern analytical techniques (GC-FID, GC-MS, NMR, UV-Vis, IR) in combination with biological assays, the antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties of the obtained molecules were evaluated. The scientific contribution of this work lies in expanding the knowledge of chemical variability within local populations of <i>B. vulgaris</i>, identifying potentially new chemotypes, and obtaining compounds that may serve as a basis for the development of new bioactive agents.
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic chemistry and biochemistry, organic synthesis
Key Words:	<i>Barbarea vulgaris</i> , Brassicaceae, autolysate, essential oil, glucosinolate degradation product, chemotaxonomy, biological activity, GC-MS, NMR, chromatography
UDC:	581.192 : [582.683.2 : 577.121] (043.3)
CERIF Classification:	P 003 Chemistry, P 390 Organic chemistry, P 004 Biochemistry, Metabolism, P 300 Analytical chemistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Eksperimentalni rad ove doktorske disertacije realizovan je u Laboratoriji za organsku analizu i sintezu na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, kao i u Laboratoriji za bioorgansku hemiju Državnog Univerziteta u Novom Pazaru.

Zahvaljujem svojim mentorima, profesoru dr Milanu Dekiću i profesoru dr Ivanu Paliću, na podršci, stručnom vođenju i korisnim sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije. Njihova posvećenost, otvorenost za ideje i spremnost da nesebično podele svoje znanje uveliko su doprineli kvalitetu i uspešnom vođenju ovog istraživanja.

Posebnu zahvalnost dugujem koleginicama dr Edini Avdović i dr Dušici Simijonović, kao i kolegi dr Vladimiru Dobričiću, na pomoći u sprovođenju bioloških ispitivanja.

Zahvalna sam članovima komisije – profesoru dr Zoranu Markoviću, višem naučnom saradniku i docentu dr Marku Mladenoviću i višoj naučnoj saradnici dr Mirjani Grujović – na posvećenom vremenu, pažljivim sugestijama i korisnim savetima, koji su doprineli potpunom unapređenju ove disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, prijateljima i kolegama, a najviše svojim roditeljima, Mirsadu i Mersiji, i sestri Emini, koji su mi tokom celog perioda studija i izrade ove disertacije pružali nesebičnu podršku, razumevanje i stalni podstrek.

OZNAKE I SKRAĆENICE

Nomenklatura

<i>m</i>	<i>meta</i>
<i>o</i>	<i>orto</i>
<i>p</i>	<i>para</i>

Reagensi i rastvarači

CDCl ₃	deuterisani hloroform
CHCl ₃	hloroform
CS ₂	ugljen-disulfid
DCM	dihlormetan
DEC	dietil-karbonat
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d ₆	deuterisani dimetilsulfoksid
Et ₂ O	dietil-etar
Et ₃ N	trietilamin
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
Eu(hfc) ₃	europijum(III) <i>tris</i> [3-(heptafluorpropilhidroksimetilen)-D-kamforat]
HCl	hlorovodonična kiselina
K ₂ CO ₃	kalijum-karbonat
MeOH	metanol
Pd/C	paladijum na ugljeniku
THF	tetrahidrofuran
TMS	tetrametilsilan

Instrumenti i metode razdvajanja

“t”	pseudo triplet
1D	jednodimenzionalni
¹ H– ¹ H COSY	¹ H– ¹ H <i>correlation spectroscopy</i>
2D	dvodimenzionalni

<i>brs</i>	široki singlet (eng. <i>broad singlet</i>)
<i>d</i>	dublet
<i>dd</i>	dublet dubleta
<i>ddd</i>	dublet dubleta dubleta
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
GC-FID	gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom
GC-MS	gasna hromatografija sa masenospektrometrijskom detekcijom
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	herc
FTIR	infracrvena spektroskopija
<i>J</i>	konstanta kuplovanja tj. sprezanja (eng. <i>coupling constant</i>)
<i>m</i>	multiplet
<i>m/z</i>	odnos mase i naelektrisanja (eng. <i>mass to charge ratio</i>)
$M^{+•}$	molekulski jon
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
NOESY	nuklearni Overhauzerov efekat
ppm	delova na milion (<i>parts per milion</i>)
rel. int.	relativni intezitet
RI	retencioni indeks
R_t	retenciono vreme
<i>s</i>	singlet
<i>t</i>	triplet
TIC	ukupni jonski hromatogram
TLC	tankoslojna hromatografija
UV	ultraljubičasta
δ_C	hemijsko pomeranje u ^{13}C NMR spektru
δ_H	hemijsko pomeranje u ^1H NMR spektru

Biološka aktivnost

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
BIC ₅₀	inhibitorna koncentracija biofilma
COX-2	ciklooksigenaza-2

DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
LOX	lipoksigenaza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MMC	minimalna mikrobicidna koncentracija
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MFC	minimalna fungicidna koncentracija
OD	optička gustina
RSD	relativna standardna devijacija
SD	standardna devijacija
SE	standardna greška

Ostalo

°C	stepen celzijusa
Å	angstrem
DFT	teorija funkcionala gustine (eng. <i>density functional theory</i>)
ekv	ekvivalent
et al.	i drugo (lat. <i>et alia</i>)
eV	elektronvolt
g	gram
GSL	glukozinolat
L	litar
m	metar
mg	miligram
min	minut
mm	milimetar
mmol	milimol
MP	tačka topljenja (eng. <i>melting point</i>)
nm	nanometer
<i>rac</i> /(±)	racemat
rpm	obrtaži u minuti
ssp.	podvrsta
syn/sin.	sinonim
var.	varijetet ili varijanta

w/w	masa/masa (eng. <i>weight/weight</i>)
v/v	zapremina/zapremina (eng. <i>volume/volume</i>)
μl	mikrolitar
μM	mikrometar

S A D R Ź A J

1. UVOD I CILJEVI RADA	1
2. OPŠTI DEO	8
2.1. TAKSONOMIJA, FILOGENIJA I POLIMORFIZAM VRSTE <i>Barbarea vulgaris</i>	8
2.1.1. Porodica Brassicaceae Burnett.....	8
2.1.2. Rod <i>Barbarea</i> W. T. Aiton	9
2.1.3. <i>Barbarea vulgaris</i> W.T. Aiton	11
2.1.4. Intraspecijska varijabilnost vrste <i>Barbarea vulgaris</i>	14
2.1.4.1. Monogenski polimorfizam (BAR- i NAS-tip).....	15
2.1.4.2. Poligenski i duboko divergentni polimorfizam (G- i P-tip)	17
2.1.4.3. Geografska i evolutivna struktura <i>B. vulgaris</i> kompleksa	21
2.1.4.4. Odbrambeni metaboliti i interakcije sa herbivorima i patogenima kod vrste <i>B. vulgaris</i>	24
2.1.4.5. Značaj hemotipske varijabilnosti i istraživanja populacija sa Balkana	29
2.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>Barbarea vulgaris</i>	29
2.2.1. Glukozinolati	30
2.2.1.1. Glukozinolati i njihovi degradacioni proizvodi u vrsti <i>B. vulgaris</i>	33
2.2.2. Flavonoidni glikozidi vrste <i>B. vulgaris</i>	38
2.2.3. Odbrambeni sekundarni metaboliti biljaka: fitoaleksini i fitoanticipini.....	42
2.2.3.1. Fitoaleksini.....	44
2.2.3.2. Fitoaleksini identifikovani u biljnoj vrsti <i>B. vulgaris</i>	46
2.2.4. Saponini u vrsti <i>B. vulgaris</i>	50
3. EKSPERIMENTALNI DEO	54
3.1. Hemikalije i rastvarači	55
3.2. Metode analize i razdvajanja.....	55
3.2.1. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)	55
3.2.2. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID)	55
3.2.3. Identifikacija sastojaka i kvantitativna analiza etarskog ulja i autolizata	55
3.2.4. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija	56
3.2.5. Infracrvena (FTIR) spektroskopija	57
3.2.6. Određivanje tačke topljenja	57
3.2.7. Ultraljubičasta-vidljiva (UV-Vis) spektrofotometrija	57
3.2.8. Fluorescentna spektrofotometrija	57
3.2.9. Kolorimetrijska analiza.....	57

3.2.10. Denzitometrijska standardizacija inokuluma.....	57
3.2.11. Tankoslojna hromatografija (TLC).....	58
3.2.12. Preparativna tankoslojna hromatografija (PTLC)	58
3.2.13. Vakuum hromatografija (FDC)	58
3.2.14. Brza hromatografija (FC).....	58
3.3. Biljni materijal, izolovanje autolizata i etarskog ulja.....	58
3.3.1. Biljni materijal	58
3.3.2. Izolovanje autolizata	59
3.3.3. Izolovanje etarskog ulja	59
3.4. Opis sinteza i izolovanja jedinjenja.....	59
3.4.1. Sinteza nasturleksina A (metil-fenetilkarbamoditioat) (87).....	59
3.4.2. Sinteza metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (96)	60
3.4.3. Sinteza 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (raphanusamic acid) (17)	61
3.4.4. Sinteza ($\pm$)-barbarina (rac-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona) (18).....	61
3.4.5. Izolovanje barbarina.....	62
3.4.6. Određivanje apsolutne konfiguracije izolovanog barbarina (18)	62
3.4.7. Izolovanje 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (97).....	63
3.4.8. Sinteza rezedina (rac-5-fenil-oksazolidin-2-ona) (20).....	64
3.4.9. Sinteza hidroksi-supstituisanih izomera fenetil-izotiocijanata	64
3.5. Antimikrobna aktivnost – <i>in vitro</i> testiranje	66
3.5.1. Kulture mikroorganizama	66
3.5.2. Priprema suspenzije	66
3.5.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom	66
3.6. Antibiofilm aktivnost – <i>in vitro</i> testiranje	67
3.6.1. Formiranje biofilma	67
3.6.2. Inhibicija sposobnosti formiranja biofilma.....	68
3.7. <i>In vitro</i> testovi za procenu sposobnosti vezivanja slobodnih radikala	68
3.7.1. DPPH test.....	68
3.7.2. ABTS test	69
3.8. <i>In vitro</i> testovi za procenu antiinflamatorne aktivnosti.....	69
3.8.1. Test inhibicije LOX enzima	69
3.8.2. Test inhibicije COX-2 enzima	69
3.9. Statistička analiza.....	70
3.10. <i>In silico</i> analiza.....	70
4. REZULTATI I DISKUSIJA	71

4.1. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ETARSKOG ULJA I AUTOLIZATA VRSTE <i>B. vulgaris</i>	72
4.1.1. Degradacioni proizvodi glukozinolata i druga isparljiva jedinjenja	72
4.1.2. Određivanje apsolutne konfiguracije izolovanog barbarina	85
4.1.3. Izomerizacija barbarina u 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on.....	88
4.1.4. Hemotipska varijabilnost i glukozinolati izvedeni iz homofenilalanina.....	89
4.1.5. <i>In silico</i> ispitivanje inhibitornog potencijala (<i>R</i>)-barbarina i njegovog platina(II) kompleksa prema PBP1a proteinu	92
4.2. ANTIMIKROBNA, ANTIOKSIDATIVNA I ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST SINTETISANIH I IZOLOVANIH JEDINJENJA	94
4.2.1. Antibiofilm i antimikrobna aktivnost.....	94
4.2.2. Antioksidativna aktivnost protiv DPPH i ABTS radikala.....	100
4.2.3. <i>In vitro</i> test inhibicije LOX i COX-2 enzima.....	101
5. ZAKLJUČAK	105
6. SUMMARY	109
7. LITERATURA.....	113
8. PRILOZI.....	126
9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM	169

1. UVOD I CILJEVI RADA

Fitohemija (od grčke reči *φυτόν* – biljka) je disciplina koja proučava sekundarne metabolite biljnog porekla, njihovu strukturu, biosintezu, funkciju u biljci i njihov značaj za čoveka. Smatra se interdisciplinarnom oblašću na granici između hemije prirodnih proizvoda i filogenije biljaka, uz naglasak na ekološke interakcije i translaciju u primene. Sekundarni metaboliti, iako nisu neophodni za primarne životne procese, igraju ključnu ulogu u adaptaciji biljaka na stres, odbrani od patogena i interakcijama s okolinom. Zbog svoje hemijske raznolikosti i značajne biološke aktivnosti, predmet su istraživanja hemije, biohemije, botanike, molekularne biologije, fitoterapije, farmacije, bioinformatike i drugih oblasti. U kombinaciji sa etnofarmakologijom, fitohemijska istraživanja doprinose identifikaciji novih bioaktivnih jedinjenja sa potencijalom za farmaceutsku primenu (Alamgir, 2018).

Porodica Brassicaceae (kupusnjače ili krstašice) obuhvata 372 rodova i preko 4.060 vrsta, svrstanih u 52 tribusa (Christenhusz & Byng, 2016; Tamokou et al., 2017; Warwick et al., 2006) i predstavlja jednu od najvažnijih biljnih familija u svetu poljoprivrede, prehrambene industrije i biomedicinskih istraživanja. Rodovi i vrste iz ove porodice obuhvataju brojne prehrambene kulture (kupus, brokoli, karfiol, kelj, rotkva), ali i lekovite, industrijske i ukrasne biljke (Kopjar et al., 2012). Njihova ekonomska i ekološka važnost proističe iz prisustva specifičnih sekundarnih metabolita, među kojima se izdvajaju glukozinolati – sumporna jedinjenja prepoznata kao ključni faktori hemijske odbrane biljaka i kao bioaktivne supstance od značaja za ljudsko zdravlje, sa dokazanim antikancerogenim, antiinflamatornim, antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima (Fahey et al., 2001; Tamokou et al., 2017; Kopjar et al., 2012).

Glukozinolati čine veliku i evolutivno stabilnu grupu metabolita karakterističnu, mada ne isključivu, za porodicu Brassicaceae. Njihovi hemotaksonomski profili pokazuju izrazitu raznolikost među vrstama, populacijama i hemotipovima, što im daje veliki hemotaksonomski potencijal. Pri oštećenju biljnog tkiva, delovanjem enzima mirozinaze, dolazi do hidrolize glukozinolata i stvaranja širokog spektra bioaktivnih produkata, uključujući izotiocijanate, tiocijanate, nitrile i oksazolidin-2-tione (Agrawal & Kurashige, 2003; Fahey et al., 2001). Ovi proizvodi imaju važnu ekološku funkciju u odbrani biljaka, ali i značajan farmakološki potencijal.

Kod vrste *Barbarea vulgaris* W. T. Aiton, jedne od najrasprostranjenijih samoniklih krstašica Evrope, Azije i severne Afrike, identifikovan je bogat spektar sekundarnih metabolita koji uključuje glukozinolate, degradacione produkte glukozinolata, flavonoidne glikozide,

saponine i značajne fitoaleksine (Dalby-Brown et al., 2011; Kuzina et al., 2011; Pedras et al., 2015a; 2015b; 2017; 2018). Vrsta je dvogodišnja ili višegodišnja, visoko adaptabilna na različite stanišne uslove i često naturalizovana širom sveta. Najčešće se navode dve podvrste – *B. vulgaris* var. *vulgaris* i *B. vulgaris* var. *arcuata*, koje se razlikuju prema morfološkim karakteristikama ploda i peteljke (drške) (Agerbirk et al., 2003). U mnogim florama opisuje se kao *B. vulgaris*.

Od posebnog značaja su hemotipovi *B. vulgaris*, pre svega G-tip i P-tip, koji se razlikuju prema stereoisomernoj konfiguraciji glavnih glukozinolata: G-tip proizvodi (*S*)-glukobarbarin, dok P-tip proizvodi (*R*)-epiglukobarbarin (Agerbirk et al., 2015; Byrne, 2017). Ovi hemotipovi pokazuju različite odbrambene strategije, ekološke interakcije i nivoe otpornosti na herbivore, što ukazuje na visok adaptivni značaj hemijske polimorfije u ovoj vrsti. Pored glukozinolata, vrsta akumulira i saponine, relativno retke u okviru porodice Brassicaceae, koji dodatno doprinose hemijskoj odbrani (Kuzina et al., 2011). Takođe, *B. vulgaris* je poznata po biosintezi fitoaleksina kao što su brasinin, ciklobrasinin i nasturleksini — jedinjenja koja se sintetizuju isključivo kao odgovor na infekciju ili stresne uslove i poseduju snažno antimikrobno i antifungalno dejstvo (Ahuja et al., 2012; Bailey & Mansfield, 1982; Dalby-Brown et al., 2011; Kuzina et al., 2011; Senatore et al., 2000; Agerbirk et al., 2001; Agerbirk et al., 2011; Agerbirk et al., 2018; Agerbirk et al., 2015; Agerbirk et al., 2021; Agerbirk et al., 2003; Pedras et al., 2014–2018; Pedras & To, 2014; Van Leur et al., 2003; Van Leur et al., 2008; Van Etten et al., 1994).

Iako je vrsta *B. vulgaris* intenzivno proučavana u pogledu hemijskih i ekoloških aspekata u zapadnoj i severnoj Evropi, populacije sa područja Balkanskog poluostrva ostale su relativno nedovoljno istražene. Očekuje se da bi analiza populacija iz Srbije mogla doprineti razumevanju hemijske i genetičke varijabilnosti, identifikaciji novih ili prelaznih hemotipova, kao i boljem sagledavanju evolutivnih i ekoloških obrazaca u okviru roda *Barbarea*. Dobijeni podaci mogu imati primenu u hemotaksonomiji, ekologiji, evolutivnoj biologiji, ali i potencijal u poljoprivredi (kao izvor prirodnih biopesticida), prehrambenoj industriji (kao prirodni antioksidansi) i biomedicini (razvoj antimikrobnih i antiinflamatornih agenasa). Doprinos u formiranju sveobuhvatne analitičke baze, uključujući spektroskopijsku karakterizaciju i retencione indekse derivata glukozinolata, predstavljaće značajan doprinos daljim istraživanjima fitohemijske raznovrsnosti ove i srodnih vrsta.

S obzirom na izraženi polimorfizam uočen u populacijama biljne vrste *B. vulgaris*, ograničene literaturne podatke o glukozinolatnim profilima populacija koje rastu u Srbiji, kao i na nedostatak podataka o biološkoj aktivnosti sekundarnih metabolita ove biljne vrste, istraživanje u predloženoj doktorskoj disertaciji biće usmereno na izolovanje, identifikaciju i spektralnu karakterizaciju proizvoda autolize glukozinolata u populaciji *B. vulgaris* koja raste u Srbiji, kao i na ispitivanje biološke aktivnosti sekundarnih metabolita — antimikrobnog dejstva prema odabranim humanim i fitopatogenim mikroorganizmima, kao i antiinflamatornog i antioksidativnog dejstva.

Na osnovu dostupne literature, formulisani su sledeći ciljevi doktorske disertacije:

1. Izolovanje etarskog ulja i autolizata biljne vrste *B. vulgaris* koja raste u Srbiji;
2. Detaljna hemijska analiza sastava izolovanog etarskog ulja i autolizata;
3. Utvrđivanje glukozinolatnog profila i njegovog taksonomskog značaja kod populacije iz Srbije, na osnovu proizvoda razgradnje glukozinolata identifikovanih u ispitivanim etarskim uljima i autolizatima;
4. Preparativno hromatografsko razdvajanje ekstrakata i detaljna analiza dobijenih frakcija;
5. Izolovanje, tj. razdvajanje i prečišćavanje sekundarnih metabolita iz analiziranih smeša;
6. Sinteza jedinjenja identifikovanih u analiziranim smešama u slučajevima kada njihovo izolovanje nije moguće ili kada izolovanjem nije moguće dobiti dovoljnu količinu materijala potrebnu za strukturnu karakterizaciju i ispitivanje biološke aktivnosti;
7. Određivanje strukture izolovanih jedinjenja spektroskopskim tehnikama i odgovarajućim hemijskim transformacijama;
8. Ispitivanje biološke aktivnosti izolovanih i/ili sintetisanih čistih jedinjenja—određivanje antimikrobne aktivnosti prema odabranim humanim i fitopatogenim mikroorganizmima, kao i procena njihovog antiinflamatornog i antioksidativnog dejstva.

Za izradu ove doktorske disertacije implementirane su sledeće metode:

1. Izolovanje etarskog ulja i priprema ekstrakata

Izolovanje etarskog ulja izvršeno je hidrodestilacijom u aparaturi po Klevendžeru. Ekstrakcija biljnog materijala izvršena je nakon autolize endogenom mirozinazom prema proceduri opisanoj od strane Radulovića i saradnika (2008).

2. *Hemijska analiza etarskog ulja i autolizata*

Kvalitativna i kvantitativna analiza sastojaka izolovanih uzoraka obavljena je gasnom hromatografijom (GC-FID) i gasnom hromatografijom sa masenospektrometrijskom detekcijom (GC-MS).

3. *Utvrdjivanje glukozinolatnog profila*

Na osnovu identifikovanih proizvoda razgradnje glukozinolata iz etarskih ulja i autolizata određen je glukozinolatni profil populacije koja raste u Srbiji i upoređen sa relevantnim literaturnim podacima radi procene taksonomskog značaja.

4. *Preparativno hromatografsko razdvajanje ekstrakata i dodatna GC-MS analiza*

Ekstrakti su podvrgnuti preparativnom razdvajanju primenom kolonske hromatografije. Dobijene frakcije takođe su detaljno analizirane GC-MS metodom radi eventualne identifikacije komponenti koje nisu detektovane u prethodnom koraku.

5. *Primena hromatografskih metoda za izolovanje sekundarnih metabolita*

Za izolovanje, razdvajanje i prečišćavanje sekundarnih metabolita korišćene se različite preparativne hromatografske tehnike: *dry-flash* hromatografija, kolonska hromatografija, ekskluziona hromatografija, kao i preparativna tankoslojna hromatografija.

6. *Sinteza odabranih jedinjenja*

U slučajevima kada izolovanje pojedinačnih komponenti od interesa nije bilo moguće ili nije bilo moguće izolovanjem obezbediti dovoljnu količinu za strukturnu karakterizaciju i biološka ispitivanja, realizovana je njihova hemijska sinteza.

7. *Spektralna i strukturna karakterizacija izolovanih i/ili sintetisanih jedinjenja*

Spektralna i strukturna karakterizacija izolovanih i sintetisanih jedinjenja izvršena je kombinacijom spektroskopskih tehnika – nuklearnom magnetnom rezonancijom ugljenika i vodonika (^1H - i ^{13}C -NMR), uključujući jedno- i dvodimenzionalne metode (NOESY, ROESY, gradijentne HSQC i HMBC, ^1H - ^1H COSY) i multipulsne NMR eksperimente (DEPT-90, DEPT-135 i selektivno homonuklearno dekupovanje), UV/Vis i IR spektroskopijom.

8. *Ispitivanje biološke aktivnosti izolovanih i/ili sintetisanih jedinjenja*

Biološka aktivnost procenjena je kroz:

- antimikrobnu aktivnost prema odabranim humanim i fitopatogenim mikroorganizmima mikrodilucionom metodom,

- ispitivanjem antibiofilm aktivnosti prema odabranim humanim i fitopatogenim mikroorganizmima,
- određivanjem inhibitornog delovanja na enzime ciklooksigenaze (fluorimetrijskom metodom) i 5-lipoksigenaze (spektrofotometrijskom metodom),
- određivanjem antioksidativnog potencijala na osnovu sposobnosti vezivanja („hvatanja“) slobodnih radikala DPPH i ABTS metodama,
- *in silico* analiza, uključujući DFT proračune i eksperimente molekulskog dokovanja (ukotljavanja).

2. OPŠTI DEO

2.1. TAKSONOMIJA, FILOGENIJA I POLIMORFIZAM VRSTE *Barbarea vulgaris*

2.1.1. Porodica Brassicaceae Burnett

Porodica kupusnjača (Brassicaceae), sinonim Cruciferae, predstavlja jednu od ekonomski najznačajnijih familija u okviru cvetnica, sa nezamenljivom ulogom u poljoprivredi. Vrste koje pripadaju ovoj porodici imaju izuzetan poljoprivredni, tradicionalni, prehrambeni i naučni značaj. Porodica Brassicaceae obuhvata oko 370 rodova i približno 4000 najčešće jednogodišnjih, dvogodišnjih i višegodišnjih biljnih vrsta (Tamokou et al., 2017; Jovanović-Dunjić et al., 1972). O širokoj rasprostranjenosti ove porodice svedoči činjenica da gotovo ne postoji deo Zemlje sa razvijenom vegetacijom u kojem njeni predstavnici u potpunosti izostaju. Većinu rodova karakteriše kosmopolitski karakter, dok se pojedini odlikuju umerenom ili restriktivnom geografskom distribucijom (Jovanović-Dunjić et al., 1972).

Značajan broj vrsta raste u području Sredozemlja, koje se odlikuje prisustvom monotipskih rodova (rodova sa samo jednom vrstom) endemskog karaktera ili rodova sa manjim brojem vrsta. Pojedine vrste uspevaju i na najvišim planinskim vrhovima, do granice poslednjeg vegetacionog sloja. U Flori Srbije zabeležen je 51 rod porodice kupusnjača (Diklić, 1972; Kopjar et al., 2012).

Krstašice se gaje širom sveta zbog svoje raznovrsne primene – kao povrće, začini, uljane kulture (rodovi *Sinapis*, *Raphanus*, *Brassica* i dr.), ukrasno bilje (rodovi *Aethionema*, *Iberis* i dr.) i kao stočna hrana (Diklić, 1972; Kopjar et al., 2012). Svakodnevna ishrana nezamisliva je bez kultivisanih predstavnika ove porodice, kao što su kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata*), karfiol (*B. oleracea* var. *botrytis*), brokoli (*B. oleracea* var. *italica*), rotkva (*Raphanus sativus*), keleraba (*B. oleracea* var. *gongylodes*) i potočarka (*Lepidium sativum*) (Jovanović-Dunjić et al., 1972; Kopjar et al., 2012).

Pored prehrambenog značaja, kupusnjače zauzimaju važno mesto i u narodnoj medicini zbog svojih terapijskih svojstava. Poznate su po antiinflamatornom, antimikrobnom, antioksidativnom i antikancerogenom delovanju. Brojna istraživanja ukazuju na značaj pojedinih vrsta u prevenciji i lečenju hroničnih oboljenja, uključujući maligne i kardiovaskularne bolesti (Fahey et al., 2001). Utvrđeno je da konzumacija biljaka iz ove porodice može delovati preventivno i smanjiti rizik od pojave različitih oblika kancera, poput kancera pluća (Wu et al., 2015), debelog creva (Azeem et al., 2015), bešike (Al-Zalabani et al.,

2016), želuca (Bosetti et al., 2012) i dojke (Bosetti et al., 2012; Wu & Pehrsson, 2021), kao i drugih maligniteta.

Smatra se da sposobnost prevencije malignih i benignih oboljenja potiče od degradacionih proizvoda glukozinolata, među kojima su najznačajniji izotiocijanati i indol-3-karbinol (Clarke, 2010; Wu & Pehrsson, 2021). Brojne *in vivo* i *in vitro* studije potvrdile su sposobnost ovih jedinjenja da indukuju apoptozu ćelija, tj. da pokrenu proces programirane smrti oštećenih ili tumorskih ćelija, čime doprinose suzbijanju razvoja malignih promena (Wu & Pehrsson, 2021; Abbaoui et al., 2012). Porodica Brassicaceae ima izuzetno važnu ulogu u agrokulturi, ali je istovremeno često na meti brojnih biljnih patogena i štetočina (Kuzina et al., 2011). Pored kupusnjača, značajnu pažnju istraživača privlače i srodne porodice, kao što su Cleomaceae i Capparaceae (Brown et al., 2003).

2.1.2. Rod *Barbarea* W. T. Aiton

Rod *Barbarea* W. T. Aiton¹ predstavlja relativno mali rod koji obuhvata 29 dvogodišnjih i višegodišnjih biljnih vrsta široko rasprostranjenih u različitim klimatskim područjima (Agerbirk et al., 2003; Al-Shehbaz, 1988; Mabberly, 1997). Prema novijim literaturnim podacima, rod *Barbarea* obuhvata 29 vrsta (Lange et al., 2022), dok se u Flori Srbije navodi da je 14 vrsta rasprostranjeno u Sredozemlju, kao i u delovima severne Azije, Severne i Južne Amerike (Diklić, 1972).

Vrstu *Barbarea vulgaris* W.T. Aiton taksonomski je opisao škotski botaničar William Townsend Aiton 1812. godine. Prvi naziv *Herba Sanctae Barbarae* dao je Rembert Dodoens u delu *Cruydeboeck* (1564), dok je Henry Lyte, 1578. godine, u svom delu *A Niewe Herball*, upotrebio skraćeni oblik *Barbarea*. Epitet *vulgaris* potiče od latinske reči *vulgus*, što znači „narod“ ili „običan“, i koristi se za označavanje vrsta koje su česte i široko rasprostranjene (Acta Plantarum, 2025). Ovaj rod ima monofiletski status, što znači da sve njegove vrste potiču

¹ Naziv roda *Barbarea* potiče od imena Svete Barbare, hrišćanske mučenice iz 3. veka, kojoj je biljka bila posvećena u Srednjem veku (Gilbert-Carter, 1964; Stearn, 1992; Diklić, 1972). *Herba Sanctae Barbarae* je srednjovekovni latinski naziv za biljku danas poznatu kao *Barbarea vulgaris*, a prevodi se kao „biljka (ili trava) Svete Barbare“. Pretpostavlja se da ova povezanost potiče iz činjenice da biljka ostaje zimzelena i u zimskom periodu, te da dostiže pun razvoj u vreme obeležavanja Svetičinog praznika (4. decembar, po starom kalendaru), kada su ljudi tradicionalno sakupljali rozete i koristili ih kao izvor svežeg zelenog povrća – običaj koji datira još iz 14. veka (Diklić, 1972; Acta Plantarum, 2025; Fermanagh Species Accounts, 2025).

od zajedničkog pretka, a smatra se da je prošao kroz proces divergentne evolucije u relativno kratkom evolutivnom periodu (Lange et al., 2022).

Vrste roda *Barbarea* karakterišu vretenasti koren, izduženo četvorouglasto seme sa mrežasto isprepletanom semenjačom i pljosnati listovi klice. Stabljike su najčešće nerazgranate pri osnovi, u gornjem delu razgranate, glatke ili retko obrasle prostim dlačicama. Listovi se morfološki razlikuju u zavisnosti od položaja na stabljici – bazalni listovi formiraju rozetu, perasto su deljeni i imaju lisnu dršku, dok su listovi u gornjem delu stabljike sedeći i šireg oblika. Cvetovi su grupisani u guste grozdaste cvasti. Čašični listići su jajasti, izduženi, sa beličastim opnastim obodom, i za trećinu do polovine kraći od kruničnih listića. Krunični listići su obrnuto jajasti, svetložute do intenzivno žute boje. U osnovi prašničkih konaca nalaze se nektarije različitih oblika i veličina. Tučak je sedeći, sa izraženim dvodelnim žigom i jasno vidljivim stubićem. Plod je okruglasto četvorouglast, ljuspaste teksture, sužava se ka vrhu i prelazi u kratak stubić. Po sazrevanju se otvara na dva ispupčena kapka sa izraženim središnjim nervom (Diklić, 1972).

Vrste ovog roda privlače značajnu pažnju istraživača zbog proizvodnje specifičnih sekundarnih metabolita koji imaju ulogu u odbrambenim mehanizmima biljke, poput saponina, neindolskih fitoaleksina i glukozinolata (Byrne et al., 2017). Pojedine vrste roda *Barbarea* koriste se u proizvodnji biljnih ulja, kao i u ishrani domaćih životinja. Gajene populacije ove biljke naturalizovane su u Australiji, Africi i na Novom Zelandu (Diklić, 1972). Prema podacima iz Flore Srbije, na teritoriji Srbije zastupljene su četiri vrste: *B. balcana*, *B. bracteosa*, *B. vulgaris* i *B. stricta* (Diklić, 1972).

Detaljnim literaturnim pregledom ističe se vrsta *B. vulgaris* W.T. Aiton, poznata pod narodnim nazivima dičak, barica ili obična repica. Raste širom Evrope (osim severnih područja), Azije (posebno u centralnom, južnom i istočnom delu kontinenta), severne Afrike (Alžir i Tunis), te je zabeležena i u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, na Novom Zelandu i u Argentini. Filogenetsko stablo ove vrste dato je u Tabeli 1. U literaturi je poznata pod engleskim nazivom *winter-cress*, jer listovi bazalne rozete ostaju zeleni tokom kasne jeseni, a često prežive i zimski period; u proleće razvija intenzivno žute cvetove, čime opravdava drugi epitet – *yellow rocket* (Agerbirk et al., 2001).

Prema zapisima iz tradicionalne medicine, jestivi delovi biljke koristili su se u lečenju prehlade, skorbuta i kao diuretik (Nielsen, Nielsen & Staerk, 2010). Zbog visokog sadržaja vitamina A i C, kao i karotenoida, list se koristi u pripremi salata. Filogenetski i

hemotaksonomski, *B. vulgaris* pokazuje sličnosti sa vrstama *Arabidopsis thaliana* i *Brassica rapa* (Dalby-Brown et al., 2011; Kuzina et al., 2011). Takođe, proizvodi specifičnu grupu fitoaleksina – nasturleksine, karakteristične i za vrstu *Nasturtium officinale* R. Br. iz iste porodice (Pedras et al., 2015; Pedras et al., 2018; Cárdenas et al., 2023).

U Crvenoj knjizi flore Srbije, *B. vulgaris* subsp. *lepuznica* navedena je kao ugroženi takson sa malim arealom; prisutna je na Vršaćkim planinama, u jugoistočnom delu Banata. Kao glavni uzroci njenog ugroženog statusa navode se industrijalizacija i izgradnja infrastrukture (Jakšić, DZPS; Diklić, 1972).

Razlike u ekološkoj adaptaciji uočene su i među hemotipovima – Agerbirk i saradnici (2016) utvrdili su da G-tip ima tendenciju rasta u suvljim predelima sa nižom vegetacionom produktivnošću. Novija istraživanja ukazuju na filogenetsku srodnost rodova *Armoracia* i *Cardamine* sa rodnom *Barbarea* (Olsen et al., 2016; Guo et al., 2017; Lange et al., 2022). Zbog morfološki sličnih listova i cvetova, *B. vulgaris* se često može zameniti sa vrstama roda *Sinapis* (Zrybko et al., 1997).

2.1.3. *Barbarea vulgaris* W.T. Aiton

Barbarea vulgaris W.T. Aiton (Slika 1) je divlja, samonikla zeljasta biljka koja se odlikuje dvogodišnjim, ređe višegodišnjim životnim ciklusom. Morfološki je prepoznatljiva po uspravnoj, uglastoj i slabo razgranatoj, glatkoj stabljici bez dlačica, koja u proseku dostiže visinu od 30 do 90 cm, a povremeno i do 1 m (Diklić, 1972; Senatore et al., 2000).

Koren je vretenast, mrkožute boje, sa gustim spletom žilica u gornjem delu. Listovi su raspoređeni u rozetu i perasto su deljeni na 5–9 režnjeva. Gornji listovi su sedeći, jajastog oblika, u osnovi blago uvijeni i prošireni, a prema dršci se postepeno sužavaju u klinast oblik. Odlikuju ih tamnozeleno boja, glatka površina bez dlačica i umerena debljina lisne lamele. Tokom cvetanja cvast je u početku zbijena, a kasnije se izdužuje i formira bogat grozdast sklop sa brojnim cvetovima. Period cvetanja traje od marta do septembra. Cvetovi su žuti, sa po četiri latice dužine 5–7 mm i širine 12–16 mm, koje se razvijaju iz zelenkastih pupoljaka smeštenih na vrhovima brojnih stabljika (Senatore et al., 2000). Čašični listići su izduženi, dužine 2,5–3,5 mm, a drške cvetova duge su 3–4 mm. Čašični listići i cvetne drške zajedno formiraju uspravan, vitak habitus cveta (Diklić, 1972). Plod je mahuna dužine 2–3 cm, uspravna, četvorouglasta i glatka, koja sadrži više sitnih semena. Prirodna staništa ove vrste obuhvataju

puteve, ivice staza, vlažne livade i planinske predele do oko 700 m nadmorske visine, a povremeno se može naći i u kultivisanim uslovima (Senatore et al., 2000) (Slika 2).

Tabela 1. Filogenetsko stablo biljne vrste *B. vulgaris*².

Taksonomska kategorija	Takson
<i>Regnum</i> (carstvo)	Plantae
<i>Divisio</i> (odsek)	Tracheophyta (vaskularne biljke)
<i>Subdivisio</i> (pododsek)	Spermatophytina (semenjače)
<i>Classis</i> (razred)	Magnoliopsida (dikotiledone)
<i>Superordo</i> (nadred)	Rosanae
<i>Ordo</i> (red)	Brassicales Bromhead
<i>Familia</i> (porodica)	Brassicaceae Burnett
<i>Subfamilia</i> (potporodica)	Brassicoideae Prantl & Karl
<i>Tribus</i> (pleme)	Cardamineae Dumort.
<i>Genus</i> (rod)	<i>Barbarea</i> W.T. Aiton
<i>Species</i> (vrsta)	<i>Barbarea vulgaris</i> W.T. Aiton

Tokom nekoliko decenija prošlog veka taksonomski status, odnosno definisanje taksonomske pripadnosti vrste *B. vulgaris*, bio je predmet brojnih diskusija. Takson prvobitno označen kao *B. vulgaris* ssp. *arcuata* kasnije je u pojedinim florama izdvojen i tretiran kao posebna vrsta (*B. arcuata*), na osnovu zapaženih karakteristika u procesu hibridizacije i zabeleženih slučajeva smanjene plodnosti hibrida u poređenju sa drugim intraspecijskim kategorijama (Lange, 1937; Bush, 1970; Rostrup & Jørgensen, 1970; Loos, 1996). U narednim decenijama, radi pojednostavljivanja taksonomske strukture, širok koncept vrste *B. vulgaris* ponovo je prihvaćen u mnogim florama (Bush, 1970; Loos, 1996).

U danskim florama najčešće se razlikuju dve podvrste – ssp. *arcuata* i ssp. *vulgaris* (Frederiksen et al., 2012; Hansen, 1981), dok se u drugim evropskim florama umesto podvrsta uvode varijeteti, i to var. *vulgaris* i var. *arcuata* (Hartvig, 2015; Lange et al., 2022; Mossberg & Stenberg, 2003). Morfološke razlike koje razdvajaju ova dva varijeteta prvenstveno se

²Prema Euro+Med PlantBase, dostupno na <https://ww2.bgbm.org> (pristupljeno: 30.10.2025.).

odnose na orijentaciju ploda i drške: kod var. *vulgaris* one su pretežno prave, dok su kod var. *arcuata* blago povijene, odnosno lučnog oblika (Agerbirk et al., 2003).



Slika 1. Ilustracija vrste *B. vulgaris*.

Izvor: A. Masclef. Atlas des plantes de France (1891).

B. vulgaris je rasprostranjena širom Evroazije i u delovima Afrike. Introdulovana je u Severnu Ameriku i Australiju, gde je često smatraju korovom (Slika 3). Prema nekim florističkim i taksonomskim izvorima, var. *arcuata* je relativno čest varijetet na području

bivšeg Sovjetskog Saveza (Bush, 1939), Skandinavije (Lange, 1937; Jensen, 1985; Nielsen, neobjavljeno) i Kanade (Mac Donald & Cavers, 1991) (Agerbirk et al., 2003).



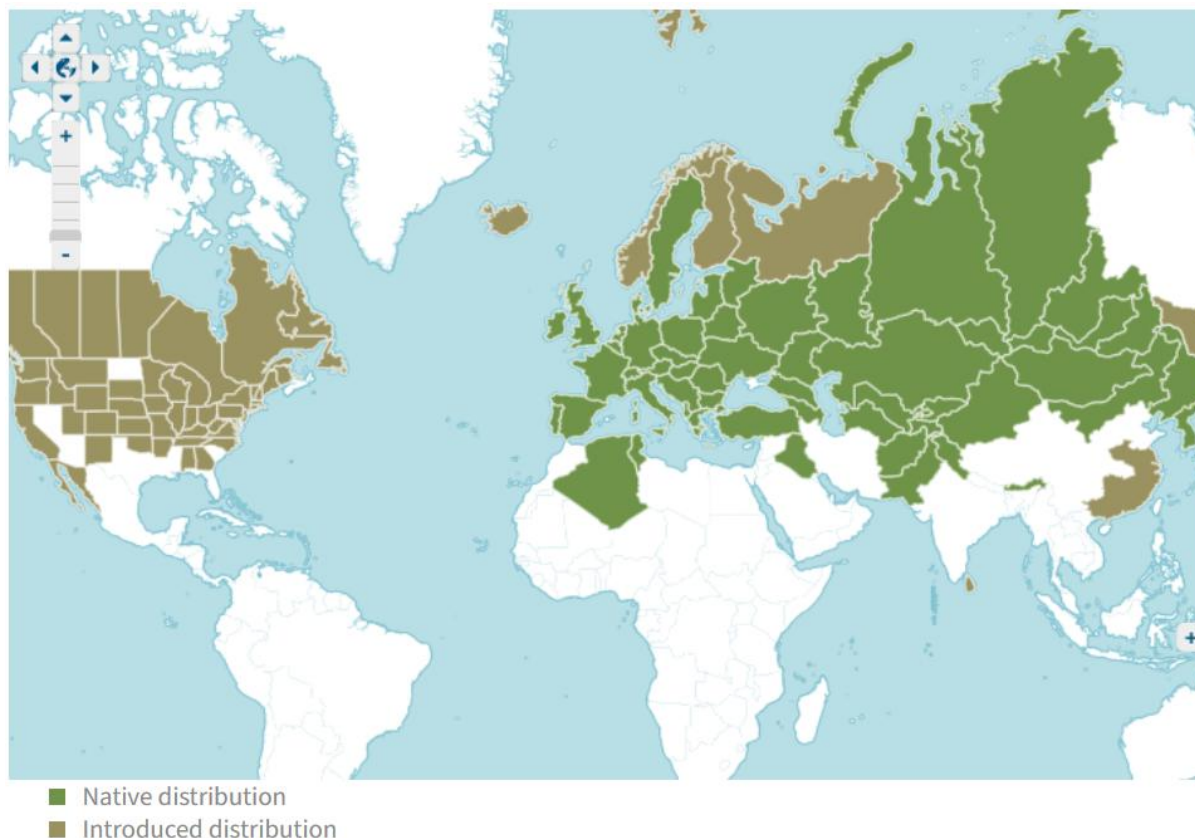
Slika 2. Habitus vrste *B. vulgaris*.

Izvor: *Acta Plantarum – Flora delle regioni italiane* (<https://www.actaplantarum.org>). Licenca CC BY-NC-ND 4.0.

2.1.4. Intraspecijska varijabilnost vrste *Barbarea vulgaris*

U kojoj meri će se biljka odbraniti od patogena zavisi, pre svega, od vrste sekundarnih metabolita koje proizvodi. Sastav sekundarnih metabolita može varirati unutar iste biljne vrste, unutar populacije – između jedinki iste vrste – kao i u zavisnosti od biosintetski uslovljenih puteva sinteze u pojedinim delovima biljke (Brown et al., 2003; Hartmann, 1996; Sang et al., 1984; Van Leur et al., 2006; Zhang et al., 1991). Koji će se sekundarni metaboliti proizvoditi zavisi od više faktora, kao što su varijabilnost genoma (Cipollini et al., 2003; Kliebenstein et al., 2001), ontogenetski stepen razvika (Boege & Marquis, 2005), klimatski faktori (Agerbirk

et al., 2001a), kao i vrsta patogena kojima je biljka izložena (Agrawal et al., Dicke et al., 2003; Van Leur et al., 2006; 1999; Van Dam et al., 2003). Pored tipa glukozinolata koje biljka poseduje, od velike važnosti je i njihova procentualna zastupljenost (Van Leur et al., 2006).



Slika 3. Geografska rasprostranjenost vrste *B. vulgaris*. Izvor: *World Flora Online* (2025): *Barbarea vulgaris* W.T. Aiton.

Objavljeno na: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000560064>. Pristupljeno 30. oktobra 2025. Licenca CC BY 4.0.

2.1.4.1. Monogeniski polimorfizam (BAR- i NAS-tip)

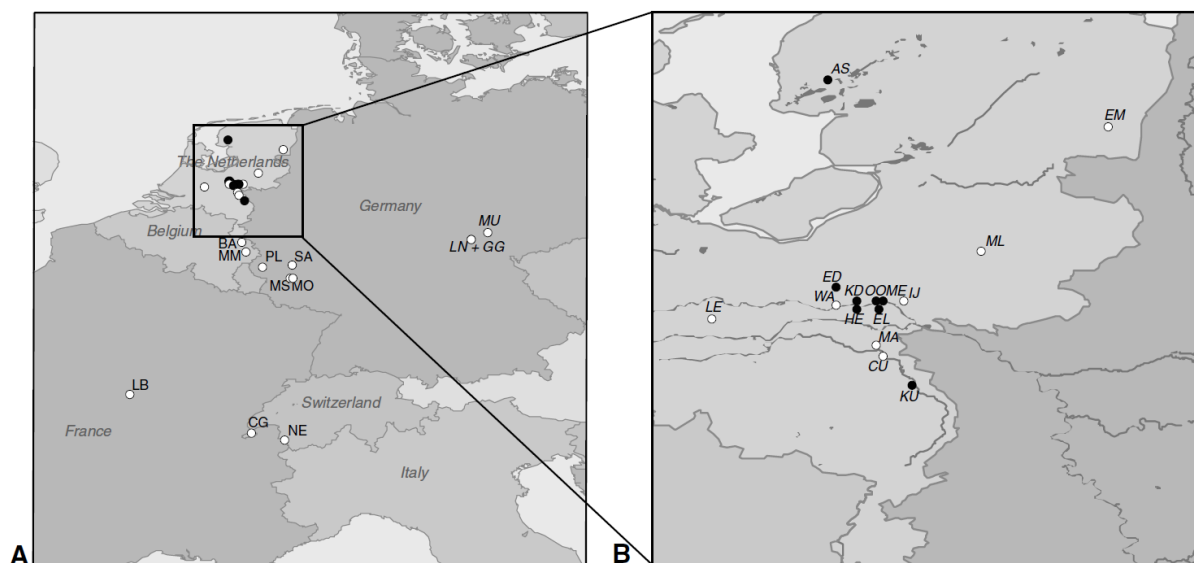
Barbarea vulgaris je privukla veliku pažnju zbog izuzetne intraspecijske hemijske varijabilnosti koja je povezana sa njenom adaptabilnošću i otpornošću prema biljojedima i patogenima. Ova vrsta predstavlja važan model za proučavanje varijacije glukozinolata i njenih ekoloških implikacija unutar porodice Brassicaceae (Agerbirk et al., 2003; Van Leur et al., 2006).

Istraživanja Van Leura i saradnika (2006) pružaju značajan uvid u intraspecijsku varijabilnost vrste *B. vulgaris*, naročito kada je reč o suptilnim monogeniskim razlikama

prisutnim u prirodnim populacijama. Ovi autori su ispitali glukozinolatni profil u prirodnim populacijama vrste *B. vulgaris*, pri čemu su identifikovali postojanje dva jasno razgraničena hemotipa ove vrste, koji su označeni kao BAR- i NAS-tip, i koji se, pre svega, razlikuju se prema sastavu glukozinolata. Iako oba hemotipa poseduju isti skup glukozinolata, bez značajnih razlika u ukupnom sadržaju ili raspodeli po biljnim organima, jasno se razdvajaju prema količini dominantnog glukozinolata (Van Leur et al., 2006). Prvi, BAR-tip, karakteriše dominacija glukobarbarina, odnosno (*S*)-2-hidroksi-2-feniletil-glukozinolata, dok je drugi, NAS-tip, zapravo monogenska varijanta u kojoj se pretežno akumulira glukonasturtiin (2-feniletil glukozinolat) (Van Leur et al., 2001; 2006). Utvrđeno je da strukturna razlika dominantnih glukozinolata u ova dva hemotipa predstavlja ključni faktor njihovog različitog biološkog delovanja (Van Leur et al., 2006). Pored glukozinolatnih profila, ova dva hemotipa se razlikuju i morfološki, naročito prema prisustvu ili odsustvu trihoma, kao i po različitom stepenu otpornosti na biljojede.

Prema dostupnim podacima, BAR-tip je najrasprostranjeniji i genetski najučestaliji u populacijama na teritoriji Srednje i Zapadne Evrope (Van Leur et al., 2006, 2008; Slika 4). U istraživanju navedenih autora utvrđena je geografska rasprostranjenost hemotipova u okviru populacija na teritoriji Holandije i susednih zemalja. Bez obzira na lokalne uslove staništa, u svim analiziranim populacijama oba hemotipa zabeležen je stabilan, konzistentan glukozinolatni profil. Dok je BAR-tip široko rasprostranjen u ispitivanim populacijama, NAS-tip je identifikovan samo u okviru određenog broja populacija na, takođe, geografski ograničenom području u Holandiji. U drugim ispitanim populacijama iz Holandije, kao i u komercijalnim uzorcima semena i svim ispitanim populacijama van Holandije, NAS-tip nije uočen. Prikaz geografske rasprostranjenosti ispitanih hemotipova prikazan na Slici 4 jasno potvrđuje izrazitu dominaciju BAR-tipa u odnosu na NAS-tip (Van Leur et al., 2006).

Prema mišljenju nekih autora, NAS- i BAR-tipove nazivaju formama, analogno najnižem taksonomskom rang, formi, koji se tipično koristi za monogenske varijetete, kako bi naglasili njihovu monogensku prirodu, za razliku od izražene genetičke divergencije između P- i G-tipa opisanih u daljem tekstu (Agerbirk et al., 2015).



Slika 4. Geografska rasprostranjenost NAS- i BAR-tipova kod ispitanih populacija sa teritorije Srednje i Zapadne Evrope. Crne tačke označavaju koegzistirajuće populacije oba hemotipa, dok bele tačke označavaju populacije kojima dominira isključivo BAR-tip.

Preuzeto iz Van Leur et al. (2006), uz dozvolu izdavača Elsevier.

Važno je napomenuti da su uočene razlike između hemotipova nasledne i genetički određene, što ukazuje na stabilan polimorfizam u prirodnim populacijama ove vrste. BAR- i NAS-forme vrste *B. vulgaris*, prilikom oštećenja tkiva i hidrolize glukozinolata, daju različite degradacione proizvode, čije strukturne razlike imaju važne biohemijske i ekološke posledice. Tokom hidrolize, 2-fenetil-glukozinolat (dominantan u NAS-formi) daje isparljive izotiocijanate, poznate po tome što odbijaju biljojede, naročito oligofagne za kupusnjače. Nasuprot tome, 2-hidroksi-derivati (glukobarbarin u BAR-formi) vode do formiranja oksazolidin-2-tiona, kao što je 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion (barbarin) i srodnih metabolita, čije su biološke funkcije još uvek nedovoljno razjašnjene (Van Leur et al., 2006). Zanimljivo je istaći da se NAS- i BAR-forme razlikuju u otpornosti prema polifagnom herbivoru, kupusnoj sovici (*Mamestra brassicae* L.) (Van Leur et al., 2008). Takođe, sprovedena je kvantitativna i kvalitativna analiza prisutnih aminokiselina i šećera, pri čemu je utvrđeno da ova dva hemotipa ne pokazuju varijabilnost u ovom pogledu (Van Leur et al., 2008) (opširnije u okviru odeljka 2.4.4).

2.1.4.2. Poligenski i duboko divergentni polimorfizam (G- i P-tip)

Prirodne populacije vrste *B. vulgaris* obuhvataju dva genetički divergentna tipa koja se razlikuju morfološki, biohemijski i citološki. Oni se, između ostalog, razlikuju po gustini i

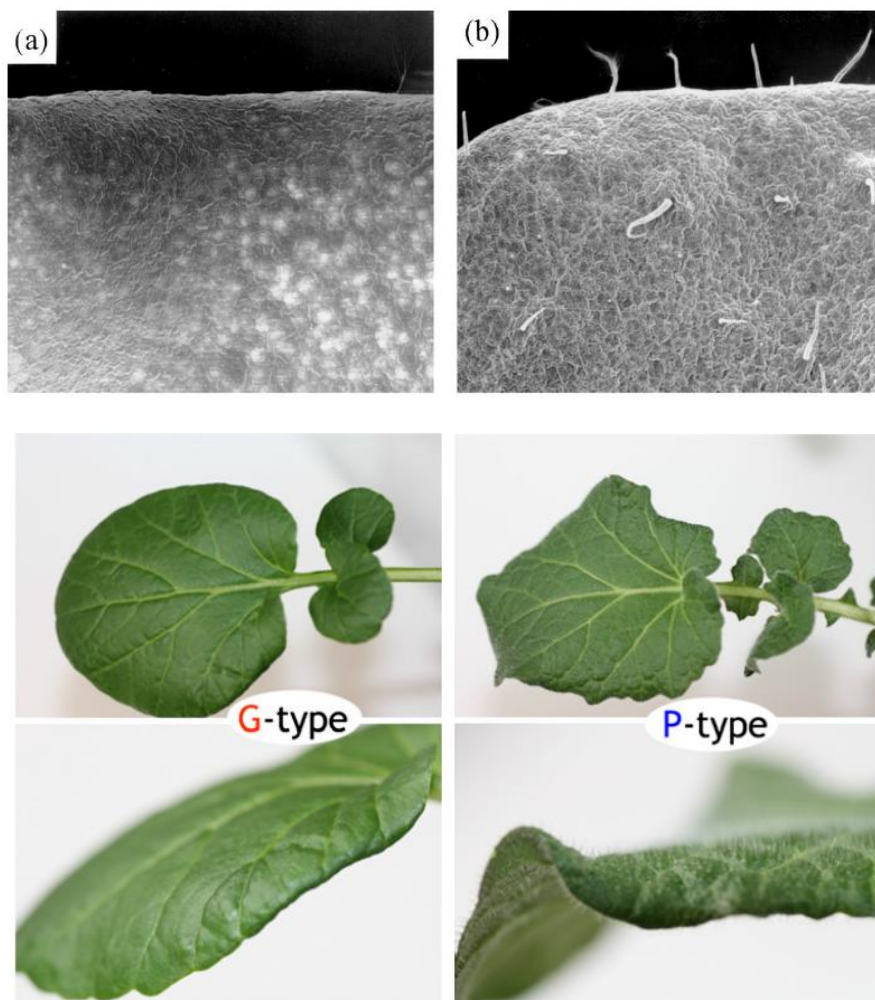
prisutnosti trihoma, specifičnim glukozinolatima, saponinima o evolutivnoj inovacijama i flavonoidi o sezonskim varijacijama, kao i po ekološkoj interakciji sa okolinom (Agerbirk et al., 2003; Agerbirk et al., 2015; Byrne et al., 2017; Christensen et al., 2014; Dalby-Brown et al., 2011; Kuzina et al., 2009). Ovi tipovi se razlikuju pre svega po gustini trihoma na listovima rozete: jedan tip je gotovo potpuno bez trihoma („goli“, eng. *glabrous*) i naziva se G-tip, dok drugi poseduje visoku gustinu trihoma („dlakavi“, eng. *pubescent*) i označava se kao P-tip (Slika 5). Ova dva tipa imaju različite, ali delimično preklapajuće geografske areale (Christensen et al., 2014) (Slika 6). Posebnu pažnju privlači izražen intraspecijski hemijski polimorfizam, naročito u pogledu glukozinolata (Agerbirk et al., 2003; Agerbirk et al., 2015; Christensen et al., 2014; Van Leur et al., 2006).

Najzastupljeniji glukozinolati G- i P-tipa razlikuju se u stereochemiji (*S*-, odnosno *R*-konfiguracija) hiralnog, benzilnog C-atoma, čime nastaju epimerni oblici glukobarbarina. G-tip pretežno biosintetiše glukobarbarin (2*S*-epimer), dok P-tip sintetiše epiglukobarbarin (2*R*-epimer), čija se struktura isključivo razlikuje u konfiguraciji benzilnog C-atoma (videti odeljak o glukozinolatima za detaljnije objašnjenje biosinteze, Agerbirk et al., 2022). Dodatna hidroksilacija u P-tipu rezultuje nastankom drugih, njemu specifičnih glukozinolata i odgovarajućih produkata njihove hidrolize. Pored hemijskih razlika, G- i P-tip razlikuju se i po morfološkim i reproduktivnim karakteristikama: ne koegzistiraju u istim populacijama, razlikuju se po gustini trihoma i ne ukrštaju se u prirodi, dok listovi oba tipa sadrže visoke koncentracije glukonasturtiina (Agerbirk et al., 2003; Van Leur et al., 2008).

Uopšteno, P-tip se znatno razlikuje od G-tipa, kao i od drugih ispitivanih vrsta roda *Barbarea*, pa se smatra “inovativnom” evolutivnom linijom u biosintezi specijalizovanih metabolita, koja obuhvata niz retkih, pa čak i jedinstvenih glukozinolata i saponina. Genetičke analize ukazale su na više od 22.000 fiksiranih razlika u kodirajućim regijama između G- i P-tipa, što potvrđuje izraženu genetičku divergenciju (Byrne et al., 2017). Ova dva tipa su razdvojena nepotpunom, ali značajnom reproduktivnom barijerom, što sugerise da predstavljaju važne, iako taksonomski nepriznate, evolutivne linije unutar vrste *B. vulgaris*. Pregled hibridizacije i evolutivne istorije *B. vulgaris* i srodnih vrsta dao je Lange sa saradnicima (2017). Prvi put je sekvenciran genom predstavnika roda *Barbarea*, što je značajan iskorak i za celu porodicu kupusa; slično filogenetski srodnoj vrsti *A. thaliana*, pretpostavlja se da gen GL1 može biti odgovoran za uočene razlike u gustini trihoma između hemotipova. Pored fenotipskih razlika koje potencijalno reguliše ovaj gen, sekvenciranjem genoma G- i P-tipa potvrđeno je prisustvo različitih skupova gena odgovornih za biosintezu dominantnih

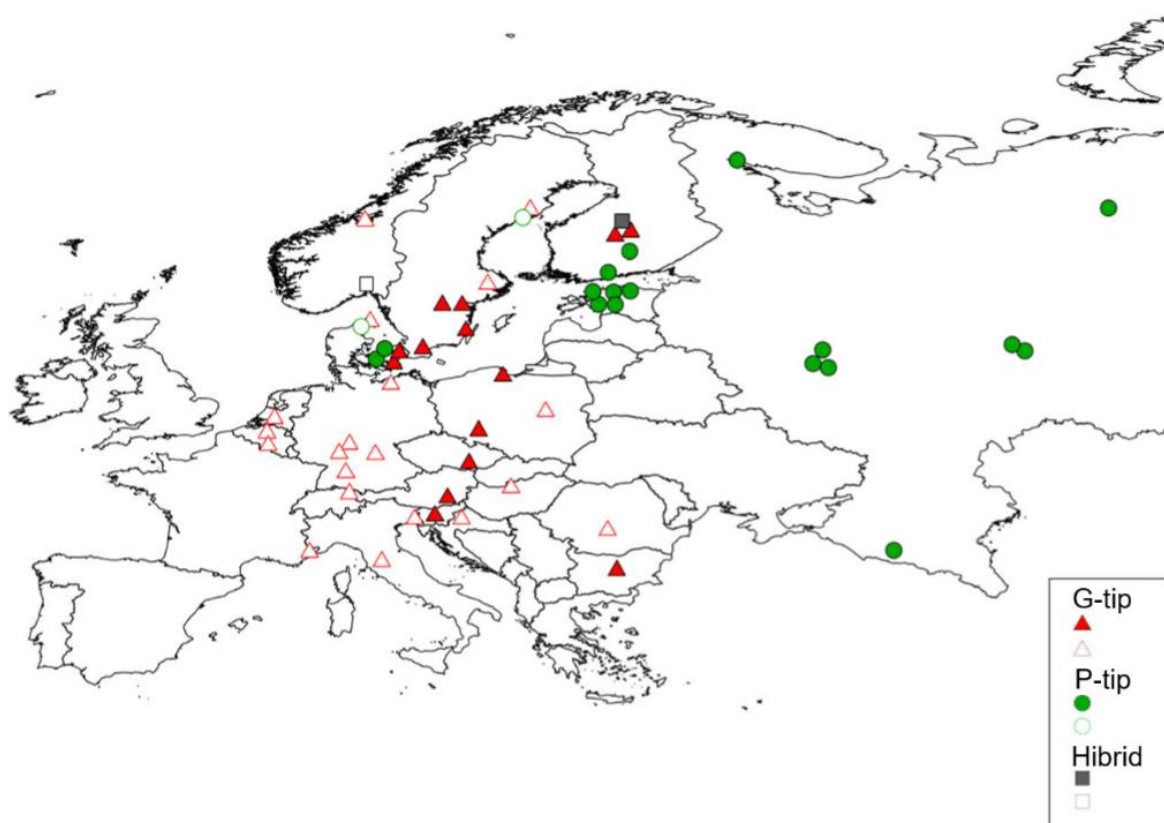
glukozinolata i saponina (Byrne et al., 2017). U odnosu na *A. thaliana*, smatra se da je *B. vulgaris* tokom evolucije izgubila glukozinolate koji potiču od metionina (Agerbirk et al., 2014; Byrne et al., 2017).

Ove fenotipske i genetičke razlike prate i jasne biohemijske razlike između hemotipova, naročito u pogledu glukozinolata, flavonoida i saponina (Kuzina et al., 2009; Dalby-Brown et al., 2011; Khakimov et al., 2012; Agerbirk et al., 2015).



Slika 5. Fenotipske razlike (gustina trihoma) između G- i P-tipa vrste *B. vulgaris* var. *arcuata*: snimak dobijen skenirajućom elektronskom mikroskopijom ($\times 43$) koji prikazuje pubescenciju na adaksijalnim površinama i ivicama listova rozete G- (gore levo) i P-tipa (gore desno) (Agerbirk et al., 2003); prikaz listova rozete oba hemotipa nalazi se u donjem delu slike.

Preuzeto iz Agerbirk et al. (2003), uz dozvolu izdavača Elsevier (gornji deo slike); Preuzeto iz Kuzina et al. (2009), uz dozvolu izdavača Oxford University Press (donji deo slike).



Slika 6. Geografska rasprostranjenost analiziranih populacija *Barbarea vulgaris*. Puni trouglovi označavaju G-tip populacije, puni krugovi P-tip populacije, a puni kvadrat označava pretpostavljenu hibridnu populaciju. Pored toga, G- i P-tip populacije iz studije Hauser i sar. (2012) označene su odgovarajućim otvorenim simbolima.

Preuzeto iz Agerbirk et al. (2015) uz dozvolu izdavača Elsevier i Christensen et al. (2014) uz dozvolu izdavača Springer Nature.

Kod G-tipa koji raste u Danskoj potvrđeno je prisustvo flavonoidnih glikozida, među kojima se izdvajaju kempferol-3-*O*-(2,6-di-*O*- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid i kvercetin-3-*O*-(2,6-di-*O*- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (detaljno obrađeno kasnije, u okviru odeljka 2.2.2. Flavonoidni glikozidi vrste *B. vulgaris*). Sa druge strane, P-tip akumulira značajno manje količine ovih flavonoida u poređenju sa G-tipom, koji istovremeno ispoljava i veću rezistentnost prema određenim insektima (Dalby-Brown et al., 2011). Isti autori su pokazali da rezistentnost na biljojede tokom sezone ispoljava mnogo izraženije promene nego koncentracije flavonoidnih glikozida. Drugim rečima, iako je otpornost biljaka prema insektima varirala u zavisnosti od godišnjeg doba, flavonoidni profil G- i P-tipa ostajao je relativno stabilan.

Nedavno sprovedena eko-metabolomska analiza pokazala je da su specifični oleanški triterpenski saponini kod *B. vulgaris* u značajnoj meri povezani sa rezistentnošću na *Phyllotreta nemorum*, čime se dodatno potvrđuju jasne biohemijske razlike između genotipova (Kuzina et al., 2009).

Pored toga, *B. vulgaris* pokazuje izražen polimorfizam u otpornosti prema insektima: P-tip je osetljiv na sve do sada poznate genotipove *Ph. nemorum*, dok je G-tip rezistentan na većinu uobičajenih genotipova ovih štetočina. Ovaj obrazac jasno potvrđuje da morfološke razlike u pubescenciji nisu samo fenotipska odlika, već imaju direktne ekološke i evolutivne posledice (Kuzina et al., 2009).

2.1.4.3. Geografska i evolutivna struktura *B. vulgaris* kompleksa

Ispitivanje geografske rasprostranjenosti hemotipova vrste *B. vulgaris* pokazalo je jasno prostorno razdvajanje između G- i P-tipa. U okviru 26 analiziranih populacija, identifikovano je 11 populacija u kojima dominira G-tip, 14 populacija sa dominantnim P-tipom, kao i jedna populacija mešovitog, hibridnog tipa (Christensen et al., 2014). Analiza glukozinolata potvrdila je da su glukobarbarin (2*S*-epimer) i epiglukobarbarin (2*R*-epimer) dominantni glukozinolati u većini populacija, u skladu sa stereospecifičnim razlikama između hemotipova: G-tip karakteriše pretežno 2*S*-epimer, dok je P-tip definisan dominacijom 2*R*-epimera. Izuzetak od ovog obrasca predstavljaju populacije iz Slovenije i sa Kavkaza (Rusija), kod kojih je uočeno odstupanje između hemotipske klasifikacije prema profile glukozinolata i genetičkih markera, što ukazuje na lokalne evolutivne specifičnosti ili istorijske događaje introgresije (Agerbirk et al., 2015). Između područja u kojima dominiraju G- odnosno P-tipovi nalazi se i jasno definisana zona kontakta, koju karakteriše prisustvo hibridnog tipa. Pojedine populacije iz Poljske i Bugarske (Slika 6) predstavljaju posebne slučajeve, jer pokazuju delimično odstupanje u glukozinolatnim profilima, ali i dalje fenotipski odgovaraju klasičnim G- i P-tipovima opisanim u južnoj Skandinaviji (Agerbirk et al., 2003; Christensen et al., 2014).

