



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
U NIŠU



Sonja I. Filipović

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH
VRSTA JETRENJAČA RODOVA *PORELLA* L.
(PORELLACEAE) I *CONOCEPHALUM* HILL.
(CONOCEPHALACEAE)**

Doktorska disertacija

Niš, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
IN NIŠ



Sonja I. Filipović

**SECONDARY METABOLITES OF SELECTED
LIVERWORTS FROM THE GENERA *PORELLA* L.
(PORELLACEAE) AND *CONOCEPHALUM* HILL.
(CONOCEPHALACEAE)**

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:	Соња Филиповић
Ментор, МН:	Нико Радловић
Наслов рада, НР:	Секундарни метаболити одабраних врста јетрењача родова <i>Porella</i> L. (Porellaceae) и <i>Conocephalum</i> Hill. (Conocephalaceae)
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	српски
Земља публикавања, 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:	10 поглавља, 416 страна, 511 цитата, 23 табеле, 85 слика, 59 прилога
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска и медицинска хемија, биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Јетрењача, <i>Porella platyphylla</i> , <i>Porella cordaeana</i> , <i>Conocephalum conicum</i> , етарско уље, хроматографија, пингвизани, лепидозани, гермакрани, хумулани, синтеза, (био)хемијска повезаност, биолошка/фармаколошка активност
УДК	577.121 : 582.321.1 577.121 : 582.321.2
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део је урађен у Лабораторији за органску анализу и синтезу, Департман за хемију, Природно-математички факултет, као и Катедри за физиологију, Медицински факултет, Универзитет у Нишу.

Извод, ИЗ:	У овој докторској дисертацији испитан је хемијски састав етарских уља и екстраката три јетрењаче, две врсте из фамилије Porellaceae (<i>Porella platyphylla</i> и <i>Porella cordaeana</i>), као и врсте <i>Conocephalum conicum</i> из фамилије Conopsephalaceae. Етарска уља добијена су хидродестилацијом, а њихова анализа извршена је помоћу GC-MS. Препаративним хроматографским раздвајањем етарских уља и екстраката изолована су чиста једињења, чије су структуре одређене коришћењем спектралних метода (1D- и 2D-NMR, GC-MS, FTIR, HRMS, и др.) и хемијских трансформација. Посебна пажња посвећена је новим природним производима, укључујући два деривата пингвизанског скелета (α-фуранопингвизанол и фуранопингвизанон), једињење лепидозанског скелета ((1Z,4E)-лепидоза-1(10),4-диен-14-ол) и сесквитерпенски диол гермакранског скелета са структуром <i>rel</i>-(1(10)Z,4S,5E,7R)-гермакра-1(10),5-диен-11,14-диол. Детаљна анализа NMR спектра омогућила је идентификацију још једног новог једињења, <i>rel</i>-(1(10)Z,4S,5E,7R)-хумула-1(10),5-диен-7,14-диола. Биолошка активност и фармаколошки потенцијал одабраних секундарних метаболита испитивани су различитим тестовима на лимфоцитима пацова.
Датум прихватања теме, ДП:	13. јул 2016.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: др Милан Декић, ванредни професор
	Члан: др Павле Ранђеловић, ванредни професор
	Члан: др Милан Нешић, доцент
	Члан: др Ирена Раца, научни сарадник
	Члан, ментор: др Нико Радловић, редовни 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 :	Sonja Filipović
Mentor, MN :	Niko Radulović
Title, TI :	Secondary metabolites of selected liverworts from the genera <i>Porella</i> L. (Porellaceae) and <i>Conocephalum</i> Hill. (Conocephalaceae)
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, Višegradaska 33
Physical description, PD :	10 chapters, 416 pages, 511 references, 23 tables, 85 figures, 59 appendices
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Organic and medicinal chemistry, biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	Liverwort, <i>Porella platyphylla</i> , <i>Porella cordaeana</i> , <i>Conocephalum conicum</i> , essential oil, chromatography, pinguisanes, lepidozanes, germacrane, humulane, synthesis, (bio)chemical connection, biological/pharmacological activity
UC	577.121 : 582.321.1 577.121 : 582.321.2
Holding data, HD :	library
Note, N :	The experimental part was carried out in the Laboratory for Organic Analysis and Synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, as well as in the Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Niš

Abstract, AB :		In this doctoral dissertation, the chemical composition of essential oils and extracts from three liverworts, two species from the Porellaceae family (<i>Porella platyphylla</i> and <i>Porella cordaeana</i>), as well as the species <i>Conocephalum conicum</i> from the Conocephalaceae family, was investigated. The essential oils were obtained by hydrodistillation, and their analysis was performed by GC-MS. Preparative chromatographic separations of the essential oils and extracts led to the isolation of pure compounds, whose structures were determined by combining spectral methods (1D- and 2D-NMR, GC-MS, FTIR, HRMS, etc.) and chemical transformations. Special attention was given to new natural products, including two derivatives of the pinguisane skeleton (α -furanopinguisanol and furanopinguisanone), a compound of the lepidozane skeleton ((1 <i>Z</i> ,4 <i>E</i>)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol), and a sesquiterpene diol of the germacrane skeleton with the structure <i>rel</i> -(1(10) <i>Z</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>R</i>)-germacra-1(10),5-dien-11,14-diol. Detailed analysis of the NMR spectra identified another new compound, <i>rel</i> -(1(10) <i>Z</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>R</i>)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol. The biological activity and pharmacological potential of selected secondary metabolites were investigated by various methods on rat lymphocytes.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :		July 13 th, 2016
Defended on, DE :		
Defended Board, DB :	President:	PhD Milan Dekić, Associate Professor
	Member:	PhD Pavle Randelović, Associate Professor
	Member:	PhD Milan Nešić, Assistant Professor
	Member:	PhD Irena Raca, Research Associate
	Member, Mentor:	PhD Niko Radulović, Full Professor

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Нико Радуловић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет у Нишу, Департман за хемију
Наслов:	Секундарни метаболити одабраних врста јетрењача родова <i>Porella</i> L. (Porellaceae) и <i>Conocephalum</i> Hill. (Conocephalaceae)
Резиме:	У овој докторској дисертацији испитан је хемијски састав етарских уља и екстраката три јетрењаче, две врсте из фамилије Porellaceae (<i>Porella platyphylla</i> и <i>Porella cordaeana</i>), као и врсте <i>Conocephalum conicum</i> из фамилије Conocephalaceae. Етарска уља добијена су хидродестилацијом, а њихова анализа извршена је помоћу GC-MS. Препаративним хроматографским раздвајањем етарских уља и екстраката изолована су чиста једињења, чије су структуре одређене коришћењем спектралних метода (1D- и 2D-NMR, GC-MS, FTIR, HRMS, и др.) и хемијских трансформација. Посебна пажња посвећена је новим природним производима, укључујући два деривата пингвизанског скелета (α-фуранопингвизанол и фуранопингвизанон), једињење лепидозанског скелета ((1Z,4E)-лепидоза-1(10),4-диен-14-ол) и сесквитерпенски диол гермакранског скелета са структуром <i>rel</i>-(1(10)Z,4S,5E,7R)-гермакра-1(10),5-диен-11,14-диол. Детаљна анализа NMR спектра омогућила је идентификацију још једног новог једињења, <i>rel</i>-(1(10)Z,4S,5E,7R)-хумула-1(10),5-диен-7,14-диола. Биолошка активност и фармаколошки потенцијал одабраних секундарних метаболита испитивани су различитим тестовима на лимфоцитима пацова.
Научна област:	Хемија
Научна дисциплина:	Органска и медицинска хемија, биохемија
Кључне речи:	Јетрењача, <i>Porella platyphylla</i> , <i>Porella cordaeana</i> , <i>Conocephalum conicum</i> , етарско уље, хроматографија, пингвизани, лепидозани, гермакрани, хумулани, синтеза, (био)хемијска повезаност, биолошка/фармаколошка активност

УДК:

577.121 : 582.321.1

577.121 : 582.321.2

CERIF
класификација:

Р 003 Хемија, Р 390 Органска хемија, Р 351 Структурна хемија, Р 004
Биохемија, метаболизам, В 740 Фармаколошке науке, фармакогнозија,
фармација, токсикологија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD, Niko Radulović, Full Professor, University of Niš, Faculty of Science and Mathematics in Niš, Department of Chemistry
Title:	Secondary metabolites of selected liverworts from the genera <i>Porella</i> L. (Porellaceae) and <i>Conocephalum</i> Hill. (Conocephalaceae)
Abstract:	In this doctoral dissertation, the chemical composition of essential oils and extracts from three liverworts, two species from the Porellaceae family (<i>Porella platyphylla</i> and <i>Porella cordaeana</i>), as well as the species <i>Conocephalum conicum</i> from the Conocephalaceae family, was investigated. The essential oils were obtained by hydrodistillation, and their analysis was performed by GC-MS. Preparative chromatographic separations of the essential oils and extracts led to the isolation of pure compounds, whose structures were determined by combining spectral methods (1D- and 2D-NMR, GC-MS, FTIR, HRMS, etc.) and chemical transformations. Special attention was given to new natural products, including two derivatives of the pinguisane skeleton (α-furanopinguisanol and furanopinguisanone), a compound of the lepidozane skeleton ((1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol), and a sesquiterpene diol of the germacrane skeleton with the structure <i>rel</i>-(1(10)Z,4S,5E,7R)-germacra-1(10),5-dien-11,14-diol. Detailed analysis of the NMR spectra identified another new compound, <i>rel</i>-(1(10)Z,4S,5E,7R)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol. The biological activity and pharmacological potential of selected secondary metabolites were investigated by various methods on rat lymphocytes.
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic and Medicinal Chemistry, Biochemistry
Key Words:	Liverwort, <i>Porella platyphylla</i> , <i>Porella cordaeana</i> , <i>Conocephalum conicum</i> , essential oil, chromatography, pinguisanes, lepidozanes, germacrane, humulanes, synthesis, (bio)chemical correlation, biological/pharmacological activity

UDC:

577.121 : 582.321.1

577.121 : 582.321.2

CERIF
Classification:

P 003 Chemistry, P 390 Organic chemistry, P 351 Structural chemistry, P 004
Biochemistry, metabolism, B 740 Pharmacological sciences, pharmacognosy,
pharmacy, toxicology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru istraživanja na projektu ON 172061 „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima,” koji je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu 2011-2019.

Ovom prilikom najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru, profesoru Niku Raduloviću, na ukazanom poverenju, ogromnoj i nesebičnoj pomoći tokom izrade ove disertacije, kao i na prijateljskom odnosu i podršci tokom ovih godina. Posebno sam zahvalna na tome što me je svojim primerom i savetima naučio mnogim životnim stavovima, ojačao u svakom smislu i nadogradio me kao ličnost, čime je ostavio neizbrisiv trag na mom profesionalnom i ličnom razvoju.

Najsrdahnije zahvaljujem i članovima komisije – prof. dr Milanu Dekiću, prof. dr Pavlu Randeloviću, prof. dr Milanu Nešiću i dr Ireni Raca – na korisnim sugestijama i savetima koji su značajno doprineli unapređenju kvaliteta ove disertacije.

Duboku zahvalnost izražavam i svojim kolegama iz istraživačke grupe, ne samo zbog njihove podrške i predusretljivosti tokom realizacije disertacije, već i zbog stvaranja podsticajne i prijatne atmosfere, koja je rad u laboratoriji učinila sadržajnijim i ispunjenijim.

Naposletku, posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na inspiraciji, primerima, motivaciji i bezgraničnoj podršci, razumevanju i ljubavi bez kojih ovaj put ne bi bio isti. Ovu disertaciju posvećujem svojoj ćerki Sari Krstić.

OZNAKE I SKRAĆENICE

-NOMENKLATURA-

Me ili **CH₃** – metil

Et ili **C₂H₅** – etil

Ac ili **CH₃CO** – acetil

CoA – **coenzyme A** (koenzim A)

n – normalni niz

o – *orto*

m – *meta*

p – *para*

E – entgegen (stereodeskriptor)

Z – zusammen (stereodeskriptor)

L – laevus

(-) – levorotacioni

-REAGENSI I RASTVARAČI-

A-15 – **amberlyst 15** (amberlist 15)

AcOH – sirćetna kiselina

AIBN – **azobisisobutyronitrile** (azobisisobutironitril)

9-BBN – **9-borabicyclo[3.3.1]nonane** (9-borabiciklo[3.3.1]nonan)

BnBr – **benzyl bromide** (benzil-bromid)

CSA – **camphorsulfonic acid** (kamforsulfonska kiselina)

DBU – **1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene** (1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en)

DIBAL-H – **diisobutylaluminum hydride** (diizobutilaluminijum-hidrid)

DMAc – **dimethylacetamide** (dimetilacetamid)

DMAP – 4-(**dimethylamino**)**pyridine** (4-(dimetilamino)piridin)

DME –**dimethoxyethane** (dimetoksietan)

DMF – *N,N*-**dimethylformamide** (*N,N*-dimetilformamid)

DMP – **dess–Martin periodinane** (des–Martinov perjodinan)

DMS – **dimethyl sulfide** (dimetil sulfid)

DMSO – **dimetilsulfoksid**

Et₃N – trietilamin

Et₂O – dietil-etar

EtOH – etanol

Eu(fod)₃ – *tris*(6,6,7,7,8,8,8-Heptafluor-2,2-dimetil-3,5-oktandionat)europijum(III)

FFP – **farnesyl pyrophosphate** (farnesil-pirofosfat)

HMPA – **hexamethylphosphoramide** (heksametilfosforamid)

IBX – 2-**iodoxybenzoic acid** (2-jodoksibenzojeva kiselina)

LAH – **lithium aluminium hydride** (litijum-aluminijum-hidrid)

LDA – **lithium diisopropylamide** (litijum-diizopropilamid)

LHMDS – **lithium bis(trimethylsilyl)amide** (litijum-bis(trimetilsilil)amid)

MeOH – metanol

MsCl – **methanesulfonyl chloride** (metansulfonski hlorid)

MVA – **mevalonate** (mevalonat)

PCC – **pyridinium chlorochromate** (piridinijum-hlorohromat)

PDC – **pyridinium dichromate** (piridinijum-dihromat)

PhH – benzene (benzen)

PhMe – toluene (toluen)

PTSA – *p*-**toluenesulfonic acid** (*p*-toluensulfonska kiselina)

py – **pyridine** (piridin)

SEMCl – 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl **chloride** (2-(trimetilsilil)etoksimetil-hlorid)

TBAF – **tetrabutylammonium fluoride** (tetrabutilamonijum-fluorid)

TBAI – **tetrabutylammonium iodide** (tetrabutilamonijum-jodid)

TBDPSCI – **tert-butyl(chloro)diphenylsilane** (*terc*-butil(hloro)difenilsilan)

TBHP – **tert-butyl hydroperoxide** (*terc*-butil-hidroperoksid)

TBSOTf – **tert-butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate** (*terc*-butildimetilsilil trifluorometansulfonat)

TESCI – **triethylchlorosilane** (trietilhlorosilan)

TFA – **trifluoroacetic acid** (trifluoroacetatna kiselina)

TFAA – **trifluoroacetic anhydride** (trifluoroacetatni anhidrid)

THF – **tetrahydrofuran** (tetrahidrofuran)

TIPSOTf – **triisopropylsilyl trifluoromethanesulfonate** (triizopropilsilil trifluorometansulfonat)

TMEDA – ***N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine** (*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin)

TMS – **tetramethylsilane** (tetrametilsilan)

TMSCHN₂ – **trimethylsilyldiazomethane** (trimetilsilildiazometan)

TMSCl – **trimethylsilyl chloride** (trimetilsilil-hlorid)

TMSOTf – **trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate** (trimetilsilil trifluorometansulfonat)

TsOH – **4-toluenesulfonic acid** (4-toluensulfonska kiselina)

TsCl – **4-toluenesulfonyl chloride** (toluensulfonski hlorid, tozil-hlorid)

-HROMATOGRAFIJA I MASENA SPEKTROMETRIJA-

AMDIS – **automated mass spectral deconvolution and identification system** (automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara)

C – koncentracija

EI – MS-**electron ionization- mass spectrometry** (elektronska jonizacija- masena spektrometrija)

GC – **gas chromatography** (gasna hromatografija)

GC-MS – **gas chromatography-mass spectrometry** (gasna hromatografija-masena spektrometrija)

HRMS – **high resolution mass spectrometry** (masena spektrometrija visoke rezolucije)

HREIMS – **high resolution electron ionization mass spectrometry** (elektronska jonizacija - masena spektrometrija visoke rezolucije)

$[M]^+$ – molekularni jon

m/z – mass-to-charge-ratio (odnos mase i naelektrisanja)

MPLC – **medium pressure liquid chromatography** (tečna hromatografija pri srednjim pritiscima)

rel. int. – relativni intenzitet

RI – **retention index** (retencioni indeks)

R_t – **retention time** (retenciono vreme)

TLC – **thin-layer chromatography** (tankoslojna hromatografija)

TIC – **total ion chromatogram** (ukupni jonski hromatogram)

-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA I ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA-

ATR – **attenuated total reflectance**

IR – **infrared** (infracrvena)

UV – **ultraviolet** (ultraljubičasta)

UV-Vis – **ultraviolet-visible spectroscopy** (spektroskopija u UV i Vis oblasti)

$\lambda_{\max}$ – talasna dužina maksimuma apsorpcije

-NUKLEARNA-MAGNETNA REZONANTNA SPEKTROSKOPIJA-

1D – jednodimenzionalni

2D – dvodimenzionalni

¹³C-NMR – **carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy** (nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika-13)

d – dublet

dd – dublet dubleta

ddd – dublet dubleta dubleta

dddd – dublet dubleta dubleta dubleta

ddq – doublet od doublet of quartets (dublet dubleta kvarteta)

dq – doublet of quartets (dublet kvarteta)

DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer

^1H - ^1H COSY – ^1H - ^1H correlation spectroscopy (^1H - ^1H korelaciona spektroskopija)

^1H -NMR – hydrogen-1 nuclear magnetic resonance (protonska nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)

HMBC – heteronuclear multiple bond correlation (heteronuklearna korelacija preko višestrukih veza)

HSQC – heteronuclear single quantum coherence (heteronuklearna jedno-kvantna koherencija)

J – Konstanta kuplovanja

NMR – nuclear magnetic resonance (nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)

NOESY – nuclear overhauser effect spectroscopy

ppm – parts per million (delovi na milion)

s – singlet

δ – hemijsko pomeranje u NMR spektru

δ_{H} – hemijsko pomeranje u ^1H -NMR spektru

δ_{C} – hemijsko pomeranje u ^{13}C -NMR spektru

$\Delta\delta$ – razlika u hemijskim pomeranjima

-TESTIRANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI-

ConA – concanavalin A (konkanavalin A)

Dex. – dexamethasone (deksametazon)

DMSO – dimethyl sulfoxide (dimetil-sulfoksid)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiamintetraacetatna kiselina)

FCS – fetal calf serum (fetalni goveđi serum)

HEPES – *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid) (*N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-(2-etansulfonska kiselina))

LPS – lipopolysaccharides (lipopolisaharid iz *Escherichia coli* serotip 0111:B4)

LYM – **l**ymphocytes (limfociti)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazonijum-bromid

NaCl – natrijum-hlorid

NADH – nicotinamide adenine dinucleotide (nikotinamid-adenin-dinukleotid)

NAD(P)H – nicotinamide adenine dinucleotide **p**hosphate (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat)

NR – **n**eutral **r**ed (neutralno crveno)

PBS – **p**hosphate-**b**uffered-**s**aline (fiziološki rastvor puferovan fosfatom)

PHA – **p**hyto**h**aemagglutinin (fitohemagglutinin)

RNK – **r**ibonukleinska **k**iselina

RPMI – roswell **p**ark **m**emorial **i**nstitute (medijum za rast ćelijske kulture)

SPC – **s**plenociti

SSB – **s**ingle-**s**trand **b**rakes (prekidanje jednog lanca)

TB – trypan **b**lure (tripan plavo)

Triton X – polietilen glikol *p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil etar

-STATISTIČKA ANALIZA-

ANOVA – **a**nalysis of **v**ariance (analiza varijanse)

AHC – **a**gglomerative **h**ierarchical **c**lustering (aglomerativna hijerarhijska klaster analiza)

PCA – **p**rincipal component **a**nalysis (analiza glavne komponente)

D – diterpeni

MT – monoterpeni

O – ostalo

S – seskviterpeni

SD – standardna devijacija

-MERNE JEDINICE-

amu- atomic **mass unit** (jedinica atomske mase)

°C – celzijusov stepen

cm – centimetar

dm – decimetar

eV – electron volt

g – gram

h – sat

Hz – hertz (here)

l – litar

M – mol/dm³

m – metar

mg – miligram

min – minut

ml – mililitar

mm – milimetar

mmol – milimol

mmu – milli **mass unit**

ng – nanogram

nm – nanometar

rpm – revolutions **per minute** (broj okretaja u minuti)

s – sekunda

μA – mikroamper

μg – mikrogram

μl – mikrolitar

μm – mikrometar

-OSTALO-

anhyd. – **anhydrous** (anhidrovani)

aq. – **aqueous** (vodeni)

eq. – **equivalent** (ekvivalent)

et al. - **et alia** (i drugi)

itd. - **i tako dalje**

liq. – **liquidus** (tečnost)

r.t. – **room temperature** (sobna temperatura)

sl. – slično

sin. –sinonim

tr – trag

SADRŽAJ

1. UVOD I CILJEVI RADA.....	1
2. OPŠTI DEO	8
2.1. RAZDEO MARCHANTIOPHYTA I NJEGOVA KLASIFIKACIJA	9
2.1.1. RASPROSTRANJENJE I EKOLOGIJA	12
2.1.2. MORFOLOGIJA I ANATOMIJA	13
2.1.3. RAZMNOŽAVANJE JETRENJAČA	16
2.1.4. EKOLOŠKI ZNAČAJ JETRENJAČA	19
2.2. HEMIJSKI DIVERZITET MARCHANTIOPHYTA	22
2.3. BIOLOŠKI/FARMAKOLOŠKI ZNAČAJ JETRENJAČA I NJIHOVIH SASTOJAKA	29
2.4. VRSTA <i>CONOCEPHALUM CONICUM</i> I NJENI SEKUNDARNI METABOLITI.....	52
2.5. VRSTE <i>PORELLA CORDAEANA</i> I <i>PORELLA PLATYPHYLLA</i> , I NJIHOVI SEKUNDARNI METABOLITI.....	63
2.6. PINGVIZANSKI SESKVITERPENI.....	74
2.6.1. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE PINGVIZANA	74
2.6.2. HEMOTAKSONOMSKI I EVOLUTIVNI ZNAČAJ PINGVIZANSKIH SESKVITERPENA U OKVIRU RAZDELA MARCHANTIOPHYTA.....	93
2.6.3. BIOSINTEZA PINGVIZANA.....	97
2.6.4. SINTEZA PINGVIZANSKIH SESKVITERPENOIDA	101
2.6.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST PINGVIZANSKIH SESKVITERPENA.....	111
3. EKSPERIMENTALNI DEO	113
3.1. HEMIKALIJE I RASTVARAČI	114

3.2. METODE ANALIZE	115
3.2.1. NUKLEARNO-MAGNETNA REZONANTNA (NMR) SPEKTROSKOPIJA	115
3.2.2. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)	115
3.2.3. ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS).....	116
3.2.4. MASENA SPEKTROMETRIJA VISOKE REZOLUCIJE (HRMS)	116
3.2.5. GASNA HROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)	116
3.2.6. IDENTIFIKACIJA SASTOJAKA.....	117
3.2.7. ELEMENTNA MIKROANALIZA	117
3.2.8. OPTIČKA ROTACIJA	118
3.3. METODE RAZDVAJANJA	119
3.3.1. TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA (TLC)	119
3.3.2. TEČNA HROMATOGRAFIJA PRI SREDNJIM PRITISCIMA (MPLC)	119
3.3.3. „ <i>DRY FLASH</i> “ HROMATOGRAFIJA.....	119
3.4. BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA	121
3.4.1. BILJNI MATERIJAL.....	121
3.4.2. DOBIJANJE ETARSKIH ULJA.....	122
3.5. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE <i>PORELLA CORDAEANA</i>	123
3.5.1. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>P. CORDAEANA</i>	123
3.5.2. DOBIJANJE DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA BILJNE VRSTE <i>P. CORDAEANA</i>	125
3.5.3. IZOLOVANJE α -FURANOPINGVIZANOLA HROMATOGRAFSKIM RAZDVAJANJEM ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>P. CORDAEANA</i>	125
3.5.4. SINTEZA FURANOPINGVIZANONA	126
3.5.5. REDUKCIJA FURANOPINGVIZANONA.....	127
3.6. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE <i>CONOCEPHALUM</i> <i>CONICUM</i>	128

3.6.1. DOBIJANJE DIETIL-ETARSKIH EKSTRAKATA JETRENJAČE <i>C. CONSUM.</i>	128
3.6.2. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE DIETIL-ETARSKIH EKSTRAKATA JETRENJAČE <i>C. CONSUM.</i>	128
3.6.3. OKSIDACIJA FRAKCIJE 24	134
3.7. TESTIRANJE TOKSIKOLOŠKE/FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI ODABRANIH JEDINJENJA	136
3.7.1. LEKOVI I HEMIKAJIJE KORIŠĆENI U ISPITIVANJIMA.....	136
3.7.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	136
3.7.3. IZOLOVANJE I KULTIVACIJA ĆELIJA	137
3.7.4. ĆELIJSKA VIJABILNOST	138
3.7.5. MIKROSKOPIRANJE SPLENOCITA.....	142
3.7.6. KOMET TEST	142
3.7.7. ODREĐIVANJE CELULARNIH PROTEINA, UKUPNOG SADRŽAJA DNK I RNK.....	144
3.7.8. ISPITIVANJE METABOLIZMA I DISTRIBUCIJE α -FURANOPIGVIZANOLA I FURANOPINGVIZANONA U ĆELIJAMA/MEDIJUMU.....	144
3.7.9. BOJENJE LAKTAT DEHIDROGENAZOM NA RAZMAZU SPLENOCITA	144
3.8. STATISTIČKA ANALIZA	146
3.8.1. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA DOBIJENIH <i>IN VITRO</i> ĆELIJSKIM TESTOVIMA	146
3.8.2. MULTIVARIJANTNA ANALIZA: METODA ANALIZE GLAVNIH KOMPONENTI I AGLOMERATIVNA HIJERARHIJSKA KLASITER ANALIZA.....	146
3.9. MOLEKULSKO MODELOVANJE	147
4. REZULTATI I DISKUSIJA	148
4.1. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>P. CORDAEANA</i>	149
4.1.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>P. CORDAEANA</i>	149
4.1.2. IZOLOVANJE I IDENTIFIKACIJA α -FURANOPINGVIZANOLA	152
4.1.3. IDENTIFIKACIJA FURANOPINGVIZANONA.....	163

4.1.4. HEMIJSKI SASTAV DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA BILJNE VRSTE <i>P. CORDAEANA</i>	169
4.1.5. ISPITIVANJE POTENCIJALNE IMUNOMODULATORNE AKTIVOST NOVODETEKTOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA JETRENJAČE <i>P. CORDAEANA</i>	173
4.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>P. PLATYPHYLLA</i>	186
4.2.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>P. PLATYPHYLLA</i>	186
4.3. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>C. CONICUM</i>	193
4.3.1. HEMIJSKI SASTAV DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA BILJNE VRSTE <i>C. CONICUM</i>	193
4.3.2. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA	211
4.3.3. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE <i>rel</i> -(1(10)Z,4S,5E,7R)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA	220
4.3.4. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE <i>rel</i> -(1(10))Z,4S,5E,7R)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA	224
4.3.5. (BIO)HEMIJSKA POVEZANOST NOVOIDENTIFIKOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE <i>C. CONICUM</i>	227
4.3.6. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>C. CONICUM</i>	236
4.3.7. IMUNOMODULATORNI I CITOTOKSIČNI EFEKAT NOVOIZOLOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA JETRENJAČE <i>C. CONICUM</i>	243
5. IZVOD	258
6. SUMMARY	264
7. LITERATURA	270
8. PRILOZI	309

9. BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA.....	381
--	------------

10. IZJAVE AUTORA.....	390
-------------------------------	------------

1. UVOD I CILJEVI RADA

Razdeo jetrenjača (Marchantiophyta) predstavlja grupu autotrofnih, primarno kopnenih biljaka koje, zajedno sa razdelima pravih mahovina (Bryophyta) i rožnjača (Anthocerotophyta), spadaju u podcarstvo Bryobiotina (Glime, 2021). Rezultati filogenetskih analiza ukazuju na to da jetrenjače predstavljaju jednu od najstarijih sačuvanih linija kopnenih biljaka (Asakawa, 2012). Razdeo obuhvata oko 10 000 vrsta, koje se odlikuju talusoidnom ili folioznom građom, prilagođenom najrazličitijim ekološkim uslovima habitata širom sveta (Veljić et al., 2018).

Njihova jedinstvenost, u poređenju sa drugim razdelima, ogleda se, između ostalog, u prisustvu uljanih telašaca (specifične organele smeštene u ćelijama). Ova uljana telašca predstavljaju veoma važan taksonomski marker razdela Marchantiophyta. Ona sadrže pretežno lipofilne mono-, seskvi- i diterpenoide, od kojih su mnogi enantiomerni u odnosu na terpene iz viših biljaka, izuzev drimanskih, germakranskih i gvajanskih skeleta (Asakawa, 2009). Pored terpenoida, jetrenjače su bogate raznovrsnim aromatičnim jedinjenjima, uključujući bibenzile, bis-bibenzile, benzoate, cinamate, fenole sa dugim alkilnim lancima, naftalene, ftalide, acetogenine i izokumarine (Asakawa, 2007). Do sada, od oko 700 terpenoida i 220 aromatičnih jedinjenja, bez flavonoida, izolovanih iz jetrenjača, više stotina je predstavljalo nova jedinjenja, sa pronađenih preko 40 novih ugljovodoničnih skeleta.

Evolucija biosintetskih puteva omogućava biljkama da prilagode svoj metabolizam u skladu sa promenama u okruženju, što je od suštinskog značaja za njihovo preživljavanje. Ovi metabolički putevi omogućavaju biljkama da optimizuju resurse, interaguju sa drugim organizmima i održavaju ekološke ravnoteže u različitim ekosistemima. Hemijska diverzifikacija predstavlja ključnu strategiju adaptacije biljaka na spoljne promene. Iako sekundarni metaboliti nemaju direktnu ulogu u osnovnim životnim procesima biljke, poput rasta i reprodukcije, njihova proizvodnja podložna je značajnim varijacijama. Ovaj proces omogućava biljnim vrstama da se prilagode promenama u okruženju i suoče sa ekološkim izazovima tokom različitih faza evolucije. Metaboliti jetrenjača često uključuju hemijske skelete koji nisu prisutni u višim biljkama, čime pružaju uvid u rane faze evolucije biljnog metaboličkog puta. Na primer, prisustvo pingvizanskog skeleta kod određenih vrsta

ukazuje na jedinstvene enzimske procese koji se mogu dalje istraživati, a metaboliti od interesa sintetisati.

Metaboliti jetrenjača ne samo da doprinose boljem razumevanju hemijske ekologije i biosintetskih puteva, već imaju i potencijalno značajnu ulogu u medicini i farmaciji. Naime, briofite se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini, a njihova primena zabeležena je u Brazilu (Pinheiro de Silva et al., 1989), Engleskoj (Wren, 1956), Severnoj Americi (Pejin et al., 2011a,b), Kini (Ding, 1982; Wu, 1982), Indiji (Watts, 1891) i Nemačkoj (Frahm, 2004). Takođe, poznato je da ove biljne vrste u svom prirodnom habitusu nisu oštećene od strane mikroorganizama, insekata, puževa, ili sitnih sisara, što još jednom govori o njihovom potencijalu primene u tretmanu oboljenja.

Imunologija se bavi proučavanjem strukture i funkcije imunog sistema, koji je kroz milione godina evolucije razvio sofisticirane mehanizme za zaštitu organizma od patogena i drugih štetnih faktora. Imunomodulacija se definiše kao svaka terapijska intervencija koja izaziva promenu u imunskom odgovoru (bilo stimulativnu ili supresivnu) (Gea-Banacloche, 2006). Jedan od mehanizama kroz koje imunomodulatori deluju je kontrola specifičnih imunskih ćelija (limfociti, makrofagi, neutrofili, T-limfociti i NK-ćelije) (Gea-Banacloche, 2006). Pojačanje imunskog odgovora poželjno je radi prevencije infekcija kod stanja imunodeficijencije, borbe protiv već uspostavljenih infekcija i karcinoma (Van den Brink, 2004; Gea-Banacloche, 2006; Yang, 2009; Shukla, 2012). Pored endogenih imunostimulanasa, broj egzogenih modulatora neprestano raste (Agarwal, 1999). Imunosupresivni agensi kontrolišu biomarkere zapaljenja i njihove regulatorne puteve, te se mogu koristiti u tretmanu ili prevenciji imunopatoloških stanja (Van den Brink, 2004). Međutim, dosadašnji imunosupresivni lekovi često imaju niz neželjenih efekata (Bascones-Martinez, 2014), uključujući interakcije sa farmakokinetikom i farmakodinamikom drugih lekova, što ograničava njihovu dugoročnu primenu (Hsu i Katelaris, 2009). Zbog navedenih rizika, istraživanja su poslednjih godina usmerena ka pronalaženju novih, sigurnijih imunomodulatornih lekova, oslanjajući se donekle na tradicionalnu primenu pojedinih biljnih vrsta. Prvi pokušaji razvoja imunomodulatornih agenasa zasnivali su se na tradicionalnim biljnim medicinskim proizvodima, a čak i danas, jedinjenja prirodnog

(biljnog) porekla igraju značajnu ulogu u razvoju novih imunoterapeutskih lekova (Wagner, 1998).

Jetrenjače predstavljaju još uvek nedovoljno ispitano polje na ovu temu. Veliki broj njih korišćen je u tradicionalnoj medicini pri tretmanu opekotina, posekotina, groznice, ulcera, ekcema, rana, tuberkuloze, kamena u žučnoj kesi i mnogih drugih stanja koje uključuju imuni sistema (Alam, 2012; Ando, 1983; Asakawa, 2015; Chandra et al., 2017; Ding, 1982; Kumar et al., 2007; Pant i Tewari, 1989; Wu, 1977; Yan, 1999). Fitohemijski skrining sekundarnih metabolita jetrenjača, pokazao je da mnogi, posebno terpenoidne strukture, izazivaju farmakološke efekte značajne za imuni sistem. Na primer, jetrenjače se ističu sa dokazanim aktivnostima: citotoksičnost, anti-HIV i inhibicija DNK-polimeraze- β , antimikrobna i antifungalna aktivnosti, inhibicija oslobađanja superoksidnih anjonskih radikala, inhibicija 5-lipooksigenaze, kalmodulina, hijaluronidaze, ciklooksigenaze, i inhibicije proizvodnje azot-(II)-oksida (NO) (Asakawa, 2007). Takođe, potvrđene su neurotrofične aktivnosti, sposobnosti opuštanja mišića, inhibicije kathepsina B i L, kardiotoničke i antagonističke aktivnosti prema vazopresinu, kao i uticaji na rezistenciju na lekove i citotoksične procese (Asakawa, 2004, 2007; Shi et al., 2008).

Rod *Porella* L., iz familije Porellaceae, predstavlja kosmopolitski rod jetrenjača koji obuhvata 252 vrste (The Plant list, 2013). Na osnovu metaboličkog profila, vrste roda *Porella* klasifikovane su u hemotipove (Asakawa et al., 1979b; Gilabert et al., 2011; Ludwiczuk et al., 2011). Analizom sekundarnih metabolita ovih vrsta identifikovane su različite grupe seskviterpenoida (aromadendrani, afrikani, lepidozani, germakrani, drimani, gvajani i dr.), diterpenoida, kao i steroida i flavonoida (Asakawa et al., 1982a; 2013a; Markham i Porter, 1978). Dosadašnja istraživanja ukazuju na značajne razlike u profilu sekundarnih metabolita kako između različitih rodova, tako i među vrstama unutar roda *Porella*.

Porella cordaeana (Huebener) Moore (sinonim, *Jungermannia cordaeana* Huebener) je fitohemijski analizirana u malom broju radova (Toyota et al., 1989b; Harrigan et al., 1993; Tan et al., 2017; Tosun et al., 2013; Bukvički et al., 2012). Ova vrsta pripada grupi lisnatih jetrenjača, među čijim je metabolitima dominantan redak pingvizanski tip

seskviterpena, prisutan isključivo kod jetrenjača. U nekim od prethodnih istraživanja ove vrste, određena identifikovana jedinjenja zabeležena su po prvi put (Harrigan et al., 1993; Tan et al., 2017; Toyota et al., 1989b). Dalje, fitohemijska istraživanja vrste *P. cordaeana* ukazuju na značajnu varijabilnost u njenom sekundarnom metaboličkom profilu, koja zavisi od geografskog porekla biljnog materijala (Asakawa, 1995a; Bukvički et al., 2012; Harrigan et al., 1993; Tosun et al., 2013). Analizama su, pored pingvizanskih seskviterpena, identifikovane i druge retke seskviterpenske strukture, kao što su lepidozanska, drimanska, monociklofarnezanska i afrikanska (Asakawa et al., 2013a). Svi dosadašnji zaključci u vezi sa sekundarnim metabolitima vrste *P. cordaeana* proizašli su iz analiza ekstrakata, dok nijedno od prethodnih istraživanja nije uključivalo analizu sastava etarskog ulja ove vrste. Dietil-etarski ekstrakt *P. cordaeana* iz Turske pokazao je značajne antiinflamatorne i analgetičke aktivnosti, što se pripisuje prisustvu pingvizanskih seskviterpena (pingvizanin i spiropingvizanin) (Harrigan et al., 1993). Pored toga, sirovi ekstrakti *P. cordaeana* različite polarnosti demonstrirali su antimikrobnu aktivnost, naročito prema mikroorganizmima povezanim sa hranom (Bukvički et al., 2012).

Porella platyphylla L. Pfeiff. je još jedan predstavnik ovog roda, poznat po odsustvu oporog ukusa (zbog izostanka drimanskog seskviterpena poligodjala) i po dominantnoj biosintezi seskviterpena retkog pingvizanskog skeleta (Buchanan et al., 1996; Nagashima et al., 1996a). Prema dostupnim podacima, etarsko ulje ove vrste do sada je analizirano u samo jednom istraživanju (Suire i Bourgeois, 1977), dok je sekundarnim metabolitima ekstrakata ove vrste, pretežno iz uzoraka francuskog, turskog, bugarskog i švedskog porekla (Akatin et al., 2024; Asakawa, 1979a; 1979b; 1979c; 2018; Mues, 1982; Nilsson, 1969; 1973; Tosun et al., 2013), posvećeno ukupno petnaest studija. Zabeleženo je prisustvo različitih monoterpenoida (limonen, β -felandren, α -terpinen, terpinolen, *p*-cimen, α -pinen, β -pinen, kamfen, β -sabinen, itd.), i pomenuto dominantnih pingvizanskih seskviterpena (Asakawa et al., 1979a; 1979b; 1979c; 1980a; Buchanan et al., 1996; Suire i Bourgeois, 1977). Prethodna istraživanja pokazala su da ekstrakti ove vrste ispoljavaju antimikrobno delovanje protiv gram-pozitivnih bakterija (Asakawa et al., 1979d; Pavletić i Stilinović, 1963), dok su ispitivane i njene antiinflamatorne i antinociceptivne aktivnosti

(Tosun et al., 2013). Biljni materijal poreklom iz Srbije nije do sada bio predmet fitohemijskih istraživanja.

Conocephalum conicum (L.) Dumort. (Conocephalaceae) je taloidna jetrenjača, koja predstavlja kompleks šest kriptičnih vrsta (A, C, F, J, L, S) - vrste se jasno genetički razlikuju, a pokazuju ili male morfološke razlike, ili se morfološki ne razlikuju (Ludwiczuk et al., 2014). U dosadašnjim istraživanjima (Toyota et al. 1997; Melching et al. 1999; Ludwiczuk et al. 2013; Suire i Burgeois, 1977), pokazano je da su seskviterpeni, uključujući i konocefalenol (retki brazilanski skelet) i lepidozen (retki lepidozanski skelet), monoterpeni i aromatična jedinjenja najčešći sekundarni metaboliti ove vrste. Utvrđeno je da su ova jedinjenja odlični hemotaksonomski markeri, npr. brazila-5,10-dien, dehidratacioni proizvod dominantnog konocefalenola, karakterističan je za evropsku kriptičnu vrstu L (Ludwiczuk et al. 2013). Takođe, dosadašnja fitohemijska istraživanja vrste *C. conicum* pokazala su značajne razlike u profilu sekundarnih metabolita, koje se mogu pripisati kompleksnoj genetskoj strukturi i uticaju geografskog porekla na metaboličke osobine biljke (Ludwiczuk et al., 2013). Jetrenjača *C. conicum* naširoko se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini u sastavu biljnih ulja i mikstura za lečenje različitih oboljenja, uključujući pulpitis (Sun, 2017), kolorektalne adenomatozne polipe (Li, 2016), kožne i varikozne ulceracije (Li, 2015; Sun, 2014), tuberkulozu (Dai, 2015), opekotine (Shu, 2015), ujede (Zhou et al., 2015), facijalni periferni neuritis i impetigo kod novorođenčadi (Yang, 2013). Pored toga, etnobotanički preparati roda *Conocephalum* pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antimikrobna, antifungalna, antipiretička i antidotalna svojstva (Glime, 2017), što se pripisuje bogatom spektru sekundarnih metabolita prisutnih u ovim biljkama. Metabolički profil *C. conicum* sa Balkanskog poluostrva do sada nije analiziran.

Imajući sve prethodno u vidu, ciljevi ove doktorske disertacije bili su ispitivanje tri vrste jetrenjača – *P. cordaeana*, *P. platyphylla* i *C. conicum* sakupljenih sa različitih lokaliteta Balkanskog poluostrva, koje obuhvata:

- ❖ ekstrakciju organskim rastvaračem i/ili izolovanje etarskih ulja biljnog materijala;

- ❖ analizu ulja i ekstrakata pomoću gasne hromatografije sa masenom detekcijom (GC-MS) i preparativno hromatografsko razdvajanje sastojaka na koloni silika-gela;
- ❖ izolovanje/sintezu i određivanje strukture odabranih sekundarnih metabolita pomoću kombinacije većeg broja spektralnih metoda;
- ❖ na osnovu dobijenih, kao i prethodno objavljenih rezultata, razmatranje (bio)hemijske karakteristike vrste ili drugih taksonomskih kategorija;
- ❖ testiranje biološke/farmakološke aktivnosti izolovanih čistih jedinjenja na ćelije imunog sistema (splenocita glodara).

Predviđena ispitivanja su sprovedena korišćenjem sledećih metoda:

- ❖ *dobijanje etarskih ulja*—hidrodestilacija po Klevendžeru (*Clevenger*);
- ❖ *dobijanje ekstrakata*—maceracija u dietil-etu;
- ❖ *analiza*—gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS) i tankoslojna hromatografija na SiO₂ (TLC);
- ❖ *sinteza*—odabrani sekundarni metabolit *P. cordaeana*;
- ❖ *izolovanje*—*dry flash* hromatografija i tečna hromatografija pod srednjim pritiscima (MPLC);
- ❖ *statistička analiza*—statistička obrada rezultata korišćenjem *One-Way* ANOVA testa uz *Tukey-ev post-hoc* test, kao i multivarijantna analiza pomoću programskog paketa *plug-in* XLSTAT za program EXCEL;
- ❖ *spektroskopska i strukturna karakterizacija*—nuklearna magnetna spektroskopija ugljenika-13 i vodonika (¹H- i ¹³C-NMR, jedno- i dvodimenzionalna), infracrvena spektroskopija (IR), ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV-Vis) i masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS);
- ❖ *biološka/farmakološka aktivnost*—vijabilnost ćelija (MTT-, NR- i TB-test), mikroskopiranje splenocita, ispitivanje metabolizma i distribucije metabolita od interesa u ćelijama/medijumu, Komet test, koncentracija proteina, sadržaj DNK i RNK u lizatima ćelija i histohemijsko LDH bojenje.

2. OPŠTI DEO

2.1. RAZDEO MARCHANTIOPHYTA I NJEGOVA KLASIFIKACIJA

Razdeo jetrenjača (Marchantiophyta), zajedno sa razdelima rožnjača (Anthocerotophyta) i pravih mahovina (Bryophyta), spada u parafiletsku grupu - biljno podcarstvo Bryobiotina, poznatije pod zajedničkim imenom briofite (Glime, 2021). Klasifikacija briofita u ovoj disertaciji data je po *Goffinet i Shaw* (2009). U zavisnosti od autora, sinonima i usklađenosti nivoa taksonomske pripadnosti, razdeo obuhvata do 10.000 vrsta, raspoređenih u 74 familije, sa preko 300 rodova (Veljić et al., 2018). Prema genomskoj teoriji, jetrenjače se smatraju vrstama koje su prve naselile kopno. Takođe, jedan od najranijih dokaza o postojanju kopnenih biljaka (i to, analizom ultrastrukture mikrofosila spora rasprostranjenih u sedimentima stena) datira iz perioda ordovicijuma, pre 475 miliona godina; tom prilikom zaključeno je da su ispitivane spore, najverovatnije, poreklom od jetrenjača, ili njima veoma srodnih rožnjača (Wellman et al., 2003). Postojanje fosilizovanih jetrenjača, koje se mogu odnositi na anakrogene vrste reda Jungermanniales, slične vrstama današnjih rodova *Aneura* Dumort. i *Treubia* K.I. Goebel, potvrđeno je u karbonu, uz ostatke vrsta *Hepaticites kidstonii* J. Walton i *Thallites willisiae* (J. Walton) J. Walton. Fosilni ostaci svedoče o postojanju jetrenjača i u trijasu, donjoj kredi (Harris, 1938; 1939), kao i u kenozoiku (kvartar) (Steere, 1946), dok je 1961. godine pronađen i najstariji fosilni ostatak jetrenjače *Pallaviciniites devonicus* (Hueber) R.M.Schust., koji datira iz gornjeg devona (Brandt, 1995). Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da 7 vrsta jetrenjača potiče iz paleozoika, 14 iz mezozoika, dok 35 vrsta jetrenjača datira iz tercijara (Veljić et al., 2018).

Koren naziva ovih drevnih biljaka poreklom je iz davnog srednjeg veka. Naime, u delu „Doctrine of signatures” – koncipiranom na metafizičkoj teoriji iz doba *Dioscorides*-a i *Galen*-a, spominje se da bi se, posmatrajući habitus biljke, moglo zaključiti koji bi organ u ljudskom telu ona mogla da leči. Kako talus jetrenjača podseća oblikom na režnjeve jetre, tokom perioda evropske renesanse predložena je njihova upotreba za lečenje oboljenja ovog organa. Otuda u nazivu jetrenjača kombinacija grčke reči $\eta\pi\alpha\tau\omicron\varsigma$ = „hepatos” i engleske reči „liver” sa značenjem „jetra”, kao i engleskog termina „wort”, što znači „mala biljka” (liverwort, hepatica). Naziv Hepaticae se prvenstveno odnosio na rod *Conocephalum*, a onda je njegova upotreba proširena i na ostale jetrenjače (Veljić et al., 2018). Prvim literaturnim navodom *Marchantiophyta* smatra se delo „Species Plantarum” *Carl Linnaeus*-a, koji je prepoznao i imenovao ovu grupu (Linnaeus,

1753). Početkom 19. veka su, do tada opisane jetrenjače, raspoređene u okviru 21 roda od strane *Raddi*-a (Raddi, 1808; 1818), *Gray*-a (Gray, 1821), *Dumortier*-a (Dumortier, 1822; 1835), *Corda* (Corda, 1829) i *Nees Von Esembeck*-a (Nees Von Esembeck, 1833), nezavisno. Tradicionalna podela ovog razdela podrazumeva postojanje dve klase, Marchantiopsida i Jungermanniopsida, rasprostranjene od tropskih do cirkumpolarnih predela. Nakon ekspanzije molekularnih i filogenetskih studija, moderna klasifikacija briofita, predložena od strane *Crandall-Stotlera* i saradnika (Crandall-Stotler et al., 2008), ukazuje na podelu razdela Marchantiophyta na tri klase- Jungermanniopsida, Marchantiopsida i Haplomitriopsida, sa ukupno sedam podklasa, 15 redova i preko 300 rodova, dok se broj novoopisanih vrsta i dalje uvećava (tabela 2.1.1.) (Asakawa et al., 2013a; Veljić et al., 2018).

Procenjuje se da se klasa Marchantiopsida odvojila od klase Jungermanniopsida u kasnom devonu i da najčešće obuhvata jetrenjače sa složenim tipom talusa. U okviru klase Marchantiopsida prepoznate su dve podklase, Marchantiidae i Blasiidae. Podklasa Marchantiidae sačinjena je od četiri reda (Sphaerocarpaceae Cavers, Neohodgsoniales D. G. Long, Lunulariales H. Klinggr i Marchantiales Limpr.) sa devetnaest familija, dok podklasa Blasiidae obuhvata red Blasiales Stotl & Crand., i familiju Blasiaceae H. Klinggr. (tabela 2.1.1.) (He-Nygrén et al., 2006). U okviru klase Jungermanniopsida Stotler & Stotl. postoje dve podklase prostih taloidnih jetrenjača, Pelliidae i Metzgeriidae, kao i podklasa Jungermanniidae, sačinjena od folioznih jetrenjača. Podklasa Pelliidae podeljena je u tri reda: Pelliales, Fossombroniales Schijakov i Pallaviciniales W. Fery & M. Stech. Podklasa Metzgeriidae obuhvata dva reda: Metzgeriales i Pleuroziales, dok podklasa Jungermanniidae sadrži tri reda: Porellales, Ptilidiales i Jungermanniales. Smatra se da je podklasa Jungermanniidae nastala u kasnom karbonu, divergiranjem od podklase Metzgeriidae (tabela 2.1.1.) (He-Nygrén et al., 2006; Forrest et al., 2006). Klasa Haplomitriopsida Stotler & Stotl.-Crand. izdvojena je relativno nedavno zbog specifične kombinacije morfoloških karakteristika i, za razliku od prethodne dve klase, obuhvata manji broj taksona. Sastoji se od dve potklase (tabela 2.1.1.), koje uključuju samo dve familije. Familija Haplomitriaceae Dedeček obuhvata osam vrsta u okviru roda *Haplomitrium* Ness (Bartholomew-Began, 1991), dok familiju Treubiaceae Verdoorn čini sedam vrsta roda *Treubia* Goebel, kao i dve vrste roda *Apotreubia* Hattori & Mizutani (Crandall-Stotler i Stotler, 2000). Dalja klasifikacija unutar podklasa, te rasvetljavanje filogenetskih odnosa, temelji se, pored morfoloških razlika, na razlikama molekularnih studija. Takođe, hemijski sastojci

Marchantiophyta predmet su detaljnih istraživanja usled toga što, za razliku od mahovina i rožnjača, gotovo sve jetrenjače poseduju uljana telašca (Veljić et al.,2018.). Ove karakteristične ćelijske organele, oivičene membranom i sačinjene od terpenoida, odnosno aromatičnih ulja suspendovanih u ugljenohidratnom ili proteinima bogatom matriksu, predstavljaju važne markere prilikom klasifikacije (Glime, 2021; Veljić et al., 2018).

Tabela 2.1.1. Klasifikacija razdela Marchantiophyta.

Klasa	Marchantiopsida
Podklasa	Blasiidae
Red	Blasiales
Familija	Blasiaceae
Podklasa	Marchantiidae
Red	Sphaerocarpales
Familija	Sphaerocarpaceae, Riellaceae
Red	Neohodgsoniales
Familija	Neohodgsoniaceae
Red	Lunulariales
Familija	Lunulariaceae
Red	Marchantiales
Familija	Aytoniaceae, Cleveaceae, Conocephalaceae, Corsiniaceae, Cyathodiaceae, Dumortieraceae, Exormothecaceae, Marchantiaceae, Monocarpaceae, Monocleaceae, Monosoleniaceae, Oxymitraceae, Ricciaceae, Targioniaceae, Wiesnerellaceae
Klasa	Jungermanniopsida
Podklasa	Pelliidae
Red	Pelliales
Familija	Pelliaceae
Red	Fossombroniales
Podred	Calyculariineae
Familija	Calyculariaceae
Podred	Makinoineae
Familija	Makinoaceae
Podred	Fossombroniineae
Familija	Allisoniaceae, Fossombroniaceae, Petalophyllaceae
Red	Pallaviciniales
Podred	Phyllothalliineae
Familija	Phyllothalliaceae
Podred	Pallaviciniineae
Familija	Hymenophytaceae, Moerckiacae, Pallaviciniaceae, Sandeothallaceae
Podklasa	Metzgeriidae
Red	Pleuroziales
Familija	Pleuroziaceae
Red	Metzgeriales
Familija	Metzgeriaceae, Aneuraceae, Mizutaniaceae, Vandiemeniaceae
Podklasa	Jungermanniidae
Red	Porellales
Podred	Porellinae
Familija	Porellaceae, Goebeliellaceae, Lepidolaenaceae
Podred	Radulineae
Familija	Radulaceae
Podred	Jubulineae
Familija	Frullaniaceae, Jubulaceae, Lejeuneaceae,
Red	Ptilidiales
Podred	Ptilidiineae
Familija	Ptilidiaceae, Neotrichocoleaceae, Herzogianthaceae

Red	Jungermanniales
Podred	Personiellineae
Familija	Personiellaceae, Schistochilaceae
Podred	Lophocoleineae
Familija	Brevianthaceae, Chonecoleaceae, Grolleaceae, Herbertaceae, Lepicoleaceae, Lepidoziaceae, Lophocoleaceae, Mastigophoraceae, Phycolepidoziaceae, Plagiochilaceae, Pseudolepicoleaceae, Trichocoleaceae, Vetaformaceae
Podred	Cephaloziineae
Familija	Adelanthaceae, Cephaloziellaceae, Cephaloziaceae, Jamesoniellaceae, Scapaniaceae
Podred	Jungermannineae
Familija	Acrobolbaceae, Antheliaceae, Arnelliaceae, Balantiopsidaceae, Calypogeiaceae, Delavayellaceae, Geocalycaceae, Gymnomitriaceae, Gyrothyraceae, Jackiellaceae, Jungermanniaceae, Mesoptychiaceae, Myliaceae, Trichotemnomataceae
Klasa	Haplomitriopsida
Podklasa	Treubiidae
Red	Treubiales
Familija	Treubiaceae
Podklasa	Haplomitriidae
Red	Calobryales
Familija	Haplomitriaceae

2.1.1. RASPROSTRANJENJE I EKOLOGIJA

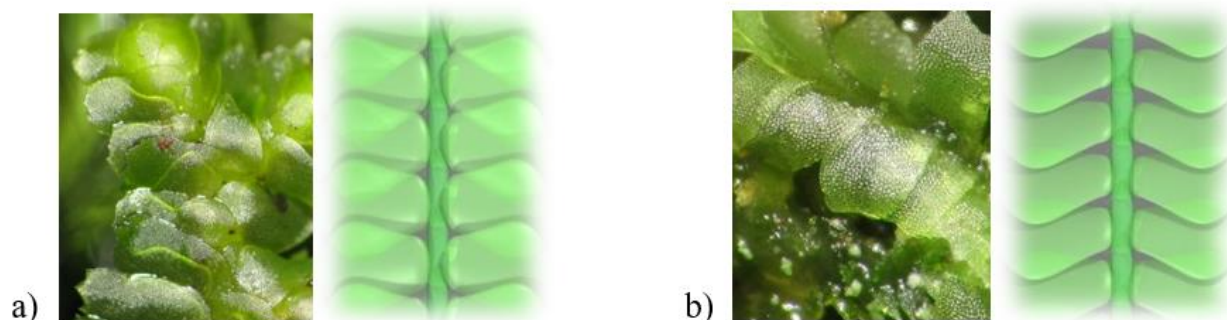
Jetrenjačama pripadaju uglavnom kopnene kosmopolitske forme visoke adaptibilnosti, koje, u pogledu staništa, preferiraju humidne uslove supstrata. U skladu sa navedenim, mogu se naći na različitim tipovima zemljišta u zaseni, na trulim stablima, u priobalnim zonama potoka i močvara, na stenovitom supstratu (litofite) (Randelović et al., 2006). Predstavnici koji egzistiraju u aridnim uslovima su retki. Jedna od ekoloških formi u okviru ovog razdela su epifite (tzv. „paraziti prostora“, obrastaju koru drvenastih vrsta, ali i listove dendroflоре tropskih kišnih šuma). Predstavnici pravih akvatičnih jetrenjača ograničeni su na flotantne (plutajuće) vrste roda *Riccia* L. i submerzne (potopljene) vrste roda *Riella* Mont. Jetrenjače veoma dobro podnose ekstremne vremenske prilike, zahvaljujući tome što se odlikuju promenljivom vlažnošću biljnog tela (poikilohidrične biljke). Naime, sa smanjenjem vlažnosti na staništu, smanjuje se metabolička aktivnost i postiže stanje mirovanja (anabioze ili anhidrobioze). Čak i nakon produženih perioda kompletne dehidracije ili zamrzavanja, u povoljnim sredinskim uslovima (sa povećanjem vlažnosti) jetrenjače podležu fiziološkom obnavljanju – reviviscenciji (Glime, 2021; Veljić et al., 2018).

2.1.2. MORFOLOGIJA I ANATOMIJA

Jetrenjače su relativno proste morfološke građe, i odsustvo visoko diferenciranih vegetativnih organa, sprovodnih snopića i lignina ograničava njihov rast svrstavajući ove kopnene biljke u niskorastuće, od par stotina μm (rod *Cephaloziella* (Spruce) Schiffn.) do nekoliko desetina cm (rod *Dumortiera* Ness). Od ostalih dvaju razdela briofita razlikuju se po dorzoventralnoj orijentaciji talusa, jednoćelijskim rizoidima, odsustvu kolumele u centru kapsule, odsustvu stoma i kutikule, kao i prisustvu uljanih telašaca bogatih isparljivim jedinjenjima i lipofilnim terpenoidima suspendovanim u ugljenohidratnom ili proteinskom matriksu, obavijenom membranom (Glime, 2021). Karakteriše ih heteromorfni životni ciklus, sa dominantnim višegodišnjim gametofitom (haploidna (n) generacija), na kome matrotrofno živi relativno kratkotrajni sporofit (diplna ($2n$) faza) (slika 2.4.2.) (Veljić et al., 2018). Na osnovu morfološke varijabilnosti gametofita, jetrenjače možemo diferencirati u foliozne, one sa jednostavnim talusom (frondozne), kao i one sa kompleksnim talusom (maršancioidne). Ukoliko vegetativni organi gametofita obuhvataju strukture nalik stablima, cirkularne na poprečnom preseku (kaulidije), sa izraženim prostim listićima (filidije) reč je o folioznim jetrenjačama. S druge strane, dorzo-ventralno spljošten naboran ili režnjeviti talus karakteristika je taloidnih jetrenjača (slika 2.4.2.) (Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018).

Kauloid folioznih jetrenjača je zelene, purpurne ili crvenkaste boje, proste parenhimatozne građe, po čijoj periferiji je eventualno moguće uočiti jedno- ili višeslojnu koru (koju sačinjavaju sitnije ćelije sa blago zadebljanim zidovima) i srž (sa krupnijim ćelijama tanjih zidova). Filoidi su najčešće okruglastog, srcastog ili ovalnog oblika; mogu biti režnjeviti, na različite načine deljeni (jedno-, dvo-, višestruko), celog ili nazubljenog oboda. Osnovna uloga filoida je asimilaciona. Raspored folioznih izraštaja može biti naizmeničan ili naspraman, uz međusobno prekrivanje, nadležnog (eng. *incubous*) ili podležnog tipa (eng. *succubous*). U slučaju nadležnog prekrivanja, gornja ivica svakog filoida prekriva donju ivicu sledećeg filoida, postavljenog iznad njega. Prekrivanje je u skladu sa habitusom ovih biljaka (pretežno rastu na staništima gde voda dolazi odozgo, npr. kora drveća), stoga je kapilarno sprovođenje vode duž gametofita od izuzetnog značaja. Kod podležnog tipa situacija je obrnuta, tj. gornja ivica svakog filoida sakrivena je ispod

donje ivice filoida iznad (slika 2.1.1.) (Randelović et al., 2006; Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018).

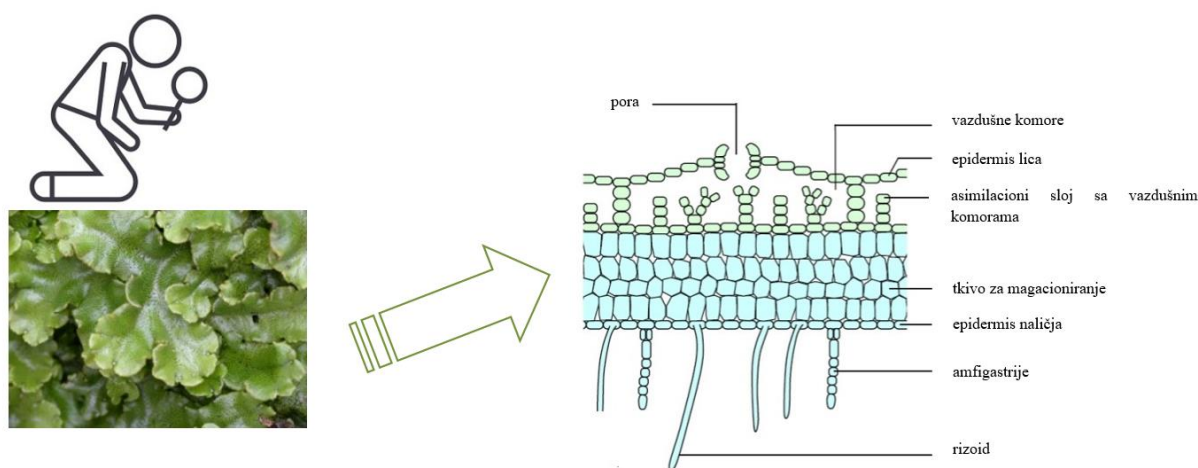


Slika 2.1.1. Raspored listova: a) nadležno prepočinjanje na primeru jetrenjače *Bazzania trilobata* (L.) Gray.; b) podležno prepočinjanje filoida na primeru jetrenjače *Lophocolea heterophylla* (Schrand.) Dumort.

Talusne jetrenjače mogu imati proste (frondozone) ili kompleksne forme gametofita (maršancioidne jetrenjače). Prostu taloidnu formu karakterišu bilateralno simetrični, puzeći talusi, koji su najčešće dihotomo ili monopodijalno granati pri vrhu, kao i prisustvo zadebljalog centralnog rebra (*costa*), uz koje se mogu uočiti amfigastrije i rizoidi. Složenu taloidnu formu odlikuje dorzoventralna građa, i najčešće dihotomo grananje. Na poprečnom preseku, ispod epidermisa dorzalne strane, u kojem su smeštene proste ili složene pore, nalazi se asimilaciono tkivo sa vazдушnim komorama. Dalje ka ventralnoj strani nadovezuje se tkivo za magacioniranje i provođenje, parenhimskog tipa, kao i epidermis naličja sa rizoidima i amfigastrijama. Kod nekih predstavnika se može uočiti niz ćelija diferenciranih da provode vodu (hidroide), kao i ćelije koje provode organske materije (leptoide) (Vashishta et al., 2010).

Amfigastrije su mali jednoslojni izraštaji u obliku lamela, bogati uljanim ćelijama, zrcima skroba ili sluznim papilama, sa ulogom u kapilarnoj provodljivosti i zaštiti od isušivanja. Iz specijalizovanih ćelija epidermisa, amfigastrija, površinskih ćelija kauloida ili retko iz donjeg režnja listića, formiraju se brojne končaste tvorevine – rizoidi. Rizoidi su prisutni kod svih jetrenjača, izuzev vrsta *Haplomitrium*, a ponekad odsustvuju i kod akvatičnih formi predstavnika roda *Riccia*. Oni imaju dvojaku ulogu, i to da pričvrste gametofit za supstrat, kao i da sprovode vodu i mineralne materije. Uglavnom su jednoćelijski, osim kod vrsta rodova *Plagiochila*

(Dumort.) Dumort. i *Pachyschistochila*, kada, nakon gljivičnih infekcija, dostižu višćelijski nivo organizacije (Pressel et al., 2008; Schuster, 1984). Rizoidi većine kompleksnih taloidnih jetrenjača su dimorfni, tipično glatkozidne forme, ili ređe forme sa različitim invaginacijama (jezičastim, tubuloznim, papiloznim, granatim) unutrašnjeg zida. Nakon perioda dehidracije, rizoidi sa invaginisanim zidovima mogu da povrate svoj strukturni i funkcionalni integritet u potpunosti, te budu uključeni u transport vode, dok rizoidi glatkih zidova ostaju spljošteni i zadržavaju samo ulogu u pričvršćivanju talusa za supstrat (Duckett et al., 2000). Glatkozidni rizoidi takođe služe i kao pogodna struktura za razvoj endofita, simbionskih gljiva, pri čemu su mesto kolonizacije, najčešće, njihovi prošireni razgranati krajevi (Russell i Bulman, 2005). Dok je prisustvo rizoida, kao pleziomorfna (primitivna, neizvedena) osobina, prisutna i kod rožnjača, prisustvo uljanih telašaca karakteristično je samo za jetrenjače (slika 2.1.2.) (Randelović et al., 2006; Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018).



Slika 2.1.2. Poprečni presek kompleksnog talusa na primeru jetrenjače *Marchantia polymorpha*

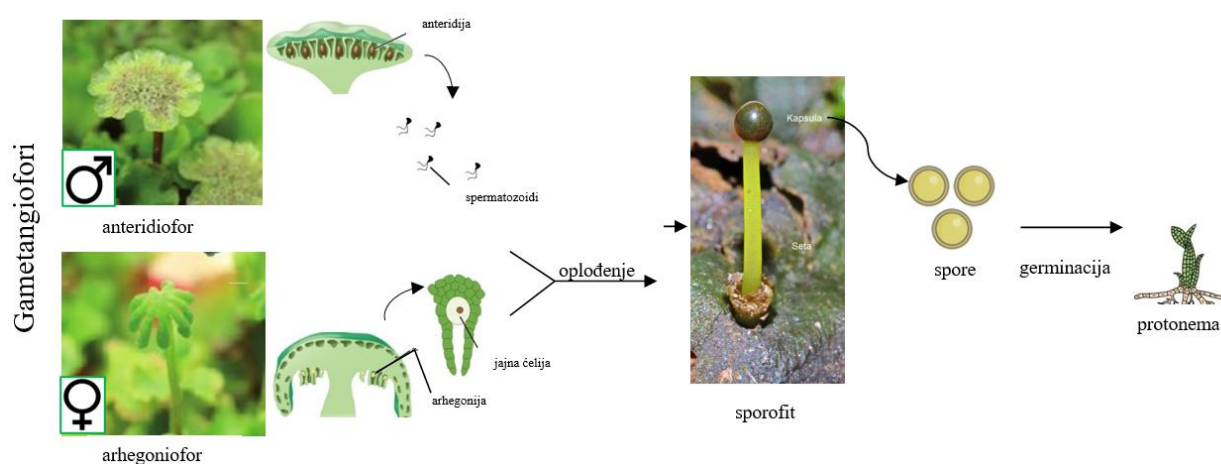
Uljana telašca su prave organele ograničene ćelijskim zidom, prisutne kod više od 90% jetrenjača, dok su kod nekih retkih familija klase Jungermanniopsida (Cephaloziaceae Mig., Lepidoziaceae Limpr., Metzgeriaceae Klinggr. i Antheliaceae) i Marchantiopsida (Sphaerocarpaceae (Dumort.), Blasiaceae H. Klinggr. i Ricciaceae Rchb.) odsutna (He-Nygrén et al., 2006). Njihov broj, veličina (1-30 μm), oblik, distribucija i hemijski sastav varira u zavisnosti

od taksona. Prvi opis ovih intracelularnih organela dao je *Hübener* 1834. godine i to na primeru današnje vrste *Mylia taylori* (Hook.) Gray, koja i ima najveći poznati procenat etarskog ulja u odnosu na svoju masu (dostiže do 1,6% suve materije). Nedugo potom, *Mirbel* (1835.) je primetio razbacane tada tzv. „uljane ćelije” kod vrste *Marchantia polymorpha* (Hübener, 1834; Mirbel, 1835). Prethodno uvedeni termini, „ćelijska tela“ (Gottsche, 1843) i „ćelijske vezikule” (Von Holle, 1857), zamenjeni su trenutnim imenom – „uljana telašca”, proisteklim iz njihove „masne” prirode, od strane *Pfeffer*-a (Pfeffer, 1874). *Suire* (2000.) je dokazao da su ona aktivni ćelijski kompartment, nastao dilatacijom cisterne endoplazmatskog retikuluma, koji predstavlja mesto intracelularne sinteze izoprenoida (Suire et al., 2000). Uljana telašca su prisutna u svim zrelim ćelijama klase Jungermanniopsida i roda *Haplomitrium*, kao i specijalizovanim idioblastima klase Marchantiopsida i roda *Treubia*, gde se javljaju kao izolovana, zrnasta telašca (Glime, 2017). U prirodi, uljana telašca opstaju u biljci i nakon perioda isušivanja, ukazujući na njihov evolutivni značaj za preživljavanje u nepovoljnim sredinskim uslovima. Sa druge strane, u laboratorijskim uslovima često se događa da, sušenjem herbarskih primeraka, uljana telašca nestaju (Pressel et al., 2008). Uloga uljanih telašaca ogleda se u zaštiti biljke od herbivora, patogena, UV zračenja i niskih temperatura. Varijacije u njihovoj morfologiji, broju i veličini, kao i hemijskom sastavu predstavljaju hemotaksonomske markere jetrenjača, dok je sastav sekundarnih metabolita u njima parametar od važnosti sa medicinske tačke gledišta. Iako je još *Lohman* (1903.) primetio prisustvo terpena, a *Muller* (1905.) precizirao da je reč o monoterpenima, seskviterpenima ili njihovim odgovarajućim alkoholima, hemijski konstituenti jetrenjača intenzivnije se istražuju tek od pedesetih godina prošlog veka (Fujita et al., 1956; Lohmann, 1903; Muller, 1905). Danas brojni radovi svedoče o tome da je izolovanje čistih jedinjenja – često ekskluzivno prisutnih u jetrenjačama, određivanje njihove hemijske strukture, ispitivanje njihovog medicinskog potencijala, kao i poznavanje mehanizama metaboličke aktivnosti koja se odvija unutar njih, od velike važnosti.

2.1.3. RAZMNOŽAVANJE JETRENJAČA

Životni ciklus jetrenjača obuhvata smenu generacija između haploidnog gametofita i diploidnog sporofita. Gametofit kod mahovina predstavlja dominantnu generaciju. Na njemu se

razvijaju polni organi (gametangije), koji kod svih jetrenjača nastaju od epidermalnih ćelija. Kod morfološki različitih tipova jetrenjača položaj gametangija se razlikuje. U gametangijama se stvaraju polne ćelije (gameti), koje se u slučaju jetrenjača međusobno razlikuju (heterogameti). Stoga možemo govoriti o ženskim gametangijama (arhegonije) u kojima nastaju jajne ćelije, i muškim gametangijama (anteridije) u čijoj se unutrašnjosti formiraju spermatozoidi. U zavisnosti od toga da li se anteridije i arhegonije nalaze na istoj, ili na odvojenim jedinkama, razlikujemo monoične i dioične gametofite. Gametangije maršancioidnih jetrenjača se nalaze na izmenjenim granama gametofita (gametangiofori); obuhvataju muške (anteridiofori) koji nose anteridije, i ženske gametangiofore (arhegoniofori) koji nose arhegonije (slika 2.4.2.) (Randelović et al., 2006). I anteridije i arhegonije nastaju deobom površinskih ćelija talusa ili kauloida. Arhegonije prostih taloidnih vrsta nastaju od ćelija neposredno ispod apikalne ćelije – anakrogine mahovine (Metzgeriidae), dok kod folioznih formi arhegonija nastaje direktno iz apikalne ćelije-akrogine (Jungermanniidae). Anteridije su elipsoidnog oblika sa kratkom drškom i formiranim spermato-



Slika 2.1.3. Uprošćeni prikaz razmnožavanja jetrenjača na primeru vrste *Marchantia polymorpha*

nim tkivom, od čijih se ćelija obrazuju spermatozoidi. Arhegonije imaju flašolik oblik, pri čemu se razlikuje suženi, vratni deo (jednoslojni, sa kanalnim ćelijama) i prošireni (trbušni) deo arhegonija (u kome se formira jajna ćelija). Za proces oplodjenja kod mahovina je neophodno prisustvo slobodne vode. Mnogobrojni zreli spermatozoidi oslobođeni iz anteridija, čiji

jednoslojan zid osluzavi i nabubri tokom kišnog perioda, dospevaju u spoljašnju sredinu i plivaju ka arhegonijama. Kanalne ćelije vrata arhegonije takođe postaju sluzave neposredno pred oplođenje, čime se olakšava prolazak spermatozoida do jajne ćelije. Oplođenjem i formiranjem zigota, a zatim i embriona, otpočinje diploidna faza životnog ciklusa koja rezultira razvojem jedinke bespolne generacije, koja se naziva sporofit (*sporogonium s.l.*) (slika 2.1.3.) (Randelović et al., 2006; Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018).

Sporofit jetrenjača se sastoji od čaure (*capsula sporogonium s.s.*) i kratke drške (*seta*) koja može i da nedostaje (Zlatković i Šarić, 2016). Za gametofit, od koga je fiziološki zavistan, sporofit je pričvršćen proširenim delom, stopalom (haustorija). Sa spoljne strane mladog sporofita, od razraslih zidova arhegonije, formira se zaštitno tkivo (*calyptra*) (Veljić et al., 2018), a obavijen je i sterilnim tkivom koje potiče od gametofita (*perigynium*). Zid čaure sastavljen je od jednog ili više slojeva ćelija, dok se u čauri nalazi sporogeno tkivo čijom mejotičkom (reduktivnom) deobom nastaju haploidne spore i elatere; kolumela odsustvuje. Elatere su sterilne končaste strukture, koje imaju ulogu u oslobađanju i rasejavanju spora iz otvorene čaure. Ćelije elatera su izdužene, mrtve, sa spiralno zadebljalim zidovima. Sazrevanjem sporogona dolazi do izduživanja sete, pucanja čaure, i oslobađanja velikog broja spora i elatera. Varijacije u načinu pucanja čaure, kao i u veličini i ornamentici spora, su od taksonomskog značaja. Klijanjem haploidnih spora, endo- (u čauri, neposredno pre njenog pucanja) ili egzosporno (nakon oslobađanja spora iz čaure), nastaje protonema, od koje se razvija odrasli gametofit (Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018).

Pored polnog, kod jetrenjača je prisutno i vegetativno razmnožavanje, koje se može odvijati na različite načine. Vegetativno razmnožavanje posebno je zastupljeno kod folioznih oblika, a najčešće se odvija na habitatima gde su uslovi za odvijanje polnog razmnožavanja otežani. Najjednostavniji vid je fragmentacijom tela. Takođe, na gametofitu mogu se obrazovati specifične dodatne tvorevine, geme, različitog oblika i sa ulogom u vegetativnom razmnožavanju (Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018). Kod taloidnih oblika geme se najčešće formiraju na dorzalnoj strani i obodu gametofita, dok se kod folioznih formi javljaju na obodu listića. Kod nekih vrsta (npr. *M. polynorpha*), geme se obrazuju u posebnim peharastim izraštajima na gametofitu.

2.1.4. EKOLOŠKI ZNAČAJ JETRENJAČA

Ekološki značaj jetrenjača je mnogostruk. Pored toga što služe kao hrana životinjama, učestvuju i u regulaciji protoka vode kroz ekosistem. Njihova sposobnost da brzo apsorbuju i polako otpuštaju vodu u okolno okruženje („biosunderi“) sprečava isušivanje supstrata i održava vlažnu mikroklimu staništa, u kojoj i same najbolje opstaju (Randelović et al., 2006). Jetrenjače imaju sposobnost da menjaju pH vrednost supstrata, apsorbuju ugljenik i regulišu ciklus hranljivih materija. Jedne su od pionirskih grupa na jalovištima, pričvršćivanjem rizoidima za supstrat, stvaraju svojevrsnu fizičku barijeru, čime smanjuju erozivni potencijal obilnih pljuskova. Pored toga, jetrenjače imaju ulogu u dezintegraciji stena, truljenju stabala, a takođe, mogu uticati i na povećanje plodnosti zemljišta akumulacijom humusa.

Jetrenjače su dobri indikatori zagađenja vazduha, vode i zemljišta. Kao potpuno netolerantne na zagađenje, ne rastu u kontaminiranim regijama i razvijaju vidljive simptome povrede čak i pri najmanjim količinama zagađivača. S druge strane, u poređenju sa drugim biljnim vrstama koje rastu na istom staništu, imaju znatno veći kapacitet apsorpcije i zadržavanja zagađivača, sprečavajući njihovo recikliranje u ekosistemu tokom različitih vremenskih perioda (Govindaparyari et al., 2010; Rao, 1982). Dobrim bioindikatorima i hiperakumulatorima čine ih i njihove fiziološke, morfološke i anatomske osobine (visoka stopa apsorpcije i visok kapacitet za razmenu jona, niska stopa desorpcije, akumulacija teških metala u njihovom jonskom stanju, nedostatak pravog korenovog sistema, odsustvo stoma i kutikule). Takođe, bioindikacioni i fitoremedijacioni potencijal omogućeni su i zahvaljujući različitim biološkim i enzimskim mehanizmima, razvijenim kao kompenzatorni, adaptivni odgovor, a u cilju preživljavanja u najtežim klimatskim uslovima milionima godina unazad (Glime i Saxena, 1991).

Jedan od najopasnijih oblika zagađenja je onaj izazvan teškim metalima. Zbog nemogućnosti njihove biorazgradnje, teški metali se mogu akumulirati i perzistirati u živim organizmima, što zahteva stalni monitoring (Tangahu et al., 2011). Skupe i zametne metode, od kojih mnoge za rezultat imaju rezidue koje sadrže teške metale, mogu se zameniti ekološki prihvatljivim, efikasnim i pristupačnim tehnološkim rešenjima. Jedno od pomenutih rešenja su fitoremedijacija i biomonitoring zagađenja, korišćenjem odabranih biljnih vrsta kao „hiperakumulatora“ (Sinha et al., 2007). Kao što je već navedeno jetrenjače poseduju značajan

akumulacioni potencijal za teške metale, ali se malo zna o konkretnom ponašanju i, odbrambenim mehanizmima ovih vrsta, kao i unutarćelijskoj lokalizaciji teških metala kod njih (Sharma, 2007; Samecka-Cymerman i Kempers, 1996; Samecka-Cymerman et al., 1997).

Uprkos velikom potencijalu briofita u analiziranju akumulacije teških metala, do sada je rađen samo mali broj studija (Sharma, 2007), obuhvatajući nekoliko rodova briofita (*Funaria*, *Jungermannia*, *Scapania*, *Pellia*, *Conocephalum*, *Lunularia*, *Hylocomium*, *Hypnum*, *Marchantia*, *Pleurozium* i *Sphagnum*), od kojih je samo šest vrsta pripadalo rodu *Marchantia*. Poznato je da jetrenjače vezuju teške metale u obliku katjona, čime pružaju informacije o njihovoj koncentraciji (Carginale et al., 2004; Sharma, 2007; Samecka-Cymerman et al., 1997; Samecka-Cymerman i Kempers, 1996).

Taloidna jetrenjača *Conocephalum conicum* (L.) Dum., pokazuje značajnu korelaciju između koncentracija hroma i kobalta u zemljištu i bioakumulisanih količina ovih metala. Još jedna taloidna jetrenjača, *Pellia epiphylla* (L.), pokazala se korisnom u kontroli zagađenja, posebno supstrata, hromom, bakrom i niklom (Samecka-Cymerman i Kempers, 1996). Sposobnost bioakumulacije ($>1000 \mu\text{g/l Hg}$) vrste *Scapania undulata* (L.) Dum., čini ovu vrstu dragocnim pokazateljem biorasploživosti i prirodnim prečišćivačem vode (Vincent, 2001). Visok adsorptivni kapacitet deklarirao je jetrenjaču *M. polymorpha* za hiperakumulatora olova ($2,276 \mu\text{g/g suve mase}$) (Sharma, 2007). Takođe, najveći ikada zabeleženi sadržaj žive u vodenim biljkama registrovan je kod jetrenjače *Jungermannia vulcanicola* (Schiffn.) Steph., koja je sadržala 1,3% žive u odnosu na suhu masu (Satake et al., 1983).

Jedan od načina za utvrđivanje koncentracije teških metala apsorbiranih od strane jetrenjača je analizom njihovog uticaja na nivo proteina i aktivnosti enzima. To potvrđuje zabeležena aktivacija fitohelatin-sintaze kod *C. conicum* (Basile et al., 2013), zajedno sa konstitutivnom fitohelatin sintazom (phytochelatin synthase, PCS), responzivnom na prisustvo metala, nakon izlaganja jetrenjače *Lunularia cruciata* (L.) Dumort. ex Lindb. testiranim količinama Cd, Cu, Hg, Pb (Degola et al., 2014). Povećani nivo šaperona, Hsp70, važnih zbog njihove centralne uloge u suzbijanju efekata teških metala, zabeležen je kao odgovor na metabolički stres kod *C. conicum*. Enzimi koji kontrolišu fiziološke i biohemijske procese takođe su imenovani intoksikacijom teškim metalima. Naime, *L. cruciata* kompartmentalizuje kadmijum, koji ima pleiotropni efekat na nivou gena i pokazuje regulaciju povećanja i smanjenja gena koji

koodiraju cistation γ -sintazu i metiltransferazu (Basile et al., 2005). Pretpostavljajući da su gore spomenute morfološke osobine, koje uzrokuju dobar bioakumulacioni kapacitet uvek iste, pretpostavka je da slični sekundarni metabolički profili rezultuju sličnim molekularnim odgovorom na zagađenje, kao i sličnim mehanizmima aktivacije proteina stresa, ukazujući na značaj hemijskog sastava predstavnika jetrenjača prilikom razmatranja njihovog potencijala za monitoring i procenu zagađenja. Imajući u vidu sve gore pomenuto mogli bismo zaključiti da jetrenjače poseduju raznolike adaptivne odbrambene mehanizme koji se suprotstavljaju posledicama zagađenja teškim metalima, kao i da, u skladu sa dosadašnjim istraživanjima, jetrenjače mogu biti mogući bioakumulatori, biosenzori i fitoremedijatori, pa su dalja ispitivanja na ovom polju neophodna.

2.2. HEMIJSKI DIVERZITET MARCHANTIOPHYTA

Sekundarni metaboliti jetrenjača predstavljaju lipofilna mono-, seskvi- i diterpenoidna, kao i aromatična jedinjenja, relativno niskih molekulskih masa. Iako postoji mnogo naučnih radova koji se bave izučavanjem sekundarnog metaboličkog profila ovih vrsta, smatra se da je samo mali procenat svih vrsta jetrenjača detaljno hemijski istražen. Do sada je detektovano više od 60 **monoterpenoida** jetrenjača, uključujući aciklične, ciklične (mono-, di- i triciklične), oksigenovane i neoksisgenovane strukture, koji u nekim slučajevima, kao što je to kod *C. conicum*, mogu poslužiti u svrhu podele vrste na hemotipove (Ludwiczuk et al., 2013a). Monoterpeni mogu biti zaslužni i za karakterističan miris određene vrste kao što je to slučaj kod pripadnika rodova *Plagiochila* (Dumort.) Dumort. (Rycroft et al., 1999; Rycroft i Cole, 2001), *Drepanolejeunea* (Spruche) Schiffn. (Gauvin-Bialecki et al., 2010) i *Astrella* P. Beauv. (Figueiredo et al., 2006), što olakšava njihovu identifikaciju. Za razliku od jetrenjača koje predominantno sintetišu monoterpenska jedinjenja, kao što je to slučaj sa *Trichocolea pluma* (Reinw., Blume & Ness) Mont. (Ludwiczuk et al., 2009), postoji veliki broj vrsta koje su bogate seskviterpenodnim i diterpenoidnim jedinjenjima, od kojih su mnoga isključivo prisutna kod jetrenjača, ili se retko nalaze drugde (slike 2.2.1. i 2.2.2.). Od više od 900 do sada okarakterisanih jedinjenja **seskviterpenskih** skeleta, *seco*-afrikani, *nor-seco*-afrikani, *noraristolani*, *1,10-seco*-aromadendrani, *2,3-seco*-aromadendrani, *aromadendran-gvaj*an dimeri, *izocirani*, *barbatani*, *bazanani*, *brazilani*, *trinorkalamenani*, *hiloscipani*, *dimeri kuparana*, *seco-kuparani*, *herbertani* (i njihovi dimeri), *pekulariani*, *izogermakrani*, *biciklohumulani*, *strijatani*, *miltajlani*, *ciklomiltajlani*, *tridensani*, *rikciokarpani*, *modifikovani pacifigordžijani* (*pacifigorgianes*), *pingvizani* (i njihovi dimeri), *sandvikani* (*sandvicanes*), *rikardifani*, *olivacani* (*olivacanes*), *trifarani* i *neotrifarani*, *henopodani* i *nudenani* su ekskluzivno prisutni u jetrenjačama. Dok seskviterpenski skeleti kao što su *afrikani*, *aristrani*, *cirani*, *azuleni*, *bergamotani*, *brazilani*, *nardosinani*, *santalani* i *tujopsani* predstavljaju retke grupe prirodnih proizvoda (Asakawa et al., 2013a).

Među gotovo 500 **diterpenoida** identifikovanih kod jetrenjača, uključeni su kako oni prisutni samo kod njih (*spiroklerodani*, *5,10-seco-klerodani*, *9,10-seco-klerodani*, *verukozani*, *epi-homoverukozani*, *fuzikokan-labdan dimeri*, *fuzikokan-aromadendran dimer* *fuzikokan-bibenzilni dimeri*, *sekoinfuskan* (*secoinfuscane*), *infuskan*, *abeo-labdani*, *sakulatani*, *sfenolobani* i *hačeran*

(hatcherane)), tako i cijatani, dolabelani, fuzikokani, cembrani, vibsani, neodenudatani, prenilgvajan, *abeo*-abijetan i viscidani koji su retko prisutni u biljnom svetu van jetrenjača (slika 2.2.3.).

Jedna od najkarakterističnijih jedinjenja izolovanih iz jetrenjača su bibenzili, koji se pojavljuju, zajedno sa prenilbibenzilima i bis-bibenzilima, kako u vrstama redova Marchantiales, tako i kod predstavnika redova Jungermanniales i Metzgeriales. Rodovi *Marchantia* (L.), *Frullania* (Raddi), *Plagiochila* i *Radula* Müll.Frib. su posebno bogati ovim jedinjenjima. Određeni bibenzili, uključujući 4-hidroksi-2-karboksi-3,4'-dimetoksibibenzil (*Plagiochila* sp.) (Anton et al., 1997), 3,4',5-trimetoksibibenzil (*Monoselenium tenerum* Griff.) (Ludwiczuk et al., 2008), 3,4-dihidroksi-3'-metoksibibenzil (*Plagiochila exigua* (Taylor) Taylor) (Rycroft et al., 1998) radulanin-A-5-on, β -hidroksiradulanin-5-on (*Marsupidium epiphytum* Colenso) (Omatsu, 2004) i glosofilin (*Lethocolea glossophylla*) (Kraut et al., 1997), prvi put su detektovani upravo kod jetrenjača.

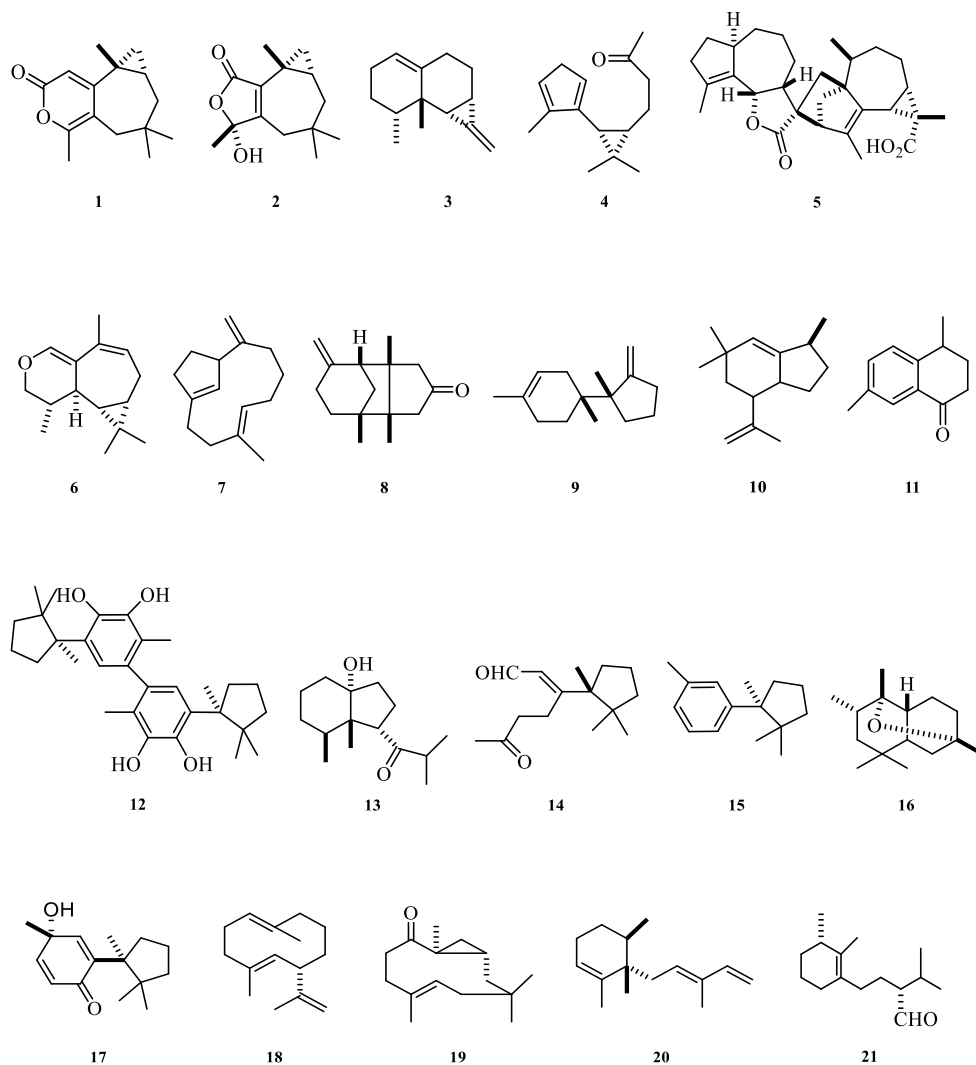
Familije Plagiochilaceae (Jörg.) Müll. Frib & Herzog i Lepidoziaceae Limpr., sa vrstama *Plagiochila satoi* (Nakamura, 1995) i *Lepidozia vitrea* Stepr. (Toyota et al., 1996), predstavljaju jedne od prvih jetrenjača kod kojih su detektovani prenilbibenzili. Prvi **hlorovani bibenzili** prirodnog porekla, detektovani su upravo kod jetrenjača, dok je jedinstveni bibenzil koji sadrži sumpor (Asakawa, 1995a), zajedno sa tri **prebibenzila** (među kojima su dva jedinstvena, dimerna bibenzila), otkriven kod vrste *Balantiopsis rosea* Berggr. Dok su **dimerni prebibenzili** prisutni samo kod *Balantiopsis rosea*, vrste *Radula* bogate su kako bibenzilima, među kojima su 3,5-dihidroksi-2-(3-metil-2-butenil)bibenzil i 2-geranil-3,4-dihidroksibibenzil važni markeri vrsta roda *Radula*, tako i **prenilbibenzilima** (Asakawa et al., 2008).

U jetrenjačama detektovano je preko 90 **bis-bibenzila**, među kojima su prvi bili rikardin A i markancin A iz *Riccardia multifida* (L.) Gray i *Marchantia polymorpha* (Asakawa, 1982a). Od tada je detektovano preko pedeset bis-bibenzila (Asakawa, 1995a), među kojima su i oni koji pokazuju farmakološki značajnu aktivnost (slike 2.3.1. i 2.3.5.). Ova jedinjenja su dominantno prisutna u jetrenjačama iz redova Jungermanniales, Marchantiales, Metzgeriales i Monocleales (Asakawa, 1995a), i to mahom vrste *Marchantia polymorpha* (Niu et al., 2006), *Reboulia hemisphaerica* (L.) Raddi (Wei et al., 1995), *Marchantia foliacea* (Asakawa, 1995a), *Asterella angusta* (Stephani) Pandé (Qu et al., 2007a), *Heteroscyphus planus* (Nabeta et al., 1998) i *Plagiochila* sp. (Asakawa, 1995a). Pored bis-bibenzila, u različitim vrstama jetrenjača detektovani

su i **bis-bibenzilni dimeri**. Kao nova jedinjenja okarakterisani su bis-bibenzilni dimeri kod vrste *Riccardia multifida* subsp. *decrescens* (Steph.) Furuki (Yoshida et al., 1997), pusilatin E, dok je kod *M. polymorpha* (So et al., 2002) detektovan izorikardinhinon A (isoriccardinquinon A). Pusilatini A-D identifikovani su u *Blasia pusilla* (L.) (Asakawa, 1995a; Yoshida et al., 1996). Bis-bibenzilni seskviterpenski dimeri izolovani su iz jetrenjače *Schistochila glaucescens* (Hook.) A. Evans prikupljene sa različitih lokacija na Novom Zelandu (Asakawa et al., 2008; Nagashima et al., 2004). **Hlorovani bis-bibenzili** detektovani su u različitim vrstama jetrenjača, kao što su na primer *Bazzania trilobata* (L.) Gray (Martini et al., 1998), *Mastigophora diclados* (Brid. ex F. Weber) Nees (Hashimoto et al., 2000), i tri vrste roda *Plagiochila*: *P. oresitopha*, *P. fruticosa* i *P. deflexa* (Anton et al., 1997; Asakawa, 1995a), među kojima su neki bili i potpuno nova jedinjenja, kao na primer 6,6',10,10',12,12'-heksahlor-izoperotetin A, poreklom iz vrste *Jamesoniella colorata* (Lehm.) Schiffn. (Hertewich et al., 2003). Bibenzili, u slučaju vrsta roda *Trichocolea* Dumort., i dimerni bis-bibenzili, kod vrsta rodova *Riccardia* Gray. i *Blasia* (L.), mogu poslužiti i kao taksonomski markeri vrsta, za razliku od njihovih široko rasprostranjenih derivata (benzilftalidi, fenantreni i njihovi dehidroanalizi). Od više od 90 detektovanih, bibenzilni kanabinoidi i bibenzili sa ciklopropanskim prstenom se retko nalaze u prirodi.

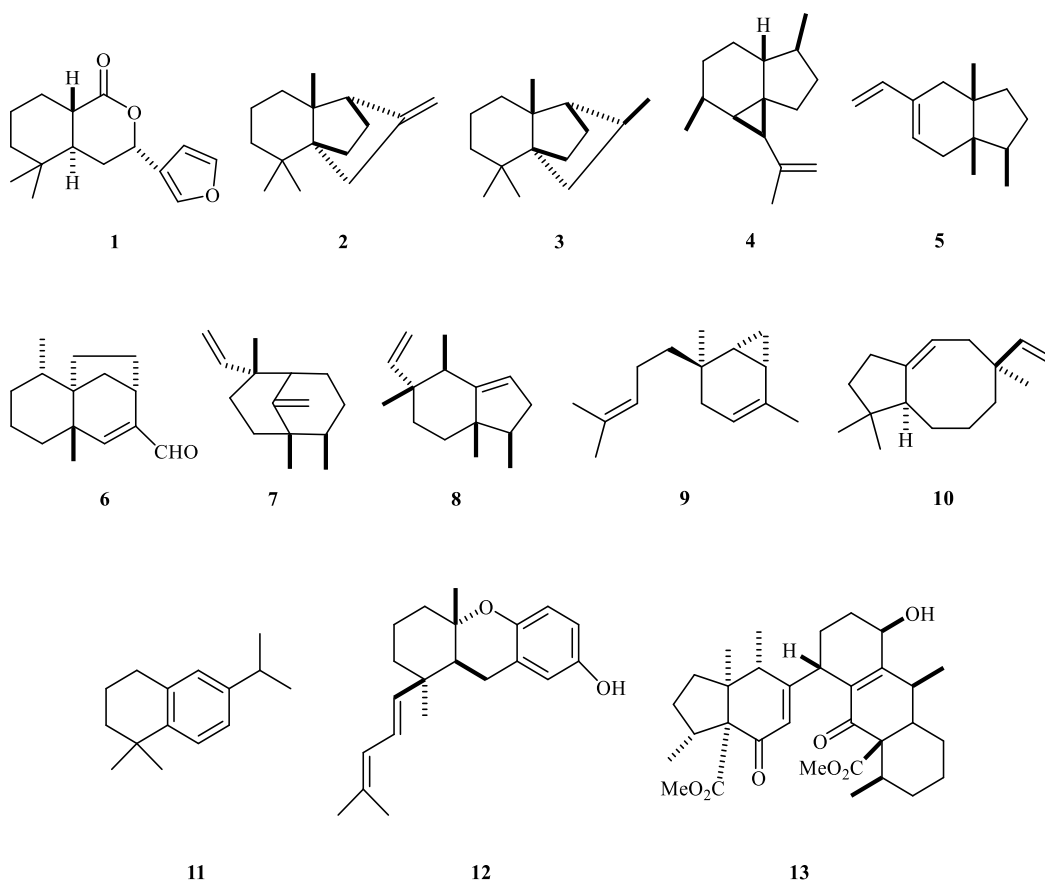
Azotna i sumporna jedinjenja su retko prisutna u jetrenjačama. *Corsinia coriandriana* (Spreng.) Lindb. sadrži korijandrine i metil-tridentatole sa azotom prisutnim u molekulu (Asakawa et al., 2007b, Von Reuß i König, 2005), dok je rufulamid detektovan u vodeno-metanolnom ekstraktu *Metzgeria rufula* Spruce (Kraut et al., 1997). Skatol, zaslužan za jak fekalni miris (Asakawa et al., 1996), identifikovan je kod *Cyathodium foetidissimum* Schiffn (Ludwiczuk et al., 2009), kao i kod vrsta *Asterella* i *Mannia* (Asakawa et al., 1995b), dok su izotaksin A i B, benzil- i β -fenetil- β -metiltioakrilati takođe neka od sumpornih jedinjenja detektovanih kod vrsta rodova *Isotachis* i *Balantiopsis* (Asakawa et al., 1997, Harinantenaina i Asakawa, 2004b, Labbé et al., 2005). **Flavonoidi i polinezasićene masne kiseline** su takođe česti sastojci jetrenjača (Asakawa et al., 2013a; Asakawa, 1995a). **Flavonoidni glikozidi** su prisutni kod jetrenjača, dok su **terpenoidni glikozidi** veoma retki (Asakawa, 1995a).

Kod jetrenjača je detektovano preko 50 **steroida i triterpenoida**, uključujući nove triterpenoide među kojima su neki, poput hopan-22,29-diola, prvi put izolovani iz prirodnih izvora (Asakawa et al., 2008; Grammes et al., 1994). Neke od jetrenjača proizvode slične triterpenoide.



Slika 2.2.1. Novi, odabrani, prirodni proizvodi, seskviterpenoidnog porekla u jetrenjačama: **1.** sekošvarcijanin A (secoswartzianin), **2.** norsekošvarcijanin, **3.** 4-*epi-nor*-aristola-1(10),11-dien, **4.** ((-)-(6*R*,7*S*)- α -teilorionn, **5.** aromadendran-gvajanolidni-tip seskviterpenskog dimera, **6.** plagiohilin W, **7.** (+)-izociren, **8.** gimnomitr-3(15)-en-9-on, **9.** β -bazanen, **10.** brazila-1,10-dien, **11.** 1,6-dimetiltetrahidronaftalen-4-on, **12.** akvaticenol ((7*S*,7'*S*)-(-)-4,4'-bis-1,2-kuparendiol), **13.** dihidrohiloscifolon, **14.** sekakuparenal, **15.** herberten, **16.** pekuilaroksid, **17.** herbertenon A, **18.** (+)-izogermakren A, **19.** biciklohumulenon, **20.** striaten, **21.** tridensenal.