Ovi rezultati nedvosmisleno potvrđuju postojanje geografski strukturisanog hemotipskog polimorfizma unutar vrste *B. vulgaris*, pri čemu se hemotipovi razlikuju u stereohemiji glukozinolata, genetičkim markerima i prostornoj distribuciji, ali u isto vreme pokazuju ograničeno preklapanje i potencijal za hibridizaciju.

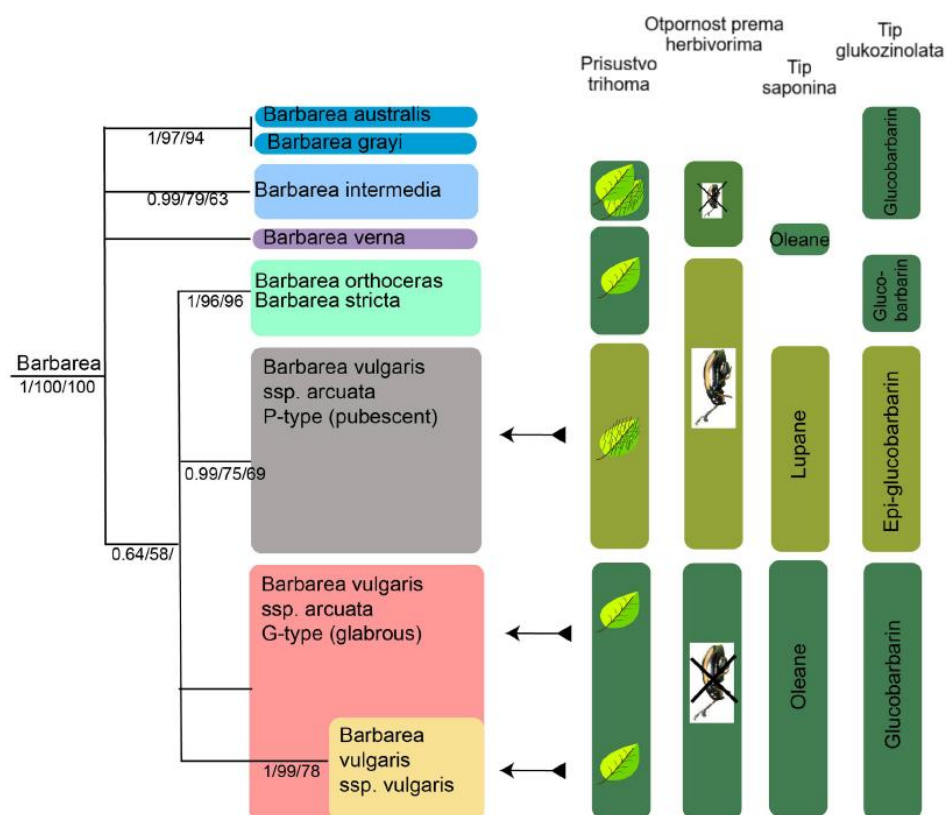
Analiza genotipa *B. vulgaris* ukazuje na značajnu genetičku divergenciju unutar vrste na teritoriji Danske: uzorci su pokazali nisku stopu hibridizacije između rezistentnih i osetljivih

hemotipova, što sugerise da su G- i P-tip bili ranije izolovani – verovatno u različitim refugijima tokom poslednjeg ledenog doba – te da su se nakon sekundarnog kontakta održali značajnu genetičku diferencijaciju (Toneatto et al., 2010). U literaturi se pominju tri glavne evolucione hipoteze koje objašnjavaju poreklo hemotipova kod *B. vulgaris*: (1) razlike u broju hromozoma, (2) hibridizacija sa drugim vrstama roda *Barbarea*, i (3) postepena divergencija hemotipova usled alopatrične specijacije ili geografske separacije. Prva hipoteza je u velikoj meri odbačena uprkos zabeleženim varijacijama u broju hromozoma među hemotipovima (Agerbirk et al., 2015; Ørgaard & Linde-Laursen, 2008). Druga hipoteza nema eksperimentalnu potvrdu, jer P-tip nije pokazao veću sličnost ni sa jednom ispitivanom vrstom roda *Barbarea* (Agerbirk et al., 2003; Agerbirk et al., 2015; Toneatto et al., 2012). Treća hipoteza dobija sve više potvrda zahvaljujući jasno izraženoj geografskoj razdvojenosti P- i G-tipa – prvog, široko rasprostranjenog u istočnoj Evropi, i drugog, pretežno prisutnog u zapadnijim regionima (Slike 6 i 7) (Christensen et al., 2014; Hauser et al., 2012). Većina istraživanja ukazuje na snažnu saglasnost između hemotipskog profila glukozinolata i genetičkih markera među hemotipovima, što dodatno potvrđuje postojanje divergentnih evolutivnih linija unutar ove vrste (Agerbirk et al., 2015).

Prema najnovijim filogenetskim analizama, pored dobro poznate podele na G- i P-tip u okviru *B. vulgaris* subsp. *arcuata*, jasno se izdvaja i treća evolutivna linija – tipična *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* (Slika 7). Ove tri linije razlikuju se morfološki, hemijski i genetički, i predstavljaju duboko divergentne genetske grupe unutar vrste (Lange et al., 2022). Autori stoga preporučuju tretiranje vrste kroz tri infrataksonsko ekvivalentne jedinice („vulgaris-tip”, „G-tip” i „P-tip”), naglašavajući da *B. vulgaris* pokazuje izuzetno visok stepen unutrašnje varijabilnosti. U skladu s tim, predlaže se upotreba termina „*Barbarea vulgaris* kompleks” (Lange et al., 2022; Rich, 1987), kao adekvatnog odraza njene složene evolutivne istorije.

B. arcuata (Opiz ex J. & C. Presl) Reichenb. (sin. *B. vulgaris* subsp. *arcuata* (Opiz) Hayek) bila je obuhvaćena istraživanjem prisustva i raspodele mikotoksina u divljim krstašicama Centralne Rusije. Burkin i Kononenko (2022) analizirali su prisustvo mikotoksina u 12 vrsta Brassicaceae i pokazali da se određeni toksini (alternariol, ciklopiazonska kiselina i ergot alkaloidi) javljaju sa visokom frekvencijom, dok su drugi detektovani znatno ređe. Kod *B. arcuata* zabeležene su razlike u raspodeli mikotoksina između vegetativnih i generativnih organa, ali nije utvrđena jasna sezonska dinamika njihove akumulacije. Ovaj nalaz ukazuje na

stabilnost prisustva mikotoksina u vremenu kod *B. arcuata*, ali ne omogućava generalizaciju o odsustvu intraspecijske varijabilnosti za *B. vulgaris* u celini.



Slika 7. Filogenetski odnosi vrsta roda *Barbarea* (*B. australis*, *B. grayi*, *B. verna*, *B. intermedia*, *B. orthoceras*, *B. stricta*, *B. vulgaris* ssp. *arcuata* (P-tip), *B. vulgaris* ssp. *arcuata* (G-tip) i *B. vulgaris* ssp. *vulgaris*) i intraspecijska struktura *B. vulgaris*. Otpornost prema herbivorima označava saponinima posredovanu rezistentnost na specijalizovane herbivore. Prikazan je preovlađujući tip saponina (oleanski ili lupanski) i dominantni tip glukozinolata – S-oblik (glukobarbarin) ili R-oblik (epiglukobarbarin).

Preuzeto i adaptirano iz Lange et al. (2022) uz dozvolu izdavača Elsevier.

Pored morfoloških (Agerbirk et al., 2003; Byrne et al., 2017; Kuzina et al., 2009), hemijskih odnosno hemotipskih (Van Leur et al., 2001; Van Leur et al., 2006) i genotipskih razlika (Hauser et al., 2021; Van Leur et al., 2008), sve više podataka ukazuje da divergencija između G- i P-tipa obuhvata i ekološku dimenziju. Heimes i saradnici (2016) pokazali su da G-tip, za razliku od P-tipa, pretežno nastanjuje suvlja, manje produktivna i alkalnija staništa, što ukazuje na jasnu razliku u stanišnim preferencijama hemotipova. Rezultati recipročnog transplantacionog ogleda dodatno su potvrdili da biljke oba tipa ostvaruju značajno veću biomasu tokom prve vegetacione godine kada rastu na staništima „vlastitog“ hemotipa, u

poređenju sa staništima drugog hemotipa, što predstavlja direktan pokazatelj lokalne adaptacije. Ovi rezultati jasno sugerišu da su se G- i P-tipovi divergirali u određenoj meri u pravcu ekotipske diferencijacije, pri čemu se adaptacija na različite mikroekološke uslove nadovezuje na već dobro dokumentovane razlike u trihomima, saponinima, glukozinolatima i genetičkim markerima. U skladu s tim, divergencija unutar vrste *B. vulgaris* posmatra se danas kao višeslojni proces koji obuhvata međusobno povezane fenotipske, biohemijske, genetske i ekološke aspekte.

2.1.4.4. Odbrambeni metaboliti i interakcije sa herbivorima i patogenima kod vrste *B. vulgaris*

Vrste roda *Barbarea*, uključujući *B. vulgaris* i *B. verna*, odlikuju se složenim i višeslojnim odbrambenim fenotipovima. Među najistaknutijim karakteristikama izdvajaju se rezistentnost prema larvama *Ph. nemorum*, specifična interakcija sa dijamantskim moljcem (*Plutella xylostella*) – koju odlikuje privlačenje odraslih jedinki za ovipoziciju uz istovremenu nemogućnost razvoja njihovih larvi – zatim otpornost prema oomiceti *Albugo candida*, kao i dobra podnošljivost niskih temperatura (Agerbirk et al., 2003; Huang et al., 1994; Van Leur et al., 2008). Ovakvi odbrambeni obrasci čine rod *Barbarea* modelom od posebne vrednosti za proučavanje interakcija biljka–herbivor i biljka–patogen.

U okviru vrste *B. vulgaris* sposobnost odbrane dodatno je oblikovana izraženom hemijskom i genetičkom diferencijacijom njenih hemotipova. Hemotipske razlike u sastavu i koncentraciji dominantnih glukozinolata, kao i u strukturi njihovih degradacionih proizvoda, direktno utiču na to kako različiti herbivori i patogeni prepoznaju i eksploatišu biljku. Razumevanje funkcionalne uloge ovih sekundarnih metabolita stoga predstavlja ključni korak u tumačenju adaptivne vrednosti hemijske raznovrsnosti unutar vrste. U nastavku je dat pregled glavnih odbrambenih metabolita *B. vulgaris* i načina na koje oni učestvuju u ekološkim interakcijama koje oblikuju dinamiku prirodnih populacija ove vrste.

Glukozinolatno-mirozinazni sistem i hemotipske razlike

Odbrambeni metaboliti vrste *B. vulgaris* čine jedan od najistaknutijih primera hemijske evolucije u porodici Brassicaceae. Kao i druge krstašice, *B. vulgaris* poseduje razvijen glukozinolat-mirozinaza odbrambeni mehanizam, tzv. *mustard-oil bomb*, koji se aktivira pri oštećenju biljnog tkiva i pokreće niz hemijskih reakcija sa snažnim biološkim efektima (Ratzka et al., 2002; Wittstock et al., 2003). Hidroliza glukozinolata pod dejstvom mirozinaze dovodi

do nastanka izotiocijanata, nitrila, epitionitrila, tiocijanata i drugih reaktivnih jedinjenja, čija se priroda i toksičnost određuju strukturom glukozinolata i prisustvom proteina koji usmeravaju tok razgradnje (ESP³, NSP⁴ i TFP⁵). Ove molekule karakterišu snažna antimikrobna i antinutritivna svojstva, zbog čega imaju ključnu ulogu u hemijskoj odbrani biljke, ali i u oblikovanju njenih ekoloških interakcija. Dosadašnja istraživanja pokazuju da izotiocijanati ispoljavaju izrazitu toksičnost prema različitim biljojedima, puževima, fitopatogenim gljivama, nematodama, kao i prema pojedinim biljkama (Kerfoot et al., 1998; Potter et al., 1999; Serra et al., 2002; Tierens et al., 2001; Wittstock et al., 2003; Yamane et al., 1992).

Vrsta *B. vulgaris* naročito se izdvaja izraženim hemijskim polimorfizmom, koji se ogleda u postojanju više hemotipova različitog glukozinolatnog sastava i različitih odbrambenih fenotipova. Hemotipovi G- i P-tip razlikuju se po stereochemiji hidroksilacije fenetilglukozinolata, što utiče na prirodu i biološku aktivnost nastalih produkata razgradnje. Na primer, G-tip i BAR-tip, koji proizvode visoke koncentracije (2S)-glukobarbarina, karakteriše formiranje 2-hidroksi-2-feniletil izotiocijanata, koji zbog prisutne hidroksi-grupe spontano prelazi u ciklički derivat – 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion, poznat kao barbarin. Barbarin ne dostiže tipičnu akutnu toksičnost izotiocijanata, ali je u pojedinim istraživanjima pokazano da može doprineti odbrani biljke, na primer od kupusne kile koju izaziva *Plasmodiophora brassicae* i od polifagnih štetočina kao što je *M. brassicae*, gde je uočeno usporavanje razvoja larvi i povećan mortalitet (Fenwick et al., 1983; Kjær & Gmelin, 1957; Ludwig-Müller et al., 1999; Van Leur et al., 2006; Van Leur et al., 2008). Oksazolidin-2-tioni, uključujući barbarin, svrstavaju se među jedinjenja sa potencijalnim antinutritivnim dejstvom, ali njihova precizna ekološka uloga u biljkama i dalje ostaje delimično razjašnjena.

Sa druge strane, pojedini herbivorni insekti specijalisti, poput *Pieris rapae*, *Ph. nemorum* i *Delia radicum*, evolutivno su razvili visoku toleranciju prema izotiocijanatima. Kod ovih vrsta glukozinolati ne deluju prvenstveno kao toksini, već kao signalni molekuli koji stimulišu prepoznavanje domaćina, hranjenje ili polaganje jaja (Chew, 1988; Nielsen, 1997c; Städler et al., 2002). NAS-tip, u kome dominira glukonasturtiin, hidrolizom proizvodi 2-feniletil izotiocijanat – jedinjenje snažne toksičnosti prema širokom spektru biljojeda, puževa, fitopatogenih gljiva i nematoda (Kerfoot et al., 1998; Potter et al., 1999; Serra et al., 2002;

³ eng. *epithiospecifier protein*.

⁴ eng. *thiocyanate-forming protein*.

⁵ eng. *thiocyanate-forming protein*.

Tierens et al., 2001; Wittstock et al., 2003; Yamane et al., 1992). Iako bi ovakav hemijski profil trebalo da predstavlja snažnu odbrambenu barijeru, vrste roda *Pieris* uspele su da ga zaobiđu zahvaljujući NSP proteinu, enzimu koji preusmerava razgradnju glukozinolata ka formiranju manje toksičnih nitrila (Chew, 1988; Nielsen, 1997; Städler et al., 2002). Ova prilagođenost predstavlja jasan primer koevolucije između biljaka i njihovih specijalizovanih antagonista.

Ekološka dinamika odbrane naročito se upečatljivo ispoljava u odnosu prema dijamantskom moljcu (*P. xylostella*). Iako odrasli moljci redovno polažu jaja na *B. vulgaris*, larve se na ovoj biljci ne mogu uspešno razvijati – fenomen poznat kao *dead-end trap crop*. Ovaj mehanizam povezan je sa specifičnim glukozinolatnim profilom i produktima razgradnje, te predstavlja dvostruku strategiju: biljka privlači herbivora radi ovipozicije, ali istovremeno onemogućava razvoj larvi (Reyes et al., 2024).

Uloga saponina u odbrani i hemotip-specifična otpornost

Rod *Barbarea* je jedini poznati rod u porodici Brassicaceae u čijim se vrstama identifikuju triterpenski saponini kao deo odbrambenog metabolizma biljke (više o hemiji i strukturi u odeljku 2.2.4). Ova pojava dovodi se u vezu sa evolucijom specijalizovanih glukozil-transferaza (posebno članova UGT73C podfamilije), koje su kod *B. vulgaris* stekle novu supstratnu specifičnost usled duplikacije gena (Augustin et al., 2011; Byrne et al., 2017). Smatra se da je biosinteza saponina u ovom rodu evoluirala nakon uspostavljanja glukozinolata kao primarne linije hemijske odbrane u Brassicaceae, kao dodatni zaštitni sloj koji doprinosi otpornosti biljke prema biljojedima i patogenima (Byrne et al., 2017).

Specifični triterpenski saponini *B. vulgaris* pokazuju izrazitu funkcionalnu povezanost sa interakcijama biljke i specijalizovanih herbivora. Jedan od prvih eksperimentalno potvrđenih efekata zabeležen je upravo u odnosu prema dijamantskom moljcu (*P. xylostella*). Ovaj insekt koristi glukozinolate i njihove produkte razgradnje kao ključne signalne molekule za prepoznavanje domaćina, pa odrasle jedinke redovno polažu jaja na predstavnike porodice Brassicaceae. Ipak, *B. vulgaris* predstavlja izuzetak: iako je atraktivna za ovipoziciju, larve na ovoj biljci ne mogu da se razviju, što je klasičan primer prethodno opisanog *dead-end trap crop* fenomena (Shinoda et al., 2002; Badenes-Pérez et al., 2014; Reyes et al., 2024). Iz listova *B. vulgaris* izolovan je triterpenski saponin 3-*O*-[*O*-β-D-glukopiranozil-(1→4)-β-D-glukopiranozil]-hederagenin kao ključno *feeding deterrent* jedinjenje koje sprečava larve *P. xylostella* da se hrane biljnim tkivom (Serizawa et al., 2001; Shinoda et al., 2002). Ovo jedinjenje predstavlja prvi opisani oleananski saponin sa ovakvim dejstvom u porodici

Brassicaceae, ali i prvi metabolit ove porodice sa jasno potvrđenom feeding-deterrent ulogom prema *P. xylostella*.

Dalja istraživanja pokazala su da razlike između G- i P-tipa *B. vulgaris* značajno utiču na njihovu otpornost prema *P. xylostella* i *Ph. nemorum*. Iz listova G-tipa izolovan je triterpenski saponin 3-*O*- β -celobiozil-oleanolna kiselina, čija se koncentracija tokom vegetacione sezone smanjuje od leta ka kasnoj jeseni, prateći pad rezistentnosti na dijamantskog moljca (Agerbirk et al., 2003; Nielsen et al., 2010). Ekstrakti listova G-tipa značajno inhibiraju rast larvi *P. xylostella*, dok P-tip ne proizvodi iste saponine u dovoljnoj meri i samim tim pokazuje slabiju rezistentnost (Kuzina et al., 2009). Slično tome, G-tip ispoljava visoku otpornost prema *Ph. nemorum*, dok je P-tip generalno osetljiv, što dodatno potvrđuje centralnu ulogu saponina u odbrani prema ovim specijalizovanim štetočinama (Agerbirk et al., 2001; Agerbirk et al., 2003; Shinoda et al., 2002).

Geografska ispitivanja pokazala su da se različiti genotipovi *B. vulgaris* razlikuju i po rezistentnosti i po saponinskom profilu. Populacije koje rastu u Češkoj, Poljskoj i delovima Finske (Ruta, Jyvä 3—skraćene za populacije koje rastu u oblastima Rutalahti i Jyväskylä/Lievestuore u Finskoj) odlikuju se visokom otpornošću i niskim preživljavanjem larvi, dok populacije iz Rusije, Estonije i oblasti Leiv u Finskoj pokazuju veći procenat preživljavanja larvi *Ph. nemorum* i *P. xylostella* (Christensen et al., 2014; Kuzina et al., 2011). U otpornim populacijama dominiraju saponini oleanskog tipa, poput celobiozida hederagenina, gipsogenina i 4-epihederagenina, dok u osetljivijim populacijama ti saponini izostaju ili se javljaju u znatno nižim koncentracijama. Na osnovu toga zaključuje se da prisustvo i koncentracija ovih saponina predstavljaju jedan od ključnih determinanti otpornosti *B. vulgaris* na specijalizovane štetočine (Kuzina et al., 2009; Nielsen et al., 2010a,b).

Na nivou odnosa strukture i funkcije, od posebnog je značaja činjenica da modifikacije u aglikonskom skeletu i broj, tip i raspored šećernih ostataka snažno utiču na biološku aktivnost saponina. Uopšteno, monoglikozidni saponini pokazuju veću biološku aktivnost od diglikozidnih analoga, dok su kod glikozida hederagenina zabeleženi primeri da derivati sa tri šećerne jedinice ispoljavaju izraženije moluskocidno dejstvo od analognih jedinjenja sa jednim šećernim ostatkom (Parkhurst et al., 1974; Schenkel et al., 1991; Favel et al., 1994; Lee et al., 2001; Sparg et al., 2004; Kuzina et al., 2009). Ovi nalazi uklapaju se u širu sliku prema kojoj su saponini u *B. vulgaris* “druga linija odbrane”, koja deluje uz glukozinolatni sistem i dodatno

ograničava preživljavanje i ishranu specijalizovanih biljojeda (Feeny, 1977; Shinoda et al., 2002; Badenes-Pérez et al., 2014).

Hemotip-specifične razlike u odbrani dodatno su potvrđene i u interakcijama sa *Ph. nemorum* i patogenima. Prema Agerbirku i saradnicima (2003), G-tip ispoljava potpunu otpornost prema tzv. ST-liniji⁶ ovog biljojeda, dok je P-tip u potpunosti osetljiv, što se dovodi u vezu sa prisustvom triterpenskih saponina karakterističnih za G-tip i odsutnih ili potisnutih u P-tipu. P-tip, iako generalno osetljiviji prema većini herbivora, ispoljava značajno veću otpornost prema patogenu bele rđe (*A. candida*), u poređenju sa G-tipom (Christensen et al., 2014; Hauser et al., 2021). Nalaz da P-tip uspešno odoleva infekciji *Albugo* spp., dok G-tip podleže uprkos višim koncentracijama visokoaktivnih saponina, jasno pokazuje da je otpornost prema patogenima rezultat kompleksne interakcije više odbrambenih puteva. Shodno tome, uloga saponina mora se tumačiti u okviru šire, multikomponentne hemijske odbrane, a ne kao jedini faktor zaštite.

Dodatne biotske interakcije i hemijska specijalizacija

Dodatne razlike u interakcijama biljojeda sa hemotipovima NAS- i BAR-tipa dokumentovali su Van Leur i saradnici (2008). Polifagni biljojed *M. brassicae* pokazao je 100% preživljavanje na NAS-tipu, dok je na BAR-tipu razvoj larvi bio značajno usporen i praćen povećanim mortalitetom. Nasuprot tome, specijalista *Pieris rapae* nije pokazala razliku između hemotipova, što ukazuje na visok stepen adaptacije specijalizovanih biljojeda na glukozinolate *B. vulgaris*.

Iako se BAR- i NAS-tipovi razlikuju po dominantnim glukozinolatima u nadzemnim organima, oba hemotipa u korenu sadrže glukonasturtiin, čija je uloga povezana sa osnovnim odbrambenim mehanizmima u podzemnim organima (Agerbirk et al., 2003; Van Dam et al., 2004; Van Leur et al., 2006; Kirkegaard & Sarwar, 1998).

Intraspecijska hemijska diferencijacija dodatno je naglašena prisustvom 1,4-dimetoksiglukobrasicina, izolovanog iz korena *B. vulgaris* ssp. *arcuata*, kao i njegovog verovatnog biosintetičkog prekursora, tenualeksina (2-(1,4-dimetoksi-1*H*-indol-3-il)acetonitril) (Pedras et al., 2014). Ovaj glukozinolat karakterističan je isključivo za P-tip *B. vulgaris* var. *arcuata* i nije pronađen u drugim vrstama roda *Barbarea*, niti u vrstama rodova

⁶ Genotipovi *Phyllotreta nemorum* tolerantni na saponine (eng. *saponin-tolerant line*).

A. i *Brassica* (Agerbirk et al., 2001; Agerbirk et al., 2003), što predstavlja snažan primer specijalizacije i evolutivnog divergiranja unutar vrste.

Sveukupno, glukozinolati vrste *B. vulgaris* nisu samo hemijski odbrambeni mehanizam već i centralna tačka kontakta između biljke i organizama u njenom okruženju. Na taj način glukozinolati u velikoj meri određuju tokove energije između trofičkih nivoa, obrasce ponašanja herbivora, otpornost prema patogenima i dugoročne evolutivne putanje prirodnih populacija.

Konačno, više studija potvrdilo je da se *B. vulgaris*, naročito pojedini genotipovi, može posmatrati kao obećavajuća *dead-end trap crop* vrsta za suzbijanje *P. xylostella* u agroekosistemima (Badenes-Pérez et al., 2014; Newman et al., 2016). Odrasle jedinke privlače glukozinolati, ali larve ne mogu da prežive zbog saponinskog sastava u listu, što otvara mogućnost praktične primene ovih saznanja u integrisanoj zaštiti bilja.

2.1.4.5. Značaj hemotipske varijabilnosti i istraživanja populacija sa Balkana

Uzimajući u obzir sve navedeno, hemotipske, morfološke (fenotipske), genotipske i, na posletku, ekotipske razlike čine ovu vrstu složenom na više nivoa, pri čemu su svi njeni „tipovi“ uzročno-posledično povezani. Definisanjem osobenosti pojedinačnih tipova uočava se njihova međuzavisnost i preplitanje sa karakteristikama drugih, različito definisanih tipova. Pregled dosadašnje literature ukazuje na nedostatak sličnih podataka za populacije *B. vulgaris* koje rastu na Balkanskom poluostrvu. Stoga je precizno i jasno određivanje „tipa“ koji raste u Srbiji postavljeno kao jedan od važnijih ciljeva ove doktorske disertacije.

2.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *Barbarea vulgaris*

Detaljnim pregledom dostupne naučne literature putem baza *SciFinder Scholar* i *Google Scholar* utvrđeno je da je u proteklom decenijama vrsta *B. vulgaris* bila predmet brojnih fitohemijskih i povezanih istraživanja (pristupljeno 25.8.2025.). Rezultati ovih istraživanja ukazuju na prisustvo velikog broja specifičnih sekundarnih metabolita, pre svega glukozinolata i njihovih produkata razgradnje, kao i drugih strukturno i biosintetski različitih jedinjenja (Agerbirk et al., 2001; Agerbirk et al., 2003; Agerbirk et al., 2011; Agerbirk et al., 2015; Agerbirk et al., 2018; Agerbirk et al., 2021; Van Leur et al., 2008; Van Leur et al., 2011; Dalby-Brown et al., 2011; Kuzina et al., 2011; Pedras et al., 2015a; Pedras et al., 2015b; Pedras et al., 2017; Pedras et al., 2018; Senatore et al., 2000).

U skladu sa pripadnošću porodici Brassicaceae, fitohemijski profil *B. vulgaris* dominantno čine glukozinolati i njihovi produkti razgradnje, najčešće izotiocijanati, nitrili i oksazolidin-2-tioni. Pored glukozinolata, u ovoj vrsti su opisani i saponini, različiti flavonoidni glikozidi, kao i posebno istaknuti fitoaleksini – nasturleksini. Ovi sekundarni metaboliti se razlikuju po hemijskoj strukturi, raspodeli u tkivima i organima biljke, kao i po biološkim funkcijama, uključujući ulogu u odbrani od herbivora, patogenih i drugih abiotičkih i biotičkih stresova, što *B. vulgaris* čini pogodnim model-sistemom za proučavanje odnosa između hemijske zaštite biljaka i ekoloških interakcija.

2.2.1. Glukozinolati

Među najznačajnijim i najzastupljenijim sekundarnim metabolitima u porodici Brassicaceae nalaze se glukozinolati (GSL) – jedinjenja koja sadrže sumpor i imaju ključnu ulogu u odbrani biljaka, ali i u unapređenju ljudskog zdravlja (Van Leur et al., 2008; Kopjar et al., 2012). Glukozinolati su sekundarni metaboliti karakteristični za krstašice, čija je biološka aktivnost tokom poslednjih decenija privukla značajnu naučnu pažnju. Predstavljaju strukturno veoma raznovrsnu grupu jedinjenja koja značajno doprinose ukupnoj odbrambenoj sposobnosti biljaka (Fahey et al., 2001; Agrawal & Kurashige, 2003). Ovi metaboliti mogu odvratiti herbivore od hranjenja biljkom koja ih sadrži, inhibirati rast mikroorganizama i doprineti toleranciji biljnog tkiva na patogene, dok kod ljudi imaju važne biološke efekte, među kojima se posebno ističe antikancerogeno dejstvo (Fahey et al., 2001; Kopjar et al., 2012; Agrawal & Kurashige, 2003). Izotiocijanati su naročito bioaktivni, pa mogu delovati čak i na specijalizovane insekte, omogućavajući biljkama koje ih proizvode značajnu ekološku prednost, dok su nitrili i tiocijanati nešto manje toksični za insekte (Van Leur et al., 2008).

Osnovnu strukturu glukozinolata čini β -tioglukozid-*N*-hidroksi-sulfat. Poznati su i kao (*Z*)-*N*-hidroksiiminosulfatni estri, sa bočnim R-ostatkom i D-glukopiranoznim prstenom povezanim sa aglikonom preko tioglukozidne veze (S-veze) (Slika 8). Međusobne razlike među glukozinolatima uglavnom potiču od strukture bočnog R-ostatka, koji biosintetski potiče iz različitih aminokiselina (Mithen, 2001; Van Leur et al., 2006). Do danas je opisano više od 200 glukozinolata (Dekić, 2011; Bennett et al., 2004; Bellostas et al., 2007; Clarke, 2010). Tipični predstavnici prikazani su na Slici 8.

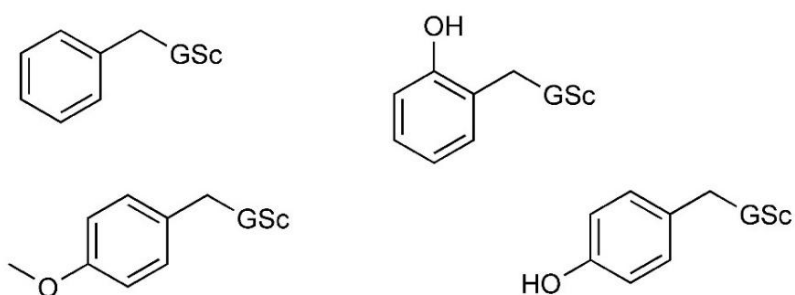
Glukozinolati se najčešće razvrstavaju prema aminokiselini iz koje potiče njihov bočni lanac ili prema tipu strukturnih modifikacija R-grupe. Tako, glukozinolati nastali iz alanina, leucina, izoleucina, metionina ili valina pripadaju grupi alifatičnih glukozinolata; jedinjenja

izvedena iz fenilalanina ili tirozina svrstavaju se u aromatične, dok se oni koji potiču iz triptofana nazivaju indolskim glukozinolatima. Kod većine glukozinolata bočni lanac prolazi kroz dodatne strukturne modifikacije, pri čemu metionin predstavlja posebno značajan prekursor zbog velikog broja mogućih metaboličkih transformacija. Ove modifikacije obuhvataju produžavanje R-grupe metilenskim jedinicama (homologaciju), hidroksilaciju, O-metilovanje, uvođenje dvostrukih veza, glikozilovanje i/ili acilovanje (Dekić, 2011).

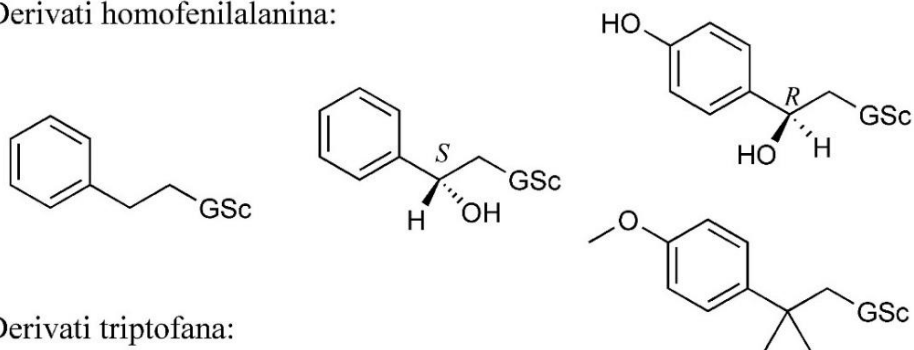
Kada se biljno tkivo bogato glukozinolatima mehanički ošteti, dolazi do njihove hidrolize katalizovane enzimom mirozinazom (β -tioglukozid glukohidrolaza, TGG, EC 3.2.1.147), pri čemu nastaje širok spektar toksičnih, biološki aktivnih i hemijski reaktivnih proizvoda razgradnje – najčešće izotiocijanati, nitrili i tiocijanati, ali i drugi derivati (Van Leur et al., 2008; Agerbirk et al., 2018; Wittstock et al., 2016) (Slika 9). Tokom poslednjih decenija identifikovan je veći broj dodatnih proteina koji usmeravaju razgradnju glukozinolata ka različitim klasama produkata. Među najznačajnijima su tzv. specifični biomolekuli koji određuju tip nastalog produkta: ESP, NSP i TFP-ptoteini. Ovi proteini usmeravaju nestabilni aglikon, nastao delovanjem mirozinaze, ka formiranju izotiocijanata, nitrila, epitionitrila ili tiocijanata. Paralelno su opisani i složeni, tkivno i ćelijski specifični obrasci lokalizacije glukozinolata, mirozinaza i navedenih proteina, što ukazuje na znatno veću složenost ovog sistema nego što se ranije pretpostavljalo (Agerbirk et al., 2018; Pastorczyk & Bednarek, 2016; Wittstock et al., 2016a,b; Montaut & Bleeker, 2010; Agerbirk & Olsen, 2012; Frisch et al., 2015; Pedras et al., 2016; Klein & Sattely, 2017; Kissen & Bones, 2009; Barth & Jander, 2006).

Kompartmentalizacija glukozinolata i mirozinaza je složena. U klasičnom modelu, glukozinolati se skladište u tzv. S-ćelijama, dok su mirozinaze lokalizovane u mirozin-ćelijama (idioblastima), pri čemu su ovi tipovi ćelija najčešće susedni, ali međusobno odvojeni (Barth & Jander, 2006; Koroleva et al., 2000; Husebye et al., 2002; Thangstad et al., 2004). Međutim, novija istraživanja pokazuju da glukozinolati i mirozinaze mogu biti razdvojeni i na nivou subćelijskih kompartneta, kao i da u pojedinim tkivima i razvojnim fazama dolazi do njihove ko-lokalizacije u istim ćelijama u zavisnosti od tkiva i razvojnog stadijuma, što dodatno ukazuje na složenost organizacije ovog sistema (Chhajed et al., 2019; Hunziker et al., 2019).

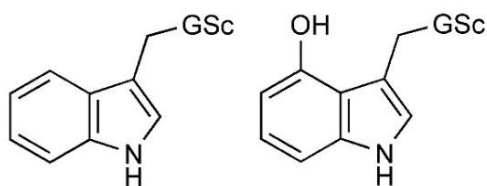
Derivati fenilalanina/tirozina:



Derivati homofenilalanina:



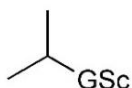
Derivati triptofana:



Derivat alanina:



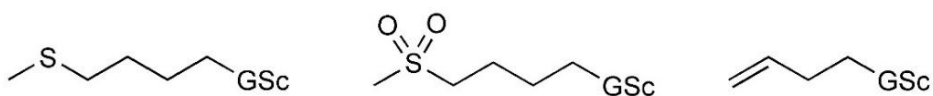
Derivat valina:



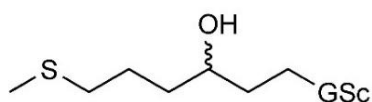
Derivati izoleucina:



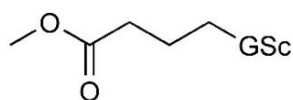
Derivati dihomometionina:



Derivat tetrahomometionina:

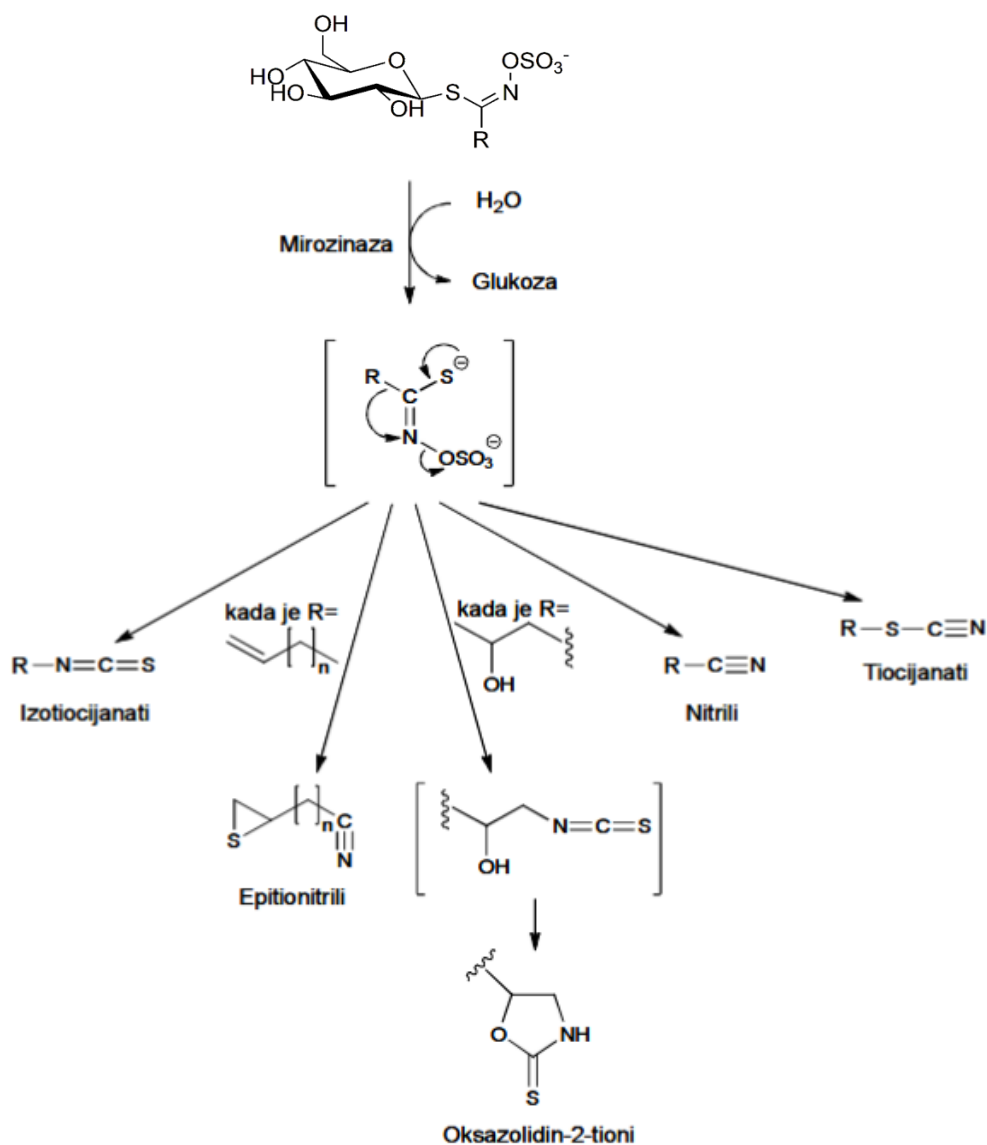


Derivat homoglutaminske kiseline:



Slika 8. Tipični predstavnici glukozinolata razvrstani prema biosintetskom poreklu, tj. aminokiselinama iz kojih se izvode (Agerbirk & Olsen, 2012). Opštu formulu glukozinolata i strukturu GSc grupe videti na Slici 10.

Naročito specifično za *B. vulgaris* jeste intraspecijska varijabilnost u pogledu GSL profila. Ova vrsta pokazuje jasne hemotipove koji se razlikuju prema tipu i količini sintetisanih GSL, što utiče na njihove ekološke interakcije, posebno na otpornost prema herbivorima (Van Leur et al., 2006). Zbog ovih osobina, *B. vulgaris* predstavlja značajan ekološki i biohemijski model za proučavanje varijacija glukozinolata unutar porodice Brassicaceae (Halkier, 2006).

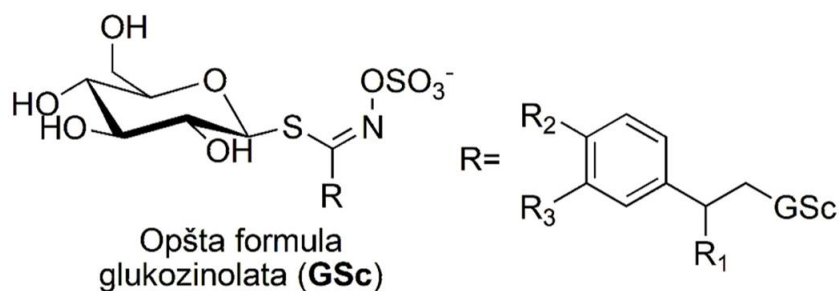


Slika 9. Degradacija glukozinolata i produkti njihove razgradnje (Dekić, 2011).

2.2.1.1. Glukozinolati i njihovi degradacioni proizvodi u vrsti *B. vulgaris*

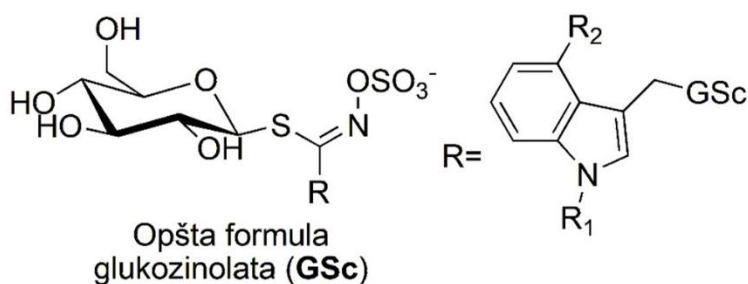
Glukozinolati predstavljaju najznačajniju i najtemeljnije proučavanu grupu sekundarnih metabolita u vrsti *B. vulgaris*, a istovremeno i jedan od najsuptilnijih primera hemijske diversifikacije unutar porodice Brassicaceae. Dosadašnja fitohemijska istraživanja *B. vulgaris* otkrila su izrazito bogat i divergentan glukozinoladni profil, pri čemu su

najzastupljeniji derivati aromatičnog i indolskog porekla. Za razliku od mnogih drugih predstavnika porodice Brassicaceae, kod kojih dominiraju glukozinolati alifatičnog porekla (npr. kod *A. thaliana*), u rodu *Barbarea* preovlađuju glukozinolati izvedeni iz aromatičnih i indolskih prekursora, pre svega fenilalanina, homofenilalanina i triptofana (Agerbirk et al., 2003; Byrne et al., 2017; Khakimov et al., 2015). Sažetak do sada identifikovanih glukozinolata u nadzemnim i podzemnim organima vrste *B. vulgaris* prikazan je na Slici 10 i Slici 11 (Agerbirk et al., 2003; Agerbirk et al., 2011; Gusinac et al., 2025).



Glukozinolati izvedeni iz homofenilalanina	R ₁	R ₂	R ₃
Glukonasturtiin (1)	H	H	H
Glukobarbarin (2)	OH(S)	H	H
Epiglukobarbarin (3)	OH(R)	H	H
<i>p</i> -Hidroksiglukobarbarin (4)	OH(S)	OH	H
<i>p</i> -Hidroksiepiglukobarbarin (5)	OH(R)	OH	H
<i>p</i> -Hidroksiglukonasturtiin (6)	H	OH	H
<i>m</i> -Hidroksiglukonasturtiin (7)	H	H	OH
<i>m</i> -Hidroksiepiglukobarbarin (8)	OH(R)	H	OH
Delimično identifikovan glukozinolat (9)	H	H/Me	H/Me
Delimično identifikovan glukozinolat (10)	OH	H/Me	H/Me

Slika 10. Glukozinolati izvedeni iz homofenilalanina identifikovani u *B. vulgaris* (Gusinac et al., 2025).



Glukozinolati izvedeni iz triptofana	R ₁	R ₂
Glukobrasicin (11)	H	H
4-Metoksiglukobrasicin (12)	H	OMe
Neoglucobrasicin (13)	OMe	H
1,4-Dimetoksiglukobrasicin (14)	OMe	OMe
4-Hidroksiglukobrasicin (15)	H	OH

Slika 11. Indolski glukozinolati identifikovani u *B. vulgaris* (Gusinac et al., 2025).

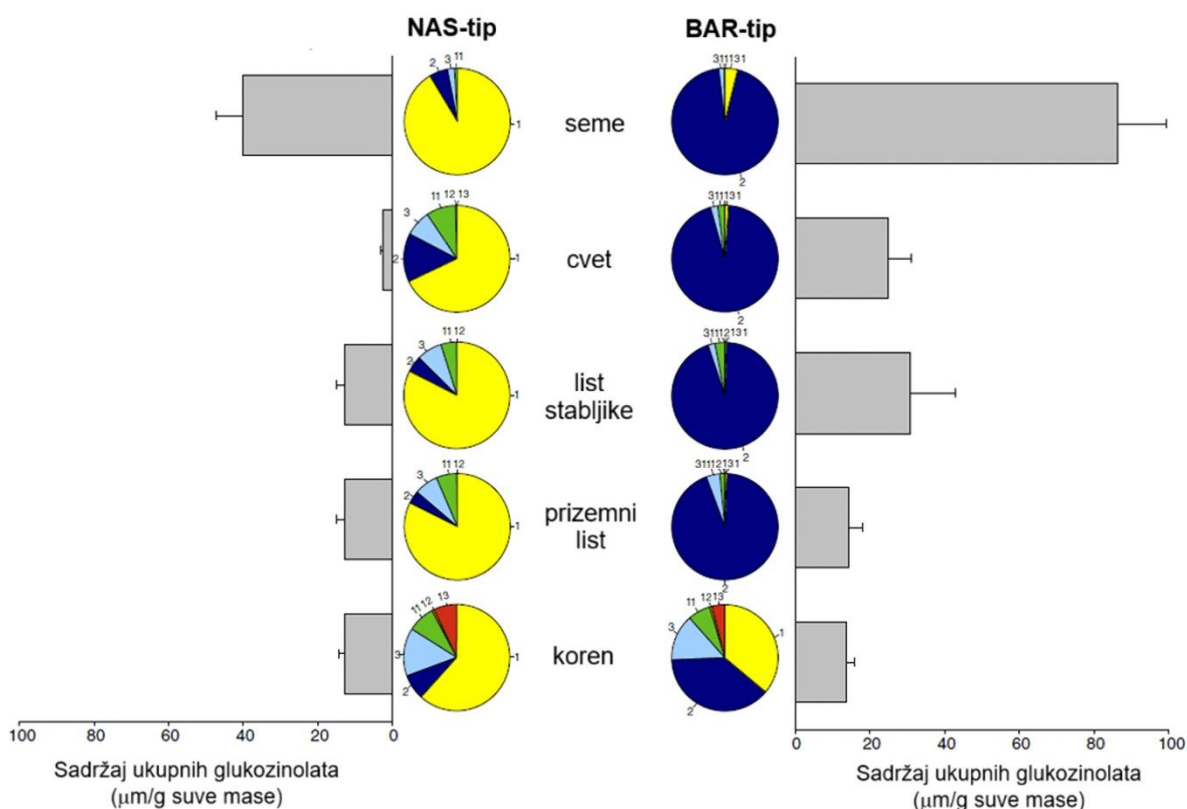
Jedan od najzanimljivijih aspekata hemijske raznovrsnosti glukozinolata u *B. vulgaris* jeste postojanje dva jasno razdvojena hemotipa – G- i P-tipa. Ovi hemotipovi razlikuju se u stereochemiji 2-hidroksilacije zajedničkog fenetilglukozinolatnog skeleta, što dovodi do formiranja epimernih oblika glukobarbarina: G-tip biosintetiše pretežno glukobarbarin (2*S*-epimer) (**2**), dok je za P-tip karakteristična sinteza epiglukobarbarina (2*R*-epimer) (**3**), često praćena dodatnim hidroksilovanim derivatima. Ove stereochemijske razlike dalje uslovljavaju stvaranje različitih produkata razgradnje glukozinolata, uključujući specifične izotiocijanate, nitrile i oksazolidin-2-tione, koji imaju istaknute ekološke funkcije. Divergentnost glukozinolata između G- i P-tipa, kako na strukturnom tako i na biosintetskom nivou, smatra se ključnim faktorom koji oblikuje interakcije *B. vulgaris* sa herbivorima, patogenima i drugim komponentama ekosistema.

Pored ovog stereochemijskog polimorfizma, unutar vrste je prisutan i drugi nivo hemijske diferencijacije, oličen u tzv. BAR- i NAS-tipu. Ovi hemotipovi ne razlikuju se po prisutnosti različitih glukozinolata, već po njihovoj relativnoj raspodeli u biljnim organima. BAR-tip karakteriše izrazito visoka zastupljenost glukobarbarina u nadzemnim organima, dok NAS-tip dominira glukonasturtiinom, koji u listovima može činiti i više od 80% ukupnog glukozinolatnog profila (Van Leur et al., 2006). Kvantitativne analize pokazale su da NAS-tip sadrži glukonasturtiin u udelu od približno 62% u korenu i 81% u nadzemnim organima, dok BAR-tip karakteriše glukobarbarin sa oko 94% u nadzemnim delovima i oko 38% u korenu, uz relativno visok sadržaj neoglukobrassicina u korenu BAR-tipa (Van Leur et al., 2006). Iako BAR- i NAS-tip poseduju kvalitativno identičan skup glukozinolata, kvantitativna raspodela među organima biljke utiče na različite fiziološke i biochemijske odgovore, kao i na metabolite nastale u procesu razgradnje. Najrasprostranjeniji i najučestaliji BAR-tip sintetiše pretežno glukobarbarin ((2*S*)-hidroksi-2-feniletilglukozinolat) (**2**), dok ređi NAS-tip preovlađujuće sadrži glukonasturtiin (2-feniletil glukozinolat) (**1**) (Slika 12).

Hidrolizom 2-feniletil glukozinolata (glukonasturtiina) (**1**) nastaju odgovarajući izotiocijanati, dok 2-hidroksilovani oblici, poput glukobarbarina (**2**) u BAR-tipu, spontano prelaze u stabilne oksazolidin-2-tion derivate i njihove analoge kao glavne degradacione produkte (Van Leur et al., 2006).

Pored fenetil-derivata, u *B. vulgaris* su identifikovani i brojni indolski glukozinolati. Jedan od najintrigantnijih je 1,4-dimetoksiglukobrassicin (**14**), izolovan iz korena P-tipa *B. vulgaris* (Agerbirk et al., 2001). Ovaj metabolit, zajedno sa glukobrasicinom (**11**), 1-

metoksiglukobrasicinom i 4-metoksiglukobrasicinom (**12**), nije identifikovan ni u jednoj drugoj vrsti roda *Barbarea*, niti u biljkama rodova *A.* i *Brassica* (Agerbirk et al., 2001; 2003). Prisustvo ovako retkog indolskog glukozinolata ukazuje na visoku biosintetsku specijalizaciju određenih hemotipova i značajnu fleksibilnost metaboličkih puteva u okviru vrste. Degradacioni proizvodi glukozinolata identifikovani u vrsti *B. vulgaris* prikazani su na Slici 13.

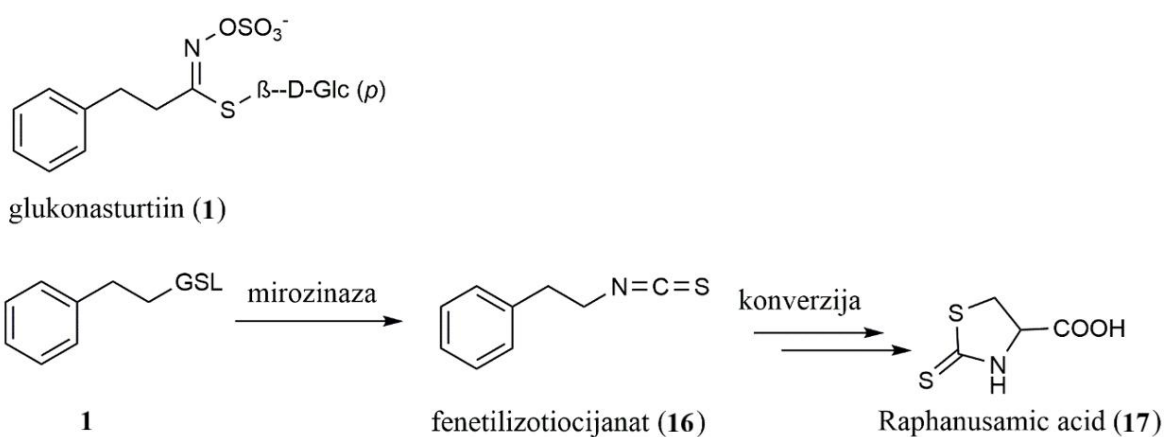


Slika 12. Rasprostranjenost glukozinolata u različitim delovima biljke između dva hemotipa u NAS- i BAR-tipovima: glukonasturtiin (**1**), glukobarbarin (**2**), epiglukobarbarin (**3**), glukobrasicin (**11**), 4-metoksiglukobrasicin (**12**) i neoglukobrassicin (**13**).

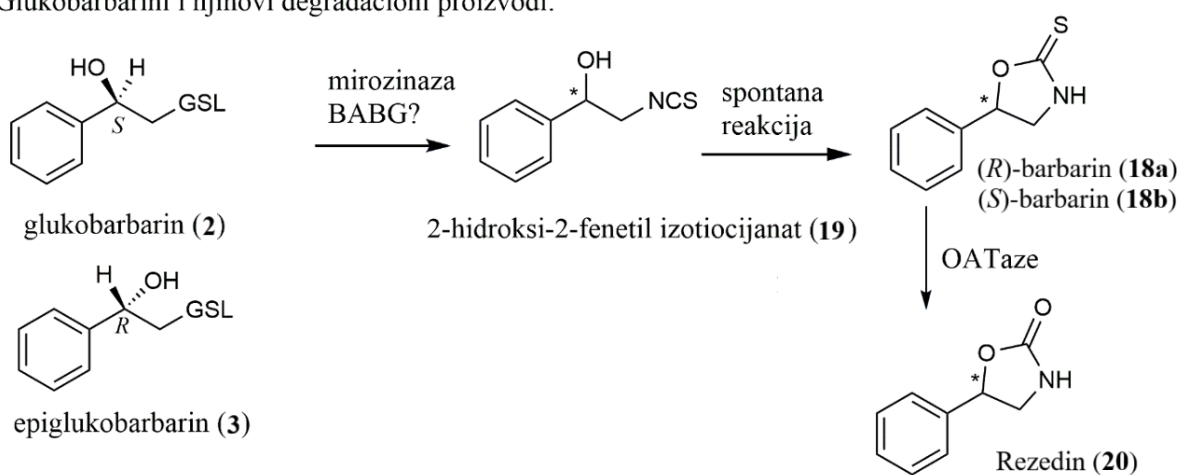
Preuzeto i adaptirano iz Van Leur et al. (2006), uz dozvolu izdavača Elsevier.

Dodatna istraživanja pokazala su da se glukozinolati, iako kvalitativno identični među hemotipovima, raspodeljuju u različitom odnosu između korena, stabla, listova i semena. Na primer, u semenu više evropskih populacija najrasprostranjeniji glukozinolat bio je 2*S*-glukobarbarin (Andersson et al., 1999), dok je u korenu često prisutna visoka koncentracija neoglukobrassicina (Agerbirk et al., 2003). U skladu sa ovim nalazima, Windsor i saradnici (2005) potvrđuju da *B. vulgaris* ne proizvodi alifatične glukozinolate karakteristične za mnoge druge kupusnjače, čime se jasno diferencira u okviru porodice po svom hemijskom „potpisu“.

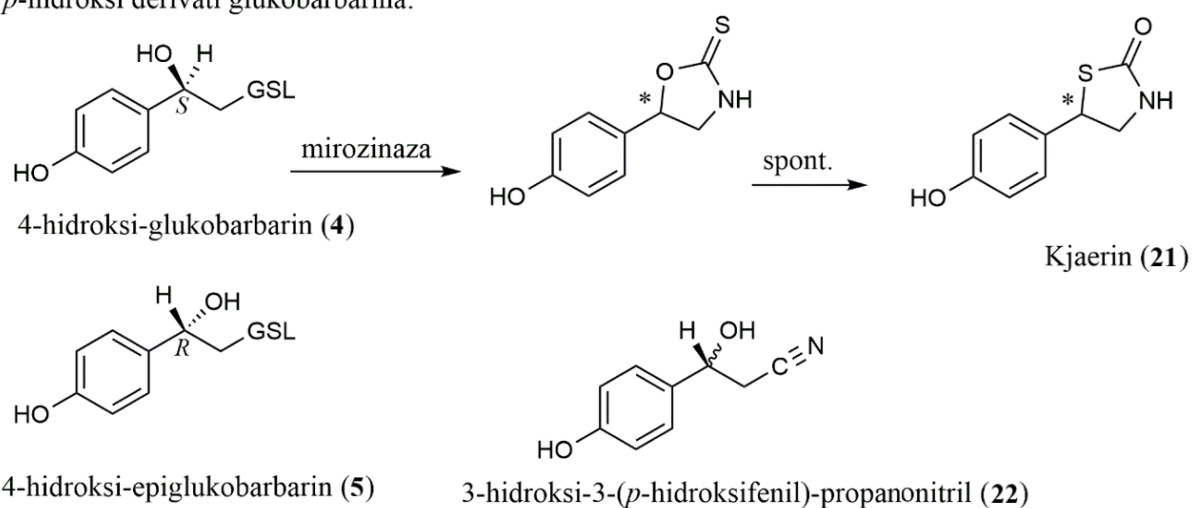
Fenetilglukozinolati i njihovi degradacioni proizvodi:



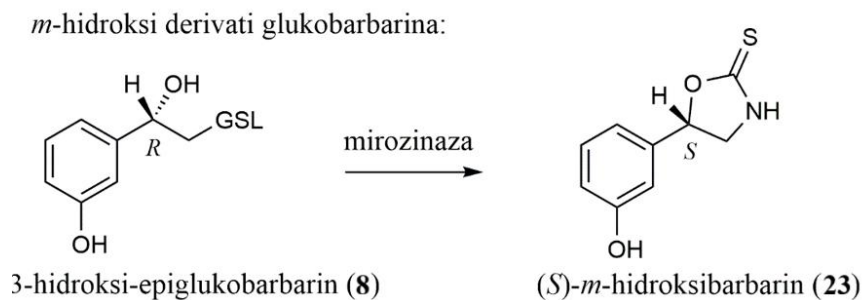
Glukobarbarini i njihovi degradacioni proizvodi:



p-hidroksi derivati glukobarbarina:



Slika 13. (nastavak na sledećoj strani)



Slika 13. Degradacioni proizvodi glukozinolata identifikovani u vrsti *B. vulgaris*; *- hiralni centar, BABG – vrsta enzima mirozinaze (Agerbirk & Olsen, 2015; Cardenas et al., 2023).

Hemijska raznovrsnost glukozinolata u *B. vulgaris* dopunjena je i otkrićem novih struktura u novijim analizama. Primena savremenih niskoskalnih metoda ekstrakcije dovela je do otkrića ranije nepoznatog glukozinolata – 8-(metilsulfanil)oktil glukozinolata – što ukazuje da fitohemijska diversifikacija vrste još uvek nije u potpunosti sagledana (Brèard et al., 2022).

Razlike u glukozinolatnim profilima reflektuju se i na geografskoj skali. Dok su u danskim populacijama jasno diferencirani G- i P-tipovi, populacije sa Kavkaza odstupaju od ovog obrasca, a slovenačke populacije sadrže jedinke koje ne sintetišu glukobarbarin, ali akumuliraju visoke koncentracije glukonasturtiina (Van Leur et al., 2006; Christensen et al., 2014). Ovakva lokalna specifičnost ukazuje da glukozinolati predstavljaju dinamičan i evolutivno osetljiv deo metaboloma, koji funkcioniše kao odraz istorijskih i savremenih selekcionih pritisaka u prirodnim populacijama.

U celini posmatrano, glukozinolati *B. vulgaris* predstavljaju izrazito kompleksan hemijski sistem u kome se biosintetska raznovrsnost prepliće sa organ-specifičnom akumulacijom, stereohemijskim razlikama i geografskim varijacijama. Takva složenost čini ovu vrstu izuzetno pogodnim modelom za proučavanje evolucije glukozinolata i procesa hemijskog divergiranja u prirodnim populacijama.

2.2.2. Flavonoidni glikozidi vrste *B. vulgaris*

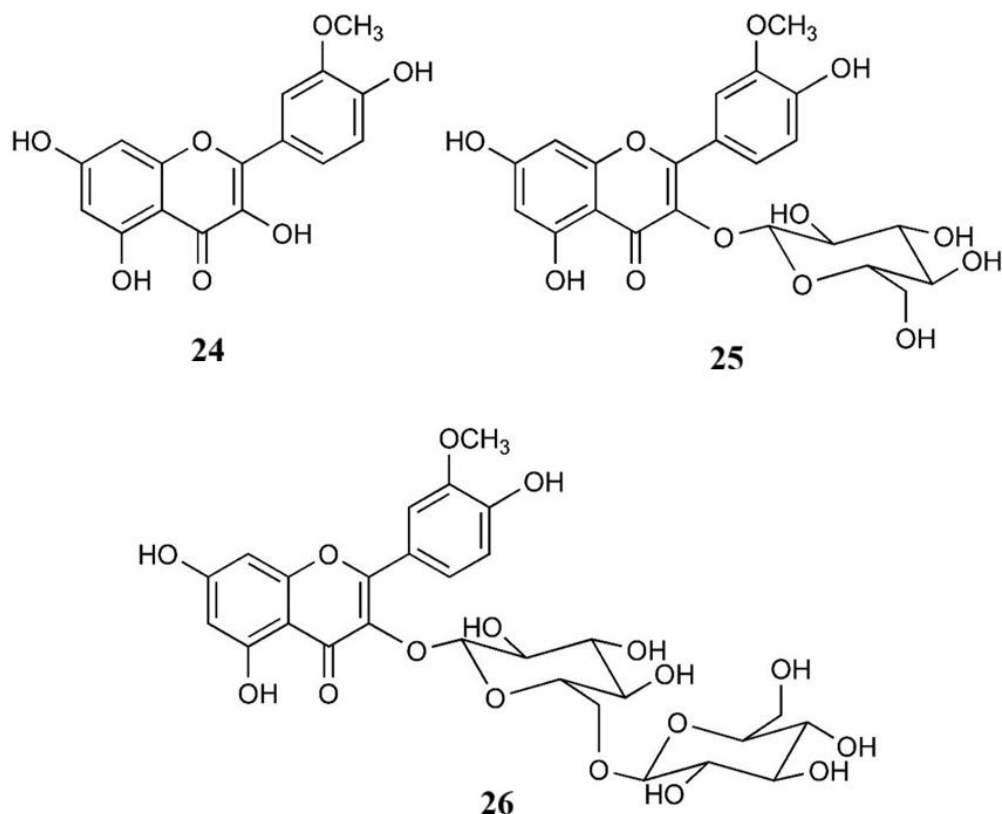
Pored glukozinolata, značajnu grupu sekundarnih metabolita vrste *B. vulgaris* čine i flavonoidni glikozidi. Ova široko rasprostranjena klasa fenolnih jedinjenja ima ključne uloge u fiziologiji biljaka, uključujući zaštitu od UV zračenja, modulaciju oksidativnog stresa, interakcije sa mikroorganizmima i herbivorima, kao i regulaciju rasta i razvoja. U vrsti *B. vulgaris* identifikovan je niz specifičnih flavonoidnih glikozida, od kojih su najčešće zastupljeni derivati kvercetina, kempferola i izoramnetina. Strukturna raznovrsnost ovih

jedinjenja, uslovljena varijacijama u položaju i tipu šećernih ostataka, doprinosi složenosti ukupnog fitohemijskog profila ove vrste i predstavlja važan element njene biohemijske i ekološke adaptacije (Pedras & To, 2014; Bailey & Mansfield, 1982; Mansfield & Bailey, 1982; VanEtten et al., 1994).

Prevenција kardiovaskularnih oboljenja i pojedinih oblika karcinoma predstavlja jedan od glavnih razloga intenzivnog ispitivanja biološke aktivnosti flavonoida, posebno onih jedinjenja za koja je potvrđeno da doprinose očuvanju zdravlja čoveka (Salah et al., 1995; Senatore et al., 2000). Flavonoidi poseduju niz bioloških aktivnosti, uključujući antialergijsku, antiinflamatornu, antioksidativnu, hepatoprotektivnu, antitrombocitnu, antikancerogenu, antivirulentnu i antimikrobnu aktivnost (Dragsted, 1993; Senatore et al., 2000). Pokazano je da ovi metaboliti mogu sprečiti nastanak katarakte, posebno kod osoba sa predispozicijom ka dijabetesu (Murray, 1994; Senatore et al., 2000). Takođe, pojedini flavonoidi ispoljavaju inhibitorno dejstvo prema enzimima uključenim u sintezu estrogena, čime se potencijalno smanjuje rizik od hormon-zavisnih maligniteta (Northrup, 1994; Senatore et al., 2000), kao i prema angiotenzin-konvertujućem enzimu (ACE), što utiče na regulaciju krvnog pritiska (Middleton & Kandaswami, 1996; Senatore et al., 2000). Pored preventivne zaštite kardiovaskularnog sistema, flavonoidi doprinose jačanju kapilara, važnih za transport kiseonika i nutrijenata u tkivima (Middleton & Kandaswami, 1996).