Naime, najzastupljeniji triterpenoidi kod jetrenjača iz redova Jungermanniales, Metzgeriales i Marchantiales, su hopanoidi. Sa druge strane, fridelin je nađen samo kod jedne vrste jetrenjača, *Junngermannia sublata* (Bläs et al., 2004). Stigmasterol, koji je prisutan kod preko 30 različitih jetrenjača, te kampesterol i sitosterol, prisutni kod preko 20 različitih vrsta jetrenjača, spadaju među najzastupljenije steroide (Asakawa, et al., 2013a).



Slika 2.2.2. Novi, odbrani, prirodni proizvodi, seskviterpenoidnog porekla u jetrenjačama: **1.** rikiokarpin A, **2.** (-)-miltejlil-4(12)-en, **3.** ciklomiltejljan, **4.** (-)-tamariscen, **5.** α -pingvizen, **6.** nudenal, **7.** trifara-9,14-dien, **8.** neutrifaradien, **9.** (+)-henopoden, **10.** sandvicen, **11.** olivacen, **12.** rikardifenol C, **13.** Bisakutifolon A.

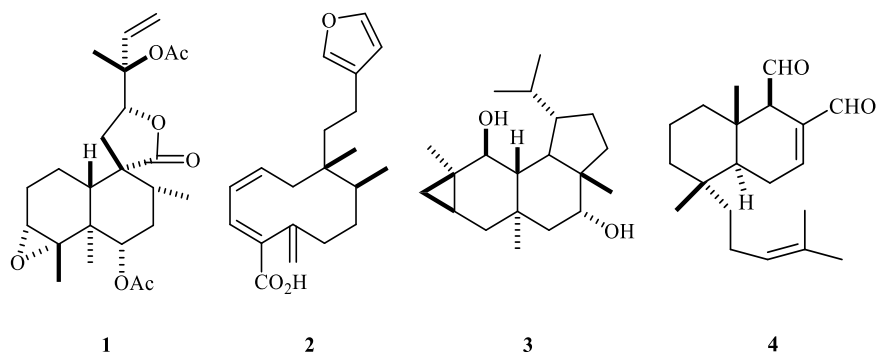
Jetrenjače proizvode razna aromatična jedinjenja uključujući benzoate, cinamate, alkil-fenole, naftalene, tokoferole, ftalide, fenantrene, izokumarine, kumarine, hormone, lignane itd. Izokumarini su detektovani u vrstama *Plagiochila adianthoides* (Sw.) Lindn. (Valcic et al., 1997), *Marchantia polymorpha* (Adam i Becker, 1993), *Lepidozia vitrea* (Ma et al., 2007) *L. reptans* (L.) Dumort. (Sanders, 1996), *Bazzania trilobata* (Scher et al., 2004), i drugima. Prvi put su u prirodi pronađeni jednostavni derivati naftalena, 1,2,4-trimetoksinaftalen i 1,2,3,4-tetrametoksinaftalen, upravo iz jetrenjače *Adelanthus decipiens* (Hook.) Mitt. (Rycroft et al., 1998). Iz iste vrste su izolovani 2-hidroksi-3,4,5,6-tetrametoksiacetofenon, 2,3,4,6-tetrametoksiacetofenon i 1,2,3,4,5-pentametoksiacetofenon koji su tada, takođe po prvi put detektovani u prirodi (Rycroft et al., 1998). Pored toga derivati naftalena su izolovani i iz drugih jetrenjača, među koje spada i vrsta *Pallavicinia subciliata* (Saito, 1998).

Preko 30 različitih **lignanskih** jedinjenja izolovano je iz više vrsta jetrenjača (Asakawa, 1995a), pri čemu je kod nekih (*Jamesoniella autumnalis* (Tazaki et al., 1995), *Scapania undulata* (L.) Dumort. (Asakawa, 1995a), *Lepicolea ochroleuca* (Spreng.) Spruce (Cullmann i Becker, 1999a) i *L. vitrea* (Ma et al., 2007), *Bazzania trilobata* (Martini et al., 1998; Scher et al., 2003) i *Pellia epiphylla* (Cullmann et al., 1996)), za određena jedinjenja, to bilo po prvi put. **Acetofenoni** su takođe prisutni kod jetrenjača. Prvi put su identifikovani kao prirodni proizvodi jetrenjača od strane Rycroft-a i saradnika 1998. godine (Rycroft et al., 1998) i to u vrsti *Adelanthus decipiens*. Sa druge strane prisutni su, kako kod vrsta *Plagiochila fasciculata* (Lorimer i Perry, 1994) *Trocholejeunea sandvicensis* (Asakawa, 1995b), *Heteroscyphus* sp. (Omatsu, 2004), tako i u drugim jetrenjačama. Derivati **benzaldehyda** i **benzoeve kiseline** takođe su prisutni u jetrenjačama. Na primer, pulherimumin (*Ptilidium pulcherrimum*) (Guo et al., 2009), metil-2-metil-3,4-metilendioksi-6-metoksibenzoat i metil-2-metil-3,4,6-trimetoksi-benzoat (*Plagiochila spinulosa*) (Connolly et al., 1999), metil-2,6-dihidroksi-3-(3-metil-2-butenil)-4-metoksi-benzoat, metil-2,4,6-trihidroksi-3-(3-metil-2-butenil)benzoat, i metil-2,4,6-trihidroksi-3-(2-hidroperoksi-3-metil-3-butenil)benzoat (*Pedinophyllum interruptum*) (Feld et al., 2004), su nova jedinjenja izolovana iz jetrenjača.

Aromatična jedinjenja u razdelu Marchantiophyta uključuju i metil-benzoate (Asakawa, 1982a; 1995a; Barlow et al., 2005; Harinantenaina et al., 2005; Harinantenaina i Asakawa, 2007), kao i derivate fenantrena, koji su retko prisutni kod vrsta jetrenjača iz reda Metzgeriales (Adam i Becker, 1993; Anton et al., 1997; Asakawa, 1995a; Rycroft et al., 1999). **Derivati dihidrofenantrena** su mahom prisutni u različitim predstavnicima vrsta *Plagiochila* (Anton et al., 1999; Connolly et al., 1999; Heinrichs et al., 2004; Kraut et al., 1994; Rycroft et al., 1999; 2001; 2002), dok su **fenantrenski derivati** prisutni kod vrsta jetrenjača iz rodova *Marchantia* i *Plagiochila*, posebno vrsta *Plagiochila permista* (Asakawa, 1995a; Anton et al., 1997; Lahlou et al., 2000) i *P. spinulosa* (Nakamura, 1995).

Glikozidi su prisutni u vrstama *Conocephalum conicum*, *Heteroscyphus coalitus*, i dve vrste roda *Plagiochila*, *P. spinulosa* i *P. fruticosa* (Nakamura, 1995; Toyota et al., 1996). Takođe, četiri nova glikozida izolovna su iz vrste *Marchantia polymorpha*, kineskog porekla, od strane Qu-a i saradnika (Qu et al., 2007b). **Benzilftalidi i benzofuranski derivati** detektovani su iz više vrsta roda *Plagiochila* (*P. buchitiniana*, *P. diversifolia*, *P. longispina*), kao i vrsta *Frullania falciloba* i

F. muscicola, *Balantiopsis rosea*, *Monoselenium tenerum* Giff., te vrste *Corsinia coriandrina* (Spreng.) Lindb. iz familije Corsiniaceae (Asakawa, 1995a; Heinrichs et al., 2000; Komala et al., 2011; Kraut et al., 1994; Ludwiczuk et al., 2008; Rycroft et al., 1999; von Reuß i König, 2004). **Hromani i hromeni** detektovani su u vrstama *Metacalypogeia cordifolia* (Stephani) Inoue i *M. alternifolia* Grolle, *Cephalozia otaruensis* Steph., *Pedinophyllum interruptum* (Nees) Kaal., *Lethocolea glossophylla* (Spruce) Grolle, *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. i unutar roda *Radula* (Asakawa, 1995a; Cullman i Becker, 1999b; Shy et al., 2002; Toyota et al., 2001). **Alkilfenoli** su prisutni u vrstama *Omphalanthus filiformis* (Sw.) Nees i *Schistochila appendiculatum*, dok su **tokoferoli** prisutni kod većine jetrenjača (Asakawa, 1995a; Asakawa et al., 1996; Nakaishi, 1996).



Slika 2.2.3. Odabrani primeri diterpenoida prisutnih isključivo u jetrenjačama: heteroscolipid A (1), striktna kiselina (2), 2β,9α-dihidroksiverukozan (3), sakulatal (4)

Više od 40 **flavonoidnih jedinjenja**, od kojih su luteolin i apigenin najzastupljeniji, izolovano je kao svuda prisutni malo zastupljeni sastojci jetrenjača, pri čemu su flavoni češći od flavanona kod briofita (Asakawa, 1995a). Pigmenti ćelijskog zida, antocijanini, rikcionidin A i rikcionidin B detektovani su u vrstama *Ricciocarpus natans* (L.) Corda, *Marchantia polymorpha*, *Riccia duplex* Lorb. & K. Müller i *Scapania undulata* (Kunz et al., 1993). Preko 100 jedinjenja **acetogeninske** strukture je do sada pronađeno u jetrenjačama, pri čemu su neka jedinjenja veoma česta kod razdela Marchantiophyta. Taksoni razdela Marchantiophyta sadrže zasićene i nezasićene masne kiseline, triacilglicerole, kao i fosfolipidne sastojke (Asakawa, 1995a).

2.3. BIOLOŠKI/FARMAKOLOŠKI ZNAČAJ JETRENJAČA I NJIHOVIH SASTOJAKA

Jedan od razloga za izučavanje hemijskih jedinjenja jetrenjača je njihova biološka aktivnost i potencijalna primena u medicini. Viševjekovna tradicionalna primena biljnih lekovitih preparata, u čiji sastav one ulaze, može pružiti smernice za povezivanje medicinskih efekata sa određenim vrstama ili konkretnim jedinjenjima izolovanim iz jetrenjača (tabela 2.3.1.) (Asakawa, 2008; Asakawa et al., 2013a; Harris, 2008). O istorijskoj upotrebi ovih biljaka, kao lekovitih, svedoči i delo „Doctrine of signatures” koncipirano na metafizičkoj teoriji, koja datira još iz doba *Dioscorides*-a i *Galen*-a. Na osnovu ove teorije Bog je pružio vizuelne znake kroz karakteristike biljaka na osnovu kojih bi se, posmatrajući fizički oblik biljke, moglo zaključiti koji bi organ u ljudskom telu ona mogla da leči. Jedan od najznačajnijih predstavnika, upotrebljavan na osnovu sličnosti izgleda svog gametofita sa poprečnim presekom jetre, je jetrenjača *M. polymorpha*, koja se u Kini, Južnoj Americi i Evropi koristi za lečenje žutice izazvane hepatitisom, čišćenje jetre, i spolja za redukciju njene inflamacije (Bland, 1971; Hu, 1987; Miller i Ellsworth, 1979; Roig y Meesa, 1945). Sa druge strane, Evropljani su povezivali sličnost ove vrste sa plućima čoveka, pa su je koristili za lečenje tuberkuloze, kao i Kinezi (Asakawa, 2012; Bland, 1971). Još dva predstavnika ovog roda, *M. convoluta* i *M. palacea*, koriste se u tretmanu hepatitisa (Chandra et al., 2017; Rao, 2009; Sabovljević et al., 2011), dok se *M. palmata* koristi u tretmanu čireva i apscesa (Pant i Tewari, 1989).

Tabela 2.3.1. Odabrane tradicionalno korišćene vrste jetrenjača.

Jetrenjača	Upotreba	Referenca
<i>Marchantia polymorpha</i> L.	koristi se protiv groznice, kod čireva i apscesa; diuretik; tretman posekotina, zarastanje opekotina i preloma; tretman modrica, ulcera, ugriza, ekcema, rana; antidot za ujed zmije	Ando, 1983; Azuelo et al., 2011; Asakawa 2015; Chandra et al., 2017; Ding, 1982; Hu, 1987; Pant i Tewari, 1989; Sabovljević, 2011; Shirsat, 2008; Wu, 1977; Yan et al., 1999
<i>Conocephalum conicum</i> (L.) Dum.	lečenje kamena u žuči; protiv groznice; antimikrobno, antimikotičko, antipiretičko dejstvo; lečenje posekotina, ulcera, ugriza, ekcema, zarastanje opekotina, preloma i rana, tretman modrica i ujeda zmije	Alam, 2012; Ando, 1983; Asakawa, 2015; Chandra et al., 2017; Ding, 1982; Sabovljević, 2011; Wu, 1977; Yan et al., 1999

<i>Reboulia hemisphaerica</i> (L.) Raddi	zaustavljanje krvarenja; depigmentacija fleka na koži, i tretman spoljnih rana i modrica	Asakawa, 2007; Asakawa, 2015; Chandra et al., 2017; Gulabani, 1974
<i>Frullania tamarisci</i> (L.) Dumort.	antiseptik	Asakawa, 2015
<i>Targionia hypophylla</i> L.	protiv svraba, šuge i drugih kožnih oboljenja	Chandra et al., 2017; Remesh i Manju, 2009
<i>Marchantia palmata</i> Reinw., Nees & Blume	protiv čireva i apscesa; protiv inflamacije nakon opekotina	Chandra et al., 2017; Pant i Tewari, 1989; Tag et al., 2007
<i>Frullania ericoides</i> (Nees ex Mart.) Mont.	nega kose i vlasišta	Chandra et al., 2017; Remesh i Manju, 2009
<i>Plagiochila beddomei</i> Steph.	zarastanje rana	Lubaina et al., 2014
<i>Riccia</i> spp.	tretman dermatomikoza (tretiranje/lečenje lišajeva)	Chandra et al., 2017; Shirsat, 2008
<i>Marchantia palacea</i> Bertol.	smanjuje oteke i deluje protiv groznice	Sabovljević, 2011
<i>Herbertus</i> sp.	antiseptik, ekspektorans, adstringent, antidijaroik	Azuelo et al., 2011; Alam, 2012; Chandra et al., 2017
<i>Wiesnerella denudata</i> (Mitt.) Steph.	tretman kamena u žučnoj kesi	Kumar et al., 2007
<i>Plagiochasma appendiculatum</i> Lehm. & Lindenb.	tretman opekotina i različitih oboljenja kože	Alam, 2012; Asakawa ,2007a; Chandra et al.,2017; Flowers, 1957; Kumar et al., 2007; Pant, 1989; Shirsat, 2008

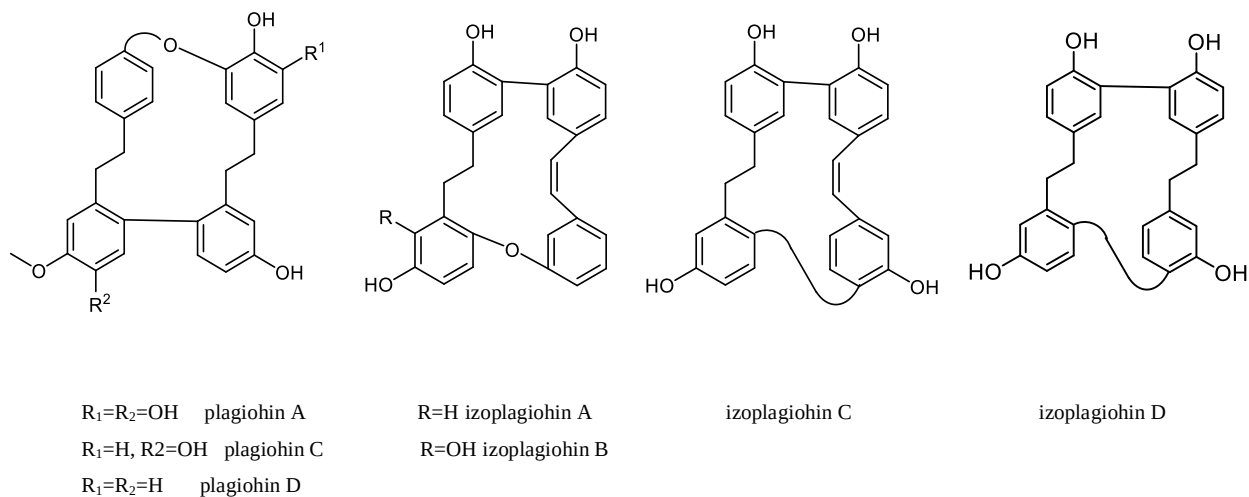
Poslednjih decenija, mnogi naučni radovi su inspirisani tradicionalnom primenom jetrenjača i ispituju kako sekundarne metabolite, tako i njihov biološki potencijal. Do sada je poznato da sekundarni metaboliti, ekstrakti i etarska ulja izolovani iz jetrenjača, ispoljavaju različita biološka dejstva kao što su antimikrobno, antifungalno, citotoksično, miorelaksantno, neurotrofično, insekticidno, anti-HIV, inhibitorno na stvaranje NO, alergeno, kao i inhibitorna dejstva na različite enzime (Asakawa et al., 2012; 2013a). (tabela 2.3.2.).

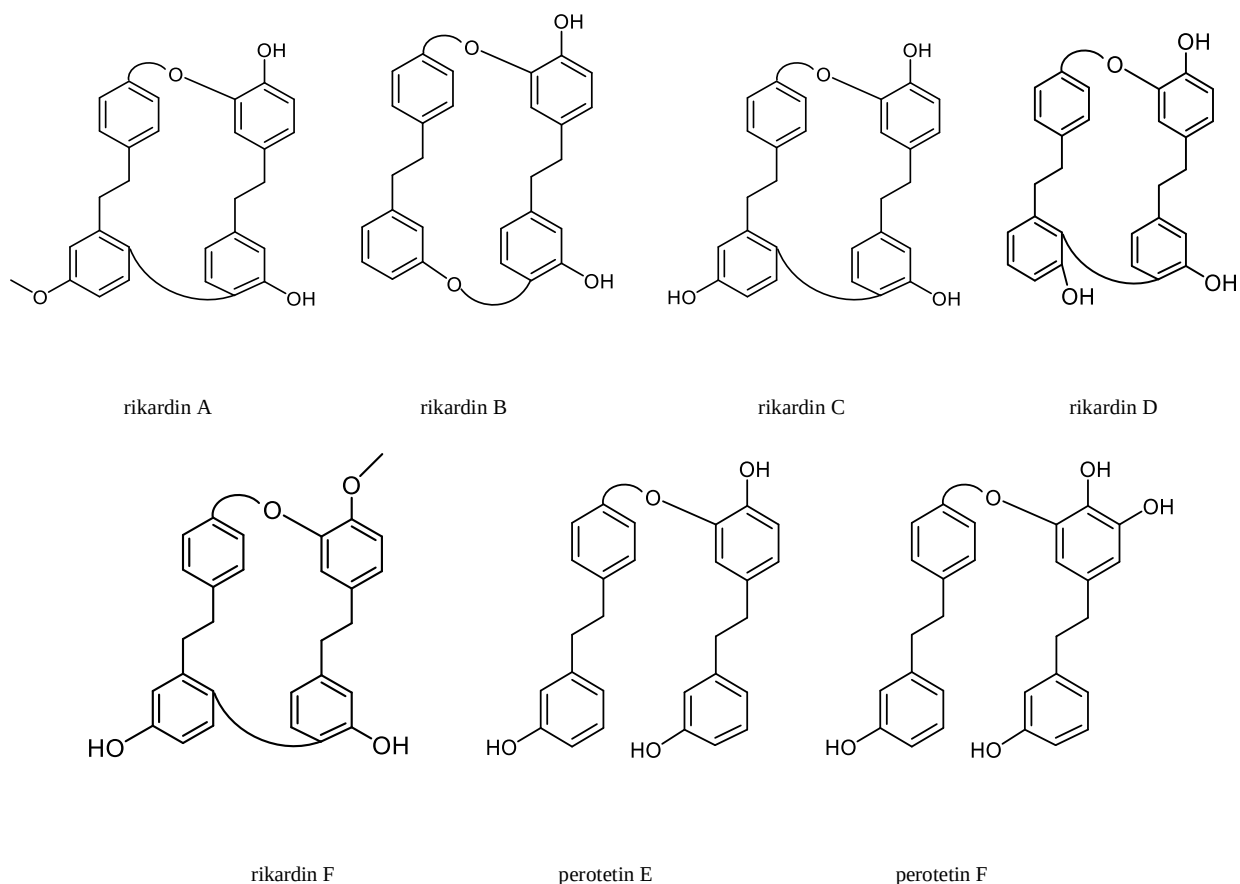
Mnoge jetrenjače pokazale su značajano antifungalno i antibakterijsko dejstvo. Još su davne 1952. Madsen i Pates ispitivali inhibiciju rasta bakterija *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i gljive *Candida albicans* pod uticajem vodenih rastvora različitih jetrenjača (Madsen i Pates, 1952), dok je 1972. Pryce izneo pretpostavku da je lunularična kiselina (hormon starenja

kod jetrenjača), izolovana iz *Lunularia cruciata*, jedinjenje odgovorno za antifungalnu aktivnost ovih biljaka protiv gljivica *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Septoria nodorum* i *Uromyces fabae* (Pryce, 1972). Blecik i Wiegner zabeležili su antimikrobnu aktivnost ekstrakata vrsta *Pallavicinia lyellii* (Hook.) Grey i *Reboulia hemisphaerica* (L.) Raddi (Blecik i Wiegner, 1980), koja je kasnije upotpunjena i antitrombocitnom aktivnošću markancinhinona iz vrste *Reboulia hemisphaerica*, pri koncentraciji od 100 µg/mL (Wei et al., 1995).

Istraživanja Ichikawa i saradnika iz 1982. i 1983. uključuju ispitivanje blizu 80 vrsta briofita od kojih skoro sve pokazuju antimikrobnu aktivnost (Belcik i Wiegner, 1980; Ichikawa, 1982; Ichikawa et al., 1983). Asakawa 1982. godine izoluje prenilbibenzile iz vrste *Radula complanata* (L.) Dumort. koji inhibiraju rast bakterije *Staphylococcus aureus*, pri koncentracijama od 20,3 µg/mL (Asakawa et al., 1982a). Antimikrobnu aktivnost pokazali su i markancin C, neomarkancini A i B, izolovani iz vrste *Schistochila glaucescens* (Hook.) A. Evans, a protiv bakterije *Bacillus subtilis* (MIC=2, 1,5 i 2 µg/mL) i gljive *Trichophyton mentagrophytes*, pri MIC vrednostima od 0,5, 1,0 i 0,5 µg/mL (Ayer i Law, 1962; Komala et al., 2010b).

Acetonski ekstrakti *C. conicum* pokazali su jak inhibitorni efekat na rast kvasca *C. albicans* (Vashistha et al., 2007), što opravdava njenu tradicionalnu primenu (tabela 2.3.1.). Ista grupa autora pokazala je antifungalni efekat aceton-rastvornog ekstrakta jetrenjača *Plagiochasma appen-*





Slika 2.3.1. Odabrani bioaktivni bis-benzili i aciklični bisbenzili poreklom iz razdela Marchantiophyta

diculatum Lehm. & Lindenb. i *Marchantia polymorpha*, i to na rast Gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* i *Salmonella typhi*, i gljive *Aspergillus niger*.

Makrociklični bisbenzili poseduju različite bioaktivnosti (Asakawa, 1995a; Morita et al., 2009; Ng et al., 2004). Slobodne hidroksi-grupe na benzenskim prstenovima bis-bibenzila igraju važnu ulogu u mehanizmu antifungalne aktivnosti, što je potvrđeno na primeru gljive *Cladosporium cucumerinum* (Scher et al., 2004). Analiza etarskog ekstrakta vrste *A. angusta* pokazuje da fenolne grupe igraju važnu ulogu u ostvarivanju antifungalne aktivnosti.

Testiranjem uticaja izolovanih bis-bibenzila kao što su rikardin B, rikardin D, markancini H, M i P, asterelin A i B, 11-demetoksimarkancin I, dihidroptihantol (dihydroptychantol), perotetin E (slike 2.3.1. i 2.3.5.), na rast kvasca *C. albicans*, zapaženo je da pokazuju antifungalnu aktivnost pri MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) u opsegu od 16-512 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Niu et al.,

2006; Scher et al., 2004; Qu et al., 2007a). Antifungalna aktivnost je takođe dokazana za dimetil sulfoksid ekstraktata *M. polymorpha* ssp. *ruderalis* protiv vrsti *Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron* i *Trichoderma viride* (Sabovljević et al., 2011).

Niu i saradnici su testirali antifungalnu aktivnost *Marchantia polymorpha* na rast kvasca *Candida albicans* TLC bioautografijom, došavši do zaključka da jedinjenja izolovana iz ove jetrenjače, rikardin D i neomarkancin A, pokazuju antifungalnu aktivnost pri relativnim vrednostima MID (minimalne inhibitorne doze) od 0,2 i 0,25 µg, što je relativno blisko sa dobijenom vrednošću pozitivne kontrole (mikonazol), 0,01 µg (Niu et al., 2006). Figueiredo i saradnici su zabeležili antifungalnu aktivnost rikardina D na rast sojeva kvasca *C. albicans* otpornih na flukonazol, QL-14 (MIC 16 µg/mL), QL-28 (MIC 32 µg/mL), SDEY-24R (MIC 16 µg/mL) i SDEY-09R (MIC 16 µg/mL) (Braun et al., 2003; Figueiredo et al., 2002). Takođe, testiranjem uticaja na rast kvasca *C. albicans*, u rasponu vrednosti MIC od 32 do preko 512 µg/mL, utvrđena je antifungalna aktivnost šest bisbibenzila iz *Plagiochasma intermedium* Lindenb. & Gottsche (neomarkancin A, markancin H, rikardin C i F, izorikardin C i pakionol) (slike 2.3.1. i 2.3.5.) (Rycroft et al., 1999; Xie et al., 2010). Smatra se da je antifungalna aktivnost rikardina D posledica izazivanja mitohondrijalne disfunkcije indukcije apoptoze kod kvasca *C. albicans* aktivacijom metakaspaze (Brémond et al., 2009; Wu et al., 2008, 2009), kao i njegovo inhibitorno dejstvo na sintezu hitina ćelijskog zida (Bovi Mitre et al., 2004; Nagashima et al., 1999).

Tabela 2.3.2. Bioaktivna jedinjenja jetrenjača i polja njihovog delovanja.

Delovanja	Jedinjenje	Koncentracija	Referenca
	1,2-kuparendiol	IC ₅₀ 9,2 µM	Harinantenaina i Asakawa, 2007
	2-hidroksi-4-metoksikuparen	IC ₅₀ 4,1 µM	
	herberten-1,2-diol	IC ₅₀ 8,03 µM	
	β-herbertendiol	IC ₅₀ 12,23 µM	
	mastigoforen C	IC ₅₀ 10,18 µM	
	mastigoforen D	IC ₅₀ 15,16 µM	

Inhibicija produkcije NO	markancin A	IC ₅₀ 1,44 µM	Harinantenaina et al., 2005; 2007; Hashimoto et al., 1994
	markancin A trimetil etar	IC ₅₀ 42,5 µM	
	markancin B	IC ₅₀ 4,1 µM	
	markancin B trimetil etar	IC ₅₀ 42,45 µM	
	markancin C	IC ₅₀ 13,28 µM	
	markancin D	IC ₅₀ 10,18 µM	
	markancin E	IC ₅₀ 62,16 µM	
	markancin H	IC ₅₀ 15,34 µM	
	izomarkancin C	IC ₅₀ >100 µM	
	perotetin F	IC ₅₀ 7,42 µM	
	perotetin E 11'- metiletar	IC ₅₀ 49,85 µM	
	rikardin A	IC ₅₀ 2,5 µM	
	rikardin C	IC ₅₀ >100 µM	
	rikardin F	IC ₅₀ 5,0 µM	
	ptichantol A	IC ₅₀ >100 µM	
	plagiochin A	IC ₅₀ 9,01 µM	
	izoplagochin A	IC ₅₀ >100 µM	
	izoplagochin B	IC ₅₀ >100 µM	
	izoplagochin D	IC ₅₀ 14,35 µM	
		- protiv LTB ₃ 89% pri konc. 10 ⁻⁵ mol	

Inhibicija 5-lipooksigenaze	markancin A	94% pri konc. 10^{-6} mol	Asakawa, 1990
		45% pri konc. 10^{-7} mol	
		16% pri konc. 10^{-8} mol	
		- protiv 5-HETE	
		99% pri konc. 10^{-5} mol	
		97% pri konc. 10^{-6} mol	
		70% pri konc. 10^{-7} mol	
		40% pri konc. 10^{-8} mol	
		IC ₅₀ 3,0 μM	Schwartner et al., 1995
	markancin B	IC ₅₀ 1,4 μM	Schwartner et al., 1995
	perotetin D	IC ₅₀ 0,66 μM	Schwartner et al., 1995
	perotetin A	76-4% pri konc. 10^{-6}	Asakawa, 1982a
	markancin D		
	markancin E		
rikardin A			
izorikardin C	IC ₅₀ 37,2 μM	Schwartner et al., 1995	
paleatin B	IC ₅₀ 0,78 μM		
radulanin H	IC ₅₀ 15,2 μM		
	markancin A	IC ₅₀ 1,85 μg/ml	Asakawa, 1990; 1994
	markancin D	IC ₅₀ 2,0-95.0 μg/ml	
	markancin E		
	perotetin A		

Kalmodulin inhibitorna	perotetin D		
	rikardin A		
	labda-12,14-dien-7,8-diol	IC ₅₀ 82 µg/ml	
Inhibicija ciklooksigenaze	markancin A	IC ₅₀ 46,4 µM	Schwartner et al., 1995
	markancin B	IC ₅₀ 55,9 µM	
	markancin E	IC ₅₀ 58,0 µM	
	paleatin B	IC ₅₀ 45,2 µM	
	perotetin D	IC ₅₀ 26,6 µM	
	radulanin H	IC ₅₀ 39,7 µM	
	izorikardin C	IC ₅₀ 50,8 µM	
	rikardin C	IC ₅₀ 53,5 µM	
Neurotrofična aktivnost	mastigoforen A	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁷ M	Asakawa et al., 1994
	mastigoforen B	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁷ M	
	mastigoforen D	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁷ M	
	plagiohilal B	10 ⁻⁵ M	Asakawa, 1995a; 2007a
	plagiohilid	10 ⁻⁵ M	
	infuskasid A	10 ⁻⁷ M	Asakawa, 1995a
	infuskasid B	10 ⁻⁷ M	
	izomarkancin C	95% pri konc. 10 ⁻⁵ M	Asakawa, 1995a
	infuskična kiselina (Infuscaic acid)	63% pri konc. 10 ⁻⁵ M	

Katepsin L inhibitorna aktivnost	11,13-dehidroporela-diolid	24,7% pri konc. 10^{-5} M	Hashimoto et al., 1998a
Katepsin B inhibitorna aktivnost	izo-Markancin C	93% pri konc. 10^{-5} M 32% pri konc. 10^{-5} M	Asakawa, 1995a
	11,13-dehidroporela-diolid	13,4% pri konc. 10^{-5} M	Hashimoto et al., 1998a
Povećanje koronarnog protoka krvi	markancin A	2,5 ml/min pri dozi 0,1 mg	Asakawa, 1990.
Vazopresin inhibitorno dejstvo	prenilbibenzil	IC ₅₀ 27 µg/ml	Asakawa, 1990.
Antihijaluronidazna aktivnost	lunularična kiselina	IC ₅₀ 0,13 nM	Hashimoto et al., 1998a
Trombin inhibitorna aktivnost	perotetin E	IC ₅₀ 18 µM	Nagashima et al., 1996a
Inhibitorna aktivnost oslobađanja superoksida	infuskična kiselina	IC ₅₀ 0,07 µg/ml i IC ₅₀ 40 µg/ml	Asakawa, 1990
	plagiohilal B	IC ₅₀ 6,0 µg/ml i IC ₅₀ 25 µg/ml	
	norpingvizon metil etar	IC ₅₀ 35 µg/ml	
	ciklomiltejlalil-3-kafetat	IC ₅₀ 7,5 µg/ml	
	plagiohilid	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	norpingvizon	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	biciklogermakrenal	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	herbertendiol	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	izokuparen-3,4-diol	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	infuskasid A	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	infuskasid B	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	

	perotecianal A	IC ₅₀ 12,5-50 µg/ml	
	radulanin K	IC ₅₀ 6 µg/ml	Asakawa, 1994
	poligodial	IC ₅₀ 4 µg/ml	Asakawa, 1995a
	sakulatal	IC ₅₀ 4 µg/ml	

Markancin A, prisutan u različitim vrstama roda *Marchantia*, ispoljava snažnu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost. Njegovo antibakterijsko dejstvo se odnosi na širok spektar bakterija, uključujući *Acinetobacter calcoaceticus* (MIC 6,25 µg/ml), *Alcaligenes faecalis* (MIC 100,0 µg/ml), *Bacillus cereus* (MIC 12,5 µg/ml), *B. megaterium* (MIC 25 µg/ml), *B. subtilis* (MIC 25 µg/ml), *Cryptococcus neoformans* (MIC 12,5 µg/ml), *Enterobacter cloacae* (MIC 100 µg/ml), *Escherichia coli* (MIC 100 µg/ml), *Proteus mirabilis* (MIC 100 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 100 µg/ml), *Salmonella thyphimurium* (MIC 100 µg/ml) i *Staphylococcus aureus* (3,13-25 µg/ml)). Antifungalna aktivnost je poznata u odnosu na različite vrste gljiva, poput *Alternaria kikuchiana* (MIC 100 µg/ml), *Aspergillus fumigatus* (MIC 100 µg/ml), *A. niger* (MIC 25-100 µg/ml), *C. albicans* (MIC 100 µg/ml), *Microsporum gypseum* (MIC 100 µg/ml), *Penicillium chrysogenum* (MIC 100 µg/ml), *Pyricularia oryzae* (MIC 12,5 µg/ml), *Rhizoctonia solani* (MIC 50 µg/mL), *Saccharomyces cerevisiae* (MIC 100 µg/mL) i *Sporothrix schenckii* (MIC 100 µg/mL) (Asakawa, 1990). Pored antifungalne, ekstrakti *Marchantia polymorpha* pokazuju antibakterijsko dejstvo na Gram-pozitivne bakterije kao što su *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Micrococcus luteus*. Slična aktivnost potvrđena je i kod foliozne jetrenjače *P. platyphylla* (Frahm, 2004; Pavletić i Stilinović 1963), koja, pored antibakterijskog, ispoljava i antifungalno dejstvo (Kumar et al., 2007). Pokazana je i antibakterijska aktivnost ekstrakta jetrenjače *P. cordaeana* dominantno metanolnog, u odnosu na bakterije *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* (Bukvički et al., 2012).

Dihlormetanski ekstrakt *Balantiopsis cancellata* ispoljio je antifungalnu aktivnost protiv gljivice truleži, *Cladosporium herbarum*, pri dozi do 0,01 µg, dok je aromatični estar izotahin B (0,006 µg) pokazao najjaču aktivnost (Buchanan et al., 1996; Labbé et al., 2007). Isti ekstrakt bio je letalan za larve račića *Artemia salina*, pri LD₅₀ vrednostima manjim od 2,5 ppm, kao i četiri analizirana hlorovana bibenzila (0,42-2,35 ppm) (Labbe' et al, 2005; 2007). Metanolni ekstrakt

Ptilidium pulcherrimum pokazuje antimikrobnu aktivnost dominantno na Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*), ali i znatnu antifungalnu aktivnost na vrstu gljive *Trichoderma viride*, u poređenju sa bifonazolom (Veljić et al., 2010). Ekstrakt taloidne jetrenjače *Riccia nigerica* ispoljio je značajan antibakterijski i antifungalni efekat na bakterijske vrste *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* i *Staphylococcus aureus*, kao i na gljive *Aspergillus niger*, *A. flavus* i *Penicillium* spp. (Ariyo et al., 2011). Antifungalno dejstvo polihlorovanih bibenzila — 3-hidroksi-2,6-dihlor-4'-metoksibibenzila, 2,3',6-trihlor-3-hidroksi-4'-metoksibibenzila i 2,3',4,6-tetrahlor-3,4-dimetoksibibenzila — iz vrste *Riccardia polyclada* pokazano je na gljivu *Cladosporium herbarum*, pri čemu je dejstvo bilo veće nego ono dobijeno



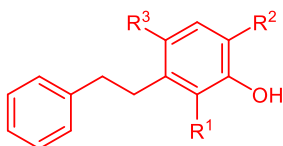
Riccardia marginata
(Colenso) Pearson



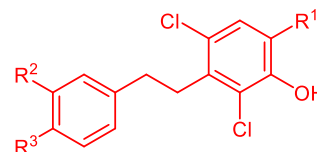
Riccardia polyclada Schiffn.
(syn. *R. umbrosa*)

- a) $R^1=R^2=R^3=Cl$ 3-hidroksi -2,4,6-trihloro-bibenzil
 $R^1=R^2=Cl$, $R^3=H$ 3-hidroksi 2,4-dihloro-bibenzil
 $R^1=Cl$, $R^2=R^3=H$ 3-hidroksi-2-hloro-bibenzil

a)



b)



- b) $R^1=R^2=H$, $R^3=OMe$ 3-hidroksi- 2,6-dihloro- 4'-metoksibibenzil
 $R^1=H$, $R^2=Cl$, $R^3=OMe$ 3-hidroksi-2,6,3'-trihloro- 4'-metoksibibenzil
 $R^1=R^2=Cl$, $R^3=OH$ 3,4-dihidroksi-2,4,6,3'-tetrahloro-bibenzil

Slika 2.3.2. Sekundarni metaboliti *Riccardia* sp. koji su ispoljili antifungalnu i antimikrobnu aktivnost

za ketokonazol (Labeé et al., 2007). Takođe, antibakterijsku aktivnost ispoljio je i rikardifenol C (60 µg/mL), poreklom iz vrste *Riccardia crassa*, u odnosu na bakteriju *Bacillus subtilis* (Perry et al., 1996), dok su hlorovani bibenzili 2,4,6-trihlor-3-hidroksibibenzil, 2,4-dihlor-3-

hidroksibenzil i 2-hlor-3-hidroksibenzil, izolovani iz vrste *Riccardia marginata*, pokazali antimikrobnu aktivnost u odnosu na Gram-pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis*), dermatofitne gljive (*Trichophyton mentagrophytes*), kvasce (*Candida albicans*) i patogene gljive (*Cladosporium resinae*), pri dozi 30 µg/disk (slika 2.3.2.) (Baek et al., 2004).

Dehidrokostuslakton, izolovan iz jetrenjače *Targionia lorbeeriana* K. Müller, pokazao je antifungalnu aktivnost u odnosu na gljivu *Cladosporium cucumerium* (MIC 20 µg/cm³) i kvasac *Candida albicans* (MIC 5 µg/cm³), kao i insekticidnu aktivnost u odnosu na komarac *Aedes aegypti* (LC₁₀₀ 12,5 ppm) (Neves et al., 1999). Izolovani iz iste vrste jetrenjača, antifungalnu aktivnost ispoljili su i acetiltriflokulozid (MIC 10 µg/cm³) i 11αH-dihidrodehidrokostuslakton (MIC 3 µg/cm³). Šest antifungalno aktivnih jedinjenja izolovano je iz jetrenjače *Bazzania trilobata*, među kojima je za viridiflorol potvrđena antifungalna aktivnost u odnosu na gljive *Cladosporium cucumerium* i *Pyricularia oryzae*, dok je za gimnomitrol dokazana inhibitorna aktivnost u odnosu na gljive *Phytophthora infestans*, *Pyricularia oryzae* i *Septoria tritici* (Haase i Schneider, 1993; Scher et al., 2004). Inhibitornu aktivnost u odnosu na *Pyricularia oryzae* pokazao je 5-hidroksikalamen, dok je 7-hidroksikalamen delovao antifungalno u odnosu na gljive *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Phytophthora infestans*, *Pyricularia oryzae* i *Septoria tritici*. Dimenal je najpotentniju aktivnost inhibicije rasta ispoljio ka gljivama *Septoria tritici* i *Phytophthora infestans* (Scher et al., 2004).

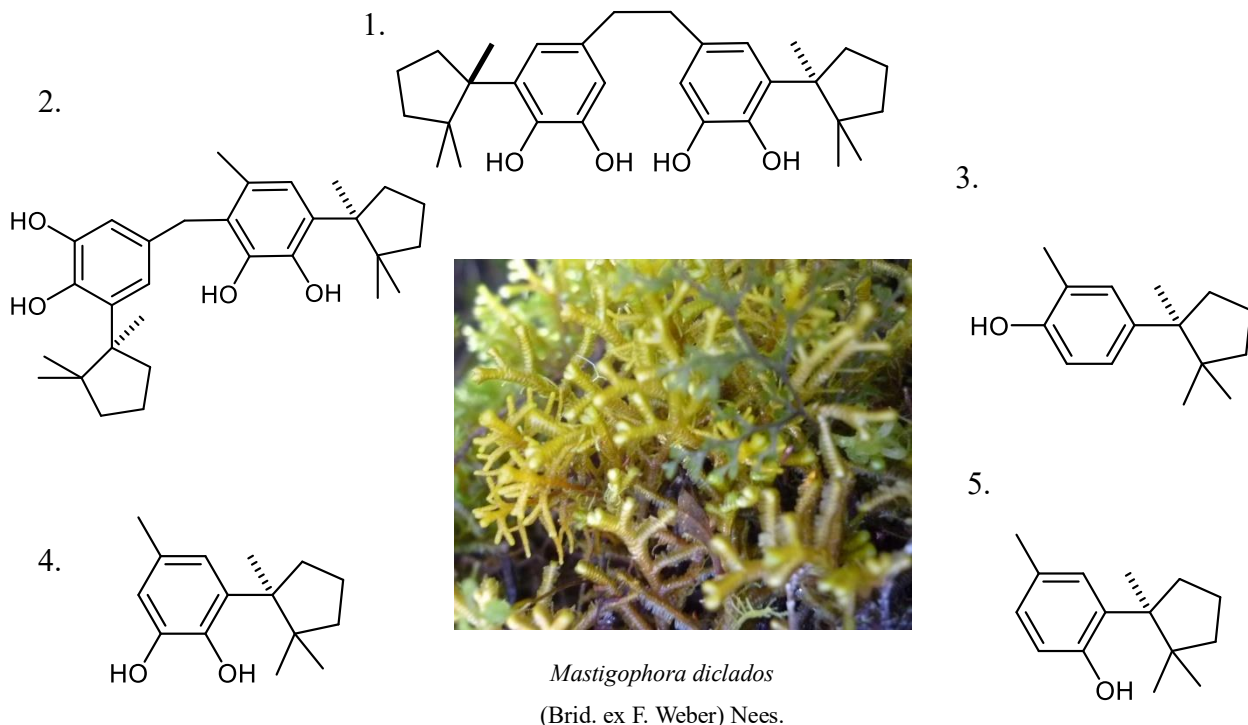
Antifungalnu aktivnost u odnosu na gljive *Trichophyton mentagrophytes* ispoljio je glaucescenolid iz jetrenjače *Schistochila glaucescens* (Hook.) A. Evans, dok je za ent-1β-hidroksikauran-12-on, izolovan iz vrste *Paraschistochila pinnatifolia* (Hook.) R.M. Schust., potvrđena antifungalna aktivnost u odnosu na kvasac *C. albicans* (Lorimer et al., 1997; Scher et al., 2002). Jetrenjače predstavljaju potencijalne domaćine za endofitske vrste gljiva. Na primer, jetrenjača *Scapania verrucosa* Heeg domaćin je gljivici *Chaetomium fusiforme* (Guo et al., 2008). Kumulativni antifungalni i antiproliferativni efekti sekundarnih metabolita jetrenjače i endofita veći su nego efekti pojedinačno analiziranih jedinica (npr. antifungalni efekat u odnosu na vrste *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus*, *Pyricularia oryzae*, kao i antiproliferativni u odnosu na ćelijske linije A549, LOVO, HL-60, QGY) (Guo et al., 2008).

Jedinjenje 2-hidroksi-3,4,6-trimetoksiacetofenon je pri dozi do 150 µg/disk ispoljilo antifungalnu aktivnost u odnosu na gljive *Trichophyton mentagrophytes* i *Cladosporium resinae*, dok je 2-hidroksi-4,6-dimetoksiacetofenon, takođe izolovan iz jetrenjače *Plagiochila fasciculata*, ispoljio istu antifungalnu aktivnost ka gore pomenutim vrstama, a uz to pokazao i antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakterije *E. coli* (100 µg/mL), *Proteus mirabilis* (100 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (100 µg/mL) i kvasac *C. albicans* (Komala et al., 2009). U okviru široko rasprostranjenog roda *Plagiochila* (red Jungermanniales), pored pomenute antifungalne aktivnosti metabolita *Plagiochila fasciculata*, zabeležena je i antimikrobna aktivnost četiri sekundarna metabolita iz jetrenjače *Plagiochila ovalifolia* protiv bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* (Matsuo et al., 1996). Ista jetrenjača, *P. ovalifolia*, poseduje plagiohin D (50-200 µg/mL) i 3,5-dihidroksi-2-(3-metil-2-butenil)bibenzil (50-200 µg/mL) koji su, pored gore navedenog antimikrobnog, okarakterisali ovu jetrenjaču kao potencijalni izvor sekundarnih metabolita koji mogu ispoljiti i antioksidativnu aktivnost (Sadamori, 2009), dok je plagiohin A ispoljio neurotrofičnu aktivnost pri koncentraciji od 10^{-6} M (Fukuyama i Kodama, 1996).

Uočljivu antifungalnu aktivnost u odnosu na gljivu *Pyricularia oryzae* pokazali su izoplagiohini C i D (IC₅₀ 3,9 i 4,0 µg/mL) i 6'-hlORIZOplagiocilin D (IC₅₀ 2,6 µg/mL), kao i u odnosu na vrstu *Septoria tritici* (IC₅₀ 23,5, 15,9 i 4,5 µg/mL) (Qu et al., 2007a). Izoplagiohini A (IC₅₀ 50 µM) i B (IC₅₀ 25 µM), izolovani iz jetrenjače *Plagiochila fruticosa*, inhibirali su proliferaciju tubulina (Morita et al., 2009). Tomentelin i demetoksitomentelin, metaboliti jetrenjača *Trichocolea tomentella* (familija Trichocoleaceae), pokazali su: antifungalnu aktivnost u odnosu na kvasac *C. albicans* i gljivu *Trichophyton mentagrophytes*. Antimikrobnu aktivnost u odnosu na vrstu bakterije *Staphylococcus epidermidis* ispoljio je metil-3-hidroksi-4-[(2E)-3,7-dimetil-2,6-oktadienil]oksi-benzoat (MIC 1.000 µg/mL) izolovan iz vrste *T. hatcheri* (Baek et al., 2004; Perry et al., 1996). Lepidozenolid (100 µg/mL), izolovan iz jetrenjače *Lepidozia fauriana* Stephani, ispoljava inhibitorski efekat na rast kvasca *C. albicans* i parazita *Trichomonas foetus* (Shu et al., 1994). Takođe, lepidozenolid (100 µg/mL) i (–)-5β-hidroperoksilepidozenolid (100 µg/mL) izazivaju vazorelaksaciju torakalne aorte pacova, pri faznim i toničnim kontrakcijama indukovanim norepinefrinom (3 µM) (Shu et al., 1994). Plagiohilin C (Lin i Wu, 1996) ima antitrombozni efekat na agregaciju ispranih trombocita kunića izazvanu arahidonatom (100 µg/mL) i kolagenom (10 µg/mL). Pored toga, lepidozenolid inhibira i vazokonstrikciju indukovanu kalcijumom i kalijumom.

Lunularin (64 $\mu\text{g/mL}$) iz vrste *Dumortiera hirsuta* pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, dok su (–)-herbertan-1,2-diol, (–)-mastigoforen C i (–)-mastigoforen D, oba izolovana iz jetrenjače *Mastigophora diclados*, efikasni protiv bakterije *Bacillus subtilis* (MIC 2-8 $\mu\text{g/mL}$) (Komala et al., 2009). Sekundarni metaboliti vrste *M. diclados* takođe pokazuju snažnu antioksidativnu aktivnost, nadmašujući čak i vitamin C, pri čemu su (–)-herbertan-1,2-diol (IC_{50} 1,9 $\mu\text{g/mL}$), (–)-mastigoforen C (IC_{50} 2,7 $\mu\text{g/mL}$) i (–)-mastigoforen D (IC_{50} 2,0 $\mu\text{g/mL}$) bili najaktivniji (slika 2.3.3.) (Komala et al., 2010a). Mastigoforen C i herbertan-1,2-diol, iz iste jetrenjače madagaskarskog porekla, ispoljili su antibakterijsku aktivnost u odnosu na bakteriju *Staphylococcus aureus* (Harinantenaina i Asakawa, 2004a). Sakulatal (LD_{50} 8 $\mu\text{g/mL}$), izolovan iz *Pellia endiviifolia*, pokazuje antibakterijsku aktivnost u odnosu na bakteriju *Streptococcus mutans* (Asakawa et al., 2009), dok etarsko ulje jetrenjače *Marchesinia mackaii* deluje antibakterijski u odnosu na vrste *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus* i *Yersinia enterocolitica* (Figueiredo et al., 2002).

Inhibiciju proizvodnje NO izazvanu lipopolisaharidom (LPS) pokazali su sekundarni metaboliti poreklom iz dve vrste roda *Bazzania*, i to kupareni, 1,2-kuparenolid i 2-hidroksi-4-metoksikuparen, izolovani iz jetrenjače *Bazzania decrescen*, kao i miltežil-4(12)-enil-2-kafeat izolovan iz vrste *B. nitida* (Harinantenaina i Asakawa, 2007; Harinantenaina et al., 2007). Takođe, tri herbertanska monomera, α -herbertanol, β -herbertanol, herberten-1,2-diol, i njegova dva dimera, mastigoforen C i D, svi poreklom iz jetrenjače *Mastigophora diclados*, ispoljili su isto dejstvo (tabela 2.3.2.). Inhibitorno na proizvodnju NO, u lipopolisaharidima stimulisanim RAW 264.7 ćelijama, delovali su norpingvizon (IC_{50} 45,5 μM), norpingvizon metil-estar (IC_{50} 1,7 μM) i *ent*-16-kauren-15-on (IC_{50} 69,4 μM) izolovani iz vrste *Porella densifolia*, (3 β ,4 β)-15,16-diepoksi-13(16),14-klerodedien i tisaspaton iz jetrenjače *Thysananthus spathulistipus*, kao i šest derivata bibenzila iz jetrenjače *Radula appresa*, među kojima je najaktivniji bio 2-geranil-3,5-dihidroksibenzil (Harinantenaina et al., 2005; Quang i Asakawa, 2010). Inhibitorno dejstvo na proizvodnju NO u lipopolisaharidima stimulisanim RAW 264.7 ćelijama ispoljili su i makrociklični bisbibenzili, takođe izolovani iz jetrenjača (tabela 2.3.2.). Pored podsticanja rasta neurona, kao i inhibicije produkcije NO, mastigoforeni A i B ispoljili su i neuroprotektivni efekat na preživljavanje neurona pri koncentraciji 1 μM u kulturama kortikalnih neurona fetusa pacova (Fukuyama et al., 2001).



Slika 2.3.3. Sekundarni metaboliti jetrenjače *Mastigophora diclados* među kojima su oni koji pokazuju antibakterijsku, antimikrobnu, antioksidativnu aktivnost i inhibiraju produkciju NO: **1.** (–)- mastigiforen D, **2.** (–)-mastigiforen C, **3.** (–)- β -herbertenol, **4.** (–)-herberten-1,2-diol i **5.** (–)- α -herbertenol

Nematode, valjkasti crvi, predstavljaju raznovrsnu grupu beskičmenjaka sa više od 80.000 vrsta, uključujući i parazite kao što su, trihinele i filari. Stoga je od velike važnosti pronalaziti nove lekove protiv parazita, kao i strategije koje se tiču inhibicije njihove pokretljivosti. Poligodial (IC_{50} 0,07 mg/mL), izolovan iz jetrenjače *Porella vernicosa*, kao i sintetisani (*Z*)- i (*E*) 4'-hidroksi-3-metoksistilben (IC_{50} 0,06 i 0,07 mg/mL) pokazuju približno jednaku inhibitornu aktivnost na nematode. Sa druge strane, 4'-hidroksi-3-metoksi-bibenzil, poreklom iz vrtse *Plagiochila stephensoniana* (IC_{50} 0,13 mg/mL), kao i sintetisani 3,4'-dimetoksibibenzil, manje su efikasni u poređenju sa prethodno pomenutim jedinjenjima (Asakawa, 1995a; Lorimer et al., 1996). Katepsini su proteinaze odgovorne za razgrađuju proteina različitog porekla. Ekstrakt jetrenjače *P. japonica* pokazuje snažan inhibitorni efekat na lizozomalne enzime peptidazne familije C1, uključujući katepsin L i katepsin B. Frakcionisanjem sirovog ekstrakta gore pomenute jetrenjače

dobijena su tri nova gvajanolida, među kojima je samo 11,13-dehidroporeladiolid kao čisto izolovan pokazao slabu inhibitornu aktivnost u odnosu na katepsine L i B (tabela 2.3.2.) (Hashimoto et al., 1998a).

Mnoga jedinjenja izolovana iz jetrenjača manifestuju citotoksično i antiproliferativno dejstvo, a određivanje mehanizma dejstva često zahteva detaljna istraživanja. Tradicionalno, mnoge jetrenjače poput *Chiloscyphus polyanthos*, *Diplophyllum albicans*, *D. taxifolium*, *Marchantia palmata*, *M. polymorpha* i *Frullania tamarisci*, korišćene su u Indiji u borbi protiv tumora. Pripadnici rodova *Riccardia* i *Plagiochila*, takođe su korišćeni kao agensi u lečenju leukemije (Azuelo et al., 2011; Alam 2012; Asakawa, 2007; Chandra et al., 2017). Godine 1977, Ohta i saradnici otkrili su da diplofilin, izolovan iz jetrenjača *Diplophyllum albicans* i *D. taxifolium*, poseduje značajnu antiproliferativnu aktivnost u slučaju ćelijske kulture humanog epidermoidnog karcinoma (ED₅₀ približno 8 µg/mL) (Ohta et al., 1977). Kostunolid i tulipinolid (izolovani iz vrsta *Conocephalum supradecompositum*, *Frullania monocera*, *F. tamarisci*, *M. polymorpha*, *Wiesnerella denudata*, *P. japonica*, *L. vitrea* i *Plagiochila semidecurrens*) takođe su pokazali antiproliferativnu aktivnost, i to u slučaju karcinoma nazofaringusa u ćelijskim kulturama (Asakawa 1981c; 1982a; Matsuo, 1981a; 1981b; 1984). Kostunolid je sam po sebi pokazao citotoksično dejstvo sa IC₅₀ vrednošću od 4,6 µM na HL-60 ćelijske linije (Wong et al., 1986).

Jedno od najzapaženijih dejstava metabolita jetrenjača je njihova citotoksičnost u odnosu na P-388 ćelije limfocitne leukemije. Spjut i saradnici su 1986. godine, inspirisani etnofarmakološkom upotrebom (pripadnici roda *Marchantia* korišćeni kao narodni lekovi protiv kancera), testirali aktivnost metabolita dvadeset i tri vrste jetrenjača na P388 ćelije, od kojih su metaboliti vrsta *Bazzania trilobata* (Lepidoziaceae) i *Dumortiera hirsuta* (Marchantiaceae), posedovali ovu aktivnost (Spjut et al., 1986). Sa druge strane, Asakawa je pokazao da etarski ekstrakti brojnih jetrenjača, uključujući vrste *Kurzia makinoana*, *Bazzania pompeana*, *Makinoa crispata*, *Lophocolea heterophylla*, *Marsupella emarginata*, *Pellia endiviifolia*, *Plagiochila fruticosa*, *P. ovalifolia*, *Porella caespitans*, *P. japonica*, *P. perrottetiana*, *P. vernicosa* i *Radula perrottetii*, ispoljavaju citotoksični efekat na P-388 ćelije (Asakawa, 1995a). *Plagiochila* sp. su se pokazale kao izuzetno bogat izvor ovih jedinjenja. Etarski ekstrakt vrste *P. ovalifolia* ispoljio je inhibiciju proliferacije P-388 ćelija leukemije miševa, zahvaljujući jedinjenjima kao što su plagiohilin A (ID₅₀ 3 µg/mL), plagiohilin A-15-il-oktanoat (ID₅₀ 0,05 µg/mL), 14-

hidroksiplagiohilin A-15-il-(2*E*,4*E*)-dodekadienoat (ID₅₀ 0,05 µg/mL), marsupelon i acetoksimarupelon (Asakawa, 1994; Nagasima et al., 1993; Toyota et al., 1998). Još jedan derivat plagiohilina, plagiohilin A-15-il-dekanoat (*P. ovalifolia*), kao i sakulatal (*P. endiviifolia*), i poligodial (*P. vernicosa*), ispoljavaju citotoksičnu aktivnost u slučaju ćelijske linije humanog melanoma (Asakawa, 1994). Sakulatal je takođe pokazao citotoksični efekat na Lu1 (IC₅₀ 5,7 µg/mL), KB (IC₅₀ 3,2 µg/mL), LNCap (IC₅₀ 7,6 µg/mL) i ZR-75-1 (IC₅₀ 7,6 µg/mL) ćelije (Toyota et al., 1998).

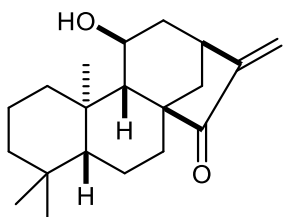
Navikulil-kafeat iz jetrenjače *Bazzania novae-zelandiae* je pri koncentracijama od 0,8 do 1,1 µg/mL (GI₅₀=50% inhibicije rasta (growth inhibition)) doveo do proliferacije P-388 ćelija mišje leukemije. Sa druge strane, citotoksični efekat na iste ćelije pokazala su jedinjenja – (–)-*ent*-arbuskulin B (IC₅₀ 1,1 mg/mL) i (–)-*ent*-kostunolid (IC₅₀ 0,7 mg/mL), izolovana iz jetrenjače *Hepatostolonophora paucistipula* (Rodway) J.J. Engel, *ent*-1β-hidroksikauran-12-on (IC₅₀ 15 mg/mL) iz jetrenjače *Paraschistochila pinnatifolia* (Hook.) R.M. Schust., kao i 1α-hidroksi-*ent*-sandarakopimara-8(14),15-dien (IC₅₀ >25 mg/mL) izolovana iz vrste *Trichocolea mollissima* Hatcher (Baek et al., 2003; Campbell et al., 1979). Markancin C (IC₅₀ 8,5 µg/mL), neomarkancini A (IC₅₀ 18 µg/mL) i B (IC₅₀ 7,6 µg/mL), smeša bisbibenzila A i B (IC₅₀ 10,3 µg/mL), te glaucescenolid, iz jetrenjače *Schistoschila glaucescens*, takođe su pokazali citotoksični efekat na P-388 ćelije leukemije miševa (Scher et al., 2002). Markancin A prisutan je, u promenljivoj količini, kod većine vrsta roda *Marchantia*, i ispoljava citotoksični efekat na P-388 ćelije limfocitne leukemije (Asakawa, 1990), kao i na leukemijske ćelije KB (Asakawa et al., 1982a).

Pokazano je da markancin A (*Marchantia palacea*, *M. polymorpha* i *M. emarginata* subsp. *tosana*), rikardini A i B (*Riccardia multifida*) i perotecin E (*Radula perrottetii*) pokazuju citotoksični efekat na leukemijske KB ćelije (Asakawa et al., 1982b). Takođe, istovetna aktivnost dokazana je i za jedinjenja – α-herbertenol (IC₅₀ 3,3 µg/mL), (–)-herberten-1,2-diol (IC₅₀ 12,5 µg/mL), mastigoforen C (IC₅₀ 11,8 µg/mL), mastigoforen D (IC₅₀ 14,8 µg/mL) i (–)-diplofilolid (IC₅₀ 14,2 µg/mL), izolovana iz etarskog i metanolnog ekstrakta vrste *Mastigophora dicladus* (Komala et al., 2010a). Ista jedinjenja su prilikom testiranja pri koncentracijama od, redom, IC₅₀ 1,4, 12,8, 1,4, 2,4 i 2,5 µg/mL, ispoljila citotoksični efekat na ćelijsku liniju leukemije HL-60.

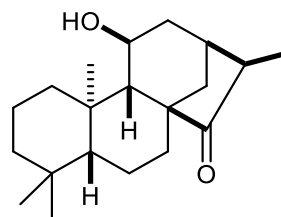
Mnoge biološki aktivne supstance iz jetrenjača, osim citotoksičnosti u odnosu na leukemijske ćelije KB, pokazale su citotoksični efekat i na ćelijske linije leukemije HL-60. Za

etarski ekstrakt vrsta roda *Frullania* dokazan je citotoksični efekat i to na ćelije HL-60, pri efektivnim koncentracijama od EC₅₀ 6,7 i 1,6 µg/mL, kao i na ćelijsku liniju KB (1,6 i 11,2 µg/mL). Etarski ekstrakt japanske vrste jetrenjače *Porella perrottetiana* takođe pokazuje citotoksičnost u slučaju obe linije (Komala et al., 2011). Citotoksični efekat na ćelije HL-60 pokazali su metaboliti izolovani iz jetrenjače *Chandonanthus hirtellus* (F. Weber) Mitt. (Komala et al., 2009; 2010b).

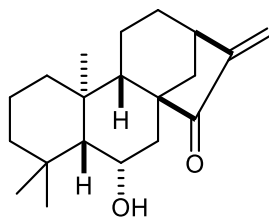
Iz vrsta roda *Jungermania* izolovani su jungermanenoni A–D, koji su pri koncentracijama od 1,3 µM, 5,5 µM, 7,8 µM i 2,7 µM ispoljili citotoksično dejstvo na HL-60 ćelije, indukujući fragmentaciju DNK i nuklearnu kondenzaciju. Jungermanenoni A i D su se pokazali i kao potencijalni antitumorni agensi inhibirajući aktivnost nuklearnih faktora-kB (NF-kB) (Kondoh et al., 2005a; 2005b). Selektivnu inhibiciju NF-kB je, pored jungermanenona A, preuređenog *ent*-kaurena, ispoljilo još četiri testirana *ent*-kaurena, pri čemu se *ent*-11 α -hidroksi-16-kauren-15-on



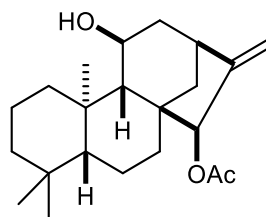
ent-11 α -hidroksi-16-kauren-15-on



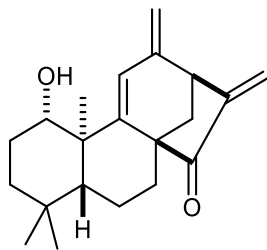
(16*R*)-*ent*-11-hidroksikauran-15-on



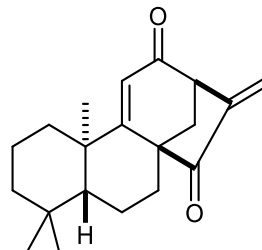
ent-6 β -hidroksi-16-kauren-15-on



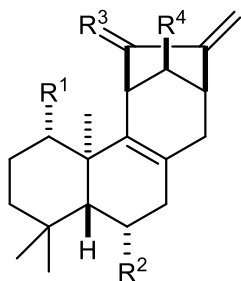
ent-11-hidroksi-16-kauren-15-il-acetat



ent-1 β -hidroksi-9(11),16-kauradien-15-on



ent-9(11),16-kauradien-12,15-dion



R¹=OH, R²=R⁴=H, R³=O jungermanenon A

R¹= R²=R⁴=H, R³=O jungermanenon B

R¹=R²=H, R⁴=OH, R³=O jungermanenon C

R¹= R⁴=OH, R²=H, R³=O jungermanenon D

Slika 2.3.4. Odabrani bioaktivni *ent*-kaurenski-tip diterpenoida iz Marchantiophyta

pokazao kao najaktivniji (Suzuki et al., 2004a; 2004b). Citotoksični efekat na ćelije HL-60 ispitan je za sedam *ent*-kaurena iz japanske vrste jetrenjača *Jungermannia truncata* Nees, pri čemu se kao najaktivniji pokazao *ent*-11 α -hidroksi-16-kauren-15-on (Nagashima et al., 2002). *Ent*-kauren i modifikovani *ent*-kauren, izolovani iz neidentifikovane novozelandske vrste jetrenjače, indukovali su fragmentaciju DNK ćelija HL-60 (Kondoh et al., 2004; 2005a; Nagashima et al., 2002; 2003a; 2003b; 2005; Suzuki et al., 2004a; 2004b).

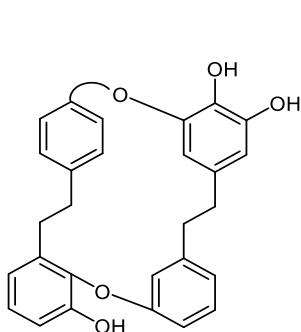
Takođe, *ent*-kaureni (*ent*-11 α -hidroksi-16-kauren-15-on i *ent*-11 α -hidroksi-16-kauren-15-il-acetat) novozelandskih vrsta *Jungermania* pokazali su slab citotoksični efekat na ćelije P-388, pri koncentracijama od 0,48 i 25 μ g/mL (Perry et al., 1999). *Ent*-11 α -hidroksi-16-kauren-15-on, *ent*-1 β -hidroksi-9(11),16-kauradien-15-on, *ent*-9(11),16-kauradien-12,15-dion i jungermanenon A su pri koncentracijama od 0,49, 7,0, 0,59 i 0,28 μ M inhibirali proliferaciju 50% ćelija HL-60. Citotoksični efekat na HL-60 ćelijsku liniju ispoljili su i (16*R*)-*ent*-11 α -hidroksi kauran-15-on

(IC₅₀ 1,0 µM), *ent*-6 α -hidroksi-16-kauren-15-on (IC₅₀ 0,4 µM), jungermanenoni B, C i D (IC₅₀ 1,21, 1,28 i 0,78 µM) (slika 2.3.4.) (Beneš et al., 1981).

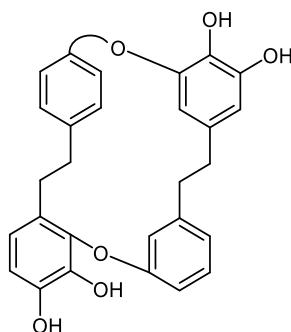
Jetrenjača *Scapania verrucosa* sa endofitskom gljivom *Chaetomium fusiforme* proizvodi određen broj bioaktivnih metabolita koji imaju antiproliferativno dejstvo (Guo et al., 2008). Seskviterpenski kafeat, navikulil-kafeat (GI20 0,8-1,1 µg/mL), izolovan iz jetrenjače *Bazzania novae-zelandiae* prikupljene sa ostrva Stjuart na Novom Zelandu, deluje selektivno na ćelije određenih vrsta tumora (Burgess et al., 2000). Predloženo je da makrociklično bisbibenzilno jedinjenje, rikardin D, može da predstavlja potentno hemoterapeutsko sredstvo za lečenje kancera. Naime, utvrđeno je da on dovodi do apoptoze ćelija leukemije kod ljudi delujući na DNK-topoizomerazu II u ćelijama H460 i A549. Za rikardin D, izolovan iz jetrenjače *Dumortiera hirsuta*, ispitivani su inhibitorni efekti na proliferaciju, invaziju, migraciju i apoptozu ćelija humanog karcinoma pluća (NSCLC), u *in vitro* i *in vivo* uslovima, kada je utvrđeno i antikancerogeno dejstvo na NSCLC (Xue et al., 2012). Takođe, rikardin D je pri koncentraciji od 16 µM, pokazao antiproliferativnu aktivnost na ćelije humanog glioma A172, dok je markancin C inhibirao apoptozu istih, pri koncentracijama do 8 do 16 µM (Abad et al., 1999; Basar et al., 2001; Basile et al., 1999).

Jedinjenje 13-hidroksihiloscifon (IC₅₀ 2,0 µg/mL), derivat hiloscifona poreklom iz jetrenjače *Chyloscyphus rivularis*, pokazao je citotoksični efekat na ćelije karcinoma pluća A-549 (Wu et al., 1993), dok je kostunolid (IC₅₀ 12,0 µg/mL), izolovan iz vrste *Frullania nisqualensis*, pored inhibicije proliferacije A-549 ćelija manifestovao i umerenu aktivnost degradacije DNK u tri mutirana soja kvasca (RS321N (IC₅₀ 50 µg/mL), RS322YK (IC₅₀ 150 µg/mL) i RS167K (IC₅₀ 330 µg/mL)) (Kim et al., 1996). Dva nova bisbibenzila detektovana u jetrenjači *Lunularia cruciata* su, uz već poznati rikardin G (IC₅₀ 2,5 µM), ispoljili citotoksični efekat na ćelije karcinoma pluća A549 (Barlow et al., 2005; Morita et al., 2009). Imajući u vidu prethodno utvrđenu aktivnost ispitano je da li je C-1' i C-6', hidroksilne grupe odgovorne za citotoksičnost i antioksidativnu aktivnost pomenutih jedinjenja putem sinteze odgovarajućih derivata (Barrero et al., 1997; Novaković et al., 2020). Nakon testiranja na zdravoj ćelijskoj liniji pluća ljudi (MRC-5), raka pluća kod ljudi (A549) i ćelijske linije raka dojke MDA-MB-231, potvrđeno je da C-prsten igra veoma važnu ulogu u ispoljavanju citotoksične aktivnosti (Barrero et al., 1996; Novaković et al., 2019).

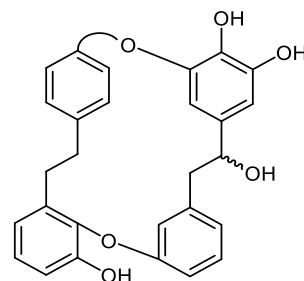
Tri triterpenoida poreklom iz jetrenjače *Ptilidium pulcherrimum*, uključujući ursolinsku, $2\alpha,3\beta$ -dihidroksiurz-12-en-28-sku i acetoksiursolinsku kiselinu, pokazala su citotoksične efekte inhibirajući proliferaciju ćelija kancera prostate PC3 (Guo et al., 2009). Jedinjenja $2\alpha,5\beta$ -dihidroksibornan-2-cinamat (IC_{50} 4,5 mg/mL) iz jetrenjače *Conocephalum conicum* i lunularin (IC_{50} 7,4 mg/mL) iz vrste *Dumortiera hirsuta*, pokazala su citotoksični efekat na ćelije HepG2 (Lorimer et al., 1996). Rikardifenol C (60 μ g/disk) iz vrste *Riccardia crassa* i prenil-etri (tomentelin i demetiltomentelin), kao i metaboliti vrsta roda *Trichocolea* ispoljili su citotoksičnu aktivnost u odnosu na ćelije BSC. Tomentelin (IC_{50} 15 μ g/mL) izolovan od strane Perri-a i saradnika iz jetrenjače *Trichocolea mollissima*, kao i iz jetrenjača *Trichocolea lanata* i *T. tomentella*, i demetoksitomentelin, iz *T. tomentella*, pokazali su citotoksični efekat na ćelije BSC-1 (Perry i Foster, 1995; Perry et al., 1996). Klavigerini A-D, izolovani iz jetrenjače *Lepidoleana*



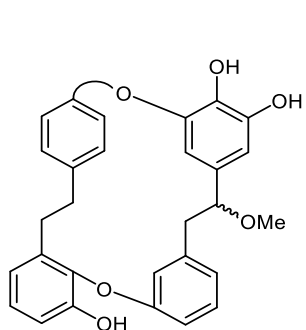
markancin A



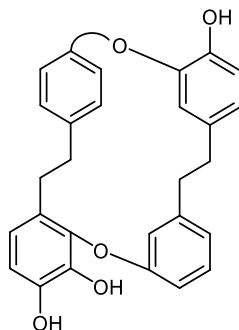
markancin B



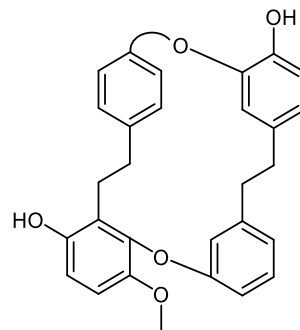
markancin D



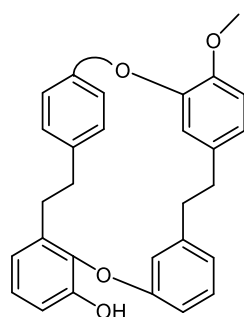
markancin E



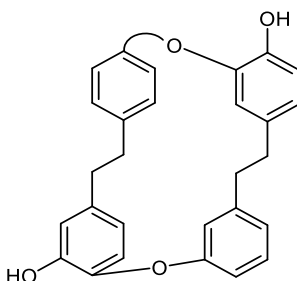
markancin H



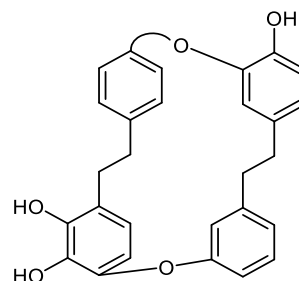
markancin M



markancin P



neomarkancin A



neomarkancin B

Slika 2.3.5. Markancini i neomarkancini, koji poseduju različite biološke aktivnosti, poreklom iz jetrenjača.

clavigera, pokazali su slab citotoksični efekat na BSC ćelije pri dozi od 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ (Baek et al., 1998; Nagashima et al., 2002).

Markancini A, B, D, perotecin F i paleacin B (IC_{50} 14,4-97,5 μM), svi poreklom iz jetrenjače *Marchantia palacea* var. *diptera*, inhibiraju DNK-polimerazu β , pokazuju anti-HIV-1 dejstvo (5,3-23,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pored citotoksičnog efekta na ćelije KB (IC_{50} 3,7-20 μM) (Asakawa, 2007). Takođe, markancin A, iz jetrenjače *Marchantia emarginata* subsp. *tosana*, izaziva indukciju apoptoze kod ćelija kancera dojke MFC-7 pri 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC_{50}) (Huang et al., 2010). Širok spektar bioloških aktivnosti markancina A može se objasniti i mehanizmom delovanja vezivanjem jona kalcijuma. Markancin A i njegov trimetil-etar ispoljili su miorelaksantno dejstvo (Taira et al., 1994), dok je markancin A (IC_{50} 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pokazao i sposobnost hvatanja slobodnih radikala.

Markancin C je inhibirao proliferaciju ćelija tumora materice i smanjio količinu mikrotubula u G2/M fazi, u ćelijama tumora humanog glioma, i ćelijama HaLa, ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma grlića materice, pri 8-16 μM . Takođe, ovo jedinjenje je pri koncentraciji 8-24 μM dovelo do smanjenja brzine polimerizacije tubulina, što ga čini potencijalno jakim antitumornim agensom (Shi et al., 2008; 2009). Pokazano je da markancin C inhibira proliferaciju ćelija KB i KB/VCR, a dimetil-etar markancina C izaziva apoptozu u ćelijama KB/VCR pri 16 μM , odnosno pri 0,2 μM za ćelije VCR tokom 48 h. Ovo ukazuje na njihov mogući modulacioni efekat na P-glikoprotein i VCR-otporne KB/VCR ćelije (Barrero et al., 2000; Huang et al., 2010).

Markancini A i E dovode do aktivacije nuklearnih FXR receptora, što se dovodi u vezu sa regulacijom žučne kiseline (Suzuki et al., 2008). Markancin C je, kao jedini predstavnik bisbenzila jetrenjača, inhibirao α -glukozidazu (52,2% pri 1 mM) (González et al., 1975). Markancin H je pri 0,51 μ M (IC_{50}) doveo do neenzimske peroksidacije lipida u homogenatima mozga pacova (Hsiao et al., 1996; Huang et al., 2010), a pri 0,32 μ M (IC_{50}) potisnuo NADPH-zavisnu peroksidaciju lipida.

Perotecin E (12,5 μ g/mL) i plagiohilin A (0,28 μ g/mL), iz vrste *Riccardia multifida* subsp. *decrescens*, pokazuju citotoksični efekat na ćelije KB, dok rikardini A (10 μ g/mL) i B (12 μ g/mL) (Asakawa et al., 1982a), germakranolidi i eudesmanolidi deluju inhibirajuće (Asakawa, 1990). Rikardini A i B takođe deluju i antileukemijski na ćelije KB (Asakawa et al., 1982a). Istu aktivnost ispoljio je i markancin A, kao i perotecin E, dok su plagiohilini A, I i M pokazali citotoksični efekat na veći broj ćelijskih linija humane leukemije (3T3, H460, DU145, MCF-7, M-14, HT-29, K562 i VERO) (Aponte et al., 2010; Asakawa et al., 2001). Grupa ovih jedinjenja ima potencijalnu primenu u održanju lipidne homeostaze, s obzirom na to da rikardini C i F, izolovani iz jetrenjača *Reboulia hemisphaerica* i *Blasia pusilla*, deluju kao $LXR\alpha$ agonisti/ $LXR\beta$ antagonisti i $LXR\alpha$ antagonisti receptora jetre (Tamehiro et al., 2005). Rikardin C efikasno poboljšava efluks holesterola iz ćelija THP-1, što može igrati ulogu u kontroli gojaznosti. Bisbibenzilni dimeri izolovani iz vrste *Blasia pusilla* (puzilacini B (IC_{50} 13 μ M) i C (IC_{50} 5,16 μ M)), inhibiraju DNK polj β , deluju umereno citotoksično na ćelije KB (ED_{50} 13,1 i 13 μ g/ml) i pokazuju slab inhibitorni efekat u odnosu na virus HIV-RT (Yoshida et al., 1996).

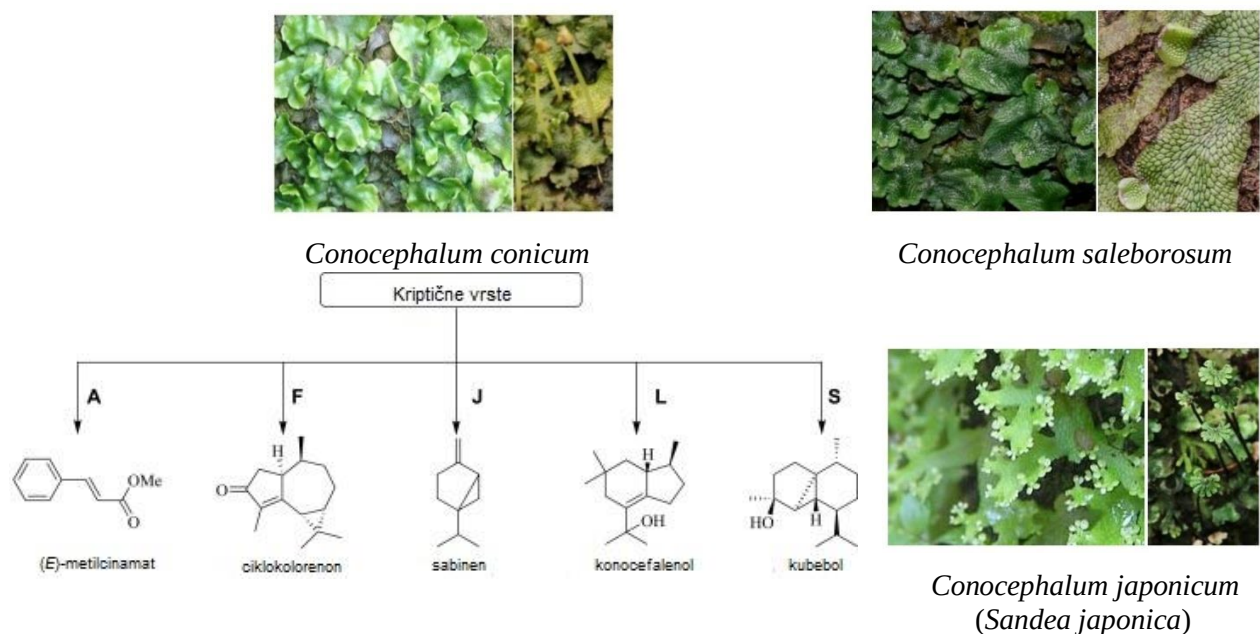
2.4. VRSTA *CONOCEPHALUM CONICUM* I NJENI SEKUNDARNI METABOLITI

Conocephalaceae Müll. Frib. ex Grolle je široko rasprostranjena familija, koja pripada redu Marchantiales Limpr., potklasi Marchantiidae, čiji rod, *Conocephalum* Hill. predstavlja pravi taksonomski izazov. Za *C. conicum/salebrosus* (*C. conicum* (L.) Dumort., *C. salebrosus* Szwedk., Buczk. & Odrzyk.) kompleks, savremenim filogenetskim istraživanjima (Odrzykoski & Akiyama, 2020) potvrđeno je postojanje šest vrsta, uključujući novu vrstu, koja je prethodno bila okarakterisana kao tip R ili hemotip III (Toyota, 1994; Kim et al., 2001). Takođe, potvrđeno je prisustvo tri kriptične vrste u okviru kompleksa *C. japonicum* (*C. japonicum* (Thunb.) Grolle). Kako su ove tri vrste filogenetski izuzetno udaljene u odnosu na vrste kompleksa *C. conicum/salebrosus*, kompleks *C. japonicum* je prebačen u rod *Sandea* Lindb., pod nazivom *S. japonica* Steph. ex Yoshin. (Odrzykoski & Akiyama, 2020). Vrste porodice Conocephalaceae su rasprostranjene na području Severne Amerike, Evrope i istočne Azije (Zhang et al., 2019) (slika 2.4.1.). Dvodome su, robusnih talusa, čija površina podseća na zmijsku kožu (Glime, 2021). Ove jetrenjače formiraju gusti pokrivač na stenama i vlažnom zemljištu, najčešće u blizini vode, u šumama i drugim zasenjenim habitatima (Borovichev et al., 2009; Szwedkowski et al., 2005).

Jetrenjača *C. conicum*, rasprostranjena širom Evrope, dobila je ime po arhegonioforima u obliku konusa. Obzirom da dostiže dužinu do 20 cm, *C. conicum* se smatra najvećom taloidnom jetrenjačom. Talus ove vrste je složene organizacije i dorzoventralne orijentacije, pri čemu se gornja (dorzalna) i donja (ventralna) strana razlikuju po građi. Dorzalna strana talusa je zelena i sjajna (Szwedkowski et al., 2005). Talus je dužine 10-25 mm i širine 7-20 mm, račvast, sa krupnim režnjevima zaobljenih ili urezanih vrhova, blago sinuoznih margina, sa 3-4 reda izduženih ćelija (Casas et al., 2009) (slika 2.4.2.).

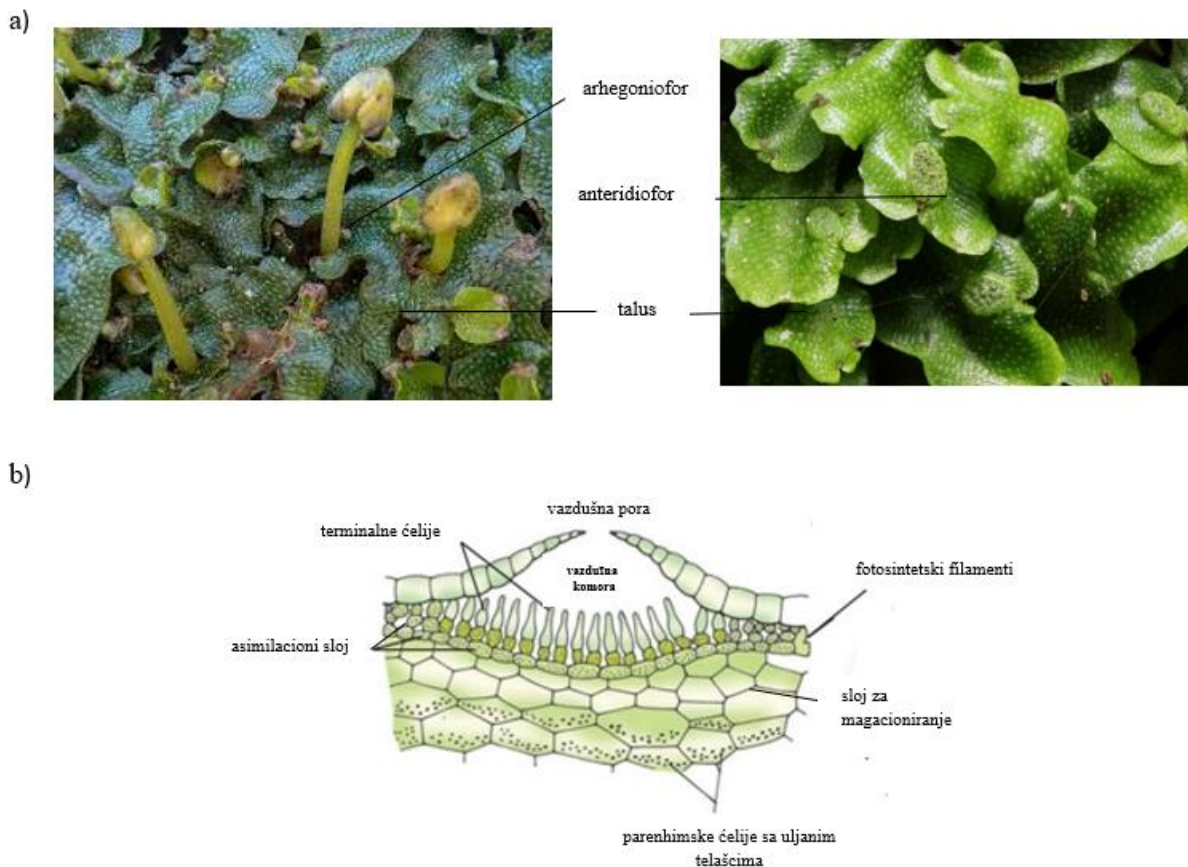
Dorzalna površina talusa karakteristična je po izraženoj heksagonalnoj (ili poligonalnoj) mrežastoj strukturi. Svaka heksagonalna jedinica (areola) u svom središnjem delu poseduje po jednu makroskopski vidljivu vazдушnu poru. Vazdušne pore su uske, proste i izdignute, okružene prstenasto raspoređenim ćelijama (4-6 koncentričnih prstenova malih uskih ćelija, od kojih se svaki prsten sastoji od 7-8 ćelija) (Casas et al., 2009). Ispod epidermisa, nalazi se sloj velikih vazdušnih komora i hlarenhima, čije su ćelije bogate hloroplastima (asimilaciono tkivo). Za ovim slojem sledi tkivo za skladištenje, kao i provođenje. Skladišno tkivo se sastoji od parenhimskih

ćelija, koje su krupne, tankih zidova i često sadrže skrobna zrna i uljana telašca karakteristična za jetrenjače. U ovom sloju prisutne su i sluzne ćelije, bogate mucilaginoznim materijama, koje doprinose zadržavanju vlage i zaštiti od isušivanja. Sa ventralne strane talusa, polaze ljupe – jednoslojne listolike strukture, gotovo polumesečastog oblika, sa ljubičastim nastavkom koje su raspoređene u dva uzdužna reda (po jedan sa obe strane centralnog rebra) (Casas et al., 2009). Iz njihovih pazuha najčešće izrastaju rizoidi. Pritom, mogu se razlikovati dva tipa rizoida – glatkozidni, koji služe za pričvršćivanje talusa za podlogu, i krtolasti (kratki) rizoidi sa ulogom u apsorpciji vode i hranljivih materija (Vashishta et al., 2010).



Slika 2.4.1. Gametofiti taloidnih jetrenjača predstavnika roda *Conocephalum* i marker jedinjenja odabranih kriptičnih vrsta kompleksa *C. conicum*.

Conocephalum conicum proizvodi game u najdubljim slojevima talusa koje se oslobađaju degradacijom talusa, stvarajući nove jedinke (Smith, 1990). Seksualno razmnožavanje se vrši preko gametangija, polnih organa smeštenih na gametangioforima. U pogledu polnosti, biljke su dvodome (slika 2.4.2.). Anteridiofori (smešteni na dorzalnoj strani) nemaju stabljiku i sastoje se od anteridijskih jastučića, tamnih i ovalnih regiona talusa, koji sadrže anteridije. Tačnije, anteridijske komore (zajedno sa vazдушnim) razbacane su sa dorzalne strane ovih struktura. Svaka

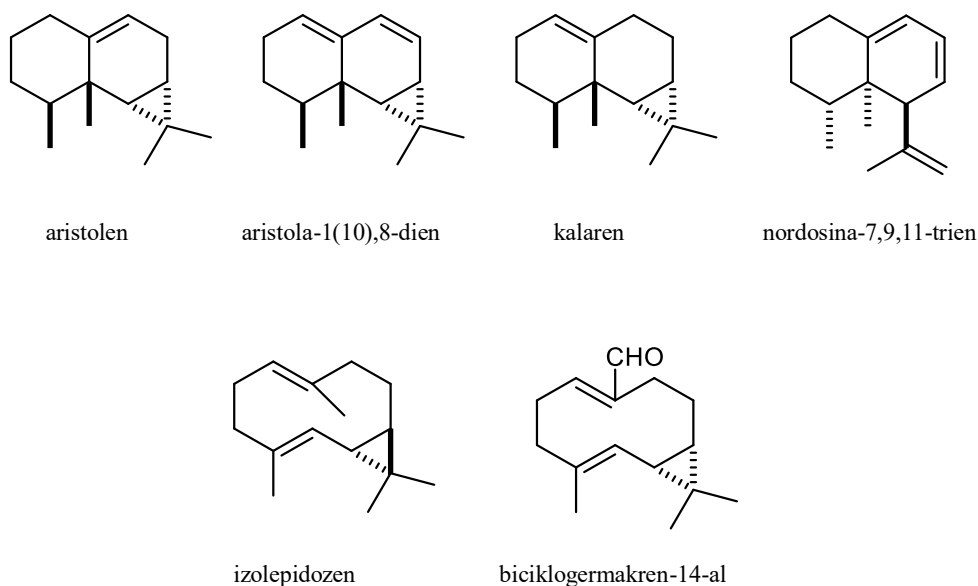


Slika 2.4.2. Prikaz a) izgleda gametangiofora kod vrsta roda *Conocephalum*; b) anatomija talusa vrsta roda *Conocephalum*

anteridijska komora sadrži po jednu anteridiju. Mehanizma raspršivanja spermatozoida kod vrsta kompleksa *C. conicum* veoma je karakterističan, primećeno je da se isti izbacuju i nekoliko centimetara u vazduh (Glime, 2017). Arhegoniofori (dužine 5-10 cm, na dorzalnoj strani talusa) su konusnog oblika i poseduju dršku. Konusni deo arhegoniofora je okarakterisan prisustvom vazdušnih komora, kao i prisustvom 5-8 kratkih režnjeva u svojoj osnovi. Svaki sporofit se sastoji od malog stopala, nešto duže drške i čaure kruškastog do elipsoidnog oblika. Sporofit se razvija na režnjevima konusnog dela arhegoniofora (stoga broj sporofita zavisi od broja režnjeva). Svaki sporofit je zaštićen omotačem (Veljić et al., 2018). Čaure sadrže spore (koje unutar nje počinju da klijaju, pritiskajući njen zid) i jednoćelijske elatere u međusobnom brojnom odnosu od 4:1. Nakon sazrevanja čaure, poklopac se odbacuje a zid puca na 4-8 nepravilnih režnjeva. Zrele spore su višćelijske, dok su elatere slobodne (izdužene, poput opruga, sa 2-4 spiralna zadebljanja), i

pomažu u otvaranju kapsule i raspršivanju spora (slika 2.4.2.) (Vashishta et al., 2010; Veljić et al., 2018).

Jetrenjača *C. conicum* deo je mnogih tradicionalnih kineskih mikstura i biljnih ulja korišćenih u tretmanu pulpitisa (Sun, 2017), kolorektalnih adenomatoznih polipa (Li, 2016), kožnih i varikoznih ulcera (Li, 2015; Sun, 2014), tuberkuloze (Dai, 2015), opekotina (Shu, 2015), ujeda (Zhou et al., 2015), facijalnog perifernog neuritisa, u tretmanu impetiga novorođenčadi (Yang, 2013), kao i u stomatologiji (Hu, 2015; Wang, 2015). Etnobotanički preparati na bazi vrsta roda *Conocephalum* pokazuju antimikrobna, antifungalna, antipiretička i antidotalna svojstva (Glime, 2017), što je posledica prisustva raznovrsnih sekundarnih metabolita u ovim biljkama. Prethodna fitohemijska istraživanja vrste *C. conicum* otkrila su značajne varijacije u sastavu njenih sekundarnih metabolita, što je rezultat kompleksne genetske strukture i velike zavisnosti sekundarnog metaboličkog profila od geografskog porekla biljnog materijala (Ludwiczuk et al., 2013a).



Slika 2.4.3. Odabrane strukture najkarakterističnijih sastojaka jetrenjača *C. conicum* kompleksa

Postoji više hemotipova jetrenjače *C. conicum* (Asakawa et al., 1995; Ludwiczuk et al., 2013). Literaturni podaci navedeni u ovoj disertaciji se, ukoliko nije decidirano kojem hemotipu

pripadaju, odnose na agregatnu vrstu *C. conicum*. U Japanu su identifikovana tri, od kojih je za svaki karakteristična produkcija određenog dominantnog jedinjenja. Jedinjenje (–)sabinen dominira najrasprostranjenijim tipom (tip I), (+)-bornil-acetat karakterističan je hemotip koji raste na obalskom području Japana (tip II), dok je metil-cinamatni tip (tip III) karakterističan za planinske šumske predele ove zemlje (Ghani et al., 2016; Toyota et al., 1997). Za kompleks vrsta *C. conicum* je potvrđeno da, usled hemijskog polimorfizma, broji najmanje šest kriptičnih vrsta (A, C, F, J, L i S), što je potkrepljeno i upotrebom molekularnih markera u taksonomskim studijama (Akiyama et al., 1998; Akiyama i Odrzykoski, 2020; Kim et al., 2001; Odrzykoski i Szweykowski, 1991) (slika 2.4.1.). Uz pomoć multivarijantne statističke analize hemijskih profila analiziranih uzoraka kompleksa *C. conicum/salebrosus* sakupljenih širom Japana, Evrope i Severne Amerike (Szweykowski et al., 2005), kriptična vrsta, označena kao „L“, evropskog porekla, kojom dominira seskviterpenski alkohol brazilanskog skeleta, konocefalenol, a posmatrajući i njihove ostale isparljive sastojke, brazila-5,10-dien, izolepidozen, biciklogermakren-14-al, najviše se razlikuje od ostalih kriptičnih vrsta.

Kriptična vrsta „A” je endemična za Severnu Ameriku, i njenim hemijskim markerom smatra se produkcija (*E*)-metil-cinamata, kao dominantnog jedinjenja, dok je u „J” tipu, čiji je rast ograničen isključivo na Japan, prisutna velika količina sabinena. Geografsko područje kriptične vrste „F”, koja sadrži velike količine ciklokolorena ili germakrena D, simpatrično je sa „J” i alopatrično sa „A”, što je u vezi sa različitim hemijskim sastavom ove dve vrste. Tip „J” se smatra hemijski sličnim „F” tipu, što je okarakterisano zajedničkim prisustvom β -kariofilena, germakrena D i ciklokolorena, odvajajući „F” i „J” u poseban klaster, klaster II. Sa druge strane, prisustvo kubebola karakteriše vrstu „S”, koja je po prisustvu 1-*epi*-kubenola, kadina-1,4-diena slična sa vrstom „A” (zajedno čine klaster III), dok se prisustvom aristolena, aristola-1(10),8-diena, kalarena, nordosina-7,9,11-triena poklapa sa tipom „L” (Ludwiczuk et. al, 2013) (slika 2.4.3.).

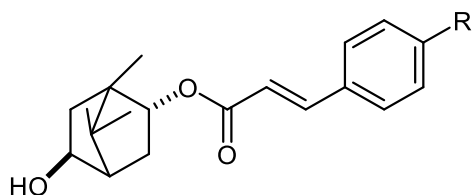
Isparljivi i neisparljivi, visoko funkcionalizovani monoterpenoidi i retki, ili do tada nepoznati seskviterpenoidi izolovani su iz japanskih i evropskih uzoraka jetrenjače *C. conicum* (Harinantenaina et al., 2007; Lu et al., 2006; Melching i Koning, 1999; Toyota et al., 1988). Sastavom etraskog ulja *C. conicum* se, polazeći od analize *Suire* i *Bourgeois* (*Suire* i *Bourgeois*, 1977), bavilo svega 7 radova (Rezultati i diskusija 4.3.2.). Preko 20 radova obuhvatilo je analizu ekstrakata *C. conicum*, među kojima se skoro polovina, njih 11, ticala dietil-etraskih. Nakon prvog

rada od strane čeških naučnika (Benešová et al., 1969b) analizom sastava dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum* evropskog porekla do sada se bavilo svega 3 rada (Rezultati i diskusija 4.3.1.), dok su ostali, među kojima su bili prvi *Asakawa i Takemoto* (Asakawa i Takemoto, 1979), mahom vršili analizu sastava uzoraka japanskog i kineskog porekla, kao što se dalje navodi.

Hromatografskom analizom dietil-etarskog ekstrakta, biljnog materijala *C. conicum* prikupljenog u Tokušima prefekturi, Kamiyamacho, detektovano je prisustvo dva nova gvajanolida, 8 α -acetoksizaluzanini C i D, uz dva poznata, zaluzanin C i D, i germakranolida (tulipinolida). Ciklizacijom tulipinolida, koji je zaslužan za karakterističnu oporost ženskog gametofita vrste *C. conicum*, dobijeni su eudezmanolidi, 8 α -acetoksi- α -ciklokostunolid i 8 α -acetoksi- β -ciklokostunolid. Ovi eudezmanolidi, zajedno sa gvajanolidima, zaluzaninima C i D, 8 α -acetoksizaluzaninom D i dehidrozaluzaninom C, ispoljavaju inhibitornu aktivnost prema klijanju (100-200 ppm) i rastu (50 ppm) pirinča (Asakawa i Takemoto, 1979) (slika 2.4.5.).

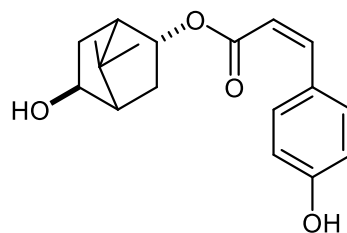
Naredne godine, *Asakawa* je ekstrahovao biljni materijal *C. conicum* japanskog porekla, sastavljen od ženskih receptakuluma sa zrelim kapsulama i muških talusa, dietil-etrom tokom pola sata nakon dvodnevnog sušenja. U analizi je detektovao 43 sastojka, od kojih je identifikovano deset: β -pinen, kamfen, sabinen, mircen, limonen, β -kariofilen, δ -kadinen, kampesterol, stigmasterol i sitosterol (Asakawa et al., 1980a). Daljom analizom dietil-etarskih ekstrakata tokom narednih 20 godina identifikovano je više novih monoterpena iz ove jetrenjače. Hromatografskim razdvajanjem dietil-etarskog ekstrakta dobijenog dvonedeljnim potapanjem biljnog materijala *C. conicum* poreklom iz Japana, dobijeno je devet frakcija. Daljom obradom pored novog monoterpenskog estra, (+)-bornil-ferulata, i dva „green leaf volatiles“ (GLV) derivata (1-okten-3-ol, 1-okten-3-il-acetat) identifikovano je još 9 sastojaka: (+)-bornil-acetat, bornil-4-hidroksi-2-metoksicinamat, (–)-limonen, (–)- β -sabinen, (+)-bicikloelemen, (+)- β -elemen, (–)-biciklogermakren, *trans*-fitol i lunularin (Suire et al., 1982). Sličnog sastava bio je i dietil-etarski ekstrakt biljnog materijala *C. conicum* (hemotip I, II i III) prikupljenog takođe u Japanu. Nakon desetodnevnog potapanja, hromatografskim razdvajanjem detektovano je više monoterpenskih estara koji su bili novi prirodni proizvodi.