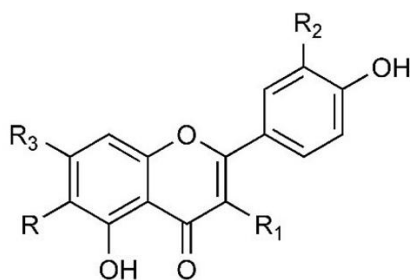
Flavonoidi su polifenolna, visoko supstituisana i strukturno raznovrsna grupa jedinjenja, karakterisana osnovnim C₆-C₃-C₆ skeletom aromatičnog bi- ili tricikličnog tipa. Osim njihove uloge u ljudskom zdravlju, flavonoidi imaju značajnu funkciju i u biljkama, gde učestvuju u adaptaciji na abiotičke stresove, interakcijama sa mikroorganizmima i herbivorima, te u signalnim procesima (Heribal & Renwick, 2001; Simmonds, 2003; Dalby-Brown et al., 2011). Na osnovu strukturnih razlika, flavonoidi se dele na više klasa, među kojima su flavoni i flavonoli. Flavoni sadrže karbonilnu grupu na centralnom prstenu, dok flavonoli, u odnosu na flavone, poseduju dodatnu hidroksilnu grupu u položaju C-3 (Dalby-Brown et al., 2011).

Prva sistematska ispitivanja flavonoidnog profila vrsta roda *Barbarea* započela su tokom druge polovine 20. veka. Najranija detaljna istraživanja datiraju iz 1969. godine, kada su Fursa i saradnici, pored kempferola i kvercetina, izolovali još tri flavonoida – izoramnetin (**24**), izoramnetin-3-β-D-glukopiranozid (**25**) i izoramnetin-3-β-D-glukopiranozil-6-β-D-glukopiranozid (**26**) (Slika 14) (Fursa et al., 1969).



Slika 14. Strukture flavonoida izoramnetina (**24**), izoramnetin-3- β -D-glukopiranozida (**25**) i izoramnetin-3- β -D-glukopiranozil-6- β -D-glukopiranozida (**26**) izolovanih iz *B. arcuata* (Fursa et al., 1969).

Senatore i saradnici (2000) su izolovali sedam različitih flavonoidnih glikozida iz vrste *B. vulgaris* (Slika 15), iz biljaka uzorkovanih na području Potence u južnoj Italiji. Izolovani flavonoidi definisani su kao hemotaksonomski markeri specifični za ovu biljnu vrstu, a ujedno su po prvi put identifikovani u ovoj vrsti. Identifikovani su sledeći flavonoidni glikozidi: kvercetin-3'-*O*-metil-3-*O*- β -D-glukopiranozil-[(1-6)- α -L-ramnopiranozid] (**27**), kvercetin-3-*O*- β -D-glukopiranozil-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (**28**), kaempferol-3-*O*- β -D-glukopiranozid (**29**), luteolin-3'-*O*-metil-6-*C*- β -D-glukopiranozid (**30**), luteolin-6-*C*- β -D-glukopiranozid (**31**) i kvercetin-3'-*O*-metil-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (**32**) (Senatore et al., 2000). Jedinjenja **27**, **28**, **29**, i **32** predstavljaju mono- i diglikozide kvercetina i kempferola, koji se ubrajaju u flavonole, dok jedinjenja **30** i **31** predstavljaju derivate flavona luteolina (Senatore et al., 2001; Dalby-Brown et al., 2011).



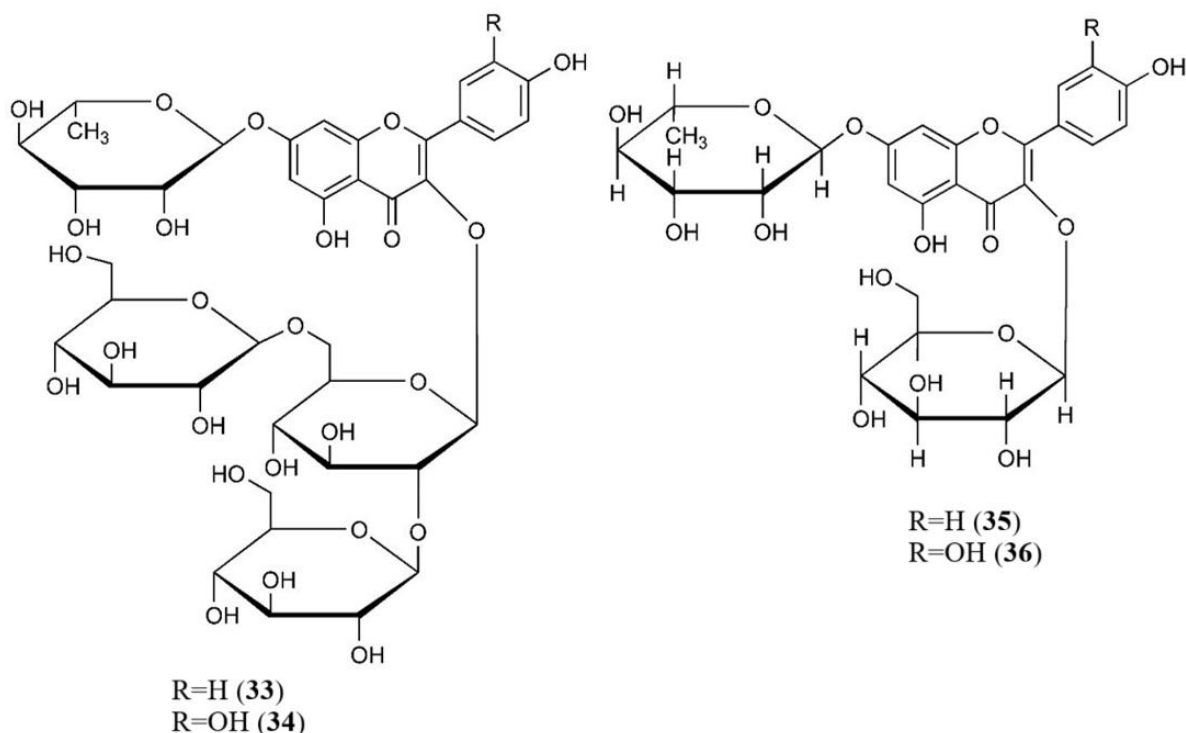
opšta struktura izolovanih flavonoida **27-32**

Jedinjenje	R	R ₁	R ₂	R ₃
27	H	O-rutinoza	OCH ₃	OH
28	H	O-glukoza	OH	O-ramnoza
29	H	O-glukoza	H	OH
30	glukoza	H	OCH ₃	OH
31	glukoza	H	OH	OH
32	H	OH	OCH ₃	O-ramnoza

Slika 15. Flavonoidni glikozidi izolovani iz vrste *B. vulgaris* (Senatore et al., 2000).

Nekoliko godina kasnije identifikovano je ukupno 19 flavonoida iz G-tipa *B. vulgaris*, od kojih su četiri izolovana – jedinjenja **33** – **36** (Slika 16). Među njima su tetraglikozidi flavonola izolovani kao novi prirodni proizvodi – kempferol-3-*O*-(2,6-di-*O*- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (**33**) i kvercetin-3-*O*-(2,6-di-*O*- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (**34**) (Dalby-Brown et al., 2011). Flavonoidni glikozidi **33** i **34** nisu nađeni u P-tipu ove vrste, dok je jedinjenje **33** dominantno zastupljeno u G-tipu. Kempferol-3-*O*-(2,6-di-*O*- β -D-glukopiranozil)- β -D-glukopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (**35**) takođe je identifikovan u listu vrste *A. thaliana*, kao najzastupljeniji flavonoidni glikozid. Sličnosti u flavonoidnim profilima potvrđuju filogenetsku srodnost ove dve biljne vrste (Slika 16) (Dalby-Brown et al., 2011; Kuzina et al., 2011).

Takođe, zabeležena je sezonska varijacija, odnosno promena u otpornosti, tačnije u sposobnosti rezistentnog odgovora na oligofagne insekte, dok su promene u koncentracijama ovih flavonola zanemarljivo male (Dalby-Brown et al., 2011). Prema novijim istraživanjima, navedeni flavonoidi nisu u korelaciji sa rezistentnim odgovorom kupusnjača na dejstvo štetočina (Austel et al., 2021). Koncentracija i kvalitativni sastav flavonoida ove biljne vrste ostaje nepromenjen prilikom hemijskog tretmana, poput onog opisanog u radu Cardenas i saradnika (2023).



Slika 16. Flavonoidni glikozidi izolovani iz vrste *B. vulgaris* (Dalby-Brown et al., 2011).

2.2.3. Odbrambeni sekundarni metaboliti biljaka: fitoaleksini i fitoanticipini

Kada je biljka izložena infekciji ili napadu štetočina, u ćelijama se aktivira kompleksan odbrambeni odgovor: aktivira se ekspresija gena odbrane, formiraju se reaktivne kiseonične vrste (ROS), akumuliraju se proteini povezani sa patogenima (PR-proteini), ojačava se ćelijski zid i sintetišu se visokoaktivna antimikrobna jedinjenja. Sekundarni metaboliti koji se *de novo* sintetizuju tokom ovog procesa nazivaju se fitoaleksini (Pedras et al., 2005).

Nasuprot tome, sekundarni metaboliti koji su prisutni u biljnom tkivu pre infekcije i mogu se brzo aktivirati (na primer enzimskom hidrolizom), nazivaju se fitoanticipini (Pedras et al., 2005; VanEtten et al., 1994). Osnovna razlika između ova dva tipa odbrambenih jedinjenja jeste da li su već prisutna u tkivu (anticipini) ili se sintetizuju kao odgovor na stres (aleksini). Pojedini metaboliti mogu biti fitoanticipini u jednoj vrsti, a fitoaleksini u drugoj, u zavisnosti od regulatornog konteksta i načina indukcije (npr. indolil-3-acetonitril i srodni nitrili). Važno je napomenuti da su neka jedinjenja koja su prvobitno opisivana kao fitoaleksini (npr. nitrili **38–81**, Slika 18) naknadno klasifikovana kao fitoanticipini u pojedinim vrstama (*Thellungiella salsuginea*, *B. rapa*, *Brassica napus*), što dodatno ilustruje dinamičnost i kontekstualnost ove podele (Pedras & Zheng, 2010).

Mnogi sekundarni metaboliti učestvuju u odbrambenim putevima, ali za brojne jedinjenja još nije definitivno utvrđeno da li pripadaju fitoaleksinima ili fitoanticipinima u određenim vrstama (González-Lamothe et al., 2009). Pored svoje zaštitne uloge, fitoaleksini se smatraju i biomarkerima odbrambenog odgovora biljaka, jer njihova akumulacija odražava aktivaciju specifičnih signalnih i biosintetskih puteva (Ahuja et al., 2012).

Kupusnjače pretežno sintetizuju indolske fitoaleksine (Pedras et al., 2010; Pedras et al., 2011). Dobar primer su indolski sekundarni metaboliti *A. thaliana*, posebno kamaleksin i indolski glukozinolati (iGS), koji doprinose otpornosti na patogen *Phytophthora brassicae* (Schlaeppli & Mauch, 2010). U ovoj interakciji, indolski glukozinolati deluju kao fitoanticipini, dok kamaleksin predstavlja klasičan fitoaleksin; otpornost se zasniva na sekvencijalnoj aktivnosti ovih metabolita, pri čemu produkti hidrolize iGS deluju u ranoj fazi infekcije, a kamaleksin u kasnijoj fazi restrikcije patogena.

Uloga glukozinolata u odbrani kupusnjača je dvostruka – oni su konstitutivni metaboliti i samim tim pripadaju fitoanticipinima (npr. indolski glukozinolati nastali iz Trp), jer su prisutni u tkivu i aktiviraju se hidrolizom u okviru sistema glukozinolat–mirozinaza; istovremeno, indolski glukozinolati predstavljaju biosintetske prekursore indukovanih indolsumpornih fitoaleksina karakterističnih za Brassicaceae (Bodnaryk, 1992; Bartlett et al., 1999; Hopkins et al., 1998; Liu et al., 2016; Pedras et al., 2010).

Fitoaleksini su često toksični ne samo za patogene već i za biljne ćelije, zbog čega je njihova produkcija prostorno i vremenski strogo ograničena na mesto infekcije ili oštećenja. Koncentracije potrebne za potpuno zaustavljanje rasta nekih gljivičnih fitopatogena obično se postižu samo u lokalnim, ograničenim zonama tkiva (tipično reda veličine 1–5 mg/kg sveže mase biljke), što je potvrđeno za više fitoaleksina (Pedras et al., 2011).

S druge strane, brojni fitopatogeni su evoluirali i razvili sofisticirane mehanizme detoksikacije fitoaleksina, uključujući specifične enzime za njihov metabolizam, poput brasinin-oksidade i brasinin-hidrolaze, kao i membranske transportere tipa ABC, na primer BcatrB kod *Botrytis cinerea*, zaslužne za efluks kamaleksina iz ćelije gljive. Ovi mehanizmi smanjuju efikasnu koncentraciju fitoaleksina u zoni infekcije i tako doprinose većoj virulentnosti patogena (Ahuja et al., 2012; Pedras et al., 2011).

2.2.3.1. Fitoaleksini

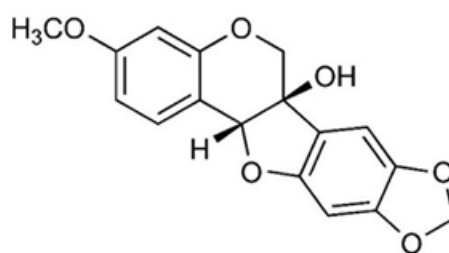
Skoro sve vrste kupusnjača poseduju specifične mehanizme koji im omogućavaju efikasnu odbranu od patogenih, kao i od različitih abiotičkih i biotičkih stresora (Pedras et al., 2014). Patogeni mikroorganizmi mogu inficirati bilo koji deo biljke, usporiti njen rast i razvoj i narušiti njeno fiziološko stanje. Najosetljiviji delovi, poput mladih listova, posebno moraju biti zaštićeni od negativnog delovanja mikroorganizama (Badenes-Perez et al., 2014; McKey, 1974; Rhoades, 1979).

Kao odgovor na infekciju ili druge stresne signale, biljke *de novo* sintetišu niskomolekulska antimikrobna jedinjenja koja se nazivaju fitoaleksini. Ona nisu prisutna u značajnim koncentracijama u zdravom tkivu; njihova biosinteza se aktivira tek nakon izloženosti spoljašnjem stresu, poput UV zračenja, patogenih ili teških metala (Bailey & Mansfield, 1982; Mansfield & Bailey, 1982; Pedras & To, 2014; VanEtten et al., 1994).

Pojam fitoaleksina uveden je nakon zapažanja da tkivo krompira (*Solanum tuberosum*) inficirano nekompatibilnim (avirulentnim) patotipom *Phytophthora infestans* indukuje snažan lokalni odbrambeni odgovor, pri čemu se razvija povećana otpornost tkiva na naknadnu infekciju kompatibilnim (virulentnim) patotipom istog patogena. Zaključeno je da biljka u takvim uslovima sintetiše specifične antimikrobne metabolite koji inhibiraju rast patogena, što je dovelo do uvođenja termina fitoaleksina i postavilo osnovu za kasnija sistematska istraživanja njihove uloge u otpornosti biljaka (Ahuja et al., 2012; Pedras et al., 2011).

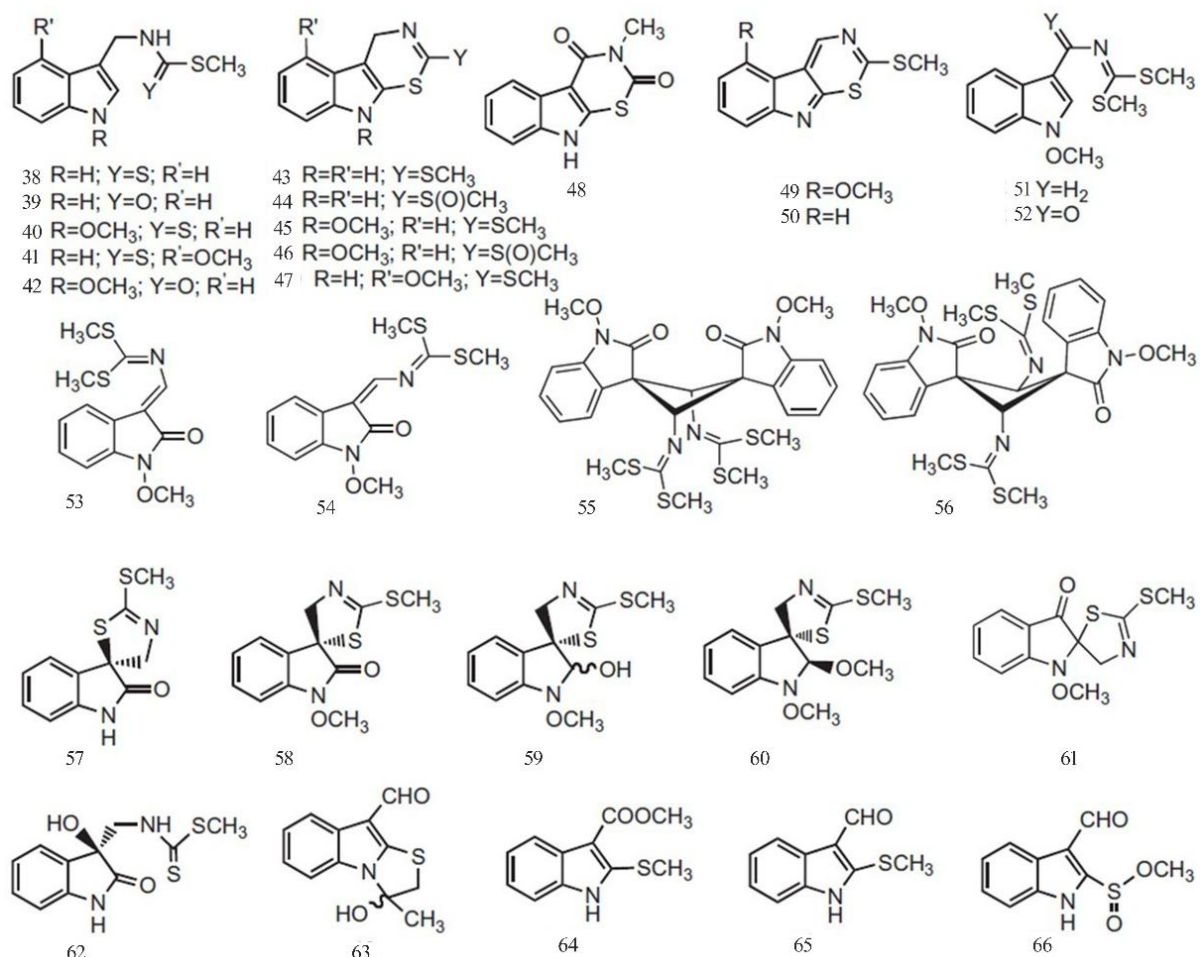
Strukturna raznovrsnost fitoaleksina je veoma velika, a posebno su istraživani indolski fitoaleksini roda *Brassica*, koji pokazuju antikancerogeno, antioksidativno, *antifeedant* i antiproliferativno delovanje, kao i potencijalni zaštitni efekat na kardiovaskularni sistem (Ahuja et al., 2012; Jahangir et al., 2009; Monde et al., 1990; Pedras et al., 2011). Pored njihove primarne uloge u odbrani od patogenih, sve veća pažnja se posvećuje i njihovom značaju za ljudsko zdravlje, upravo zbog ovako izraženih bioloških aktivnosti.

Prvi identifikovani fitoaleksini bio je (+)-pisatin (**37**) izolovan iz graška (*Pisum sativum* L.) (Slika 17). Ovaj fitoaleksini ispoljava snažno antifungalno dejstvo prema većem broju sojeva fitopatogenih gljiva, dok je samo manji broj sojeva pokazao toleranciju. Njegov (-)-izomer nije pokazao uporedivu aktivnost (Cruickshank and Perrin, 1960; Cruickshank, 1962; Pedras & Ahiahonu, 2005).

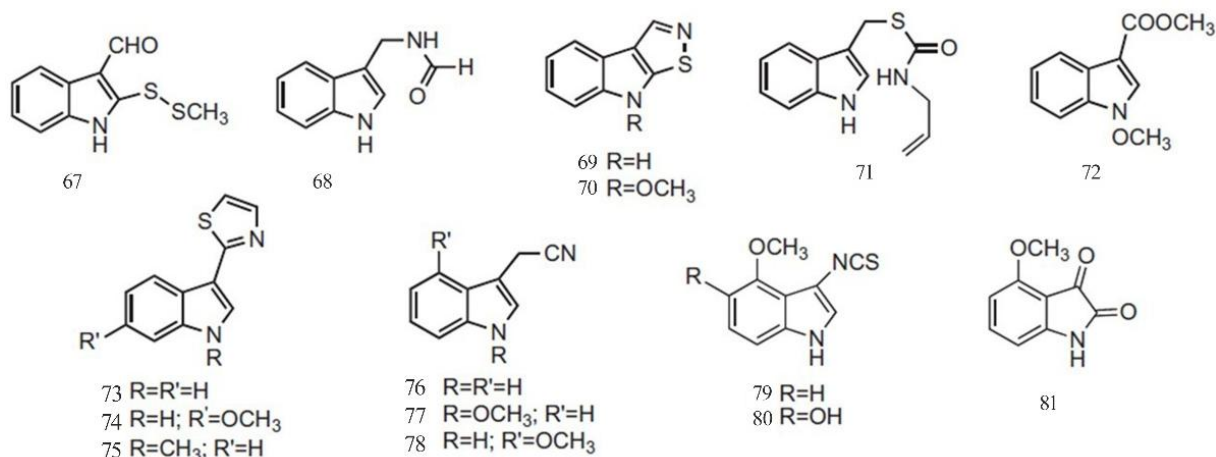


Slika 17. Strukturna formula fitoaleksina (+)-pisatina (**37**).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da je kod predstavnika reda Brassicales identifikovan značajan broj fitoaleksina, pri čemu u porodici Brassicaceae dominiraju jedinjenja biosintetski izvedena iz triptofana, dok manji broj potiče iz homofenilalanina i drugih aromatičnih prekursora (Pedras et al., 2010; Pedras et al., 2011; Slika 18).



Slika 18. (nastavak na sledećoj strani)



Slika 18. Indolski fitoaleksini u vrstama porodice Brassicaceae: brasinin (38), brasitin (39), 1-metoksibrasinin (40), 4-metoksibrasinin (41), 1-metoksibrasitin (42), ciklobrasinin (43), ciklobrasinin sulfoksid (44), sinalbin B (45), sinalbin A (46), 4-metoksiciklobrasinin (47), rutaleksin (48), 4-metoksideohidrociklobrasinin (49), dehidrociklobrasinin (50), 1-metoksibrasenin A (51), 1-metoksibrasenin B (52), vasaleksin A (53), vasaleksin B (54), bisvasaleksin A1 (55), bisvasaleksin A2 (56), (*S*)-spirobrasinin (57), (*R*)-1-metoksispirobrasinin (58), 1-metoksispirobrasinol (59), (2*R*,3*R*)-1-metoksispirobrasinol metil-etar (60), erukaleksin (61), dioksibrasinin (62), brasikanal B (63), braskanat A (64), brasikanal A (65), brasikanal C (66), kaulileksin A (67), kaulileksin B (68), brasileksin (69), sinaleksin (70), brusaleksin A (71), metil-1-metoksiindol-3-karboksilat (72), kamaleksin (73), 6-metoksikamaleksin (74), 1-metilkamaleksin (75), indolil-3-acetonitril (76), kaulileksin C (77), arveleksin (78), rapaleksin A (79), rapaleksin B (80) i isaleksin (81).

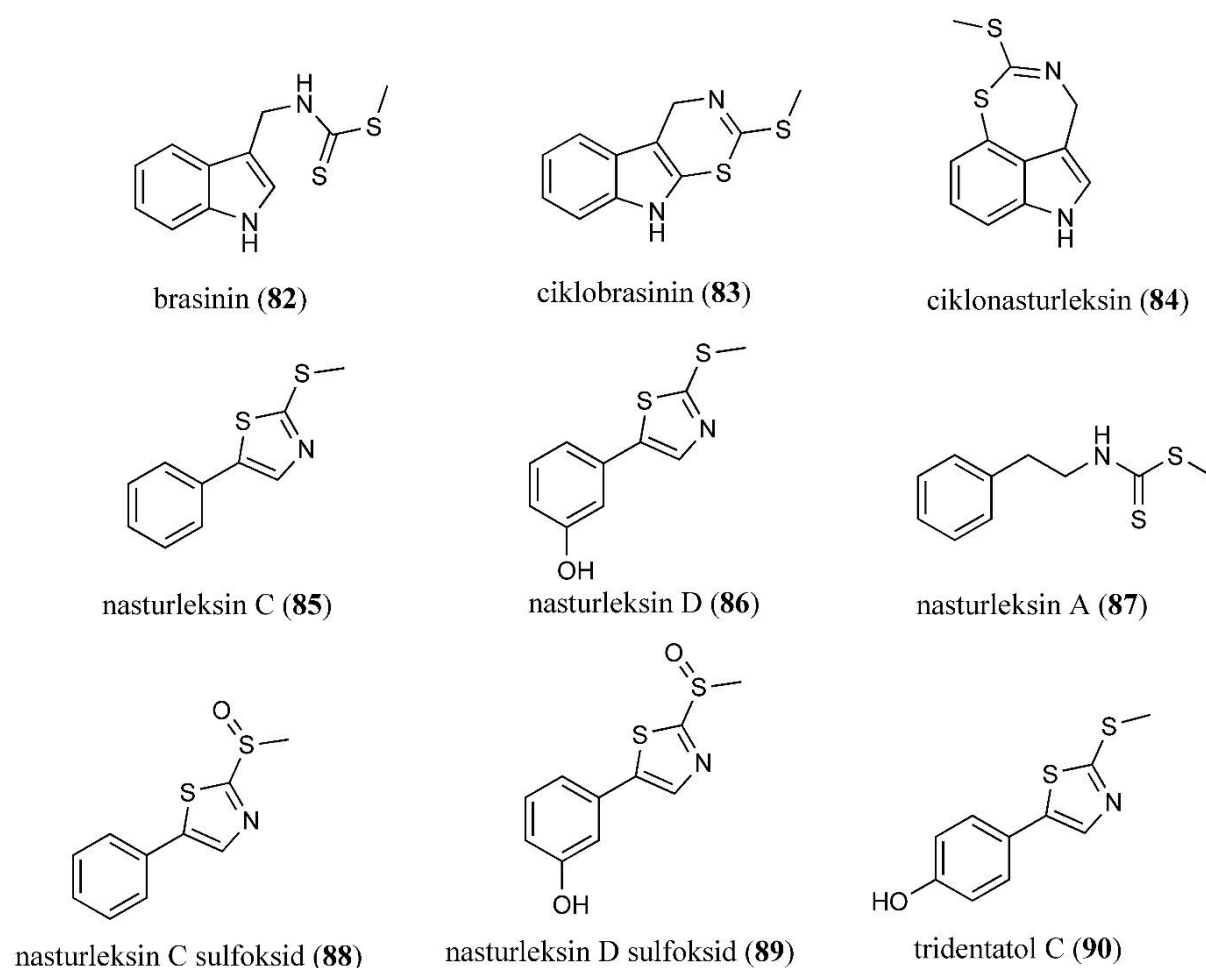
Preuzeto iz Pedras et al. (2010), uz dozvolu izdavača Elsevier.

Kasnija ispitivanja proširila su ovaj skup novim strukturama, uključujući fitoaleksine koji se biosintetski izvode iz homofenilalanina i povezani su sa fenetil-glukozinolatima (Pedras et al., 2015; Liu et al., 2016). Autori posebno naglašavaju da fitoaleksini nisu ograničeni samo na kupusnjače, već su široko rasprostranjeni i u drugim biljnim porodicama unutar reda Brassicales, što ukazuje na evolutivnu i hemijsku raznovrsnost ovog tipa odbrambenih metabolita.

2.2.3.2. Fitoaleksini identifikovani u biljnoj vrsti *B. vulgaris*

Fitoaleksini čine deo jedne od ključnih indukovanih odbrambenih reakcija kupusnjača koje se indukuju u prisustvu biotičkih ili abiotičkih stresora. I pored toga, ovaj vid odbrane kod

vrste *B. vulgaris* dugi niz godina ostajao je na marginama interesovanja. Tek novija istraživanja, zasnovana prvenstveno na radovima Pedras i saradnika (2015 a,b), a potom i na sveobuhvatnoj analizi Cárdenas i saradnika (2023), otkrivaju složen i evolutivno jedinstven arsenal fitoaleksina ove vrste (Cárdenas et al., 2023). Za razliku od većine drugih predstavnika porodice Brassicaceae, kod kojih dominiraju indolski fitoaleksini, kod *B. vulgaris* jasno se izdvajaju dve hemijski različite, ali funkcionalno komplementarne grupe odbrambenih metabolita: specifični fenetil-fitoaleksini – pre svega nasturleksine – i indolski fitoaleksini tipa ciklobrasinina (Slika 19).



Slika 19. Strukturne formule izolovanih i identifikovanih fitoaleksina u *B. vulgaris*. Indolski fitoaleksini: brassinin (82), ciklobrasinin (83) i ciklonasturleksin (84). Neindolski fitoaleksini: nasturleksin C (85), nasturleksin D (86), nasturleksin (A) (87), nasturleksin C sulfoksid (88), nasturleksin D sulfoksid (89) i tridentatol C (90) (Cárdenas et al., 2023; Pedras et al., 2015; Pedras et al., 2018).

Najpouzdaniji podaci o fitoaleksinima *B. vulgaris* potiču iz eksperimenata sa abiotičkom elicitacijom listova rastvorom CuCl₂, u kojima su oba ispitivana hemotipa (G- i P-tip) dosledno akumulirala tri dominantna fitoaleksina. U pitanju su nasturleksin D, ciklonasturleksin i ciklobrasinin – kombinacija koja se ispostavlja karakterističnom za vrstu i predstavlja osnovni hemijski potpis njenog indukovanog odbrambenog odgovora (Cárdenas et al., 2023).

Nasturleksin D (86), koji pripada neindolskim fitoaleksinima, najizraženiji je i najstabilniji marker indukovane odbrane (Pedras et al., 2015). Nasuprot njemu, ciklobrasinin (83) i ciklonasturleksin (84) pripadaju indolskim fitoaleksinima, grupi metabolita koji su u Brassicaceae vrstama daleko rasprostranjeniji, ali u *B. vulgaris* imaju izrazitu funkcionalnu specifičnost – javljaju se samo u stresnim uslovima i u veoma niskim nivoima u zdravim biljkama (Pedras et al., 2007).

Premda su u pojedinim studijama detektovani i tragovi nasturleksina A (87), tridentatola C (90), nasturleksina C (85), kao i odgovarajućih sulfoksida, njihov doprinos ukupnom fitoaleksinskom profilu vrste je marginalan. Sa druge strane, nasturleksini A i B, kao i tridentatol C karakteristični su za filogenetski srodnu vrstu *Nasturtium officinale*, u kojoj dostižu znatno veće koncentracije (Cárdenas et al., 2023; Pedras & To, 2015; Pedras & To, 2018).

Tkivna distribucija i dinamika akumulacije fitoaleksina

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je fitoaleksinska odbrana *B. vulgaris* izrazito koncentrisana u listu. Rozetni, prizemni listovi predstavljaju glavno mesto akumulacije obe vrste fitoaleksina nakon elicitacije (Cárdenas et al., 2023). Suprotno tome, u korenu se ovi metaboliti detektuju retko i u izrazito niskim koncentracijama, što ukazuje na prostornu specijalizaciju odbrane.

Hronologija elicitacije takođe je konzistentna: najveće koncentracije fitoaleksina postižu se između prvog i trećeg dana nakon tretmana CuCl₂, što je obrazac zabeležen i u ranijim studijama drugih kupusnjača (Pedras et al., 2011). U poređenju hemotipova, G-tip u proseku akumulira više ukupnih fitoaleksina od P-tipa, ali se kvalitativni profil u oba slučaja pokazuje izuzetno stabilnim (Cárdenas et al., 2023).

Odnos fitoaleksina i sistema glukozinolat-mirozinaza

Elicitacija produkcije fitoaleksina gotovo uvek je praćena aktivacijom sistema glukozinolat-mirozinaza. Povećanje nivoa barbarina i rezedina tokom stresa jasno ukazuje na pojačanu razgradnju glukobarbarina, iako oni sami nisu prekursori nasturleksina (Agerbirk et al., 2015; Agerbirk & Olsen, 2015; Cárdenas et al., 2023). Ovaj metabolički signal odražava ukupnu reorganizaciju aromatičnih glukozinolata tokom odbrambenog odgovora, čak i kada pojedinačni glukozinolati ne učestvuju direktno u formiranju fitoaleksina.

Osim toga, pad koncentracije fenetil glukozinolata nakon elicitacije, dosledno zabeležen u eksperimentima Cárdenas i saradnika (2023), predstavlja jasan metabolički pokazatelj aktivacije odbrane, saglasan ranijim opažanjima istraživačke grupe Pedras i saradnika (2015a,b). Iako biosintetički detalji ovde nisu predmet razmatranja, sama korelacija fenetil glukozinolat–nasturleksin D ostaje značajna kao pokazatelj metaboličke dinamike tokom indukovano odgovora.

Antifungalna svojstva i biološki značaj

Najpotpuniji uvid u biološku aktivnost fitoaleksina roda *Barbarea* potiče iz radova Pedras i saradnika (2015a,b), koji su detaljno ispitivali antimikrobna svojstva neindolskih i indolskih odbrambenih metabolita. U okviru ove grupe, nasturleksini C i D predstavljaju najznačajnije neindolske fitoaleksine vrste *B. vulgaris*, sa jasno potvrđenom antifungalnom aktivnošću. U ispitivanjima sprovedenim na patogenima karakterističnim za kupusnjače – *Alternaria brassicicola*, *Leptosphaeria maculans* i *Sclerotinia sclerotiorum* – oba metabolita inhibirala su rast ovih gljiva, pri čemu je nasturleksin D u pojedinim slučajevima pokazivao i potpunu inhibiciju micelijalnog rasta (Pedras et al., 2011; Pedras et al., 2015). Ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju na njihovu ulogu kao ključnih komponenata hemijskog odgovora kod vrsta roda *Barbarea*.

Ciklonasturleksin i ciklobrasinin, indolski fitoaleksini *B. vulgaris*, zajedno sa nasturleksinom D čine tri glavna fitoaleksina čija je biosinteza elicirana nakon tretmana CuCl₂ (Cárdenas et al., 2023). Ciklonasturleksin je u testovima prema *A. brassicicola* takođe pokazao izraženu antifungalnu aktivnost (Pedras & To, 2016). Ciklobrasinin, iako se akumulira u manjim i varijabilnijim količinama, takođe poseduje antifungalno dejstvo (Pedras et al., 2009; Pedras, 2014).

Kombinacija neindolskih i indolskih metabolita predstavlja evolutivno zanimljivu i relativno retku strategiju u okviru porodice Brassicaceae koja verovatno odražava prilagođenost vrste *B. vulgaris* da efikasno odgovori na raznoliku zajednicu patogena karakterističnu za njena prirodna staništa. Iako je tokom poslednje decenije značajno unapređeno razumevanje strukture i biosinteze fitoaleksina kod *B. vulgaris*, istraživanja njihovih bioloških efekata i dalje su izuzetno skromna i obuhvataju tek mali broj organizama. Osim ograničenih testova antifungalne aktivnosti, gotovo da ne postoje studije koje bi sistematski obuhvatile njihov uticaj na druge biotičke faktore, kao što su bakterije, nematode, herbivorni insekti ili simbiotski mikroorganizmi. Zbog ograničenosti dosadašnjih ispitivanja, potencijalno širok spektar delovanja ovih jedinjenja za sada se može samo naslutiti na osnovu njihovih strukturnih osobina i poznatih aktivnosti hemijski srodnih fitoaleksina.

Slično tome, potencijalni uticaj ovih specifičnih fenetil- i indolskih fitoaleksina na ljudsko zdravlje u potpunosti je neistražen. Premda brojni sekundarni metaboliti kupusnjača – naročito glukozinolati, izotiocijanati i indolski derivati – pokazuju antimikrobna, antikancerogena i antiinflamatorna svojstva, za fitoaleksine vrste *B. vulgaris* ne postoje podaci koji bi ukazali na eventualnu farmakološku vrednost ili sigurnosni profil. Međutim, njihove jedinstvene strukturne karakteristike, reaktivnost i ekološka uloga u biljci upućuju na mogućnost da bi pojedini predstavnici, poput ciklonasturleksina ili nasturleksina D, mogli posedovati i aktivnosti relevantne u širem biomedicinskom kontekstu – od antimikrobnog potencijala do modulacije ćelijskih signalnih puteva. Te pretpostavke, međutim, ostaju spekulativne sve dok se ne sprovedu ciljana farmakološka, toksikološka i biohemijska ispitivanja.

Zbog svega navedenog, biološko delovanje fitoaleksina *B. vulgaris* izvan uskog okvira antifungalnih testova ostaje mahom nepoznato, a razumevanje njihovog punog ekološkog i zdravstvenog potencijala predstavlja otvoreno istraživačko polje koje tek treba biti sistematski ispitano.

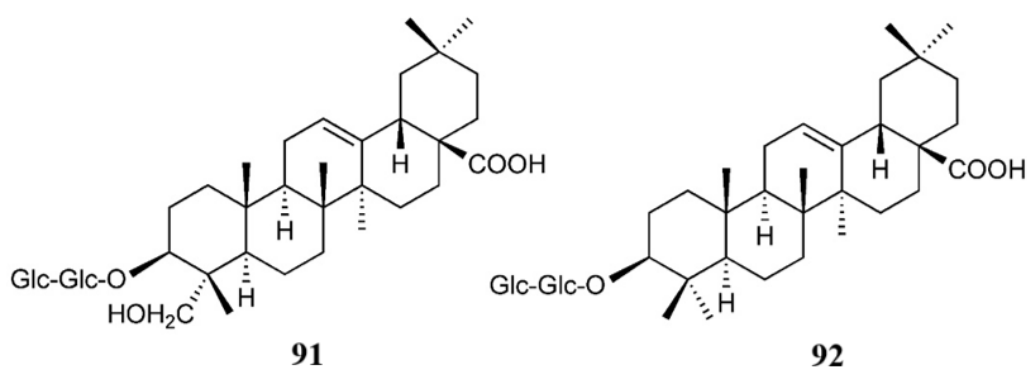
2.2.4. Saponini u vrsti *B. vulgaris*

Saponini su steroidni i triterpenoidni glikozidi široko rasprostranjeni u višim biljkama, pri čemu su triterpenoidni saponini pretežno zastupljeni u dikotiledonama, dok monokotiledone uglavnom sintetišu steroidne oblike; odlikuju se brojnim biološkim i potencijalno terapijskim svojstvima (De Geyter et al., 2007; Hussain et al., 2019; Kuzina et al., 2009). Rod *Barbarea* jedinstven je u okviru porodice Brassicaceae, jer nekolicina njegovih

vrsta, za razliku od ostalih kupusnjača, proizvodi triterpenoidne saponine kao značajne komponente odbrambenog metabolizma (Kuzina et al., 2009; Khakimov et al., 2015; Lange et al., 2022; Shinoda et al., 2002). Njihovo prisustvo u rodu *Barbarea* dovodi se u vezu sa evolucijom specifičnih UDP-glukozil transferaza (UGT), posebno članova UGT73C podfamilije, za koje se smatra da su, nakon genskih duplikacija i neofunkcionalizacije, stekli novu substratnu specifičnost prema triterpenskim sapogeninima i time omogućili formiranje karakterističnih saponina *B. vulgaris* (Augustin et al., 2011; Byrne et al., 2017; Khakimov et al., 2015).

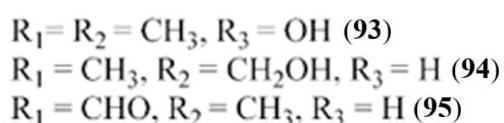
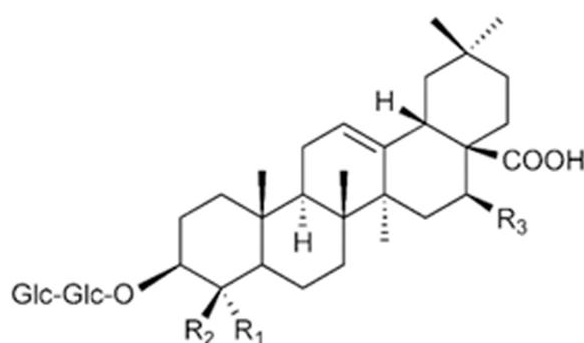
Sa hemijskog stanovišta, saponini *B. vulgaris* pretežno pripadaju oleanskom tipu triterpena i zasnovani su na aglikonima poput hederagenina, 4-epihederagenina, gipsogenina i oleanolne kiseline. Na ove aglikone vezani su šećerni ostaci tipa celobioze (β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukopiranozid), najčešće na C-3 položaju triterpenskog skeleta. Strukturne razlike u stepenu oksidacije (npr. na C-16, C-23 i C-24) i u obrascu glikozilovanja presudne su za biološku aktivnost ovih jedinjenja (Kuzina et al., 2009; Nielsen et al., 2010).

Prvi detaljno okarakterisani saponin iz *B. vulgaris* bio je monoglikozidni triterpenski saponin 3-O-[O- β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukopiranozil]-hederagenin (3-O-celobiozil-hederagenin, **91**), izolovan iz listova ove vrste (Serizawa et al., 2001; Shinoda et al., 2002) (Slika 20). Ubrzo zatim, izolovana je i 3-O-celobioziloleanolna kiselina, koji takođe pripada monoglikozidnim oblicima triterpenskih saponina (Agerbirk et al., 2003; Kuzina et al., 2009; Slika 20).



Slika 20. Strukturne formule triterpenskih saponina vrste *B. vulgaris* – 3-O-celobiozil-hederagenina (**91**) i 3-O-celobioziloleanolna kiselina (**92**) (Agerbirk et al., 2003; Kuzina et al., 2009; Shinoda et al., 2002).

Detaljna analiza G-tipa *B. vulgaris* pokazala je da ova biljka proizvodi više strukturno bliskih saponina. Pored prethodno navedenih, izolovani su i identifikovani 3-*O*-celobiozilkohalna kiselina (**93**), 3-*O*-celobiozil-epihederagenin (**94**) i 3-*O*-celobiozil-gipsogenin (**95**) (Nielsen et al., 2010a; Slika 21). Identifikovani glikozidi kohalne kiseline, gipsogenina i 4-epihederagenina su po prvi put nađeni u okviru porodice Brassicaceae, dok je 3-*O*-celobiozil-hederagenin prethodno identifikovan kao dominantni saponin u G-tipu *B. vulgaris* (Kuzina et al., 2009; Nielsen et al., 2010). U poređenju sa ovim profilom, P-tip iste vrste sadrži znatno niže koncentracije ovih saponina ili ih uopšte ne sintetise, što ukazuje na izraženu hemotipsku diferencijaciju u saponinskom sastavu (Kuzina et al., 2009).



Slika 21. Hemijske strukture triterpenskih saponina izolovanih iz *B. vulgaris* var. *acruata*: 3-*O*-celobiozil-kohalne kiseline (**93**), 3-*O*-celobiozil-epihederagenina (**94**) i 3-*O*-celobiozil-gipsogenina (**95**) (Nielsen et al., 2010a).

Sa aspekta strukture i bioaktivnosti, saponini *B. vulgaris* obuhvataju pretežno monoglikozidne oblike (sa jednim šećernim lancem na C-3), dok se diglikozidni saponini, sa dva šećerna lanca, smatraju manje aktivnim ili čak neaktivnim (Kuzina et al., 2009; Hostettmann & Marston, 1995). Pokazano je da broj, tip i raspored šećernih ostataka, kao i način glikozilovanja aglikona, značajno utiču na biološku aktivnost ovih jedinjenja (Mshvildadze et al., 2000; Zhang et al., 2005).

Na molekulskom nivou, saponini se odlikuju sposobnošću da formiraju komplekse sa sterolima u ćelijskim membranama, čime narušavaju polupropustljivost membrane, dovode do gubitka integriteta i, konačno, do smrti ćelije. Ovo objašnjava njihovu široku biološku aktivnost prema različitim organizmima, dok je oralna toksičnost prema sisarima u većini slučajeva

umerenog intenziteta (Kuzina et al., 2009; Hostettmann & Marston, 1995; Sparg et al., 2004; Güçlü-Ustündağ & Mazza, 2007).

Najzad, ograničena distribucija triterpenskih saponina unutar porodice Brassicaceae – praktično isključivo u rodu *Barbarea* – tumači se kao relativno kasna evolutivna inovacija, nastala nakon uspostavljanja glukozinolata kao primarne hemijske odbrane kupusnjača (Byrne et al., 2017; Kuzina et al., 2009). Ovakav redosled događaja sugerise da su saponini u *B. vulgaris* evoluirali kao dodatni, specijalizovani odbrambeni sloj čija je funkcionalna uloga detaljnije razmotrena u okviru odeljka 2.1.4.4.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i rastvarači

Svi rastvarači korišćeni u eksperimentalnim procedurama komercijalno su dostupni (Sigma-Aldrich, SAD; Merck, Nemačka; Carl Roth, Nemačka; Fluka, Nemačka; Zorka Pharma Šabac, Srbija) i korišćeni su bez dodatnog prečišćavanja, izuzev THF-a koji je predestilovan pre upotrebe. Sve hemikalije korišćene u radu, poput tiramina, ugljen-disulfida, fenetilamina, piridina, dietil-karbonata, metil-jodida, vodonik-peroksida, trietilamina, natrijum-hidroksida, anhidrovanog kalijum-karbonata, anhidrovanog natrijum-sulfata i *rac*-1-amino-2-feniletanola, bile su p.a. čistoće i korišće su u već komercijalno dostupnom obliku.

3.2. Metode analize i razdvajanja

3.2.1. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

GC-MS analiza autolizata, etarskog ulja kao i sintetisanih i izolovanih jedinjenja, izvedene su na gasnom hromatografu *Agilent Technologies 7890B*, opremljenom HP-5MS kapilarnom kolonom (5% polidifenil-siloksan i 95% polidimetil-siloksan, dimenzija 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm, *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD), povezanom sa masenospektrometrijskim detektorom 240-MS sa jonskom zamkom, istog proizvođača. Temperatura injektora i spojnice (*interface*) iznosila je, redom, 250 °C i 325 °C. Temperatura peći povećavana je gradijentno od 40 °C do 315 °C brzinom od 5 °C/min, nakon čega je izotermno održavana 10 minuta. Helijum je korišćen kao noseći gas pri protoku od 1,0 mL/min. Uzorci (1 µL rastvora koncentracije 1% u dihlormetanu ili dietil-etru) injektovani su u *split* režimu sa odnosom 40:1. Uslovi rada masenospektrometrijskog detektora bili su sledeći: temperature masenog analizatora, jonskog izvora i *manifold*-a iznosile su, redom, 100 °C, 180 °C i 50 °C; energija jonizacije bila je 70 eV; opseg za akviziciju masa bio je 35–500 amu, uz brzinu skeniranja od 2,08 Hz. Linearni retencioni indeksi izračunati su u odnosu na retenciona vremena homologe serije *n*-alkana na HP-5MS kapilarnoj koloni (Van Den Dool i Kratz, 1963).

3.2.2. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID)

Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID) izvedena je na aparatu *Agilent 7890A GC* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, Kalifornija, SAD) opremljenom jednim injektorom, FID detektorom i HP-5MS kapilarnom kolonom (5% difenilsiloksan i 95% dimetilsiloksan; dimenzija 30 m × 0,32 mm i.d.; debljina filma 0,25 µm, *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD).

Program peći bio je sledeći: početna temperatura 70 °C, zatim porast do 300 °C brzinom od 15 °C/min, nakon čega je temperatura izotermno održavana 5 minuta. Azot je korišćen kao noseći gas pri konstantnom protoku od 3,0 mL/min. Temperatura injektora bila je 250 °C. Injektovanje (1,0 µL rastvora) je vršeno *splitless* režimu. Parametri FID detektora bili su: temperatura detektora 300 °C, protok H₂ 30 mL/min, protok vazduha 400 mL/min i protok pomoćnog gasa 23,5 mL/min. Podaci su prikupljeni korišćenjem *Agilent GC ChemStation* softvera, pri stopi digitalizacije od 20 Hz. Svaki uzorak analiziran je u triplikatu. Procentualni sastav izračunat je na osnovu površina pikova GC-FID hromatograma, bez primene korekcionih faktora. Relativna standardna devijacija (RSD) površina pikova kod triplikatnih injekcija bila je konzistentno ispod 1%.

3.2.3. Identifikacija sastojaka i kvantitativna analiza etarskog ulja i autolizata

Kvalitativna analiza sastojaka etarskog ulja i autolizata zasnivala se na poređenju njihovih linearnih retencionih indeksa (u odnosu na C₈–C₂₃ *n*-alkana na HP-5MS koloni) sa literaturnim vrednostima, kao i na poređenju masenih spektara sa spektrima referentnih standarda, zatim sa bibliotekama masenih spektara Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3, kao i internom MS bibliotekom koja sadrži spektre čistih supstanci. Gde god je bilo moguće, identitet komponenti potvrđivan je i koinjekcijom sa autentičnim standardom. Hromatogrami su analizirani korišćenjem programa AMDIS i NIST MS Search 2.0 (National Institute of Standards and Technology, SAD).

3.2.4. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija

Svi NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance III 400 MHz NMR spektrometru (Fällanden, Švajcarska; ¹H na 400 MHz, ¹³C na 100,6 MHz) opremljenim radnom glavom za kivete od 5 mm, na temperaturi od 20 °C. Svi NMR spektri su snimljeni u CDCl₃, DMSO-d₆ ili C₆D₆ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), pri čemu je tetrametilsilan (TMS) korišćen kao unutrašnji standard. Hemijska pomeranja izražena su u δ (ppm) vrednostima i podešena na TMS (δ 0,00), dok su u ¹³C i heteronuklearnim 2D spektrima podešena u odnosu na signale rastvarača (rezidualni CHCl₃: δ_H 7,26 i ¹³CDCl₃: δ_C 77,16; rezidualni DMSO: δ_H 2,51 i DMSO-d₆: δ_C 39,97). Skalarno sprežanje prikazano je u hercima (Hz). Sledeće skraćenice korišćene su za označavanje multiplleta: *s* (singlet), *brs* (široki singlet), *d* (doublet), *dd* (doublet dubleta), *ddd* (doublet dubleta dubleta), *t* (triplet), „*t*“ (pseudo-triplet) i *m* (multiplet). 2D Eksperimenti (NOESY i gradijentni ¹H–¹H COSY, gHSQC i gHMBC), kao i DEPT-45, DEPT-135 i

selektivni homonuklearni dekaplajući eksperimenti, snimljeni su na istom instrumentu uz korišćenje pulsnih sekvenci iz Bruker biblioteka. Snimljeni spektri obrađeni korišćenjem programa MestReNova (v.11.0.3, Mestrelab Research, Korunja, Španija).

3.2.5. Infracrvena (FTIR) spektroskopija

ATR-FTIR spektri (ATR, *attenuated total reflectance*) izolovanih i sintetisanih jedinjenja snimljeni su korišćenjem instrumenta *Thermo Nicolet 6700 FTIR* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

3.2.6. Određivanje tačke topljenja

Vrednosti tačaka topljenja izolovanih i sintetisanih jedinjenja određene su na aparatu *Büchi Melting Point B-540* (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska) i nisu korigovane.

3.2.7. Ultraljubičasta-vidljiva (UV-Vis) spektrofotometrija

Svi UV-Vis spektri tokom izvođenja *in vitro* testova za procenu sposobnosti vezivanja slobodnih radikala (DPPH i ABTS testovi), kao i *in vitro* testova za procenu inhibitornog dejstva izolovanih i sintetisanih jedinjenja na LOX enzim, snimljeni su korišćenjem UV-Vis spektrofotometra *PerkinElmer Lambda 365* (Waltham, MA, SAD).

3.2.8. Fluorescentna spektrofotometrija

Određivanje fluorescencije tokom izvođenja *in vitro* testova za procenu inhibitornog dejstva izolovanih i sintetisanih jedinjenja na COX-2 enzim izvršeno je korišćenjem čitača mikrotitarskih ploča *Synergy LX* (BioTek, Winooski, VT, SAD).

3.2.9. Kolorimetrijska analiza

Optička gustina (OD) obojenog biofilma u mikrotitarskoj ploči određena je na 630 nm korišćenjem čitača mikrotitarskih ploča za enzimsku imunološku analizu *ELISA Rayto RT-2100C* (Rayto, Shenzhen, Kina).

3.2.10. Denzitometrijska standardizacija inokuluma

Zamućenost suspenzija u *in vitro* testovima antimikrobne aktivnosti određena je korišćenjem denzitometra Biosan (Riga, Letonija).

3.2.11. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Tankoslojna hromatografija (TLC) vršena je na aluminijumskim pločama sa nanesenim slojem silika-gela 60 GF₂₅₄ debljine 0,2 mm (*Merck*, Darmštat, Nemačka). Nakon razvijanja mrlje su vizualizovane pomoću UV-lampe (254 i 365 nm) i/ili primenom hemijskog reagensa (50% rastvor sumporne kiseline (v/v) uz zagrevanje na 110 °C).

3.2.12. Preparativna tankoslojna hromatografija (PTLC)

Tankoslojna hromatografija (TLC) vršena je na staklenim pločama sa nanesenim slojem silika-gela 60 GF₂₅₄ debljine 1 mm (*Macherey-Nagel GmbH & Co*, Düren, Nemačka). Nakon razvijanja mrlje su vizualizovane pomoću UV-lampe (254 i 365 nm). Označena područja odsecana su sa površine nosača i ekstrahovana dihlormetanom.

3.2.13. Vakuum hromatografija (FDC)

Za preparativno razdvajanje sastojaka autolizata, kao i za prečišćavanje sintetisanih jedinjenja, korišćena je aparatura za vakuum hromatografiju (eng. *dry-flash*), koja se sastojala od kolone sa silika-gelom 60 (0,04–0,063 mm, *Merck*, Darmštat, Nemačka), napakovane na sinterovanom staklenom levku srednje poroznosti, povezanom sa standardnom bocom za vakuum filtraciju. Hromatografija je izvođena izokratski ili pod gradijentnim uslovima (*n*-heksan/EtOAc, 100:0 → 0:100), u skladu sa parametrima navedenim u odgovarajućim eksperimentalnim procedurama.

3.2.14. Brza hromatografija (FC)

Za preparativno razdvajanje sastojaka autolizata, kao i za prečišćavanje sintetisanih jedinjenja, korišćena je brza kolonska hromatografija (kolone dužine 20–70 cm i prečnika 1–3 cm) na silika-gelu 60 (0,04–0,063 mm; *Merck*, Darmštat, Nemačka), uz blago povišen pritisak obezbeđen pumpom. Hromatografija je izvođena izokratski ili pod gradijentnim uslovima, u skladu sa parametrima navedenim u odgovarajućim eksperimentalnim procedurama.

3.3. Biljni materijal, izolovanje autolizata i etarskog ulja

3.3.1. Biljni materijal

Biljni materijal vrste *B. vulgaris* sakupljen je početkom maja 2015. godine, tokom faze cvetanja, pored puta na teritoriji opštine Tutin (selo Ribariće, Republika Srbija). Herbarski

primerici deponovani su u herbarijumu Državnog univerziteta u Novom Pazaru, pod oznakom MD201514. Identifikaciju vrste izvršili su doc. dr Bojana P. Veljković i dr Dalibor Stojanović. Pre hemijske obrade, sav biljni materijal pažljivo je očišćen od ostataka zemlje, osušen na sobnoj temperaturi i potom izmeren.

3.3.2. Izolovanje autolizata

Hidroliza glukozinolata katalizovana je endogenom mirozinazom, u skladu sa procedurom koju su opisali Radulović i saradnici (2011; 2012). Svež biljni materijal vrste *B. vulgaris* – koren (48 g), nadzemni deo bez cveta (88 g) i cvet (8 g) – prethodno je homogenizovan i pomešan sa destilovanom vodom (250 mL). Svakom uzorku je zatim dodato 100 mL dietil-etra, a boce su hermetički zatvorene i postavljene u šejker na 25 °C i 200 rpm tokom 8 sati. Po završetku hidrolize, u smešu je dodat natrijum-hlorid (60 g) uz intenzivno mešanje. Organski sloj je dekantovan i filtriran kroz filter-papir Whatman br. 1, dok je preostali biljni materijal dodatno ekstrahovan tri puta dihlormetanom. Etarski i dihlormetanski ekstrakti su spojeni i osušeni preko anhidrovanog natrijum-sulfata, zatim upareni do suva na vakuum-uparivaču na temperaturi do 40 °C, rastvoreni u odgovarajućem rastvaraču i odmah analizirani. Autolizati su dali sledeće prinose: koren 8 mg, nadzemni deo bez cveta 115 mg i cvet 40 mg.

3.3.3. Izolovanje etarskog ulja

Svež biljni materijal cele biljke (350 g) podvrgnut je hidrodestilaciji sa 2 L destilovane vode u trajanju od 2,5 sata u originalnoj aparaturi po Klevendžeru (*Clevenger*). Dobijeno ulje je ekstrahovano sa dietil-etrom, a zatim je osušeno anhidrovanim natrijum-sulfatom. Dobijeno je 30 mg etarskog ulja (0,01%, w/w). Ulje je rastvoreno u 2 mL dietil-etra i odmah analizirano.

3.4. Opis sinteza i izolovanja jedinjenja

3.4.1. Sinteza nasturleksina A (metil-fenetilkarbamoditioat) (87)

U piridin (6,20 mL), ohlađen na 0 °C, dodat je feniletilamin (0,25 mL, 2 mmol), a zatim su sukcesivno dodati ugljen-disulfid (2,0 mL, 33,1 mmol) i trietilamin (0,80 mL, 5,74 mmol). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 30 min, nakon čega je dodat metil-jodid (0,181 mL, 2,9 mmol) i mešanje je nastavljeno još 15 min. Potom je reakcionoj smeši dodat toluen, a rastvor je koncentrisan *in vacuo*. Dobijeni sirovi proizvod (1,3 g) prečišćen je brzom hromatografijom na koloni (heksan/EtOAc 9:1), pri čemu je izolovano 328 mg

nasturleksina A (**87**). Čistoća proizvoda potvrđena je TLC i GC-MS analizama (delimična razgradnja je primećena u GC inletu). Spektralni podaci bili su u saglasnosti sa ranije objavljenim vrednostima (Pedras & To, 2018).

Bela čvrsta supstanca. Prinos: 78%. Tačka topljenja: 52–53 °C (literaturna vrednost: 51–52 °C, Pedras & To, 2018). FTIR (ATR), cm^{-1} : 3320 (N–H), 2936 (C–H), 1598 (arC–C), 1500 (arC–C), 1453, 1381, 1338, 1297, 1199, 1090, 1061, 1090, 940, 772, 700. ^1H NMR (CDCl_3), δ : 2,61 (s, 3H, CH_3), 2,97 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-7), 3,99 (m, 2H, H-8), 6,95 (brs, 1H, NH), 7,20–7,29 (m, 3H, H-2, H-4, H-6), 7,30–7,36 (m, 2H, H-3, H-5), i signali koji potiču od manje zastupljenog rotamera (ca. 24%) na 2,68 (s, 3H, CH_3), 2,97 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-7), 3,71 (m, 2H, H-8), 7,20–7,29 (m, 3H, H-2, H-4, H-6), 7,30–7,36 (m, 2H, H-3, H-5), 7,69 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3), δ : 18,1 (CH_3), 34,2 (C-7), 48,0 (C-8), 126,9 (C-4), 128,7 (C-2, C-6, dva preklopljena signala), 128,8 (C-3, C-5, dva preklopljena signala), 138,1 (C-1), 199,1 (C=S), i signali koji potiču od manje zastupljenog rotamera na 18,9 (CH_3), 34,8 (C-7), 47,3 (C-8), 126,9 (C-4), 128,7 (C-2, C-6, dva preklopljena signala), 128,8 (C-3, C-5, dva preklopljena signala), 137,2 (C-1), 201,9 (C=S). EIMS, m/z (rel. int.): 211 (24, $\text{M}^{+\bullet}$), 163 (18), 105 (27), 104 (29), 91 (100), 77 (28), 72 (41), 65 (32), 51 (23), 39 (18). Spektralni podaci nasturleksina A bili su u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Pedras & To, 2018; Gaspari et al., 2006).

3.4.2. Sinteza metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**)

U piridin (3,75 mL), ohlađen na 0 °C, rastvoreno je 250 mg tiramina, nakon čega su dodati ugljen-disulfid (1,25 mL, 20,7 mmol) i trietilamin (0,5 mL, 3,6 mmol). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Zatim je dodat metil-jodid (0,125 mL, 2 mmol) i mešanje je nastavljeno još 15 minuta. Nakon toga je dodat toluen, a smeša je koncentrisana *in vacuo*. Dobijeni suvi ostatak (1,5 g) prečišćen je brzom hromatografijom (heksan/EtOAc 1:1), čime je dobijeno 330 mg metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**). Čistoća proizvoda potvrđena je TLC analizom. Kod GC-MS analize, u GC inletu došlo do potpune razgradnje do odgovarajućeg izotiocijanata. Spektralni podaci bili su u skladu sa ranije objavljenim vrednostima (Pedras & To, 2018; Ashton et al., 1992).

Svetlo-žuta čvrsta supstanca. Prinos: 80%. FTIR (ATR), cm^{-1} : 3283 (O–H, N–H), 3024 (arC–H), 2938 (C–H), 1612, 1600, 1500, 1441, 1333, 1244, 1202, 1169, 936, 822. ^1H NMR (CDCl_3), δ : 2,61 (s, 3H, CH_3), 2,90 (m, 2H, H-7), 3,96 (m, 2H, H-8), 6,92 (brs, 1H, NH), 6,78–6,82 (m, 2H, H-3, H-5), 7,05–7,11 (m, 2H, H-2, H-6), i signali koji potiču od manje zastupljenog rotamera (ca. 33%) na 2,69 (s, 3H, CH_3), 2,90 (m, 2H, H-7), 3,68 (m, 2H, H-8), 6,78–6,82 (m,

2H, H-3, H-5), 7,05–7,11 (m, 2H, H-2, H-6), 7,63 (brs, 1H, NH). OH signal nije uočen u ^1H NMR (CDCl_3) spektru usled brze izmene. ^{13}C NMR (CDCl_3), δ : 18,1 (CH_3), 33,3 (C-7), 48,2 (C-8), 115,7 (C-3, C-5, dva preklopljena signala), 129,9 (C-2, C-6, dva preklopljena signala), 130,2 (C-1), 154,4 (C-4), 199,1 (C=S), i signali koji potiču od manje zastupljenog rotamera na 18,9 (CH_3), 33,9 (C-7), 47,4 (C-8), 115,5 (C-3, C-5, dva preklopljena signala), 130,1 (C-2, C-6, dva preklopljena signala), 130,2 (C-1), 154,4 (C-4), 201,9 (C=S).

3.4.3. *Sinteza 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (raphanusamic acid) (17)*

Pripremljen je rastvor NaOH (0,8 g) u destilovanoj vodi (15 mL), u koji je dodat L-cistein-hidrohlorid monohidrat (0,875 g). Zatim je dodat ugljen-disulfid (0,325 mL) uz mešanje do potpunog rastvaranja. Nakon toga je dodata smeša FeSO_4 (0,765 g) i NaOH (0,2 g), a reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom dva sata. Dobijeni čvrsti proizvod je profiltriran i dodatno ispiran vodom. Filtrat je zakiseljen do pH 2–3, ekstrahovan etil-acetatom (EtOAc), osušen preko anhidrovanog natrijum-sulfata, a rastvarač je uparen na vakuum-uparivaču. Dobijeno je 263 mg bele čvrste supstance. Spektralni podaci bili su u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Li et al., 1996; Roiser et al., 1983; Kopecky et al., 1984).

Bela čvrsta supstanca. Prinos: 263 mg (29%). FTIR (ATR), cm^{-1} : 3337 (N–H), 1732 (C=O), 1465 (O–H), 1257 (C–O), 1203, 1172 (C=S), 1134, 1045, 961, 938, 824, 782, 736, 680 (C–S). ^1H NMR (CDCl_3), δ : 3,60 (dd, 1H, $J = 11,5, 3,9$ Hz, H-5), 3,86 (dd, 1H, $J = 11,5, 9,3$ Hz, H-5), 4,84 (ddd, 1H, $J = 9,3, 3,9, 1,5$ Hz, H-4), 10,43 (br s, 1H, NH), 13,46 (br s, 1H, COOH). ^{13}C NMR (CDCl_3), δ : 35,4 (C-5), 63,7 (C-4), 170,9 (COOH), 199,2 (C=S). EIMS, m/z (rel. int.): 163 (100, $\text{M}^{+\bullet}$), 118 (36), 77 (27), 76 (35), 64 (45), 59 (58), 58 (44), 45 (89), 44 (22), 41 (29).

3.4.4. *Sinteza ($\pm$)-barbarina (rac-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona) (18)*

U 3,3 mL anhidrovanog etanola dodato je 230 mg anhidrovanog kalijum-karbonata, 0,4 mL ugljen-disulfida i 460 mg *rac*-1-amino-2-feniletanola, nakon čega je pažljivo ukapavan vodonik-peroksid (0,566 mL). Reakciona smeša je zagrevana u vodenom kupatilu na 50 °C. Nakon dodatka svih reagenasa pojavljuje se žuta boja koja nestaje nakon nekoliko sekundi. Ubrzo se izdvaja talog koji se profiltrira. Filtrat je ekstrahovan sa 100 mL etil-acetata, zatim ispiran sa tri porcije zasićenog vodenog rastvora natrijum-hlorida. Organski sloj je osušen preko anhidrovanog natrijum-sulfata. Rastvarač je uparen na vakuum-uparivaču pri čemu je dobijeno 462 mg suvog ostatka. Za prečišćavanje je korišćena vakuum hromatografija

(heksan/EtOAc 3:1), kojom je dobijeno 260 mg čistog *rac*-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (**18**). Čistoća proizvoda potvrđena je TLC i GC-MS analizama. Spektralni podaci bili su u skladu sa ranije objavljenim vrednostima (Radulović et al., 2017).