Unutar hemotipa I, novoidentifikovani metaboliti obuhvatali su bornil-*cis*-4-hidroksicinamat i (+)-bornil-*cis*-4-hidroksi-3-metoksicinamat, dok je (+)-bornil-*p*-kumarat, kao novo jedinjenje, prvi put identifikovano u hemotipovima II i III (Toyota et al., 1997). Hromatog-

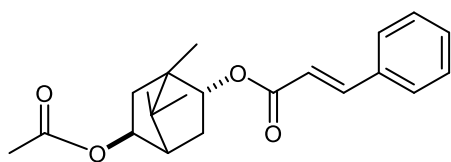


R=H 5β-dihidroksiborn-2α-il cinamat

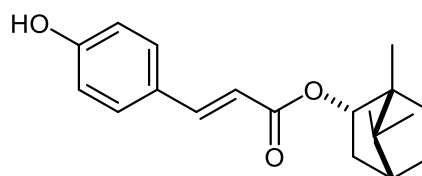
R=OH 5β-dihidroksiborn-2α-il-*p*-hidroksicinamat



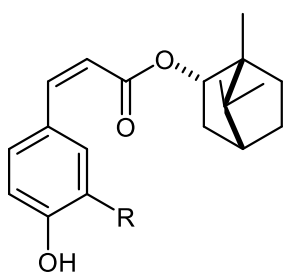
5β-dihidroksi-bornan-2-*cis-p*-hidroksicinamat



5β-acetoksiborn-2α-il-cinamat

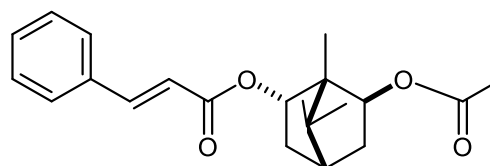


(+)-bornil-*p*-kumarat



R=H bornil-*cis*-4-hidroksicinamat

R=OMe (+)-bornil-*cis*-4-hidroksi-3-metoksicinamat



6β-acetoksiborn-2α-il cinamat

Slika 2.4.4. Odabrani sastojci etarskog ulja i ekstrakata jetrenjače *C. conicum*

rafskim razdvajanjem dietil-etarskog ekstrakta kineskih uzoraka *C. conicum* identifikovana su četiri nova monoterpenaska estra: 5β-dihidroksiborn-2α-il cinamat, 5β-dihidroksiborn-2α-il-*p*-hidroksicinamat, 5β-acetoksiborn-2α-il-cinamat i 5β-dihidroksi-bornan-2-*cis-p*-hidroksicinamat, uz već poznati 3,4-dimetoksistiren. Novoizolovani 5β-dihidroksiborn-2α-il-cinamat je pri IC₅₀ 4,5 μg/mL pokazao citotoksični efekat na HepG2 ćelijama (Lu et al., 2006) (slika 2.4.4.).

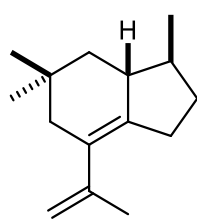
Iz dietil-etarskog ekstrakta dobijenog nakon jednomesečnog potapanja na sobnoj temperaturi biljnog materijala *C. conicum*, poreklom iz Japana, Tokushima, izolovan je biciklogermakren-13-al, kao novi seskviterpenski aldehid (Toyota et al., 1988), dok 6 β -acetoksi-2 α -cinamoiloksi-bornan, izolovan od strane *Harinantenaina* i saradnika iz istog kompleksa vrsta, istog porekla, takođe predstavlja novi sekundarni metabolit (*Harinantenaina* et al., 2007) (slika 2.4.4.). *Ludwiczuk* i saradnici ustanovili su da dietil-etarskim ekstraktom japanskih uzoraka dominiraju β -sabinen, isto kao i uzorcima poreklom iz Nemačke (Rezultati i diskusija 4.3.1.), uz dodatne identifikovane sekundarne metabolite β -elemen, β -kariofilen, germakren D, kubebol i *ent*-(1(10)*E*,5*E*)-germakra-1(10),5-dien-11-ol (*Ludwiczuk* et al., 2008).

Analizom heksanskog ekstrakta se bavilo pet radova (*Abay* et al., 2013; *Matsuo* et al., 1980; *Melching* et al., 1997; *Singh* et al., 2011; *Tori* et al., 1995). U istraživanju iz 1980. godine, *Matsuo* i saradnici izolovali su seriju etil-estara masnih kiselina (C14-C24), koji su činili 77% heksanskog ekstrakta *C. conicum*, iz predgrađa Iwakuni, Yamaguchi Prefecture, pri čemu su najdominantniji bili etil-heksadekanoat (42,9%) i etil-oktadekanoat (32,9%) (*Matsuo* et al., 1980). *Tori* i saradnici su 1995. godine analizom i daljom obradom heksanskog ekstrakta *C. conicum* nemačkog porekla odredili tačnu strukturu brazilanskog seskviterpena, konocefalenola, karakterističnog upravo za ovu vrstu evropskog porekla (*Tori* et al., 1995, Rezultati i diskusija 4.3.1.). Jedinjenje (+)-kadina-3,5-dien takođe je detektovano u heksanskom ekstraktu *C. conicum* poreklom iz Nemačke (*Melching* et al., 1997).

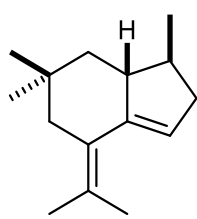
Analizom dihlormetanskog ekstrakta bavili su se *Wood* i saradnici, obrađujući materijal *C. conicum* prikupljen na području severne Kalifornije, kada su detektovali 15 sastojaka (>1%) (*Wood* et al., 1995). Uzorcima iste vrste iz južnog Ilinoisa ovi autori okarakterisali su *trans*-metilcinamat kao dominantni sastojak među 12 detektovanih isparljivih jedinjenja.

Obradom metanolnog ekstrakta *C. conicum* japanskog porekla, hemotipa I, nakon sedmodnevnog stajanja, izolovan je novi fenetil-glikozid: 2-(3,4-dihidroksifenil)etil- β -alopiranozid (*Toyota* et al., 1996). Analiza HPLC spektra ovog ekstrakta sprovedena od strane *Niranjana* i saradnika, pokazala je prisustvo poznatih antioksidanasa kao što su galna kiselina i ferulna kiselina u najvećem procentu, dok su rutin (171,56 μ g/g), kofeinska kiselina (72,82 μ g/g), hlorogena kiselina (19,99 μ g/g), protokatehinska kiselina (16,13 μ g/g), kvercetin (4,72 μ g/g) i kempferol (kaempferol) (2,43 μ g/g) identifikovani kao zastupljeni u manjim količinama (*Niranjan*

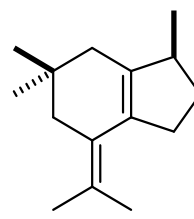
et al., 2014). Analiza metanolnog i acetonskog ekstrakta uzoraka *C. conicum* prikupljenih sa dve različite nadmorske visine Himalaja, pokazala je antifungalnu aktivnost u odnosu na dve vrste roda *Aspergillus* u različitim koncentracijama. Ovi ekstrakti su pri koncentraciji od 100 µg/mL inhibirali rast vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* za 50%. Acetonski ekstrakt je inhibirao rast navedenih vrsta za više od 76%, pri čemu su derivati masnih kiselina (metil-estar stearinske kiseline (14,04%), palmitinska kiselina (11,16%) i metil-estar palmitinske kiseline (10,69%)) bili dominantni među 30 identifikovanih konstituenata. Naime, inhibitorna aktivnost acetonskog ekstrakta vrste *C. conicum* u odnosu na vrste gljiva *A. flavus* (MIC 3,91 µg/mL i MFC 7,81 µg/mL) i *A. parasiticus* (MIC 7,81 µg/mL i MFC 7,81 µg/mL), može se porediti sa inhibitornom aktivnošću flukonazola (MIC i MFC 7,81 µg/mL) (Negi et al., 2020).



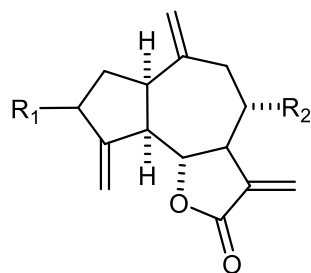
brazila-5,10-dien



brazila-5(10),6-dien



brazila-1(6),5(10)-dien



$R_1=R_2=OAc$

8 α -acetoksizaluzanin D

$R_1=OH$; $R_2=OAc$

8 α -acetoksizaluzanin C

Slika 2.4.5. Odabrani sekundarni metaboliti, po prvi put izolovani, iz ekstrakata i etarskog ulja vrste *C. conicum*

Ivković i saradnici su analizom metanolnog ekstrakta *C. conicum*, poreklom iz Petničke pećine u Srbiji, identifikovali terpene, ulja i šećere. Međutim, antimikrobni potencijal ovog ekstrakta nije bio potvrđen u odnosu na osam testiranih bakterijskih sojeva (Ivković et al., 2021).

Singh i saradnici su ispitivali antibakterijsku aktivnost ekstrakta vrste *C. conicum*, poreklom iz Indije pri koncentraciji od 30 mg/mL. Najosetljivija Gram-pozitivna bakterija bila je *Bacillus cereus*, na koju su delovali svi testirani ekstrakti (metanolni (67%), butanolni (47%), hloroformski (75%) i heksanski (71%)), dok je aktivnost u odnosu na vrstu *Streptococcus pyogenes* ispoljio samo butanolni ekstrakt (70%). Sa druge strane, svi gore pomenuti testirani ekstrakti ispoljili su antibakterijsku aktivnost ka svim testiranim Gram-negativnim bakterijama—*Pseudomonas aeruginosa* (32-12%), *Klebsiella pneumoniae* (37-84%), *Enterococcus faecalis* (39-80%), *Enterobacter aerogenes* (34-77%) i *Proteus mirabilis* (39-84%) (*Singh et al.*, 2011). Analizom masnih kiselina u heksanskom, dihlormetanskom, hloroformskom, etil-acetatnom i metanolnom ekstraktu *C. conicum*, Turskog porekla, bavili su se *Abay* i saradnici (*Abay et al.*, 2013). Palmitinska kiselina je bila najzastupljenija u svim ekstraktima (18%-68%) a detektovane su i lignocerinska, behenska, elaidinska i linoleinska kiselina, pri čemu je najveći broj detektovanih sastojaka bio u metanolnom ekstraktu. Ista grupa autora pokazala je i slabu insekticidnu aktivnost (38%) heksanskog ekstrakta ove jetrenjače ka žitnom žižku, *Sitophilus granarius* (*Abay et al.*, 2013).

Prisustvo flavonoida naglašava kompleksnost vrste *C. conicum* (*Porter*, 1981), pri čemu varijacije u njihovom sadržaju zavise od geografskog porekla i godišnjeg doba. Evropski, severnoamerički i azijski uzorci jasno se razlikuju, a podgrupe se mogu identifikovati i unutar ovih širokih podela. Analizom flavonoidnog sastava gametofita *C. conicum* iz Nemačke i Severne Amerike, identifikovana su zajednička jedinjenja: vicenin-2, lucenin-2, apigenin 7-*O*-glukuronid, luteolin 7-*O*-glukuronid i hriseriol 7-*O*-glukuronid. Takođe, identifikovana su i tri nova jedinjenja, apigenin 7-*O*-glukuronid 4'-*O*-ramnozid, luteolin 7-*O*-glukuronid 4'-*O*-ramnozid i hrizeriol 7-*O*-glukuronid 4'-*O*-ramnozid. Nemački uzorci su, uz gore pomenute, sadržali i apigenin 7,4'-di-*O*-glukuronid i luteolin 7,4'-di-*O*-glukuronid, kao i novo jednjenje apigenin 7-*O*-diglukuronid 4'-*O*-glukuronid. Severnoamerički uzorci su dodatno sadržali luteolin 7,3'-di-*O*-glukuronid, 2 derivata luteolin 7-*O*-glukuronida i novi triglukozid, luteolin 7-*O*-glukuronid 3',4'-di-*O*-ramnozid (*Markham et al.*, 1976). Acetonski ekstrakt *C. conicum* je sadržao apigenin-7-*O*- β -*D*-glukuronid, apigenin-4'-*O*- β -*D*-glukuronid, luteolin-3'-*O*- β -*D*-glukuronid i luteolin-7-*O*- β -*D*-glukuronid (*Khetwal*, 1984). Analizom sastava *C. conicom* je utvrđeno da on sadrži 7,4% lipida. Među prisutnim dominantnim sterolima izolovanim iz ove jetrenjače sa Tajvana bili su holesterol (2%),

24-metil-5,22-olestadienol (2%), 24-metil-5-olestanol (41%), 24-etil-5,22-olestadienol (37%)
i 24-etil-5-olestenol (18%) (Chiu et al., 1985).

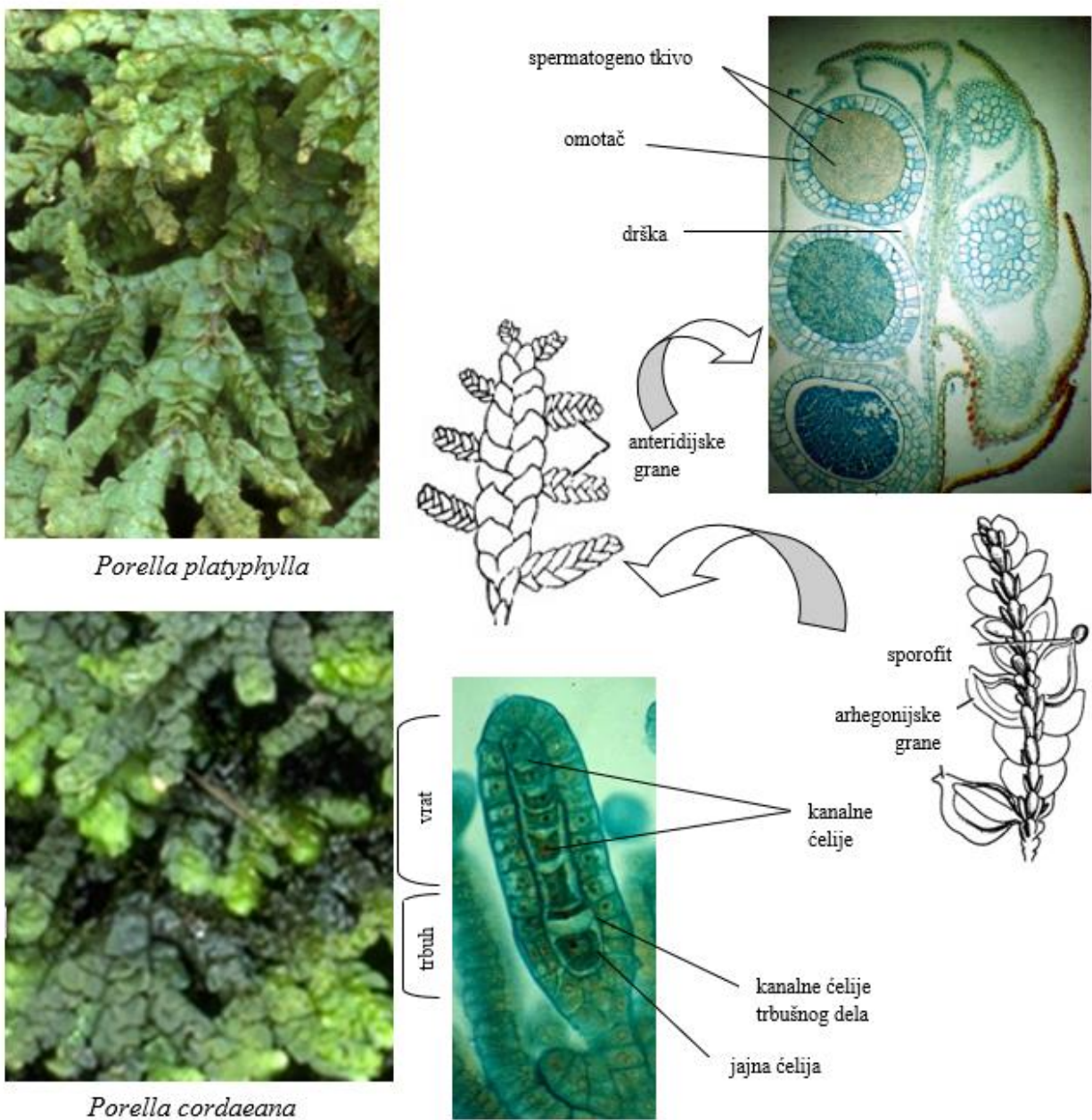
2.5. VRSTE *PORELLA CORDAEANA* I *PORELLA PLATYPHYLLA*, I NJIHOVI SEKUNDARNI METABOLITI

Kosmopolitski rod *Porella* (L.) Gray, zajedno sa rodovima *Macvicaria* i *Ascidiota*, pripada familiji jetrenjača Porellaceae (klasa Jungermanniopsida). Od ukupno 252 vrste roda *Porella* koje se navode u bazi *The Plant List*, 109 njih (43,3%) je sa zvanično prihvaćenim imenima (Secretariat, 2023;

Klasa	Jungermanniopsida
Potklasa	Jungermanniidae
Red	Porellales
Podred	Porellineae
Familija	Porellaceae
Rod	<i>Porella</i>

The Plant List, 2013). Predstavnici roda *Porella* su vrste dorzoventralne orijentacije, sa folioznim gametofitom, osrednje veličine ili robusnim, sa monopodijalno granatim kauloidom i filoidima raspoređenim u tri reda (Veljić et al., 2018). Od tri reda listova, dva su dorzalna, a jedan je ventralni (amfigastrije). Filoidi se sastoje od jednog sloja hlarenhimskih ćelija (poligonalnog oblika i sa brojnim hloroplastima) i dvorežnjeviti su (prepokrivanje je nadležnog tipa); dorzalni režanj je krupniji, obično jajastog oblika, sa zaobljenim vrhom, dok je ventralni gotovo upola manji, uži, sa oštrijim vršnim delom. Iz bazalnih delova amfigastrija na ventralnoj strani, razvijaju se rizoidi, kojima je jetrenjača pričvršćena za supstrat. U anatomskom smislu, mlađa stabaoća čine uniformno tkivo sačinjeno od parenhimskih ćelija (čak ni epidermis nije jasno definisan). Na poprečnom preseku starijih stabaoća, moguće je uočiti epidermis, korteks (sačinjen od malih debelozidnih ćelija) i medulu (sastoji se od tankozidnih i krupnijih ćelija) (Bendre & Kumar, 2010; Veljić et al., 2018).

Vrste su dvodome. Muške biljke su obično manjih dimenzija u poređenju sa ženskim, sa anteridijalnim granama, koje se uzdižu pod pravim uglom u odnosu na stabaoće. Ove grane sadrže puno modifikovanih listića, u čijem se pazuhu nalaze anteridije. Svaka anteridija se sastoji od dugačke drške, na čijem se vrhu nalazi globularni, prošireni deo. Drška je sačinjena od dva reda ćelija; omotač globularnog dela sadrži dva-tri sloja ćelija u svom bazalnom i jedan sloj ćelija u svom apikalnom regionu; unutrašnji deo ispunjen je spermatogenim tkivom. Po sazrevanju i u prisustvu slobodne vode, dolazi do pucanja tanjeg, gornjeg dela anteridijalnog omotača u nekoliko nepravilnih reznjeva, pri čemu se finalno oslobađaju spermatozoidi. Arhegonijalne grane se formiraju na vrhovima kratkih bočnih grana ženskih biljaka, kraće su od anteridijalnih i na vrhu nose arhegonije, kao i 4-5 zaštitnih listića. Arhegonije su zaštićene pseudoperijantom. Arhegonije



Slika 2.5.1. Gametofit jetrenjača *Porella cordaeana* i *Porella platyphylla*, muške i ženske biljke, uz anteridijumske i arhegonijumske grane

su manje-više cilindričnog oblika. Sastoje se od užeg vratnog i proširenog trbušnog regiona. Vrat se sastoji od pet vertikalnih redova ćelija, koji zatvaraju kanal (obično ispunjen i sa 8 širokih (kanalnih) ćelija). Jajna ćelija nastaje u proširenom delu arhegonije. Iznad nje se nalazi ventralna kanalna ćelija, dok je zid trbušnog dela dvoslojan (Bendre & Kumar, 2010; Veljić et al., 2018).

Zreli sporofit je diferenciran na malo stopalo, kratku setu i loptastu čauru. Omotač čaure se sastoji od dva do četiri sloja ćelija. U unutrašnjosti, mejotičkom deobom, nastaju mnogobrojne spore (dijametra 40-55 μm). Pored spora, u čauri nastaju i kratke elatere sa jednim do tri spiralna zadebljanja. Posle sporogeneze, seta se izdužuje, čaura probija kaliptru, izdiže se iznad pseudoperijanta i zaštitnih listića i puca duž nizova tankozidnih ćelija (slika 2.5.1.) (Bendre & Kumar, 2010; Veljić et al., 2018).

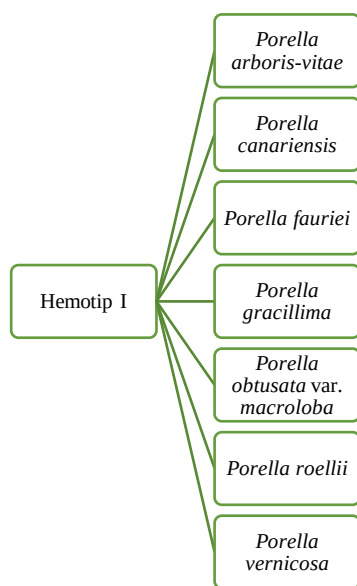
Među najpoznatije predstavnike ovog roda spadaju dve sestrinske vrste, *P. platyphylla* (L.) Pfeiff i *P. cordaeana* (Huebner) Moore. Jetrenjača *P. platyphylla* opisana je od strane Linnaeus-a (Linnaeus, 1753), a na osnovu opisa Morison-a, Vaillant-a i Dillenius-a (Dillenius, 1741; Morison, 1699; Vaillant, 1727). Ova kosmopolitska vrsta jetrenjače, sa pravilno perastom formom stabaoce, može dostići dužinu do 8 cm. Dorzalni režanj filoida je srcolik, konveksan, zatupljenog vrha, dok je ventralni režanj širok koliko i stabaoce, ovalan, i takođe zatupljenog vrha, pri čemu svojim dužim ili kraćim delom obavija stabaoce; ćelije središnjeg dela dorzalnog reznja (25-35 μm) sadrže mala ili velika obično ispupčena zadebljanja ćelijskih zidova (Casas et al. 2009). Podlistići dvostruko širi od ventralnog reznja, čitavom širinom naležu na stabaoce, sa malobrojnim zupcima u bazi. Listići koji štite arhegonije i ventralni režanj su celi, retko sa 1-2 zuba, sa zaobljenim vrhom. Otvor pseudoperijanta sa retko raspoređenim resama formira prekrivače na stenama i stablima u nizijskim i planinskim oblastima.

Porella cordaeana je vrsta jetrenjače sa gametofitom tamnozelene boje, bez sjaja, sa iregularno perastom formom stabaoce, koji može dostići dužinu do 10 cm. Razlikuje se od *P. platyphylla* samo po ustima perijanta fino zarezanih ivica i šiljatim, na dole zakrivljenim, i uvrnutim lobulama (Boisselier-Dubayle et. al., 1998). Dorzalni reznjevi filoida se međusobno preklapaju ili su udaljeni, srcastog su ili ovalnog oblika, sa celim ili blago talasastim marginama, sa jednim do nekoliko velikih zuba pri osnovi; ćelije sa malim zadebljanjima zidova; ćelije središnjeg dela dorzalnog reznja širine 30-40 μm . Ventralni režanj uži je od stabaoce, šiljat, naboran, naleže na stabaoce. Podlistići čitavom dužinom naležu na stabaoce, talasastih margina, često pri bazi nazubljeni. Vrsta formira rastresite tepihe na stenovitom supstratu ili u podnožju drveća, na vlažnim ili periodično plavnim habitatima nizijskih i planinskih područja (slika 2.5.1.) (Casas, 2009).

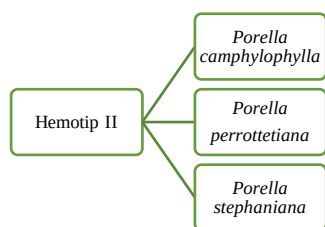
Zbog malih dimenzija, duge evolucione istorije i ograničenog broja potencijalnih morfoloških markera, taksonomija i klasifikacija roda *Porella*, kao i jetrenjača uopšte, veoma je složena. Molekularne studije ukazuju na postojanje velikog broja „kriptičnih“ vrsta koje su okarakterisane genetskom divergencijom, istovremeno bez pridruženih morfoloških razlika, usled čega ih nije moguće identifikovati kroz tradicionalni (morfološki) koncept vrsta (Heinrichs et al., 2011; Schuster, 1980). Ispitivanjem biljnog materijala morfološki gotovo istovetnih, a opet genetički različitih jetrenjača, treba imati u vidu da se detaljnom analizom sastava sekundarnih metabolita, specifičnih, kako za određenu vrstu, tako i za familiju i/ili razdeo, mogu olakšati taksonomska istraživanja (Hattori, 1978; Hentschel et al., 2007). Nakon dezintegracije tkiva, vrste roda *Porella* oslobađaju miris, za koji su najvećim delom zaslužna monoterpenska jedinjenja α -pinen, β -pinen, kamfen i limonen, koja su prisutna kod gotovo svih predstavnika ovog roda (Asakawa et al., 1979d; 1980a). Mnogo interesantnija su, sa hemosistematskog aspekta, seskviterpenska jedinjenja, koja se mogu veoma razlikovati kako među rodovima, tako i između vrsta, a njihovo prisustvo je često specifično za jetrenjače.

Pingvizani, aromadendrani, germakrani, lepidozani, gvajani, drimani, monociklofarnezani, afrikani, kao i druge vrste seskviterpenoida do sada su detektovani u, ili izolovani iz, različitih vrsta roda *Porella*, dok su od diterpenoida dominantni sakulatanski, labdanski i kauranski tip. Povremeno su u predstavnicima roda identifikovani i drugi tipovi jedinjenja kao što su steroidi i

flavonoidi (Asakawa, 1982a; 2013a; Markham i Porter, 1978).

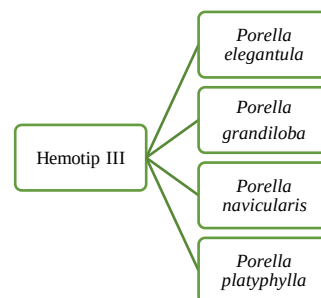


Upravo na osnovu metaboličkog profila, a sa aspekta hemijskog sastava, vrste roda *Porella* podeljene su u hemotipove. Dva glavna hemotipa se razlikuju na osnovu potencijalnog prisustva oporog ukusa biljnog materijala u skladu sa tim da li proizvode seskviterpenski dial drimanskog tipa-poligodial i srodne supstance, ili ne (Asakawa et al., 1979b). Obično se, uz poligodial, detektuju pingvizani i aromadendrani. Detaljnija podela od strane Ludwiczuk i saradnika podrazumeva postojanje šest hemotipova: drimanski-(I), sakulatanski-(II), pingvizansko-sakulatanski-(III), gvajan-germakranski-(IV), pingvizanski-(V), i afrikanski-(VI) tip (Ludwiczuk et al., 2011), pri čemu samo hemotip-(I) sadrži poligodial (Ludwiczuk, 2011). S druge strane, Gilabert i saradnici

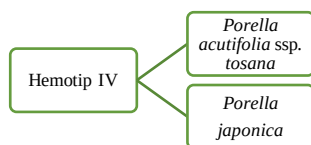


vrste roda *Porella* dele na čak deset hemotipova: driman-aromadendran-pingvizanski (I), sakulatanski (II), pingvizanski (III), pingvizan-sakulatanski (IV), afrikanski (V), santalen-afrikan-ciklofarnezanski (VI), gvajanski (VII), germakren-pingvizan-sakulatanski (VIII), germakren-afrikan-gvajanski (IX) i pingvizan-aromadendran-fuzikokanski (X) (Gilabert et al., 2011).

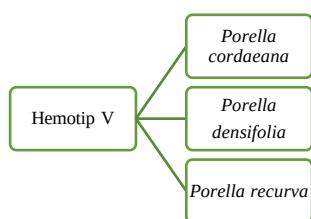
Najbrojniji hemotip, obuhvatajući *P. aboris-vitae*, *P. canariensis*, *P. fauriei*, *P. gracillima*, *P. obtusata* var. *macroloba*, *P. roellii*, kao i kompleks *P. vernicosa*, predstavlja tip I, sačinjen od takozvanih jetrenjača oštrog ukusa. Ove jetrenjače pored poligodiala (Asakawa, 1982a; 1995a; Cullman i Becker, 1999a; Ono et al., 1996; Tazaki et al., 1999a), sadrže i druge drimane, među kojima su cinamolid, drimeninol i drimenin najzastupljeniji (Asakawa, 1982a; 1995a). Paralelno prisustvo aromadendranskog seskviterpena cikloklorenona, kao i pingvizanskih seskviterpenoida, zabeleženo je kod pet od sedam gorepomenutih vrsta roda *Porella*, dok je dominantna zastupljenost drimanskog tipa seskviterpenoida do sada primećena samo kod vrsta *P. fauriei* i *P. roellii*.



Hemotipu II pripadaju tri vrste roda *Porella*, koje akumuliraju karakterističan sakulatanski-tip diterpenoida: *P. camphylophylla*, *P. perrottetiana*, i *P. stephaniana*. Ove vrste proizvode perotecianal A kao glavnu komponentu (Asakawa, 1982a; 1995a), dok su perotecianal B, sakulaporelin i labdanski diterpenoidi dodatno prisutni u jetrenjači *P. perrottetiana* (Asakawa, 1982a; 1995a). Alkohol (-)- α -eudezmol, prisutan u velikom procentu kod *P. perrottetiana*, može poslužiti kao hemotaksonomski marker ove vrste (Asakawa, 1995a; Toyota et al., 1999). *Porella platyphylla*, *P.*



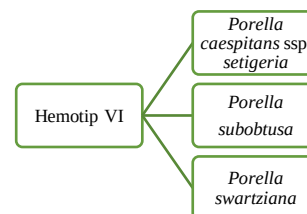
grandiloba, *P. elegantula*, *P. navicularis*, *P. japonica* i *P. acutifolia* ssp. *tosana*, pored sakulatanskog tipa diterpenoida, proizvode velike količine seskviterpenoida pingvizanskog tipa. Prve četiri vrste uključene su u sakulatan-pingvizanski hemotip (III), dok su poslednje dve vrste, zbog prisustva karakterističnih seskviterpenskih laktona gvajanskog i germakrenskog tipa, odvojene u hemotip IV (Asakawa, 1982a; 1995a; Hashimoto et al., 1998a; 2000). Važno je istaći da se ova dva taksona razlikuju po tome što vrsta *P. japonica* biosintetiše gvaja-12,6-olide, dok podvrsta *P. acutifolia* ssp. *tosana*



sintetiše gvaja-12,8-olide (Toyota et al., 1991). Specifičnost podvrste *P. acutifolia* ssp. *tosana* naglašava i prisustvo pingvizanskih dimera, bisakutifolona A-C (tabela 2.6.1.) nastalih Diels-Alderovom reakcijom.

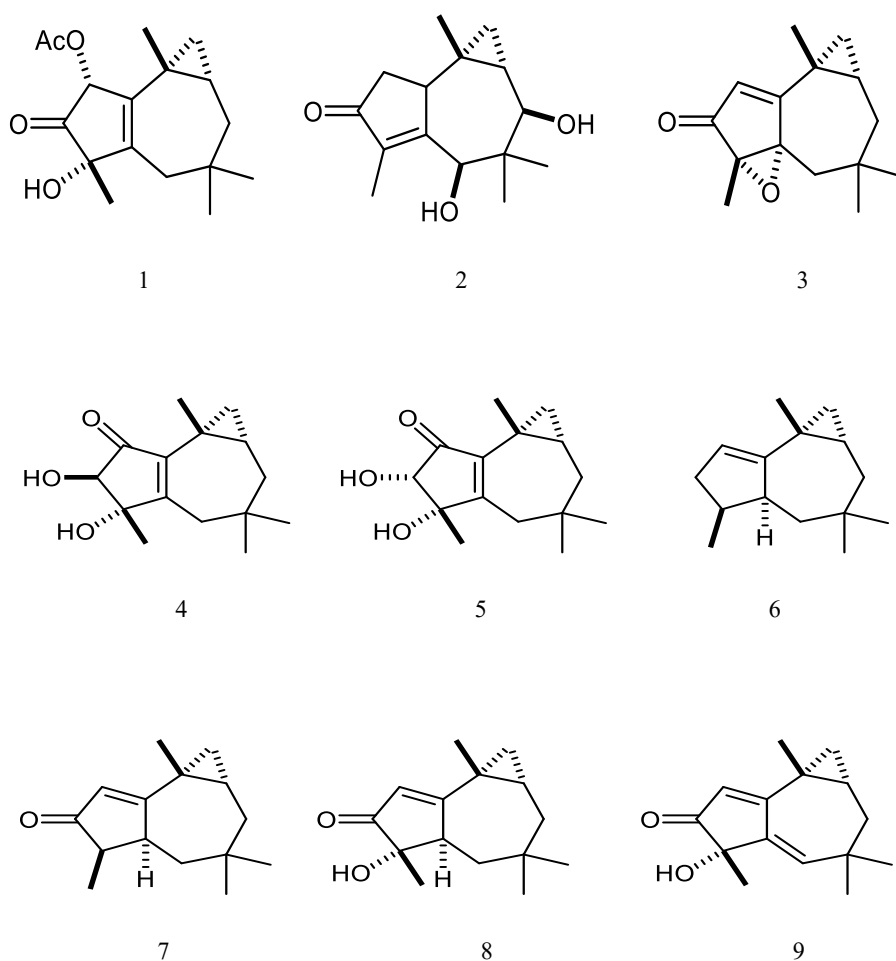
Porella recurva, *P. cordaeana*, kao i *P. densifolia* ssp. *appendiculata* i *P. densifolia* var. *fallax* (hemotip V) biosintetišu pingvizane kao glavne komponente. Pingvizanski seskviterpenoidi su široko rasprostranjeni u vrstama roda *Porella*. Dok su iz vrste *P. recurva* izolovani isključivo norpingvizani (norpingvizan, norpingvizan-metil-estar, 6,11-epoksi-3,4-diokso-15-nor-5,10-pingvizadien-12-il-acetat i 6,11-epoksi-15-nor-4-okso-5,10-pingvizadien-12-il-acetat) (Van Klink et al., 2002), iz jetrenjača *P. cordaeana* i *P. navicularis* su, pored norpingvizana, izolovani i pingvizani (Asakawa, 1995a; Bungert et al., 1998), kao i monociklofarnezanski tip seskviterpenoida, striatenon (Asakawa, 1995a). *Porella densifolia* ssp. *appendiculata* i *P. densifolia* var. *fallax*, sadrže striaten i striatol, ali i kauren, čime se razlikuju od ostalih vrsta roda *Porella* (Asakawa et al., 1987). Labdanski tip, *trans*-komunična kiselina, fitanski tip, navikulid, pimaranski tip (sandarakopimaradien), i rozanski tip (roza-5,15-dien) diterpenoida detektovani su u vrsti *P. navicularis* (Bungert et al., 1998).

Vrste roda *Porella* koje biosintetišu afrikanski tip seskviterpenoida sačinjavaju poslednji, VI hemotip. Afrikani predstavljaju veoma retka prirodna jedinjenja. Prva vrsta ovog hemotipa je *P. swartziana*, a analizom kolumbijskih i argentinskih uzoraka ove



jetrenjače detektovano je devet afrikana (slika 2.5.2.), tri *seco*-afrikana (sekošvarcianini A, B i 2,3-epoksi-sekošvarcianin A) i dva *nor-seco*-afrikana (norsekošvarcianin i dehidroksinorsekošvarcianin) (Bovi-Mitre et al., 2004; Tori et al. 1996). Iz ove pomenute jetrenjače izolovani su i gvajašvarcianini A i B, pripadnici gvajanskiog tipa seskviterpenoida, kao i seskviterpenoid germakranskog tipa, germakrašvarcianin (Asakawa, 1995a; Tori et al., 1996). Druga vrsta istog hemotipa, *P. suboptusa*, ne proizvodi germakrane i gvajane kao *P. swartziana*, ali su međusobno slične jer poseduju pet istih seskviterpenoida: tri afrikana (cespitenon, 14-acetoksicespitenon i švarcianin A) i dva *seco*-afrikana (sekošvarcianini A i B) (Asakawa et al., 1980d; Bovi-Mitre et al., 2004). *Porella suboptusa* proizvodi i santalene (α -santalen i α -santalen-

(12*S*),13-diol), što je, uz gorepomenute afrikane, čini hemijski veoma srodnom sa jetrenjačom *P. caespitans* ssp. *setigera* (Asakawa et al., 1980a). Prisustvo 14-acetoksicespitenona utvrđeno je isključivo u japanskim uzorcima *P. subobtusa* (Nagashima et al., 1996c). Takođe, za jetrenjaču *P. subobtusa* potvrđeno je prisustvo monociklofarnezana (Nagashima et al., 1996c).



Slika 2.5.2. Odabrani seskviterpenoidi afrikanskog tipa poreklom iz Marchantiophyta: **1.** 5 α -acetoksi-3 α -hidroksiafrikan-2(6)-en-4-on, **2.** 1 β ,10 β -dihidroksiafrikan-2-en-4-on, **3.** cespitenon, **4.** 3 α ,4 β -dihidroksiafrikan-2(6)-en-5-on, **5.** 3 α ,4 α -dihidroksiafrikan-2(6)-en-5-on, **6-9.** švarcianini A-D

Analiza hemijskog sastava ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Porella*, uključujući *P. cordaeana* i *P. platyphylla*, otkriva strukturni diverzitet sekundarnog metaboličkog profila (Asakawa, 2004). Analizom biljnog materijala poreklom iz Turske utvrđeno je da pingvizanin,

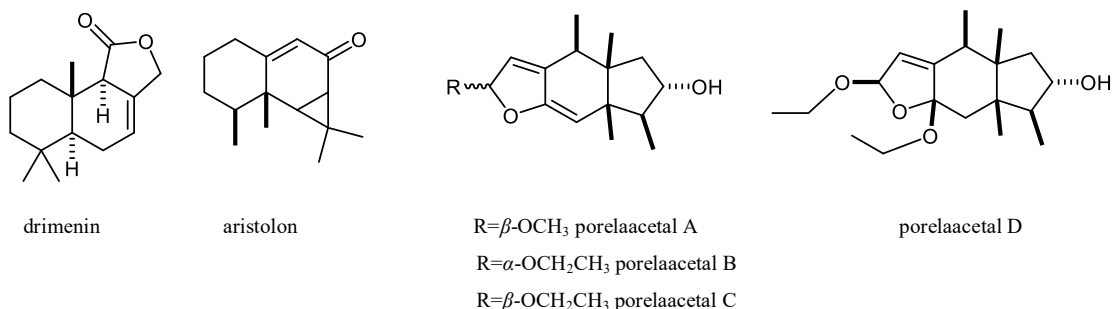
perotecianal A i spiropingvizanin čine glavne komponente dietil-etarskog ekstrakta *P. cordaeana*, s koncentracijom koja varira između 9% i 19%. S druge strane, kod vrste *P. platyphylla*, dominantni metaboliti su pingvizanin (18%) i spiropingvizanin (10%) (Tosun et al., 2013). Vrsta *P. platyphylla* se smatra evolutivno primitivnijom vrstom, zbog prisustva pingvizana kao glavnih sekundarnih metabolita (Asakawa et al., 1980b; 1980c; Asakawa, 2004).

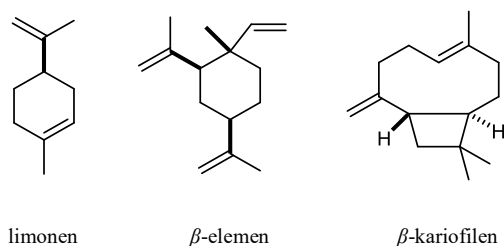
Metanolni, etanolni i etil-acetatni ekstrakti biljnog materijala vrste *P. cordaeana*, prikupljeni u aprilu 2012. godine sa planine Zlatar u Srbiji, pokazali su značajno antimikrobno dejstvo u odnosu na različite sojeve bakterijskih i gljivičnih patogena izolovanih iz prehrambenih proizvoda (Bukvički et al., 2012). Svi navedeni ekstrakti su ispoljili antimikrobnu i antifungalnu aktivnost u odnosu na osam testiranih sojeva kvasaca i tri bakterijska soja. Najveću osetljivost pokazali su kvasac *Yarrowia lipolytica* RO13 (MIC 0,50-1,00 mg/mL i MFC 1,5 mg/mL) i Gram-pozitivna bakterija *Listeria monocytogenes* 56Ly (MIC 1,00 mg/mL), pri čemu je metanolni ekstrakt biljnog materijala vrste *P. cordaeana* demonstrirao najjaču aktivnost u odnosu na sve testirane sojeve. Visok nivo antimikrobne aktivnosti ekstrakata pripisuje se prisustvu seskviterpena. Glavni sastojci metanolnog ekstrakta, među četrdeset i osam identifikovanih komponenata, su β -felandren (15%) i β -kariofilen (11%). U etanolnom ekstraktu, od četrdeset i sedam sekundarnih metabolita, pored karakterističnih (β -felandren (14%) i β -kariofilen (8%)), dominirali su 2-metil-1-butanol (8%) i neoizolongifolen (6%). U etil-acetatnom ekstraktu, najzastupljeniji su bili undekan, sirćetna kiselina, limonen, neoizolongifolen, uz β -felandren (12%) i β -kariofilen (8%) (slika 2.5.3.) (Bukvički et al., 2012). Prethodna istraživanja su pokazala da β -kariofilen ima antibakterijska svojstva u odnosu na sojeve *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, a potvrđen je i antifungalni efekat u odnosu na vrstu kvasca *C. albicans* (Goren et al., 2011), dok β -elemen (slika 2.5.3.) ima dokazanu antitumorsku aktivnost u slučaju karcinoma jajnika i pluća (Li et al., 2005; Wang et al., 2005). Sve navedeno čini istraživanje ove biljne vrste izuzetno značajnim.

Tri nova pingvizanska seskviterpena, porelapingvizanolid, porelapingvizenon i spiropingvizanin, su uz već poznate metabolita pingvizanin, norpingvizon-metil-estar, striatenon, skvalen i diterpen sakulatanskog tipa, perotecianal A, izolovani iz ekstrakta biljnog materijala *P. cordaeana* sa teritorije Oregon, SAD. Seskviterpeni ovog uzorka bili su praćeni i prisustvom monoterpena: α -tujen, α - i β -pinen, kamfen, β -sabinen, mircen i γ -terpinen (Toyota et al., 1989b).

Dietil-etarski ekstrakt vrste biljnog materijala *P. cordaeana* evropskog porekla od pingvizanskih seskviterpena sadržao je pingvizanin i izopingvizanolid, uz γ -malien (Asakawa et al., 2018). Harrigan i saradnici su iz vrste *P. cordaeana* izolovali dva nova jedinjenja, 7-ketoizodrimenin i 7-ketoizodimenin-5-en, kao i već poznate komponente drimenin i aristolon. Ova jedinjenja su pokazala sposobnost inhibicije oštećenja DNK kod mutiranih sojeva kvasca *S. cerevisiae* (slika 4.1.17.) (Harrigan et al., 1993).

Još četiri nova pingvizanska jedinjenja porelaacetali A-D (slika 2.5.3.), zajedno sa fitolom i stigmasterolom (slika 2.5.4.), izolovana su iz dietil-etarskog ekstrakta biljnog materijala vrste *P. cordaeana*, u uzorcima sakupljenim na jugu Turske. Njihova citotoksičnost je ispitivana u odnosu na ćelijske linije raka dojke kod ljudi (MCF-7), kao i ćelijske linije humanog kolorektalnog karcinoma (HT-29). Međutim, nijedno od testiranih jedinjenja nije pokazalo značajnu antiproliferativnu aktivnost (IC_{50} 16,3 do >20 $\mu\text{g/mL}$ i IC_{50} 7,4 do >20 $\mu\text{g/mL}$, HT29 i MCF-7 redom) (Tan et al., 2017). Dietil-etarski ekstrakti vrsta *P. cordaeana* i *P. platyphylla* u dozama od 100 mg/kg pokazali su značajnu antinociceptivnu aktivnost u modelu nocicepcije kod miševa indukovane *p*-benzohinonom, sa supresivnim učinkom od 28% i 31% na grčenja abdomena. Takođe, ovi ekstrakti su pokazali antiinflamatorni efekat u slučaju edema šape kod miševa indukovan karagenanom pri oralnoj administraciji doza od 100 mg/kg, uz odsustvo gastričnih oštećenja, što potvrđuje bezbednost testiranih koncentracija (Tosun et al., 2013). Sirovi ekstrakt *P. platyphylla* ispoljio je i antimikrobnu aktivnost u odnosu na Gram-pozitivne bakterije (Pavletić i Stilinović, 1963).

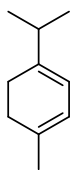




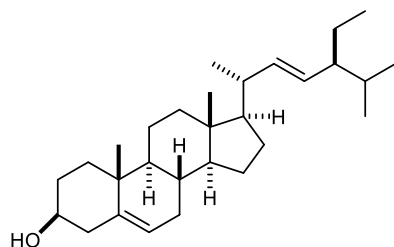
Slika 2.5.3. Odabrani sekundarni metaboliti vrste *P. cordaeana*

Iz dietil-etarskog ekstrakta francuskih uzoraka vrste *P. platyphylla* je, nakon hromatografije na silika gelu i pomoću preparativne tankoslojne hromatografije, izolovano tri nova pingvizanska seskviterpena: pingvizanin, pingvizanolid i β -pingvizendiol, zajedno sa poznatim deoksopingvizonom (Asakawa et al., 1979d). Analizom dietil-etarskog ekstrakta švajcarskih uzoraka vrste *P. platyphylla*, identifikovani su pingvizanin, perotetianal B, stigmasterol i *trans*-fitol, uz reviziju strukture prethodno izolovanog perotecianala B u 15-hidroksiperotecianal (slika 2.5.4.) (Nagashima et al., 1996a). Dietil-etarski ekstrakti turskih uzoraka iste vrste jetrenjače sadržali su pingvizanin, izopingvizanolid, neidentifikovane pingvizanske seskviterpene, afrikan švarcijanin A, kao i dva diterpenska dialdehida sakulatanskog tipa: perotecianal i perotecianal B (poznat kao 15-hidroksiperotecianal) (Asakawa et al., 2018).

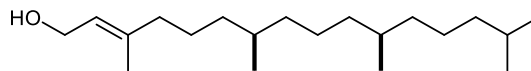
Iz metanolnog ekstrakta vrste *P. platyphylla*, prikupljene sa krečnjačkog područja Engleske, izolovan je novi pingvizanski seskviterpen metil-2 α -hidroksi-6-okso-11-pingvizanoat, kao i novi sakulatanski derivat (5*S*,9*S*,10*R*,13*S*)-11,13-epoksi-8(12),17-sakulatadien-13 β ,15 ξ -diol [(13*S*)-15 ξ -hidroksisakulaporelin], uz već poznata jedinjenja pingvizanin, β -pingvizendiol, porelapingvizanolid i perotecianal B (slika 2.5.4.) (Buchanan et al., 1996). Flavoni saponarin, izoviteksin i apigenin-6,8-di-*C*-glukozid izolovani su iz metanolnog ekstrakta vrste *P. platyphylla* nakon gel filtracije na Sephadexu G25 i razdvajanja flavonske frakcije na koloni Sephadex-LH20 (Nilsson, 1973). Širi uvid u sekundarni metabolički profil isparljivih konstituenata prethodno analiziranih ekstrakata vrste *P. platyphylla* prikazan je unutar Rezultata i diskusije 4.2.1., gde je analizirano etarsko ulje ove vrste poreklom iz uzoraka sakupljenih širom Evrope. Do sada je samo jednom analizirano etarsko ulje vrste *P. platyphylla*, što je detaljno objašnjeno u istom delu.



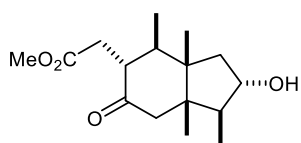
α -terpinen



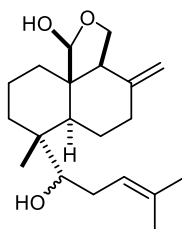
stigmasterol



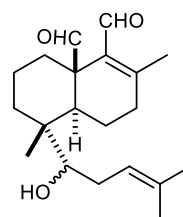
trans-fitol



metil-2 α -hidroksi-6-
okso-11-pingvinoat



(5*S*,9*S*,10*R*,13*S*)-11,13-epoksi-8(12),17-
sakulatadien-13 β ,15 ζ -diol
[(13*S*)-15 ζ -hidroksisakulaporelin]



perotetanal B

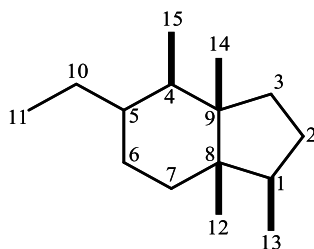
Slika 2.5.4. Odabrani sekundarni metaboliti vrste *P. platyphylla*

2.6. PINGVIZANSKI SESKVITERPENI

Pingvizanski tip seskviterpena karakteriše jedinstveni *cis*-1,2,6,7-tetrametilbiciklo-[4.3.0]nonanski skelet, koji sadrži dva susedna stereogena atoma ugljenika i četiri *cis*-metil-grupe (slika 2.6.1.). Ova jedinjenja specifična su isključivo za jetrenjače. Do sada je poznato preko 70 pingvizana, pretežno među vrstama iz reda *Jungermanniales*, dok se u manjem broju nalaze kod pripadnika porodice *Aneuraceae* (red *Metzgeriales*) (Asakawa, 1995a). Raznolikost njihove strukture se ogleda u prisustvu različitih funkcionalnih grupa, kao što su alkoholne, estarske, etarske, keto, dienske, aldehidne, odnosno spiro struktura i drugih, unutar njihovog skeleta. Hemijska varijabilnost u strukturi pingvizana i prisustvo u određenim taksonima ukazuje na njihov nedvosmislen značaj u rešavanju taksonomskih problema, hemosistematici i njihovom evolutivnom značaju. Još jednu specifičnost predstavlja biosinteza pingvizana koja, naizgled, odstupa od izoprenskog pravila. Širok spektar bioloških aktivnosti pingvizana, uključujući citotoksičnost, antimikrobnu, imunomodulatornu i antioksidativnu aktivnost, doveo je do razvoja različitih sintetičkih postupaka za njihovo dobijanje.

2.6.1. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE PINGVIZANA

Dobar izvor seskviterpena pingvizanskog skeleta predstavljaju familije *Lejeuneaceae*, *Lepidolaenaceae*, *Lepidoziaceae*, *Plagochilaceae*, *Porellaceae* i *Ptilidiaceae*, jetrenjače iz reda *Jungermanniales*, kao i familija *Aneuraceae*, red *Metzgeriales* (Gauvin-Bialecki et al., 2010). Prvo jedinjenje ove klase izolovali su Benešová i saradnici 1969. godine iz vrste *Aneura pinguis* (L.) Dumort. Nakon opsežnih ¹H-NMR eksperimenata, deкупlovanja i reakcija derivatizacije, utvrdili su da se radi o furanoseskviterpenskom jedinjenju, nazvanom **pingvizon** (tabela 2.6.1.) (Benešová et al., 1969a). Od tada, zbog labilnosti i termalne nestabilnosti ovih jedinjenja, zajedno sa malim količinama etarskih ulja i kompleksnim sastavom ekstrakata, koriste se povezane hromatografske tehnike (CC, TLC i HPLC, ili TLC, VLC i GLC) primenjene u procesu prečišćavanja sastojaka.

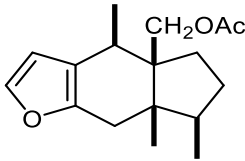
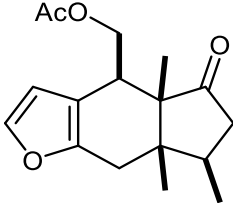
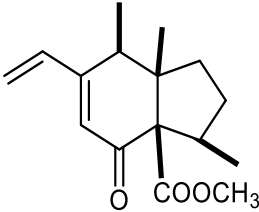
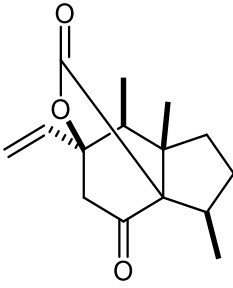
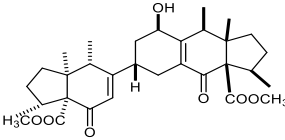
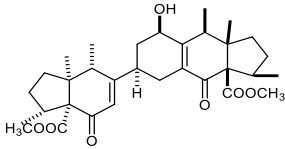
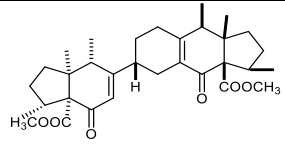


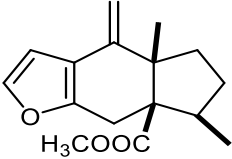
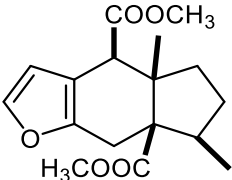
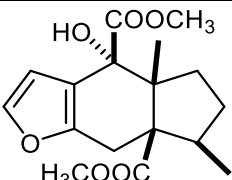
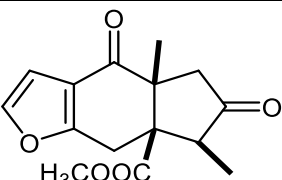
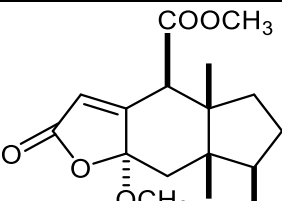
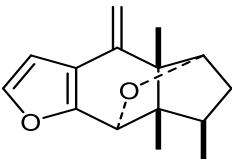
Slika 2.6.1. Pingvizanski skelet (3-etil-1,2,6,7-tetrametilbiciklo[4.3.0]nonan) sa numeracijom ugljenikovih atoma

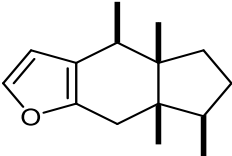
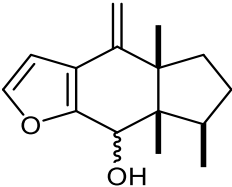
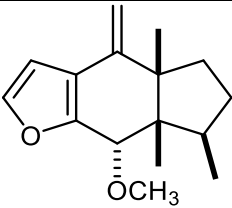
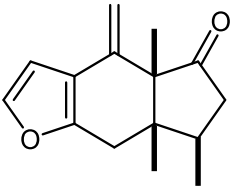
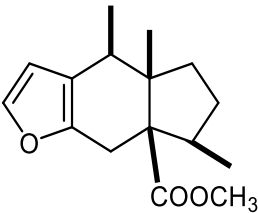
Drugi po redu pingvizan, izolovan iz vrste *Ptilidium ciliare* (L.) Hampe., predstavlja deoksigenovano jedinjenje pod nazivom **deoksopingvizon**. Njegova struktura određena je putem reduktivne transformacije i poređenja sa IR i ^1H NMR spektrima poznatog pingvizona (Krutov et al., 1973). Nakon prve detekcije putem GC/MS analize u vrsti *Wettsteinia schusteriana* Grole, deoksopingvizon je identifikovan i u više vrsta roda *Lejeunea* Lib. (Asakawa et al., 1980a; 1980b; Gradstein et al., 1981), kao i u različitim vrstama iz roda *Porella* L., a iz dihlormetanskog ekstrakta jetrenjače *Porella vernicosa* Lindb. je izolovan (Asakawa et al., 1976a; 1976b; 1978; 1979a; 1979b; 1979c; 1979d; 1980d; Cullmann i Becker, 1999b; Ono et al., 1996). Takođe, ovaj seskviterpen je izolovan iz dietil-etarskog ekstrakta vrsta *Trichocolepsis sacculata* (Mitt.) S. Okamura, *Ptilidium ciliare* (Asakawa et al., 1981a; Krutov et al., 1973), *Dicranolejeunea yoshinagana* (S.Hatt.) Mizut., *Trocholejeunea sandvicensis* Mizut., (Asakawa et al., 1977; 1979d; 1980c) i *Plagiochila alternans* Lindenb. & Gottsche, kao i iz acetonskog ekstrakta jetrenjače *Ptychanthus striatus* (Lehm. & Lindenb.), čime se svrstava među najčešće izolovane pingvizanske seskviterpene (Asakawa et al., 1980b; Nagashima et al., 1991; 1999; Takeda et al., 1981; Toyota et al., 1995).

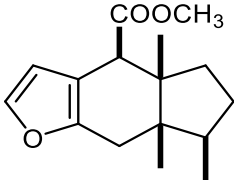
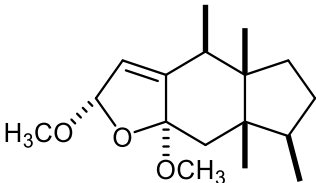
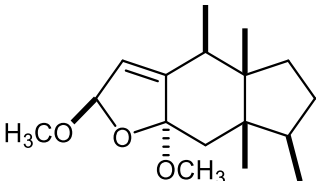
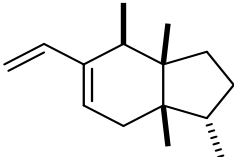
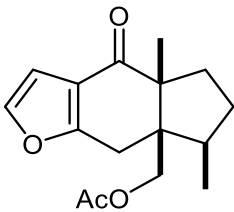
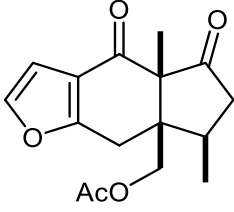
Derivati deoksopingvizona, uključujući **9-formildeoksopingvizon** i **14-acetoksideoksopingvizon**, izolovani su iz dietil-etarskog ekstrakta jetrenjače *D. yoshinagana*. Njihove strukture su potvrđene putem ^1H i ^{13}C NMR, IR analize, i redukcije pomoću LiAlH_4 , pri čemu se dobija primarni alkohol (Toyota et al., 1995). Nakon hromatografije i HPLC analize dihlormetanskog ekstrakta *Porella canariensis* (F.Weber) Underw., poreklom sa Madeire, izolovana su dva nova sekundarna metabolita: **metil-estar deoksopingvizon-15-ske kiseline** i **metil-estar deoksopingvizon-12-ske kiseline** (Cullmann i Becker, 1999b). Upoređivanjem spektroskopskih podataka poznatog pingvizona sa podacima za novo jedinjenje kao i na osnovu

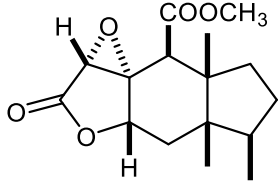
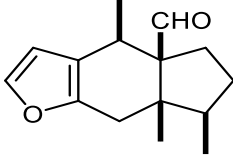
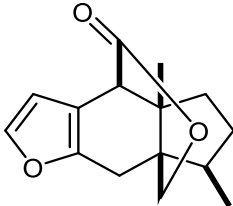
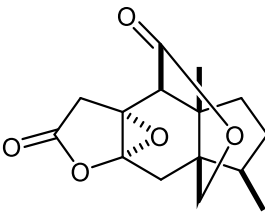
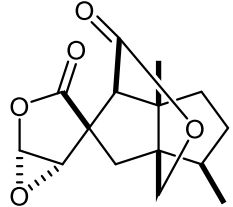
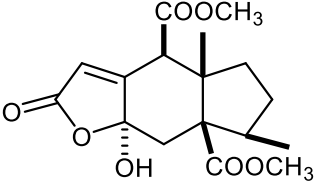
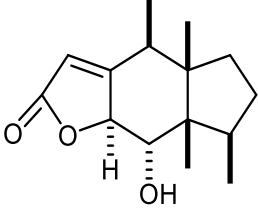
Tabela 2.6.1. Strukture seskviterpena pingvizanskog tipa sa odabranim vrstama Hepaticae iz kojih su izolovani

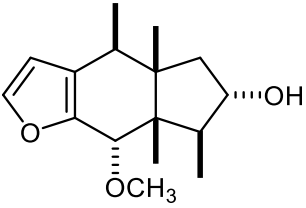
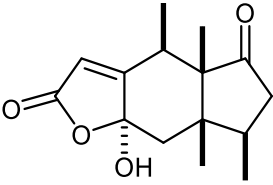
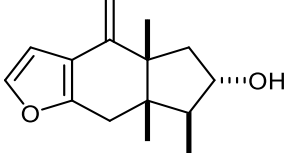
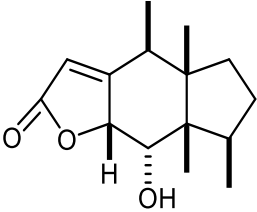
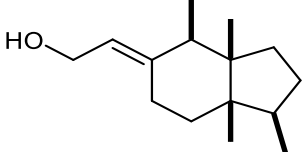
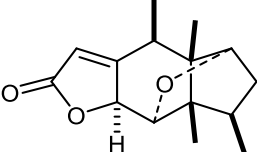
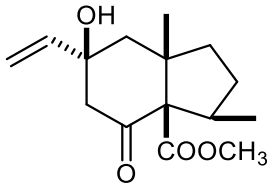
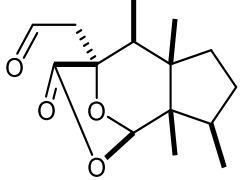
	14-acetoksideoxpingvizon	<i>Dicranolejeunea yoshinagana</i> (Hatt.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Toyota et al., 1995
	15-acetoksipingvizon	<i>Cryptothallus mirabilis</i> Malmb. (Aneuraceae)	Rycroft i Cole, 1998
	akutifolon A	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> . (Steph.) Hatt. (Porellaceae)	Hashimoto et al., 1998a; 2000
	akutifolon B	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> . (Steph.) Hatt. (Porellaceae)	Hashimoto et al., 1998a; 2000
	bisakutifolon A	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> . (Steph.) Hatt. (Porellaceae)	Hashimoto et al., 1998a; 2000
	bisakutifolon B	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> . (Steph.) Hatt. (Porellaceae)	Hashimoto et al., 1998a; 2000
	bisakutifolon C	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> . (Steph.) Hatt. (Porellaceae)	Hashimoto et al., 2000
	briopterin A	<i>Bryopteris filicina</i> (Sw.) Ness (Lejeuneaceae)	Nagashima et al., 1994b

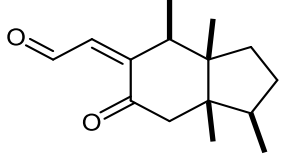
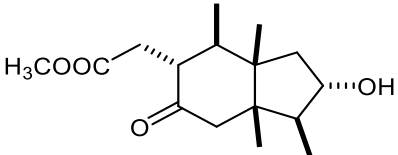
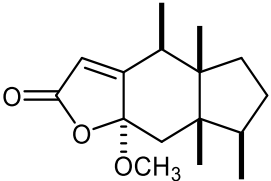
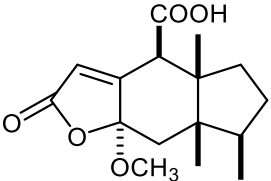
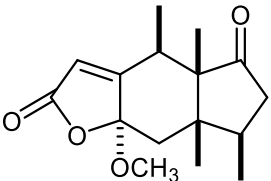
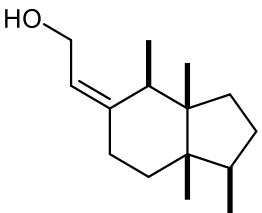
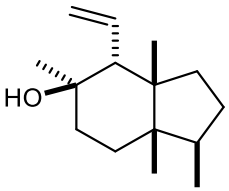
		<i>Porella viridissima</i> (Mitt.) Grolle (Porellaceae)	Métayer et al., 2019
	briopterin B	<i>Bryopteris filicina</i> (Sw.) Ness (Lejeuneaceae)	Nagashima et al., 1994b
		<i>Porella grandiloba</i> Lindb. (Porellaceae)	Tazaki et al., 1998
	briopterin C	<i>Bryopteris filicina</i> (Sw.) Ness (Lejeuneaceae)	Nagashima et al., 1994b
	briopterin D	<i>Bryopteris filicina</i> (Sw.) Ness (Lejeuneaceae)	Nagashima et al., 1994b
	4β-karbometoksi-6α- metoksipingviz-6,11-olid	<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Underw. (Porellaceae) (Artefakt)	Nagashima et al., 1996b
	dehidropingvizanin	<i>Trocholejeunea</i> <i>sanvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1980b
		<i>Dicranolejeunea</i> <i>yoshinagana</i> (Hatt.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Toyota et al., 1995
		<i>Ptychantus striatus</i> (Lehm. et Lindenb.) Nees (Lejeuneaceae)	Takeda et al., 1981

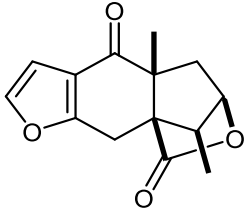
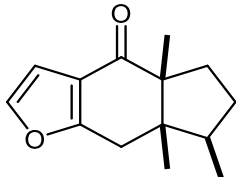
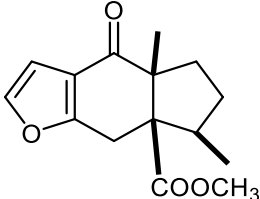
	deoksopingvizon	<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1980b
		<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullman i Becker, 1999b
		<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff (Porellaceae)	Asakawa et al., 1979d
		<i>Porella vernicosa</i> Lindb. (Porellaceae)	Ono et al., 1996
		<i>Plagiochila alterans</i> Lindbg. and Gott. (Plagiocilaceae)	Nagashima et al., 1991
		<i>Ptilidium ciliare</i> (L.) Hampe. (Ptilidiaceae)	Nagashima et al., 1999
		<i>Trichocoleopsis sacculata</i> (Mitt.) S. Okamura (Ptilidiaceae)	Asakawa et al., 1981b
	dehidropingvizenol	<i>Trocholejeunea sanvicensis</i> (Gott.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1980b
		<i>Trocholejeunea sanvicensis</i> (Gott.) Mizut (Lejeuneaceae)	Lahlou et al., 2000
	dehidropingvizenol metil-etar	<i>Trocholejeunea sanvicensis</i> (Gott.) Mizut (Lejeuneaceae) (Artefakt)	Tori et al., 1993
	dehidropingvizon	<i>Plagiochilla retrospectans</i> (Ness) Ness (Plagiocilaceae)	Nagashima et al., 1994a
	metil-estar deoksopingvizon-12-ske kiseline	<i>Porella canarensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullmann i Becker, 1999b

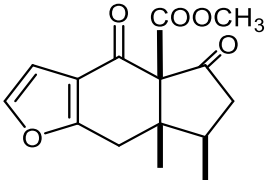
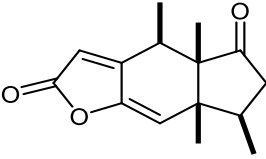
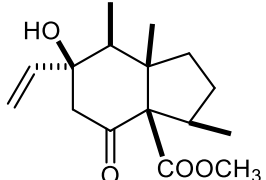
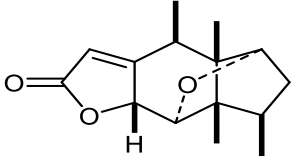
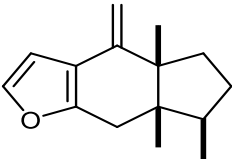
	metil-estar deoksopingvizon-15-ske (deoksopingvizon metil- estar)	<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullmann i Becker, 1999b
		<i>Porella vernicosa</i> Lindb (Porellaceae)	Ono et al., 1996
	6α,11α-dimetoksipingviz- 5(10)-en	<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae) (Artefakt)	Tori et al., 1993
	6α,11β-dimetoksipingviz- 5(10)-en	<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae) (Artefakt)	Tori et al., 1993
	1-epi-α-pingvizen	<i>Drepanolejeunea madagascariensis</i> (Steph.) (Lejeuneaceae)	Gauvin- Bialecki et al., 2010
	6,11-epoksi-15-nor-4-okso- 5,10-pingvizadien-12-il acetat	<i>Porella recurva</i> (Taylor) Kuhnem. (Porellaceae)	Van Klink et al., 2002
	6,11-epoksi-15-nor-3,4- diokso-5,10-pingvizadien- 12-il acetat	<i>Porella recurva</i> (Taylor) Kuhnem. (Porellaceae)	Van Klink et al., 2002

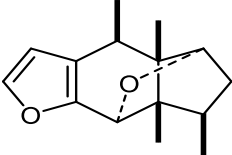
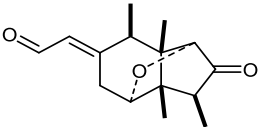
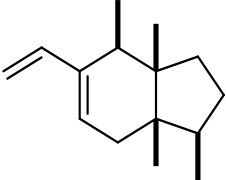
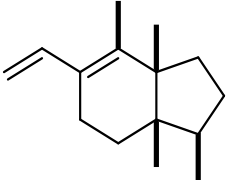
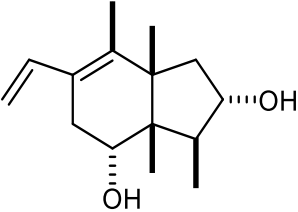
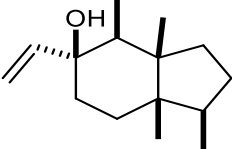
	metil-estar 5 α ,10 α -epoksi- pingvizan-11,6-olid-15-ske kiseline	<i>Porella navicularis</i> (Lehm. et Lindb.) Lindb. (Porellaceae)	Bungert et al., 1998
	9-formildeoksopingvizon	<i>Dicranolejeunea</i> <i>yoshinagana</i> (Hatt.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Toyota et al., 1995
	grandilobalid A	<i>Porella grandiloba</i> Lindb. (Porellaceae)	Tazaki et al., 1998
	grandilobalid B	<i>Porella grandiloba</i> Lindb. (Porellaceae)	Tazaki et al., 1998
	grandilobalid C	<i>Porella grandiloba</i> Lindb. (Porellaceae)	Tazaki et al., 1998
	6 α -hidroksi-4,8- dimetoksikarbonilpingviz- 11,6-olid	<i>Porella grandiloba</i> Lindb. (Porellaceae)	Tazaki et al., 1998
	hidroksipingvizanolid	<i>Brachiolejeunea</i> <i>chinantlana</i> (Lejeuneaceae)	Gradstein et al., 1981

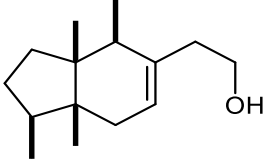
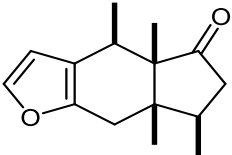
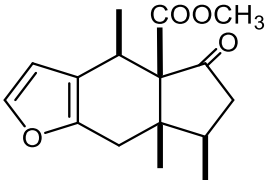
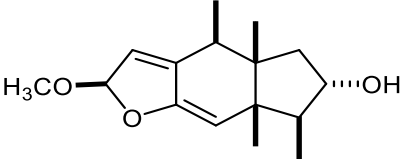
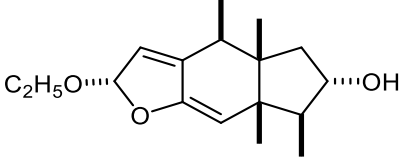
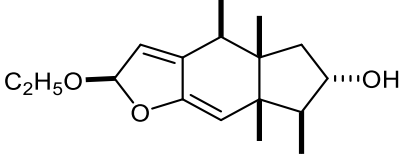
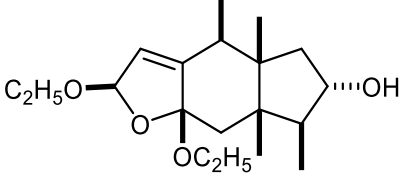
	2-hidroksi-7-metoksideoksopingvizon	<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff. (Porellaceae)	Connolly, 1990
	6α-hidroksi-3-okso-pingviz-5(10)-en-11,6-olid	Aksenska kultura <i>Aneura pinquis</i> (L.) Dumort. (Aneuraceae)	Tazaki et al., 1996
	2-hidroksipingvizanen	<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff. (Porellaceae)	Connolly, 1990
	hidroksipingvizanolid	<i>Brachiolejeunea chinantlana</i> (Lejeuneaceae)	Gradstein et al., 1981
	izonavikulol	<i>Frullanoides densifolia</i> Radii (Lejeuneaceae)	Tori et al., 1993
	izopingvizanolid	<i>Ptilidium pulcherrimum</i> (Weber) Hampe (Ptilidiaceae)	Asakawa et al., 1981a
	7-keto-8-karbometoksipingvizenol	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> (Porellaceae)	Toyota et al., 1991
		<i>Porella canarensis</i> (F. Weber) Bryhn (Porellaceae)	Cullman i Becker, 1999b
	lejeunapingvizanolid	<i>Trocholejeunea scandvicensis</i> (Gott.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Lahlou et al., 2000

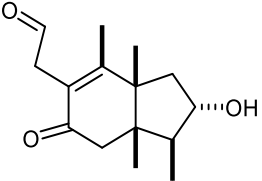
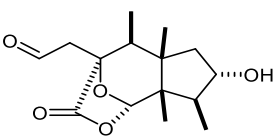
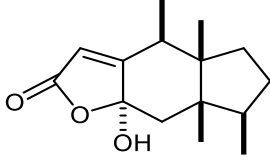
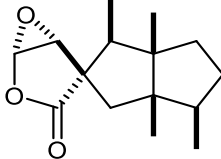
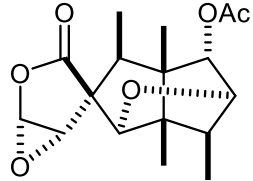
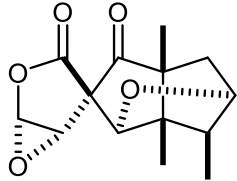
	lejeunapingvizenon	<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> (Gott.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Lahlou et al., 2000
	metil-2α-hidroksi-6-okso-11-pingvizanoat	<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff. (Porellaceae)	Buchanan et al., 1996
	6α-metoksipingviz-5(10)-en-11,6-olid	<i>Porella navicularis</i> (Lehm. et Lindenb.) Lindb. (Porellaceae)	Bungert et al., 1998
	6α-metoksipingviz-5(10)-en-11,6-olid-15-ska kiselina	<i>Porella navicularis</i> (Lehm. et Lindenb.) Lindb. (Porellaceae)	Bungert et al., 1998
	6α-metoksi-3-okso-pingviz-5(10)-en-11,6-olid	Aksenska kultura <i>Aneura pinquis</i> (L.) Dumort. (Aneuraceae)	Tazaki et al., 1996
	navikulol	<i>Frullanoides densifolia</i> Radii (Lejeuneaceae)	Tori et al., 1993
		<i>Bazzania novae-zelandiae</i> (Mitt.) (Lepidozieaceae)	Nagashima et al., 2010
		<i>Porella navicularis</i> (Lehn. & Lindenb.) Pfeiff. (Porellaceae)	Bungert et al., 1998; Toyota et al., 1989a
	neopingvizenol	<i>Dicranolejeunea yoshinagana</i> (Hatt.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Toyota et al., 1995

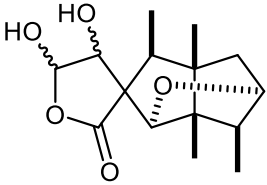
	norpingvizanolid	<i>Porella elegantula</i> (Mont.) E.A.Hodgs. (Porellaceae)	Fukuyama et al., 1988
	norpingvizon	<i>Porella elegantula</i> (Mont.) E.A.Hodgs. (Porellaceae)	Fukuyama et al., 1988
		<i>Porella navicularis</i> (Lehn. & Lindenb.) Pfeiff. (Porellaceae)	Toyota et al., 1989a
		<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullman i Becker, 1999b
		<i>Porella vernicosa</i> Lindb. (Porellaceae)	Ono et al., 1996
		<i>Porella chilensis</i> (Lehm. & Lindenb.) Trevis (Porellaceae)	Gilabert et al., 2011
		<i>Porella recurva</i> (Taylor) Kuhnem. (Porellaceae)	Van Klink et al., 2002
		<i>Porella densifolia</i> (Stephani) S. Hatt. (Porellaceae)	Qang i Asakawa, 2010
	norpingvizon metil-estar	<i>Bryopteris filicina</i> (Sw.) Ness (Lejeuneaceae)	Nagashima et al., 1994b
		<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullman i Becker, 1999b
		<i>Porella chilensis</i> (Lehm. & Lindenb.) Trevis. (Porellaceae)	Gilabert et al., 2011
		<i>Porella cordaeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Toyota et al., 1989b
		<i>Porella densifolia</i> (Stephani) S. Hatt. (Porellaceae)	Qang i Asakawa, 2010
		<i>Porella elegantula</i> (Mont.) E.A.Hodgs. (Porellaceae)	Fukuyama et al., 1988
		<i>Porella grandiloba</i> Lindb. (Porellaceae)	Tazaki et al., 1998
		<i>Porella navicularis</i> (Lehn. & Lindenb.) Pfeiff. (Porellaceae)	Toyota et al., 1989a

		<i>Porella navicularis</i> (Lehm. & Lindenb.) Pfeiff. (Porellaceae)	Bungert et al., 1998
		<i>Porella recurva</i> (Taylor) Kuhnem (Porellaceae)	Van Klink et al., 2002
		<i>Porella vernicosa</i> Lindb. (Porellaceae)	Ono et al., 1996
		<i>Porella viridissima</i> (Mitt.) Grolle	Métayer et al., 2019
	norpingvizonon metil-estar	<i>Aneura pinguis</i> (L.) Dumort. (Aneuraceae)	Asakawa, 1982a
	3-okso-pingviz-5(10),6-dien-11,6-olid	<i>Aneura pinquis</i> (L.) Dumort. (Aneuraceae)	Tazaki et al., 1996
	7-oksopingvizenol-12-metil-estar (metil-estar 7-ketopingvizenol-12-ske kiseline; 7-keto-8-karbometoksipingvizenol)	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i> (Steph.) Hatt. (Porellaceae)	Hashimoto et al., 2000; Toyota et al., 1991
		<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullmann i Becker, 1999b
		<i>Porella perrottetiana</i> (Mont.) Trevis. (Porellaceae)	Komala et al., 2011
	pingvizanolid	<i>Ptilidium pulcherrimum</i> (Weber) Hampe (Ptilidiaceae)	Asakawa et al., 1981a
		<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff. (Porellaceae)	Asakawa et al., 1979d
		<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1980b
	pingvizanen (dehidrodeoksipingvizon)	<i>Ptychantus striatus</i> (Lehm. et Lindenb.) Nees (Lejeuneaceae)	Takeda et al., 1981

	pingvizanin	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Toyota et al., 1989a
		<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff (Porellaceae)	Asakawa et al., 1979d; Clarke et al., 2006; Nagashima et al., 1996a
		<i>Ptilidium ciliare</i> (L.) Hampe (Ptilidiaceae)	Nagashima et al., 1999
		<i>Ptilidium pulcherrimum</i> (Weber) Hampe (Ptilidiaceae)	Asakawa et al., 1981a
		<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1980b
	pingvizenal	<i>Ptilidium pulcherrimum</i> (Weber) Hampe (Ptilidiaceae)	Asakawa et al., 1981a
		<i>Trocholejeunea sanvicensis</i> Mizut. (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1980b
	α -pingvizen	<i>Porella canariensis</i> (F. Web.) Bryhn (Porellaceae)	Cullman i Becker, 1999b
		<i>Porella viridissima</i> (Mitt.) Grolle (Porellaceae)	Métayer et al., 2019
	β -pingvizen	<i>Porella viridissima</i> (Mitt.) Grolle (Porellaceae)	Métayer et al., 2019
	β -pingvizendiol	<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff. (Porellaceae)	Asakawa et al., 1979d; Cullmann i Becker, 1999b
	α -pingvizenol	<i>Porella canariensis</i> (F. Weber) Underw. (Porellaceae)	Cullmann i Becker, 1999b
		<i>Porella chilensis</i> (Lehm. & Lindenb.) Trevis. (Porellaceae)	Gilabert et al., 2011

		<i>Porella vernicosa</i> Lindb. (Porellaceae)	Ono et al., 1996
		<i>Porella viridissima</i> (Mitt.) Grolle	Métayer et al., 2019
		<i>Bazzania novae-zelandiae</i> (Mitt.) (Lepidoziaceae)	Nagashima et al., 2010
	5-pingvizen-11-ol	<i>Porella navicularis</i> (Lehm. et Lindenb.) Lindb. (Porellaceae)	Bungert et al., 1998
	pingvizon	<i>Trichocoleopsis sacculata</i> (Mitt.) S. Okamura (Lejeuneaceae)	Asakawa et al., 1981b
		<i>Aneura pinguis</i> (L.) Dumort. (Aneuraceae)	Tazaki et al., 1996
	pingvizon metil-estar	<i>Aneura pinguis</i> (L.) Dumort. (Aneuraceae)	Asakawa, 1982a
	porelaacetal A	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Tan et al., 2017
	porelaacetal B	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Tan et al., 2017
	porelaacetal C	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Tan et al., 2017
	porelaacetal D	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Tan et al., 2017

	porelapingvizenon	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Toyota et al., 1989b
	porelapingvizanolid	<i>Porella coradeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Toyota et al., 1989b
		<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff. (Porellaceae)	Buchanan et al., 1996
	ptihanolakton	<i>Ptychanthus striatus</i> (Lehm. et Lindenb.) Nees (Lejeuneaceae)	Hashimoto et al., 1994
		<i>Bryopteris filicina</i> (Sw.) Nees (Lejeuneaceae)	Nagashima et al., 2003c
	ptihanolid	<i>Frullanoides densifolia</i> Radii (Lejeuneaceae)	Tori et al., 1993
		<i>Porella canarensis</i> (F. Weber) Bryhn. (Porellaceae)	Cullmann i Becker, 1999b
		<i>Dicranolejeunea yoshinagana</i> (Hatt.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Toyota et al., 1995
		<i>Trocholejeunea sandvicensis</i> (Gott.) Mizut. (Lejeuneaceae)	Tori et al., 1993
		<i>Ptychantus striatus</i> (Lehm. et Lindenb.) Nees (Lejeuneaceae)	Takeda et al., 1981; 1983
	spirodensifolin A	<i>Frullanoides densifolia</i> Radii (Lejeuneaceae)	Tori et al., 1993
	spirodensifolin B	<i>Frullanoides densifolia</i> Radii (Lejeuneaceae)	Tori et al., 1992; 1993

	spiropingvizanin	<i>Porella cordaeana</i> (Huebener) Moore (Porellaceae)	Toyota et al., 1989b
---	------------------	---	-------------------------

dobijenih NOE podataka, identifikovan je novi funkcionalizovani seskviterpen sa deoksopingvizanskim skeletom, **15-acetoksipingvizon**, u CDCl_3 ekstraktu jetrenjače *Cryptothallus mirabilis* Malmb. (Rycroft i Cole, 1998).

Asakawa je 1976. godine tokom analize tada nepoznatog pingvizenola prvi put pomenuo jedinjenja za koja se kasnije ispostavilo da su **α -pingvizen** i **β -pingvizen**, istražujući dve vrste roda *Porella*, *P. vernicosa* i *P. densifolia* (Asakawa, 1976a). Jedinjenje **α -pingvizenol**, poznato i kao pingvizenol, izolovano je iz dva od šest članova kompleksa *P. vernicosa* (*P. macroloba* i *P. gracillima*) (Asakawa, 1978), kao i iz CH_2Cl_2 ekstrakta *P. canariensis* i Et_2O ekstrakta vrsta *P. chilensis*, *P. vernicosa*, i *Bazzania novae-zelandiae*. Isto jedinjenje je detektovano i u biljnom materijalu jetrenjače *P. viridissima* (Cullmann i Becker, 1999b; Gilabert et al., 2011; Métoyer et al., 2019; Nagashima et al., 2010; Ono et al., 1996). Jedinjenje α -pingvizenol se smatra prekursorom mnogih drugih pingvizanskih jedinjenja, uključujući **α -pingvizen**, **β -pingvizen**, **deoksopingvizon**, **deoksopingvizon-metil-estar**, **norpingvizon** i **norpingvizon-metil-estar**. Dehidratacioni proizvod pingvizenola, **α -pingvizen**, je prvi put izolovan iz jetrenjače *Drepanolejeunea madagascariensis* (Steph.), prikupljene sa ostrva Reunion u Indijskom okeanu (Gauvin-Bialecki, 2010). Nakon toga, α -pingvizen je izolovan iz Et_2O i CH_2Cl_2 ekstrakta dve vrste roda *Porella*, *P. elegantula* i *P. canariensis*, dok je u biljnom materijalu vrste *P. viridissima* samo detektovan (Cullmann i Becker, 1999b; Métoyer et al., 2019). **β -Pingvizen**, koji se razlikuje od α -pingvizena po dvostrukoj vezi između C-5 i C-4 umesto između C-5 i C-6, detektovan je u vrsti *P. viridissima* (Métoyer et al., 2019). **Pingvizanen**, jedinjenje sa dvostrukom vezom između C-4 i C-15, u odnosu na deoksopingvizon, izolovano je iz acetonskog ekstrakta jetrenjače *Ptychantus striatus* (Takeda et al., 1981). **1-Epi- α -pingvizen**, koji se razlikuje od α -pingvizena samo u orijentaciji C-13 metil-grupe, detektovan je u uzorcima *Drepanolejeunea madagascariensis*, *Porella obtusata* i *Ptilidium ciliare* (Gauvin-Bialecki, 2010; Joulain i Köning, 1998). **Pingvizenal**, pingvizanski seskviterpen sa ciklopentanonskim prstenom, etarskom vezom između C-3 i C-7, i aldehidnom grupom na C-11, izolovan je iz dietil-etarskog ekstrakta jetrenjače *Trocholejeuna*

sandvicensis iz Japana i uzoraka vrste *Ptilidium pulcherrimum* francuskog porekla (Asakawa et al., 1980b; 1981a). **Metil-2 α -hidroksi-6-okso-11-pingvizanoat** je derivat pingvizanske kiseline izolovan iz metanolnog ekstrakta *P. platyphylla*, kao novi prirodni proizvod (Buchanan et al., 1996).

Nakon prvog izolovanja **β -pingvizendiola** 1979. godine, postignutog frakcionacijom Et₂O ekstrakta vrste *P. platyphylla* od strane Asakawa-e i njegovih saradnika (Asakawa et al., 1979d), usledilo je njegovo ponovno izolovanje iz MeOH ekstrakta iste biljne vrste (Buchanan et al., 1996). Struktura **navikulola**, bicikličnog seskviterpenskog alkohola sa primarnom alilnom hidroksilnom grupom, potvrđena je analizom HRMS, IR, ¹H i ¹³C NMR spektara, kao i hemijskom transformacijom do monoacetata, nakon njegovog izolovanja iz MeOH ekstrakta *P. navicularis*. Isti seskviterpen prisutan je i u Et₂O ekstraktima vrsti *P. navicularis* i *B. novae-zelandiae* (Bungert et al., 1998; Nagashima et al., 2010; Toyota et al., 1989a), dok su navikulol i njegov (*E*)-geometrijski izomer, **izonavikulol**, izolovani iz Et₂O ekstrakta bolivijskih uzoraka jetrenjače *Frullanoides densifolia* (Tori et al., 1993). **Hidroksiizopingvizanolid** i **hidroksipingvizanolid** detektovani su u Et₂O ekstraktu kolumbijske jetrenjače *Brachiolejeunea chinantlana*, podrod *Plicolejeunea* (Gradstein et al., 1981). Nestabilni seskviterpenski alkohol pingvizanskog tipa, **2-hidroksipingvizanen**, koji se u CDCl₃ u NMR kiveti lako transformiše u izopingvizanin, kao i odgovarajući metil-etar, **2-hidroksi-7-metoksideoksopingvizon**, izolovani su iz *P. platyphylla* (Connolly, 1990). Alkohol neopingvizanskog tipa, **neopingvizanol**, sa preuređenim pingvizanskim skeletom, izolovan je kao novo jedinjenje iz Et₂O ekstrakta vrste *Dicranolejeunea yoshinagana* (Toyota et al., 1995). Takođe, **5-pingvizen-11-ol** izolovan je iz Et₂O ekstrakta *P. navicularis* što ukazuje na moguću varijabilnost položaja hidroksilne grupe u ovoj vrsti skeleta (Bungert et al., 1998).

Daljim istraživanjem sastojaka jetrenjača dobijen je pingvizanin, jedinjenje nestabilno na vazduhu i u blago kiselim uslovima, koje se razlikuje od deoksopingvizona samo po prisustvu etarskog kiseonika. **Pingvizanin** je do sada izolovan iz dve vrste roda *Porella*: *P. platyphylla* (uzorci sakupljeni u Francuskoj, Engleskoj i Švajcarskoj) i *P. cordaeana* (uzorci sakupljeni u Americi). Takođe, pingvizanin je izolovan i iz Et₂O ekstrakata dve vrste roda *Ptilidium*: *P. ciliare* i *P. pulcherrimum* (Asakawa et al., 1979d; 1980b; 1981a; Buchanan et al., 1996; Nagashima et al., 1999; Toyota et al., 1989b). Oksidacija pingvizanskog jezgra u položaju 3 vodi do formiranja

dehidropingvizona, koji je izolovan iz Et₂O ekstrakta vrste *Plagiochilla retrospectans* (Nagashim et al., 1994a). **Dehidropingvizanin** je izolovan iz Et₂O ekstrakta jetrenjače *Trocholejeuna sandvicensis*, kao i **dehidropingvizenol** (Asakawa et al. 1980b; Lahlou et al., 2000).

Asakawa i njegovi saradnici su 1976. godine izvršili prvo izolovanje **norpingvizona** i **norpingvizon-metil-estra**, jedinjenja karakterističnih po intenzivnim retro-Diels-Alder-ovim fragmentnim jonom na *m/z* 108 i fragmentnim jonom na *m/z* 192, koji nastaju sukcesivnim β -cepanjem praćenim aromatizacijom, iz vrste *P. vernicosa* (Asakawa, 1976a). Kasnije, norpingvizon je izolovan iz sedam vrsta roda *Porella* upotrebom različitih rastvarača (Et₂O, CH₂Cl₂ i MeOH) za ekstrakciju (Cullman i Becker, 1999b; Fukuyama et al., 1988; Gilabert et al., 2011; Van Klink et al., 2002; Ono et al., 1996; Toyota et al., 1989; Qang i Asakawa, 2010). Sa druge strane, norpingvizon-metil-estar dobijen je iz ukupno 12 vrsta jetrenjača (Bungert et al., 1998; Cullman i Becker, 1999b; Fukuyama et al., 1988; Gilabert et al., 2011; Van Klink et al., 2002; Métoyer et al., 2019; Nagashima et al. 1994a; Ono i Sakakimoto, 1996; Tazaki et al., 1998; Toyota et al., 1989a; 1989b; Quang i Asakawa, 2010). Fukuyama i saradnici su 1988. godine revidirali strukturu norpingvizon-metil-estra, zaključivši da se metoksikarbonilna grupa nalazi na C-14, a tercijarna metil-grupa na C-12, umesto prethodno predložene asignacije. Dalja istraživanja roda *Porella* i *Aneura* rezultovala su identifikacijom **pingvizon-metil-estra** i **norpingvizon-metil-estra** uz norpingvizon i norpingvizonon (Asakawa, 1982b).

Prvo navođenje u literaturi **norpingvizanolida**, norseskviterpena pingvizanskog tipa sa γ -laktonskom jedinicom, zabeleženo je od strane Fukuyama-e i saradnika analizom Et₂O ekstrakta vrste *P. elegantula* (Fukuyama et al., 1988). Dva nova norseskviterpenoida pingvizanskog skeleta, sa acetatnom grupom na položaju 12, **6,11-epoksi-15-nor-3,4-diokso-5,10-pingvizadien-12-acetat** i **6,11-epoksi-15-nor-4-okso-5,10-pingvizadien-12-acetat**, izolovana su iz CH₂Cl₂ ekstrakta vrste *P. recurva* (Van Klink et al., 2002). Oksidacija pingvizanskog prstena nije retka što potvrđuje i 2-keto-norpingvizon-metil-estar, poznat kao **briopterin D**, izolovan iz Et₂O ekstrakta jetrenjače *Bryopteris filicina* (Sw.) Ness. poreklom iz Paname (Nagashima et al., 1994b). Pored briopterina D, iz iste vrste su izolovani pingvizanski metil-estri **briopterini A, B i C**, kao novi prirodni proizvodi. Keto estar pingvizanske strukture, **7-keto-8-karbometoksipingvizenol**, identifikovali su Toyota i saradnici 1991. godine (Toyota et al., 1991). **7-Oksopingvizenol-12-metil-estar**, oksigenisano jedinjenje pingvizanskog skeleta, izolovano je iz Et₂O ekstrakta

japanskih uzoraka jetrenjače *P. acutifolia* subsp. *tosana* (Perry et al., 1996). Reekstrahovani metanolni ekstrakti *P. perrottetiana* i CH_2Cl_2 ekstrakt jetrenjače *P. canariensis* sadržali su isto jedinjenje (Cullman i Becker, 1999b; Komala et al., 2011). Oksigenovani pingvizani, izonavikulol, **spirodensifolini A i B** izolovani su iz Et_2O ekstrakta vrste *F. densifolia* (Tori et al., 1992; 1993). Preuređeni skelet pingvizanskog tipa, spirodensifolin A, identifikovan je opsežnim ^1H i ^{13}C NMR eksperimentima uz upotrebu X-ray kristalografske analize, dok je struktura spirodensifolina B ustanovljena poređenjem NMR spektralnih podataka, sa spektralnim podacima spirodensifolina A, ukazujući na zamenu C-4 sekundarne metil-grupe i C-3 acetoksil-grupe egzometilenskom grupom i vodonikovim atomom (Tori et al., 1992).

Pingvizanski laktoni, **pingvizanolid** i **izopingvizanolid**, sa epoksidnim prstenom u strukturi, detektovani su u britanskim uzorcima vrsta *P. platyphylla* (Asakawa et al., 1979d), *T. sandvicensis* (Asakawa et al., 1980b), kao i u uzorcima jetrenjače *Ptilidium pulcherrimum* iz Evrope (Asakawa 1981a; Connolly, 1990). Još jedan spiropingvizan, **plihanolid**, koji sadrži epoksidni prsten u svojoj strukturi i razlikuje se u relativnoj konfiguraciji laktonskog prstena u poređenju sa pingvizanolidom, izolovan je iz pet različitih vrsta jetrenjača (Cullman i Becker, 1999b; Takeda et al., 1981; Tori et al., 1992; 1993; Toyota et al., 1995). Prisustvo **ptihanolaktona** potvrđeno je u dve jetrenjače, *Ptychanthus striatus* i *Bryopteris filicina* (Nagashima et al., 2003c). Spirolakton, **spiropingvizanin**, strukturno sličan ptihanolidu, sa dve acetoksil-grupe od kojih je jedna na hemiacetalnom ugljeniku, izolovan je iz CH_2Cl_2 ekstrakta vrste *P. cordaeana* (Toyota et al., 1989b).

Iz dietil-etarskog ekstrakta biljnog materijala japanske jetrenjače *Porella grandiloba* izolovana su tri grandilobalida. **Grandilobalid A** je 15,12-olid sa δ -laktonskim prstenom koji sadrži dve dvostruke veze i jednu karboksilnu grupu. **Grandilobalid B**, koji se razlikuje od A prisustvom epoksida na C-5 i C-6 u α -položaju, formira 3,4-epoksi- γ -lakton, dok **grandilobalid C**, predstavlja preuređeni pingvizanski skelet sa spirolaktonskom jedinicom (Tazaki et al., 1998). Struktura **akutifolona A**, sa $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -nezasićenim ketonom, tercijarnom olefinskom i karbometoksi grupom kao glavnim funkcionalnim grupama, kao i **akutifolona B**, pingvizanskog seskviterpena sa δ -laktonom i keto-grupom, određena je analizom pomoću HRMS, IR, UV i NMR metoda. Pored akutifolona A i B, tri dimerna pingvizana, Diels-Alder-ovog tipa, **bisakutifoloni A, B i C**, izolovani su kao nova jedinjenja iz Et_2O ekstrakta vrste *P. acutifolia* subsp. *tosana* (Hashimoto et

al., 1998b, 2000). Tri pingvizanska derivata sa γ -laktonskim prstenom, izolovana iz etarskog ekstrakta severnoameričkih primeraka jetrenjače *P. navicularis*, su **6 α -metoksipingviz-5(10)-en-11,6-olid-15-ska kiselina**, **6 α -metoksipingviz-5(10)-en-11,6-olid** i **metil-estar 5 α ,10 α -epoksipingvizan-11,6-olid-15-ska kiseline** (Bungert et al., 1998). α,β -Konjugovani- γ -laktoni, kod kojih je furanski prsten zamenjen 6-hidroksi-11,6- γ -butenolidom uključuju **6 α -hidroksi-3-okso-pingviz-5(10)-en-11,6-olid** i **6 α -metoksi-3-okso-pingviz-5(10)-en-11,6-olid** (smatra se metilovanim derivatom C-6 hidroksilne grupe prethodnog), kao i **3-okso-pingviz-5(10),6-dien-11,6-olid** (dehidratacioni proizvod kod koga je 6-hidroksilna grupa zamenjena C-6/C-7 dvostrukom vezom). Ova jedinjenja izolovana su iz Et₂O ekstrakta kulture gametofita jetrenjače *Aneura pinguis* kao prvi γ -hidroksilaktoni pingvizanskog tipa (Tazaki et al., 1996). Iz uzoraka *P. grandiloba* sakupljenih u Japanu izolovano je jedinjenje sa α,β -konjugovanim- γ -laktonskim prstenom, dve karbometoksi grupe (C-15 i C12 položaj), i hidroksilnom grupom u C-6 položaju. Ovo jedinjenje je od strane Tazaki i njegovih saradnika imenovano kao **6 α -hidroksi-4,8-dimetoksikarbonil-pingviz-11,6-olid** (Tazaki et al., 1998).

Porelaacetali A-C predstavljaju pingvizanske derivate čije su glavne strukturne karakteristike prisustvo pingvizanskog jezgra sa metoksilovanim ili etoksilovanim (α ili β -orijentisanim) položajem na C-11, konjugovane dvostruke veze, i α -orijentisana hidroksilna grupa na C-2, što je utvrđeno detaljnim NMR eksperimentima. Porelaacetal A poseduje β -orijentisane metoksi-, dok porelaacetali B i C poseduju i α - i β -orijentisane etoksi-grupe na C-11, uz prisustvo konjugovanih dvostrukih veza kod sva tri jedinjenja. Pored njih, **porelaacetal D** (nema konjugovane dvostruke veze, ali ima β -orijentisane etoksi-grupe na C-6 i C-11) izolovan je iz dietil-etarskog ekstrakta jetrenjače *P. cordaeana* (primerici sakupljeni u Turskoj) (Tan et al., 2017). Dihlormetanski ekstrakt jetrenjače *P. cordaeana* prikupljene u državi Oregon (Toyota et al., 1989b), sadržao je dva oksidovana seskviterpenska laktona, **porelapingvizanolid** i **spiropingvizanin**, kao i ketoaldehyd **porelapingvizenon** (Toyota et al., 1989b). Porelapingvizanolid je detektovan i u metanolnom ekstraktu *P. platyphylla* (Buchanan et al., 1996). Dietil-etarski ekstrakt jetrenjače *T. scandvicensis* iznedrio je dva nova jedinjenja: **lejeunapingvizanolid**, pingvizanski seskviterpen sa visokim stepenom oksigenacije, aldehidnom, acetalnom i laktonskom grupom (između C-5 i C-7 u β -diaksijalnom položaju), i **lejeunapingvizon**, za koji je predloženo, kombinovanjem HMQC, HMBC spektra, NOE

interakcija i molekularno-mehaničkim izračunavanjima, da nastaje otvaranjem epoksida prisutnog u prvom jedinjenju (Lahlou et al., 2000).