Bela čvrsta supstanca. Tačka topljenja: 116–118 °C. Prinos: 43%. ¹H NMR (CDCl₃), δ: 3,75 (ddd, 1H, *J* = 10,0; 8,1; 0,8 Hz, H-4), 4,16 (ddd, 1H, *J* = 10,0; 9,2; 0,8 Hz, H-4), 5,90 (dd, 1H, *J* = 9,2; 8,1 Hz, H-5), 7,36–7,44 (m, 5H, Ar-H), 7,62 (br s, 1H, N-H). EIMS, *m/z* (rel. int.): 179 (95, M⁺), 123 (30), 119 (27), 118 (77), 107 (49), 92 (42), 91 (100), 79 (33), 77 (53), 51 (40).

3.4.5. Izolovanje barbarina

Prirodni 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion (barbarin) izolovan je *dry-flash* hromatografijom iz autolizata odmah nakon njegovog izolovanja iz biljnog materijala. Preparativno razdvajanje komponenti autolizata (500 mg) izvedeno je pod izokratskim uslovima korišćenjem 30% etil-acetata u heksanu (v/v) kao mobilne faze, čime je dobijeno 85 mg čistog barbarina. Čistoća izolovanog jedinjenja potvrđena je TLC i GC-MS analizama. Spektralni podaci izolovanog barbarina bili su u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Radulović et al., 2017; Hirao et al., 1981).

Svetlo-žuta čvrsta supstanca. Tačka topljenja: 116–118 °C. RI (HP-5MS): 2069. FTIR (ATR), cm⁻¹: 3181 (N-H), 3036 (C-H), 1734 (C=O), 1669, 1537, 1457, 1153, 757, 696. ¹H NMR (CDCl₃), δ: 3,74 (ddd, 1H, *J* = 10,0; 8,1; 0,8 Hz, H-4), 4,16 (ddd, 1H, *J* = 10,0; 9,1; 0,8 Hz, H-4), 5,88 (dd, 1H, *J* = 9,1; 8,1 Hz, H-5), 7,36–7,43 (m, 5H, Ar-H), 8,20 (br s, 1H, N-H). ¹³C NMR (CDCl₃), δ: 51,2 (C-4), 84,0 (C-5), 126,0 (C-2', C-6'), 129,1 (C-3', C-5'), 129,4 (C-4'), 137,0 (C-1'), 189,5 (C-2). EIMS, *m/z* (rel. int.): 179 (95, M⁺), 123 (30), 119 (27), 118 (77), 107 (49), 92 (42), 91 (100), 79 (33), 77 (53), 51 (40).

3.4.6. Određivanje apsolutne konfiguracije izolovanog barbarina (**18**)

Apsolutna konfiguracija barbarina (**18**) određena je pomoću ¹H NMR titracije uz korišćenje hiralnog lantanidnog reagensa – europijum(III) *tris*[3-(heptafluorpropilhidroksimetilen)-D-kamforata], Eu(hfc)₃. Ovaj pristup omogućava razlikovanje enantiomera formiranjem diastereoizomernih kompleksa. Za titracioni eksperiment korišćen je sintetički (±)-barbarin (**18**). Uzorak barbarina (5 mg) rastvoren je u 0,7 mL C₆D₆ i snimljen je ¹H NMR spektar primenom standardnih parametara (32000 tačaka u vremenskom domenu, spektralna širina 10 ppm, O1 = 6,0 ppm, ugao pulsa 45°, vreme snimanja

5 s, broj skenova 16). Nakon snimanja početnog spektra, uzorku je dodat poznata masa Eu(hfc)_3 (2–4 mg), nakon čega je spektar ponovo snimljen. Postupnim dodavanjem Eu(hfc)_3 (2–4 mg) (u molarnom odnosu $\text{Eu(hfc)}_3 : (\pm)\text{-barbarin} = 0\text{--}0,41$) dolazilo je do progresivnog razdvajanja signala protona H-4a i H-4b, karakterističnih za dva enantiomerna oblika barbarina. Ovo razdvajanje nastaje usled formiranja diastereoizomernih kompleksa između barbarina i Eu(hfc)_3 (videti Rezultate i diskusiju). Enantiomerni sastav (ili enantiomerni višak) određen je na osnovu odnosa integrala signala H-4a(*S*) ili H-4b(*S*) prema polovini integrala preklopljenog signala H-4a+b(*R*), koristeći razdvojene ^1H NMR spektre (videti Sliku 3 i A5 u ref. Radulović et al., 2017).

Ista titraciona procedura primenjena je za procenu enantiomerne čistoće barbarina izolovanog iz autolizata nadzemnih delova bez cveta i korena *B. vulgaris*. U svim uzorcima uočena je samo jedna serija signala, odgovarajuća jednom enantiomeru, tj. (*S*)-barbarinu (**18b**).

3.4.7. Izolovanje 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**)

5-Fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**) izolovan je iz uzorka autolizata koji je čuvan na 4 °C nekoliko meseci u zatvorenim vialama, bez prisustva rastvarača i izlaganja svetlosti. Kao što je detaljno opisano u poglavlju *Rezultati i diskusija*, pod tim uslovima, (*S*)-barbarin (**18b**) je potpuno izomerizovao u odgovarajući 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**), što je omogućilo da uzorak bude pogodan za izolovanje ovog jedinjenja. Prekristalizacijom 324 mg uzorka autolizata iz smeše etra i heksana u odnosu 1:1 (v/v), dobijen je čvrst talog. Talog je profiltriran i ispiran etrom, čime je dobijeno 80 mg braon kristala jedinjenja **97**. Čistoća izolovanog proizvoda potvrđena je TLC i GC-MS analizama. Spektralni podaci izolovanog jedinjenja odgovarali su prethodno objavljenim podacima (Pedras & To, 2015; Radulović et al., 2017; Deng et al., 2011).

Braon kristali. Prinos: 80 mg. RI (HP-5MS): 1912. FTIR (ATR), cm^{-1} : 3298 (N–H), ≈ 1770 (C=O), 1645, 1492, 1191, 696. ^1H NMR (CDCl_3), δ : 3,31–3,41 (m, 1H, H-4), 3,49–3,56 (m, 1H, H-4), 4,51 („t“, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-5), 7,17–7,29 (m, 5H, Ar-H), 8,28 (brs, 1H, N–H). ^{13}C NMR (CDCl_3), δ : 45,7 (t, C-4), 47,3 (d, C-5), 127,7 (d, C-3', C-5'), 128,3 (d, C-2', C-6'), 128,8 (d, C-4'), 140,3 (s, C-1'), 165,0 (s, C-2). EIMS, m/z (rel. int.): 179 (73, $\text{M}^{+\bullet}$), 135 (21), 123 (100), 122 (72), 121 (72), 91 (51), 78 (21), 77 (28), 51 (26), 45 (24).

3.4.8. Sinteza rezedina (*rac*-5-fenil-oksazolidin-2-ona) (**20**)

5-Fenil-1,3-oksazolidin-2-on (rezedin, **20**) sintetisan je polazeći od *rac*-2-amino-1-feniletanola prema proceduri koju su opisali Nicolas i saradnici (Nicolas et al., 1993). U balon sa okruglim dnom dodat je *rac*-2-amino-1-feniletanol (1 g, 7,3 mmol), dietilkarbonat (DEC, 1,76 mL, 14,5 mmol) i K₂CO₃ (1,52 g, 11 mmol). Reakciona smeša zagrevana je na 130 °C uz intenzivno mešanje u aparaturi za destilaciju. Etanol (1,5 mL) je izdvojen destilacijom, nakon čega je reakciona smeša ohlađena na sobnu temperaturu. Dobijena bela čvrsta supstanca rastvorena je u 50 mL EtOAc, filtrirana, isprana zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (2 × 10 mL), osušena preko anhidrovanog natrijum-sulfata, a rastvarač uklonjen *in vacuo* na 40 °C, čime je dobijeno 601 mg čvrste supstance. Prekristalizacijom suvog ostatka iz smeše EtOAc/heksan (1:1, v/v) dobijeno je 208 mg jedinjenja **20**. Čistoća sintetisanog jedinjenja potvrđena je TLC i GC-MS analizama. Spektralni podaci sintetisanog produkta bili su u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Radulović et al., 2017; Laserna et al., 2015; Gabriele et al., 2003).

Bela čvrsta supstanca. Prinos: 208 mg (17%). Tačka topljenja: 88,5–89,0 °C. RI (HP-5MS): 1785. FTIR (ATR), cm⁻¹: 3264 (N–H), 1715 (C=O), 1239, 694. ¹H NMR (CDCl₃), δ: 3,55 (dd, 1H, *J* = 8,7; 7,7 Hz, H-4), 3,98 (t, 1H, *J* = 8,7 Hz, H-4), 5,62 (dd, 1H, *J* = 8,7; 7,7 Hz, H-5), 6,39 (br s, 1H, NH), 7,34–7,44 (m, 5H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃), δ: 48,4 (t, C-4), 77,9 (d, C-5), 125,7 (d, C-2', C-6'), 128,9 (d, C-3', C-4', C-5'), 138,4 (s, C-1'), 160,1 (s, C-2). EIMS, *m/z* (rel. int.): 163 (17, M⁺•), 118 (11), 107 (100), 105 (13), 91 (17), 89 (9), 79 (42), 78 (9), 77 (22), 51 (15).

3.4.9. Sinteza hidroksi-supstituisanih izomera fenetil-izotiocijanata

Hidroksi-supstituisani izomeri fenetil izotiocijanata – 2-(2-hidroksifenil)etil izotiocijanat, 2-(3-hidroksifenil)etil izotiocijanat i 2-(4-hidroksifenil)etil izotiocijanat (**98**) – sintetisani su iz odgovarajućih amina prema proceduri opisanoj u literaturi (Spencer et al., 2015).

U rastvor komercijalno dostupnog *p*-tiramina (1 ekv, 600 mg) u 30 mL suvog THF dodati su Et₃N (2 ekv, 1,23 mL) i CS₂ (5 ekv, 1,32 mL). Reakciona smeša mešana je na 30–40 °C tokom 1 sata. Nakon hlađenja na 0–10 °C, vodonik-peroksid (30% vodeni rastvor, 2,8 ekv, 1,25 mL) dodat je kap po kap. Zatim je dodat konc. HCl radi podešavanja pH na 1,0–1,5. Nastali talog sumpora je profiltriran, a filtrat ekstrahovan pomoću EtOAc (3 × 50 mL), osušen

preko anhidrovanog natrijum-sulfata. Uparavanjem rastvarača na vacuum-upraivaču dobijeno je žuto ulje. Sirovi proizvod prečišćen je vakuum hromatografijom (30% Et₂O/heksan, izokratski uslovi), čime je dobijeno 395 mg čistog *para*-izomera (8) u prinosu od 50%. Čistoća sintetisanog izotiocijanata potvrđena je TLC i GC-MS analizama. Spektralni podaci sintetisanog jedinjenja bili su u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Spencer et al., 2015; Narasimhachari & Vouros, 1974). Ostali izomerni izotiocijanati sintetisani su prema istoj proceduri.

Orto- i *meta*-tiramin, neophodni za sintezu 2-(2-hidroksifenil)etil izotiocijanata (**99**) i 2-(3-hidroksifenil)etil izotiocijanata (**100**), sintetisani su, redom, redukcijom 2-(2-nitroetil)fenola i 3-(2-nitroetil)fenola. U rastvor odgovarajućeg (2-nitroetil)fenola (60 mg, 0,36 mmol, 1 ekv) u metanolu (10 mL) dodat je 5% Pd/C (212 mg, 2 mmol, 5,55 ekv). Smeša je mešana 6 sati na sobnoj temperaturi u prisustvu gasovitog vodonika. Tok reakcije praćen je TLC metodom. Po završetku reakcije, katalizator je profiltriran, a filtrat uparen do suva. Dobijeni sirovi amin korišćen je u sledećem koraku bez dodatnog prečišćavanja. *Meta*-izomer sintetisan je po istoj proceduri.

Orto- i *meta*-izomerni izotiocijanati nisu prečišćavani niti izolovani iz reakcione smeše. Umesto toga, njihove reakcione smeše su analizirane GC-MS tehnikom radi određivanja retencionih indeksa i masenih spektara, nakon čega su koinjektovane sa uzorkom autolizata. Co-GC analiza pružila je jasan dokaz da sintetisani *orto*- i *meta*-izomerni izotiocijanati nisu prisutni u autolizatu. Spektralni podaci sintetisanih hidroksi-supstituisanih fenetil izotiocijanata bili su u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima (Spencer et al., 2015; Narasimhachari & Vouros, 1974).

2-(2-Hidroksifenil)etil izotiocijanat (**99**). RI (HP-5MS): 1770; EIMS *m/z* (rel. int.): 179 (32, M⁺), 120 (19), 107 (100), 91 (36), 79 (32), 78 (21), 77 (87), 72 (78), 51 (23), 39 (22).

2-(3-Hidroksifenil)etil izotiocijanat (**100**). RI (HP-5MS): 1789; EIMS *m/z* (rel. int.): 179 (15, M⁺), 107 (55), 91 (15), 77 (48), 72 (100), 63 (15), 59 (21), 58 (20), 51 (15), 39 (21).

2-(4-hidroksifenil)etil izotiocijanat (**98**). Svetlo-žuta uljasta tečnost. RI (HP-5MS): 1799. FTIR (ATR), cm⁻¹: 3396 (O–H), 2184, 2090 (N=C=S), 1613, 1514, 1440, 1223 (arC–OH). ¹H NMR (CDCl₃), δ: 2,91 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, H-2), 3,67 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, H-1), 4,40 (br s, 1H, OH), 6,79–6,82 (m, 2H, H-3', H-5'), 7,06–7,10 (m, 2H, H-2', H-6'). ¹³C NMR (CDCl₃), δ: 35,6 (t, C-2), 46,6 (t, C-1), 115,6 (d, C-3', C-5'), 129,2 (s, C-1'), 130,0 (d, C-2', C-6'), 130,5

(NCS), 154,6 (s, C-4'). EIMS, m/z (rel. int.): 181 (1,3), 180 (1,8), 179 (15, M^{+}), 109 (2), 108 (12), 107 (100), 77 (2), 55 (2), 51 (2), 39 (2).

3.5. Antimikrobna aktivnost – *in vitro* testiranje

3.5.1. Kulture mikroorganizama

Antimikrobna aktivnost ispitivana je na ukupno 15 mikroorganizama. Testiranje je obuhvatilo 11 bakterijskih sojeva: četiri standardna soja (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus pumilus* NCTC 8241 i *Escherichia coli* ATCC 25922) i šest kliničkih ili ekoloških izolata (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* i *Klebsiella pneumoniae*). Pored njih, testiran je i jedan probiotski soj, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Dodatno, ispitivana su četiri gljivična soja: *Candida albicans* ATCC 10231, *Trichoderma viride* ATCC 13233, *Aspergillus flavus* ATCC 9170 i *Fusarium solani* ATCC 11712. Bakterijski sojevi čuvani su u glicerolskim kulturama na -80 °C, dok su gljivični sojevi održavani u parafinskom ulju na 4 °C.

3.5.2. Priprema suspenzije

Bakterijske i kvasne suspenzije pripremljene su metodom direktne kolonije, kako je prethodno opisao Andrews (2005). Zamućenost početnih suspenzija podešena je na 0,5 McFarland standard koristeći denzitometar (Biosan, Letonija), što odgovara približno 10^8 CFU/mL za bakterije i 10^6 CFU/mL za kvasce. Od pripremljenih suspenzija napravljena su razblaženja 1:100 u sterilnom 0,85% fiziološkom rastvoru. Suspenzije gljivičnih spora dobijene su sakupljanjem spora sa kosina na kojima je bio razvijen micelijum; potom su razblažene 1:1000 u sterilnom 0,85% fiziološkom rastvoru.

3.5.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom

Antimikrobna aktivnost ispitana je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne mikrobicidne koncentracije (MMC) metodom mikrodilucije u mikrotitarskim pločama, korišćenjem rezazurina kao indikatora (Sarker et al., 2007).

U svaki bunarić mikrotitarske ploče sa 96 bunarića dodato je po 100 μ L Mueller-Hinton bujona (Torlak, Beograd, Srbija) za bakterije, odnosno Sabouraud bujona (Torlak, Beograd, Srbija) za gljive. Ispitivana jedinjenja su prvo rastvarana u 10% dimetil-sulfoksidu (DMSO; Acros Organics, Nju Džerzi, SAD), a zatim razblaživana sterilnom destilovanom vodom. U

prvu vrstu bunarića pipetirano je po 100 µL osnovnog rastvora ispitivanog jedinjenja, nakon čega su sprovedena serijska dvostruka razblaženja multikanalnom pipetom. Dobijeni opseg koncentracija iznosio je 5–0,039 mg/mL.

Mikrotitarske ploče inokulisane test organizmima inkubirane su na 37 °C tokom 24 h za bakterije, na 28 °C tokom 48 h za kvasce i na 28 °C tokom 72 h za plesni. Svaki test uključivao je kontrolu rasta i kontrolu sterilnosti, a svi eksperimenti izvođeni su u duplikatu. MIC je definisan kao najniža koncentracija ispitivanog jedinjenja gde nije doslo do promene boje rezazurina iz plave u roze. Kod plesni, MIC vrednost određena je kao najniža koncentracija koja inhibira vidljiv rast micelijuma. MMC je određen presejavanjem 10 µL sadržaja iz bunarića bez promene boje indikatora na hranljivi agar. Nakon inkubacije, najniža koncentracija koja nije pokazala rast (bez formiranja kolonija) definisana je kao MMC.

Za poređenje aktivnosti korišćeni su referentni agensi: doksiciklin, ampicilin i amfotericin B (Sigma Chemicals Co., SAD) i ketokonazol (Hemofarm A.D., Srbija), rastvoreni u odgovarajućim hranljivim bujonima. Doksiciklin je antibiotik širokog spektra, efikasan protiv aerobnih i anaerobnih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Ampicilin, beta-laktamski antibiotik, primarno deluje na Gram-pozitivne bakterije, ali pokazuje aktivnost i prema nekim Gram-negativnim sojevima. Amfotericin B je antifungalni lek koji se koristi u terapiji teških sistemskih mikotičnih infekcija, uključujući one izazvane vrstama roda *Aspergillus*. Ketokonazol je antifungalni agens koji inhibira rast vrsta roda *Candida*. Negativna kontrola (10% DMSO) nije pokazala inhibitorno dejstvo.

3.6. Antibiofilm aktivnost – *in vitro* testiranje

3.6.1. Formiranje biofilma

Sposobnost formiranja biofilma vrsta *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. mirabilis*, *S. enterica* i *K. pneumoniae* ispitana je prema metodi O'Toole i saradnika (2000), uz manje modifikacije.

U mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (Sarstedt, Nemačka) dodato je po 100 µL Mueller-Hinton hranljivog bujona. Zatim je u svaki bunarić dodat alikvot od 10 µL bakterijske suspenzije podešene na 1,0 McFarland za Gram-pozitivne i 0,5 McFarland za Gram-negativne bakterije. Ploče su inkubirane 48 h na 37 °C radi formiranja biofilma.

Nakon inkubacije, bunarići su dvaput isprani sa po 200 μ L sterilnog 0,85% fiziološkog rastvora kako bi se uklonile neadherentne i slabo adherentne ćelije. Biofilm formiran od adherentnih bakterija fiksiran je dodatkom 100 μ L metanola, koji je ostavljen da potpuno ispari. Fiksirani biofilmovi bojeni su 0,1% (m/v) rastvorom kristal-violeta (Fluka AG, Švajcarska) i ostavljeni na sobnoj temperaturi 20 min. Nakon bojenja, višak boje uklonjen je ispiranjem dejonizovanom vodom, a zatim je dodato 100 μ L 96% etanola. Kontrole su uključivale bunariće sa samim bujonom radi provere sterilnosti i nespecifičnog vezivanja boje. Pozadinska apsorbanca sterilnog medijuma, fiksativa i boje oduzeta je od OD očitavanja testiranih uzoraka. Svi eksperimenti izvedeni su u triplikatu.

3.6.2. Inhibicija sposobnosti formiranja biofilma

Za procenu inhibicije formiranja biofilma testiranih bakterija, mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (Sarstedt, Nemačka) pripremljene su dodavanjem po 100 μ L Mueller-Hinton bujona u svaki bunarić. Iz osnovnih rastvora ispitivanih jedinjenja (10 mg/mL) po 100 μ L je pipetirano u prvu vrstu ploče, nakon čega su sprovedena serijska dvostruka razblaženja (opseg 5–0,039 mg/mL) multikanalnom pipetom. Zatim je u svaki bunarić dodat alikvot od 10 μ L sveže bakterijske suspenzije (0,5 McFarland za Gram-negativne i 1,0 McFarland za Gram-pozitivne sojeve). Ploče su inkubirane 48 h na 37 °C. Nakon inkubacije, sadržaj je pažljivo uklonjen blagim okretanjem ploče, a preostali koraci analize sprovedeni su identično kao u odeljku 3.6.1.

Inhibitorna koncentracija biofilma (BIC₅₀) definisana je kao najniža koncentracija jedinjenja koja smanjuje formiranje biofilma za 50% (Chaieb et al., 2011; Muruzović et al., 2016). Kontrolni bunarići sadržali su samo bujon ili bujon sa ispitivanim jedinjenjima radi provere sterilnosti i nespecifičnog vezivanja boje. Pozadinska apsorbanca oduzeta je od očitanih vrednosti testiranih uzoraka. Svi eksperimenti izvedeni su u triplikatu. Tetraciklin (Sigma Chemicals Co., SAD), rastvoren u hranljivom bujonu, korišćen je kao referentno jedinjenje.

3.7. *In vitro* testovi za procenu sposobnosti vezivanja slobodnih radikala

3.7.1. DPPH test

DPPH test korišćen je za procenu sposobnosti ispitivanih jedinjenja da uklone reaktivne radikalske vrste (Avdović et al., 2023). Osnovni rastvori ispitivanih jedinjenja pripremljeni su u DMSO, a zatim razblaženi metanolom do ukupne zapremine od 1000 μ L. Nakon toga,

pripremljenoj smeši dodate su jednake zapremine 50 μ M rastvora DPPH u metanolu, pri čemu su konačne koncentracije ispitivanih jedinjenja iznosile 25, 50 i 100 μ M. Uzorci su nakon blagom mešanja inkubirani u mraku na sobnoj temperaturi 20–60 minuta. Metanol je korišćen kao slepa proba, a apsorbanca je merena na 517 nm nakon završetka inkubacije. Sva merenja izvedena su u triplicatu (Avdović et al., 2023).

3.7.2. ABTS test

Rastvor ABTS radikal-katjona pripremljen je prema ranije opisanom protokolu (Avdović et al., 2023). Različite koncentracije analiziranih uzoraka pripremljene su u DMSO. Test uzorci pripremljeni su tako što je 20 μ L uzorka pomešano sa 980 μ L metanola, nakon čega je dodato 1000 μ L ABTS rastvora. Apsorbanca je merena na 734 nm. Sva merenja izvedena su u triplicatu (Avdović et al., 2023).

3.8. In vitro testovi za procenu antiinflamatorne aktivnosti

3.8.1. Test inhibicije LOX enzima

Tip I-B sojine lipooksigenaze (LOX) predstavlja standardni enzim za ispitivanje antiinflamatornih svojstava različitih jedinjenja (Simijonović et al., 2024). Test inhibicije LOX enzima zasniva se na merenju sposobnosti enzima da oksiduje natrijum-linoleat u 13-hidroperoksilinoleinsku kiselinu.

Inhibicija enzima testiranim jedinjenjima određena je praćenjem apsorbance na 234 nm. U UV kivetu dodati su ispitivano jedinjenje, Tris pufer, rastvor enzima (5×10^3 jedinica/mL u fiziološkom rastvoru) i rastvor natrijum-linoleata (3 mM u Tris puferu, pH 9). Zabeležena je apsorbanca reakcione smeše, a aktivnost ispitivanih uzoraka poređena je sa aktivnošću standardnog inhibitora kvercetina. Sva merenja izvedena su u triplicatu.

3.8.2. Test inhibicije COX-2 enzima

Fluorimetrijski komplet za skrining inhibitora COX-2 (Abcam, Velika Britanija) korišćen je za procenu inhibitornog potencijala ispitivanih jedinjenja. Ovaj test se zasniva na fluorometrijskoj detekciji prostaglandina G_2 , međuproizvoda u reakciji koju katalizuje COX-2 enzim.

Ispitivana jedinjenja pripremljena su kao osnovni rastvori od 5 mM u DMSO, zatim razblažena pet puta u puferu za testiranje. Po 10 μ L razblaženog rastvora dodato je u

odgovarajuće bunariće mikrotitarske ploče sa 96 bunarića. Kontrole su obuhvatale: celekoksisib (kontrola inhibitora), DMSO (kontrola rastvarača) i kontrolu enzima. Reakcioni miks koji je sadržao COX-2 enzim, fluorescentnu sondu, kofaktor i pufer za testiranje dodavan je u zapremini od 80 µL, nakon čega je reakcija pokrenuta dodatkom 10 µL rastvora arahidonske kiseline/NaOH. Fluorescencija (Ex/Em = 535/587 nm) praćena je kinetički na 25 °C (Bošković et al., 2023; Nedeljković et al., 2023). Sva merenja izvedena su u triplicatu.

3.9. Statistička analiza

Vrednosti antimikrobne aktivnosti (MIC i MMC) prikazane su deskriptivno i nisu statistički obrađivane. Podaci o antioksidativnim i antiinflamatornim aktivnostima izraženi su kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) ili srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SE), u skladu sa prikazima u tabelama.

Razlike u antioksidativnim aktivnostima (DPPH i ABTS testovi), pri različitim koncentracijama i vremenima inkubacije, analizirane su korišćenjem jednodimenzionalne ili multifaktorske ANOVA analize, a statistički značajni efekti dalje su ispitivani Tukey testom višeg ranga. Vrednosti IC₅₀ određene su nelinearnom regresionom analizom krivih doza-odgovor. Statistička značajnost prihvaćena je na nivou $p < 0,05$. Sve statističke obrade sprovedene su korišćenjem softvera SPSS Statistics (v. 24.0, IBM, SAD).

3.10. *In silico* analiza

Strukture svih ispitivanih liganada optimizovane su korišćenjem metode M06-2X/6-311++G(d,p), implementirane u programskom paketu *Gaussian09* (Frisch et al., 2009; Zhao & Truhlar, 2008). Trodimenzionalna kristalna struktura PBP1a proteina preuzeta je iz *Protein Data Bank*-a (PDB ID: 2C6W) (Contreras-Martel et al., 2005).

Za potrebe simulacija molekularnog dokovanja korišćen je *AutoDock 4.0* softver (Morris et al., 2009). Mrežna kutija imala je dimenzije $45 \times 59 \times 56$ mrežnih tačaka u, redom, -x, -y i -z pravcima, dok je centar mreže bio postavljen na koordinate $98,799 \text{ Å} \times 35,214 \text{ Å} \times 55,068 \text{ Å}$. Rastojanje između mrežnih tačaka iznosilo je $0,375 \text{ Å}$. Fleksibilne simulacije interakcija između proteina i liganada sprovedene su primenom Lamarckovog genetskog algoritma (LGA), pri čemu je ligand tretiran kao fleksibilan, a protein kao rigidan. Vizualizacija i analiza dobijenih kompleksa sprovedene su korišćenjem softvera *BIOVIA Discovery Studio* (Biovia, 2017).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ETARSKOG ULJA I AUTOLIZATA VRSTE *B. vulgaris*

4.1.1. Degradacioni proizvodi glukozinolata i druga isparljiva jedinjenja

Biljna vrsta *B. vulgaris* analizirana je radi identifikacije sekundarnih metabolita, odnosno degradacionih proizvoda glukozinolata prisutnih u uzorku populacije koja raste u Srbiji. Na osnovu degradacionih proizvoda glukozinolata prisutnih u etarskom ulju i autolizatima, cilj je bio izvršiti detaljnu analizu njihovog hemijskog sastava, utvrdi glukozinolatni profil i njegov taksonomski značaj za populaciju koja raste u Srbiji. U tu svrhu, izvršeno je izolovanje etarskog ulja hidrodestilacijom i autoliza glukozinolata endogenom mirozinazom uz ekstrakciju nastalih proizvoda prema procedurama opisanim u poglavlju Eksperimentalni deo.

Detaljna analiza hemijskog sastava izvršena GC-MS metodom. Hromatogrami su analizirani korišćenjem programa AMDIS i NIST MS Search 2.0 (za više detalja videti Eksperimentalni deo). Rezultati analize prikazani su u Tabeli 2. Identifikovano je ukupno 54 sastojaka poređenjem njihovih linearnih retencionih indeksa, izračunatih u odnosu na homologu seriju *n*-alkana, sa literaturnim vrednostima i poređenjem masenih spektara sa spektrima referentnih standarda. Gde god je bilo moguće, identitet komponenti potvrđivan je i koinjekcijom sa autentičnim standardom, dok su pojedini sastojci izolovani i spektralno potpuno okarakterisani, kako je to naznačeno u Tabeli.

Analizom etarskog ulja i autolizata identifikovano je ukupno 12 jedinjenja koja su nastala razgradnjom glukozinolata (Slika 22). Jedinjenja fenilacetonitril (**101**), 3-fenilpropanonitril (**102**), 3-hidroksi-3-fenilpropanonitril (**103**), 2-fenetil-izotiocijanat (**16**), 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (**19**), 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-on (sin. resedin) (**20**), 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanat (**98**), 1*H*-indol-3-karboksaldehid (**104**), nasturleksin C (**85**), 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**), (*S*)-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) i nasturleksin D (**86**), istaknuta u Tabeli 2, smatraju se degradacionim produktima glukozinolata.

Tabela 2. Hemijski sastav etarskog ulja, autolizata korena, nadzemnog dela bez cvetova i cvetova vrste *B. vulgaris* (Gusinac et al., 2025).

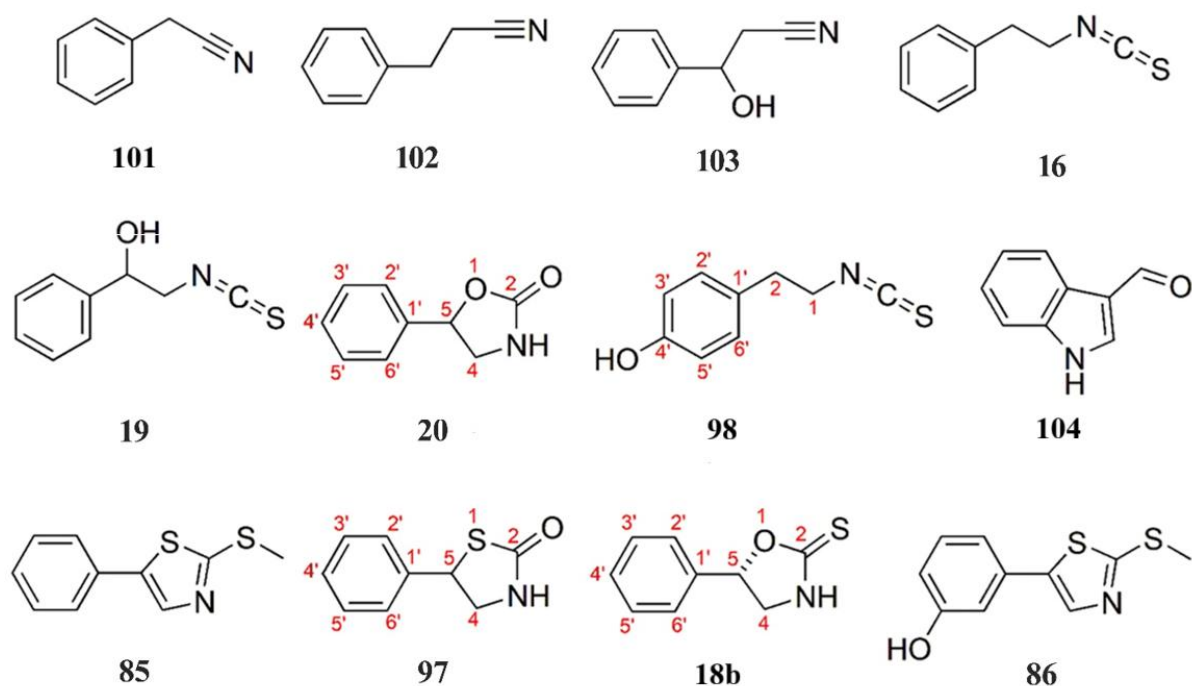
RI ^[a]	Komponenta	Etarsko ulje	Autolizat			Metoda identifikacije ^[c]
			Koren	Nadzemni deo	Cvet	
		Procenat zastupljenosti ^[b]				
845	(<i>E</i>)-3-Heksen-1-ol	0,2	-	-	-	RI, MS
850	(<i>Z</i>)-3-Heksen-1-ol	15,7	-	0,8	0,4	RI, MS
967	Benzaldehid	10,6	t	-	0,5	RI, MS, Co-GC
976	Fenol	0,9	0,3	2,2	1,1	RI, MS, Co-GC
986	(<i>E</i>)-3-Heksenska kiselina	-	-	0,9	-	RI, MS
1002	Mezitilen	-	t	t	0,9	RI, MS
1005	Neidentifikovano jedinjenje ^[d]	0,8	-	-	-	-
1029	<i>p</i> -Cimen	-	t	t	-	RI, MS, Co-GC
1038	Benzil-alkohol	-	0,1	0,1	-	RI, MS, Co-GC
1050	Fenilacetaldehid	2,3	0,1	0,1	-	RI, MS, Co-GC
1074	<i>p</i> -Krezol	-	-	t	-	RI, MS, Co-GC
1100	Undekan	-	t	t	-	RI, MS, Co-GC
1109	(<i>E,E</i>)-2,4-Oktadienal	0,5	-	t	-	RI, MS
1119	β -Fenetil-alkohol	t	0,6	t	-	RI, MS, Co-GC

1145	Fenilacetonitril (101)	t	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1147	Veratrol	t	t	-	-	RI, MS
1156	Benzojeva kiselina	t	t	t	-	RI, MS, Co-GC
1200	Dodekan	0,6	0,2	0,7	1,0	RI, MS, Co-GC
1216	Dihidroindol	t	t	0,3	t	RI, MS
1219	4-Vinilfenol	t	-	-	-	RI, MS
1228	β -Ciklocitral	t	-	-	-	RI, MS
1240	Pulegon	t	-	-	-	RI, MS
1242	Fenilsirćetna kiselina	-	t	-	-	RI, MS
1246	3-Fenilpropanonitril (102)	25,5	0,4	-	-	RI, MS
1296	Dihidroedulan (izomer 1) ^[e]	2,6	-	-	-	RI, MS
1300	Tridekan	-	0,6	3,8	2,5	RI, MS, Co-GC
1302	Dihidroedulan (izomer 2) ^[e]	17,8	-	-	-	RI, MS
1308	Teaspiran A	1,3	-	-	-	RI, MS
1317	4-Vinilgvajakol	0,7	-	-	-	RI, MS
1323	Teaspiran B	1,7	-	-	-	RI, MS
1359	Eugenol	-	-	0,1	-	RI, MS, Co-GC
1363	4-Hidroksibenzaldehid	-	t	0,2	-	RI, MS, Co-GC
1395	Skatol	-	0,1	-	-	RI, MS

1397	Neidentifikovano jedinjenje ^[d]	0,9	-	-	-	-
1400	Tetradekan	-	0,1	0,3	t	RI, MS, Co-GC
1402	Vanilin	-	t	-	-	RI, MS, Co-GC
1403	Metil-eugenol	t	-	-	-	RI, MS
1409	Neidentifikovano jedinjenje ^[d]	0,7	-	-	-	-
1415	(<i>E</i>)- β -Damaskon	0,5	-	-	-	RI, MS
1429	3-Hidroksi-3-fenilpropanonitril (103)	-	0,5	t	t	RI, MS
1461	Homofarnesan ^[e]	1,2	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1473	2-Fenetil-izotiocijanat (16)	3,1	49,3	1,6	0,9	RI, MS, Co-GC
1485	(<i>E</i>)- β -Ionon	-	-	t	-	RI, MS, Co-GC
1500	Pentadekan	-	-	t	-	RI, MS, Co-GC
1562	Neidentifikovano jedinjenje ^[d]	2,1	1,0	2,6	1,3	-
1597	Neidentifikovano jedinjenje ^[d]	0,6	0,2	1,6	0,3	-
1658	2-Hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (19) ^[f]	-	0,7	0,9	2,4	MS
1749	Neidentifikovano jedinjenje ^[d]	0,9	t	0,2	-	-
1785	5-Fenil-1,3-oksazolidin-2-on (sin. rezedin) (20) ^[e]	-	0,7	1,1	0,4	RI, MS, Co-GC
1799	2-(4-Hidroksifenil)etil-izotiocijanat (98)	-	1,4	-	-	RI, MS, Co-GC
1800	Oktadekan	-	-	0,2	-	RI, MS, Co-GC
1815	1 <i>H</i> -Indol-3-karboksaldehid (104)	-	0,1	-	-	RI, MS

1838	Neofitadien (izomer 1)	-	-	1,0	-	RI, MS
1864	Nasturleksin C (85) ^[f]	-	1,3	t	-	MS
1900	Nonadekan	-	-	t	-	RI, MS, Co-GC
1912	5-Fenil-1,3-tiazolidin-2-on (97) ^[e]	-	0,7	1,9	0,4	RI, MS, Co-GC, Izol.
2000	Eikozan	-	-	t	-	RI, MS, Co-GC
2069	(S)-5-Fenil-1,3-oksazolidin-2-tion (sin. (S)-barbarin) (18b)	-	40,1	70,5	83,4	RI, MS, Co-GC, Izol.
2112	(E)-Fitol	-	-	1,0	-	RI, MS, Co-GC
2217	Nasturleksin D (86) ^[f]	-	t	-	-	MS
	Ukupno	91,2	98,5	92,1	95,5	

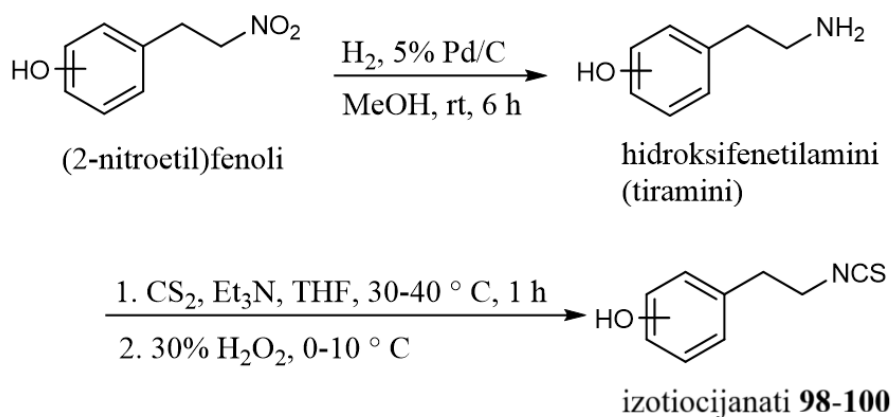
^[a]Linearni retencioni indeksi eksperimentalno su određeni na HP-5MS koloni. ^[b]Vrednosti su određene na osnovu tri analize ^[c]RI – upoređivanje RI, izračunatih u odnosu na retenciono vreme alkana (C₈-C₂₃) na HP-5MS koloni, sa onima dostupnim u literaturi; MS – upoređivanje masenih spektara sa onima iz biblioteka masenih spektara; Co-GC – koinjekcija sa čistim referentnim jedinjenjima; Izol. – Izolovano i spektralno okarakterisano jedinjenje. ^[d]MS(EI), 70eV, RI 1005, *m/z* (rel. int.): 82 (5), 81 (5), 79 (4), 68 (5), 67 (100), 65 (11), 43 (13), 41 (4), 39 (9); RI 1409, *m/z* (rel. int.): 121 (100), 119 (73), 109 (47), 107 (81), 105 (68), 95 (25), 93 (39), 91 (71), 81 (25), 79 (28); RI 1397, *m/z* (rel. int.): 174 (8), 159 (33), 134 (42), 121 (21), 120 (12), 119 (100), 107 (12), 105 (22), 91 (29), 79 (9); RI 1562, *m/z* (rel. int.): 161 (10), 160 (100), 159 (6), 131 (20), 105 (7), 104 (19), 103 (14), 78 (6), 77 (21), 51 (6); RI 1597, *m/z* (rel. int.): 106 (100), 193 (33), 104 (10), 79 (9), 107 (9), 77 (8), 194 (5), 118 (5); RI 1749, *m/z* (rel. int.): 237 (8), 166 (7), 165 (68), 107 (8), 106 (100), 104 (5), 77 (7), 45 (10), 43 (11). Tačan stereoizomer nije određen. ^[f]Tentativno identifikovano na osnovu masenih spektara; t – u tragovima (<0.1%).



Slika 22. Strukturne formule proizvoda hidrolize glukozinolata identifikovanih u etarskom ulju i autolizatima vrste *B. vulgaris*: fenilacetonitril (**101**), 3-fenilpropanonitril (**102**), 3-hidroksi-3-fenilpropanonitril (**103**), 2-fenetil-izotiocijanat (**16**), 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (**19**), 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-on (sin. resedin) (**20**), 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanat (**98**), 1*H*-indol-3-karboksaldehid (**104**), nasturleksin C (**85**), 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**), (*S*)-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-on (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) i nasturleksin D (**86**) (Gusinac et al., 2025).

Radi nedvosmislene identifikacije, pojedine komponente čija identifikacija, na osnovu podataka iz literature, nije mogla biti sa sigurnošću potvrđena, a koje su bile prisutne u značajnom udelu koji je omogućavao njihovo izolovanje – kao što su barbarin (**18**) i 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**) – izolovane su i spektralno okarakterisane primenom IR, 1D i 2D NMR spektroskopije, kao i masene spektrometrije. Komponente koje nije bilo moguće izolovati – poput rezedina (**20**) – sintetisane su. Kod komponenti za koje identitet, na osnovu dostupnih eksperimentalnih i literaturnih podataka, nije mogao biti potvrđen u pogledu izomerije detektovanog jedinjenja – kao u slučaju izotiocijanata **99** – izvršena je sinteza svih mogućih izomera radi nedvosmislene identifikacije detektovanog metabolita.

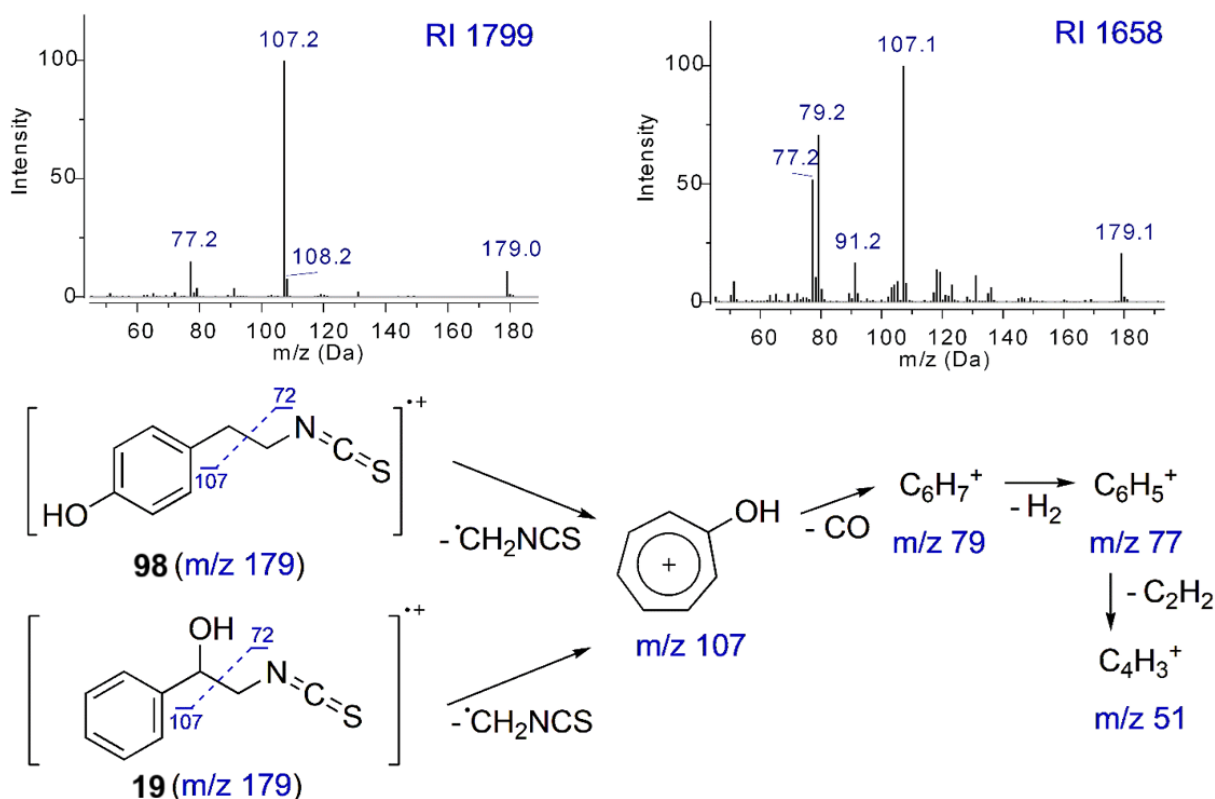
Maseni spektar komponente detektovane u autolizatu korena sa RI 1799 pokazao je obrazac fragmentacije karakterističan za izotiocijanate, što sugerise da se radi o degradacionom proizvodu glukozinolata (Slika 23). Maseni spektar karakteriše molekulski jon na m/z 179, dok osnovni pik na m/z 107 odgovara jonu $C_7H_7O^+$, što ukazuje na prisustvo hidroksibenzil-fragmenta. Takođe, fragmentni jon na m/z 72, koji se može pripisati jonu CH_2NCS^+ , potvrđuje prisustvo izotiocijanatne grupe. Na osnovu ovih zapažanja pretpostavljeno je da se jedinjenje može identifikovati kao jedan od izomera hidroksi-supstituisanih fenetil-izotiocijanata: 2-(2-hidroksifenil)etil-izotiocijanat (**99**), 2-(3-hidroksifenil)etil-izotiocijanat (**100**) ili 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanat (**98**). Sva tri položajna izomera prethodno su sintetisana i analizirana gasnom hromatografijom (GC), a njihovi EI maseni spektri dostupni su u literature (Narasimhachari & Vouros, 1974); međutim, podaci o retencionim indeksima (RI) nisu bili poznati, što je zahtevalo dodatnu potvrdu putem sinteze i koinjekcije radi nedvosmislene identifikacije. Poznato je da strukturni izomeri – naročito oni sa aromatičnim prstenom – često daju vrlo slične EI masene spektre, što otežava njihovo razlikovanje isključivo na osnovu fragmentacije (Radulović et al., 2012). Zbog navedenih ograničenja i nedostatka pouzdanih GC podataka o RI vrednostima (literaturno su bila dostupna samo retencionna vremena iz prethodno navedenog literaturnog izvora), tri pomenuta izomera su sintetisana iz odgovarajućih amina prema proceduri opisanoj u literaturi od strane Spencera i saradnika (2015) (Šema 1).



Šema 1. Opšta šema sinteze 2-(2-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**99**), 2-(3-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**100**) i 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**).

Nakon sprovedene sinteze, sintetisani izotiocijanati su koinjektovani sa uzorcima autolizata radi potpune i nedvosmislene identifikacije, pri čemu je jedinjenje na RI 1799 jasno

identifikovano kao 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanat (**98**). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno objavljenim podacima koji ukazuju da se i *meta*- i *para*-izomeri javljaju kao prirodni metaboliti u *B. vulgaris*, što će detaljnije biti razmotreno u nastavku diskusije.



Slika 23. Maseni spektri jedinjenja detektovanih u autolizatima *B. vulgaris* – 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**, RI 1799) (maseni spektar gore levo) i 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanata (**19**, RI 1658) (maseni spektar gore desno) sa pretpostavljenim putevima fragmentacije (Gusinac et al., 2025).

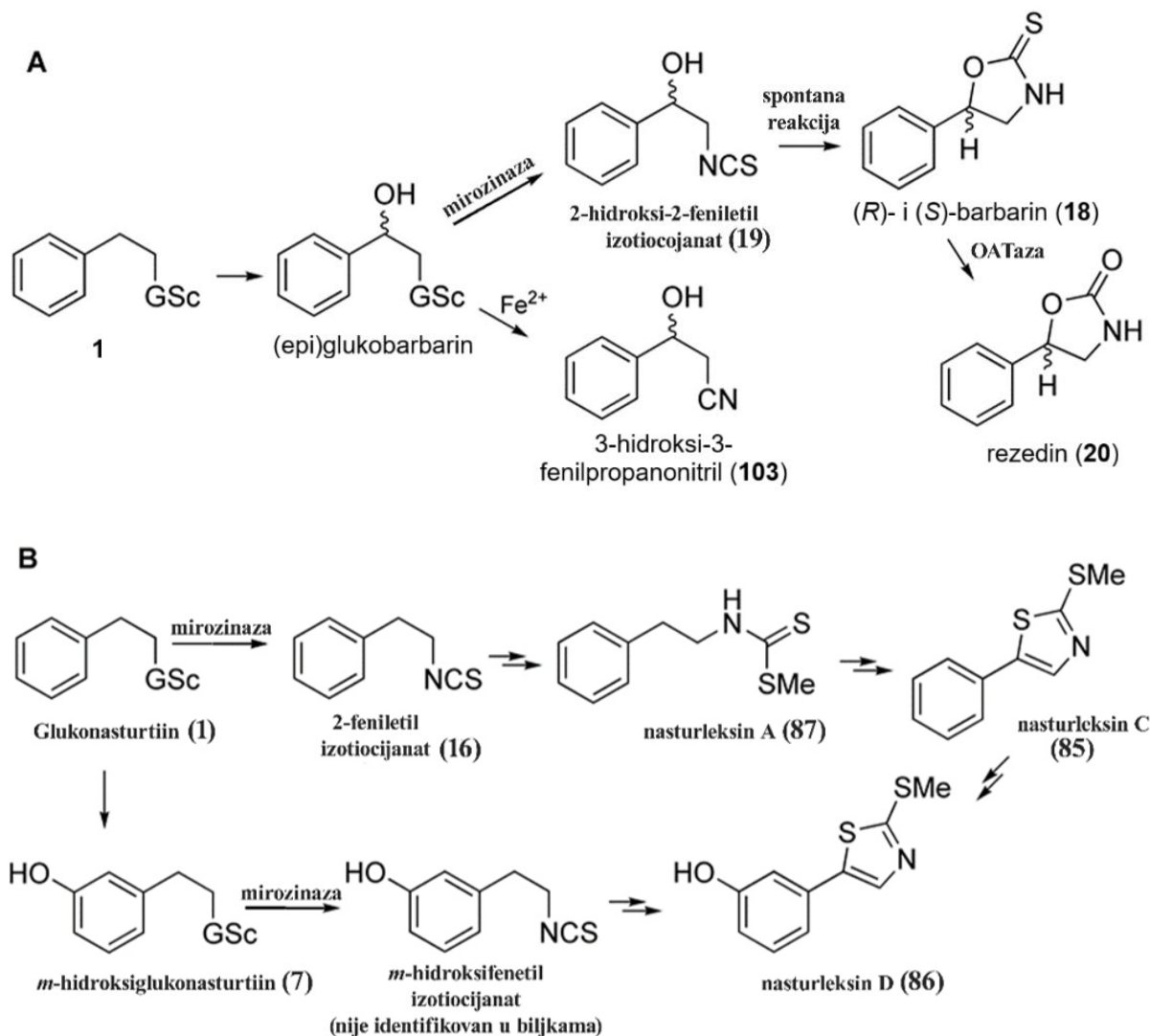
Komponenta sa retencionim indeksom (RI) 1658, detektovana u sva tri autolizata, pokazala je u masenom spektru obrazac fragmentacije veoma sličan prethodno opisanim izotiocijanatima (**98–100**). Detaljna analiza masenog spektra ovog jedinjenja dovela je do sličnih zaključaka – prisutan je molekulski jon na m/z 179, osnovni pik na m/z 107 koji odgovara $C_7H_7O^+$ jonu (tj. hidroksibenzil-grupi), kao i fragment na m/z 72, koji se može pripisati CH_2NCS^+ jonu karakterističnom za izotiocijanate. Pored toga, uočena su dva izražena pika na m/z 79 i m/z 77, koja se mogu objasniti fragmentacijom jona tropil-alkohola (m/z 107), uz naknadni gubitak CO (m/z 79) i H_2 (m/z 77). Imajući u vidu značajno niži RI u odnosu na sva tri sintetisana izotiocijanata

fenolne strukture, kao i činjenicu da je jedinjenje slične strukture ranije navedeno u literaturi kao potencijalni prekursor u biosintezi barbarina zaključeno je da je reč o 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (Slika 23). Zbog očekivane hemijske reaktivnosti ovog jedinjenja i ograničenih podataka o GC retencionim indeksima, jedinjenje je preliminarno identifikovano kao 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (**19**). Ovakva identifikacija je u skladu sa ranijim istraživanjima, gde je navedeno kao produkt degradacije (epi)glukobarbarina (**3**) i prekursora (*R*)- ili (*S*)-barbarina, što je potvrđeno prethodnim istraživanjima (Cardenas et al., 2023; Liu et al., 2016) (videti Sliku 23).

Fenilacetonitril (**101**) je detektovan u tragovima u analiziranom ulju i predložen kao mogući proizvod hidrolize glukotropeolina (benzil-glukozinolata). Do danas, ovaj glukozinolat nije zabeležen kao metabolit vrste *B. vulgaris*, verovatno zbog njegove izuzetno niske zastupljenosti, kao i ograničene osetljivosti dostupnih analitičkih tehnika pri standardnim eksperimentalnim uslovima.

3-Fenilpropanonitril (**102**) identifikovan je kao najzastupljenija komponenta analiziranog etarskog ulja (25,5%), dok je u autolizatu korena detektovan u znatno manjoj koncentraciji (0,4%). Nasuprot tome, 2-fenetil-izotiocijanat (**4**) bio je jedan od dominantnih sastojaka autolizata korena (49,3%), a u etarskom ulju je zabeležen u znatno nižem udelu (3,1%). Pretpostavlja se da oba jedinjenja potiču hidrolizom istog glukozinolatnog prekursora – glukonasturtiina – pri čemu razlike u njihovim relativnim udelima verovatno odražavaju specifičnosti primenjenih postupaka izolovanja. Za navedeni izotiocijanat takođe je sugerisano da predstavlja biosintetski prekursor fitoaleksina nasturleksina A (**87**), koji je, istovremeno, intermedijer u biosintezi nasturleksina C (**85**) i D (**86**) (Pedras et al., 2015 a, b) (Slika 24).

U autolizatima korena i nadzemnih delova bez cveta identifikovani su nasturleksini C (**85**) i D (**86**) na osnovu masenih spektara dostupnih u literaturi (Pedras & To, 2018; Cardenas et al., 2023; Pedras et al., 2015a). Ranije su predložena dva biosintetska puta koja vode do ova dva fitoaleksina; međutim, još uvek nema dokaza o tome u kom se koraku uvodi *meta*-hidroksi grupa u aromatični prsten, budući da *m*-hidroksifenetil-izotiocijanat do sada nije detektovan u biljkama (Slika 24). Zbog izazova vezanih za njihovu sintezu, prisustvo i identifikacija ovih jedinjenja u autolizatima zasnivali su se isključivo na MS podacima objavljenim od strane Pedrasa i saradnika (Pedras et al., 2015a).



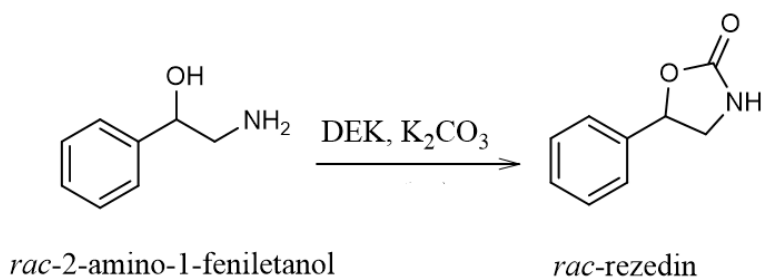
Slika 24. Biohemijska transformacija glukonasturtiina u *B. vulgaris* (Pedras & To, 2018; Cardenas et al., 2023; Liu et al., 2016; Agerbirk et al., 2018): **A.** Najzastupljeniji glukozinolati u *B. vulgaris* i njihovi proizvodi hidrolize: glukonasturtiin (**1**) i epiglukobarbarin (**2** i **3**), (*R*)- (**18a**) i (*S*)-barbarin (**18b**) i rezedin (**20**). **B.** Biosinteza nasturleksina A (**87**), C (**85**) i D (**86**) koja obuhvata dva predložena biosintetska puta. OATaza – oksazolidintionaza, Fe^{2+} – neenzimska transformacija katalizovana Fe(II)-jonima; za skraćenicu GSc videti Sliku 8 (Gusinac et al., 2025).

Relativne zastupljenosti identifikovanih nasturleksina C i D podržavaju ranije predložene biosintetske puteve i ukazuju na lokalizovanu biosintezu fitoaleksina u podzemnim delovima biljke. Pored toga, dobijeni podaci sugerišu delimičnu biosintetsku konverziju glukonasturtina (**1**) u njegov 2-hidroksilovani derivat, epiglukobarbarin (**3**), u korenu. Čini se da je ova transformacija

u nadzemnim delovima biljke gotovo u potpunosti ostvarena, što potvrđuje uočeni odnos 2-fenetil-izotiocijanata (**16**) i barbarina (**18**) u autolizatima. Ovakav obrazac ukazuje na moguću evolutivnu adaptaciju, pri čemu biljka diferencira odbrambene mehanizme u zavisnosti od ekološkog konteksta – primarno odvrćajući herbivore u nadzemnim delovima, dok se u podzemnim delovima dominantno suprotstavlja mikrobnim patogenima (Kuzina et al., 2011; Liu et al., 2016).

Identifikacija 3-hidroksi-3-fenilpropanonitrila (**103**), kao i moguće prisustvo 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanata (**19**) u svim autolizatima, dodatno podržavaju predloženi biosintetski put. Konkretno, enzimaska hidroksilacija glukonasturtina (**1**) dovodi do formiranja (epi)glukobarbarina (**3**), koji nakon hidrolize katalizovane mirozinazom, ili potencijalno alternativnim reakcijama, može dati ili 3-hidroksi-3-fenilpropanonitril (**103**) ili 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (**16**). Smatra se da se nitril **103** formira neenzimskom degradacijom glukozinolata u prisustvu Fe(II)-jona, kako je ranije opisano (Hanschen et al., 2014). Nasuprot tome, 2-hidroksi-2-fenetil-izotiocijanat (**16**) nastaje enzimskom hidrolizom i poznato je da spontano ciklizuje u (*R*)- ili (*S*)-barbarin, kao što je ranije pomenuto (Slika 24).

Identifikacija rezedina (**20**) potvrđena je sintezom. Rezedin je sintetisan polazeći od *rac*-2-amino-1-feniletanola, prema proceduri koju su opisali Nicolas i saradnici (Šema 2; Nicolas et al., 1993).



Šema 2. Sinteza rezedina (*rac*-5-fenil-oksazolidin-2-ona) (**20**).

U fiziološkim uslovima, u *B. vulgaris*, rezedin (**20**) nastaje iz barbarina (**18**) delovanjem enzima oksazolidintionaze (OATaza), kako su predložili Agerbirk i saradnici (2018; Slika 24). Pored *B. vulgaris*, rezedin je detektovan i u vrstama *Nasturtium officinale* i *Reseda luteola*. Agerbirk i saradnici pokazali su da se ovaj metabolit formira nakon oštećenja tkiva, dok u intaktnim biljkama nije detektovan. Autori su pretpostavili da je OATaza konstitutivno prisutna u

različitim biljnim tkivima i da katalizovanjem konverzije barbarina učestvuje u njegovom metabolizmu *in vivo*.

U autolizatu G-tipa *B. vulgaris* uočava se pretežna zastupljenost samo jednog stereoizomera rezedina, što ukazuje da se ovaj metabolit verovatno formira enzimskim putem iz (*R*)-barbarina. Prema Agerbirku i saradnicima, oksazolidintionaza (OATaza) bi mogla imati ulogu u metabolizmu glukozinolata tako što učestvuje u njihovoj detoksikaciji, pri čemu se pretpostavlja da može doprineti i recikliranju sumpora. Autori ne isključuju ni druge funkcije ove reakcije – uključujući signalne i biosintetske procese ili učešće u indukovanim odbrambenim mehanizmima tokom formiranja fitoaleksina, što je u skladu sa poznatom bioaktivnošću oksazolidin-2-onskih derivata. Dodatno, činjenica da je aktivnost OATaze potvrđena u predstavnicima još jedne biljne familije sugerise da ovaj enzim verovatno nije ograničen samo na rod *Barbarea*, već bi mogao biti raširen u okviru reda Brassicales (Agerbirk et al., 2018).

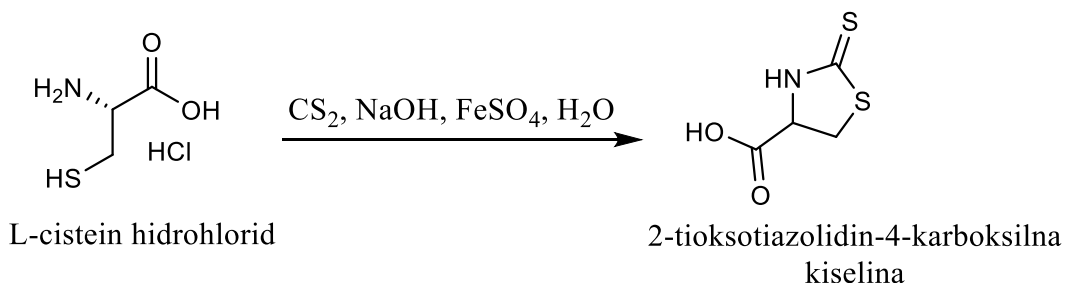
Barbarin (**18**) je u uzorcima autolizata nadzemnih organa biljke utvrđen kao dominantni produkt razgradnje glukozinolata, pri čemu je udeo ovog metabolita u ukupnom profilu isparljivih jedinjenja varirao između 40,1% i 83,4% u svim autolizatima (Tabela 2). Njegovo biosintetsko poreklo detaljno je razmatrano u radu Cardenas i saradnika (Cardenas et al., 2023). Takođe, jasno je utvrđeno da se barbarin i rezedin javljaju kao enantiomerni parovi, što odražava stereohemiju njihovih odgovarajućih glukozinolatnih prekursora: glukobarbarina (**2**) i njegovog epimera, epiglukobarbarina (**3**) (Slika 24).

Kao što je ranije navedeno, *B. vulgaris* obuhvata dva jasno divergentna geno- i hemotipa, G i P tip, koji se međusobno razlikuju kako u prostornoj distribuciji, tako i u profilu glukozinolata (Agerbirk et al., 2018; Byrne et al., 2017; Christensen et al., 2014). Populacije G-tipa, dominantne u centralnoevropskom arealu, produkuju prvenstveno glukobarbarin (**2**; 2*S*-epimer), dok je u istočnoevropskim populacijama češći P-tip, kod kojeg dominira biosinteza epiglukobarbarina (**3**; 2*R*-epimer). Razlika između ova dva metabolita ogleda se isključivo u konfiguraciji 2-hidroksi supstituenta.

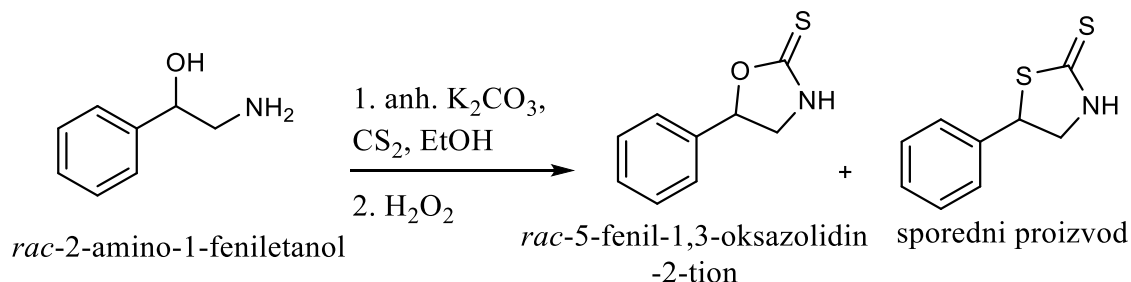
Važno je istaći da *B. vulgaris* biosintetiše oba epimera, nezavisno od hemotipa i geografskog porekla, ali u varijabilnim udelima. Odnos glukobarbarin/epiglukobarbarin nije karakterističan samo za određeni hemotip, već i za konkretan biljni organ, pri čemu nadzemni i podzemni delovi pokazuju stabilno različite raspodele ovih epimera. Ovakav stereohemijski

obrazac omogućava hemotipsku diferencijaciju na osnovu stereohemijskog profila (Van Leur et al., 2006; Agerbirk et al., 2015; Byrne et al., 2017).