Od značaja je istaći i činjenicu da, zbog uslova izolovanja i razdvajanja, pingvizanski seskviterpeni mogu biti i artefakti. Tako se **dehidropingvizenol-metil-etar**, **6 α ,11 α -dimetoksipingviz-5(10)-en** i **6 α ,11 β -dimetoksipingviz-5(10)-en**, izolovani iz *n*-heksanskog ekstrakta vrste *T. sandvicensis* mogu smatrati artefaktima zato što je metanol korišćen kao eluent tokom procesa hromatografskog razdvajanja (Tori et al., 1993). Pored njih artefakt je i **4 β -karbometoksi-6 α -metoksipingviz-6,11-olid**, izolovan iz metanolnog ekstrakta jetrenjače *P. canariensis*, uz već poznate pingvizanske seskviterpene (Nagashima et al., 1996b).

2.6.2. HEMOTAKSONOMSKI I EVOLUTIVNI ZNAČAJ PINGVIZANSKIH SESKVITERPENA U OKVIRU RAZDELA MARCHANTIOPHYTA

Morfološka klasifikacija jetrenjača na osnovu razlika u gametofu vrlo je složena. Međutim, analiza njihovog sekundarnog metaboličkog profila, a u vezi sa redom, podredom, familijom ili rodovima jetrenjača, značajno olakšava taksonomska istraživanja (Asakawa, 1982b; 1995a; 2001; 2004; Gradstein et al., 1985; Rycroft, 2003). U gametofitu i sporofitu jetrenjača prisutna su uljana telašca, koja variraju po obliku, broju, veličini, boji i distribuciji, kao i po hemijskom sastavu. Ova uljana telašca su zaslužna za široku raznolikost sekundarnih metabolita prisutnih u jetrenjačama, od kojih su neki enantiomerni onima prisutnim kod viših biljaka.

Pingvizani, prisutni samo u jetrenjačama, mogu biti hemotaksonomski markeri vrsta ili rodova jetrenjača u kojima se nalaze, u čemu se ogleda njihov taksonomski značaj. Pingvizanski seskviterpeni su značajni hemotaksonomski markeri pojedinih familija Lejeuneaceae, Porellaceae, Trichocoleaceae i Aneuraceae (Riccardiaceae) (Asakawa, 1982a). Pa tako, uprkos značajnim morfološkim razlikama, isti tip pingvizanskih jedinjenja proizvode vrste kao što su *Frullanoides densifolia*, *Trocholejeunea sandvicensis* i *Ptychantus striatus* iz familije Lejeuneaceae, kao i četiri vrste roda *Porella*: *P. navicularis*, *P. densifolia*, *P. platyphylla* i *P. japonica* (familija Porellaceae) (Asakawa et al., 1980b). Sa druge strane, morfološka sličnost između rodova *Bryopteris* i *Ptychantus* praćena je hemijskom sličnošću, s obzirom na to da su pingvizani glavni sekundarni metaboliti oba roda u okviru familije Lejeuneaceae (Nagashima et al., 1994a). Prisustvo pingvizana

omogućava nam i da razlikujemo klade unutar familija; na primer pingvizanin i deoksopingvizon su hemijski markeri *Acrolejeuna* kompleksa, uključujući vrste *T. sanvicensis*, *F. densifolia*, dok pingvizon, norpingvizon-metil-estar, pingvizen i neopingvizenol karakteristične su za klade Ptychanthinae i Brachiolejeuneinae, koje pripadaju familiji Lejeuneaceae (Gradstein et al., 1988).

Prisustvo 1-*epi-α*-pingvizena potvrđuje mogućnost korišćenja pingvizana kao hemijskih markera za red Jungermanniales (Gauvin-Bialecki et al., 2010). Pingvizanski seskviterpeni takođe se mogu koristiti za asignaciju hemotaksonomskih grupa (Asakawa, 2004). Na primer, pingvizanski seskviterpeni mogu biti značajni hemosistematski markeri familije Ptilidiaceae imajući u vidu da se deoksopingvizon iz čeških i finskih primeraka vrste *P. ciliare* (Krutov et al., 1973) ne nalazi u vrsti *P. pulcherrimum* (Asakawa et al., 1981a). Suprotno tome, pingvizanin i pingvizanolid su dominantni pingvizani u uzorcima vrste *P. pulcherrimum* (Asakawa et al., 1981a) sakupljenim u Francuskoj, što ukazuje da pingvizani mogu biti hemijski markeri čitavog roda *Ptilidium* (Nagashima et al., 1999).

Široko rasprostranjen rod folioznih jetrenjača *Porella* sastoji se od dva glavna hemotipa: onog sa oporim ukusom i onog bez oporosti, koji proizvodi velike količine pingvizana (Buchanan et al., 1996). Dalja klasifikacija vrsta *Porella* može se, prema nekim autorima, vršiti u šest hemotipova (Ludwiczuk et al., 2011) ili čak njih deset (Gilabert et al., 2011). Podela vrsta na hemotipove postiže se skriningom sekundarnog metaboličkog profila. Tako, dok neke vrste *Porella* stvaraju pingvizane samo kao prateće metabolite, uz drimane u hemotipu I ili sakulatane u hemotipu III, neke vrste proizvode velike količine pingvizanskih seskviterpena, kao što je slučaj kod hemotipa V (Gilabert et al., 2011; Ludwiczuk et al., 2011). Čak se i vrste unutar hemotipa V mogu međusobno razlikovati samo na osnovu produkcije norpingvizana (*P. recurva*) ili pingvizana (*P. cordaeana* i *P. navicularis*). Prisustvo dimernih pingvizanskih seskviterpena (bisakutifolona A-C) u Et₂O ekstraktu japanskih primeraka *P. acutifolia* subsp. *tosana* razlikuje ovu vrstu od bilo koje druge vrste roda *Porella* (Hashimoto et al. 2000). Takođe, ista grupa autora ukazala je na postojanje dva hemotipa *P. acutifolia* subsp. *tosana* u Japanu, jedan koji stvara bisakutifolone i drugi koji produkuje gvajanolide.

Pored roda *Porella*, pingvizanski seskviterpeni imaju ulogu i u podeli vrsta roda *Plagiochila* na hemotipove. Vrste roda *Plagiochila* su nakon hemijskih istraživanja svrstane u dvanaest hemotipova, među kojima je hemotip devet onaj koji stvara pingvizane (Asakawa,

1982b). Deoksopingvizon i dehidropingvizon su glavni konstituenti helijskog profila *P. alterans* i uzoraka vrste *P. rosariensis* sakupljenih iz Perua, koje se obe razlikuju od ostalih vrsta roda *Plagiochila*, i pripadaju pingvizanskom hemotipu u okviru porodice Plagiochilaceae (Asakawa, 1982a). Takođe je značajno spomenuti da je, na osnovu prisustva pingvizanskih seskviterpena, moguće razlikovati hemotip I vrste *T. sandvicensis* (Lejeuneaceae), koji sadrži pingvizanin, i hemotip II, koji stvara dehidropingvizanin kao glavnu komponentu (Asakawa et al., 2009).

Poznavanje sastojaka jetrenjača ne služi samo za utvrđivanje hemijskih, već i evolutivnih odnosa u okviru Marchantiophyta. Naime, među detektovanim terpenoidima prisutni su oni koji su ograničeno prisutni u taksonima čime omogućuju uvid u evolutivnu istoriju i filogenetske odnose (Ludwiczuk et al., 2008). U skladu sa ovim može se spekulirati da, na osnovu prisustva identifikovanih pingvizanskih seskviterpena u izolovanim etarskim uljima, jetrenjače redova Jungermanniales i Metzgeriales vode poreklo od istog pretka (Asakawa, 1995a). Takođe, vrste *Aneura pinguis* (Aneuraceae; Metzgeriales), *Ptilidium ciliare* i *P. pulcherrimum* (Ptilidiaceae; Jungermanniales) mogu smatrati srodnim na osnovu prisustva pingvizana (Tori et al., 1993). Pored njih, tri jetrenjače, *A. pinguis*, *Pellia endiivifolia* (Dicks.) Dumort. i *Makinoa crispata* (Steph.) Miyake, sve iz reda Metzgeriales, na osnovu prisustva pingvizanskih seskviterpena i diterpenskih dialdehida slične su vrstama roda *Porella* i vrste *T. sacculata*, čime potvrđuju blisku povezanost između enzima odgovornih za stvaranje karakterističnih seskviterpena redova Jungermanniales i Metzgeriales, koje ih ujedinjuje u potklasu Jungermanniiae (Schuster, 1979). Sa druge strane, bez obzira na morfološku sličnost između vrsta *T. sacculata*, *Neotrichocolea bissetii* (Mitt.) S.Hatt. i *Trichocoleopsis tomentella* (Ehrh.) Dumort., dokazano je da se one u hemijskom pogledu razlikuju, iako sve tri vrste pripadaju istoj familiji Trichocoleaceae. Jetrenjača *T. sacculata* klasifikovana je u podred Lepidolaenineae, zajedno sa podredovima Ptilidineae i Porellineae, što je u skladu sa prisustvom pingvizanskih seskviterpena i sakulatanskih diterpena u vrstama unutar roda *Porella* i samoj *T. sacculata*, ukazujući da, uprkos velikoj morfolškoj udaljenosti, ove vrste pripadaju bliskim ili čak istoj evolutivnoj liniji (Asakawa et al., 1981b).

O bliskim biohemijskim odnosima unutar familija Porellaceae i Lejeuneaceae može se zaključiti na osnovu prisustva pingvizana u nekim vrstama rodova *Porella*, *Lejeunea* i *Ptilidium* (Asakawa et al., 1981a; Asakawa, 1995a). Lejeuneaceae je najveća familija unutar reda Porellales, uglavnom epifitnih vrsta, rasprostranjenih širom regiona tropskih šuma. Pritom, njena podfamilija

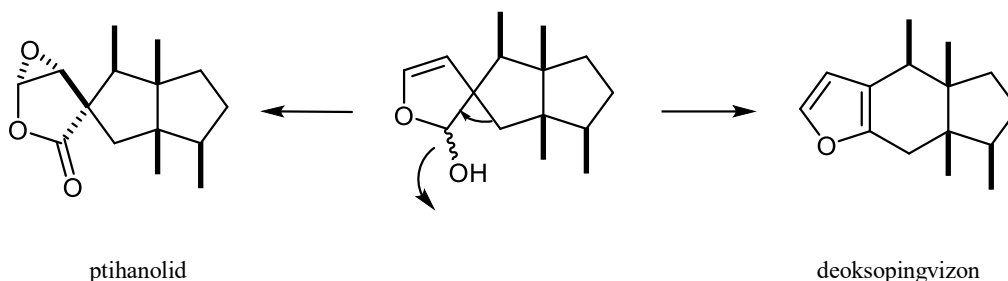
Ptychanthoideae, obuhvata osamnaest rodova, a na osnovu prisustva ili odsustva, striatena, deoksopingvizona i drugih seskviterpena pingvizanskog tipa, podeljena je na komplekse: *Ptychanthus* (rodovi *Mastigolejeunea*, *Thysananthus*, *Ptychanthus* i *Tuzibeanthus*), *Acrolejeunea* (rodovi *Acrolejeunea*, *Trocholejeunea* i *Frullanoides*), *Archilejeunea* (rodovi *Spruceanthus* i *Archilejeunea*) i *Lopholejeunea* (rodovi *Lopholejeunea* i *Marchesinia*) (Asakawa, 1982b). Pored toga, blizak hemijski odnos između vrste *F. densifolia* (Lejeuneaceae) i vrste *P. japonica* (Porellaceae) potkrepljen je činjenicom da obe proizvode pingvizane i gvajanolide (Arbiyanti, 1991).

Jetrenjače *P. cordaeana* i *P. navicularis* takođe stvaraju pingvizane, preuređene pingvizane i monociklofarnezane, srodne onima koji se nalaze u vrsti *Frullanoides densifolia* (Toyota et al., 1989a; 1989b). *Porella platyphylla* se smatra primitivnijom u odnosu na druge vrste roda *Porella* s obzirom na to da stvara samo pingvizane, kao glavne komponente (Asakawa, 1988). Pingvizanski i norpingvizanski seskviterpenoidi pronađeni u vrstama roda *Porella* takođe su izolovani iz jetrenjače *Bryopteris filicina* (Lejeuneaceae) (Nagashima et al., 1993). Bliski odnosi među vrstama, kao što je to slučaj sa *B. filicina* i *Ptychanthus striatus*, obe unutar klade Ptychanthinae, mogu se ustanoviti ne samo na osnovu morfološke sličnosti već i na osnovu produkcije pingvizanskog tipa seskviterpenoida, što podržava hipotezu da porodice Lejeuneaceae i Porellaceae imaju zajedničkog pretka.

Pingvizani mogu pomoći i u klasifikaciji familija unutar odgovarajućih redova. Na primer, pingvizani iz vrste *Neotrichocolea bissetii* (pingvizanin, pingvizanolid), kao i vrste *T. sacculata* (pingvizon, deoksopingvizon) sugerišu da bi familija Neotricholaceae trebalo da bude smeštena u red Ptilidiales u novoj klasifikaciji Marchantiophyta. Ova činjenica ukazuje da pingvizanski seskviterpeni mogu biti korisni hemijski markeri za red Ptilidiales (Crandall-Stoller, et al., 2008). Pingvizani su specifični hemijski markeri za rod *Ptilidium*, s obzirom na to da su glavni konstituenti hemijskog profila vrsta roda *Ptilidium* (Nagashima et al., 1999). Nasuprot tome, oni se ne nalaze u rodu *Mastigophora*, uključenom u red Ptilidiaceae. Ova činjenica može ukazivati na to da dve familije ne vode poreklo od zajedničkog pretka, potvrđujući još jednu značajnu ulogu pingvizana.

2.6.3. BIOSINTEZA PINGVIZANA

Tradicionalno biosinteza seskviterpena prati biogenetski izoprenski princip, poznat kao Ružičkino pravilo (Ružička, 1953). Prema ovom pravilu, seskviterpeni se formiraju od tri izoprenske jedinice (2-metil-1,3-butadien) kroz seriju enzimskih reakcija koje uključuju pirofos-

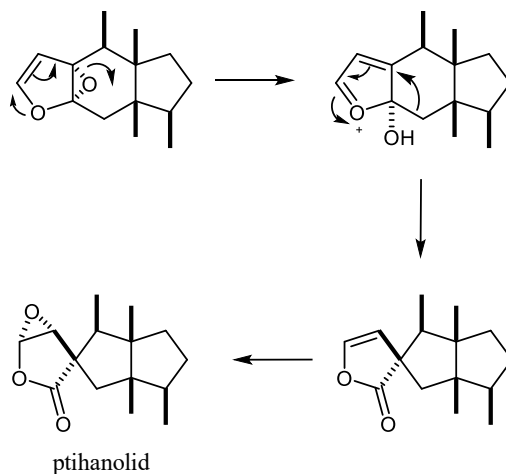


Slika 2.6.2. Predloženi biosintetski put do deoksopingvizona i ptihanolida (Takeda et al., 1983)

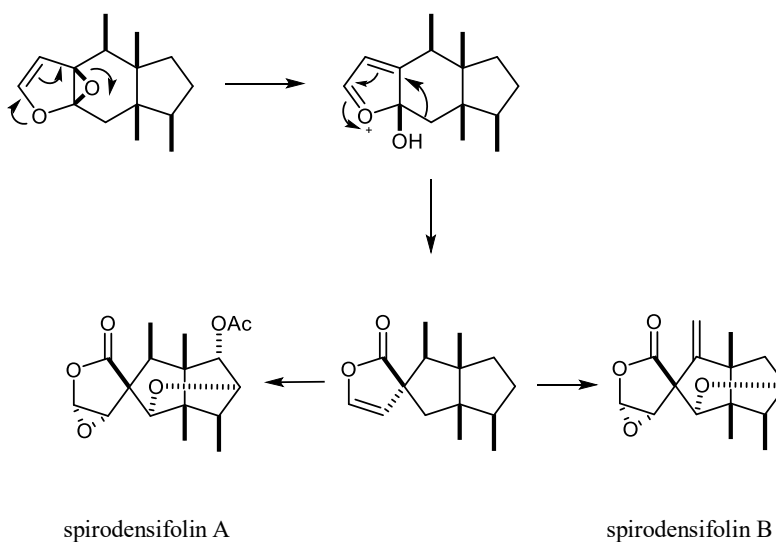
fatne jedinice nastale iz acetil-CoA (Hillier i Lathe, 2019). Fosilni zapisi i filogenetske studije sugerišu da su prve biljke na zemlji bile nalik jetrenjačama. Ovi podaci naglašavaju važnost istraživanja metaboličkih puteva jetrenjača, njihovih adaptivnih strategija i evolutivnih mehanizama, što može otkriti ključna saznanja o vegetativnim i reproduktivnim promenama koje su omogućile uspešnu adaptaciju biljaka na uslove života na kopnu. Biogeneza pingvizana ne može se jednostavno objasniti biogenetskim izoprenskim pravilom. Izolovanje ptihanolida, zajedno sa deoksopingvizonom i pingvizonom iz acetonskog ekstrakta jetrenjače *Ptychanthus striatus*, navela je Takeda-u i njegove saradnike na zaključak o postojanju zajedničkog intermedijera u još uvek nerazjašnjenom procesu biosinteze pingvizana, koji vodi do formiranja ovih jedinjenja (slika 2.6.2.) (Takeda et al., 1983).

Connolly i saradnici su 1990. godine ispitivali biogenezu spiropingvizana i predložili da se formiranje spirodensifolina A i B, kao i ptihanolida, odvija preko $5\alpha,6\alpha$ -epoksidnih i $5\beta,6\beta$ -epoksidnih derivata pingvizana (slika 2.6.3.). Ovaj rad značajno je doprineo razumevanju biosinteze spiropingvizana, usmeravajući pažnju na ključne intermedijere u ovom procesu.

a)

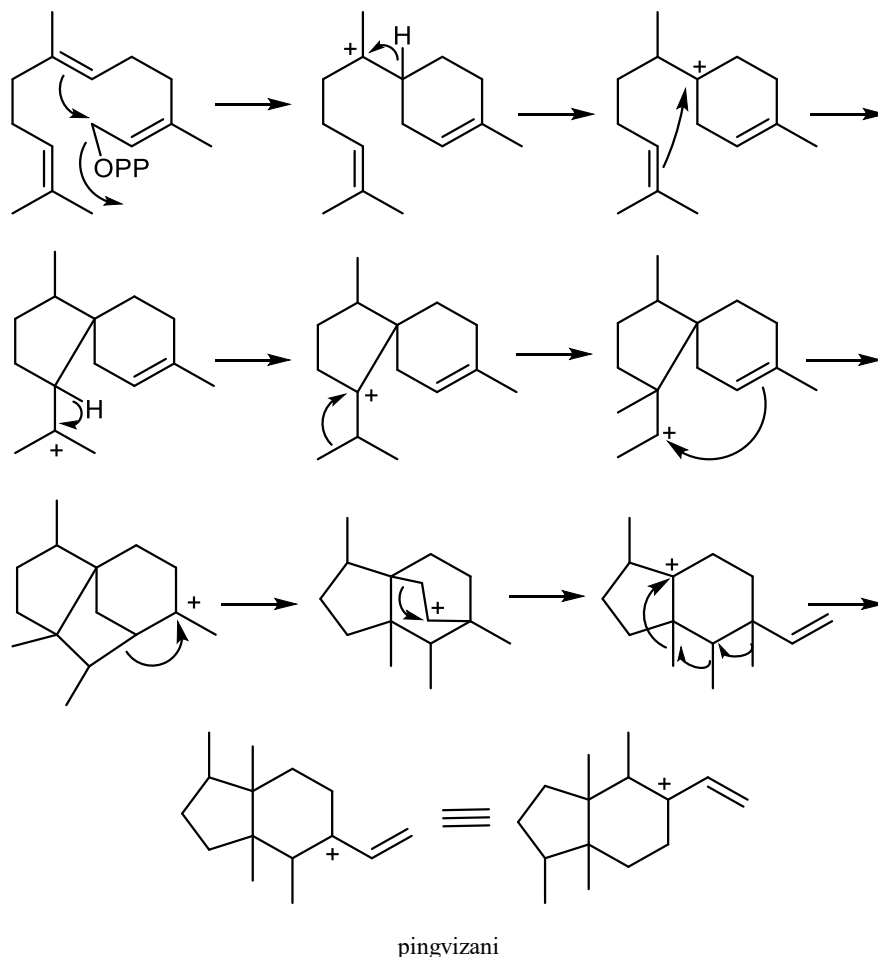


b)



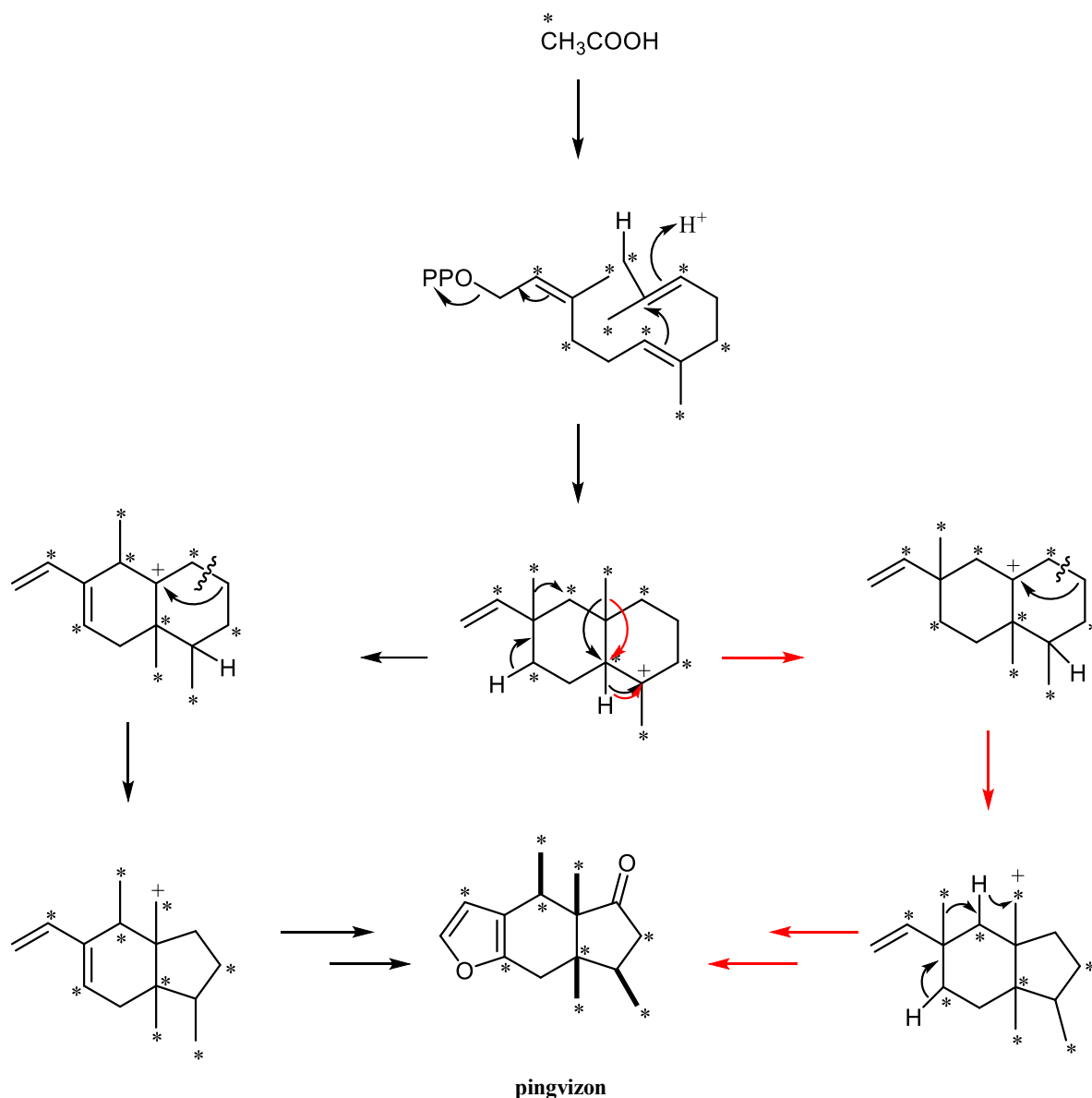
Slika 2.6.3. a) Mogući biosintetski put do ptihanolida; b) Mogući biosintetski put do spirodensifolina A i B (Connolly, 1990)

Tori i njegovi saradnici su 1993. godine istražili biosintetski put pingvizana iz farnezil-pirofosfata, predlažući da se ovaj put odvija preko formiranja bisabolanil- i akoranil-karb katjona jona. Ova serija 1,2-migracija dovodi do formiranja pingvizanskog skeleta (slika 2.6.4.) (Tori et al., 1993). Godine 1995, *Tazaki* i saradnici sproveli su biosintetsko istraživanje o formiranju pingvizona, hranivši kultivisane gametofite vrste *Aneura pinguis* [2- ^{13}C]-acetatom, pri čemu su akumulirali velike količine ovog ^{13}C -obilježenog jedinjenja (Tazaki et al., 1995). Kulture gameto-



Slika 2.6.4. Predloženi biosintetski put do pingvizanskih seskviterpenoida iz farnezil-pirofosfata (OPP) (Tori et al., 1993)

fita jetrenjača predstavljaju efikasan istraživački alat za proučavanje biosinteze terpena, s obzirom na to da terpeni formirani iz ^2H i ^{13}C obeleženih prekursora dodatih u medijum, omogućavaju analizu biosintetskog puta jedinjenja od interesa. Obeleženi pingvizon, koji se akumulirao u značajnim količinama u kulturama gametofita, imao je specifičnu distribuciju položaja inkorporiranja ^{13}C -obogaćenih ugljenika (C-2, C-4, C-6, C-8, C-10, C-12, C-13, C-14 i C-15 položaja). Na osnovu ^{13}C – ^{13}C kuplovanja između C-4–C-15 i C-8–C-12, i imajući u vidu položaje izotopskog obeležavanja, *Tazaki* i saradnici su isključili prethodno predloženi biosintetski put od strane *Tori*-ja i njegovih saradnika (Tori et al., 1993). Položaj inkorporacije ukazivao je na stvara-



Slika 2.6.5. Inkorporiranje $[2-^{13}\text{C}]$ -obeđenih acetata u pingvizon; Predloženi biosintetski put za pingvizanski tip seskviterpenoida (Tazaki et al., 1995)

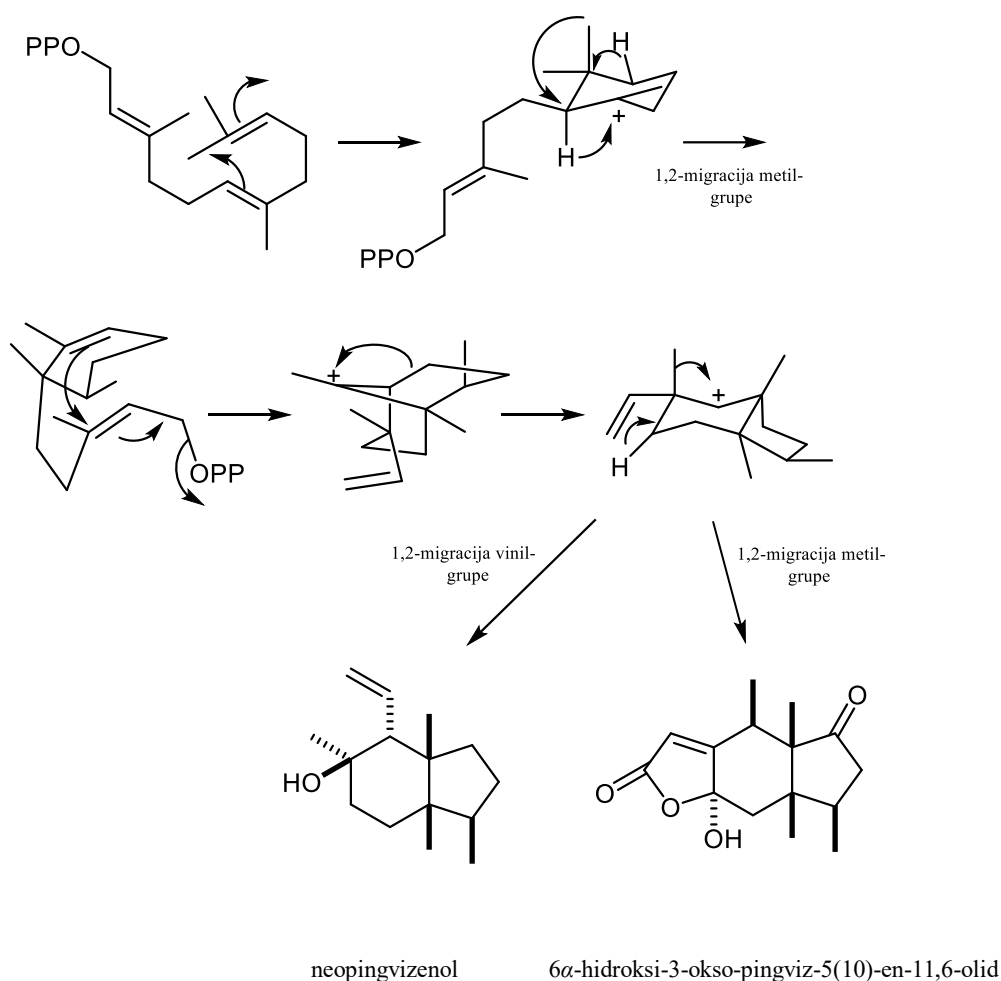
nje dekalinskog katjona preko C-3–C-12 (ili C-13) i C-6–C-11 veza u FPP, uz eliminaciju difosfata. Dalje konverzije su uključivale dve 1,2-metil migracije, kao i 1,2-migraciju hidrida (sa C-6–C-7 položaja, što je potvrđeno inkorporiranjem/retencijom deuterijuma u položaju C-1). Indanski katjon formiran pucanjem C-9–C-10 veze u dekalinskom katjonu, uz reciklizaciju, vodi do formiranja ciklopentanskog prstena, koji dalje reaguje stvarajući pingvizansku strukturu (Tazaki

et al., 1995). Data šema (slika 2.6.5.) ilustruje biosintetski put za pingvizanski tip seskviterpenoida, kao i alternativni put formiranja indanskog, preko dekalinskog katjona. Dalji eksperimenti koje su 1997. godine sproveli Tazaki i saradnici, koristili su mevalonate obeležene sa ^2H i ^{13}C ([4,5- $^{13}\text{C}_2$]-, [5- $^{13}\text{C}_2$]-, [2- $^2\text{H}_2$]- i [6- $^2\text{H}_3$]-MVA) dodavane u kulture jetrenjače *Aneura pinguis*. Ovi eksperimenti su revidirali prethodno predloženi biosintetski put prikazan na slici 2.6.5. NMR analiza izolovanog obeleženog seskviterpena, 6 α -hidroksi-3-oksopingviz-5(10)-en-11,6-olida, rasvetljuje biosintetski put pingvizana iz farnezil-pirofosfata (FPP). Ciklični karbkatjon nastaje formiranjem C-6–C-11 veze iz FPP, bez eliminacije difosfata. 1,2-Migracija hidrida, direktno dokazana upotrebom [4- $^2\text{H}_2$]-MVA i [4- $^{13}\text{C}_2$]-MVA, praćena 1,2-migracijom metil-grupe, rezultovala je formiranjem C-3–C-10 veze i sledstvenom eliminacijom pirofosfata (Tazaki et al., 1999b). Izomerizacija katjona sa biciklo[3.3.1]nonanskim skeletom u katjon sa biciklo[4.3.0]nonanskim prstenom rezultirala je formiranjem hidrindanskog skeleta. Ovaj skelet se dalje transformiše kroz 1,2-migraciju metil-grupe i 1,2-migraciju vinil-grupe, čime nastaju pingvizanski i neopingvizanski skeleti. Verovatnoća i široka rasprostranjenost predloženog biosintetskog puta oslikana je ne samo u formiranju pingvizanskih seskviterpena, već i trifaranskih i monociklofarnezanskih skeleta. Štaviše, povezivanje metabolita pingvizanskih struktura sa striatenskim, monociklonerolidolskim i trifarenolskim skeletima daje argumente za ovaj biosintetski put (slika 2.6.6.) (Tazaki et al., 1997).

2.6.4. SINTEZA PINGVIZANSKIH SESKVITERPENOIDA

Pingvizani su prirodni proizvodi koji predstavljaju sekundarne metabolite jedinstvene strukture, okarakterisane velikim brojem stereogenih centara, koji upravo mogu biti odgovorni za potencijalne biološke aktivnosti koje poseduju. Mala rasprostranjenost ovih jedinjenja u prirodnim izvorima, uz gore pomenuti farmakološki potencijal, čini ovu klasu prirodnih proizvođača privlačnom i izazovnom za organsku sintezu. Od vremena prvog izolovanja pingvizanskih jedinjenja, pingvizona i deoksopingvizona (Krutov et al., 1973), razmatrane su različite sintetske strategije za njihovo dobijanje. Prvi uspešni sintetski pristup za ova dva furanopingvizana ostvarili su Uyehara i saradnici 1985. godine (Uyehara et al., 1985). Sintetski pristup dobijanju *cis*-biciklo[4.3.0]non-4-en-7-ona, kao prekursora ($\pm$)-pingvizona i ($\pm$)-deoksopingvizona zasnovan je na ključnoj

fotohemijском [1,3]-acil preuređenju biciklo[3.2.2]non-6-en-2-ona, što je omogućilo formiranje odgovarajućeg [5-6] kondenzovanog prstena (Uyehara et al., 1985; 1986). Furanopingvizani, u poređenju sa pingvizanima, imaju triciklični furanski skelet sa *cis*-kondenzacijom između peto- i šestočlanog prstena i tri ili četiri vicinalne *cis*-orijentisane metil-grupe. Veliki broj furanopingvizana (pingvizon, deoksopingvizon, furanopingvizanol, dehidropingvizanol itd.) izolovan je iz jetrenjača (Asakawa, 1995a), a neki od njih su i naknadno sintetsiani.

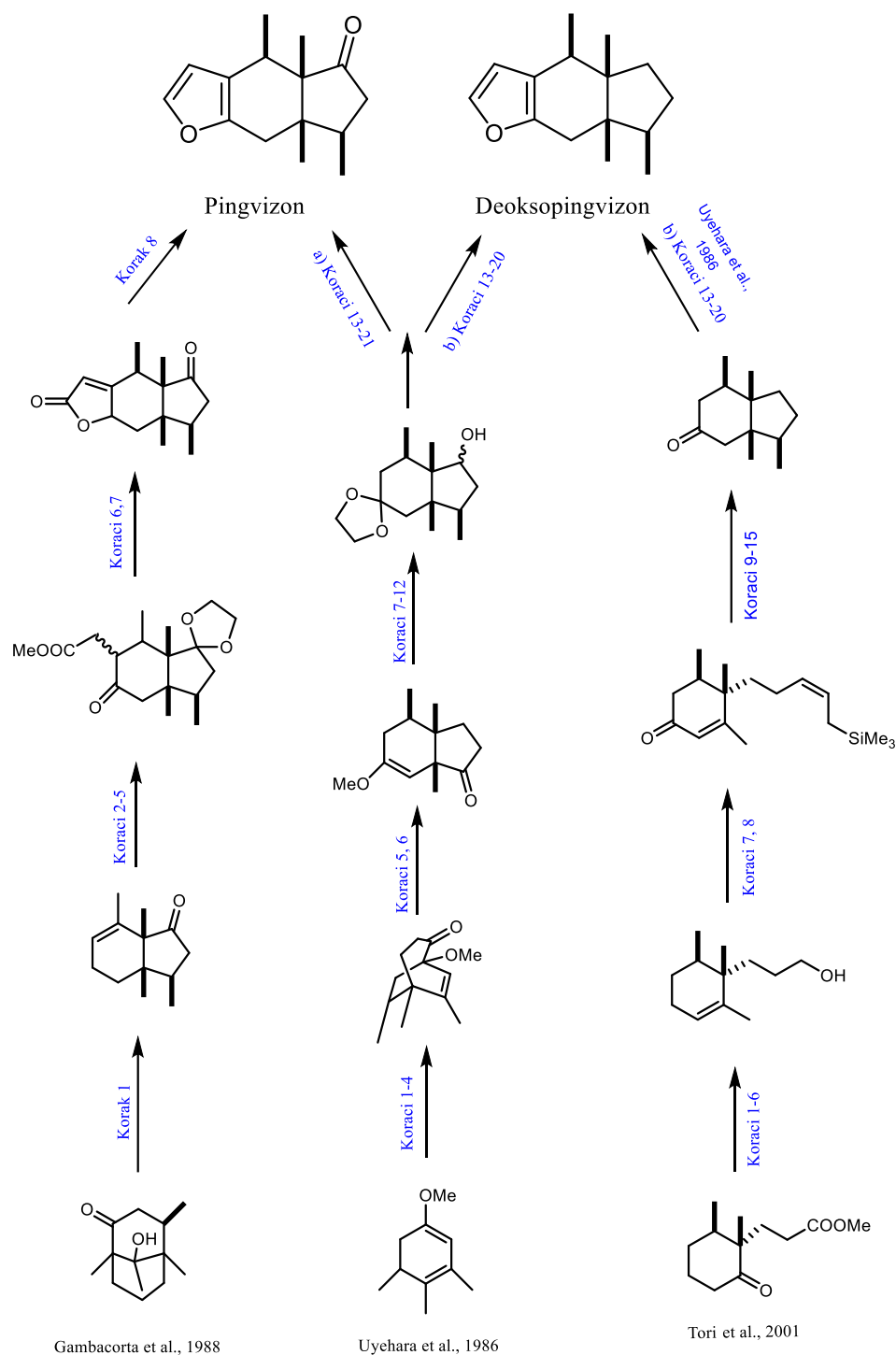


Slika 2.6.6. Predloženi biosintetski put za pingvizanski tip seskviterpenoida (Tazaki et al., 1997)

Gambacorta je 1988. sa saradnicima predložio pristup totalnoj sintezi (+)-pingvizona preko biciklo[3.3.1]nonana, koristeći kiselo katalizovano preuređenje skeleta 9-hidroksi-1,4 β ,5,9-tetrametilbiciklo[3.3.1]nonan-2-ona u tetrametil-*cis*-hidrindenon, 3 β ,3a β ,7,7a β -tetrametilbiciklo[4.3.0]non-6-en-1-on, koji dalje daje ($\pm$) pingvizon (*Gambacorta et al.*, 1988). Takođe, *Tori* i saradnici su sintetisali homohiralni biciklični pingvizanski keton, metil 3-[(1'S,6'R)-1',6'-dimetil-2'-okso-1-il], polazeći od pulegona, koristeći Hosomi-Sakurai reakciju kao ključni korak za konstrukciju petočlanog prstena formiranjem C-18 i C-1 veza, koji se potom može lako prevesti u deoksopingvizon (slika 2.6.7.) (*Tori et al.*, 2001).

Totalna sinteza ($\pm$)- α -pingvizena, izvedena u jedanaest koraka, realizovana je 1995. godine od strane *Schinzer*-a i saradnika kroz ciklizaciju enona uz upotrebu kiselo katalizovanog Amberlyst 15 (A 15), u prisustvu metoksi-dioksolana kao ključnog koraka (*Schinzer et al.*, 1995). Ovaj proces ciklizacije, iniciran od strane A 15, predstavlja metod za formiranje hidrindandskih skeleta, koji uključuju tri susedne β -metoksi grupe, od kojih su dve kvaternarni centri. Tokom procesa sinteze *Schinzer*-ov keton predstavlja ključni intermedijer, koji se u konačni proizvod transformiše preko paladijum-posredovanog unakrsnog spajanja enol triflata sa vinilstananom. Treba istaći i to da su *Srikrishna* i *Vijaykumar* ukazali na grešku u spomenutom *Schinzer*-ovom radu, gde pod pojmom β -pingvizen podrazumevaju α -pingvizen (*Srikrishna i Vijaykumar*, 1997).

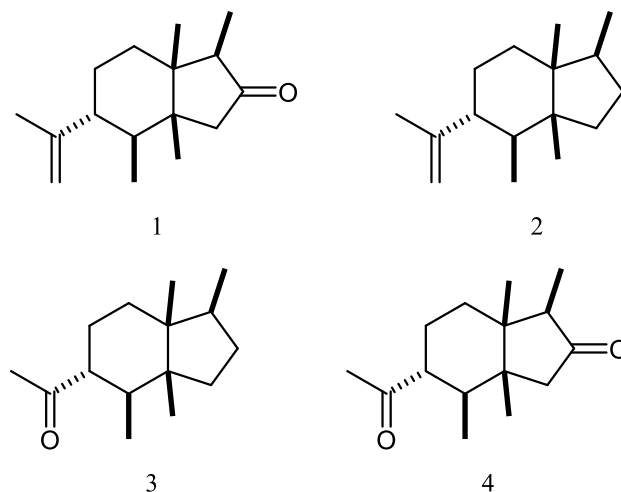
Godine 1996, postignuta je totalna sinteza ($\pm$)-**pingvizenola** i ($\pm$)- **α -pingvizena**, takođe putem ciklizacije enona (*Schinzer et al.*, 1995), da bi se dobio *Schinzer*-ov keton. Narednih godina izvedeno je više različitih sinteza pingvizanola (slika 2.6.9.). Naime, spajanjem enol triflata, dobijenog deprotonovanjem *Schinzer*-ovog ketona sa LDA na niskoj temperaturi i *in situ* hvanjem sa *N*-fenil-*bis*(trifluorometansulfonimid)-om, sa vinilstananom u prisustvu *tetrakis*(trifenilfosfin)paladijum(0)-a, formiran je izomer **α -pingvizena**. S druge strane, dodavanje vinilmagnezijum bromida *Schinzer*-ovom ketonu u ekvatorijalnom položaju dovelo je do formiranja ($\pm$)-**pinguisenola** kao jednog diastereomera. Dalja sintetska istraživanja od strane *Srikrishna*-e i saradnika 1997. godine uključivala su Claisen-ovo premeštanje ortoestra i intramolekularsku diazo keto ciklopropanaciju, što je rezultiralo stereoselektivnim formiranjem dva kvaternarna ugljenična centra, polazeći od Hagemann-ovog estra u totalnoj sintezi racemskih ($\pm$)-**pingvizenola** i ($\pm$)- **α -pingvizena** (*Srikrishna i Vijaykumar*, 1997; 1998) (slika 2.6.9.). Prva enan-



Slika 2.6.7. Odabrane sintetske šeme za pingvizon i deoksopingvizon: *Reagensi i uslovi:* **Gambacorta et. al., 1988:** 1. Kiselo katalizovano premeštanja 2. zaštita; 3. alilna oksidacija; 4. Birčova redukcija; 5. Reakcija enolata sa $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$; 6. bazna hidroliza; 7. grejanje 110°C ; 8. DIBAL-H, -20°C . **Uyehara et. al., 1986:** 1. ClCH_2CN , hidrohinon, PhMe, 90°C , preko noći; 2. Na_2S , KOH, EtOH, refluks; 3. Collins-ova oksidacija; 4. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , -78°C , TMSCHN_2 , 1,5 h; 5. ozračivanje THF rastvora sa Hg od 100 W, 4h; 6. 2-etil-2-metil-1,3-dioksolan, PhH, TsOH, s.t., 2 dana; 7. LDA, PhSSO_2Ph , THF; 8. NaIO_4 ,

MeOH-H₂O; 9. CaCO₃, PhMe, 90 °C; 10. MeLi, etar; 11. PCC, NaOAc, CH₂Cl₂; 12. Li, NH₃, *t*-BuOH, THF; a) **za pingvizon**: 13. NaH, TBAI, DME, BnBr; 14. HCl, H₂O-aceton; 15. LDA, ICH₂COOEt, THF-HMPA; 16. K₂CO₃, MeOH-H₂O; 17. TsOH, PhH, refluks; 18. BBr₃, CH₂Cl₂ 0 °C; 19. DIBAL-H, THF; 20. 1 M H₂SO₄; 21. (Ac)₂O, DMSO. b) **za deoksopingvizon**: 13. NaH, imidazol, CS₂, THF, refluks; 14. (*n*-Bu)₃SnH, PhMe, refluks; 15. HCl, H₂O-aceton; 16. LDA, ICH₂COOEt, THF-HMPA; 17. K₂CO₃, MeOH-H₂O; 18. TsOH, PhH, refluks; 19. DIBAL-H, THF; 20. 1M H₂SO₄. **Tori et. al. 2001**: 1. LAH; 2. TBDPSCl, Et₃N; 3. Swern-ova oksidacija; 4. MeMgBr, CeCl₃; 5. POCl₃, piridin; 6. TBAF, THF; 7. Swern-ova oksidacija; 8. Ph₃PMeBr, ICH₂SiMe₃, *n*-BuLi; 9. PDC, *t*BuOOH; 10. TBAF, 4 Å, molekulska sita; 11. O₃, CH₂Cl₂; onda Me₂S; 12. NaBH₄; 13. TsCl, piridin; 14. LAH; 15. Jones-ova oksidacija; Koraci od 16-23 za deoksopingvizon Uyehara et al., 1986.

tiospecifična sinteza Schinzer-ovog ketona (prethodno korišćenog u racemskoj formi kao ključni intermedijer u sintezi (±)-pingvizana i (±)- α -pingvizena (Schinzer et al., 1995; Schinzer i Ringe, 1996; Srikrishna i Vijaykumar, 1997; 1998; 2000)), izvedena je α -karbonil radikalskom ciklizacijom polazeći od (*R*)-(+)-pulegona (Sha et al., 2003). Uz (1*R*,3*aS*,4*S*,7*aS*)-1,3*a*,4,7*a*-tetrametilperhidro-5-indenone kao formalni prekursor u enantiospecifičnoj sintezi (–)-**pingvizenola** i (–)- **α -pingvizena**, Sha i saradnici su 2003. godine prijavili i (3*R*,3*aS*,7*R*,7*aS*)-3,3*a*,7,7*a*-tetrametilperhidro-4-indenone kao dodatni intermedijer koji se može koristiti prilikom sinteze drugih pingvizana (Sha et al., 2003).

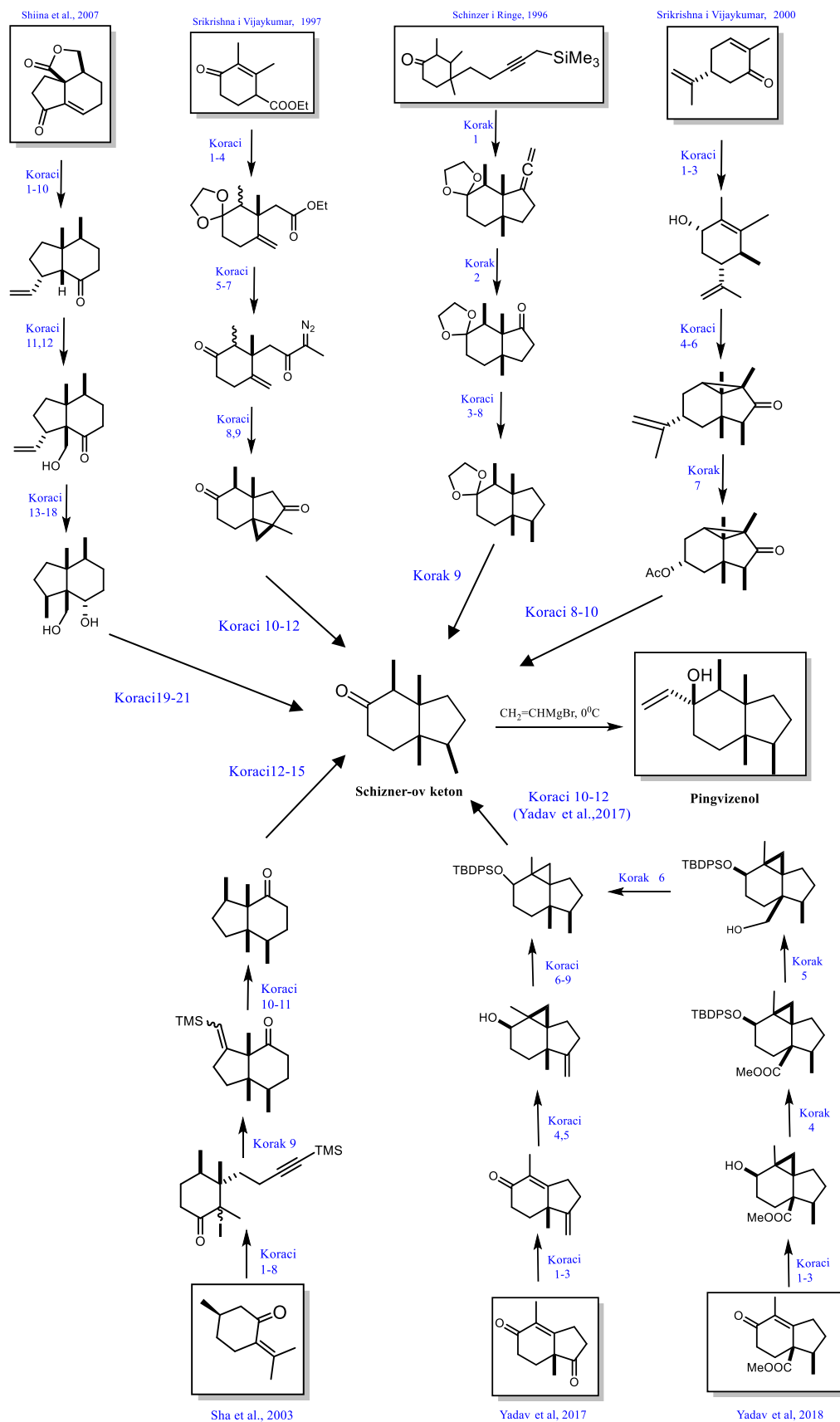


Slika 2.6.8. Sintetisani pingvizanski seskviterpeni: **1.** 10-metilenpingvizan-8-on, **2.** 10-metilenpingvizan, **3.** pingvizan-10-on, **4.** pingvizan-8,10-dion (Srikrishna i Vijaykumar, 1998)

Prva totalna enantiospecifična sinteza (+)-**pingvizenola**, optičkog antipoda prirodno zastupljenog (–)-pingvizenola (stereochemija 1*S*,2*S*,3*S*,6*S*,7*R*), ostvarena je 1998. godine od strane

Srikrishna i *Vajaykumar* polazeći od (*R*)-karvona (slika 2.6.9.). Tokom ove sinteze, dobijena su još četiri pingvizanska analoga. Regiospecifično reduktivno cepanje ciklopropanskog prstena intermedijera rezultovalo je u dobijanju **10-metilenpingvizen-8-ona**, koji je nakon Huang-Minlon modifikovane Wolff-Kishner-ove redukcije pretvoren u deoksigenovani **10-metilenpingvizen**. Ozonolizom, praćenom reduktivnom obradom, transformisan je 10-metilenpingvizen u **(-)-pingvizen-10-on**, dok je ozonolizom 10-metilenpingvizen-8-ona dobijen **(+)-pingvizen-8,10-diona** (*Srikrishna* i *Vijaykumar*, 1998). Godine 2000, *Srikrishna* i saradnici izveli su enantiospecifičnu totalnu sintezu (+)-pingvizenola, polazeći od *trans*-6-metilkarvona, dobijenog od (*R*)-karvona. Sinteza (+)-pingvizenola izvedena je u trinaest koraka, uključujući Claisen-ovo premeštanje alil-alkohola i intramolekulsku diazo keton ciklopropanaciju, regioselektivno otvaranje ciklopropanskog prstena, uz ukupni prinos od 2,5% (*Srikrishna* i *Vijaykumar*, 2000). Stereoselektivna totalna sinteza (5*S**,9*S**,1*R**,6*R**)-1,5,6,9-tetrametilbiciklo[4.3.0]nonan-2-on-a postignuta je korišćenjem Mukaiyama aldolne reakcije kao ključnog sintetskog koraka, s obzirom na to da se gore navedeno jedinjenje lako može prevesti u pingvizenol, koristeći pristup prethodno opisan od strane *Schinzer*-a i saradnika (slika 2.6.8.) (*Schinzer* et al., 1995; *Shiina* et al., 2007).