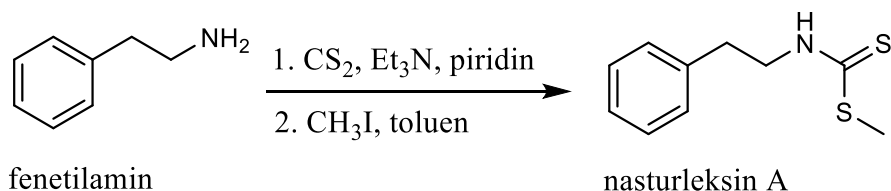
Pored pomenutih jedinjenja koja su sintetisana u cilju njihove potpune identifikacije, dodatno su pripremljeni sledeći sintetski analozi metabolita *B. vulgaris*: 2-tioksotiazolidin-4-karboksilna kiselina (**17**), ($\pm$)-barbarin (**18**), nasturleksin A (**87**), kao i 4-hidroksi derivat nasturleksina A, metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioat (**96**), prema reakcionim uslovima prikazanim na Šemama 3–6 i eksperimentalnim procedurama opisanim u Eksperimentalnom delu. U daljem toku rada, izolovana i sintetisana jedinjenja korišćena su za ispitivanje njihove biološke aktivnosti, što će biti preciznije opisano u daljoj diskusiji.



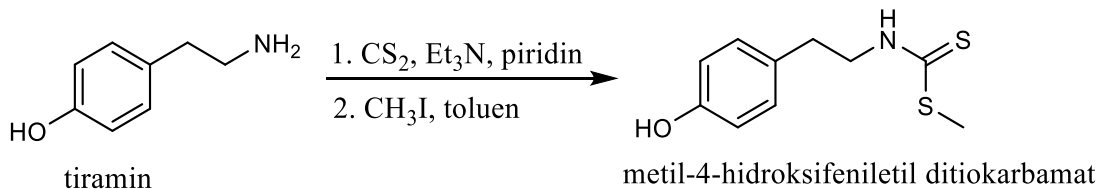
Šema 3. Sinteza 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**).



Šema 4. Sinteza ($\pm$)-barbarina (*rac*-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona) (**18**).



Šema 5. Sinteza nasturleksina A (*N*-(2-fenil)-*N*-metilditiokarbamat) (**87**).



Šema 6. Sinteza metil-4-hidroksifenetil ditiokarbamata (**96**).

4.1.2. Određivanje apsolutne konfiguracije izolovanog barbarina

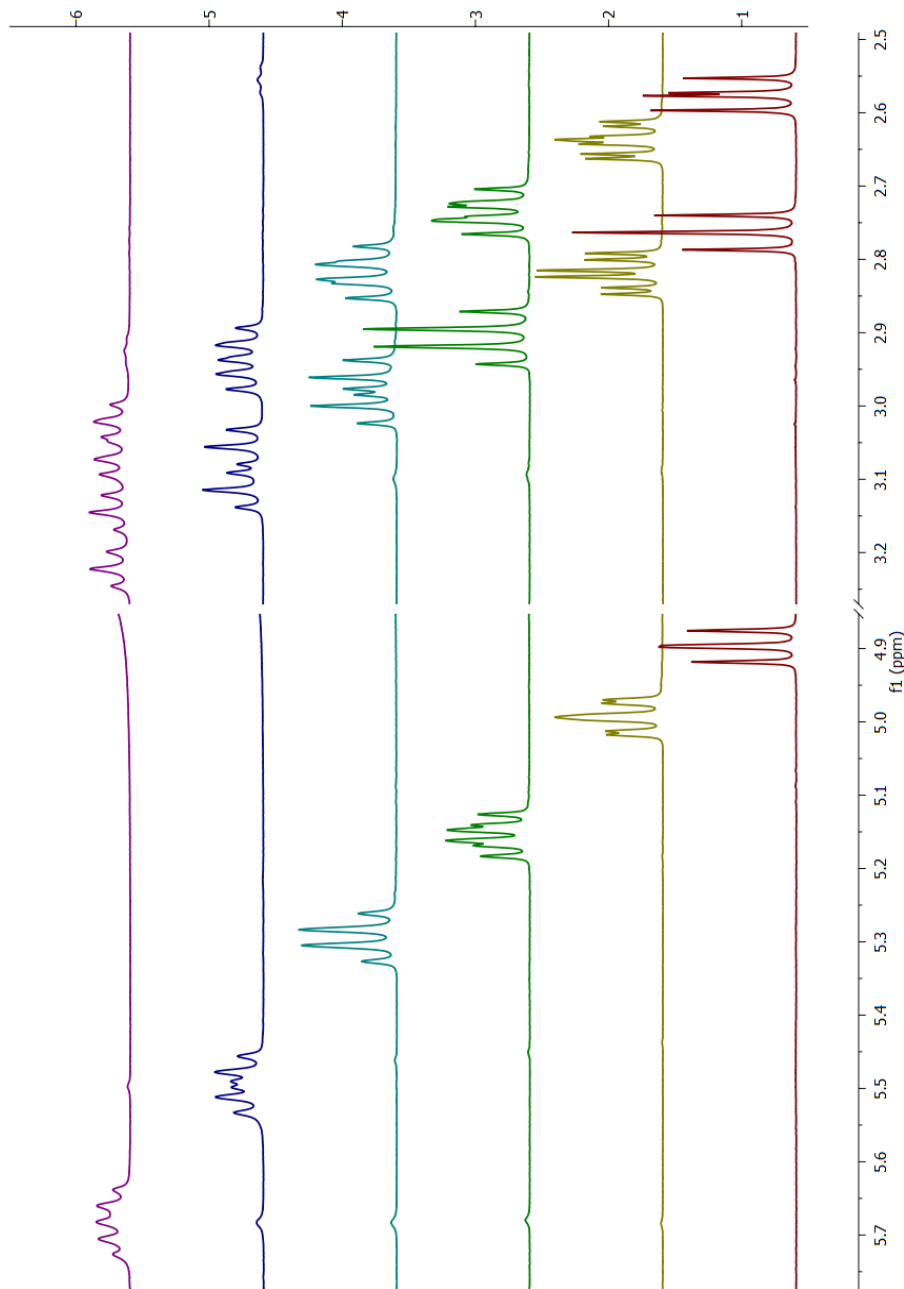
Standardnim spektroskopskim tehnikama, poput GC-MS i osnovnih 1D/2D NMR metoda, nije moguće odrediti apsolutnu konfiguraciju na hiralnom centru niti razlikovati epimere u smeši. Zbog toga je za određivanje enantiomernog sastava (odnosno enantiomernog viška) kod izolovanog barbarina primenjena NMR titracija hiralnim lantanidnim *shift*-reagensom – europijum(III) *tris*[3-(heptafluorpropilhidroksimetilen)-D-kamforatom], Eu(hfc)_3 (Mladenović & Radulović, 2017; Genčić & Radulović, 2015; Radulović et al., 2017; 2018).

Kompleks Eu(hfc)_3 se reverzibilno koordinira sa molekulom barbarina preko heteroatoma, pri čemu bi u prisustvu oba epimera došlo do formiranja dva diastereomerna kompleksa i pojave različitih hemijskih pomeranja signala u NMR spektru. Suprotno tome, ukoliko je prisutan samo jedan epimer, očekuje se jedan set signala, pre i nakon titracije. Pošto je tiokarbonilni fragment jedino izraženije bazno mesto u molekulu, pretpostavlja se da koordinacija Eu(hfc)_3 pretežno uključuje atom sumpora, što rezultuje paramagnetnim pomeranjem protonskih signala.

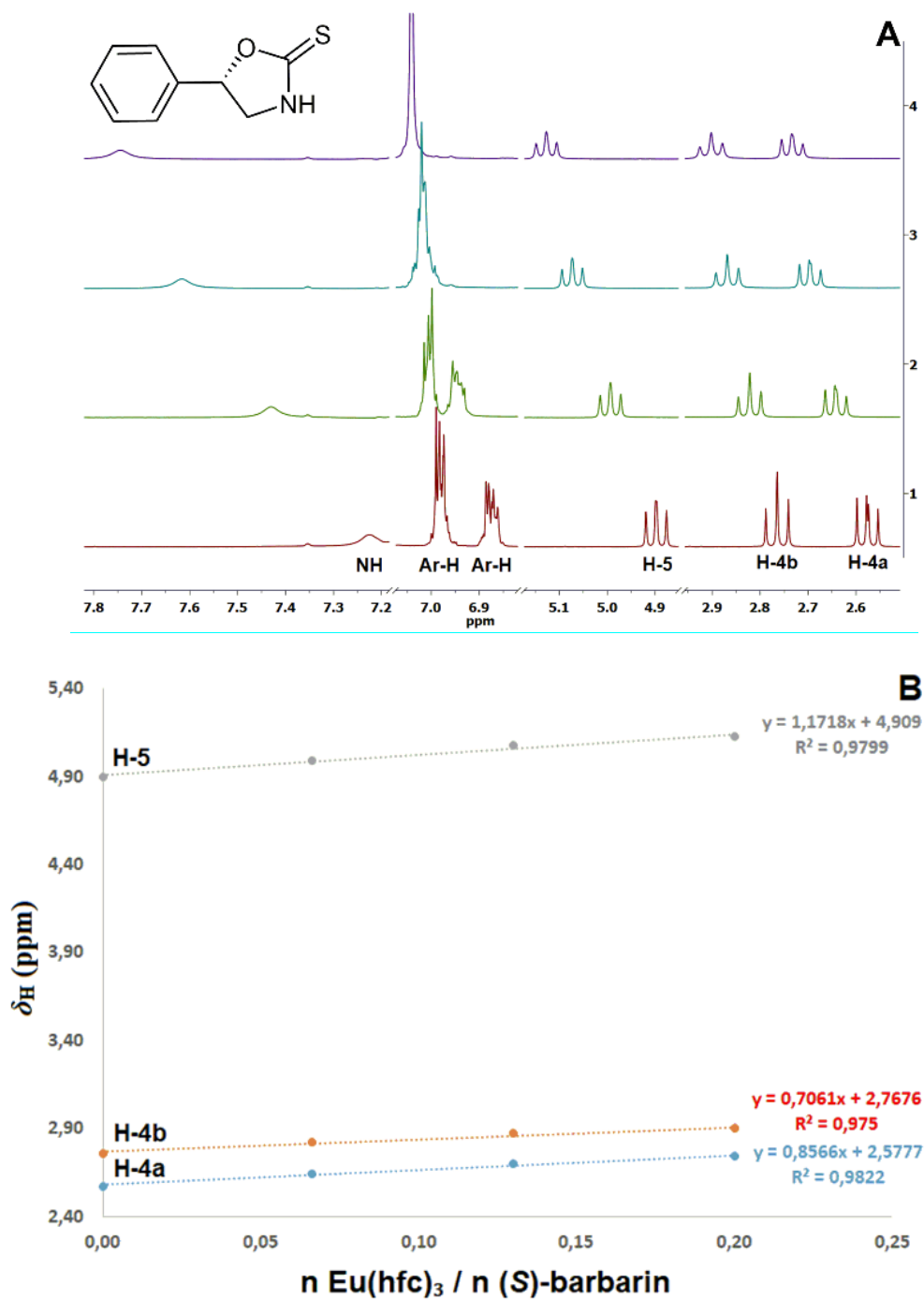
Najpre je sprovedena NMR titracija sintetskog *rac*-barbarina (**18**), a zatim je isti postupak primenjen i na barbarin izolovan iz autolizata *B. vulgaris*. U obzir su uzeti odvojeni ekstrakti nadzemnih (stabljika i listovi) i podzemnih delova (koren), imajući u vidu ranije zabeležene razlike u metabolizmu između organa biljke (Van Leur et al., 2006; Radulović et al., 2014). Tokom titracije *rac*-barbarina zabeleženo je postepeno pomeranje protonskih signala, u skladu sa literaturnim podacima (Radulović et al., 2017; Radulović et al., 2018). Pri molarnom odnosu $\text{Eu(hfc)}_3 : \text{rac-barbarin} = 0,41$, signali protona na C-4 dva enantiomera postali su jasno razdvojeni (Slika 25).

Primena istog postupka na izolovani barbarin pokazala je prisustvo samo jednog seta C-4 signala u oba ispitivana uzorka, što ukazuje da je prirodni barbarin enantiomerno čist. Poređenjem

ΔE_u vrednosti i promene hemijskih pomeranja sa referentnim podacima utvrđeno je da barbarin izolovan iz nadzemnih i podzemnih delova biljke poseduje *S*-apsolutnu konfiguraciju na C-5 hiralnom centru (Slika 26).



Slika 25. A) Hemijska pomeranja signala u ^1H NMR spektru sintetskog *rac*-barbarina prilikom postepenog dodavanja $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ reagensa, snimljeni u C_6D_6 (400 MHz). Molarni odnos $\text{Eu}(\text{hfc})_3/\text{barbarin}$: 0 (1), 0.069 (2), 0.13 (3), 0.21 (4), 0.31 (5) i 0.41 (6) (Gusinac et al., 2025).



Slika 26. A) Hemijska pomeranja signala u ¹H NMR spektru izolovanog barbarina prilikom postepenog dodavanja Eu(hfc)₃ reagensa, snimljeni u C₆D₆ (400 MHz). Molarni odnos Eu(hfc)₃/barbarin: 0 (1), 0,07 (2), 0,13 (3) i 0,20 (4). B) Odnos između δ_H vrednosti (ppm) i molarnog odnosa Eu(hfc)₃/barbarin za protone H-4a, H-4b i H-5 (*S*)-barbarina, sa prikazanim jednačinama odgovarajućih regresionih pravih (Gusinac et al., 2025).

4.1.3. Izomerizacija barbarina u 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on

5-Fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**) nije tipičan produkt razgradnje glukozinolata u biljkama, ali može nastati kao rezultat neenzimske izomerizacije barbarina. Nekoliko ranijih rezultata ukazuju da barbarin ili njegovi derivati mogu podleći naknadnim transformacijama pod kontrolisanim uslovima formirajući tiazolidinonske i oksazolidinonske derivate, najčešće tokom eksperimentalnog rada ili pod neenzimskim uslovima. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost nastanka sekundarnih produkata, odnosno analitičkih artefakata, koji ne predstavljaju native biljne metabolite.

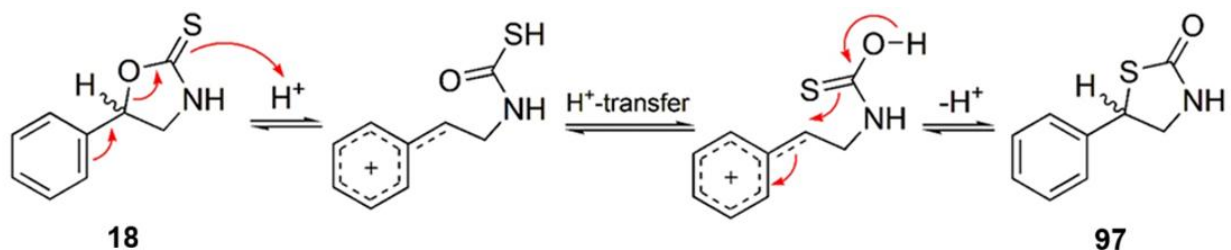
Na primer, Agerbirk i Olsen (2015) pokazali su da se *p*-hidroksi-epiglukobarbarin (**5**), karakterističan za istočni hemotip (P-tip), nakon hidrolize spontano preuređuje u termodinamički stabilniji 1,3-tiohidrooksazolidinski derivat, što ilustruje sklonost ovih jedinjenja ka naknadnim strukturnim transformacijama. Radulović i saradnici (2017; 2018) dodatno su pokazali da 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion (**18**) može preći u odgovarajući 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**), kako u gasnoj fazi tokom GC-MS analize (injektor, kolona i/ili transfer linija), tako i u rastvoru pri povišenoj temperaturi. U ovom slučaju pretpostavljen je slobodnoradikalni mehanizam odigravanja reakcije izomerizacije, za razliku od jonskog mehanizma koji uključuje benzil-katjon opisanog za *p*-hidroksilne derivate od strane Agerbirka i Olsena.

Pedras i saradnici (2015a) detektovali su 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on tek nakon frakcionisanja ekstrakata *B. vulgaris*, dok u sirovom ekstraktu nije bio prisutan, što je ukazalo na mogućnost da se ovo jedinjenje formira tokom obrade uzorka. Autori su tom prilikom spekulirali da bi derivat mogao nastati iz nasturleksina C (**85**); međutim, naši rezultati ne podržavaju takvu pretpostavku. Naprotiv, dobijeni eksperimentalni podaci jasno ukazuju da 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on zapravo nastaje neenzimskom transformacijom barbarina, kao sekundarni produkt odnosno artefakt uslovljen načinom čuvanja uzorka.

Naime, barbarin prisutan u autolizatima – inicijalno detektovan i prikazan u Tabeli 2 – pokazao je potpunu izomerizaciju u odgovarajući 1,3-tiazolidin-2-on pri ponovnoj analizi nakon dugotrajnog skladištenja na 4 °C (polučvrst uzorak, čuvan nekoliko meseci u zatvorenoj vijali, bez prisustva svetlosti i rastvarača). Sličan rezultat zabeležen je i u drugom uzorku autolizata u kojem je barbarin bio dominantna komponenta; u ovom slučaju, čak i kratkotrajno čuvanje na sobnoj temperaturi, tokom svega nekoliko nedelja, dovelo je do potpune transformacije u isti derivat.

Koliko je nama poznato, ovo predstavlja prvi eksperimentalno potvrđeni slučaj potpune izomerizacije barbarina tokom skladištenja uzorka, za razliku od ranije opisanih slučajeva koji su uglavnom povezivani sa procesiranjem ili analitičkom obradom materijala.

Uočena transformacija najverovatnije se odvija jonskim mehanizmom (Slika 27), preko stabilizovanog benzil-katjonskog intermedijera koji nastaje u blago kiseljoj sredini autolizata, što pogoduje rekombinaciji u termodinamički stabilniju tiazolidinonsku formu. Dobijeni rezultati jasno ukazuju na značaj pravilnog rukovanja i skladištenja uzoraka glukozinolata, budući da čak i relativno blagi uslovi (4 °C, bez rastvarača) mogu dovesti do potpunog strukturnog preuređenja barbarina.



Slika 27. Predloženi mehanizam izomerizacije barbarina (5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion, **18**) u 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on (**97**) (Gusinac et al., 2025).

Ovo zapažanje dopunjuje postojeća znanja o degradacionim proizvodima glukozinolata i naglašavaju važnost pažljivog razmatranja neenzimskih transformacija koje mogu nastati tokom skladištenja, rukovanja uzorcima i analitičke obrade.

4.1.4. Hemotipska varijabilnost i glukozinolati izvedeni iz homofenilalanina

Istraživanja fitohemijskog sastava vrste *B. vulgaris* ukazuju na postojanje dva dominantna hemotipa sa jasnom geografskom diferencijacijom. P-tip se pretežno sreće u istočnim populacijama, dok je G-tip karakterističan za centralnoevropsko područje. Osim ovih osnovnih varijanti, pojedine populacije pokazuju neuobičajene glukozinoladne profile, uključujući retke fenetil- i hidroksifenetil-derivate, što ukazuje na izraženu hemijsku raznovrsnost unutar vrste.

Agerbirk i saradnici (2015) su utvrdili da se P- i G-tip pouzdano razlikuju po prisustvu odnosno odsustvu *p*-hidroksi-epiglukobarbarina. Agerbirk i saradnici su utvrdili da se P- i G-tip pouzdano razlikuju po prisustvu odnosno odsustvu *p*-hidroksi-epiglukobarbarina; ovaj derivat je

dosledno detektovan u većini ispitanih populacija P-tipa, dok u G-tipu nije uočen, izuzev jednog uzorka iz Bugarske u kome je identifikovan *p*-hidroksiglukobarbarin (4) (Agerbirk et al., 2015). Fenolni glukozinolati poput *m*-hidroksi-epiglukobarbarina (8) i *p*-hidroksiglukonasturtina (6) povremeno su registrovani kod P-tip jedinki, ali u tragovima i bez jasnog geografskog obrasca. Ipak, u populaciji sa planine Kavkaz detektovane su veće količine *m*-hidroksiglukonasturtina (7), što dodatno potvrđuje lokalnu specifičnost tog područja (Agerbirk et al., 2015).

Sveukupno, autori su zaključili da G-tip dominantno akumulira glukobarbarin (2; 2*S*-epimer), dok su fenolni derivati u ovom tipu uglavnom nedetektibilni. Nasuprot tome, P-tip pretežno sadrži epiglukobarbarin (3; 2*R*-epimer), zajedno sa pripadajućim *para*- i *meta*-hidroksilovanim derivatima (Agerbirk et al., 2015). Dalje, poređenjem glukozinolatnih profila brojnih populacija *B. vulgaris*, Agerbirk i saradnici (2015) identifikovali su i geografski strukturisan polimorfizam. Dva posebno značajna izuzetka su:

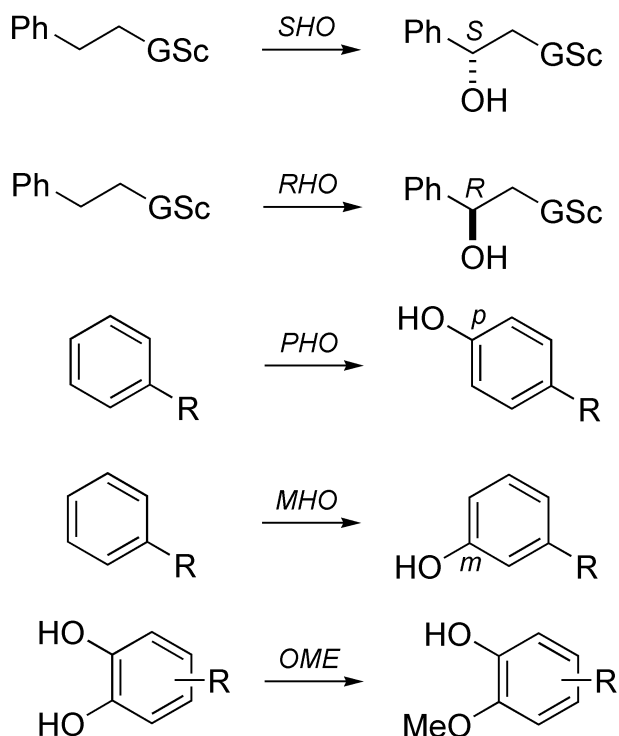
1. Slovenačka populacija (G-tip) sa visokom učestalošću alternativne biosintetske varijante glukobarbarina, označene kao „NAS forma”, koja se javlja zajedno sa standardnim G-tip profilom;
2. Kavkaska populacija sa izrazito divergentnim GSL sastavom, uključujući *p*- i *m*-hidroksifenetil glukozinolate, kao i delimično okarakterisan *m,p*-disupstituisani hidroksimetoksi fenetil-GSL, jedinjenja koja su bila odsutna ili prisutna u zanemarljivim količinama u drugim populacijama.

Kavkaz je poznat po visokom intraspecijskom diverzitetu, verovatno usled uloge glacijalnog refugijuma i biogeografske zone konvergencije. Autori su stoga oprezno spekulisali da neuobičajeni kavkaski hemotip može nastati: (i) hibridizacijom P- i G-tipova, (ii) uticajem do sada neidentifikovanih južnih/evroazijskih linija ili (iii) očuvanjem starog genetskog bazena iz koga su se razvile moderne P-populacije.

S obzirom na to da je Kavkaz region sa značajnom intraspecijskom biodiverzitetom – verovatno zbog svoje istorije kao glacijalnog utočišta i biogeografske zone konvergencije – autori su pažljivo spekulisali o poreklu i implikacijama biohemijski odstupajućeg tipa uočenog tamo. Predložili su nekoliko mogućnosti: profil je mogao nastati kroz hibridizaciju između P- i G-tipova; mogao bi uključivati hipotetičke hemotipove iz južnih ili istočnih regiona; ili bi mogao

predstavljati prastar genetski fond od kojeg su izvedeni severoistočni P-tipovi (Agerbirk et al., 2015).

Širok dijapazon glukozinolatnih profila u *B. vulgaris* može se u velikoj meri objasniti aktivnošću nekoliko ključnih gena odgovornih za hidroksilaciju i metoksilaciju homofenilalaninskih GSL, što je ilustrovano na Slici 28. U predloženom modelu, geni *RHO* i *SHO* utiču na formiranje *R*- i *S*-epimera, dok *PHO* verovatno omogućava *para*-hidroksilaciju, a *MHO* se razmatra kao mogući regulator *meta*-hidroksilacije. Tako, kod P-tipa dominira ekspresija *RHO* alela, dok je kod G-tipa zastupljeniji *SHO*, sa razlikom zavisno o biljnom organu. NAS-varijanta se tumači slabom ekspresijom oba gena, dok kombinacija srednje aktivnosti *RHO/SHO* uz snažnu aktivnost *PHO/OME* gena objašnjava jedinstvenu kavkasku hemotipsku sliku (Agerbirk et al., 2015; Byrne et al., 2017).



Slika 28. Hipotetički biosintetski putevi kojim se može objasniti uočenu raznovrsnost glukozinolata kod *B. vulgaris* (Agerbirk et al., 2015).

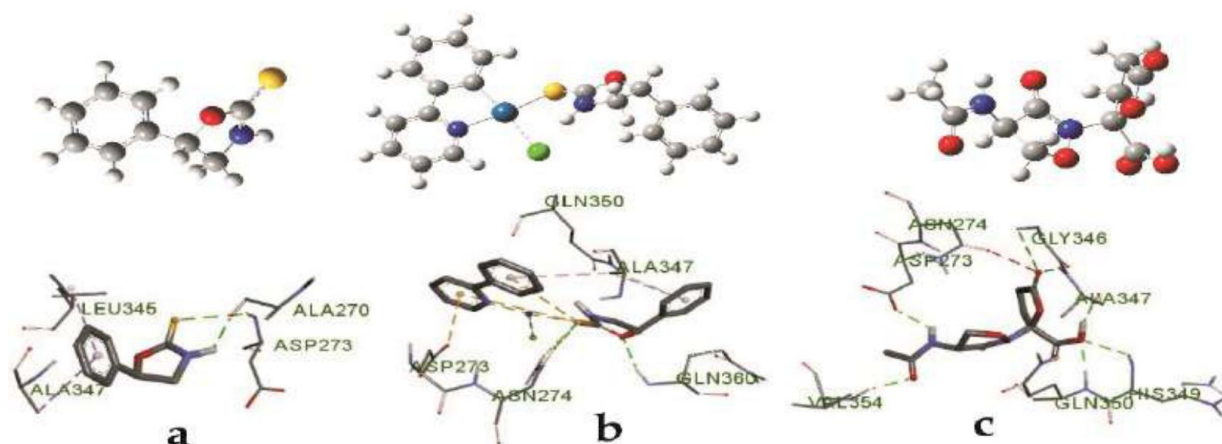
Naši podaci uklapaju se u ovaj koncept. Uzorak iz Srbije, analiziran na osnovu degradacionih proizvoda GSL, pokazao je tipičan P-tip profil, što je potvrđeno detekcijom (*S*)-barbarina. Dodatni nalaz *p*-hidroksifenetil-izotiocijanata (**98**) sugerise visoku ekspresiju *RHO*,

prethodno nepovezane sa G-morfologijom. Međutim, na osnovu morfoloških osobina, biljka pokazuje osobine G-tipa (slabije olistanje trihoma na lisnoj rozeti). Ovakva neskladnost može sugerisati hibridizaciju između P- i G-tipa ili postojanje još uvek neokarakterisanog južnog genotipa. Iako zaključak na osnovu jednog uzorka ostaje preliminaran, naši nalazi naglašavaju potrebu za sveobuhvatnim ispitivanjem GSL profila u balkanskim populacijama *B. vulgaris*, uključujući LC-MS analizu intaktnih GSL, genotipizaciju markera RHO/SHO/PHO i morfološka merenja trihoma. Takva istraživanja mogu pružiti važne uvide u moguće hibridizacije između P- i G-tipova, ili otkriti postojanje hipotetičkog južnog genotipa *B. vulgaris*.

4.1.5. *In silico* ispitivanje inhibitornog potencijala (*R*)-barbarina i njegovog platina(II) kompleksa prema PBP1a proteinu

Cilj ovog dela rada bio je da se *in silico* proceni potencijal (*R*)-barbarina (**18**), dominantnog metabolita u G-tipu *B. vulgaris*, kao i njegovog Pt(II)-kompleksa sa 2-fenilpiridinom i barbarinom, u inhibiciji penicilin-vezujućeg proteina PBP1a, ključnog enzima u biosintezi peptidoglikana kod *Streptococcus pneumoniae*. Primena molekulskog modelovanja – optimizacija geometrije (DFT) i doking simulacije – pokazala je da oba liganda formiraju stabilne komplekse sa PBP1a, pri čemu je Pt(II)-kompleks (**b**) pokazao najnižu energiju vezivanja i najmanju vrednost inhibicione konstante (K_i), što ukazuje na najjači afinitet prema enzimu i najviši inhibitorni potencijal u odnosu na ispitane strukture. (*R*)-Barbarin (**a**) pokazao je inhibicioni učinak sličan referentnom antibiotiku laktavacinu (**c**), dok je kompleks (**b**) bio značajno potentniji. Kao referentno jedinjenje za poređenje korišćen je laktavacin, čiji se antibakterijski efekat zasniva na inhibiciji PBP1a proteina (Nozaki et al., 1989; Jeremić et al., 2023).

Rezultati prikazani u Tabeli 10 jasno potvrđuju razlike u afinitetu liganada prema PBP1a. Najpovoljniju energiju vezivanja i najnižu K_i vrednost pokazao je kompleks **b**, što ukazuje na najjaču inhibiciju. Nasuprot tome, ligandi **a** i **c** pokazuju slabije vezivanje, što je u skladu sa višim K_i vrednostima. Prisustvo metalnog centra u kompleksu (**b**) očigledno doprinosi jačoj stabilizaciji liganda u aktivnom mestu enzima i povećanoj inhibitornoj aktivnosti.



Slika 29. Optimizovane strukture (gore) i doking položaji sa najnižom energijom vezivanja (dole) za barbarin (**a**), Pt(II)-kompleks sa 2-fenilpiridinom i barbarinom (**b**) i laktavacin (**c**) (Jeremić et al., 2023).

Tabela 3. Energetski parametri dokinga i inhibicione konstante (K_i) ispitivanih liganada (Jeremić et al., 2023). Oznake **a**, **b** i **c** odgovaraju strukturama prikazanim na Slici 29. K_i vrednosti prikazane su u μM , energije u kcal/mol.

Ligand	$\Delta G_{\text{(energija vezivanja)}}$	K_i	$\Delta G_{\text{(intemol. energija)}}$	$\Delta G_{\text{(vdw+hbond+desolv)}}$
a	-5,48	95,93	-5,78	-5,77
b	-9,07	0,226	-9,96	-9,97
c	-5,76	59,75	-6,96	-6,90

Ovi nalazi ukazuju da barbarin i posebno ispitani Pt(II)-kompleks predstavljaju perspektivne molekule za dalje ispitivanje inhibitornog delovanja na PBP1a. Ipak, neophodno je sprovesti dodatna *in vitro* i *in vivo* testiranja kako bi se potvrdila aktivnost, selektivnost i stabilnost ovih jedinjenja.

4.2. ANTIMIKROBNA, ANTIOKSIDATIVNA I ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST SINTETISANIH I IZOLOVANIH JEDINJENJA

4.2.1. Antimikrobna i antibiofilm aktivnost

Antimikrobna aktivnost i antibiofilm svojstva jedinjenja dobijenih iz glukozinolata imaju značajnu ekološku i farmakološku ulogu. Usled porasta rezistencije na antibiotike, ispitivanje odabranih jedinjenja na humanim patogenima može doprineti razvoju potencijalnih antimikrobnih strategija, dok ista jedinjenja u biljkama imaju važnu odbrambenu funkciju protiv patogena. Prema dostupnim literaturnim podacima, prethodna istraživanja ukazala su na to da određeni izotiocijanati i fitoaleksini poseduju izraženu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, često praćenu sposobnošću inhibicije formiranja biofilma (Melander et al., 2020; Liu et al., 2023).

Antibiofilm aktivnost predstavlja naročito značajnu osobinu ovih jedinjenja. Biofilmovi su poznati po visokoj otpornosti na uklanjanje i često su uzrok hronično prisutnih infekcija. Procena aktivnosti jedinjenja na humane patogene, saprofite omogućava dvostruku perspektivu – sa jedne strane ističe farmakološki potencijal, dok sa druge naglašava njihovu ekološku funkciju u biljci.

U okviru ove doktorske disertacije cilj je bio proširiti postojeća, relativno oskudna saznanja o biološkoj aktivnosti sekundarnih metabolita vrste *B. vulgaris*, uprkos njenoj širokoj rasprostranjenosti. Ovo istraživanje predstavlja prvi detaljan prikaz antimikrobne aktivnosti ovih metabolita sproveden na teritoriji Srbije. Testiranja antibiofilm i antimikrobne aktivnosti izvedena su *in vitro*, i to ne samo prema fitopatogenima, već i prema klinički relevantnim humanim patogenima. Time se dodatno naglašava potencijal ovih bioaktivnih molekula ne samo u poljoprivrednoj, već i u medicinskoj i biotehnološkoj primeni.

Antimikrobna aktivnost

Minimalna inhibiciona koncentracija (MIC) i odgovarajuća minimalna mikrobicidna koncentracija (MMC), uključujući minimalnu baktericidnu (MBC) ili minimalnu fungicidnu koncentraciju (MFC), korišćene su za *in vitro* procenu antibakterijske i antifungalne aktivnosti izolovanih i sintetisanih jedinjenja. Antimikrobna aktivnost prema odabranim humanim patogenima, saprofitima i fitopatogenima prikazana je u Tabeli 4, dok su aktivnosti referentnih antibiotika i antifungalnih agenasa prikazane u Tabeli 5. Testirane koncentracije kretale su se u

opsegu od 5 mg/mL do 0,039 mg/mL. Intenzitet antimikrobne aktivnosti varirao je u zavisnosti od strukture jedinjenja i vrste mikroorganizma.

Među analiziranim jedinjenjima, **96** i **98** su ispoljila najizraženiju antibakterijsku aktivnost. MIC vrednosti za jedinjenje **98** kod pojedinih sojeva iznosile su <0,039 mg/mL, dok su za jedinjenje **96** bile u rasponu od 0,078 do 0,625 mg/mL. U grupi Gram-pozitivnih bakterija, jedinjenje **98** je pokazalo značajnu aktivnost na rast *B. animalis* subsp. *lactis* (MIC <0,039 mg/mL) i *S. aureus* (MIC 0,078 mg/mL). Među Gram-negativnim vrstama, zabeležena je visoka aktivnost na rast vrsta *E. coli* (MIC <0,039 mg/mL), *E. coli* ATCC 25922 (MIC 0,078 mg/mL) i *P. mirabilis* (MIC 0,156 mg/mL) (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Jedinjenje **96** je takođe ispoljilo širok spektar antimikrobne aktivnosti, sa izraženom efikasnošću prema Gram-negativnim vrstama poput *P. mirabilis* (MIC 0,156 mg/mL), *E. coli* i *E. coli* ATCC 25922 (MIC i MBC obe 0,312 mg/mL). Uočena je nešto jača aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, naročito *B. subtilis* ATCC 6633 i *B. animalis* subsp. *lactis* (MIC 0,078 mg/mL) (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Jedinjenje **17** je pokazalo značajnu antibakterijsku aktivnost, sa MIC vrednostima u opsegu 0,156–2,5 mg/mL. Najniža MIC vrednost je zabeležena u odnosu na rast *S. aureus* (0,156 mg/mL), dok su *S. aureus* ATCC 25923, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. pumilus* NCTC 8241 i *E. coli* ATCC 25922 pokazali MIC vrednost od 0,625 mg/mL (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Jedinjenje **20** je ispoljilo umerenu antimikrobnu aktivnost (MIC 1,25–5 mg/mL). Najveća efikasnost primećena je prema Gram-negativnim vrstama (*E. coli*, *E. coli* ATCC 25922 i *S. enterica*, MIC 1,25 mg/mL), dok je umerena aktivnost zabeležena protiv Gram-pozitivnih bakterija, kao što su *S. aureus* i *B. animalis* subsp. *lactis* (MIC 2,5 mg/mL).

Rac-barbarin (**18**) je takođe pokazao umerenu antibakterijsku aktivnost (MIC 1,25–5 mg/mL), pri čemu je najefikasniji bio protiv *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923, *B. animalis* subsp. *lactis* i *B. pumilus* NCTC 8241 (MIC 1,25 mg/mL). Jedinjenje **87** pokazalo je sličnu aktivnost (MIC 1,25–5 mg/mL), gde su *B. pumilus* NCTC 8241, *B. animalis* subsp. *lactis* i *E. coli* ATCC 25922 pokazali kao najosetljiviji sojevi (MIC 1,25 mg/mL). (*S*)-Barbarin (**18b**) je ispoljio selektivnu i specifičnu antibakterijsku aktivnost prema određenim vrstama. Nasuprot tome, sve testirane bakterijske vrste bile su rezistentne na jedinjenje **97**, koje nije pokazalo uočljivu antibakterijsku aktivnost u ispitivanom koncentracionom opsegu (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Tabela 4. Antimikrobna aktivnost izolovanih i sintetisanih jedinjenja (Mavrić-Scholze et al., 2025).¹

Vrste/jedinjenja	87		96		17		18		18b		97		20		98	
	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	2,5	>5	0,078	1,25	2,5	5	2,5	5	>5	>5	>5	>5	5	5	0,312	>5
<i>B. cereus</i>	5	5	0,156	0,625	2,5	2,5	5	5	>5	>5	>5	>5	5	5	0,156	1,25
<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	1,25	2,5	0,156	0,156	0,625	0,625	1,25	2,5	2,5	5	>5	>5	5	5	0,156	0,156
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	1,25	2,5	0,078	0,625	0,625	2,5	1,25	5	1,25	5	>5	>5	2,5	5	<0,039	0,625
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5	5	0,156	0,156	0,625	0,625	1,25	2,5	5	>5	>5	>5	5	5	0,156	0,625
<i>S. aureus</i>	5	5	0,312	0,312	0,156	0,312	1,25	1,25	>5	>5	>5	>5	2,5	5	0,078	0,312
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,25	1,25	0,312	0,312	0,625	1,25	2,5	5	5	5	>5	>5	1,25	2,5	0,078	0,312
<i>E. coli</i>	2,5	5	0,312	0,312	1,25	5	2,5	5	5	5	>5	>5	1,25	2,5	<0,039	0,625
<i>P. mirabilis</i>	5	5	0,156	0,312	2,5	2,5	2,5	5	5	5	>5	>5	2,5	2,5	0,156	0,625
<i>S. enterica</i>	5	5	0,625	1,25	2,5	2,5	2,5	5	5	>5	>5	>5	1,25	2,5	0,312	1,25
<i>K. pneumoniae</i>	5	5	0,625	0,625	2,5	2,5	2,5	5	5	5	>5	>5	2,5	2,5	0,312	0,625
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	>5	2,5	>5	0,312	1,25	5	5	5	>5	>5	>5	2,5	5	2,5	2,5
<i>T. viride</i> ATCC 13233	0,625	1,25	0,156	0,312	2,5	5	2,5	2,5	5	5	>5	>5	1,25	2,5	<0,039	<0,039
<i>A. flavus</i> ATCC 9170	1,25	2,5	0,312	0,625	5	5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	2,5	2,5	<0,039	<0,039
<i>F. solani</i> ATCC 11712	1,25	1,25	0,156	0,234	0,625	0,625	2,5	3,75	5	>5	>5	>5	2,5	2,5	<0,039	<0,039

¹Podaci su dati u mg/mL; MIC – minimalna inhibiciona koncentracija; MMC – minimalna mikrobicidna koncentracija (uključuje MBC ili MFC); „>5“ označava odsustvo aktivnosti pri najvišoj testiranoj koncentraciji (5 mg/mL).

Tabela 5. Antimikrobna aktivnost antibiotika/antimikotika (Mavrić-Scholze et al., 2025).¹

Vrste/antibiotici/ antimikotici	Doksiciklin		Ampicilin		Ketokonazol		Amfotericin B	
	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1,953	31,25	3	4	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	0,977	7,81	4	6	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	-	-	8	12	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	4	8	<0,06	0,12	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,224	3,75	0,25	0,75	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	0,45	7,81	<0,06	<0,06	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15,63	31,25	0,37	0,5	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	15,63	62,5	1,2	2,1	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	15,63	62,5	>128	>128	-	-	-	-
<i>S. enterica</i>	15,63	31,25	1	1	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	2	32	>128	>128	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	1,96	1,96	<0,098	<0,098
<i>T. viride</i> ATCC 13233	-	-	-	-	62,5	125	0,78	1,56
<i>A. flavus</i> ATCC 9170	-	-	-	-	<0,49	1,96	0,39	0,78
<i>F. solani</i> ATCC 11712	-	-	-	-	0,08	0,156	-	-

¹Podaci su dati u µg/mL; MIC – minimalna inhibiciona koncentracija; MMC – minimalna mikrobicidna koncentracija (uključuje MBC ili MFC); „-“ – nije testirano.

Testirane vrste gljiva pokazale su najveću osetljivost na izotiocijanat **98** i jedinjenje **96**, sa MIC vrednostima u opsegu 0,039–2,5 mg/mL, a kod pojedinih sojeva ispod tog opsega za izotiocijanat **98**, odnosno 0,156–2,5 mg/mL za jedinjenje **96**. Među ispitivanim gljivama, *T. viride* ATCC 13233, *A. flavus* ATCC 9170 i *F. solani* ATCC 11712 bile su najosetljivije na **98**, sa MIC i MFC vrednostima <0,039 mg/mL. Jedinjenje **17** pokazalo je najizraženiju antifungalnu aktivnost prema *C. albicans* ATCC 10231 (MIC 0,312 mg/mL), dok je jedinjenje **87** ispoljilo umerenu aktivnost (MIC 1,25 mg/mL). Ostala testirana jedinjenja delovala su slabije, u zavisnosti od vrste gljive i stepena selektivnosti. Svi ispitivani gljivični sojevi bili su rezistentni na jedinjenje **97**, koje nije pokazalo uočljivu antifungalnu aktivnost u ispitivanom koncentracionom rasponu (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Degradacioni proizvodi glukozinolata pokazali su varijabilan antimikrobni efekat prema bakterijskim i gljivičnim sojevima, uz jasne razlike u delovanju na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Izotiocijanat **98**, u skladu sa širokospektralnim profilom aktivnosti, svrstava se među najefikasnija jedinjenja, verovatno zahvaljujući elektrofilnosti –N=C=S grupe i njenoj reaktivnosti prema tiolnim i aminokiselinским ostacima u proteinima mikroorganizama. Jedinjenja koja sadrže fenolne grupe (**96** i **98**) takođe su pokazala izraženu antimikrobnu aktivnost, što ukazuje na to da prisustvo hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu doprinosi jačim interakcijama sa mikrobnim strukturama. Nasturleksin A (**87**) i heterociklični derivati, poput barbarina (**18**, **18b**) i njegovog oksazolidinon analoga (**20**), ispoljili su antimikrobni potencijal užeg spektra delovanja.

Biljna vrsta *B. vulgaris* prirodno sintetiše fitoaleksine sa fenilnom grupom, među kojima se ističu nasturleksin C (**85**) i D (**86**) i njihovi sulfoksidni derivati (**88** i **89**) (Pedras et al., 2015a). Ovi metaboliti pokazuju aktivnost protiv specifičnih patogena krstašica, verovatno funkcionišući kao deo odbrambenog mehanizma biljke (Pedras et al., 2015a; Pedras et al., 2015b; Cárdenas et al., 2023). Dobijeni rezultati dodatno ukazuju na to da *B. vulgaris* proizvodi strukturno raznovrsne sekundarne metabolite koji zajedničkim, potencijalno sinergističkim delovanjem doprinose adaptivnom odgovoru biljke na spoljašnje stresore.

Prema rezultatima ispitivanja, jedinjenja sa *para*-hidroksilnom grupom na benzenovom prstenu (**96** i **98**) pokazala su najviši stepen aktivnosti. Pretpostavlja se da prisustvo hidroksilnih grupa pospešuje formiranje vodoničnih veza i povećava polarizovanost molekula, što poboljšava

interakcije sa mikroorganizmima. Ovakva zapažanja ukazuju na jasnu povezanost strukture i biološke aktivnosti (SAR). Dodatno, aktivnost izotiocijanata, konkretno jedinjenja **98**, može se povezati i sa elektrofilnošću $-N=C=S$ grupe, koja lako reaguje sa tiolnim i aminokiselinskim ostacima proteina mikroorganizama (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Inhibicija formiranja biofilma

Formiranje biofilma predstavlja važan faktor virulentnosti kod klinički i ekološki značajnih bakterija, jer omogućava povećanu otpornost na antimikrobne agense i doprinosi opstanku mikroorganizama unutar domaćina, ali i u spoljašnjoj sredini (Sharma et al., 2023). U ovom delu istraživanja, testirana je antibiofilm aktivnost izolovanih i sintetisanih metabolita biljne vrste *B. vulgaris*. Dobijeni rezultati pružaju novu perspektivu u razumevanju biološke aktivnosti sekundarnih metabolita ove vrste i ukazuju na njihov potencijal u kontroli mikroorganizama povezanih sa biofilmom.

Posebno se istakla antibiofilm aktivnost pojedinih jedinjenja. S obzirom na to da su biofilmovi poznati po izraženoj rezistenciji, te da doprinose razvoju hroničnih infekcija kako u kliničkom kontekstu tako i u poljoprivredi, sposobnost metabolita *B. vulgaris* da inhibiraju formiranje biofilma predstavlja značajan dodatak njihovom spektru bioloških efekata. Ovo svojstvo ih izdvaja od mnogih konvencionalnih antimikrobnih agenasa, koji često ne uspevaju da efikasno deluju na biofilmom zaštićene patogene. Procena aktivnosti prema humanim patogenima omogućila je potpunije razumevanje njihovog delovanja, pri čemu visoka aktivnost prema ovim mikroorganizmima ukazuje na značajan farmakološki i translacioni potencijal.

Formiranje biofilma kvantifikovano je bojenjem kristal-violetom i merenjem apsorbancije. Među ispitivanim sojevima, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. mirabilis*, *S. enterica* i *K. pneumoniae* pokazali su najveći kapacitet formiranja biofilma, sa vrednostima apsorbancije od 1,33; 0,77; 1,02; 1,19 i 1,61, redom.

Među testiranim jedinjenjima, **96** i **98** pokazala su najizraženiju antibiofilm aktivnost, kako prema Gram-pozitivnim, tako i prema Gram-negativnim vrstama, što se ogleda u niskim vrednostima BIC₅₀ i BIC₉₀ (Tabela 6). Najsnažniju aktivnost na sposobnost formiranja biofilma ispoljilo je jedinjenje **96**, sa BIC₅₀ vrednostima od 220 µg/mL prema *S. aureus* ATCC 25923, 290 µg/mL prema *B. subtilis* ATCC 6633 i 580 µg/mL prema *K. pneumoniae*. Iako su BIC₉₀ vrednosti

bile relativno visoke, jedinjenje **96** je i dalje pokazalo merljivu antibiofilm aktivnost za više testiranih sojeva (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Jedinjenje **98** takođe je ispoljilo značajnu aktivnost na sposobnost formiranja biofilma, naročito prema *K. pneumoniae* (BIC₅₀ 570 µg/mL; BIC₉₀ 2000 µg/mL) i *S. aureus* ATCC 25923 (BIC₅₀ 868 µg/mL), dok je znatno slabija aktivnost primećena protiv *S. enterica* (bez BIC₉₀ vrednosti ispod 5000 µg/mL). Ovakvi rezultati ukazuju na selektivniji antibiofilm efekat jedinjenja **98** u poređenju sa jedinjenjem **96**, čija aktivnost pokazuje izraženiji vrsta-specifičan odgovor.

Rac-barbarin (**18**) ispoljio je umerenu antibiofilm aktivnost na sposobnost formiranja biofilma, naročito prema *S. enterica* (BIC₅₀ 1000 µg/mL), ali bez značajnijih efekata na višim koncentracijama, budući da su BIC₉₀ vrednosti za većinu sojeva prelazile 5000 µg/mL. Slično tome, jedinjenje **17** pokazalo je određeni inhibicioni efekat, posebno prema *B. subtilis* ATCC 6633 i *K. pneumoniae* (BIC₅₀ 1190 i 1262 µg/mL), iako su i ovde BIC₉₀ vrednosti bile visoke. Nasuprot njima, jedinjenje **20** pokazalo je najslabiju aktivnost, sa BIC₅₀ vrednostima >5000 µg/mL za većinu testiranih vrsta, uz tek umerenu inhibiciju formiranja biofilma *S. enterica* (BIC₅₀ 1254 µg/mL) i *P. mirabilis* (BIC₅₀ 3100 µg/mL). Izostanak značajnih BIC₉₀ vrednosti potvrđuje redukovan antibiofilm potencijal ovog jedinjenja (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Rezultati antibiofilm testa dodatno potvrđuju značaj odnosa struktura–aktivnost (SAR). Fenolni derivati (**96** i **98**) dosledno su pokazivali najizraženiju aktivnost, dok su heterociklični derivati (**18** i **20**) ispoljili selektivnu i slabiju inhibiciju biofilma. Ove razlike upućuju na to da je prisustvo fenolne grupe ključno za efikasno antibiofilm delovanje i može predstavljati osnovu za dalje modifikacije strukture u cilju povećanja bioaktivnosti (Mavrić-Scholze et al., 2025).

4.2.2. Antioksidativna aktivnost protiv DPPH i ABTS radikala

Antioksidativno dejstvo je jedno od karakterističnih svojstava brojnih biljnih sekundarnih metabolita. Oksidativni stres se dovodi u vezu sa razvojem velikog broja hroničnih oboljenja kod ljudi, pa se sposobnost jedinjenja da neutrališu slobodne radikale često koristi kao indikator njihovog terapijskog potencijala. Iz tog razloga, testovi uklanjanja radikala predstavljaju standardnu početnu procenu bioaktivnosti sekundarnih metabolita. Iako izotiocijanati ne pripadaju tipičnim antioksidansima, fenolni i njima srodni derivati mogu ispoljiti određenu antioksidativnu aktivnost upravo zahvaljujući prisustvu fenolne funkcionalne grupe. Primena DPPH i ABTS

metoda, koje su među najčešće korišćenim u ovoj oblasti, omogućava uporediv uvid u potencijal neutralisanja radikala jedinjenja nastalih degradacijom glukozinolata.

U okviru ovog istraživanja, antioksidativni potencijal izolovanih i sintetisanih jedinjenja procenjen je kombinacijom dva komplementarna testa – DPPH i ABTS. Eksperimenti su izvedeni pri koncentracijama od 25, 50 i 100 μM , dok je za DPPH određivana i vremenska zavisnost reakcije (20 i 60 min inkubacije). Rezultati prikazani u Tabelama 7 i 8 pokazuju da ispitivana jedinjenja, čak i na najvišim testiranim koncentracijama, nisu pokazala uočljivo dejstvo na neutralisanje DPPH niti ABTS radikala. Dobijeni nalazi sugerišu da antioksidativni kapacitet ovih molekula nije izražen i da njihove biološke aktivnosti, potvrđene u antimikrobnim i antibiofilm testovima, verovatno potiču iz mehanizama nezavisnih od direktnog uklanjanja slobodnih radikala – pre svega iz interakcija sa mikrobnim strukturama ili modulacije enzimskih sistema (Mavrić-Scholze et al., 2025).

4.2.3. *In vitro* test inhibicije LOX i COX-2 enzima

Antiinflamatorni potencijal sekundarnih metabolita predstavlja jedno od najvažnijih funkcionalnih polja njihovog ispitivanja. Enzimi ciklooksigenaza-2 (COX-2) i lipooksigenaza (LOX) zauzimaju centralno mesto u metabolizmu arahidonske kiseline, pri čemu LOX posreduje u nastanku leukotriena, a COX-2 u sintezi prostaglandina. Zbog toga se ovi enzimi smatraju ključnim regulatorima inflamatornih procesa i istaknutim farmakološkim metama. Brojni izotiocijanati dobijeni degradacijom glukozinolata, kao što su sulforafan i fenetil-izotiocijanat (**16**), već su opisani kao prirodni antiinflamatorni agensi (Connolly et al., 2021; Hoch et al., 2024). Međutim, biopotencijal specifičnih metabolita vrste *B. vulgaris* još uvek nije detaljno istražen, pa se ovom studijom nastojalo dopuniti praznina između hemijske karakterizacije i biološke verifikacije.

U cilju procene njihovog antiinflamatornog svojstva, sprovedeni su testovi inhibicije LOX i COX-2 enzima. Treba naglasiti da su ovi enzimi povezani ne samo sa inflamatornim procesima, već se dovode i u vezu sa razvojem kardiovaskularnih oboljenja i pojedinih maligniteta. Iako su efikasni sintetski inhibitori COX-2 i LOX zastupljeni u savremenoj terapiji, molekuli iz prirodnih izvora ostaju atraktivni zbog strukturne raznolikosti i generalno povoljnijeg bezbednosnog profila.

Tabela 6. Antibiofilm aktivnost odabranih izolovanih i sintetisanih jedinjenja (Mavrić-Scholze et al., 2025).¹

Vrste/jedinjenja	96		17		18		20		98		Tetraciklin	
	BIC ₅₀	BIC ₉₀	BIC ₅₀	BIC ₉₀	BIC ₅₀	BIC ₉₀	BIC ₅₀	BIC ₉₀	BIC ₅₀	BIC ₉₀	BIC ₅₀	BIC ₉₀
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	290	1250	1190	2500	2700	>5000	>5000	>5000	1100	2300	<15.6	15.6
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	220	2120	2500	>5000	1500	>5000	>5000	>5000	868	1360	250	300
<i>P. mirabilis</i>	1158	4500	3420	>5000	3170	>5000	3100	4754	1428	2400	320	>1000
<i>S. enterica</i>	1100	3200	2400	>5000	1000	4470	1254	>5000	1547	>5000	<15.6	180
<i>K. pneumoniae</i>	580	3600	1262	>5000	3978	>5000	4400	>5000	570	2000	6	125

¹Podaci su dati u µg/mL; BIC₅₀ – koncentracija potrebna za inhibiciju biofilma za 50%; BIC₉₀ – koncentracija potrebna za inhibiciju biofilma za 90%; Oznaka „>5000“ ukazuje na odsustvo aktivnosti pri najvišoj testiranoj koncentraciji (5000 µg/mL).

Tabela 7. Rezultati DPPH testa za izolovana i sintetisana jedinjenja i odgovarajuće referentno jedinjenje (kvercetin) (Mavrić-Scholze et al., 2025).¹

Jedinjenje	Sposobnost uklanjanja (neutralisanja) DPPH radikala (%) ¹					
	25 µM		50 µM		100 µM	
	20 min	60 min	20 min	60 min	20 min	60 min
87	1.6 ± 1.2	1.8 ± 1.5	2.5 ± 1.1	2.4 ± 1.4	2.6 ± 1.2	2.9 ± 1.7
96	11.9 ± 0.7	12.0 ± 0.4	15.6 ± 0.3	15.7 ± 1.4	24.9 ± 1.1	25.2 ± 1.6
17	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.5	1.9 ± 0.8	2.1 ± 1.1	7.8 ± 1.8	7.9 ± 1.7
18	1.2 ± 0.7	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.8	2.0 ± 0.9	3.8 ± 1.2	3.5 ± 1.7
18b	7.0 ± 0.9	8.4 ± 0.5	14.8 ± 0.7	16.4 ± 0.4	21.6 ± 1.2	22.4 ± 0.7
97	3.1 ± 0.6	3.0 ± 0.7	4.2 ± 0.8	4.6 ± 0.6	5.9 ± 0.9	5.8 ± 1.4
20	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.7	1.5 ± 0.9	1.5 ± 0.8	2.6 ± 1.0	2.7 ± 1.5
98	4.4 ± 1.0	4.7 ± 1.2	7.3 ± 1.3	8.1 ± 1.3	13.1 ± 0.7	14.2 ± 0.9
Kvercetin	95.3 ± 0.8	95.1 ± 0.9	96.8 ± 1.0	96.5 ± 0.9	95.1 ± 0.9	95.4 ± 0.8

¹Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (SD) iz tri nezavisna merenja.

Tabela 8. Rezultati uklanjanja (neutralisanja) ABTS^{•+} radikala za izolovana i sintetisana jedinjenja i odgovarajuće referentno jedinjenje (troleks) (Mavrić-Scholze et al., 2025).¹

Jedinjenje	Sposobnost uklanjanja (neutralisanja) ABTS radikala (%) ¹		
	25 µM	50 µM	100 µM
87	1.7 ± 1.1	2.2 ± 1.2	2.6 ± 0.8
96	7.6 ± 1.0	13.4 ± 0.9	13.4 ± 0.8
17	1.2 ± 0.3	1.9 ± 1.2	2.6 ± 0.7
18	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.9	2.5 ± 0.3
18b	6.6 ± 0.2	12.3 ± 0.8	19.1 ± 0.6
97	2.6 ± 0.7	3.9 ± 1.2	5.1 ± 0.9
20	1.3 ± 0.1	2.7 ± 1.0	3.9 ± 0.4
98	2.9 ± 1.3	6.8 ± 1.1	11.9 ± 0.8
Troleks	97.5 ± 0.2	99.3 ± 0.1	99.5 ± 0.3

¹Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (SD), dobijene iz tri nezavisna merenja.

Tabela 9. Rezultati *in vitro* inhibicije LOX i COX-2 enzima za odabrana izolovana i sintetisana jedinjenja i odgovarajuće referentno jedinjenje (kvercetin) (Mavrić-Scholze et al., 2025).¹

Jedinjenje	Procenat inhibicije LOX i IC ₅₀ ¹		Procenat inhibicije COX-2 ²	
	100 µM	IC ₅₀ (µM)	100 µM	10 µM
87	47.5 ± 1.5	125.5 ± 0.4	-	-
96	55.5 ± 0.1	97.4 ± 1.3	-	-
17	23.8 ± 0.8	n.d.	-	-
18	90.5 ± 0.1	61.6 ± 0.6	14.23 ± 1.0	4.50 ± 1.6
18b	40.0 ± 0.5	122.5 ± 1.5	21.25 ± 1.3	8.11 ± 1.0
97	34.6 ± 0.4	n.d.	-	-
20	18.3 ± 0.3	n.d.	-	-
98	21.2 ± 0.3	n.d.	-	-
Kvercetin	92.0 ± 0.9	43.2 ± 0.5	-	-

¹Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (SD), dobijene iz tri nezavisna merenja.

²Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna greška (SE), izračunate na osnovu tri nezavisna merenja; „-“ – nije testirano.

Lipooksigenaza soje je korišćena kao model-enzim za ispitivanje inhibicije oksidacije polinezasićenih masnih kiselina, procesa koji dovodi do formiranja lipidnih hidroperoksida i inicira produkciju proinflamatornih signalnih molekula. Sva jedinjenja testirana su na koncentraciji 100 µM, dok su IC₅₀ vrednosti određene samo za najaktivnije inhibitore. Najpotentniji među njima bio je *rac*-barbarin (**18**) sa IC₅₀ = 61,6 µM, nakon kojeg je sledilo jedinjenje **96** (IC₅₀ = 97,4 µM). Referentni antioksidans kvercetin pokazao je očekivano najvišu

potentnost ($IC_{50} = 43,2 \mu M$). Ostala ispitana jedinjenja nisu dostigla prag inhibicije značajan za izračunavanje IC_{50} vrednosti (Tabela 9) (Mavrić-Scholze et al., 2025).

S obzirom da prethodni DPPH i ABTS testovi nisu ukazali na primetan kapacitet uklanjanja slobodnih radikala, može se zaključiti da njihova potencijalna antiinflamatorna aktivnost nije posledica antioksidativnih mehanizama, već verovatnije rezultat direktne interakcije sa enzimima, odnosno vezivanja za aktivno mesto (ili njegovu okolinu), čime se otežava pristup supstratu, poput linolne kiseline (Simijonović et al., 2018). Ipak, za potpuno razumevanje mehanizma delovanja potrebna su dodatna biohemijska i molekularna istraživanja, kao i šira SAR analiza u cilju optimizacije strukturnih karakteristika za poboljšanje inhibitorne aktivnosti.

COX-2 predstavlja inducibilni oblik ciklooksigenaze, za razliku od konstitutivno izražene COX-1, i najčešće je aktivirana tokom inflamatornih reakcija. Na osnovu rezultata LOX testa, odabrana su najaktivnija jedinjenja – *rac*-barbarin (**18**) i njegov enantiomer (*S*)-barbarin (**18b**) – kako bi se proverila mogućnost inhibicije COX-2. Nijedno jedinjenje nije dostiglo 50% inhibicije pri ispitivanim koncentracijama, što ukazuje na slabu aktivnost prema COX-2 i $IC_{50} > 100 \mu M$. Naglašeno bolja efikasnost *rac*-barbarina u odnosu na (*S*)-enantiomer prema LOX upućuje na ulogu stereochemije u interakciji sa enzimom, kao i na izraženu selektivnost za LOX u odnosu na COX-2 (Mavrić-Scholze et al., 2025).

Sumarno, rezultati ukazuju da *B. vulgaris* sintetiše različite tipove sekundarnih metabolita koji poseduju komplementarna biološka svojstva. Fenolna jedinjenja pokazuju izraženu antimikrobnu i antibiofilm aktivnost, dok heterociklični derivati manifestuju selektivnu inhibiciju LOX i predstavljaju potencijalne polazne strukture za razvoj prirodom inspirisanih antiinflamatornih inhibitora. Ovakva kombinacija aktivnosti oslikava adaptivni ekološki značaj ovih metabolita u biljci i istovremeno naglašava njihov farmakološki i translacioni potencijal.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je sveobuhvatna analiza hemijskog sastava i biološke aktivnosti sekundarnih metabolita biljne vrste *Barbarea vulgaris* (Brassicaceae), sa posebnim fokusom na degradacione proizvode glukozinolata, njihovu strukturnu karakterizaciju i ispitivanje antimikrobnog, antibiofilm, antiinflamatornog i antioksidativnog potencijala. Kombinacija fitohemijskih, sintetskih i biohemijskih postupaka omogućila je dublje razumevanje veze između strukture i biološke funkcije ovih jedinjenja, čime je značajno prošireno postojeće znanje o metabolizmu i bioaktivnosti vrste *B. vulgaris*, koja je uprkos širokoj rasprostranjenosti na prostoru Srbije nedovoljno istražena.

Hemijski sastav, izolovanje metabolita i sinteza analoga/derivata

Analiza autolizata i etarskog ulja *B. vulgaris* ukazala je na raznovrstan i kompleksan profil glukozinolata. Primenom GC i GC-MS metoda identifikovano je više od 90% sastava ispitanih autolizata i etarskog ulja. U nadzemnom delu biljke dominira (*S*)-barbarin, što je omogućilo i njegovo izolovanje, dok je u korenu ustanovljena veća zastupljenost 2-fenetil-izotiocijanata. Ovakva organ-specifična raspodela glukozinolata ukazuje na funkcionalnu diferencijaciju metabolizma u zavisnosti od biljnog tkiva, verovatno uslovljenu različitim ekološkim pritiscima i adaptivnim odgovorima.

Uporedni pregled hemijskih i morfoloških karakteristika populacije iz Srbije ukazao je na jedinstvenu kombinaciju osobina koje odstupaju od tipičnih P- i G-tipova opisanih u literaturi. Ovi rezultati otvaraju mogućnost da populacija predstavlja hibridni ili potencijalno nov hemotip vrste *B. vulgaris*, što ima značajnu taksonomsku, ekološku i evolucijsku relevantnost.

Pored izolovanih metabolita ((*S*)-barbarin i 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-on), sprovedena je i sinteza šest derivata i analoga: nasturleksina A, metil-4-hidroksifeniletilditiokarbamata, 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline, *rac*-barbarina, rezedina i 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata. Ovakav pristup omogućio je sistematsko poređenje bioloških svojstava u okviru SAR analize. Posebno značajan nalaz predstavlja prvi eksperimentalno potvrđen slučaj spontane izomerizacije (*S*)-barbarina u odgovarajući tiazolidinon tokom skladištenja uzorka autolizata, što ukazuje na potrebu standardizacije uslova rukovanja uzorcima ove klase jedinjenja.

Antimikrobna i antibiofilm aktivnost

Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti pokazali su da određeni degradacioni proizvodi glukozinolata, posebno **96** i **98**, ispoljavaju visoku aktivnost prema klinički relevantnim humanim patogenima i fitopatogenima, sa MIC vrednostima nižim od 0,039 mg/mL za pojedine sojeve – izuzetno niskim za prirodne metabolite. Aktivnost je potvrđena prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, uz uočljive razlike u osetljivosti ispitanih vrsta.

Test antibiofilm aktivnosti pokazao je da jedinjenja **96** i **98** efikasno inhibiraju formiranje biofilma kod *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* i drugih vrsta, često pri srednjim testiranim koncentracijama, dok su pojedina jedinjenja pokazala selektivnost. Imajući u vidu da biofilm predstavlja jedan od najrezistentnijih oblika mikroorganizama, ovi rezultati ukazuju na potencijal metabolita *B. vulgaris* u domenima gde klasični antibiotici pokazuju ograničenu efikasnost.

Antiinflamatorni i antioksidativni potencijal

Testovi DPPH i ABTS nisu pokazali značajnu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, što ukazuje da antiinflamatorno dejstvo ovih jedinjenja ne potiče iz antioksidativnog mehanizma. Nasuprot tome, LOX inhibicija jedinjenja **18** ($IC_{50} = 61,6 \mu M$) i **96** ($IC_{50} = 97,4 \mu M$) ukazuje na specifičnu enzimsku interakciju i potencijal za razvoj selektivnih LOX inhibitora, dok je aktivnost prema COX-2 bila niska ($IC_{50} > 100 \mu M$), što može biti značajno u racionalnom dizajnu novih antiinflamatornih agenasa sa manjim neželjenim efektima.

Iako (*R*)-barbarin nije bio eksperimentalno ispitivan, činjenica da racemska smeša pokazuje umerenu LOX inhibiciju ukazuje da bi svaki enantiomer mogao doprinosti aktivnosti u različitom stepenu. To (*R*)-epimer čini opravdano interesantnim kandidatom za buduća istraživanja u cilju identifikovanja potencijalno snažnijeg LOX inhibitora.

Naučni doprinos i perspektive budućih istraživanja

Ovo istraživanje pruža prvu opsežnu hemijsko-biološku karakterizaciju degradacionih proizvoda glukozinolata *B. vulgaris* iz Srbije. Fenolni izotiocijanati predstavljaju perspektivne antimikrobne i antibiofilm agense, dok *rac*-barbarin ima potencijal kao selektivni LOX inhibitor. U kombinaciji sa nalazima o mogućem hibridnom hemotipu populacije, rad otvara

širok prostor za dalja istraživanja u oblastima hemotipizacije, biosintetskog inženjeringa i primene ovih metabolita u medicini i poljoprivredi.

Budući pravci istraživanja obuhvataju:

- sveobuhvatnije ispitivanje populacija *B. vulgaris* u Srbiji i regionu,
- proširene SAR studije i sintezu semisintetskih analoga,
- *in vivo* potvrdu antiinflamatornog i antimikrobnog potencijala,
- procenu citotoksičnosti i selektivnosti prema eukariotskim ćelijama,
- ispitivanje potencijalnog sinergističkog dejstva sa konvencionalnim antibioticima,
- molekulsko modelovanje interakcija sa LOX/COX-2 aktivnim mestima,
- dalju optimizaciju strukture fenolnih i heterocikličnih derivata.

Naučni doprinos rada potvrđen je objavljivanjem rezultata u dve međunarodne publikacije kategorija M21 i M22, jednim saopštenjem sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33) i jednim saopštenjem sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34).

6. SUMMARY

In this doctoral dissertation, a comprehensive investigation of the chemical composition and biological activity of secondary metabolites from *Barbarea vulgaris* (Brassicaceae) was conducted, with a particular emphasis on the degradation products of glucosinolates, their structural characterization, and the evaluation of their antimicrobial, antibiofilm, anti-inflammatory, and antioxidant potential. The integration of phytochemical, synthetic, and biochemical approaches provided deeper insight into the relationship between structure and biological function of these compounds, significantly expanding the current knowledge of metabolic profiles and bioactivity of *B. vulgaris*, a species widespread in Serbia but insufficiently studied so far.

Chemical composition, metabolite isolation and synthesis of analogues/derivatives

Analysis of *B. vulgaris* autolysates and essential oil revealed a diverse and complex glucosinolate profile. Using GC and GC–MS techniques, more than 90% of the constituents were identified. (*S*)-Barbarin was found to be the dominant metabolite in the aerial parts of the plant, enabling its successful isolation, whereas the root was richer in 2-phenethyl isothiocyanate. This organ-specific distribution of glucosinolates suggests functional differentiation of metabolic pathways depending on plant tissue type, likely reflecting adaptive responses to different ecological pressures.

Comparative analysis of chemical and morphological traits of the Serbian population indicated a unique combination of characteristics differing from typical P- and G-type accessions described in literature. These results suggest that the investigated population may represent a hybrid or potentially novel chemotype of *B. vulgaris*, carrying significant taxonomic, ecological, and evolutionary relevance.

In addition to isolated natural metabolites ((*S*)-barbarin and 5-phenyl-1,3-thiazolidin-2-one), six structural analogues and derivatives were successfully synthesized: nasturlexin A, methyl-4-hydroxyphenethyl dithiocarbamate, 2-thioxothiazolidine-4-carboxylic acid, *rac*-barbarin, resedine, and 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl isothiocyanate. This enabled a systematic comparison of biological properties and a structure–activity relationship (SAR) study. A particularly important finding is the first experimentally confirmed case of spontaneous isomerization of (*S*)-barbarin into the corresponding thiazolidinone derivative during storage, highlighting the necessity of controlled handling and storage conditions for this class of compounds.

Antimicrobial and antibiofilm activity

Antimicrobial assays demonstrated that certain glucosinolate degradation products, particularly compounds **96** and **98**, exhibited strong activity against clinically relevant human pathogens and phytopathogens, with MIC values below 0.039 mg/mL for some strains – remarkably low for natural products. Activity was confirmed against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, with strain-dependent differences in susceptibility.

Antibiofilm experiments showed that compounds **96** and **98** effectively inhibited biofilm formation in *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, and other strains, often at moderate concentrations, while some compounds displayed selective effects. Considering that biofilms represent one of the most persistent forms of microbial growth, these results highlight the potential of *B. vulgaris* metabolites in applications where conventional antibiotics show limited efficacy.

Anti-inflammatory and antioxidant potential

DPPH and ABTS assays revealed no significant radical-scavenging capacity, indicating that the anti-inflammatory effect of the tested compounds does not originate from antioxidant mechanisms. In contrast, LOX inhibition observed for compounds **18** ($IC_{50} = 61.6 \mu M$) and **96** ($IC_{50} = 97.4 \mu M$) suggests direct enzyme interaction and positions them as promising leads for selective LOX inhibitor development. Their weak COX-2 inhibition ($IC_{50} > 100 \mu M$) points to enzymatic selectivity, an advantageous property in the rational design of new anti-inflammatory agents with fewer side effects.

Although (*R*)-barbarin was not tested in this study, the moderate LOX inhibition of the racemic mixture indicates that individual enantiomers may contribute differently to activity. Thus, the (*R*)-epimer represents a logical candidate for future evaluation as a potentially more potent LOX inhibitor.

Scientific contribution and future perspectives

This work presents the first complete chemical and biological characterization of glucosinolate degradation products from *B. vulgaris* originating in Serbia. Phenolic isothiocyanates demonstrated strong antimicrobial and antibiofilm properties, while *rac*-barbarin emerged as a promising scaffold for LOX-selective anti-inflammatory inhibitor development. Together with evidence indicating a potential hybrid chemotype in the studied

population, this research opens new directions for work in chemotyping, biosynthetic engineering, and applications of these metabolites in medicine and agriculture.

Future research should focus on:

- more extensive evaluation of *B. vulgaris* populations in Serbia and the region,
- advanced SAR studies and synthesis of semisynthetic analogues,
- *in vivo* validation of anti-inflammatory and antimicrobial potential,
- cytotoxicity and selectivity assessment toward eukaryotic cells,
- investigation of potential synergistic effects with conventional antibiotics,
- molecular modeling of interactions with LOX/COX-2 active sites,
- further optimization of phenolic and heterocyclic derivatives.

The scientific contribution of this dissertation is supported by the publication of results in two international research papers (categories M21 and M22), one full conference proceeding (M33), and one abstract in conference proceedings (M34).

7. LITERATURA

- Abbaoui, B., Riedl, K.M., Ralston, R.A., Thomas-Ahner, J.M., Schwartz, S.J., Clinton, S.K., Mortazavi, A., *Mol. Nutr. Food Res.*, 2012, 56, 1675–87.
- Abcam. Dostupno na linku: <https://www.abcam.com/en-us/products/assay-kits/cox2-inhibitor-screening-kit-fluorometric-ab283401> (pristupljeno 14. 9. 2025).
- Agerbirk, N., Hansen, C.C., Kiefer, C., Hauser, T.P., Ørgaard, M., Lange, C.B.A., Cipollini, D., Koch, M.A., *Phytochemistry*, 2022, 195, 113050.
- Agerbirk, N., Hansen, C.C., Olsen, E.C., Kiefer, C., Hauser T.P., Christensen S., Jensen, K. R., Ørgaard, M., Pattison, D.I., Lange, C.B.A., Cipollini, D., Koch, M.A., *Phytochemistry*, 2021, 185, 112658.
- Agerbirk, N., Matthes, A., Erthmann, P. Ø., Ugolini, L., Cinti, S., Lazaridi, E., Nuzillard, J-M., Müller, C., Bak, S., Rollin, P., Lazzeri, L., *Phytochemistry*, 2018, 153, 79–93.
- Agerbirk, N., Olsen, E.C., Heimes, C., Christensen, S., Bak, S., Hauser T.P., *Phytochemistry*, 2015, 115, 130–142.
- Agerbirk, N., Olsen, E.C., Nielsen, J. K., *Phytochemistry*, 2001, 58, 91–100
- Agerbirk, N., Olsen, E.C., *Phytochemistry*, 2011, 72, 610–623.
- Agerbirk, N., Olsen, E.C., *Phytochemistry*, 2012, 77, 16–45.
- Agerbirk, N., Olsen, E.C., *Phytochemistry*, 2015, 115, 143–151.
- Agerbirk, N., Ørgaard, M., Nielsen, J. K., *Phytochemistry*, 2003, 63, 69–80.
- Agrawal, A.A., Kurashige, N.S., *J. of Chem. Ecol.*, 2003, 29, 1403–1415.
- Ahuja, I., Kissen, R., Bones, A.M., *Trends Plant Sci.*, 2012, 17, 73–90.
- Alamgir, A.N.M., Therapeutic use of medicinal plants and their extracts: Vol. 2, Phytochemistry and Bioactive compounds. In: Rainsford, K.D., ed., Progress in Drug research, Vol. 74, Springer International Publishing AG, Cham, 2018.
- Al-Shehbaz, I.A., *J. Arnold Arbor*, 1988, 69, 85–166.
- Al-Zalabani, A.H., Stewart, K.F., Wesseliuss, A., Schols, A.M., Zeegers, M.P., *Eur. J. Epidemiol.*, 2016, 31, 811–51.
- Andersson, A.A.M., Merker, A., Nilsson, P., Sorensen, H., Aman, P., *Sci. Food Agric.*, 1999, 79, 179–186.

- Andrews, J.M.J., *Antimicrob. Chemother.*, 2005, 56, 60–76.
- Ashton, W.T., Cantone, C.L., Meurer, L.C., Tolman, R.L., Greenlee, W. J., Patchett, A.A., Lynch, R.J., Schorn, T.W., Strouse, J.F., Siegl, P.K., *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 2103–2112.
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B., Bak, S., *Phytochemistry*, 2011, 72, 435–457.
- Austel, N., Boettcher, C., Meiners, T., *Plant. Cell. Environ.*, 2021, 44(2), 519–534.
- Avdović, E.H., Milanović, Ž., Simijonović, D., Antonijević, M., Milutinović, M., Nikodijević, D., Filipović, N., Marković, Z., Vojinović, R., *Antioxidants*, 2023, 12, 2070.
- Azeem, S., Gillani, S.W., Siddiqui, A., Jandrajupalli, S.B., Poh, V., Syed Sulaiman, S.A., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2015, 16, 5389–5396.
- Badenes-Perez, F.R., Gershenzon, J., Heckel, D.G., *PLoS One*, 2014, 9, e95766.
- Bailey, J.A., Mansfield, J.W., *Phytoalexins*, Blackie and Son, Glasgow, UK, 1982.
- Barth, C., Jander, G., *Plant J.*, 2006, 46, 549–562.
- Bartlet, E., Kiddle, G., Williams, I., Wallsgrove, R. 10th International Symposium on Insect-Plant Relationships (Oxford: Springer), 1999, 163–167.
- Bellostas, N., Sorensen, A. D., Sorensen, J. C., Sorensen, H., *Adv. Bot. Res.*, 2007, 45, 369.
- Bennett, R.N., Mellon, F.A., Kroon, P.A., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 428.
- Bizuneh, G.K., *Adv. Tradit. Med.*, 2021, 21, 31–43.
- Bodnaryk, R.P., *Phytochemistry*, 1992, 31, 2671–2677.
- Boege, K., Marquis, R.J., *Trends Ecol. Evol.*, 2005, 20, 526.
- Bosetti, C., Filomeno, M., Riso, P., Polesel, J., Levi, F., Talamini, R., Montella, M., Negri, E., Franceschi, S., La Vecchia, C., *Ann. Oncol.*, 2012, 23, 2198–2203.
- Bošković, J., Dobričić, V., Mihajlović, M., Kotur-Stevuljević, J., Čudina, O., *Pharmaceuticals*, 2023, 16, 549.
- Breard, D., Barrit, T., Sochard, D., Aligon, S., Planchet, E., Teulat, B., Le Corff, J., Champion, C., David, G., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2022, 1205, 123348.

- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., Gershenzon, J., *Phytochemistry*, 2003, 62, 471–481.
- Budovská, M., Pilátová, M. B., Tischlerová V., Mojžiš J., *ARKIVOC*, 2016, 6, 198–234.
- Burkina, A.A., Kononenko, G.P., *Biochemistry*, 2021, 49(3), 237–245.
- Bush, N.A., 1939. *Barbarea* Beck. In: Komarov, V.L., ed., Flora SSSR. Moskva. English version: Flora of the U.S.S.R., Vol. 8. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1970, pp. 99–102.
- Bush, N.A., Capparidaceae, Cruciferae and Resedaceae, In: Flora of the U.S.S.R., Botanical Institute of the Academy of Sciences of the U.S.S.R., Moskva, 1970.
- Byrne, S.L., Erthmann, P.Ø., Agerbirk, N., Bak, S., Hauser, T.P., Nagy, I., Paina, C., Asp, T., *Sci. Rep.*, 2017, 7, 40728.
- Cárdenas, P.D., Landtved, J.P., Larsen, S.H., Lindegaard, N., Wøhlk, S., Jensen, K.R., Pattison, D.I., Burow, M., Bak, S., Crocoll, C., Agerbirk, N., *Phytochemistry*, 2023, 213, 113742.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., *BMC Complement. Altern. Med.*, 2011, 11, 29.
- Chew, F.S., 1988. Biological effects of glucosinolates. In: Cutler, H.G. (Ed.), *Biologically Active Natural Products*. ACS, Washington, DC, pp. 155–181.
- Chhajed, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., Chen, S., *Agronomy*, 2020, 10, 1786.
- Christenhusz, M.J.M., Byng, J.W. *Phytotaxa*, 2016, 261(3), 201–217.
- Christensen, S., Heimes, C., Agerbirk, N., Kuzina, V., Olsen, C.E., Hauser, T.P., *J. Chem. Ecol.*, 2014, 40, 491–501.
- Cipollini, D.F., Busch, J.W., Stowe, K.A., Simms, E.L., Bergelson, J., *J. Chem. Ecol.*, 2003, 29, 285–302.
- Clarke, D.B., *Anal. Methods*, 2010, 2, 310–325.
- Connolly, E.L., Sim, M., Travica, N., Marx, W., Beasy, G., Lynch, G.S., Bondonno, C.P., Lewis, J.R., Hodgson, J.M., Blekkenhorst, L.C., *Front. Pharmacol.*, 2021, 12, 767975.
- Contreras-Martel, C., Job, V., Guilmi, A.M.D., Vernet, T., Dideberg, O., Dessen, A., *J. Mol. Biol.*, 2005, 355, 684–696.

- Cruickshank, I.A.M., *Aust. J. Biol. Sci.*, 1962, 15, 147–159.
- Cruickshank, I.A.M., Perrin, D. R., *Nature*, 1960, 187, 799–800.
- Dalby-Brown, L., Olsen, C.E., Nielsen, J.K., Agerbirk, N., *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 6947–6956.
- De Geyter, E., Lambert, E., Geelen, D., Smagghe, G., *Pest. Technol.*, 2007, 1, 96–105.
- De Los Reyes, M.P., Wang, K.-H., Shikano, I., *Arth. Plant Int.*, 2024, 18(6), 227.
- Dekić, M., Fitohemijsko ispitivanje odabranih biljnih vrsta porodica Geraniaceae i Brassicaceae, doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet u Nišu, Niš, 2011.
- Deng, X., Chen, N., Wang, Z., Li, X., Hu, H., Xu, J., *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2011, 186, 1563–1571.
- Dicke, M., van Poecke, R.M.P., de Boer, J.G., *Basic Appl. Ecol.*, 2003, 4, 27–42.
- Dragsted, L.O., *Pharmacol. Toxicol.*, 1993, 72, 116–135.
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T., Talalay, P., *Phytochemistry*, 2001, 56, 5–51.
- Favel, A., Steinmetz, M.D., Regli, P., Vidal-Ollivier, E., Elias, R., Balansard, G., *Planta Med.*, 1994, 60, 50–53.
- Feeny, P., *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 1977, 64, 221–234.
- Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1983, 18, 123–201.
- Flora of the British Isles: Glossary of the British Flora. H. Gilbert-Carter. Cambridge University Press, New York, ed. 3, 1964, 96 pp.
- Flora Srbije III, Mladen Josifović, ed., Srpska Akademina Nauka i Umetnosti, Beograd, 1972.
- Franzke, A., Lysak, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A., Mummenhoff, K., *Trends Plant Sci.*, 2011, 16, 108–116.
- Frederiksen, S., Rasmussen, F.N., Seberg, O., *Dansk Flora*. Gyldendal, Copenhagen, 2012.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian Inc, Wallingford CT, 2009.
- Frisch, T., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Agerbirk, N., Møller, B.L., Bjarnholt, N., *Front. Plant Sci.*, 2015, 6, 926.

- Fursa, N.S., Litvinenko, V.I., Krivenchuk, P.E., *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1969, 5(4), 320.
- Gabriele, B., Mancuso, R., Salerno, G., Costa, M., *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 601–604.
- Gaspari, P., Banerjee, T., Malachowski, W.P., Muller, A.J., Prendergast, G.C., Hadaway, J.D., Bennett, S., Donovan, A.M., *J. Med. Chem.*, 2006, 49(2), 684–692.
- Genčić, M.S., Radulović, N.S., *RSC Adv.*, 2015, 5, 72670–72682.
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M. S., Malouin, F., Bouarab, K., *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10, 3400–3419.
- Greer, M.A., Whallon, J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, 107, 802–804.
- Güçlü-Ustündağ, O., Mazza, G., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2007, 47, 231–258.
- Guo, X., Liu, J., Hao, G., Zhang, L., Mao, K., Wang, X., Zhang, D., Ma, T., Hu, Q., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A., *BMC Genomics*, 2017, 18, 176.
- Gusinac, A.M., Dekić, M.S., Palić, I.R., Mladenović, M.Z., Radulović, N.S., *Chem. Biodivers.*, 2025; 0:e02719, <https://doi.org/10.1002/cbdv.202502719> (rad prihvaćen za štampu).
- Halkier, B.A., Gershenzon, J., *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, 57, 303–333.
- Hanschen, F.S., Lamy, E., Schreiner, M., Rohn, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 11430–11450.
- Hansen, K., *Dansk feltflora*. Gyldendal, Denmark, 1981.
- Haribal, M., Renwick, J.A.A., *J. Chem. Ecol.*, 2001, 27, 1585–1594.
- Hartmann, T., *Entomol. Exp. Appl.*, 1996, 80, 177–188.
- Hartvig, P., Artsoversigt/Udbredelse, In: Hartvig, P., Vestergaard, P., eds., *Atlas Flora Danica*, bind 2. Gyldendal, København, 2015.
- Hauser, T., Toneatto, F., Nielsen, J.K., *Evol. Ecol.*, 2012, 26, 611–624.
- Hauser, T.P., Christensen, S., Kuzina, V., Thines, M., Ploch, S., Bak, S., *Arth. -Plant Int.*, 2021, 15(5), 683–698.
- Hirao, T., Yamada, A., Ohshiro, Y., Agawa, T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1981, 20, 126–127.

- Hoch, C. C., Shoykhet, M., Weiser, T., Griesbaum, L., Petry, J., Hachani, K., Multhoff, G., Dezfouli, A. B., Wollenberg, B., *Pharmacol. Res.*, 2024, 201, 107107.
- Hopkins, R., Griffiths, D., Birch, A., McKinlay, R., *J. Chem. Ecol.*, 1998, 24, 2003–2019.
- Hostettmann, K., Marston, A., *Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- Huang, X., Renwick, J.A.A., Sachdev-Gupta, K., *J. Chem. Ecol.*, 1994, 20, 423–438.
- Hunziker, P., Halkier, B.A., Schulz, A., *J. Exp. Bot.*, 2019, 16(70), 4305–4317.
- Husebye, H., Chadchawan, S., Winge, P., Thangstad, O.P., Bones, A. M., *Plant Physiol.*, 2002, 128, 1180–88.
- Hussain, M., Debnath, B., Qasim, M., Bamisile, B.S., Islam, W., Hameed, M.S., Wang, L., Qiu, D., *Molecules*, 2019, 24, 2067.
- Jahangir, M., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, 2009, 8, 31–43.
- Jakšić, M., Društvo za promociju prirode Srbije (DZPS) (pristupljeno 22. decembra 2022. god. na linku: <https://dpps.org.rs/priroda/dicak-barbarea-vulgaris/>).
- Jensen, J., Brassicaceae. In: Hansen, K., ed., *Dansk Feltflora*. Gyldendal, Copenhagen, 1985, pp. 225–252.
- Kerfoot, W.C., Newman, R.M., Hanscom, Z., *Freshw. Biol.*, 1998, 40, 201–213.
- Khakimov, B., Amigo, J.M., Bak, S., Engelsens, S.B., *J. Chrom. A*, 2012, 1266, 84– 94.
- Khakimov, B., Kuzina, V., Erthmann, P.Ø., Fukushima, E.O., Augustin, J.M., Olsen, C.E., Scholtalbers, J., Volpin, H., Andersen, S.B., Hauser, T.P., Muranaka, T., Bak, S., *Plant J.*, 2015, 84, 478–490.
- Kliebenstein, D.J., Gershenzon, J., Mitchell-Olds, T., *Genetics*, 2001, 159, 757–770.
- Kirkegaard, J.A., Sarwar, M., *Plant Soil*, 1998, 201, 71–89.
- Kissen, R., Bones, A.M., *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 12057–12070.
- Kjaer, A., Gmelin, R., *Acta Chem. Scand.*, 1957, 11, 906–907.
- Klein, A.P., Sattely, E.S., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017, 114(8), 1910–1915.

- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., Mitchell-Olds, T., *Plant Physiol.*, 2001, 126, 811–825.
- Koch, M.A., Kiefer, M., *Syst. Bot.*, 2006, 31, 610–618.
- Kononenko, G.P., Zotova, E.V., Ustyuzhanina, M.I., *Usp. Med. Mikol.*, 2019, 20, 649–653.
- Kopecky, J., Smejkal, J., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1984, 93, 231–232.
- Kopjar, M., Šubari, D., Piližota, B., *Hrana u zdravlju ljudi i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2012, 1, 22–35.
- Koroleva, O.A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M.R., Tomos, A.D., Hedrich, R., *Plant Physiol.*, 2000, 124, 599–608.
- Kuzina, V., Nielsen, J.K., Augustin, J.M., Torp, A.M., Bak, S., Andersen, S.B., *Phytochemistry*, 2011, 72, 188–198.
- Lange, T., *Bot. Not.*, 1937, 216–230.
- Lange, C.B.A., Hauser, T.P., Deichmann, V., Ørgaard, M., *Mol. Phylogen. Evol.*, 2022, 169, 107425.
- Laserna, V., Guo, W., Kleij, A. W., *Adv. Synth. Catal.*, 2015, 357, 2849–2854.
- Lee, M.W., Kim, S.U., Hahn, D.R., *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24, 718–719.
- Leur, H. V., Vet, L.E.M., Van der Putten, W.H., Van Dam, N.M., *J. Chem. Ecol.*, 2008, 34, 121–131.
- Leur, H. van, Raaijmakers, C.E., Van Dam, N.M., *Phytochemistry*, 2006, 67, 1214–1223.
- Li, Y., Hu, X., Huang, H., *CN Patent CN1125228*, 1996.
- Li, Y., Hu, X., Lang, M., Kong, C., Huang, H., *Jilin Daxue Ziran Kexue Xuebao*, 1996, 4, 101–102.
- Liu, T., Zhang, X., Yang, H., Agerbirk, N., Qiu, Y., Wang, H., Shen, D., Song, J., Li, X., *Front. Plant Sci.*, 2016, 7(83), 1–15.
- Loos, G.H., *Florist. Rd.br.*, 1996, 30, 4–6.
- Ludwig-Müller, J., Bennett, R. N., Kiddle, G., Ihmig, S., Uppel, M., Hilgenberg, W., *New Phytol.*, 1999, 141, 443–458.
- Mabberly, D.J., *The Plant-Book*, Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

- Mac Donald, M.A., Cavers, P.B., *Can. J. Plant Sci.*, 1991, 71, 149–166.
- Mansfield, J.W., Bailey, J.A., *Phytoalexins*, 1982, 319–323.
- Mavrić-Scholze, E., Gusinac, A., Dekić, M., Palić, I., Avdović, E., Simijonović, D., Grujović, M., Marković, K., Dobričić, V., Bošković, J., Marković, Z., Radulović, N. *Molecules*, 2025, 30(23), 4606.
- McKey, D., *Am. Nat.*, 1974, 108, 305–320.
- Melander, R.J., Basak, A.K., Melander, C., *Nat. Prod. Rep.*, 2020, 37, 1454–1477.
- Middleton, E., Kandaswami, C., The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, In: Harborne, J. B., ed., *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1996, pp. 619–652.
- Mithen, R.F., *Adv. Bot. Res.*, 2001, 35, 213–232.
- Mladenović, M.Z., Radulović, N.S., *Flavour Fragr. J.*, 2017, 32, 5–23.
- Monde, K., Katsui, N., Shirata A., Takasugi, M., *Chem. Lett.*, 1990, 209.
- Montaut, S., Bleeker, R.S., *Carbohydr. Res.*, 2010, 345, 1968–1970.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., *J. Comp. Chem.*, 2009, 30, 2785–2791.
- Mossberg, B., Stenberg, L., *Den nye nordiske floran*. Gyldendal, Nordisk Forlag, København, 2003.
- Mshvildadze, V., Favel, A., Delmas, F., Elias, R., Faure, R., Decanosidze, G., Kemertelidze, E., Balansard, G., *Pharmazie*, 2000, 55, 325–326.
- Murray, R.K., *Harper's Biochemistry*, Appleton & Lange, New York, 1994.
- Muruzović, M., Mladenović, K., Stefanović, O., Vasić, S., Čomić, Lj., *J. Food Drug Anal.*, 2016, 24, 539–547.
- Narasimhachari, N., Vouros, P., *Biol. Mass Spectrom*, 1974, 1, 367–373.
- Nedeljković, N., Dobričić, V., Bošković, J., Vesović, M., Bradić, J., Anđić, M., Kočović, A., Jeremić, N., Novaković, J., Jakovljević, V., Vujić, Z., Nikolić, M., *Pharmaceuticals*, 2023, 16, 666.
- Newman, K., You, M., Vasseur, L., *J. Econ. Entomol.*, 2016, 109(2), 644–648.

- Nicolas, E., Russell, K. C., Hruby, V. J., *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 766–770.
- Nielsen, J.K., *Ent. Exp. Appl.*, 1997, 82, 25–35 (a).
- Nielsen, J.K., *Ent. Exp. Appl.*, 1997, 82, 37–44 (b).
- Nielsen, J.K., *Ent. Exp. Appl.*, 1999, 91, 359–368.
- Nielsen, J.K., *Entomol. Exp. Appl.*, 1997, 82, 25–35 (c).
- Nielsen, J.K., Nagao, T., Okabe, H., Shinoda, T., *J. Chem. Ecol.*, 2010, 36, 277–285 (b).
- Nielsen, N.J., Nielsen, J., Staerk, D., *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 5509–5514 (a).
- Niu, L., Ren, G., Hou, T., Shen, X., Zhu, D., *Inorg. Chem. Commun.*, 2021, 130, 108737.
- Northrup, C. *Women's Bodies, Women's Wisdom*, Bantam Books, New York, 1994.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, 54, 49–79.
- Olsen, C.E., Huang, X.-C., Hansen, C.I.C., Cipollini, D., Ørgaard, M., Matthes, A., Geu-Flores, F., Koch, M.A., Agerbirk, N., *Phytochemistry*, 2016, 132, 33–56.
- Ørgaard, M., Linde-Laursen, I., *Hereditas*, 2008, 145, 215–219.
- Parkhurst, R.M., Thomas, D.W., Skinner, W.A., Cary, L.W., *Can. J. Chem.*, 1974, 52, 702–705
- Pastorczyk, M., Bednarek, P., *Adv. Bot. Res.*, 2016, 80, 171–198.
- Pedras, M.S., Yaya, E.E., *Phytochemistry*, 2010, 71, 1191–1207.
- Pedras, M.S.C., Ahiahonu, P.W.K., *Phytochemistry*, 2005, 66(4), 391–411.
- Pedras, M.S.C., Alavi, M., *Phytochemistry*, 2015, 118, 131–138 (a).
- Pedras, M.S.C., Minić, Z., Sarma-Mamillapalle, V.K., *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 2429–2435.
- Pedras, M.S.C., To, Q.H., *Chem. Commun.*, 2016, 52, 5880–5883.
- Pedras, M.S.C., To, Q.H., *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, 2017, 61, 94–106.
- Pedras, M.S.C., To, Q.H., *Org. Biomol. Chem.*, 2018, 19, 3625–3638.
- Pedras, M.S.C., To, Q.H., *Phytochemistry*, 2015, 113, 57–63 (b).
- Pedras, M.S.C., Yaya, E.E., Glawischnig, E., *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28, 1381.
- Pedras, M.S.C., Zheng, Q.A., Gadagi, R.S., *Chem. Commun.*, 2007, 368–370.

- Pedras, M.S.C., Zheng, Q.-A., *Phytochemistry*, 2010, 71(5-6), 581-9.
- Pedras, M.S.C., To, Q.H., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2017, 61, 94–106.
- Potter, M.J., Vanstone, V.A., Davies, K.A., Kirkegaard, J.A., Athjen, A.J., *J. Nematol.*, 1999, 31, 291–298.
- Radulović, N., Zlatković, B., Skropeta, D., Palić, R., *Biochem. Syst. Ecol.*, 2008, 36, 807–811.
- Radulović, N.S., Dekić, M.S., Stojanović-Radić, Z.Z., *Food Chem.*, 2011, 129, 125–130.
- Radulović, N.S., Dekić, M.S., Stojanović-Radić, Z.Z., *Phytochem. Lett.*, 2012, 5, 351–357.
- Radulović, N.S., Todorovska, M.M., Zlatković, D.B., Stojanović, N.M., Randelović, P.J., *Food Chem. Toxicol.*, 2017, 110, 94–108.
- Radulović, N.S., Todorovska, M.M., Zlatković, D.B., Stojanović, N.M., Randelović, P.J., *Food Chem. Toxicol.*, 2018, 111, 206.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T., Kroymann, J., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99, 11223–11228.
- Rhoades, D.F., Evolution of plant chemical defense against herbivores, In: Rosenthal, G.A., Janzen, D.H., eds., *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Academic Press, New York, 1979, 3–54.
- Rich, T.C.G., *Watsonia*, 1987, 16, 389–396.
- Rosier, J., Simonds, R., Van Peteghem, C., Vanhoorne, M., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1983, 92, 397–402.
- Rostrup, E., Jørgensen, C.A., *Den danske flora*, Gyldendal, Denmark, 1970.
- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Biolwell, G.P., Rice-Evans, C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 2, 339–346.
- Sang, J.P., Minchinton, I.R., Johnstone, P.K., Truscott, R.J.W., *Can. J. Plant. Sci.*, 1984, 64, 77–93.
- Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y., *Methods*, 2007, 42, 321–324.
- Schenkel, E.P., Werner, W., Schulte, K.E., *Planta Med.*, 1991, 57, 463–467.
- Schlaeppli, K., Mauch, F., *Plant Signal. Behav.*, 2010, 5(9), 1099–1101.
- Senatore, F., D'Agostin, M., Dini, I., *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 2659–2662.

- Serizawa, H., Shinoda, T., Kawai, A., *Appl. Entomol. Zool.*, 2001, 36, 465–470.
- Serra, B., Osa, E., Iori, R., Barillati, J., Cardoso, A., Abreu, C., Ollin, P., *Sci. Hortic. (Amst)*, 2002, 92, 75–81.
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S.D., Schwartz, S.A., Bruggemann, L., Aalinkel, R., *Microorganisms*, 2023, 11, 1614.
- Shinoda, T., Nagao, T., Nakayama, M., Serizawa, H., Koshioka, M., Ookabe, H., Kawai, A., *J. Chem. Ecol.*, 2002, 28, 587–599.
- Simijonović, D., Avdović, E., Jovičić Milić, S., Antonijević, M., Milenković, D., Marković, K., Grujović, M., Stojković, D. L., Dekić, M., Marković, Z., *Pharmaceutics*, 2024, 16, 1472.
- Simijonović, D., Vlachou, E.-E., Petrović, Z.D., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E., Stanković, N., Mihović, N., Mladenović, M.P., *Bioorg. Chem.*, 2018, 80, 741–752.
- Simmonds, M.S.J., *Phytochemistry*, 2003, 64, 21–30.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 94, 219–243.
- Spencer, E.S., Dale, E.J., Gommans, A.L., Rutledge, M.T., Vo, C.T., Nakatani, Y., Gamble, A.B., Smith, R.A.J., Wilbanks, S.M., Hampton, M.B., Tyndall, J.D.A., *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, 93, 501–510.
- Städler, E., Baur, R., De Jong, R., *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.*, 2002, 48, 265–280.
- Stearn, W.T. (1992) Botanical Latin. David & Charles Pub, London.
- Tamokou, J.D.D., Mbaveng, A.T., Kuete, V., *J. Med. Spice. Veg. Afr.*, 2017, 8, 207–235.
- Thangstad, O.P., Gilde, B., Chadchawan, S., Seem, M., Husebye, H., Bradley, D., Bones, A.M., *Plant Mol. Biol.*, 2004, 54, 597–611.
- Tierens, K., Thomma, B.P.H., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F., *Plant Physiol.*, 2001, 125, 1688–1699.
- Toneatto, F., Nielsen, J.K., Ørgaard, M., Hauser, T.P., *Mol. Ecol.*, 2010, 19, 3456–3465.
- Van Dam, N.M., Harvey, J.A., Wackers, F.L., Bezemer, T.M., van der Putten, W.H., Vet, L.E.M., *Basic Appl. Ecol.*, 2003, 4, 63–77.
- Van Den Dool, H., Kratz, P.D., *J. Chromatogr.*, 1963, 11, 463–471.
- Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E., *Plant Cell*, 1994, 6, 1191.

- Warwick, S.I., Francis, A., Al-Shehbaz, I.A., *Plant Syst.Evol.*, 2006, 259, 249–258.
- Wittstock, U., Kliebenstein, D. J., Lambrix, V., Eichelt, M., Gershenzon, J., Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores, In: Romeo, J.T., ed., *Recent Advances in Phytochemistry, Integrative Phytochemistry: From Ethnobotany to Molecular Ecology*, vol. 37, Pergamon Press, Oxford, 2003, pp. 101–125.
- Wittstock, U., Kurzbach, E., Herfurth, A.-M., Stauber, E.J., *Adv. Bot. Res.*, 2016, 80, 125–169 (a).
- Wittstock, U., Meier, K., Doerr, F., Ravindran, B.M., *Front. Plant Sci.*, 2016, 7, 1821 (b).
- Wu, Q.J., Yang, G., Zheng, W., Li, H.L., Gao, J., Wang, J., Gao, Y.T., Shu, X.O., Xiang, Y.B., *Sci. Rep.*, 2015, 5, 10306.
- Yamane, A., Fujikura, J., Ogawa, H., Mizutani, J., *J. Chem. Ecol.* 1992, 18, 1941–1954.
- Zhang, Q.Z., Xi, H.F., Lan, X.F., Zhu, X.Q., Liu, Y.H., *J. Agron. Crop Sci.*, 1991, 166, 152–156.
- Zhao, Y., Truhlar, D.G., *Theor. Chem. Acc.*, 2008, 120, 215–241.
- Zrybko, C.L., Fukuda E.K., Rosen, R.T., *J. Chrom. A.*, 1997, 767, 43–52.

8. PRILOZI

SPISAK PRILOGA:

Slika S1 ^1H NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).

Slika S2 ^{13}C NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S3 DEPT45 (gore), DEPT135 (u sredini) i $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR (dole) spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S4 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 20 °C).

Slika S5 ^1H - ^1H COSY NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).

Slika S6 IR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**).

Slika S7 ^1H NMR spektar 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 400 MHz, 20 °C).

Slika S8 ^{13}C NMR spektar 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S9 DEPT45 (gore), DEPT135 (u sredini) i $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR spektar (dole) 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S10 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 20 °C).

Slika S11 ^1H - ^1H COSY i NOESY NMR spektri 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 400 MHz, 20 °C).

Slika S12 IR spektar 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**).

Slika S13 ^1H NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).

Slika S14 ^{13}C NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S15 DEPT45 (gore) i DEPT135 (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S16 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 20 °C).

Slika S17 ^1H - ^1H COSY NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tion (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).

Slika S18 IR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**).

Slika S19 ^1H NMR spektar 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).

Slika S20 ^{13}C NMR spektar 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S21 DEPT45 (gore) i $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR spektar (dole) 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S22 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl₃, 20 °C).

Slika S23 ¹H-¹H COSY i NOESY NMR spektri 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).

Slika S24 IR spektar 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**).

Slika S25 ¹H NMR spektar nasturleksina A (**87**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).

Slika S26 ¹³C NMR spektar nasturleksina A (**87**) (CDCl₃, 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S27 DEPT90 (gore) i DEPT135 NMR (dole) spektri nasturleksina A (**87**).

Slika S28 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri nasturleksina A (**87**).

Slika S29 ¹H-¹H COSY (gore) i NOESY (dole) spektri nasturleksina A (**87**).

Slika S30 EIMS (gore) i IR spektar (dole) nasturleksina A (**87**).

Slika S31 ¹H NMR spektar metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).

Slika S32 ¹³C NMR spektar metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**) (CDCl₃, 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S33 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**).

Slika S34 ¹H-¹H COSY (gore) i NOESY (dole) spektri metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**).

Slika S35 IR spektar metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**).

Slika S36 ¹H NMR spektar of 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).

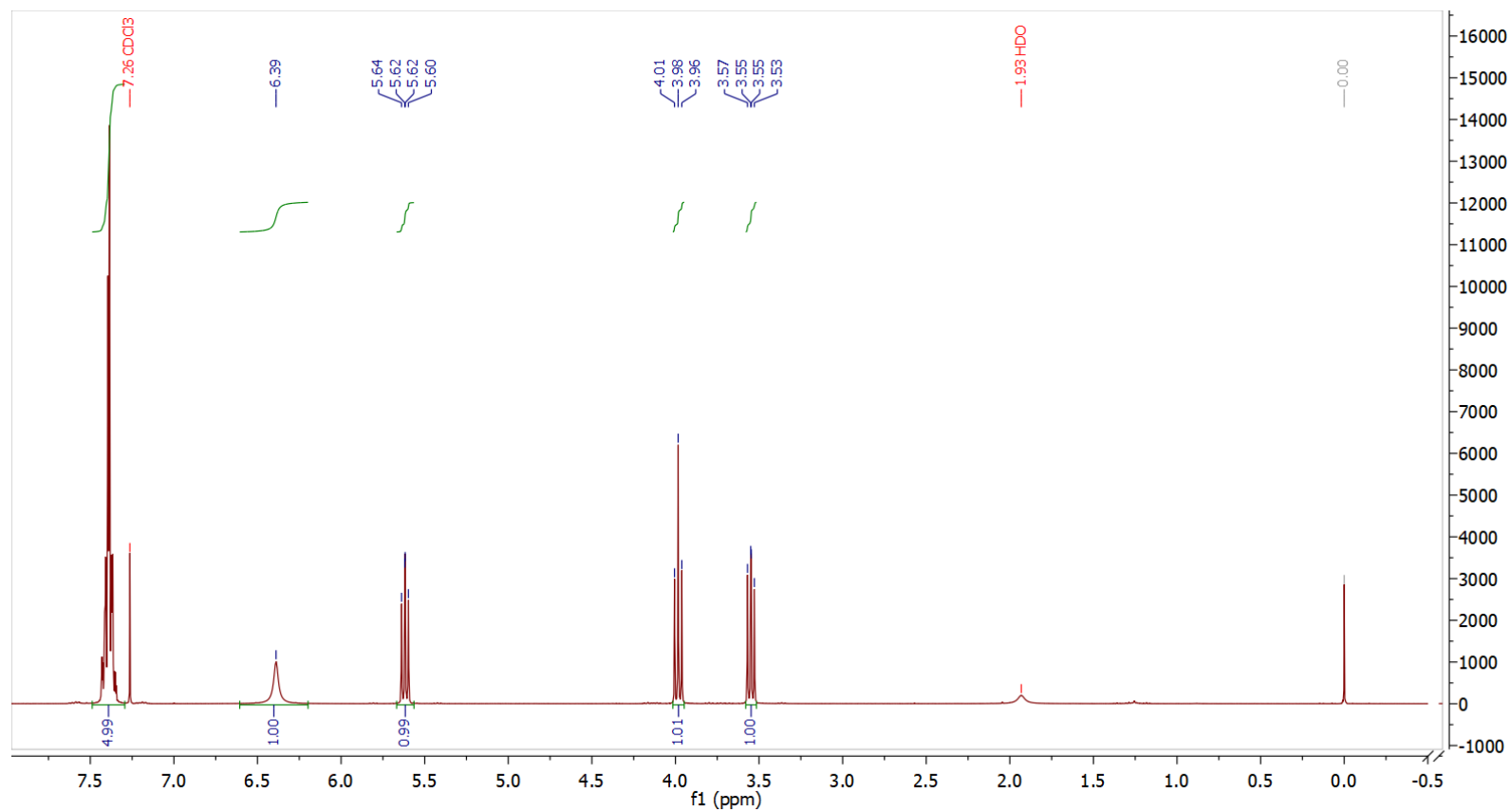
Slika S37 ¹³C NMR spektar 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**) (CDCl₃, 100.6 MHz, 20 °C).

Slika S38 IR spektar 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**).

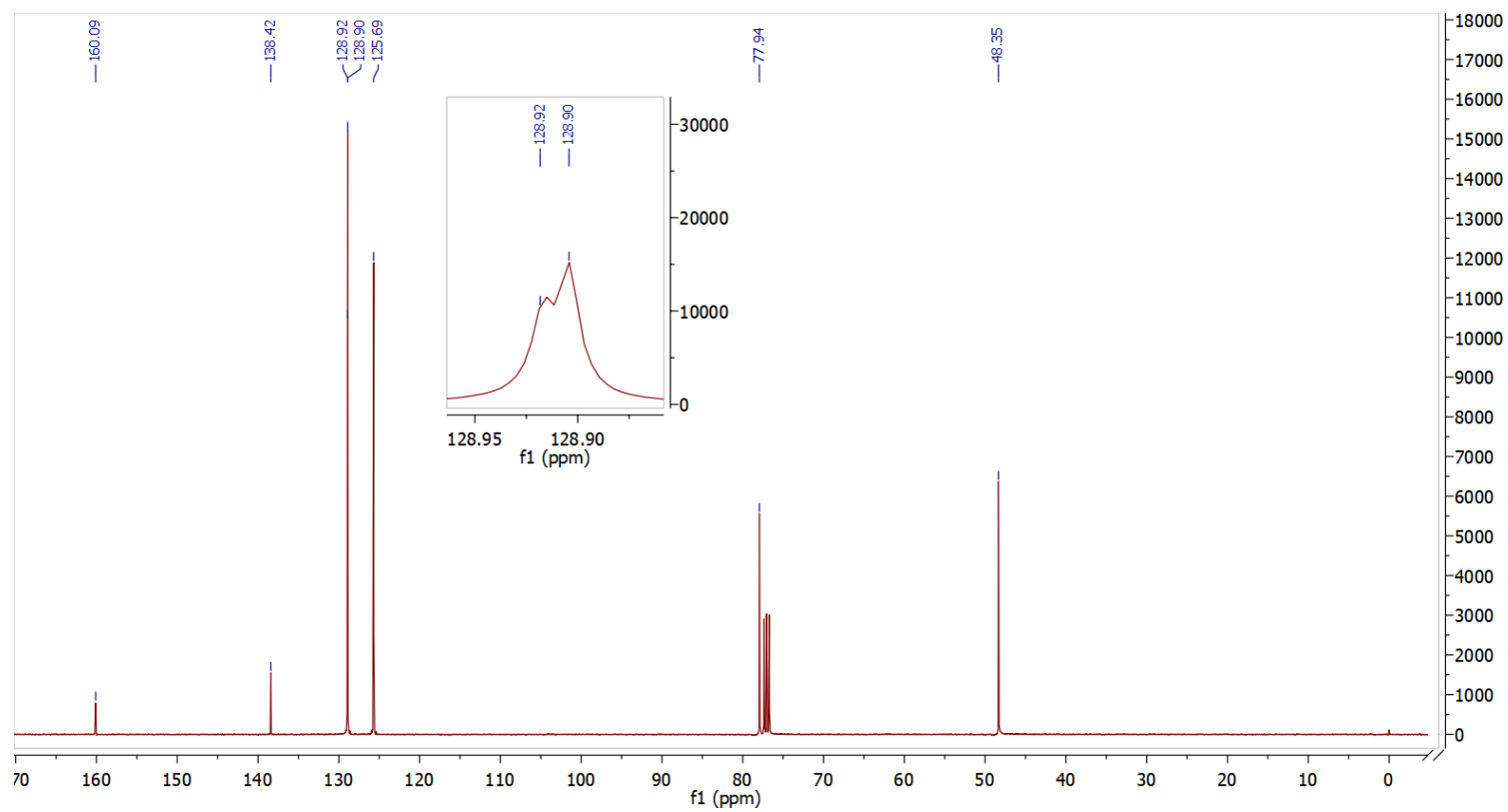
Slika S39 EIMS spektar 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**).

Slika S40 EIMS spektar *rac*-barbarina (**18**)

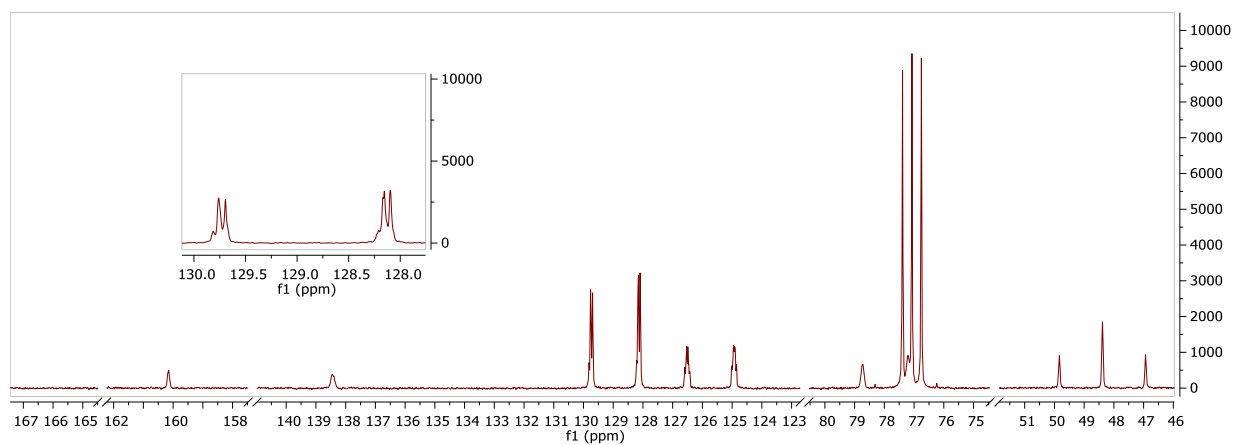
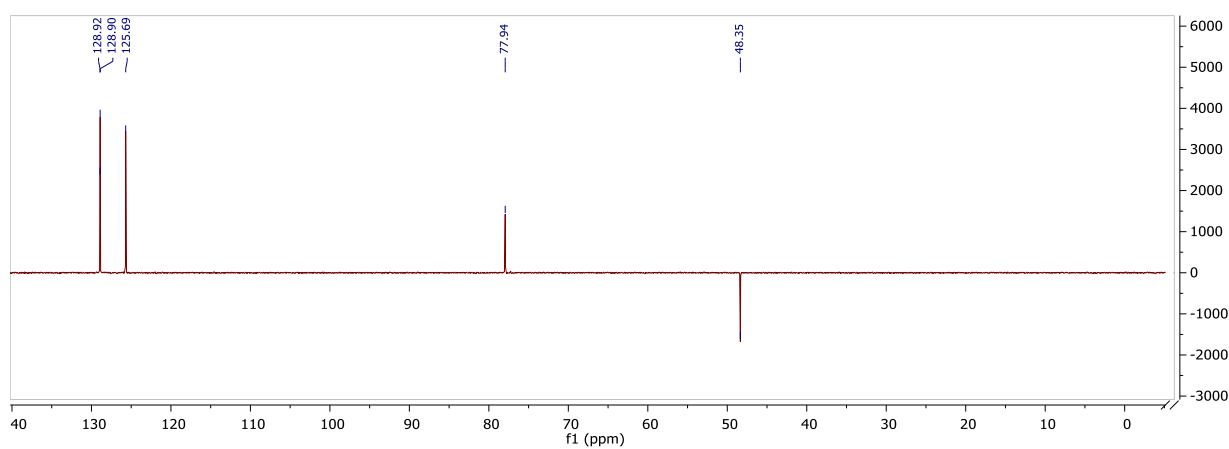
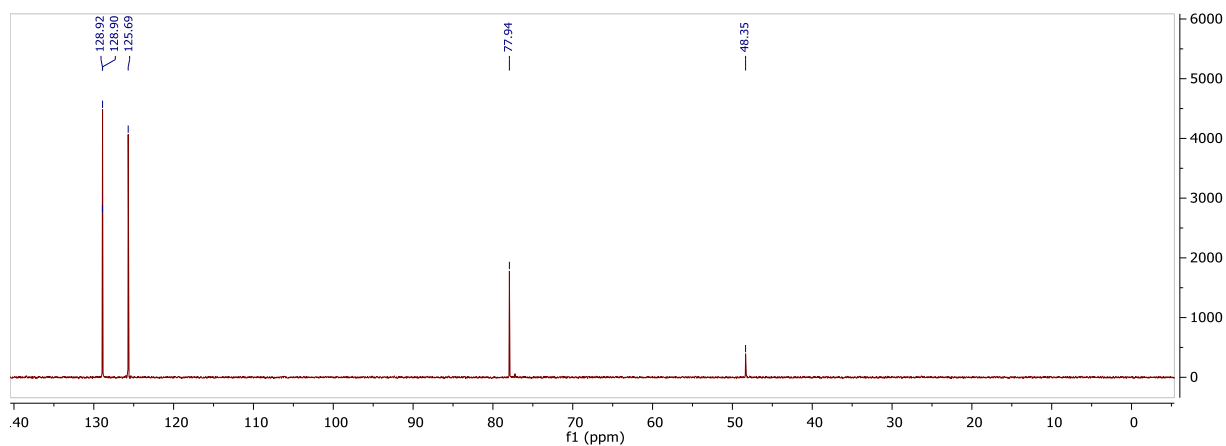
Slika S41 ¹H NMR spektar *rac*-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (*rac*-barbarin, **18**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).



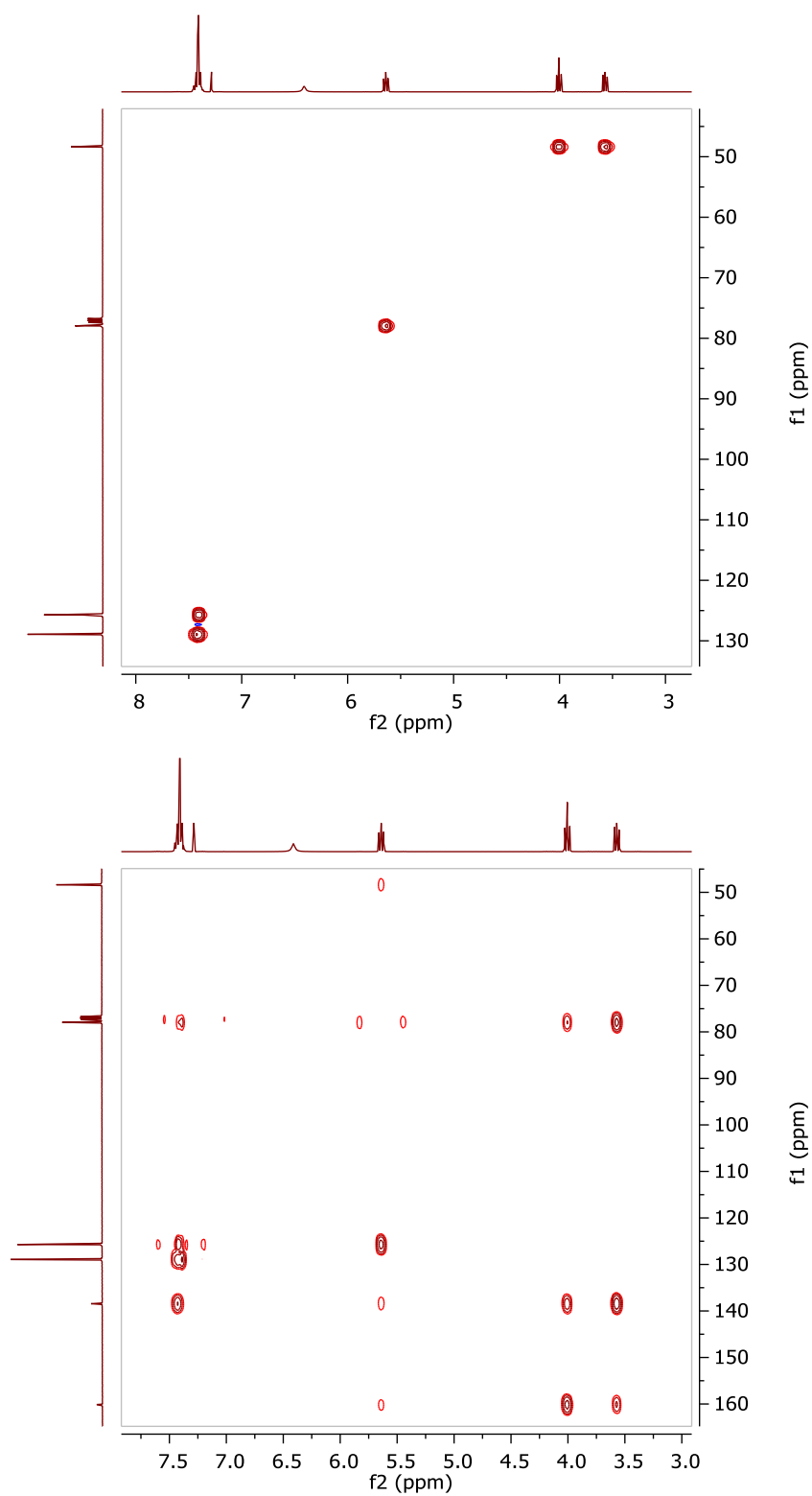
Slika S1 ^1H NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).



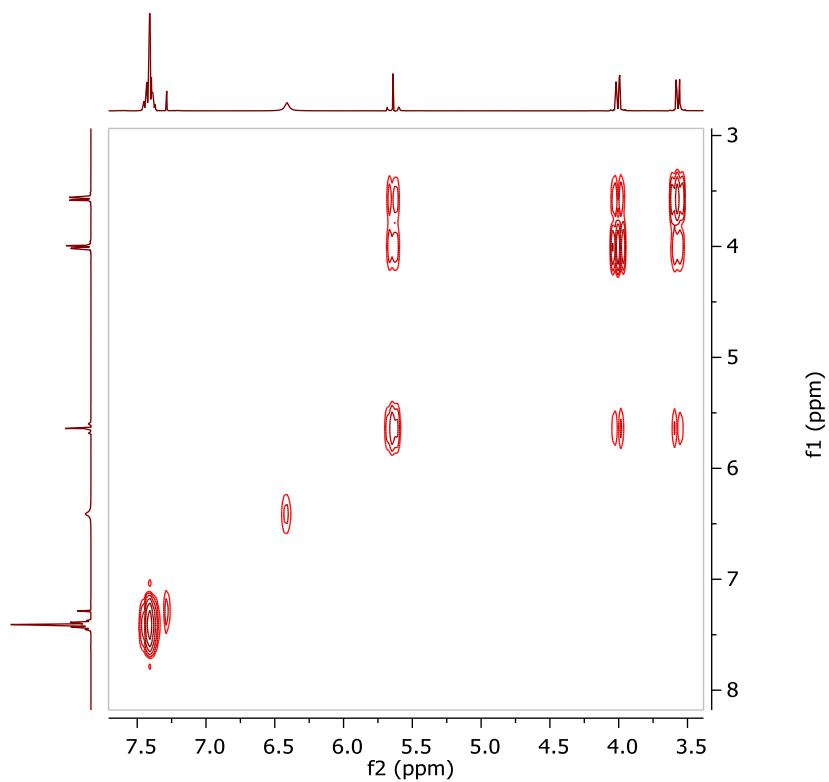
Slika S2 ^{13}C NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



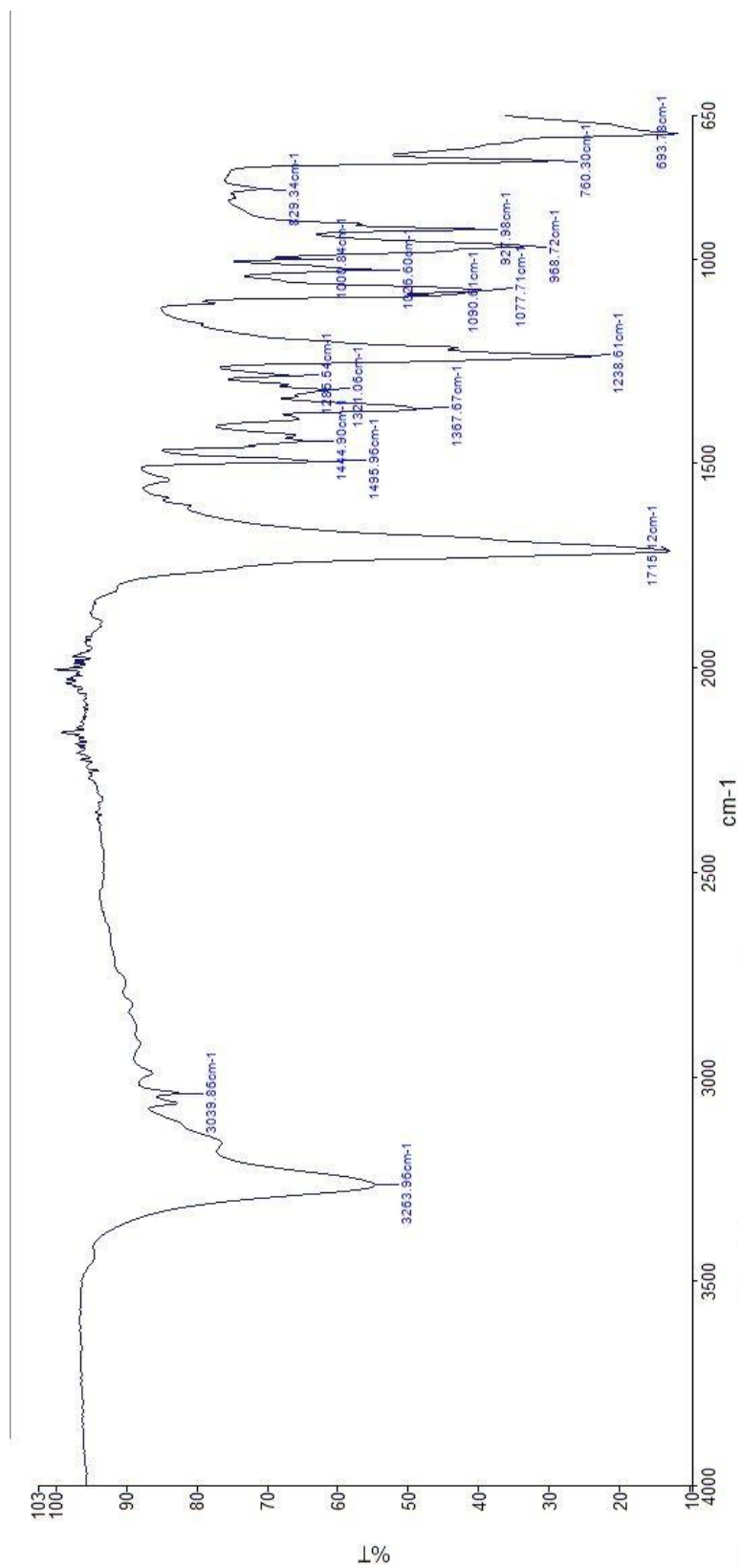
Slika S3 DEPT45 (gore), DEPT135 (u sredini) i $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR (dole) spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



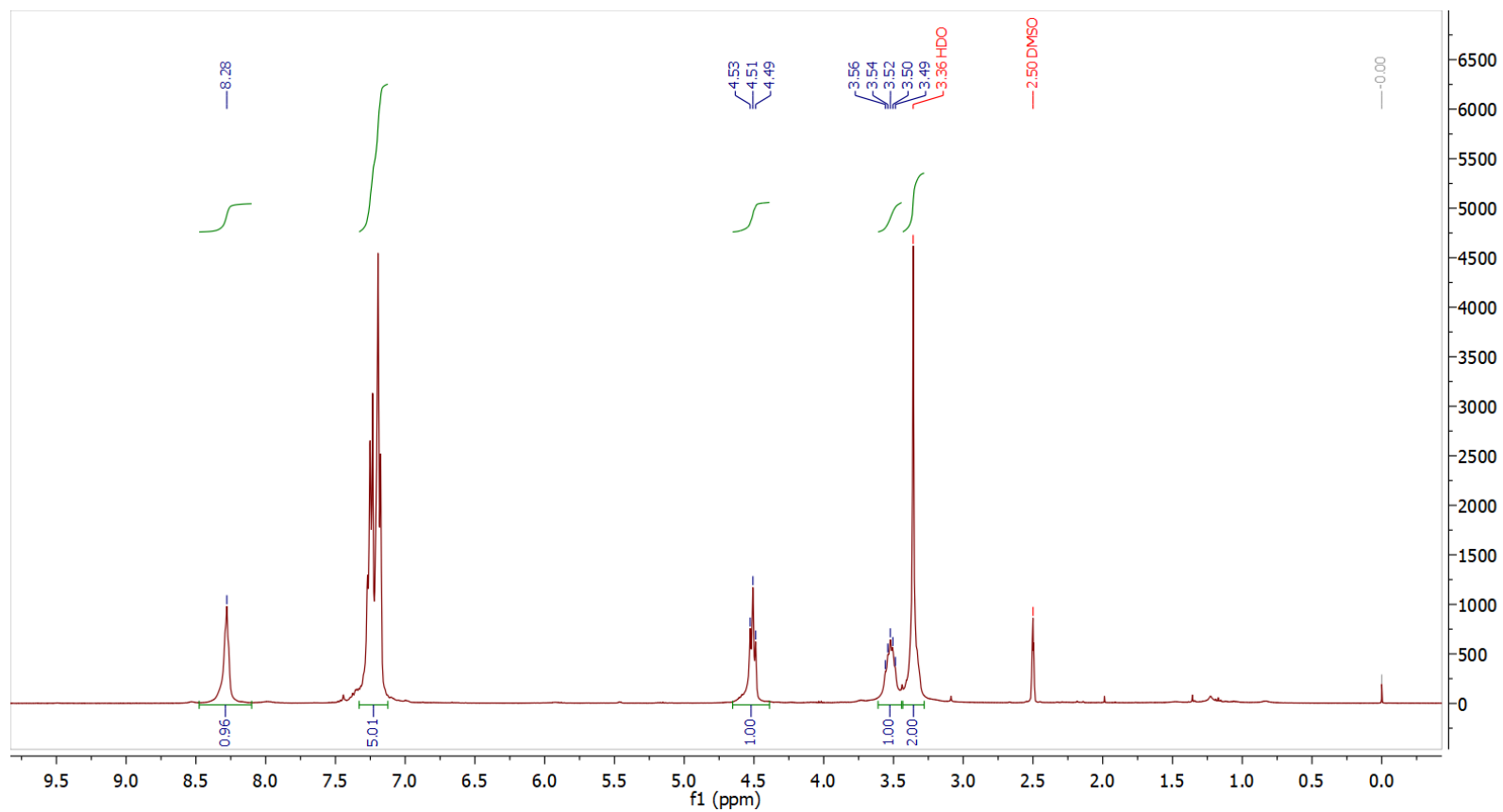
Slika S4 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl₃, 20 °C).



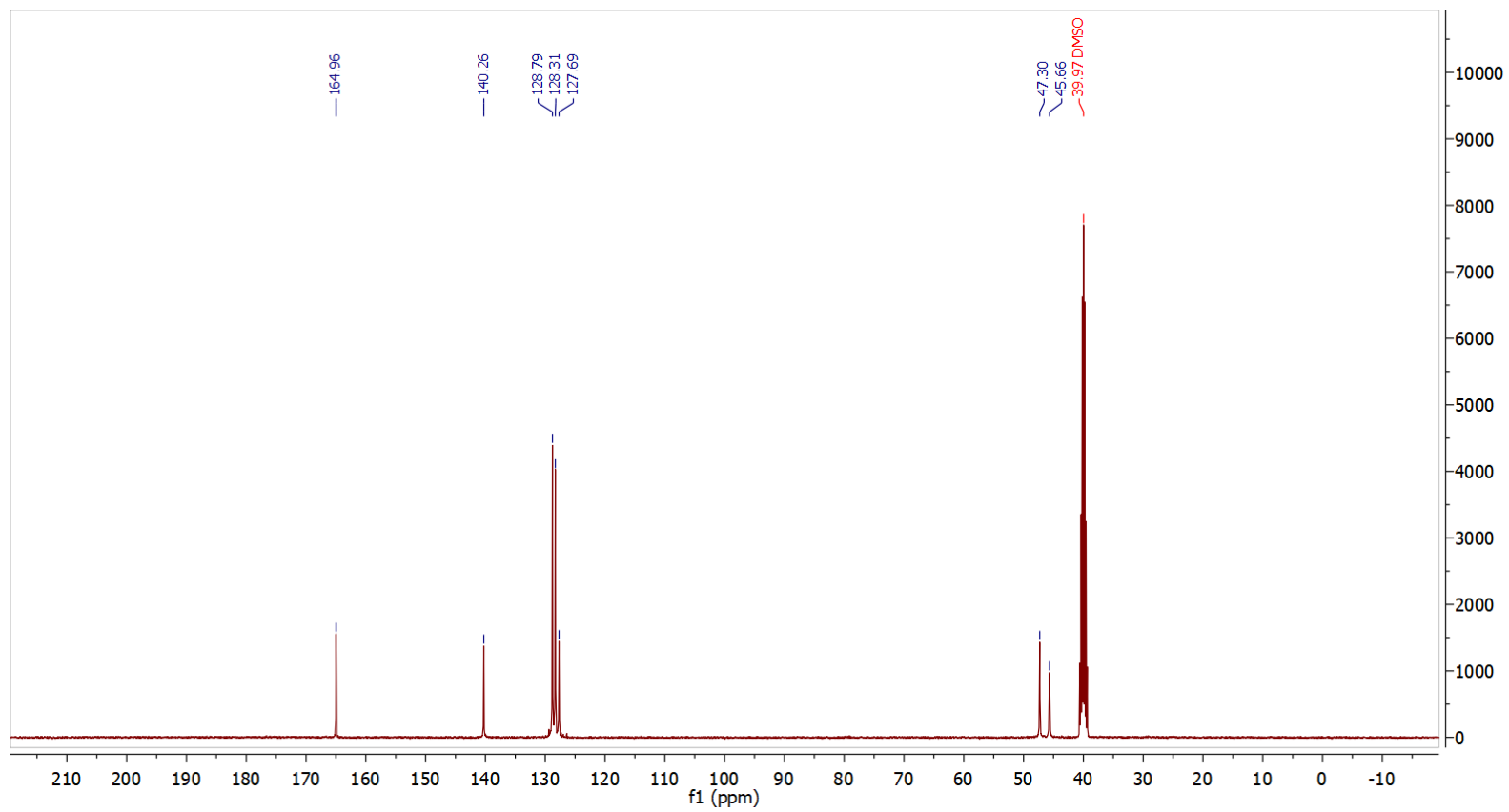
Slika S5 ^1H - ^1H COSY NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (**20**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).



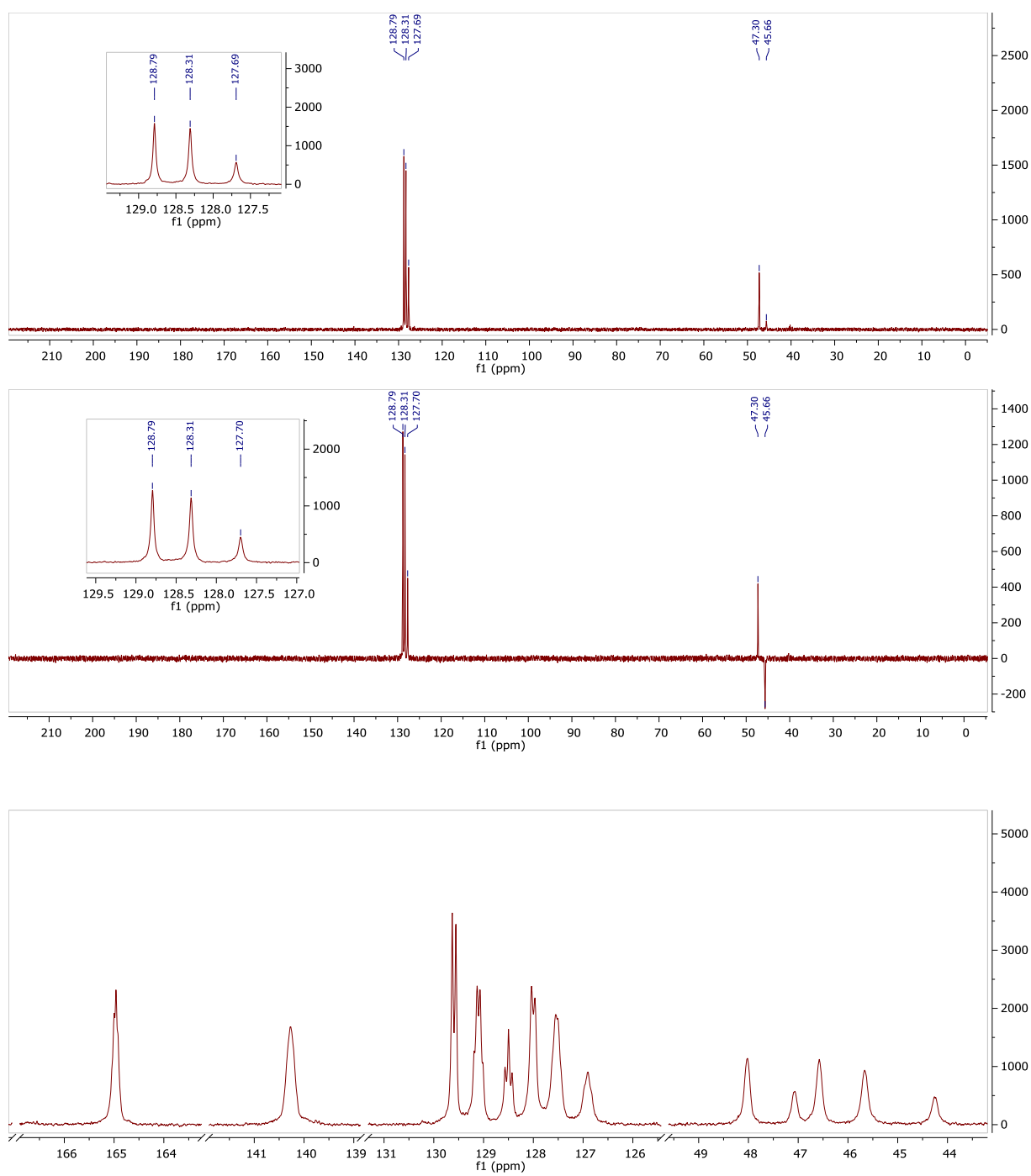
Slika S6 IR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-ona (rezedin) (20).



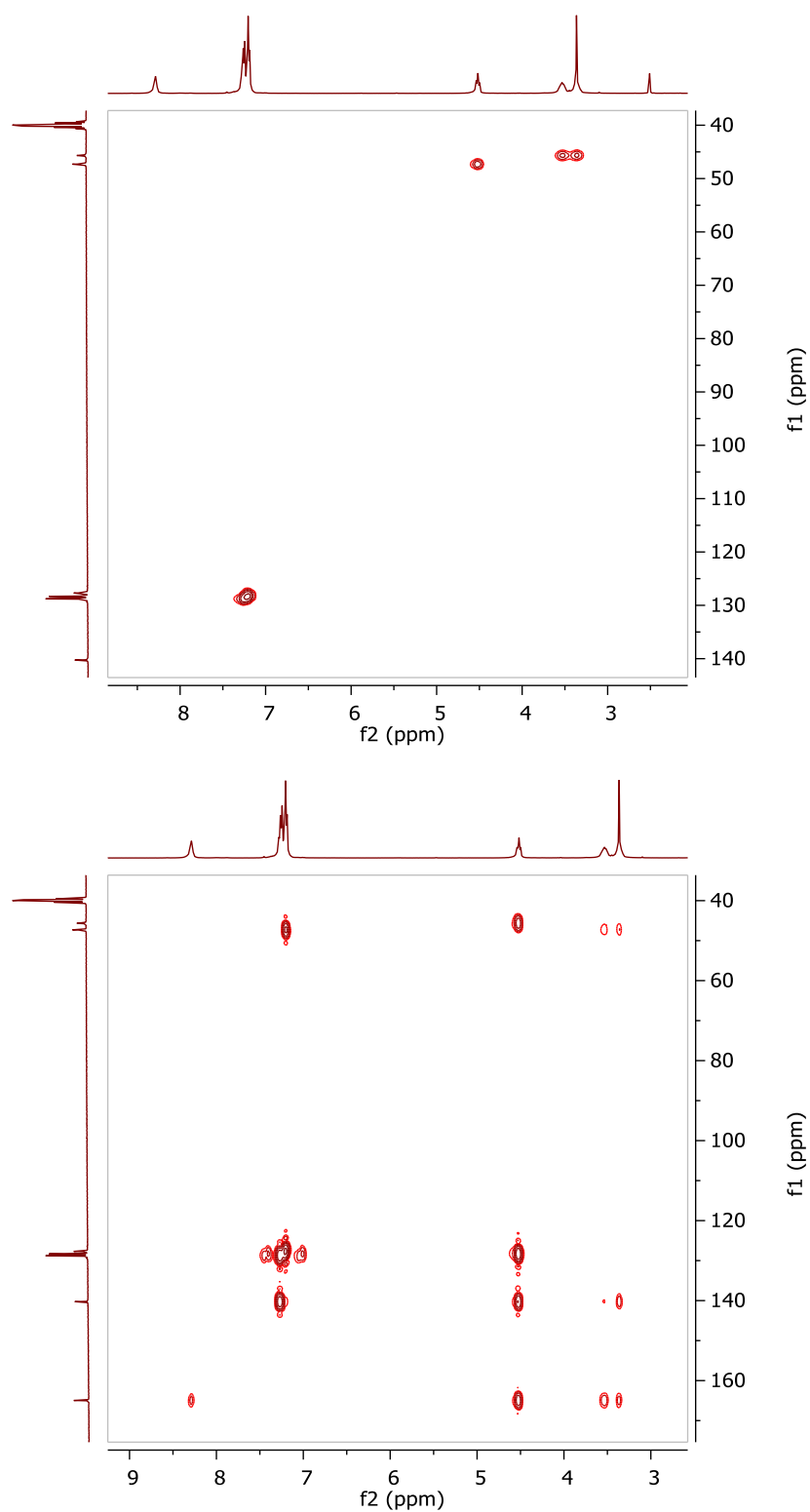
Slika S7 ^1H NMR spektar 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) (DMSO-d_6 , 400 MHz, 20 °C).



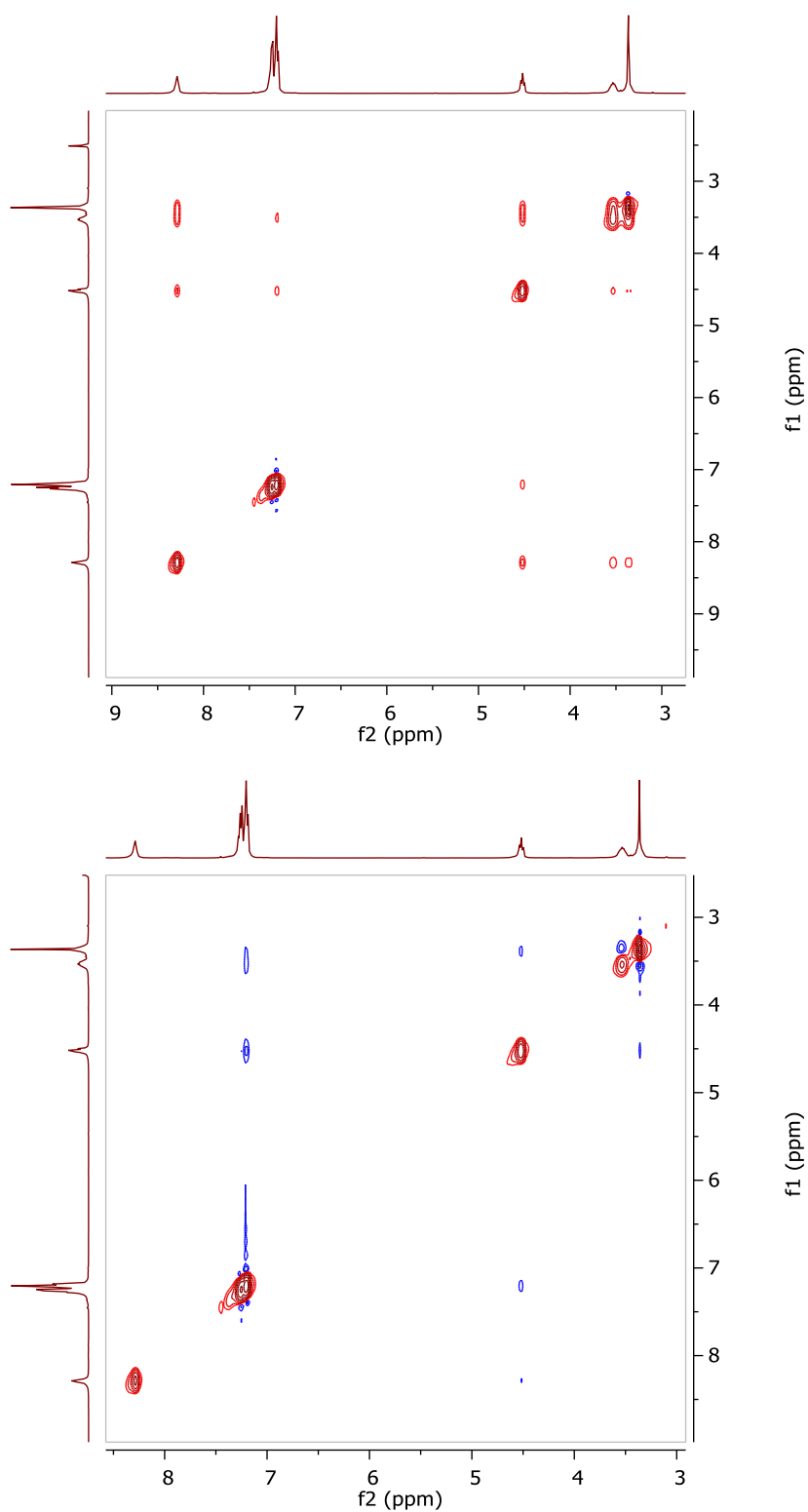
Slika S8 ^{13}C NMR spektar 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) (DMSO-d_6 , 100.6 MHz, 20 °C).



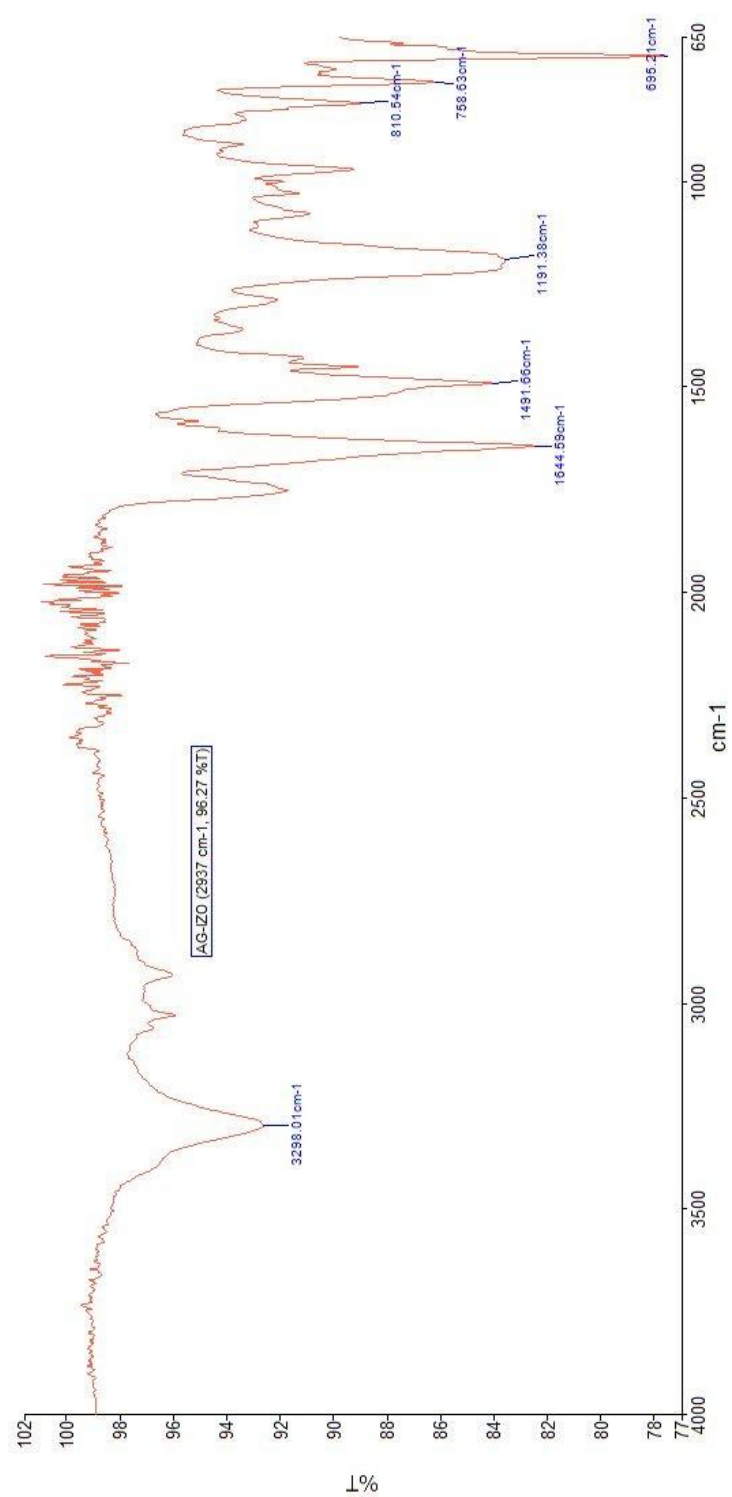
Slika S9 DEPT45 (gore), DEPT135 (u sredini) i $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR spektar (dole) 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) (DMSO-d_6 , 100,6 MHz, 20 °C).



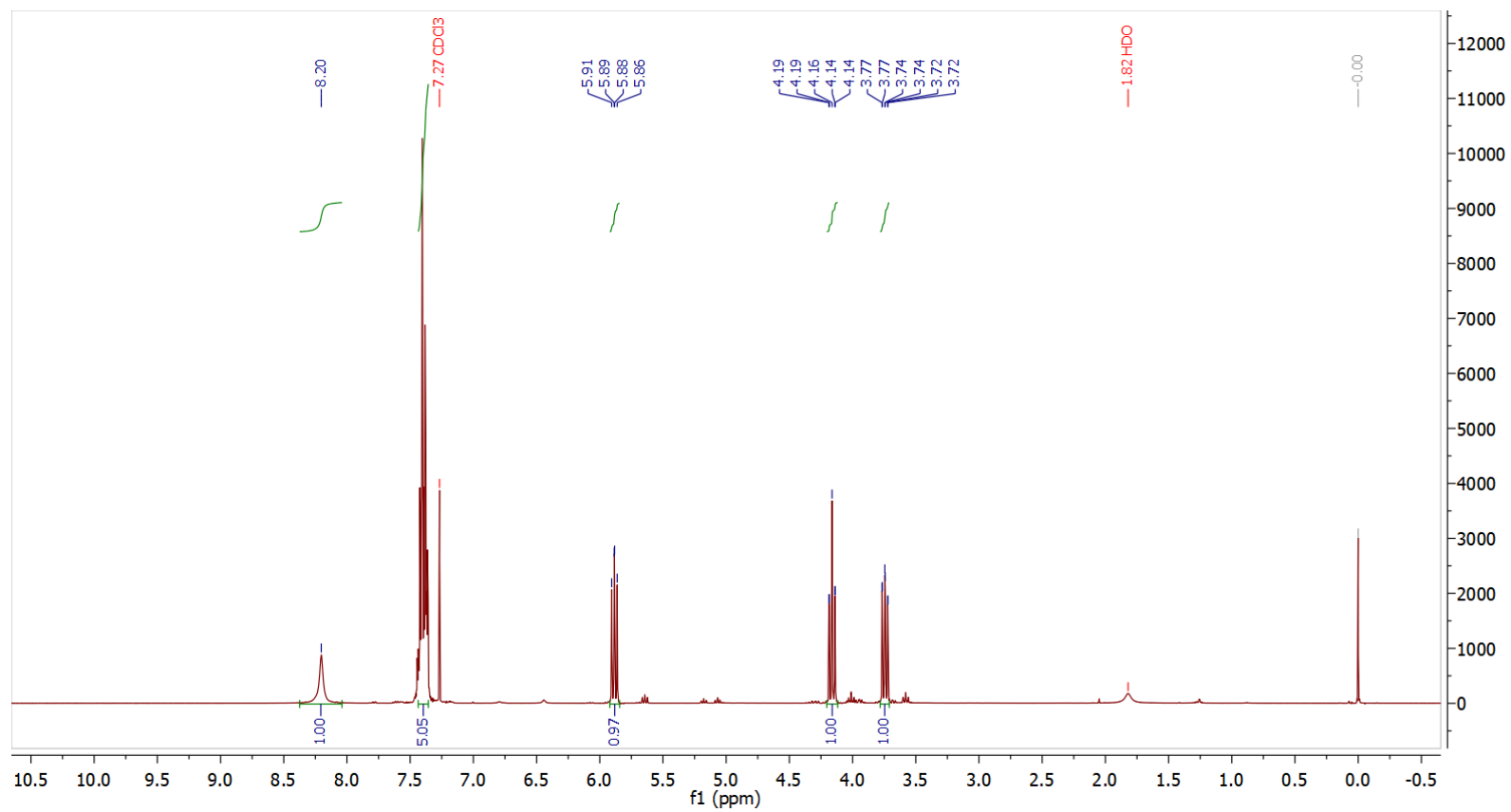
Slika S10 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) (DMSO_{d6}, 20 °C).



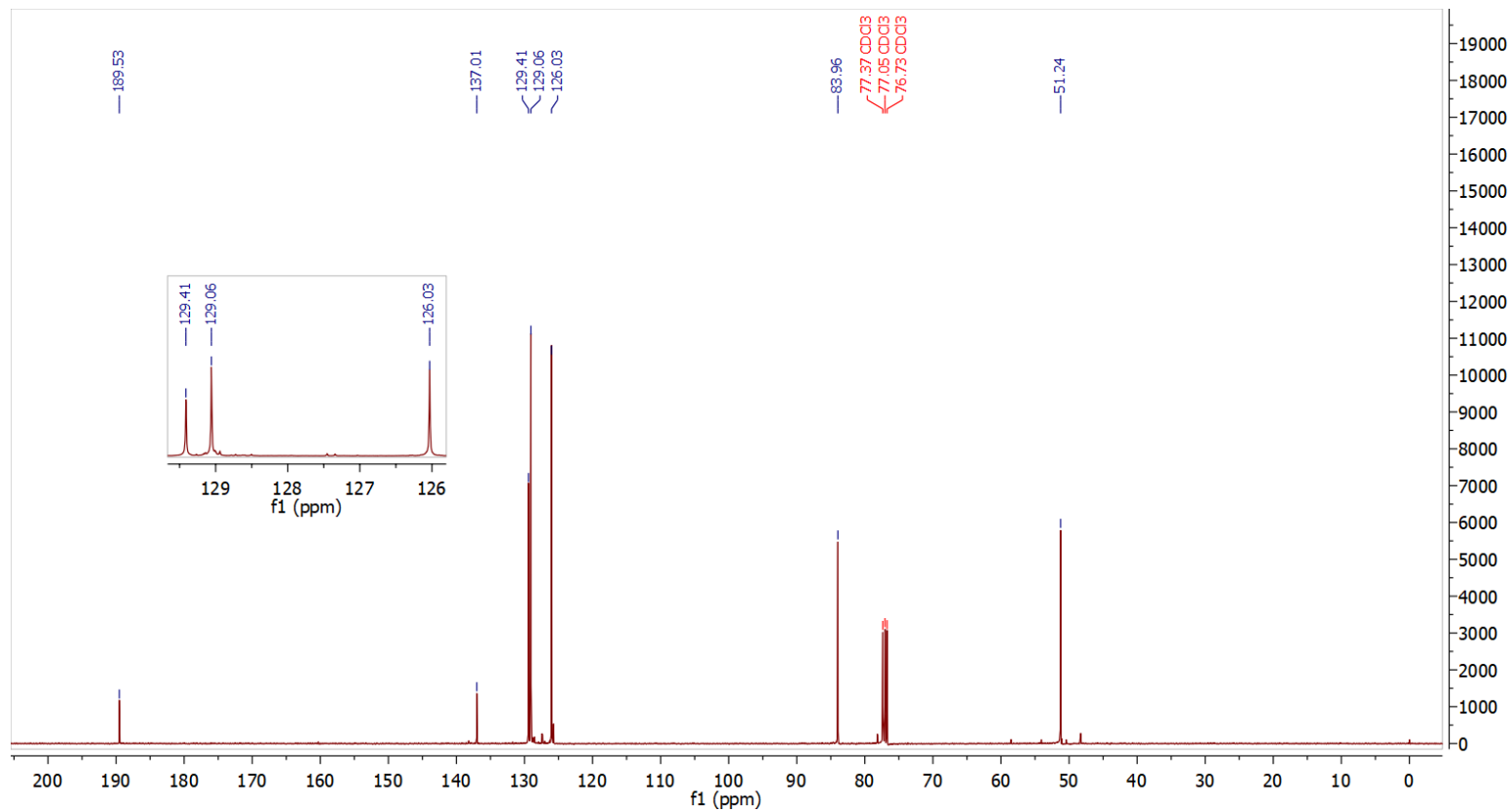
Slika S11 ¹H-¹H COSY i NOESY NMR spektri 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (**97**) (DMSO_{d6}, 400 MHz, 20 °C).



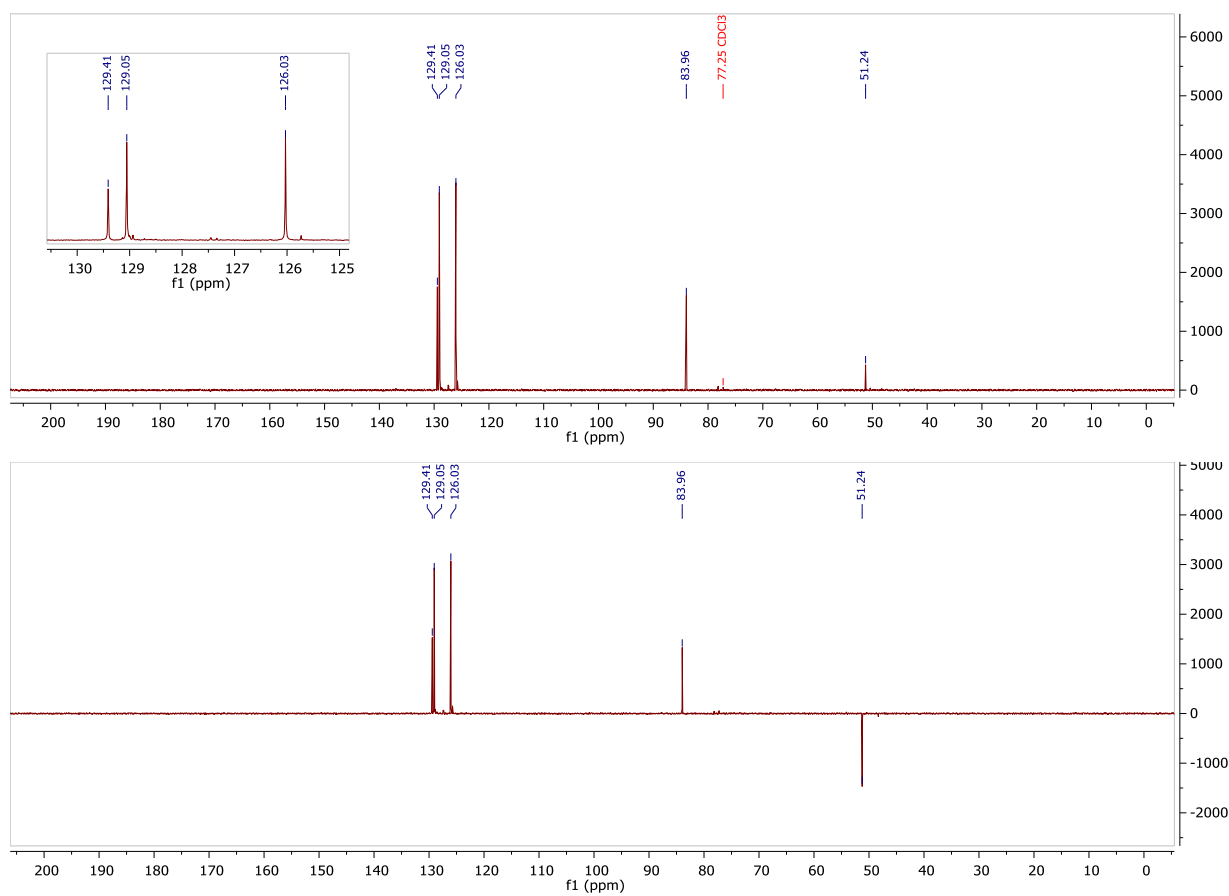
Slika S12 IR spektar 5-fenil-1,3-tiazolidin-2-ona (97).



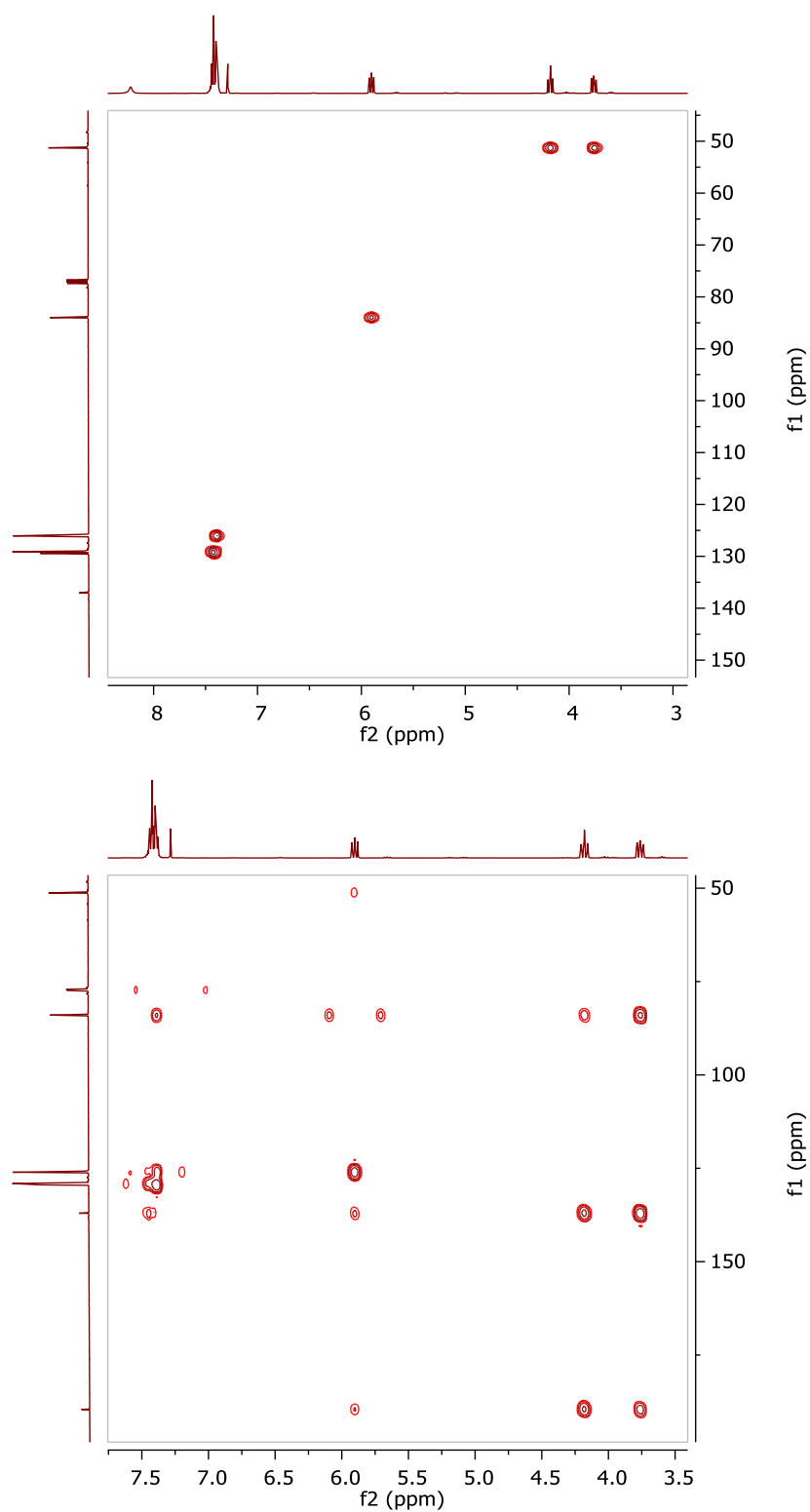
Slika S13 ^1H NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).



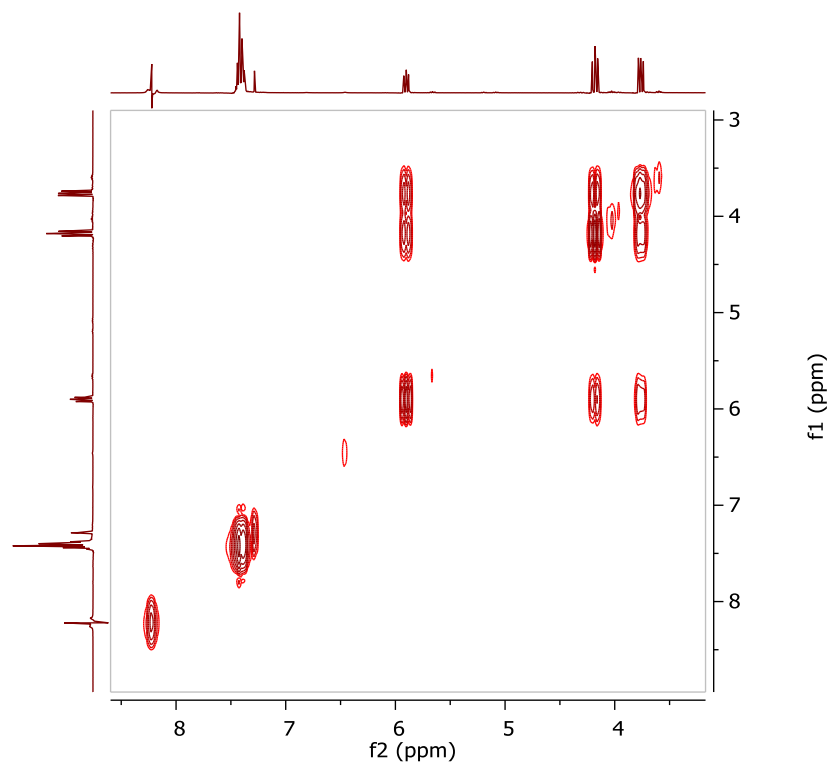
Slika S14 ^{13}C NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



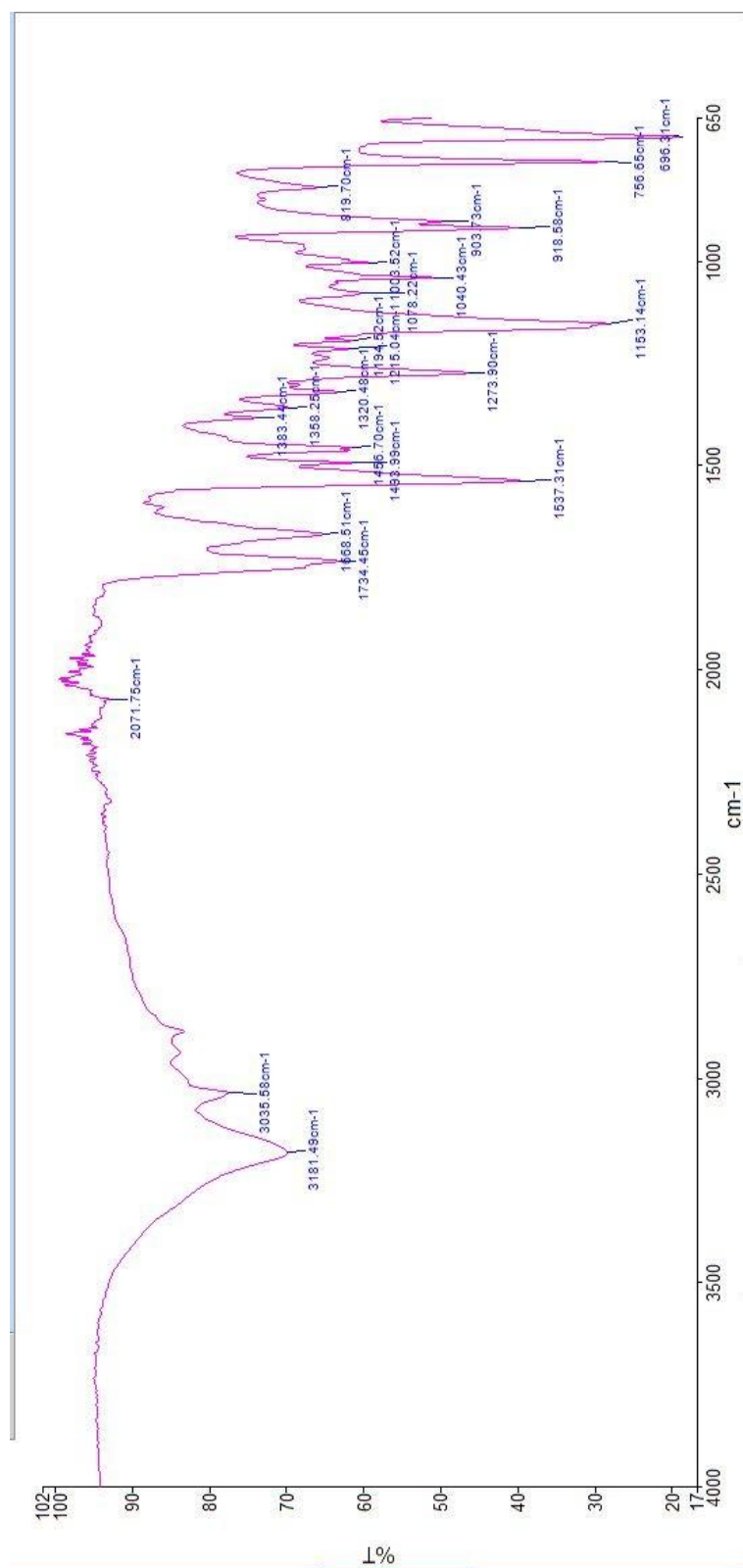
Slika S15 DEPT45 (gore) i DEPT135 (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3- oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



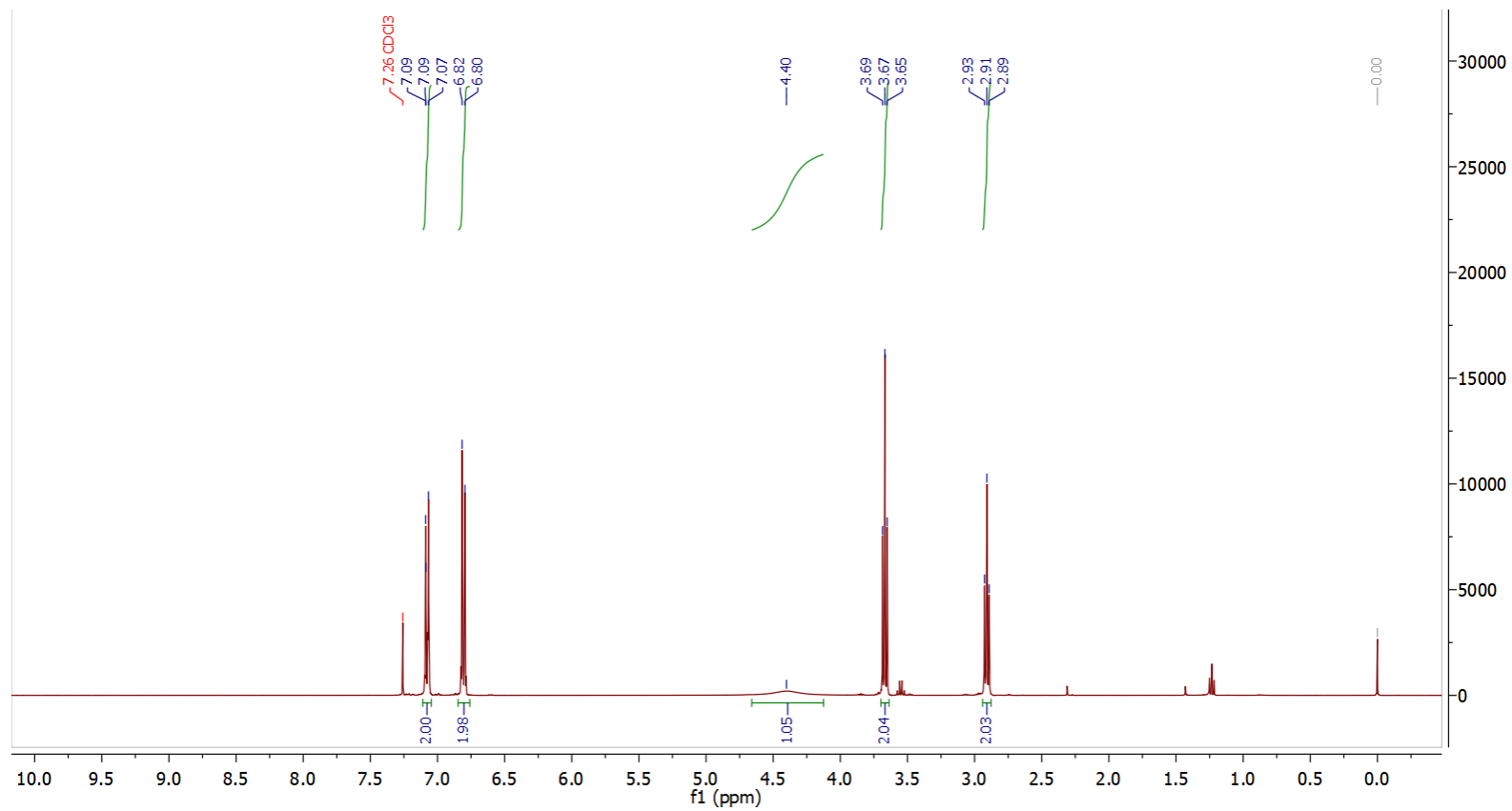
Slika S16 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl₃, 20 °C).



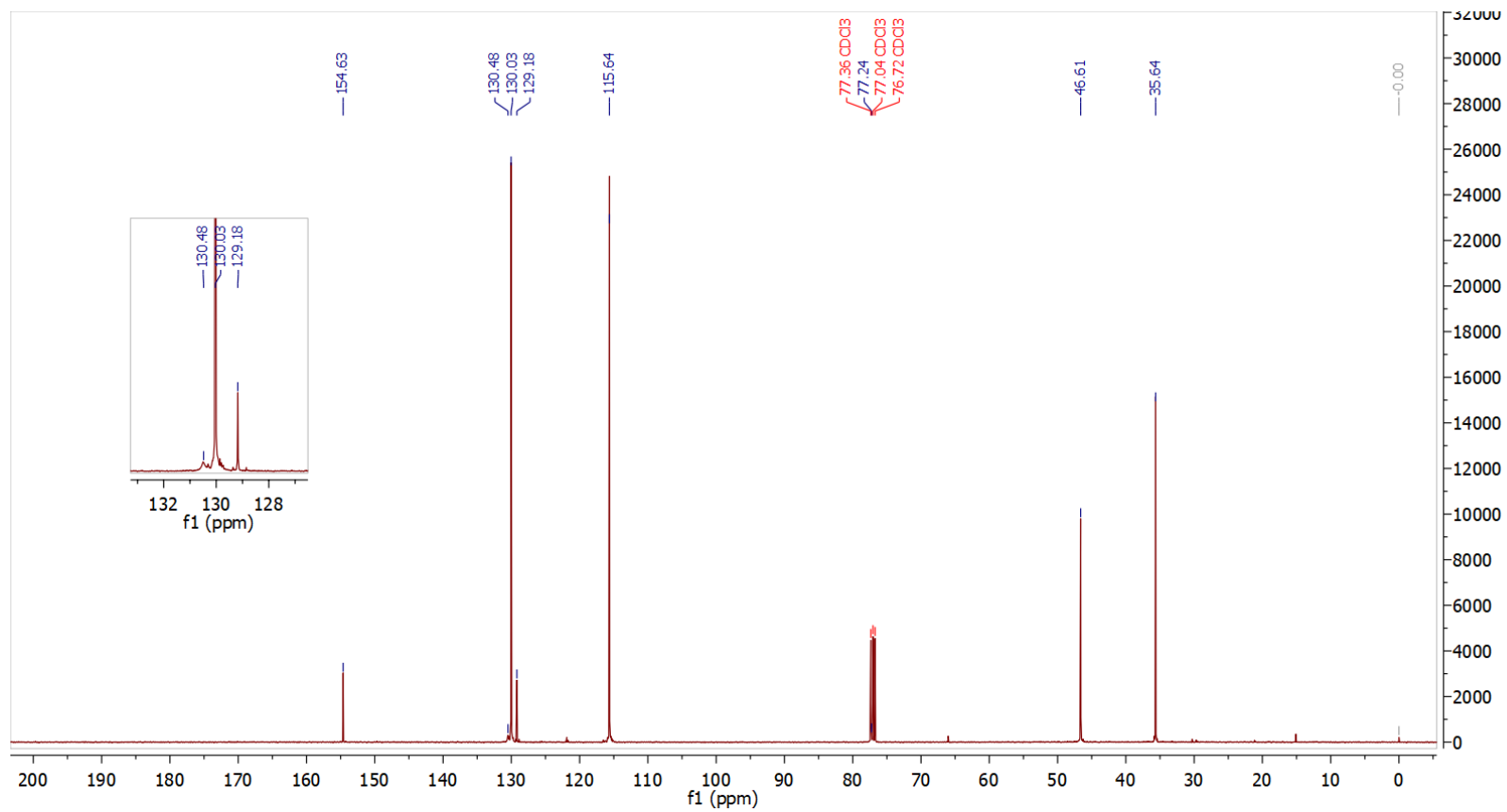
Slika S17 ^1H - ^1H COSY NMR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (*S*)-barbarin) (**18b**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).



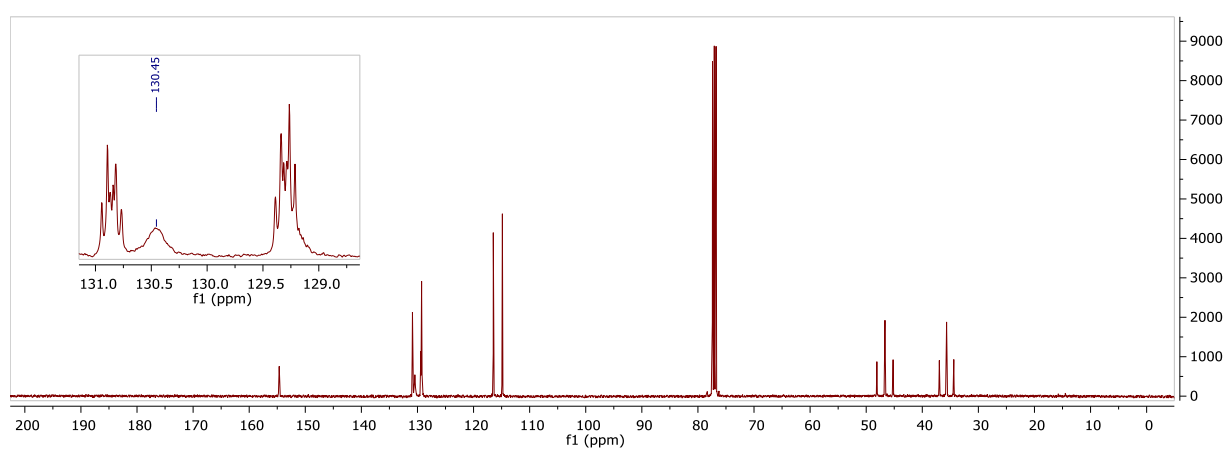
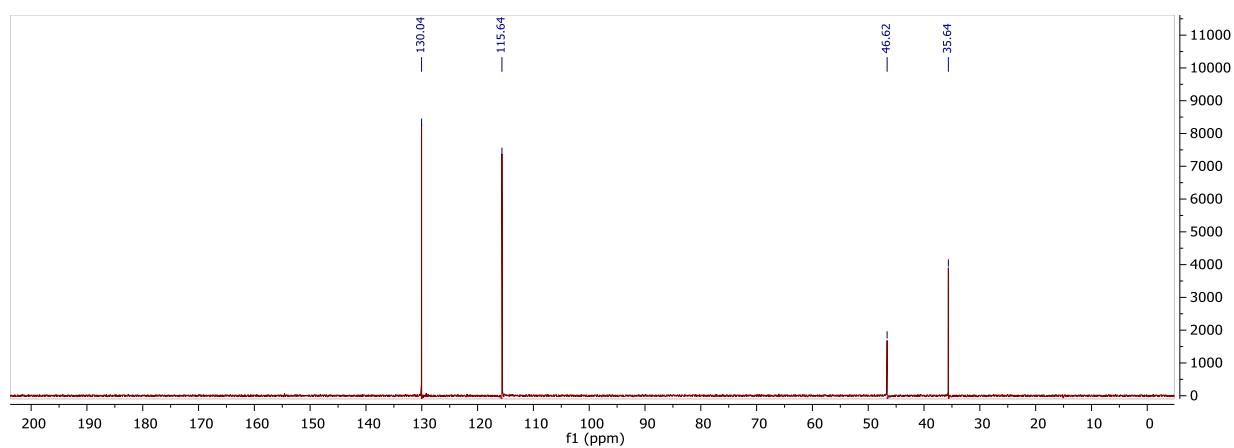
Slika S18 IR spektar 5-fenil-1,3-oksazolidin-2-tiona (sin. (S)-barbarin) (18b).



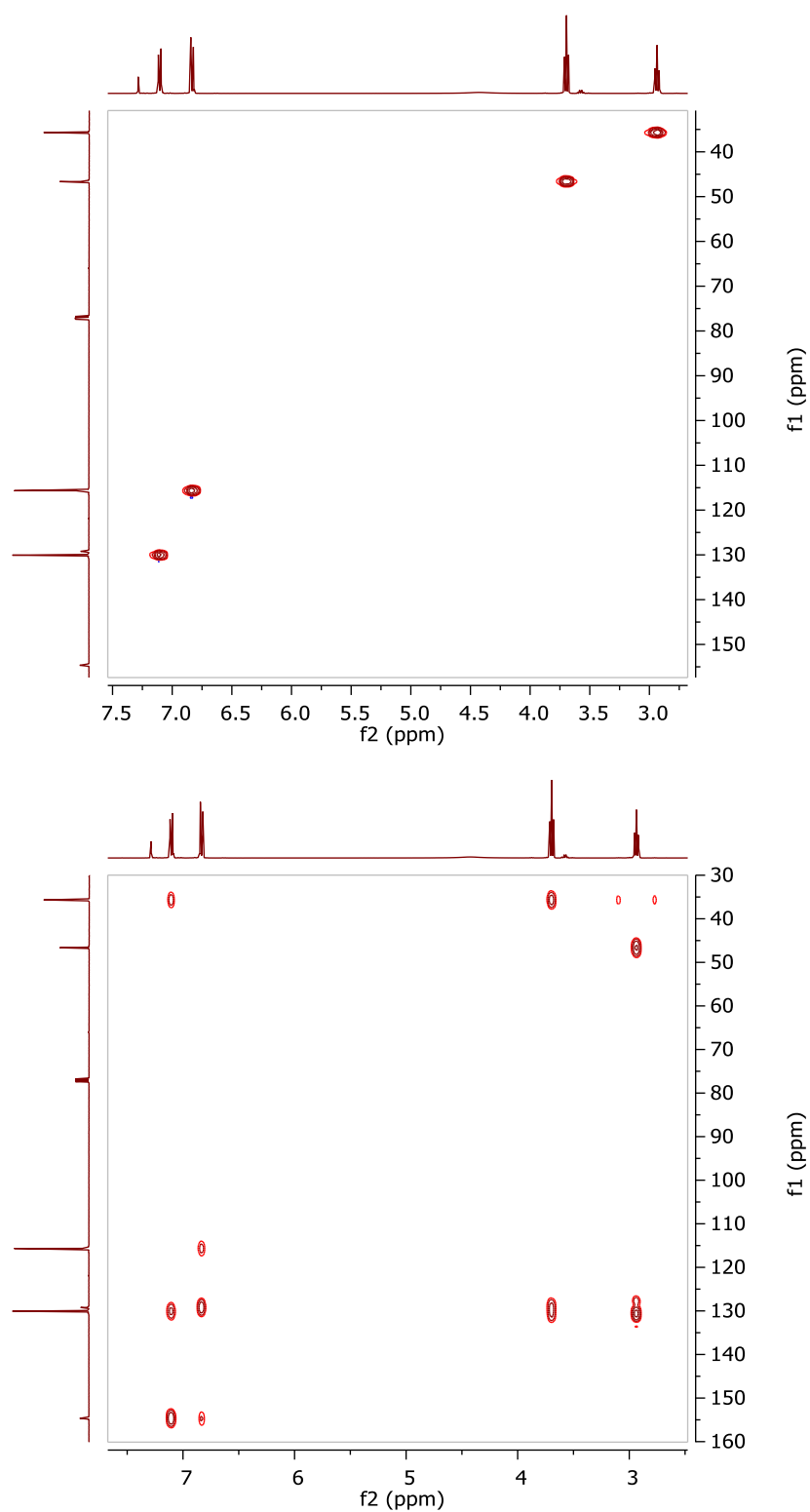
Slika S19 ¹H NMR spektar 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).



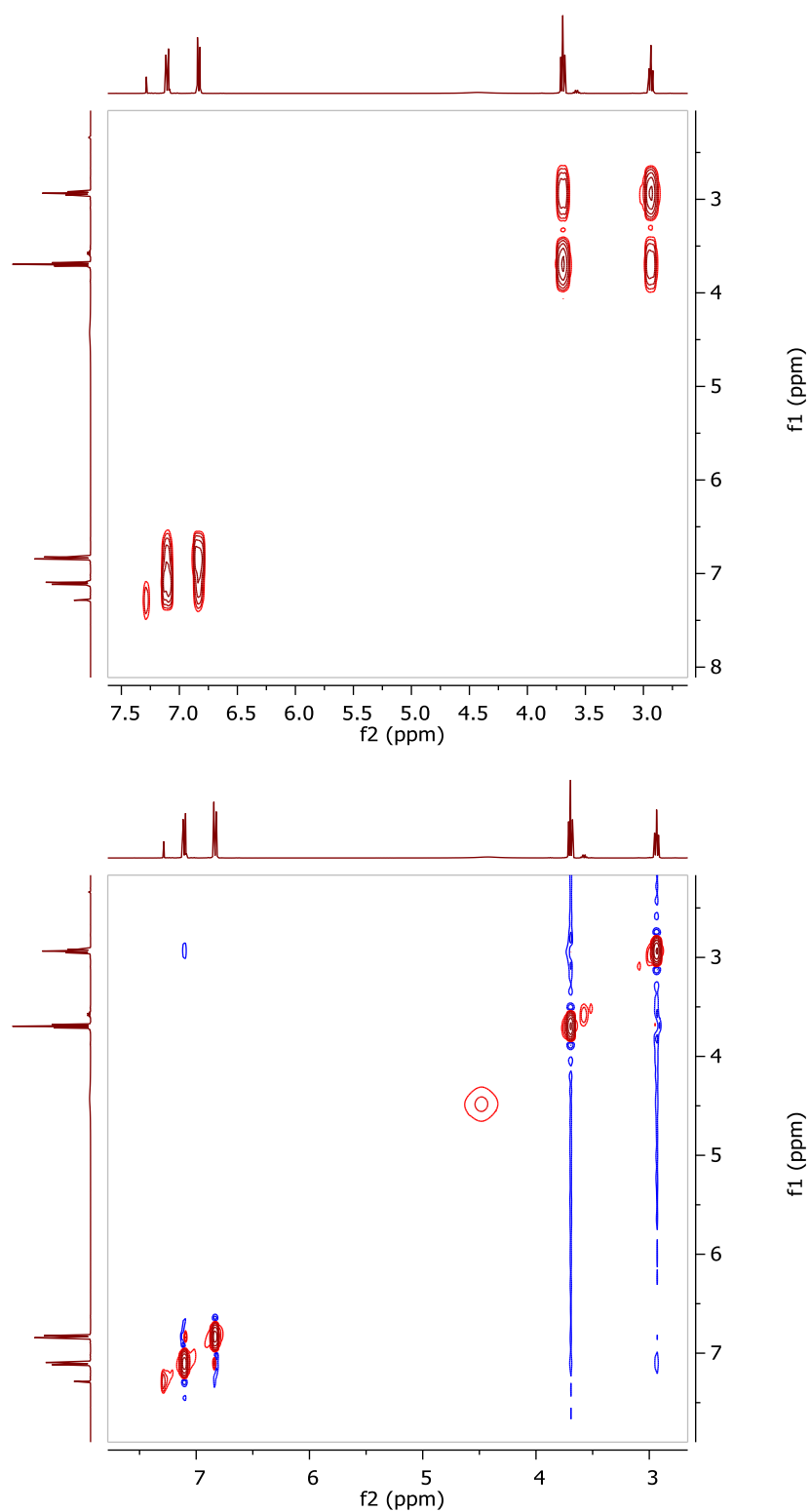
Slika S20 ^{13}C NMR spektar 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl_3 , 100.6 MHz, 20 °C).



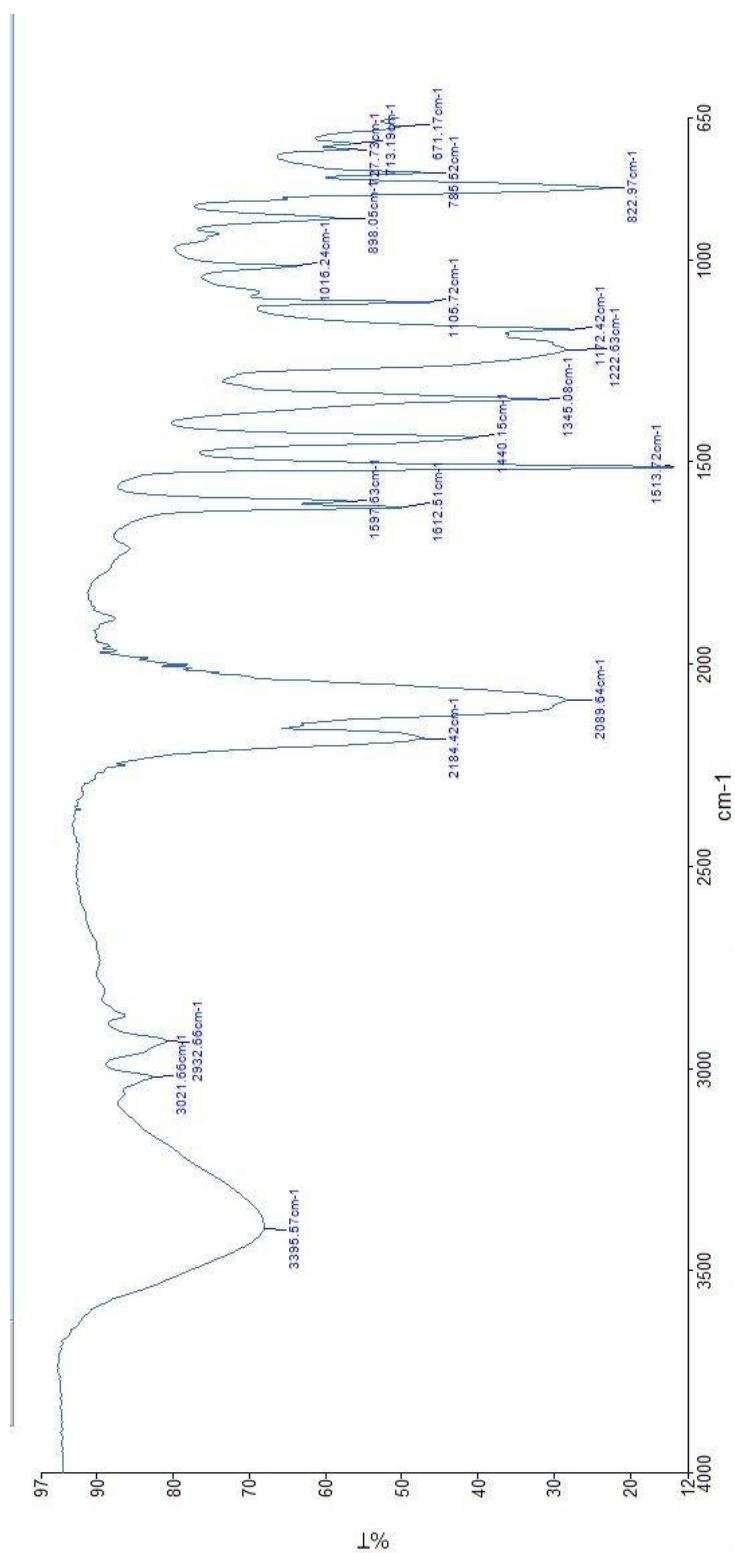
Slika S21 DEPT45 (gore) i $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spektar (dole) 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl₃, 100,6 MHz, 20 °C).



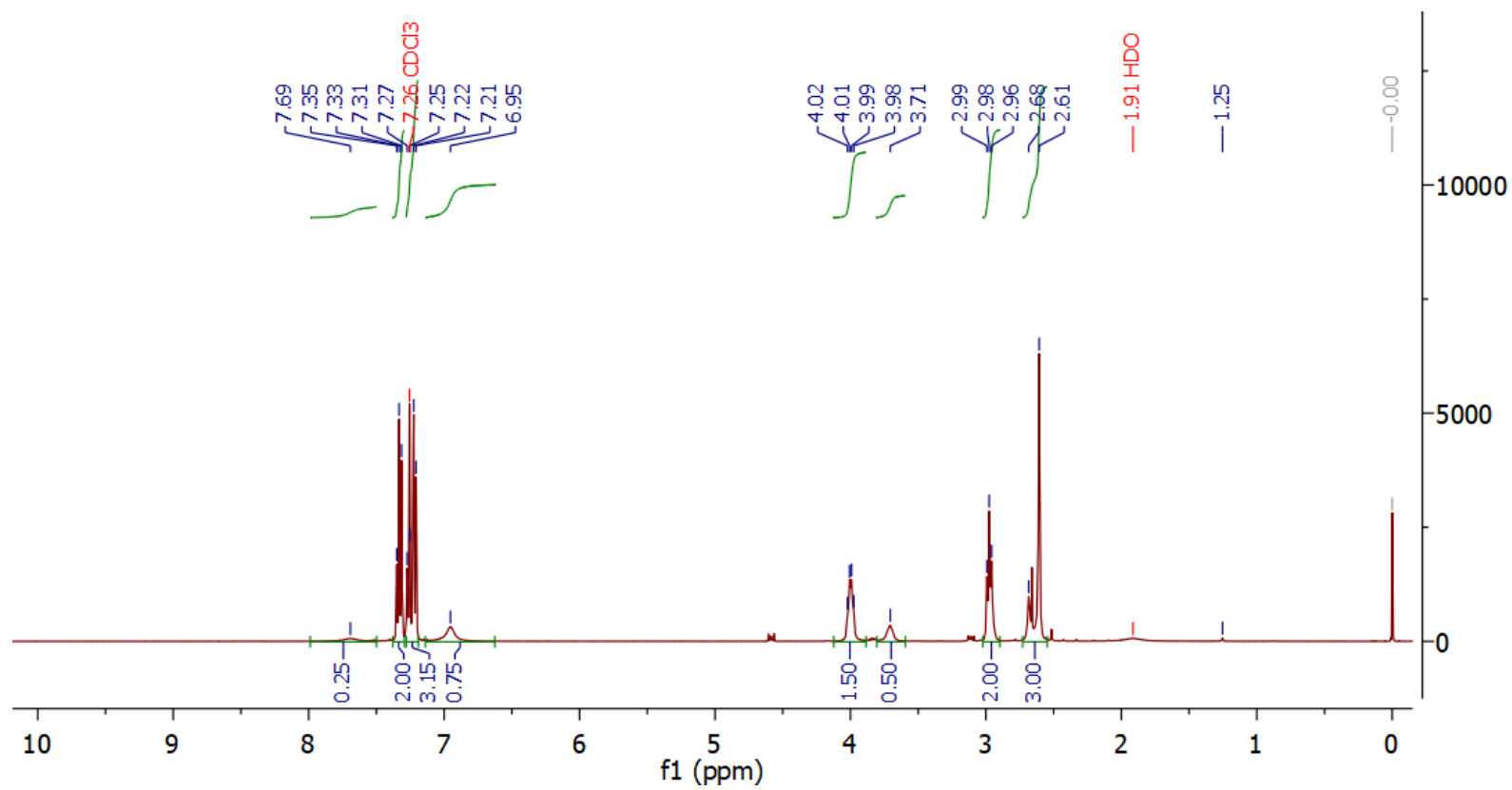
Slika S22 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl₃, 20 °C).



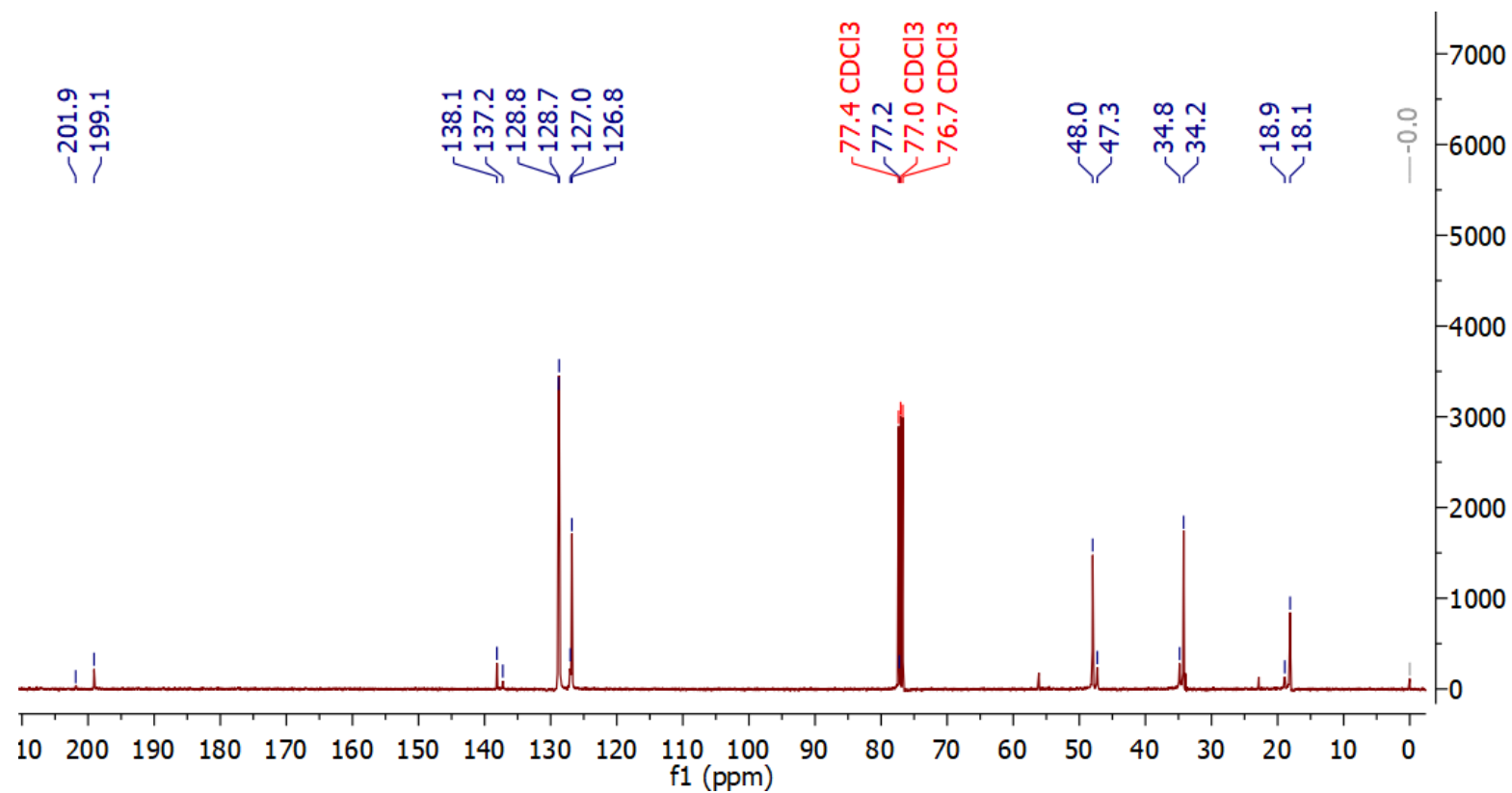
Slika S23 ^1H - ^1H COSY i NOESY NMR spektri 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (**98**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).



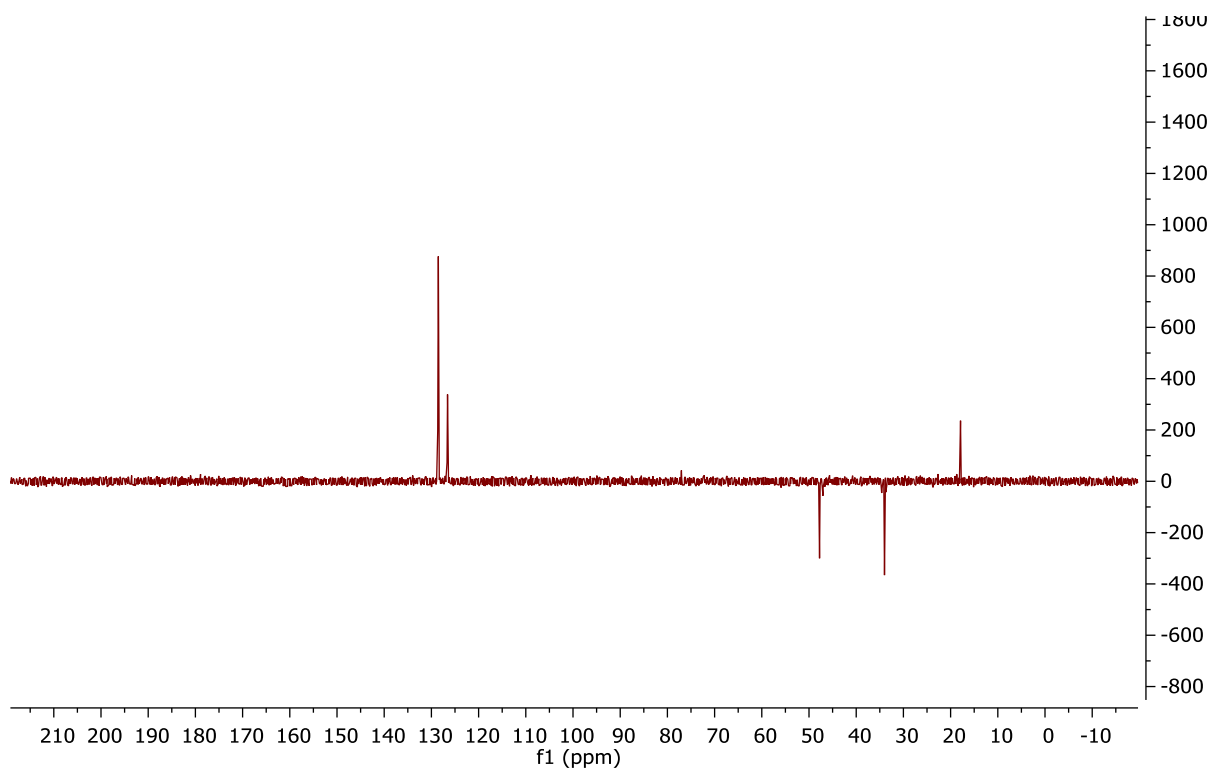
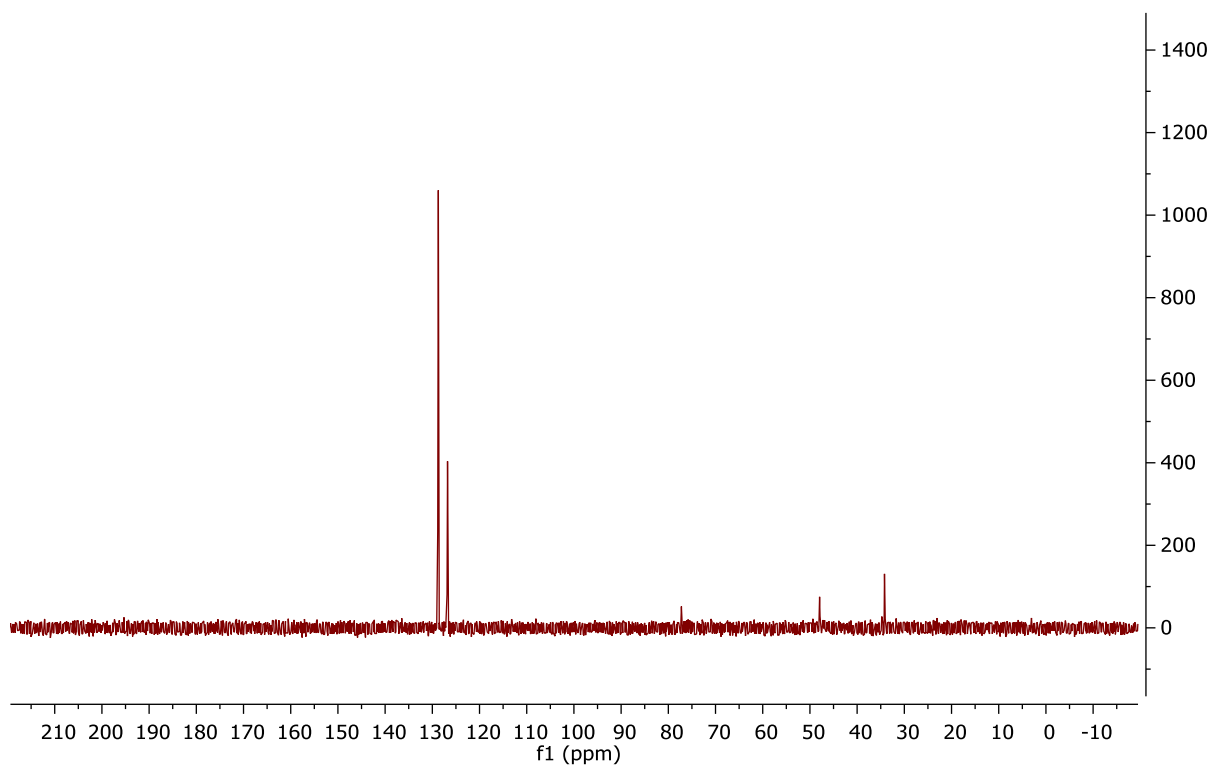
Slika S24 IR spektar 2-(4-hidroksifenil)etil-izotiocijanata (98).



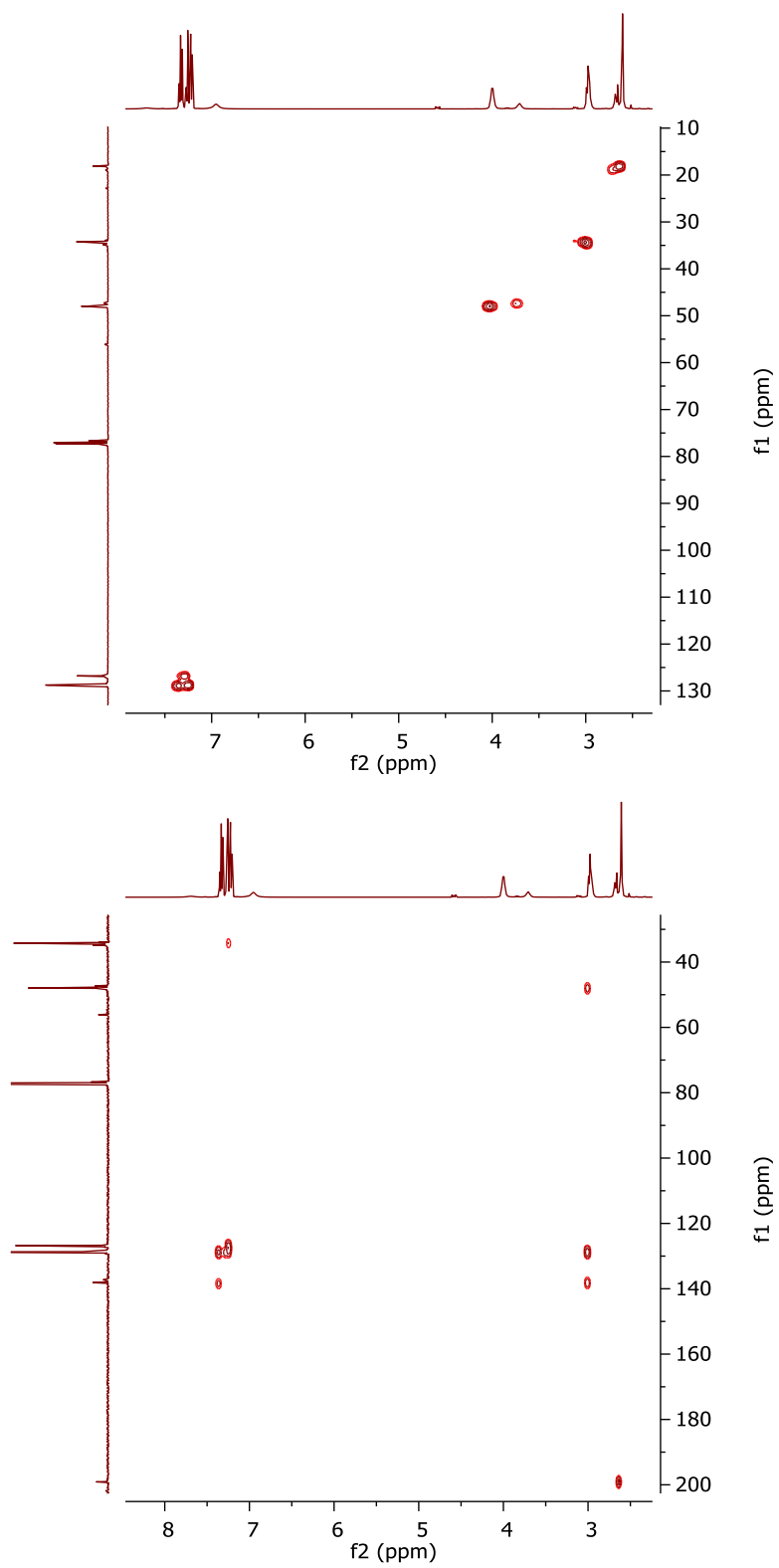
Slika S25 ^1H NMR spektar nasturleksina A (**87**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).



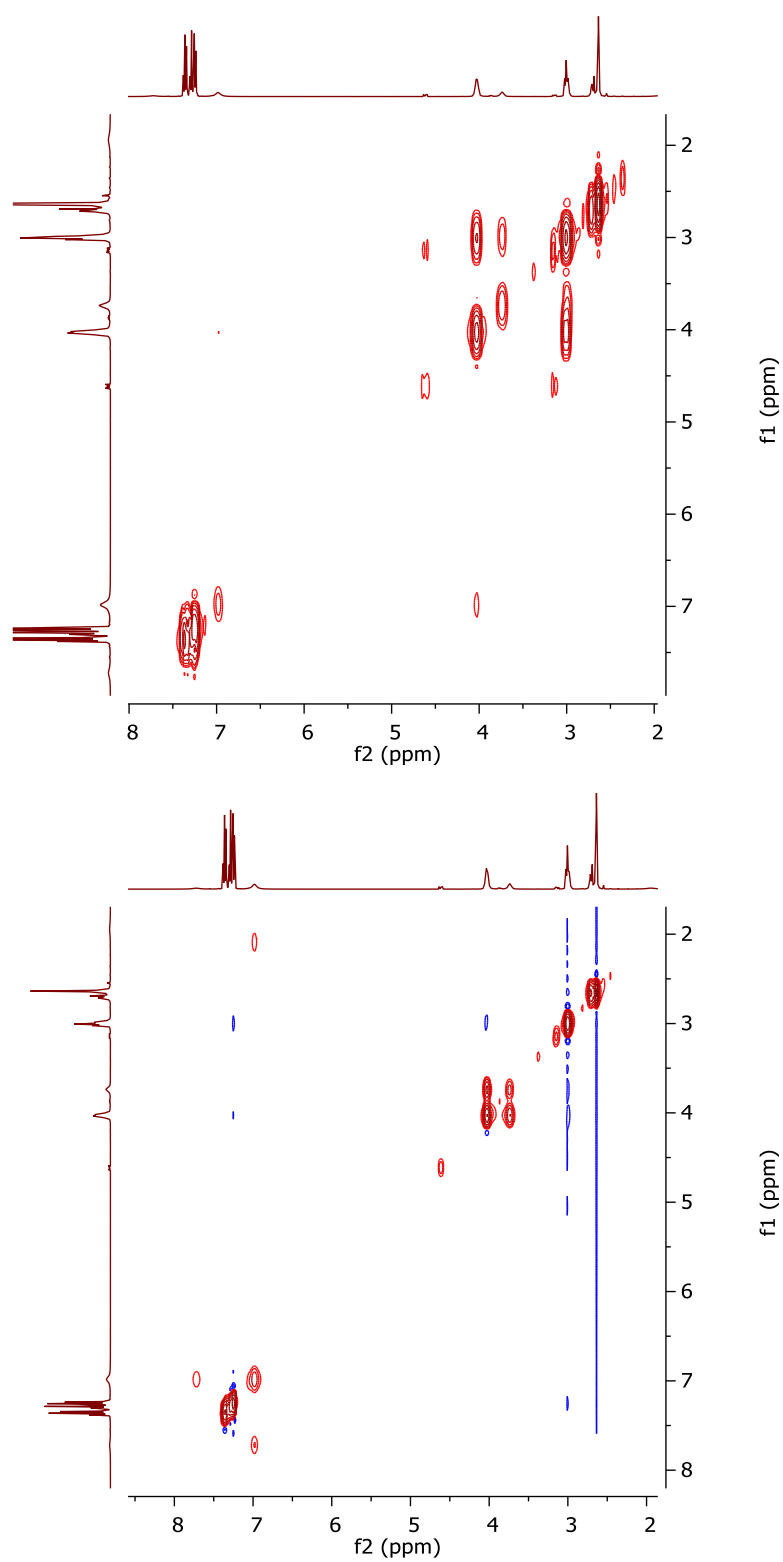
Slika S26 ^{13}C NMR spektar nasturleksina A (**87**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



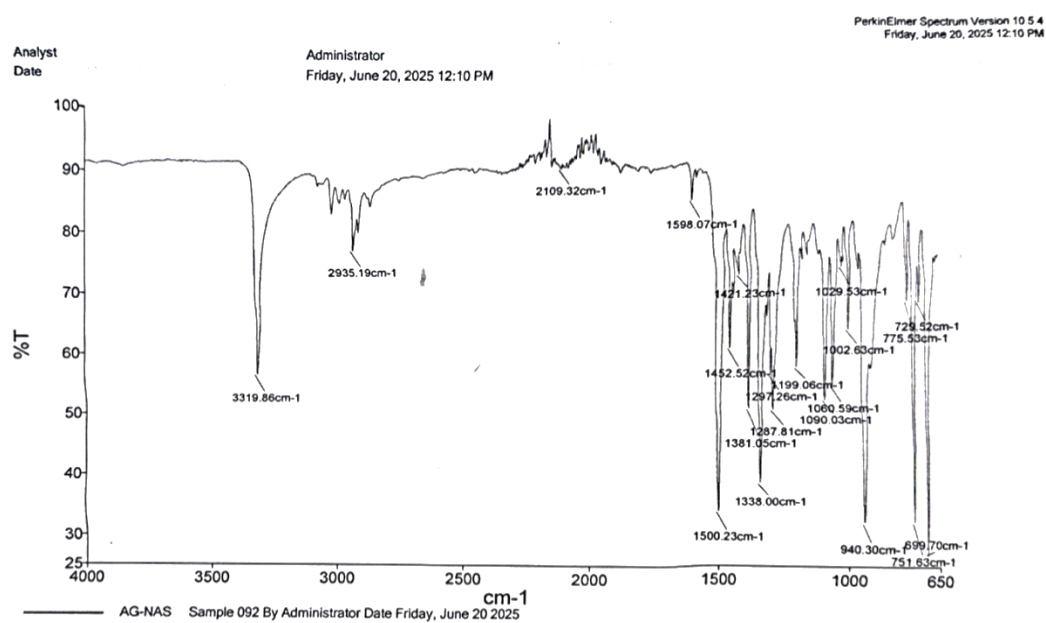
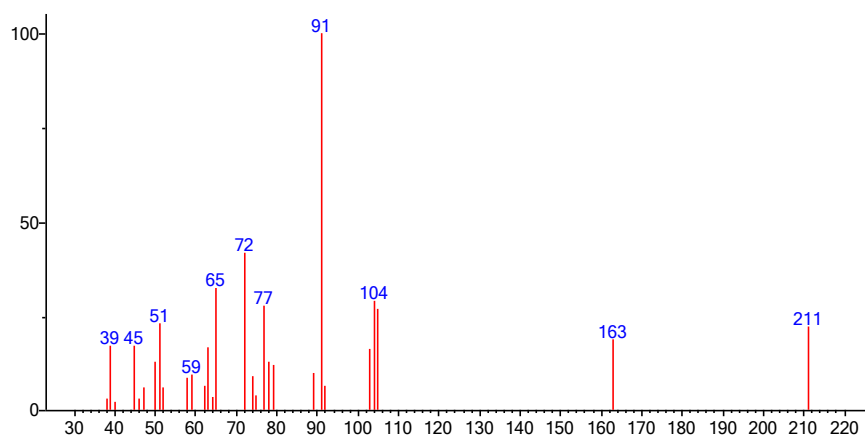
Slika S27 DEPT90 (gore) i DEPT135 NMR (dole) spektri nasturleksina A (**87**).



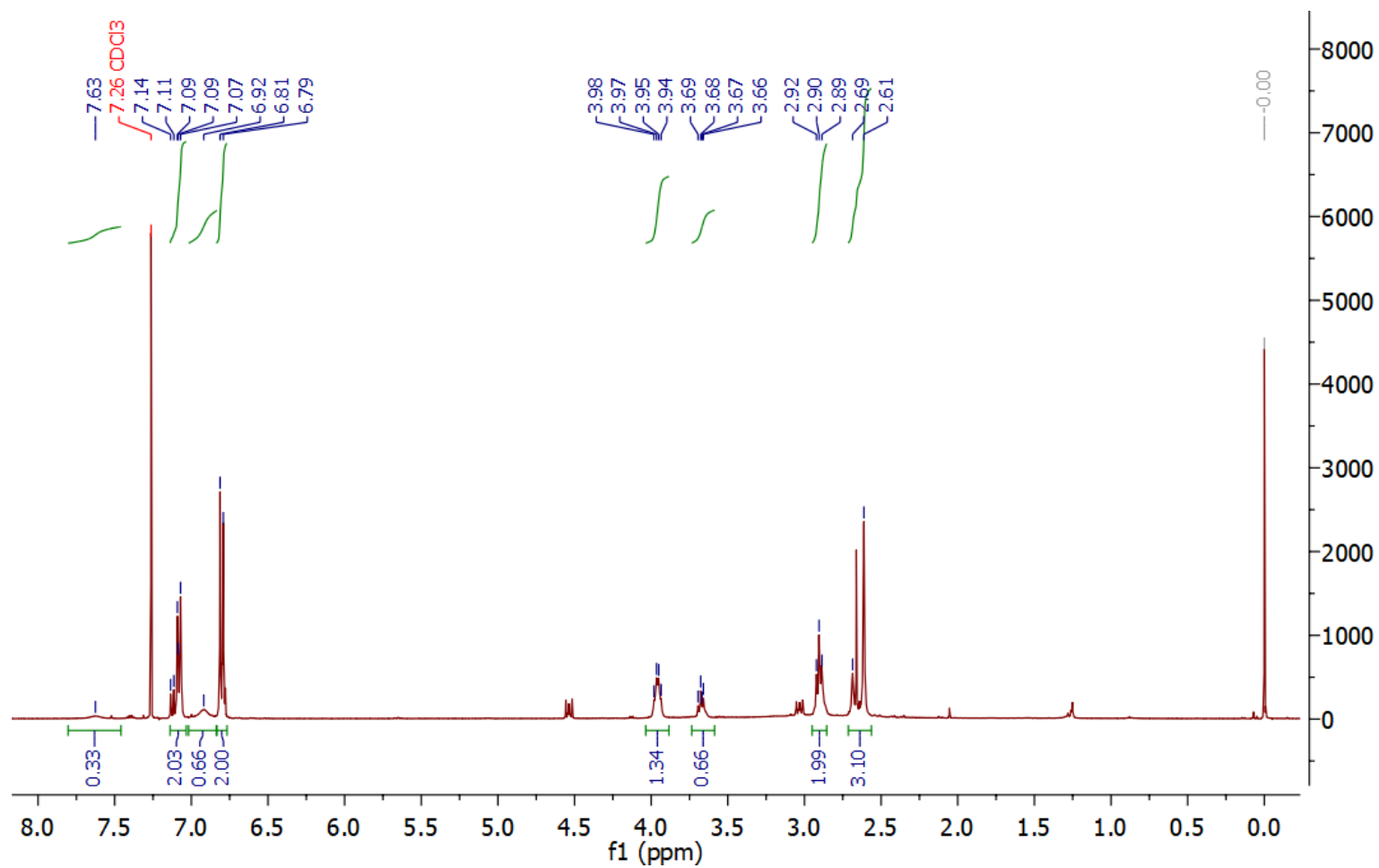
Slika S28 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri nasturleksina A (**87**).



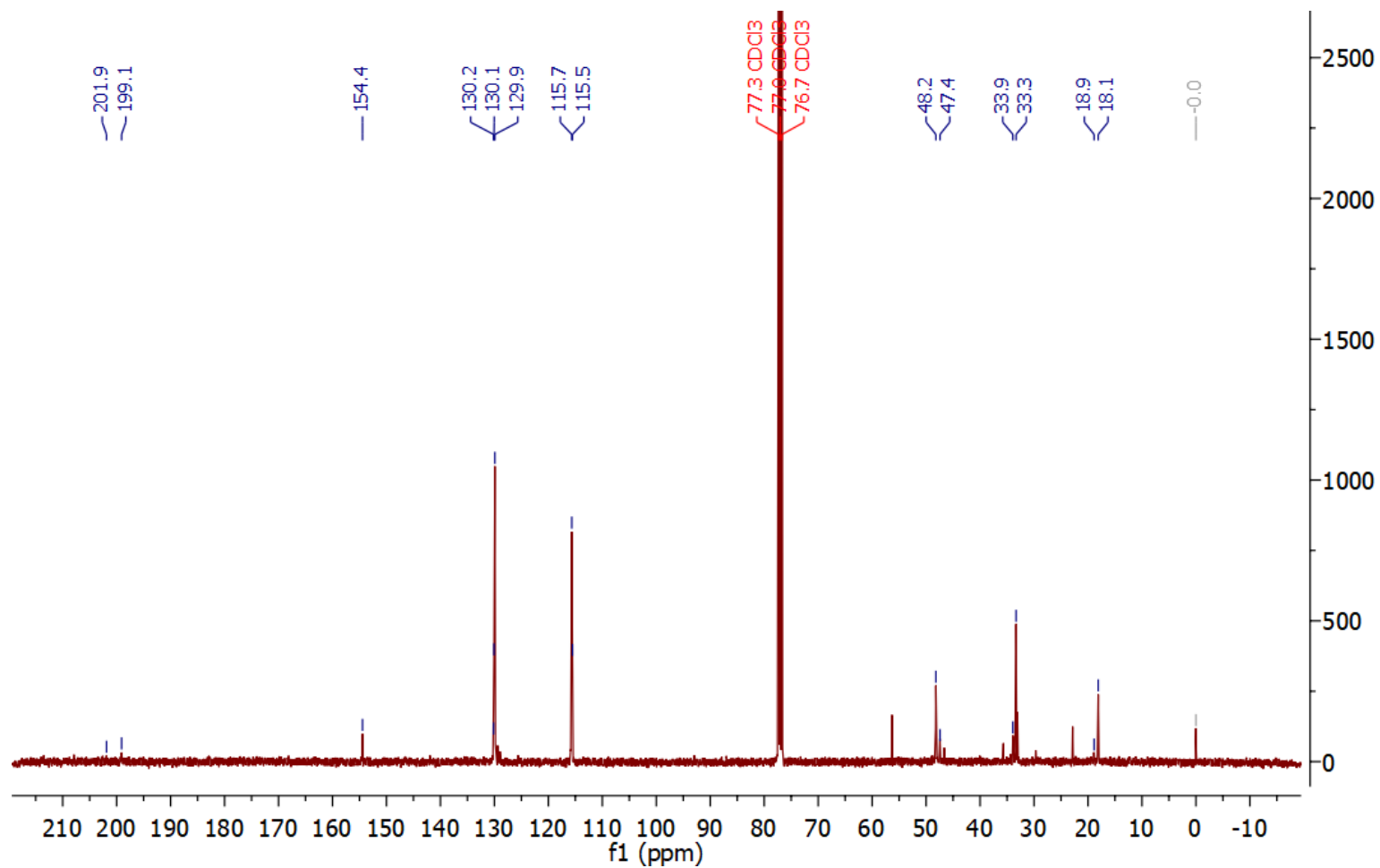
Slika S29 ^1H - ^1H COSY (gore) i NOESY (dole) spektri nasturleksina A (**87**).



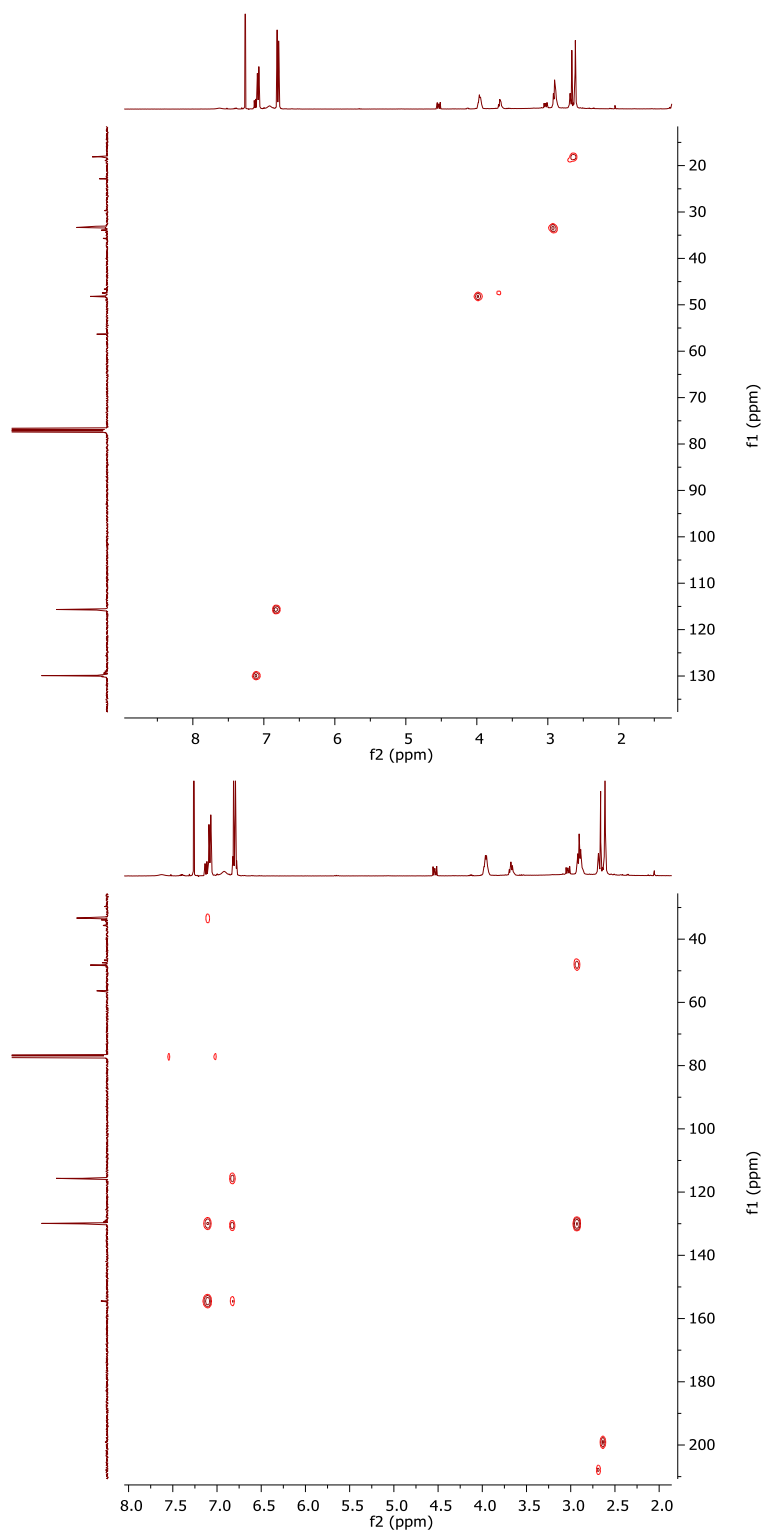
Slika S30 EIMS (gore) i IR spektar (dole) nasturleksina A (**87**).



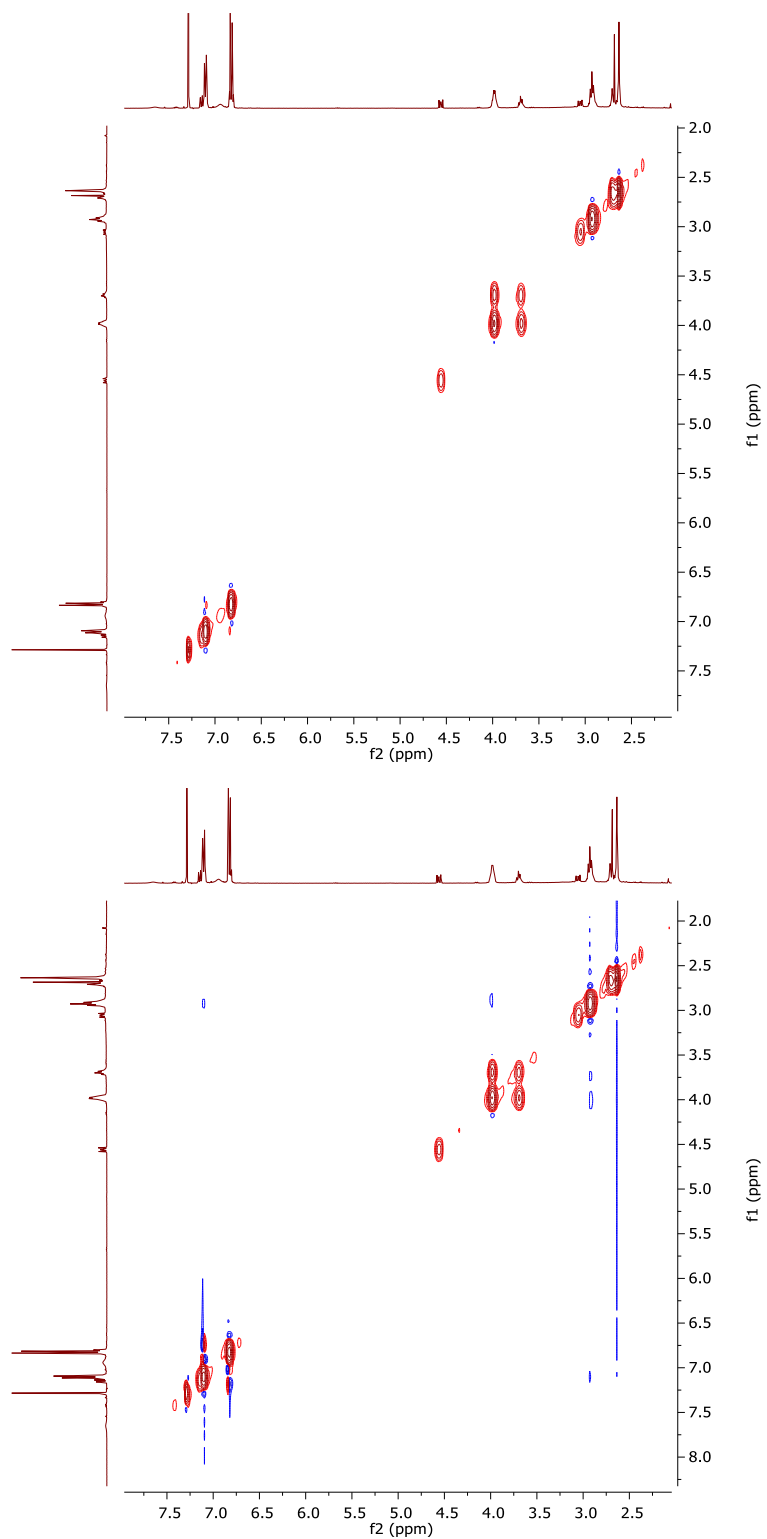
Slika S31 ¹H NMR spektar metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).



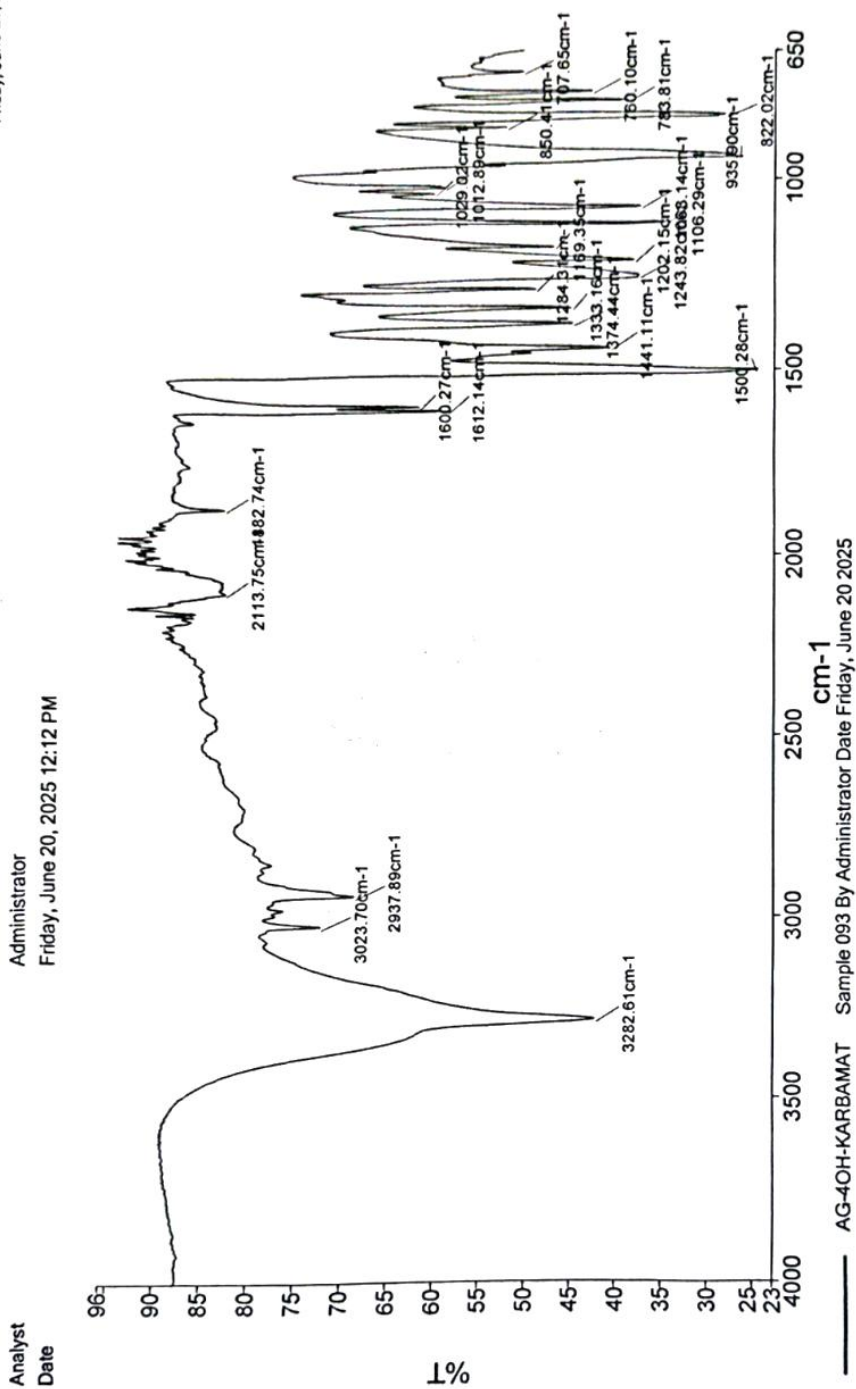
Slika S32 ^{13}C NMR spektar metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (**96**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



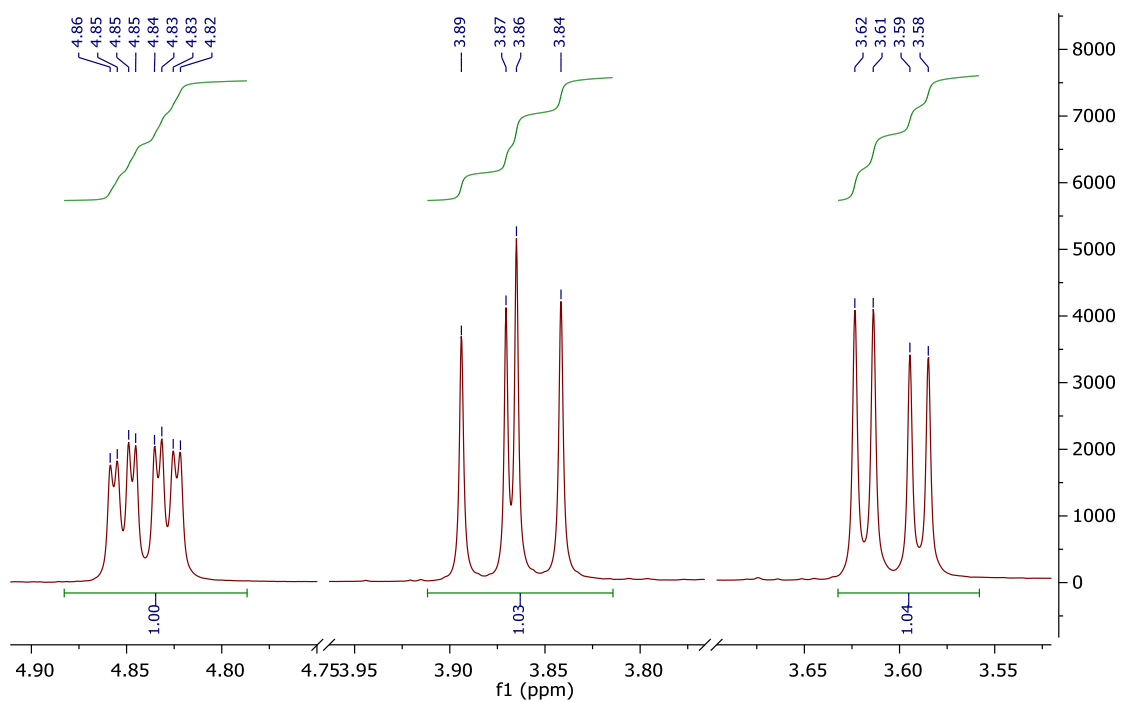
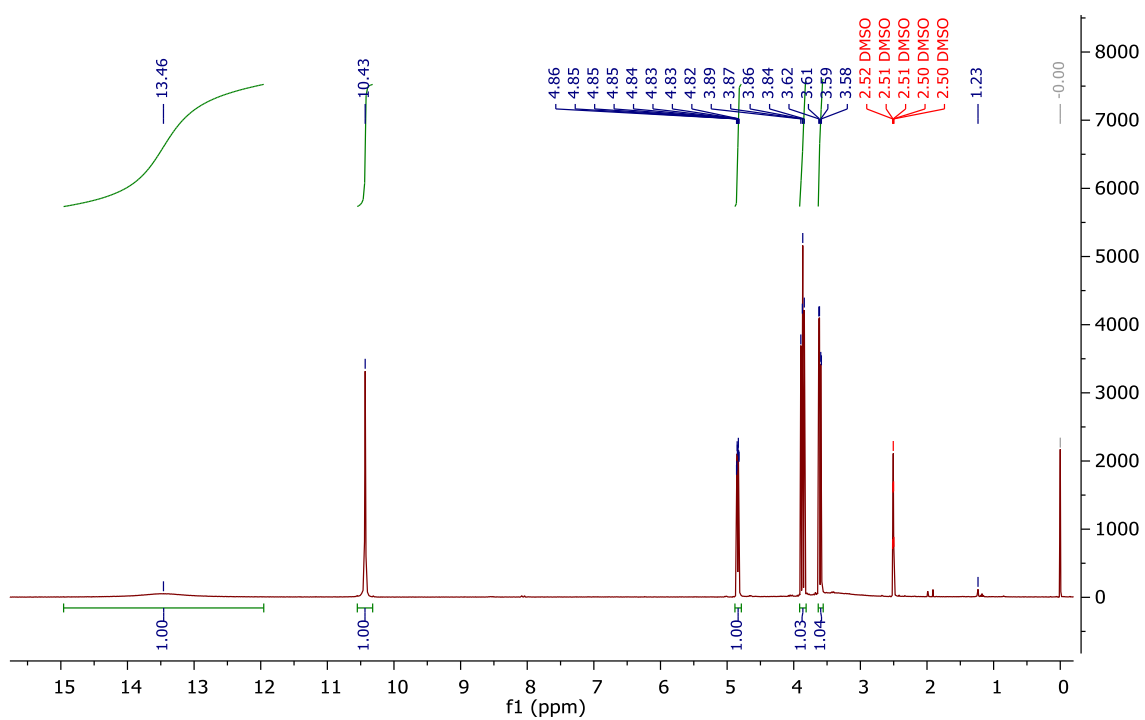
Slika S33 HSQC (gore) i HMBC (dole) NMR spektri metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (96).



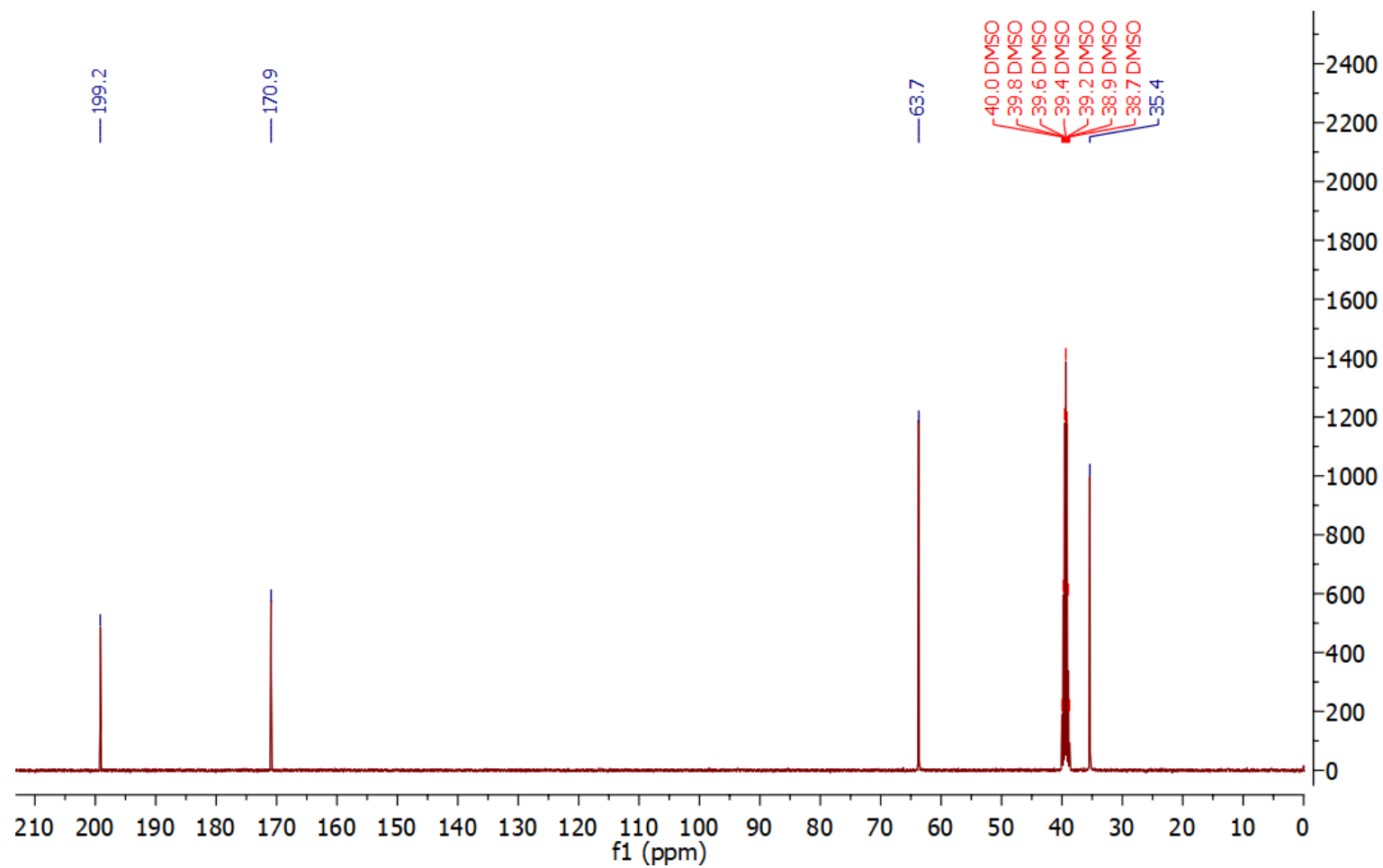
Slika S34 ^1H - ^1H COSY (gore) i NOESY (dole) spektri metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (96).



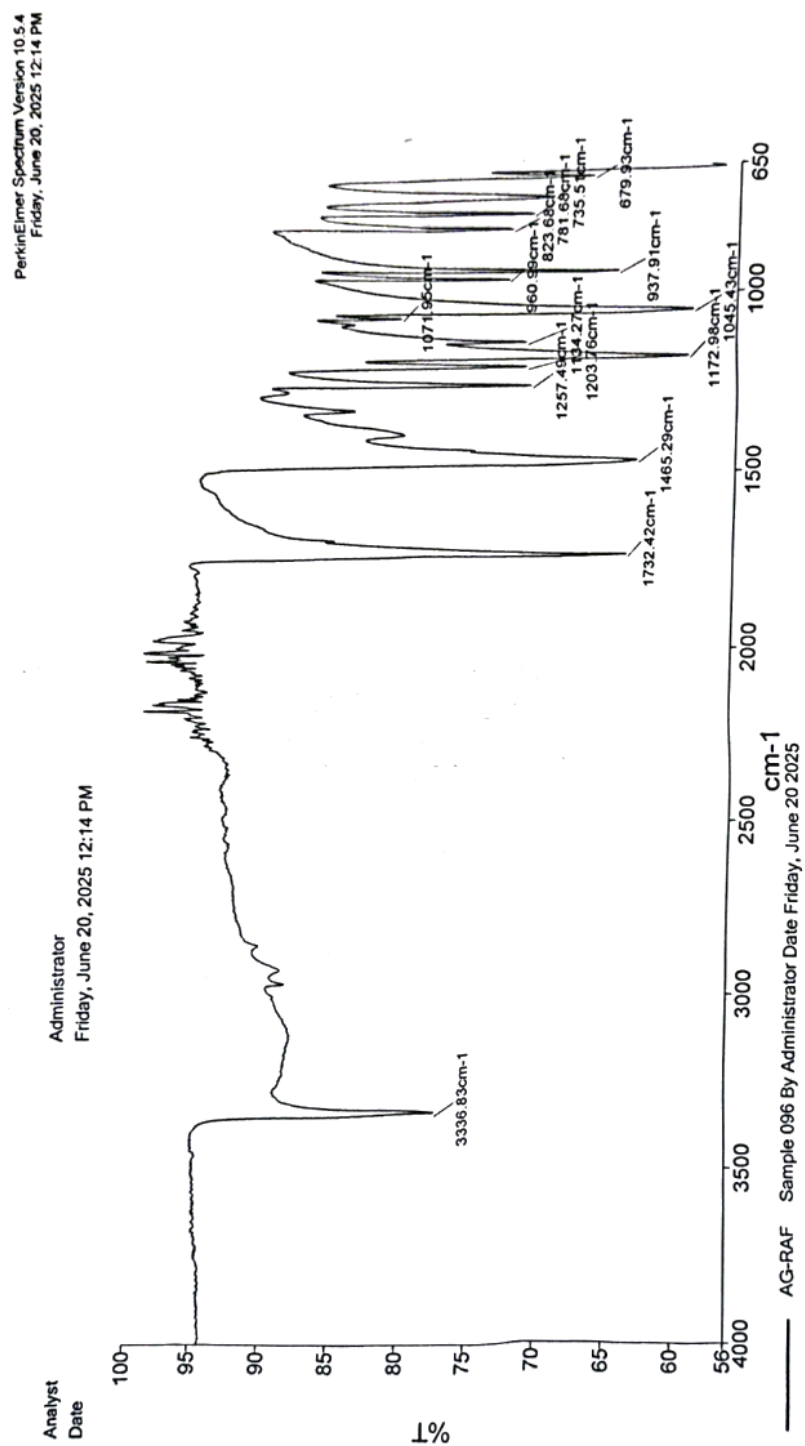
Slika S35 IR spektar metil-4-hidroksifenetilkarbamoditioata (96).



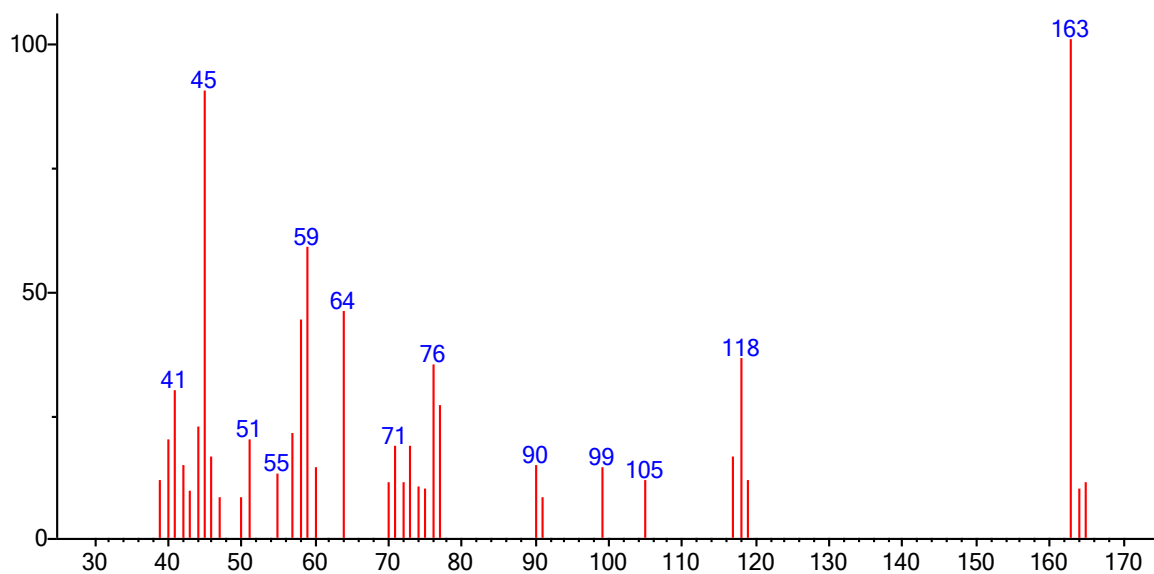
Slika S36 ¹H NMR spektar of 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**) (CDCl₃, 400 MHz, 20 °C).



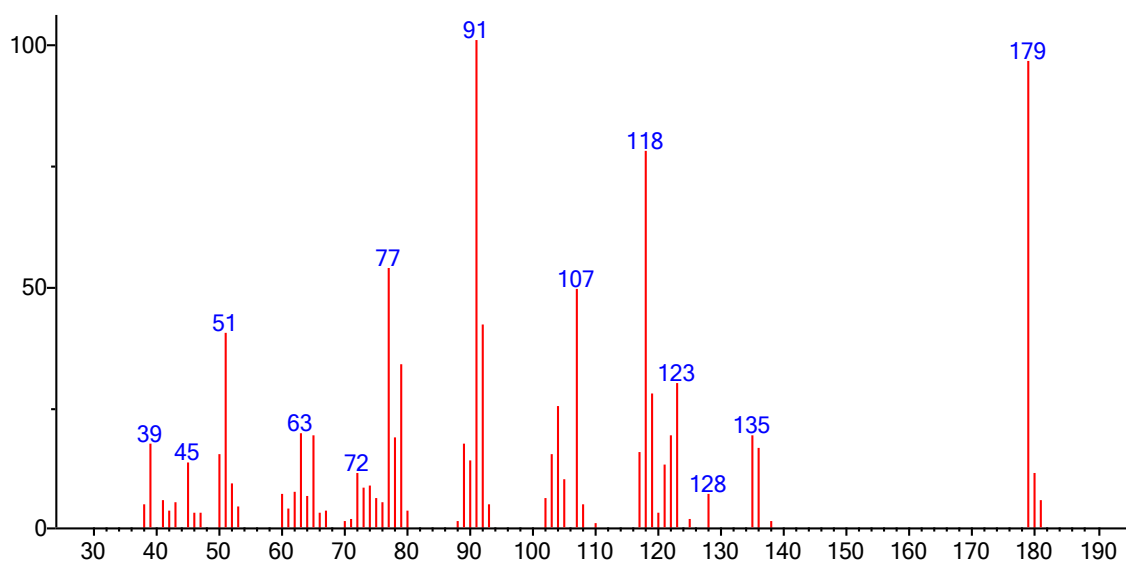
Slika S37 ^{13}C NMR spektar 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**) (CDCl_3 , 100,6 MHz, 20 °C).



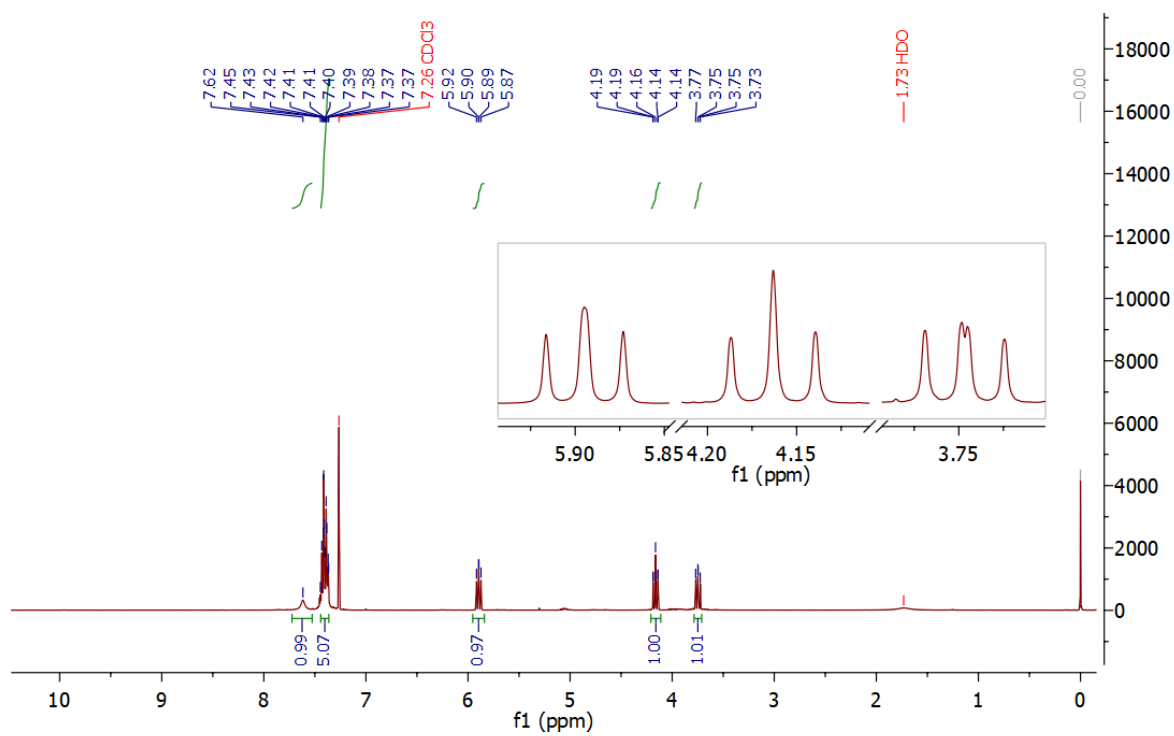
Slika S38 IR spektar 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (17).



Slika S39 EIMS spektar 2-tioksotiazolidin-4-karboksilne kiseline (**17**).



Slika S40 EIMS spektar *rac*-barbarina (**18**).



Slika S41 ^1H NMR spektar *rac*-5-fenil-1,3-oksazolidin-2-iona (*rac*-barbarin, **18**) (CDCl_3 , 400 MHz, 20 °C).

9. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

BIOGRAFIJA

Amina Gusinac rođena je u Novom Pazaru, gde je završila osnovnu i srednju školu, kao i osnovne i master akademske studije na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru. Na Departmanu za hemijsko-tehnološke nauke, studijski program osnovnih akademskih studija Hemija, upisala se 2016. godine, koje je završila 2020. godine sa prosečnom ocenom 8,91 i ocenom 10 za odbranu završnog rada. Na studijski program master akademskih studija Hemija, upisala se školske 2021/22. godine. Master rad pod nazivom „Izolovanje i identifikacija sekundarnih metabolita biljne vrste *Salvia aethiopis* L. (Lamiaceae)” odbranila je 2022. godine sa ocenom 10. Na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, školske 2022/23. godine, upisuje se na studijski program doktorskih akademskih studija Hemija.

Učestvovala je na brojnim međunarodnim skupovima, među kojima je i nosilac IFEAT stipendije na 55. konferenciji ISEO održanoj 2025. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Član je Srpskog Hemijskog Društva i Kluba Mladih Hemičara Srbije, kao i podružnice SHD Novi Pazar.

Od 15. 02. 2023. godine zaposlena je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu kao istraživač-pripravnik, gde se bavi naučnoistraživačkim radom u oblasti fitohemije.

Autor je jednog, a koautor još tri naučna rada objavljena u međunarodnim časopisima kategorije M20, jednog rada u časopisu od nacionalnog značaja, dva saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini i dva saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu.

BIBLIOGRAFIJA

Rad u vodećem međunarodnom časopisu kategorije M21a:

Dekić, M. S., Plojović, S. A., **Gusinac, A. M.**, Selimović, E. S., Radulović, N. S., Comprehensive mass spectral libraries and gas chromatographic data for esters of regioisomeric furanmethanols: addressing identification challenges in food chemistry, *Food Res. Int.* **2025**, 116294. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116294>

Rad u vodećem međunarodnom časopisu kategorije M21:

Mavrić-Scholze, E., **Gusinac, A.**, Dekić, M., Palić, I., Avdović, E., Simijonović, D., Grujović, M., Marković, K., Dobričić, V., Bošković, J., Marković, Z., & Radulović, N. Glucosinolate-Derived Metabolites from *Barbarea vulgaris* (Brassicaceae): Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Potentials. *Molecules* **2025**, 30(23), 4606. <https://doi.org/10.3390/molecules30234606>

Rad u međunarodnom časopisu kategorije M22:

Gusinac, A. M., Dekić, M. S., Palić, I. R., Mladenović, M. Z., & Radulović, N. S. Volatile Glucosinolate Hydrolysis Products of *Barbarea vulgaris* from Serbia: Organ-Specific Patterns, P-Type Chemistry in a G-Type Morph, and Storage-Driven Barbarin Isomerization, *Chem Biodivers.* **2025**, e02719. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202502719> (rad prihvaćen za štampu).

Dekić, M. S., **Gusinac, A. M.**, Jeremić, S. R., Jakovljević, V. D., Plojović, S. A., Jovanović, D., Radulović, N. S., Abietane diterpenoid salvipisone: Structure elucidation, conformational analysis, and antimicrobial activity, *J. Mol. Struct.* **2025**, 1321, 139807-139807. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.139807>

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33):

Dekić, M. S., **Gusinac, A. M.**, The autolysis products of glucosinolates in *Lepidium campestre* (L.) W. T. Aiton (Brassicaceae), 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, October 26-27th, 2021, Kragujevac, Serbia.

Jeremić, S. R., Dekić, M. S., Jakovljević, V. D., Selimović, E., **Gusinac, A. M.**, Inhibitory potential of barbarin and its platinum (II) complex towards PBP1a protein, 2nd International Conference on Chemo and BioInformatics, September 28-29th, 2023, Kragujevac, Serbia.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34):

Gusinac, A. M., Dekić, M. S., Radulović, N. S., Volatile glucosinolate degradation products and the essential oil of *Barbarea vulgaris* W. T. Aiton (Brassicaceae), ISEO2025, September 07-10, 2025, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

Avdović, E. H., **Gusinac, A. M.**, Simijonović, D. M., Marković, Z. S., Dekić, M. S., Chemical composition of essential oil and glucosinolate-derived volatiles in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae), ISEO2025, September 07-10, 2025, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

Rad u nacionalnom časopisu kategorije M52:

Gusinac, A. M., Dekić, M. S., Radulović, N. S., Chemical composition of the essential oil of *Raphanus raphanistrum* L. from Serbia, *FU Phys. Chem. Tech.* **2025** (rad prihvaćen za štampu).

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64):

Gusinac, A. M., Radulović, N. S., Dekić, M. S., Complete assignment of ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of salvipisone isolated from *Salvia aethiopsis* L. (Lamiaceae), 9th Conference of Young Chemists of Serbia, 4th November, 2023, Novi Sad, Serbia.

Gusinac, A. M., Dekić, M. S., Jeremić, S. R., Plojović, S. A., Radulović, N. S., Conformational analysis of salvipisone on the basis of ^1H NMR higher-order spin-spin interactions, Book of Abstracts / 60th Meeting of the Serbian Chemical Society, June 8-9th, 2024, Niš, Serbia.

Plojović, S. A., Jeremić, S. R., Jakovljević, V. D., **Gusinac, A. M.**, Radulović, N. S., Dekić, M. S., *In silico* and *in vitro* investigation of the antimicrobial activity of salvipisone, Book of Abstracts / 60th Meeting of the Serbian Chemical Society, June 8-9th, 2024, Niš, Serbia.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**АНАЛИЗА ХЕМИЈСКОГ САСТАВА И БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ
СЕКУНДАРНИХ МЕТАБОЛИТА БИЉНЕ ВРСТЕ *BARBAREA VULGARIS*
(BRASSICACEAE)**

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 12.12.2025.

Потпис аутора дисертације:



Амина М. Гусинац

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**АНАЛИЗА ХЕМИЈСКОГ САСТАВА И БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ
СЕКУНДАРНИХ МЕТАБОЛИТА БИЉНЕ ВРСТЕ *BARBAREA VULGARIS*
(BRASSICACEAE)**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 12.12.2025.

Потпис аутора дисертације:



Амина М. Гусинац

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

АНАЛИЗА ХЕМИЈСКОГ САСТАВА И БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ СЕКУНДАРНИХ МЕТАБОЛИТА БИЉНЕ ВРСТЕ *BARBAREA VULGARIS* (BRASSICACEAE)

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 12.12.2025.

Потпис аутора дисертације:



Амина М. Гусинац