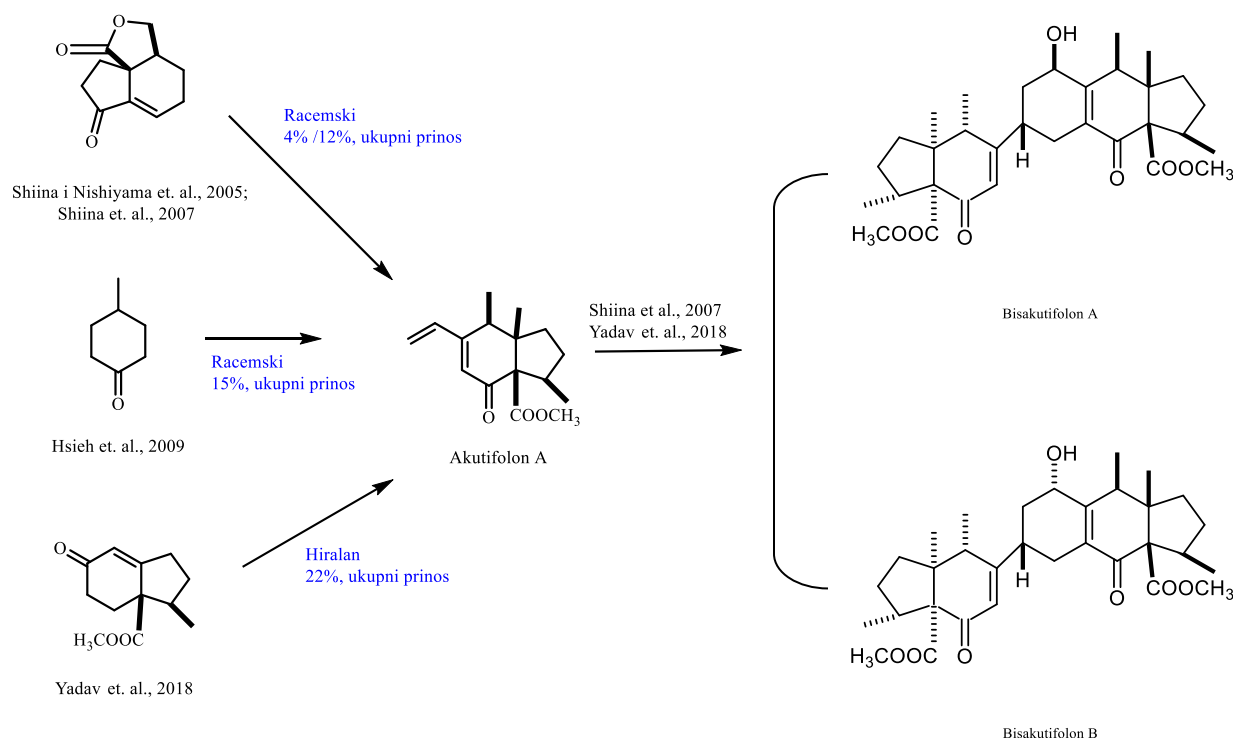
Yadav i saradnici su 2017. godine izvestili o sintezi (-)-pingvizenola u devet koraka, kao i o sintezi (-)-izonavikulola (iz pingvizenola) u deset koraka, polazeći od Hajos-Parrish ketona. Ključne reakcije u ovom pristupu uključivale su: regioselektivnu zaštitu tioketala, stereoselektivnu ciklopropanaciju uz primenu Furukawa protokola, diastereoselektivnu hidrogenizaciju olefina korišćenjem Thalesnano H-Cube Pro flow reaktora, redukciju ciklopropanskog prstena pomoću litijuma u tečnom amonijaku, i 1,3-oksidativnu transformacionu sekvencu pomoću PCC (*Yadav* et al., 2017). U 2018. godini, ista grupa autora objavila je stereoselektivnu totalnu sintezu izonavikulola i pingvizenola koristeći (*R*)-pulegon kao polazni materijal. Ključne reakcije u ovoj sintezi obuhvatale su Luche-ovu redukciju, Furukawa-inu modifikovanu Simmons-Smith ciklopropanaciju i otvaranje ciklopropanskog prstena uz pomoć litijuma u tečnom amonijaku (*Yadav* et al., 2018). Naime, do sada je objavljeno ukupno devet radova koji se bave sintetskim pristupima za dobijanje pingvizenola. Od ukupno tri rada koja se bave enantioselektivnom sintezom pingvizenola, dva se odnose na sintezu (+)-pingvizenola, antipoda prirodno zastupljenog (-)-pingvizenola (stereohemije 1*S*,2*S*,3*S*,6*S*,7*R*) (*Sha* et al., 2003; *Yadav* et al., 2017; 2018). Preostali radovi fokusirani su na sintezu racemskog pingvizenola (slika 2.6.9.).



Slika 2.6.9. Odabrane sintetske šeme za pingvizon i deoksopingvizon. *Reagensi i uslovi: Schinzer i Ringe, 1996:* 1. A15, metoksi-dioksolan; 2. O₃, Sudan crveno, Zn/CH₃COOH; 3. LDA -78 °C PhSeBr, 4. H₂O₂; 5. CH₃MgBr, CuI; 6. LAH; 7. NaH, CS₂, MeI; 8. AIBN, Bu₃SnH; 9. A15. **Srikrishna i Vijaykumar, 1997:** 1. NaH, MeI, -50 °C; 2. (CH₂OH)₂, PTSA, PhH, 48h; 3. LAH, Et₂O, -70 °C; 4. MeC(OEt)₃, EtCO₂H (cat.), 180 °C, 48 h; 5. 3 M HCl, THF, 2 h; 6. 10% NaOH, MeOH, refluks, 4 h; 7. (COCl)₂, PhH, s.t., 2 h; MeCHN₂, Et₂O, 0 °C, 2 h; 8. Cu, CuSO₄, cikloheksan, refluks, 1.5 h; 9. K₂CO₃, MeOH, s.t., 48 h; 10. Li, liq. NH₃, THF; 11. NH₂NH₂, (CH₂OH)₂, 180 °C, 2 h; Na, 4 h; 12. PCC, CH₂Cl₂, 2 h. **Srikrishna i Vijaykumar, 2000:** 1. i. LDA, MeI, ii. DBU, iii. rekristalizacija, 2. i. MeMgI; ii. PCC-silika gel; 3. i. LAH, 4. CH₃C(OEt)₃, EtCO₂H, refluks; ii. NaOH; 5. i. (COCl)₂; ii. CH₃CHN₂, 6. CuSO₄, 7. O₃/O₂; Ac₂O, Et₃N, 8. Li, liq. NH₃; 9. Wolff-Kishner-ova redukcija, 10. PCC, silika gel. **Sha et. al. 2003:** 1. litijum cikloheksilzopropilamid, BuLi; 2. MeI; 3. CH₃Li, THF, -78 °C; 4. O₃, CH₂Cl₂; 5. DMS; 6. PTSA, PhH; 7. 4-(trimetilsilil)-3-butilil magnezijum hlorid, THF, -78 °C; CuI, HMPA, TMSCl, Et₃N, 8. *m*CPBA, NaI, CH₂Cl₂, 9. Bu₃SnH, AIBN, PhH, 65 °C; 10. TFA, CH₂Cl₂; 11. Pd/C, H₂, MeOH, 12. H₂NNH₂s, MeOH, refluks; 13. *n*-BuLi, TMEDA, heksan; 14. CrO₃, DMP, CH₂Cl₂; 15. Pd/C, H₂, MeOH. **Shiina et. al. 2007:** 1. NaBH₄, CeCl₃·7H₂O/ MeOH, -70 °C, 2. TIPSOTf, 2,6-lutidin/CH₂Cl₂, 0 °C, 3. DIBAL-H/CH₂Cl₂, 0 °C; 4. MsCl, pyr, 0 °C, 5. Na₂S/ DMF, s.t.; 6. Raney Ni W-4/THF, s.t.; 7. BH₃·THF/THF, 0 °C, potom H₂O₂, NaOH, s.t.; 8. TFAA, DMSO, Et₃N/CH₂Cl₂, -65 °C; 9. DBU/PhMe, 0 °C; 10. CH₂=CHMgBr, CuI/THF, -78 °C; 11. TESCl, Et₃N, LiI/CH₂Cl₂, 40 °C; 12. HCHO (aq.) Sc(OTf)₃/THF, 65 °C; 13. LiAlH(O*t*Bu)₃/THF, 0 °C; 14. TBSOTf, 2,6-lutidin/CH₂Cl₂, 0 °C; 15. OsO₄, Me₃NO/acetone, H₂O, 0 °C, potom NaIO₄, s.t.; 16. DBU/PhH, 50 °C; 17. HS(CH₂)₃SH, BF₃·OEt₂/CH₂Cl₂, 0 °C; 18. Raney Ni W-4/THF, refluks; 19. PDC/DMF, s.t.; 20. HS(CH₂)₃SH, BF₃·OEt₂/CH₂Cl₂, -78 °C; 21. Raney Ni W-4/ THF, refluks. **Yadav et. al. 2017:** 1. HS(CH₂)₂SH, BF₃·Et₂O, MeOH, 0 °C s.t., 24h; 2. PPh₃CH₃Br, *t*BuOK, PhMe, 60 °C, 3. Ti(NO₃)₃·3 H₂O, THF/MeOH/H₂O s.t., 1 h; 4. CeCl₃·7H₂O, MeOH, NaBH₄, -20 °C, 30 min; 5. Et₂Zn, CH₂Cl₂, PhH, *n*BuLi, -20 °C do s.t., 24 h; 6. imidazol, CH₂Cl₂, TBDPSCl, 0 °C do s.t., 12 h; 7. 10% Pd/C (Flow reaktor), EtOAc, 5 bari H₂, 0,3 mL/min protok 8. TBAF, THF, 24 h; 9. DMP, CH₂Cl₂, 0 °C do s.t., 1 h; 10. Li/liq. NH₃, THF, -33 °C, 15 min, K₂CO₃, MeOH. **Yadav et. al. 2018:** 1. CeCl₃·7H₂O, MeOH, NaBH₄, -20 °C, 1 h; 2. Et₂Zn, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, 0 °C 24 h; 3. DMP, CH₂Cl₂, 0 °C; 4. imidazol, TBDPSCl, CH₂Cl₂, 0–25 °C, 24 h; 5. DIBAL-H, 0 °C, CH₂Cl₂ 2 h; 6. TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, DMAP 0–25 °C, 24 h; LAH, THF, 50 °C, 12 h.

Upotreba Brønsted-ovih kiselina dovela je do transanularne ciklizacije (između C(2) i C(6)) enola sa neaktiviranim alkenom, predstavljajući inovativan asimetrični pristup za formiranje biciklo[4.3.0]nonanskog sistema pingvizanskih seskviterpenoida. Ova metoda pruža enantioselektivni put za sintetisanje ove klase molekula (Clarke et al., 2006). Daljim radovima koji se tiču transanularnih reakcija preko devetočlanog prstena su se bavili *Iqbal* i saradnici koristeći Brønsted-ovu kiselinu za transanularnu ciklizaciju ciklononenanskog prekursora sa *tetra*-supstituisanom dvostrukom vezom, kako bi se dobili biciklo[4.3.0]nonani (*Iqbal* et al., 2011). S druge strane, *Horak* je sa svojim saradnicima razvio trostepeni put za sintezu furo[2,3-*f*]-izoindola, koji su aza-analozi pingvizanskih seskviterpena (kao što su pingvizon, briopterin B, deoksopingvizon-15-oična kiselina, itd.). Oni su koristili anhidrid maleinske kiseline kao dienofil i vinilfuranski fragment kao unutrašnji dien u intramolekularnoj Diels-Alder vinilfuran reakciji, koja je predstavljala ključni korak u procesu sinteze (*Horak* et al., 2015).

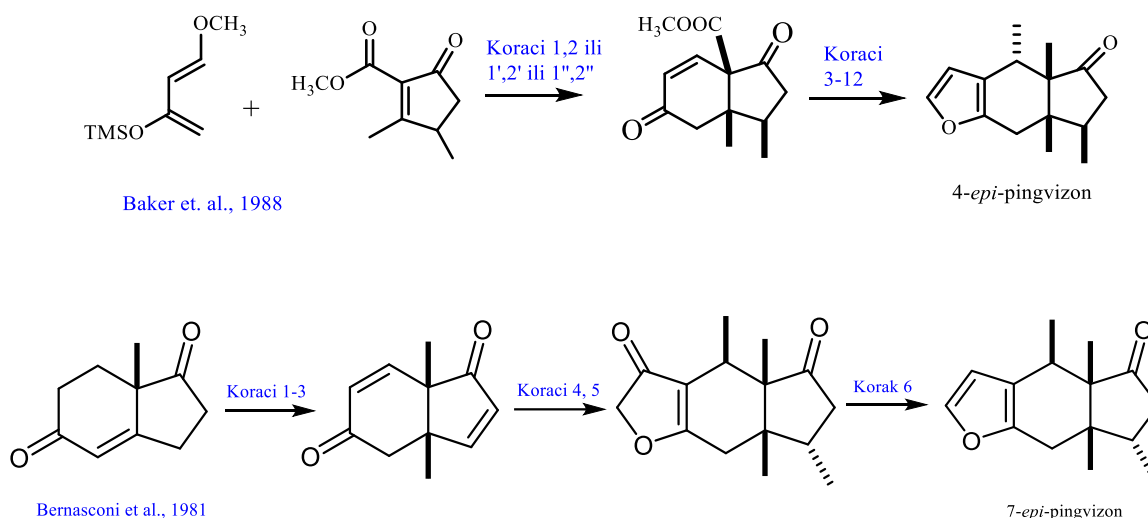
Shiina i *Nishiyama* su 2005. godine izvestili o prvoj potpuno uspešnoj sintezi akutifolona A (slika 2.6.10.), prirodnog proizvoda pingvizanskog tipa prvobitno identifikovanog od strane *Asakawa*-a i saradnika 1998. godine u jetrenjači *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. Startno jedinjenje sa biciklo[4.3.0.]nonaskim sistemom je dobijeno korišćenjem intramolekulske *Diels*-



Slika 2.6.10. Sintetski pristup za dobijanje akutifolona A, i bisakutifolona A i B. *Rreagensi i uslovi:* **Shiina i Nishiyama 2005:** 1. NaBH₄, CeCl₃·7H₂O, MeOH, -70 °C; 2. TIPSOTf, 2,6-lutidin, CH₂Cl₂, 0 °C; 3. DIBAL-H, CH₂Cl₂, 0 °C; 4. MsCl, piridin, 0 °C; 5. Na₂S, DMF, s.t.; 6. Raney Ni W-4, THF; 7. BH₃·THF, THF, 0 °C potom H₂O₂, NaOH, s.t.; 8. TFAA, DMSO, Et₃N/CH₂Cl₂, -65 °C; 9. DBU/PhMe, 0 °C; 10. CH₂CHMgBr, CuI, THF, -78 °C; 11. TESCl, Et₃N, LiI, CH₂Cl₂, 40 °C; 12. HCHO (aq.), Sc(OTf)₃, THF, 65 °C; 13. LiAlH(OtBu)₃, THF, 0 °C; 14. TBSOTf, 2,6-lutidin/CH₂Cl₂, 0 °C; 15. OsO₄, Me₃NO, acetone, H₂O, 0 °C, potom NaIO₄, s.t.; 16. DBU/PhH, 50 °C; 17. HS(CH₂)₃SH, BF₃·Et₂O, CH₂Cl₂, 0 °C; 18. Raney Ni W-4, THF, refluks; 19. PDC/DMF, s.t.; 20. NaClO₂, 2-metil-2-buten, NaH₂PO₄, tBuOH-H₂O, 0 °C; 21. TMSCHN₂, MeOH, 0 °C; 22. TIPSOTf, 2,6-lutidin, CH₂Cl₂, s.t.; 23. TBHP, 20% Pd(OH)₂-C, Cs₂CO₃, CH₂Cl₂, O₂, 0 °C; 24. CH₂CHMgCl, CeCl₃, THF, 0 °C; 25. CSA, MeOH, s.t. **Shiina et. al. 2007:** Sinteza akutifolona A; Modifikacija reakcionih uslova umetanjem sledećih reagenasa nakon koraka 1-21 istih kao kod Shiina i Nishiyama, 2005; 22. IBX, DMSO, THF, 80 °C; 23. CH₂CHMgCl, CuI/THF, -78 °C; 24. IBX ili TMSOTf, Et₃N, potom Pd(OAc)₂; Sinteza bisakutifolona A i B: BHT, PhMe, 120 °C. **Hsieh et al., 2009:** 1. NaH, CO(OMe)₂, THF, 2h refluks; 2. PhSeCl, piridin, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h onda 30% H₂O₂, 0 °C, 8 min; 3. MeLi, CuI, THF, -78 °C, 30 min; 4. PhSeCl, piridin, CH₂Cl₂, s.t., 3 h; potom 30% H₂O₂, 0 °C, 10 min; 5. 3-butenilmagnezijum bromid, CuI, THF/Me₂S (20:1), -78 °C, 30 min; 6. Pd(OAc)₂ (1.4 eq.), THF, s.t., 16 h; 7. H₂, 10% Pd/C, MeOH, s.t.; 8. LHMDs, THF, -78 °C, 15 min, potom TMSCl, 3 h; 9. Pd(OAc)₂, CH₃CN, refluks, 50 h; 10. vinilmagnezijum bromid, CuI, THF/Me₂S (20:1), -78 °C do 0 °C, 2 h; 11. LHMDs, THF, -78 °C, 15 min, potom TMSCl, 3 h; 12. Pd(OAc)₂, CH₃CN, refluks, 52 h. **Yadav et. al. 2018:** Sinteza akutifolona A: 1. CeCl₃·7H₂O, MeOH, NaBH₄, -10 °C, 1 h; 2. Et₂Zn, CH₂I₂, CH₂Cl₂, 30 min., 20 °C; 24 h 3. DMP, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h; 4. Li/liq. NH₃, THF, -33 °C, 15 min.; 5. LDA, -78 °C, MeI, 0 °C, 12 h; 6. etinil-TMS, BuLi, -78 °C, 12 h; 7. PCC, celit, CH₂Cl₂, 25 °C, 24 h; 8. K₂CO₃, MeOH, 0 °C, 1 h; 9. Lindlar-ov katalizator, hinolin, H₂ gas, EtOAc, 25 °C, 1 h; Sinteza bisakutifolona A i B: BHT, 24 h, 125 °C.

Alder-ove reakcije uz (*E*)-3-(3-hidroksihepta-4,6-dien-1-il)furan-2(5H)-on (Shiina i Nishiyama, 2005). Godine 2007., ista istraživačka grupa uspeła je da neznatno poveća ukupni prinos akutifolona A koristeći *Mukaiyama*-inu aldolnu reakciju za oksidaciju na položaju C-8 kao ključni korak (Shiina et al., 2007). U tom radu takođe su sintetisani dimerni proizvodi, **bisakutifolon A** i **bisakutifolon B**, koristeći biomimetsku intramolekulsku *Diels-Alder* dimerizaciju prirodnog

monomera (Shiina et al., 2007). Manje kompleksno startno jedinjenje, 4-metilcikloheksanon, korišćeno je od strane *Hsieh*-a i saradnika za totalnu sintezu racemskog akutifolona A, izvedenu u 14 koraka (Hsieh et al., 2009). Prva enantioselektivna totalna sinteza akutifolona A, kao i bisakutifolona A i B, postignuta je koristeći *Luche*-ovu redukciju, *Furukawa*-ovu modifikovanu *Simmons-Smith* ciklopropanaciju, otvaranje ciklopropanskog prstena uz pomoć litijuma u tečnom amonijaku, *Saegusa-Ito* oksidaciju, 1,3-oksidativno premeštanje pomoću PCC-a, i *Diels-Alder* dimerizaciju. Ova sinteza je izvedena polazeći od derivata (*R*)-pulegona (slika 2.6.10.) (Yadav et al., 2018).



Slika 2.6.11. Sintetski pristup ka 4-*epi*-pingvizonu i 7-*epi*-pingvizonu. *Reagensi i uslovi:* **Baker et. al. 1988:** 1. 155 °C, 24 h; 2. H₃O⁺; ili 1'. 13 kBar, 35 °C; 2'. CSA; ili 1". 13 kBar, 35 °C; 2". Bu₄NF; 3. NaBH₄, CeCl₃, MeOH, s.t.; 4. SEMCl, *i*PrNEt₂, CH₂Cl₂; 5. LAH, THF, s.t.; 6. TsCl, py, DMAP (1 eq.), s.t.; 7. NaI, Zn, HMPA, 110 °C; 8. TBAF, HMPA, 85 °C; 9. PCC, CH₂Cl₂; 10. Me₂CuLi; 11. ClCH₂COCl; 12. 9-BBN, 0 °C. **Bernasconi et. al. 1981:** 1. (CH₃)₂CuLi, anhid. Et₂O, -25 °C, 1 h; 2. Br₂, CH₃COOH, 5 °C, onda 10% NaOH; 3. CaCO₃, DMAc, refluks 2 h; 4. (CH₃)₂CuLi, anhid. Et₂O, -35 °C, 1 h 5. (CH₃)₂CuLi, anhid. Et₂O, zatim hloroacetilhlorid u Et₂O, -25 °C, 1 h; 6. 9-BBN, N₂, anhid. THF, 0 °C, 2 h.

Sinteza *epi*-pingvizana, koji se razlikuje od pingvizana jedino u orijentaciji metil grupe na C-15, takođe je uspešno realizovana. Sinteza **7-*epi*-pingvizona** obuhvata simetričnu aldolnu ciklizaciju Hajos-Parrish triketona, 2-metil-2-(3-oksobutil)ciklopentan-1,3-dion, u prisustvu katalitičkih količina (*S*)-(-)-prolina, kako bi se formirao hiralni sinton, (*S*)-(+)-2,3,7,7a-tetrahidro-7a-metilindenemetiliden-1,5(6H)-dion. Kvenčovanje enolata hloroacetil-hloridom, nakon stupnjevitog stereoselektivnog uvođenja druge angularne i, treće i četvrte meti-grupe (C-1 i C-4)

u indanski skelet, sa litijum dimetilkupratom u dietil-etru, ilustruje novi sintetski pristup β -furanonima (Bernasconi et al., 1981) (slika 2.6.11.). *Baker* i saradnici su koristili Danishefsky-dien (1-metoksi-3-(trimetilsiloksi)buta-1,3-dien) i dvostruko aktivirani dienofil (metil-2,3-dimetil-5-okso-ciklopent-1-en-karboksilat) u Diels-Alder reakciji ciklizacije za sintezu indena, iz čega se dobija još jedan *epi*-pingvizon, **4-*epi*-pingvizona** (slika 2.6.11.) (Baker et. al. 1988).

2.6.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST PINGVIZANSKIH SESKVITERPENA

Pripravci dobijeni iz lekovitih biljaka korišćeni su za lečenje i ublažavanje bolesti u svim civilizacijama, što je rezultiralo brojnim istraživanjima o višim biljkama u svrhu njihove medicinske primene, povezujući modernu i tradicionalnu medicinu (Verpoorte et al., 2006). Međutim, istraživanja koja se tiču ispitivanja konkretno briofita, u istu svrhu, vrlo su oskudna iako su se same briofite u tradicionalnoj medicini koristile u brojnim patološkim stanjima, uključujući lečenje posekotina, opekotina, spoljnih rana, bakterioze, plućne tuberkuloze, neurastenije, preloma, konvulzija, opekotina, uropatije, groznice i upale pluća (Glime, 2021). Jetrenjače, koje predstavljaju drugu po veličini grupu briofita, sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita, koji ispoljavaju različite biološke aktivnosti od značaja. Ove aktivnosti uključuju antimikrobna, antimikotična, antivirusna, citotoksična, antikancerogena, insekticidna, enzim inhibitorna, vazorelaksantna i druge efekte (Asakawa et al., 2013a). Mnogi od ovih metabolita karakterišu jedinstvene hemijske strukture, a neke od njih, poput pingvizanih seskviterpenoida, nisu prisutne ni u jednom drugom poznatom kopnenom ili morskom organizmu (Asakawa, 1982b; 1995a; 2013a; Ludwiczuk et al., 2011).

Ekstrakti i etarska ulja izolovani iz jetrenjača predstavljaju bogat izvor bioaktivnih molekula (Asakawa, 1982b; 1995a; Asakawa et al., 2013b). Utvrđeno je da ekstrakt jetrenjače *Bazzania novae-zelandiae* sadrži aktivne supstance koje deluju citotoksično protiv P-388 leukemije u panelu humanih tumorskih ćelijskih linija (NCI's) (Asakawa, 1995a). Pingvizanske frakcije (pingvizenol, norpingvizenol, norpingvizenol-acetat, norpingvizenol-metil-estar) izolovane iz dietil-etarskog ekstrakta vrste *P. canariensis*, u koncentracijama od 50 i 5 $\mu\text{g/mL}$, dovele su do blagog porasta bakterijskog rasta u biofilmovima Gram-negativne bakterije *Pseudomonas*

aeruginosa. Pingvizenol i norpingvizenol pokazali su značajnu korelaciju između rasta i formiranja biofilma, dok je norpingvizenol-acetat među testiranim jedinjenjima izdvojen kao najefikasniji, ispoljavajući 27% i 20% inhibicije stvaranja biofilma pri koncentracijama od 50 i 5 µg/mL, redom (Costerton et al., 1999; Gilabert et al., 2011). Ekstrakti nekih vrsta roda *Porella*, s druge strane, ispoljavaju antimikrobni efekat u odnosu na Gram-pozitivne bakterije i pokazuju ornitin dekarboksilaznu aktivnost (Pavletić i Stilinović, 1963; Toyota et al., 1991).

Norpingvizon izolovan iz vrste *P. vernicosa* i norpingvizon-metil-etar izolovan iz jetrenjače *P. elegantula* inhibiraju oslobađanje superoksida iz makrofaga morskog praseta pri koncentracijama od IC₅₀ 12,5-50 µg/ml i IC₅₀ 35 µg/ml, redom (Asakawa, 2007). U istraživanjima sprovedenim od strane Qang i Asakawa 2010. godine norpingvizon-metil-estar pokazao je inhibitornu aktivnost na produkciju NO u RAW 264.7 ćelijama stimulisanim LPS-om, dok je supresorna aktivnost norpingvizona bila slaba (IC₅₀ of 45,5 µmol) (Quang i Asakawa, 2010). Pingvizon, izolovan iz vrste *A. pinguis*, ispoljio je inhibitorni efekat na 10-13 dana stare larve polifagnog insekta *Spodoptera littoralis* Boisd. što ukazuje na potencijalnu primenu ovog jedinjenja za zaštitu biljaka od različitih insekata i smanjenje gubitka prinosa poljoprivrednih useva (Wada i Munakata, 1971).

Dehidropingvizenol je pokazao citotoksičnu aktivnost (ED₅₀ 12,5 µg/mL) na KB ćelije (Tori et al., 1993). Za 7-keto-8-karbometoksi-pingvizenol iz primeraka vrste *P. perrottetiana* sakupljenih u Japanu, utvrđeno je da poseduje značajnu citotoksičnu aktivnost u odnosu na ćelijske linije humane promijelocitne leukemije, HL-60 (IC₅₀ 8,53 µM), i humanog faringealnog skvamoznog karcinoma, KB ćelija (IC₅₀ 52,64 µM). Dva jedinjenja dobijena hemijskom transformacijom, 7-oksopingvizenol-12-metil-estar i 7α-hidroksipingvizenol-12-metil-estar, kao i akutifolon A, takođe su pokazala biološku aktivnost. Prva dva su drastično smanjila inhibitornu aktivnost u odnosu na HL-60 ćelija (IC₅₀ 83,10 µM) i izgubila aktivnost protiv KB ćelija (IC₅₀ > 177 µM), dok je akutifolon A pokazao povećanu citotoksičnu aktivnost u odnosu na HL-60 (IC₅₀ 2,65 µM) i KB ćelija (IC₅₀ 46,58 µM) (Komala et al., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. HEMIKALIJE I RASTVARAČI

Komercijalno dostupne hemikalije (p.a. čistoće): sirćetna kiselina, sumporna kiselina, vanilin, hlorovodonična kiselina, fosfomolibdenska kiselina, anhidrovani magnezijum-sulfat, amonijum-hlorid, natrijum-hidroksid, piridinium-hlorhromat (PCC), etanol, izopropanol, ugljendioksid, celit, litijum-aluminijumhidrid, polivinil-alkohol, natrijum-L-laktat, amonijum-hlorid, kao i rastvarači: dietil-etar (Et_2O), hloroform (CHCl_3), dihlormetan (CH_2Cl_2), heksan, metanol (MeOH), etanol (EtOH), dimetilsulfoksid (DMSO), deuterisani hloroform ($^{13}\text{CDCl}_3$), deuterisani benzen (C_6D_6) i *tris*-(6,6,7,7,8,8,8-heptafluor-2,2-dimetil-3,5-oktandionato)europijum(III) ($\text{Eu}(\text{fod})_3$), koji su korišćeni tokom rada, nabavljeni su od sledećih kompanija: *Acros Organics* (Moris Plejns, Nju Džersi, SAD), *Sigma Aldrich* (Sent Luis, Mizuri, SAD), *Merck* (Darmštat, Nemačka), *Carl Roth* (Karlsruhe, Nemačka), *Tokyo Chemical Industry Co.* (Tokio, Japan). Rastvarači (dietil-etar, metanol, *n*-heksan) su neposredno pre upotrebe prečišćeni destilacijom, dok su ostale hemikalije upotrebljavane bez prethodnog prečišćavanja.

3.2. METODE ANALIZE

3.2.1. NUKLEARNO-MAGNETNA REZONANTNA (NMR) SPEKTROSKOPIJA

Jednodimenzionalni (^1H i ^{13}C) i dvodimenzionalni (gHSQC, HSQC, HMBC, gHMBC, ^1H - ^1H COSY i NOESY) NMR spektri su uz DEPT-90 i DEPT-135 snimljeni na Bruker Avance III 400-MHz spektrometru (^1H na 400 MHz, ^{13}C na 100,6 MHz) (Bruker, Fällanden, Švajcarska). NMR spektri su snimljeni na 25 °C u deuterisanom hloroformu (CDCl_3) ili deuterisanom benzenu (C_6D_6). Vrednosti hemijskih pomeranja su u ^1H -NMR spektrima date u δ (ppm) jedinicama u odnosu na tetrametilsilan (Me_4Si , TMS) koji je korišćen kao unutrašnji standard ($\delta_{\text{H}}=0$ ppm), i/ili u odnosu na signale rastvarača (rezidualni CHCl_3 : δ_{H} 7,26, $^{13}\text{CDCl}_3$: δ_{C} 77,16; C_6HD_5 : δ_{H} 7,16 i $^{13}\text{CC}_5\text{D}_6$: δ_{C} 128,06) u heteronuklearnim 2D spektrima. 2D NMR spektri (NOESY, gHSQC, HMBC, gHMBC i ^1H - ^1H COSY), kao i višepulsni eksperimenti (DEPT90 i DEPT135) i eksperimenti selektivnog ^1H homonuklearnog dekuplovanja snimani su uz primenu uobičajnih pulsnih sekvenci koje su bile dostupne iz Brukerovih biblioteka pulsnih sekvenci. Skalarna sprezanja data su u hercima (Hz). Snimljeni spektri su obrađivani softverom *MestreNova* (ver.6.0.2-5475, Mestrelab Research, Španija) 11.0.3-18688, Mestrelab Research, La Korunja, Španija).

3.2.2. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)

Infracrveni spektri FT-ATR-IR (FT = *Fourier*-ova transformacija, ATR = oslabljena totalna refleksija (*attenuated total reflectance*)) čistih jedinjenja snimani su u obliku tankog sloja (*neat*) na instrumentu Thermo Nicolet, model 6700 FT-IR (Waltham, Masačusets, SAD), u Kriminalističko-tehničkom centru, MUP Niš.

3.2.3. ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS)

Ultraljubičasti spektri su snimani na spektrofotometru UV-1800 Shimadzu (Tokio, Japan), koristeći acetonitril kao rastvarač.

3.2.4. MASENA SPEKTROMETRIJA VISOKE REZOLUCIJE (HRMS)

Masena spektrometrija visokog razlaganja izvršena je na MStation JMS-700 masenom spektrometru (JEOL Peabody, Masačusec, USA), pri energiji jonizacije od 70 eV, jonskoj zamci od 300 μ A i temperaturi jonskog izvora od 230 °C. Greška dobijenog elementarnog sastava izračunata je *MStation* softverom i data je u milimassenim jedinicama (mmu).

3.2.5. GASNA HROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)

Za analizu etarskih ulja, ekstrakata, hromatografskih frakcija, izolovanih i sintetisanih jedinjenja, korišćena je GC–MS metoda. Ova analiza (3 injektovanja), izvedena je korišćenjem Hewlett-Packard 5975B detektora u kombinaciji sa Hewlett-Packard 6890N gasnim hromatografom, koji je opremljen kapilarnom DB-5MS kolonom (5% difenilsiloksana i 95% dimetilsiloksana, 30 m x 0,25 mm, debljina filma 0,25 μ m, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD), i direktno kuplovan sa 5975B masenim detektorom (MSD) iste kompanije. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV. Pun sken masenog detektora beležen je u intervalu m/z 35–650 amu (brzina skeniranja 5 skenova u sekundi), a dužina trajanja jednog skena je bila 0,32 s. Temperaturni režim rada: temperature injektora i detektora su održavane na 250, odnosno 320 °C; temperatura peći je programirana linearno od 70 do 310 °C brzinom rasta temperature od 5 °C/min, nakon toga je usledio izotermalni period u trajanju od 10 min; kao noseći gas korišćen je helijum, čiji je konstantni protok održavan na 1,0 ml/min. Injektirano je 1 μ l rastvora uzorka u etru (1 mg u 1 ml dietil-etra) (1:100, w/v), u pulsnom *split* modu (40:1), pri protoku od 1,5 ml/min u prvih 30 sekundi, a zatim 1,0 ml/min do kraja analize.

3.2.6. IDENTIFIKACIJA SASTOJAKA

Obrada rezultata uključuje upotrebu *MSD ChemStation* softvera (ver. D.03.00.611, Agilent Technologies, SAD) u kombinaciji sa programom *AMDIS* (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, Ver. 2,68; DTRA/NIST, 2002) koji se koristi za dekonvoluciju masenog skena, tj. ekstrakciju masenih spektara iz preklopljenih pikova, uz *NIST MS Search* programski paket (ver. 2.0d, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (NIST), SAD) koji obezbeđuje algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara. Hemijski sastav ispitivanih uzoraka određen je upoređivanjem literaturnih retencionih indeksa pojedinačnih komponenata (Adams, 2007), izračunatih u odnosu na C₇ – C₃₅ alkane (Van den Dool i Kratz, 1963), sa njihovim literaturnim vrednostima. Ovo poređenje je uključivalo upoređivanje masenih spektara ispitivanih jedinjenja u odnosu na masene spektre standarda i/ili masene spektre poznatih jedinjenja iz komercijalnih biblioteka kao što su *Wiley 11 (Wiley Registry of Mass Spectral Data 11th Edition)*, *NIST14 (NIST/EPA/NIH MassSpectral Library 14)*, *MassFinder 2.3*, *Adams* (Adams, 2007), i iz interne biblioteke masenih spektara istraživačke grupe „OSA“ (*Organic Synthesis and Analysis*) na Departmanu za hemiju, PMF-a u Nišu, napravljene na osnovu čistih supstanci. Kada je god to bilo moguće, identifikacija je potvrđivana koinjektiranjem sa standardom (alkani, alkoholi, metil-estri masnih kiselina, terpenoidi, aromatična jedinjenja, sintetisana i izolovana jedinjenja, itd). GC (FID) analiza izvedena je pod istim eksperimentalnim uslovima koristeći kolonu iste polarnosti koja je opisana za GC–MS. Procentualni sastav je dobijen integraljenjem hromatograma bez korišćenja korekcionih faktora.

3.2.7. ELEMENTNA MIKROANALIZA

Elementna mikroanaliza ugljenika, vodonika i kiseonika čistih jedinjenja izvršena je na Carlo Erba Elemental Analyzer 1106 (Carlo Erba Strumentazione, Milano, Italija) mikroanalizatoru, a dobijeni rezultati dobro su se slagali sa predviđenim (izračunatim) vrednostima.

3.2.8. OPTIČKA ROTACIJA

Optička rotacija merena je na Autopol IV (Rudolph, Research Analytical, Flanders, USA) polarimetru, opremljenom natrijumskom lampom (589 nm) i mikroćelijom od 10 cm.

3.3. METODE RAZDVAJANJA

3.3.1. TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA (TLC)

Tankoslojna hromatografija (TLC) vršena je na aluminijumskim pločama sa prethodno nanetim slojem silika-gela 60 (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.2 mm, Merck, Darmstadt, Nemačka). Kao eluenti su korišćene smeše heksana i dietil-etra različitih polariteta. Mrlje na TLC-u vizualizovane su pomoću UV lampe (254 nm) i izazvane su vanilin/H₂SO₄ reagensom (6% vanilin (w/v) i 1% H₂SO₄ (v/v) u etanolu), praćenim zagrevanjem ploča tokom 2 min. na 110 °C. Takođe, mrlje su vizualizovane prskanjem sa 50% (v/v) aq. H₂SO₄ ili 10% (w/v) etanolnim rastvorom fosfomolibdenske kiseline (250 ml EtOH i 12 g fosfomolibdenske kiseline), praćenim zagrevanjem u sušnici na 80 °C.

3.3.2. TEČNA HROMATOGRAFIJA PRI SREDNJIM PRITISCIMA (MPLC)

Preparativna MPLC razdvajanja sastojaka smeša vršena su na aparatu za MPLC hromatografiju Büchi (pumpa C-601 uz kontroler C-610 Work-21, Büchi, Flawil, Švajcarska), koristeći prethodno napakovanu kolonu (40 mm x 75 mm, silika-gel 60, raspodela veličine čestica 40-63 µm, Büchi, Flawil, Švajcarska). Protok mobilne faze iznosio je 2,5 ml/min, pri čemu je korišćena smeša heksana i dihlormetana pod gradijentnim uslovima.

3.3.3. „*DRY FLASH*“ HROMATOGRAFIJA

Za preparativno razdvajanje pomoću *dry flash* hromatografije korišćena je aparatura koja se sastojala od kolone silika gela 60 (veličina čestica od 40-63 µm, Acros Organics, Geel, Belgija), napakovane u sinterovanom staklenom levku srednje poroznosti i veličine, uz standardnu bocu

radi vakuum filtracije. Eluiranje je vršeno pod gradijentnim uslovima, koristeći čist heksan, smešu heksana i dietil-etra, čist dietil-etar, smeše dietil-etra i metanola, kao i čist metanol.

3.4. BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA

3.4.1. BILJNI MATERIJAL

Podaci o biljnom materijalu prikazani su u tabeli 3.4.1. U tabeli su navedeni lokaliteti i datumi sakupljanja dvaju vrsti jetrenjača roda *Porella* i vrste *Conocephalum conicum*, kao i njihovi vaučerski brojevi. Vaučerski primerci su deponovani u herbarskoj kolekciji „OSA“ (*Organic Synthesis and Analysis*) istraživačke grupe na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Tabela 3.4.1. Podaci o ispitivanim uzorcima

TAKSON	LOKALITET	DATUM SAKUPLJANJA	VAUČERSKI BROJ (HMN)	OZNAKA UZORKA	
				Etarsko ulje	Dietil-etarski ekstrakt
<i>Porella cordaeana</i> (Huebner) Moore	Srbija, Suva Planina (opština Niš), šumsko stanište, 1810 m nadmorske visine (43°12'01" S, 22°08'30" I)	25.9.2014.; 28.10.2016.	16189	SF-PCU	SF-PE
<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff.	Srbija, Veliki Kupci (opština Kruševac), šumsko stanište, 280 m nadmorske visine (43° 27' 12" S; 21° 14' 00" I)	28.5.2016.	13988	SF-KPK	-
	Bugarška, Planina Maljevica, šumsko stanište, 1803 m nadmorske visine (44° 33' 51" S; 18° 49' 39" I)	22.10.2005.		BUG	-
<i>Conocephalum conicum</i> (L.) Dum.	Srbija, Veliki Kupci (opština Kruševac), šumsko stanište, 280 m nadmorske visine (43°27'07.1" S, 21°14'28.5" I)	15.3.2016.	14005	SF-COK	CC1 (SF-COKE)
	Srbija, Veliki Kupci (opština Kruševac), obala potoka, 207 m nadmorske visine (43°27'12" S, 21°14'0" I)	22.3.2016.		-	CC3 (SF-285)
	Srbija, Vlasinsko jezero (Surdulica (Pčinjski okrug)), obala potoka, 1105	29. 10.2013.		-	CC2 (MM 317)

m nadmorske visine (42°40'42.2" S i 22°19'24.0" I)			
Srbija, Jelašnička klisura (opština Niška Banja), polupećinski zaklon pored reke, 293 m nadmorske visine (43° 16' 45" S; 22° 03' 51" I)	8.3. 2016.	SF-CON	-
Srbija, Planina Jastrebac (opština Kruševac), pored reke, 1492 m nadmorske visine (43°23'31" S, 21°26'57" I)	20.11.2018.	-	CC4 (SF-CONCJ)
Srbija, Vrelo reke Grze (opština Paraćin), pored reke, 500 m nadmorske visine (43°53'47.2" S, 21°38'45.0" I)	25.9. 2018.	-	CC-5 (SF-CONCG)

3.4.2. DOBIJANJE ETARSKIH ULJA

Etarska ulja su dobijena hidrodestilacijom odmerene mase fino usitnjenog biljnog materijala u vodi, koristeći aparat po Klevendžeru (*Clevenger*) tokom 3 h, što je u skladu sa zvaničnom procedurom navedenom u Evropskoj farmakopeji (Le Tarnec, 2004). Dobijena etarska ulja su ekstrahovana dietil-etrom iz izolovanog vodenog sloja, a dietil-etarski ekstrakt je sušen dodavanjem anhidrovanog magnezijum-sulfata ($MgSO_4$) do postizanja saturacije. Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtriranjem, rastvarač je potpuno uklonjen kratkotrajnim uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču (BUCHI RotavaporTM R-210, Fisher Scientific Ltd, Velika Britanija), i određen prinos etarskog ulja. Na ovaj način izolovana etarska ulja čuvana su na – 18 °C do analize ili daljeg frakcionisanja.

3.5. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE *PORELLA CORDAEANA*

3.5.1. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *P. CORDAEANA*

Biljni materijal jetrenjače *Porella cordaeana* (Huebener) Moore, prikupljen na padinama Suve planine, i osušen na vazduhu do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja, materijal je podvrgnut hidrodestilaciji u skladu sa protokolom opisanim u odeljku 3.4.2. Eksperimentalnog dela. Obradom 350 g osušenog biljnog materijala dobijeno je 950 mg etarskog ulja (0,27%). Dobijeno etarsko ulje iskorišćeno je za dalju izolaciju jedinjenja od interesa (videti Eksperimentalni deo 3.5.3.).

Dodatnom obradom 334 g biljnog materijala iste vrste i porekla, kroz tri uzastopne hidrodestilacije, dobijeno je ukupno 1040,3 mg (0,31%) etarskog ulja. Na ovaj način dobijeno etarsko ulje vrste *P. cordaeana* podvrgnuto je *dry flash* hromatografiji na koloni silika-gela 60 (40-63 μ m, Acros Organics, Gell, Belgija), pri čemu je za eluiranje primenjen gradijent od čistog heksana do čistog metanola. Razdvajanje je rezultiralo sa 59 frakcija (tabela 3.5.1.). Tok hromatografije praćen je pomoću TLC analize, a određene frakcije su međusobno spajane za dalju GC-MS analizu. U okviru ove analize, čisto jedinjenje 1 identifikovano je u frakcijama SF-PC 14 i SF-PC 15, koje su kasnije podvrgnute medicinskim testiranjima, što je detaljno objašnjeno u odeljku Rezultati i diskusija 4.1.5.

Tabela 3.5.1. Prikaz frakcija i njihovih masa dobijenih *dry flash* hromatografijom etarskog ulja vrste *P. cordaeana*

Eluent	Frakcije		Masa frakcija (mg)
Heksan (100, v/v)	1-5	SF-PC 1	237,1
		SF-PC 2	114,3
		SF-PC 3	28,3
		SF-PC 4	13,9
		SF-PC 5	1,8
Heksan:dietil-etar (97:3, v/v)	6-10	SF-PC 6	0,6
		SF-PC 7	49,7
		SF-PC 8	11,7
		SF-PC 9	5,9
		SF-PC 10	1,6

Heksan:dietil-etar (94:6, v/v)	11-23	SF-PC 11	/
		SF-PC 12	24,5
		SF-PC 13	23,6
		SF-PC 14	126,9
		SF-PC 15	146,8
		SF-PC 16	89,5
		SF-PC 17	23,6
		SF-PC 18	37,5
		SF-PC 19	7,8
		SF-PC 20	2,6
		SF-PC 21	/
		SF-PC 22	3,0
		SF-PC 23	6,2
Heksan:dietil-etar (88:12, v/v)	24-30	SF-PC 24-27	32,6
		SF-PC 28	7,1
		SF-PC 29	3,2
		SF-PC 30	2,2
Heksan:dietil-etar (75:25, v/v)	31-35	SF-PC 31	2,0
		SF-PC 32	11,6
		SF-PC 33	/
		SF-PC 34	1,3
		SF-PC 35	1,9
Heksan:dietil-etar (50:50, v/v)	36-44	SF-PC 36	11,0
		SF-PC 37	1,9
		SF-PC 38	1,9
		SF-PC 39	/
		SF-PC 40	2,8
		SF-PC 41	/
		SF-PC 42	0,8
		SF-PC 43	0,2
		SF-PC 44	1,9
Heksan:dietil-etar (25:75, v/v)	45-49	SF-PC 45	1,7
		SF-PC 46	1,1
		SF-PC 47	2,0
		SF-PC 48	1,0
		SF-PC 49	2,4
Dietil-etar (100, v/v)	50-53	SF-PC 50	/
		SF-PC 51	2,4
		SF-PC 52	1,7
		SF-PC 53	/
Dietil-etar:metanol (50:50, v/v)	54-56	SF-PC 54	44,6
		SF-PC 55-56	9,4
Metanol (100, v/v)	57-59	SF-PC 57	/
		SF-PC 58	/
		SF-PC 59	/

3.5.2. DOBIJANJE DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA BILJNE VRSTE *P. cordaeana*

Manji deo osušenog biljnog materijala jetrenjače *P. cordaeana* je usitnjen, izmeren i nakon toga potapan u staklenom sudu u odgovarajuću zapreminu dietil-etra (podrazumevajući da je 10 g biljnog materijala nalivano sa 50 ml), zatvoren i odložen na mračnom mestu. Nakon petnaestodnevnog stajanja, biljni material je odvojen filtracijom, a etarski ekstrakt je potom osušen iznad anhidrovanog MgSO_4 . Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, pristupljeno je uklanjanju etra destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču, na sobnoj temperaturi. Veći deo dobijenog suvog ostatka direktno je podvrgnut GC-MS analizi, sa ciljem da se utvrdi da izolovana jedinjenja nisu artefakti nastali tokom postupka analize. Preostali deo suvog ostatka čuvan je na -18°C do analize ili daljeg frakcionisanja, po potrebi.

3.5.3. IZOLOVANJE α -FURANOPINGVIZANOLA HROMATOGRAFSKIM RAZDVAJANJEM ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *P. cordaeana*

Jedinjenje α -furanopingvizanol, $(4S^*, 4aS^*, 7R^*, 7aS^*, 8S^*)$ -4,4a,7,7a-tetrametil-4a,5,6,7,7a,8-heksahid-ro-4*H*-indeno[5,6-*b*]furan-8-ol, izolovano je iz etarskog ulja jetrenjače *P. cordaeana* pomoću preparativnog MPLC razdvajanja. Primenjeno je gradijentno eluiranje pod gradijentnim uslovima od čistog heksana do čistog dihlormetana (CH_2Cl_2). Frakcije koje su sadržale α -furanopingvizanol davale su ljubičastu mrlju na TLC pločici nakon nanošenja vanilin/ H_2SO_4 reagensom (Eksperimentalni deo 3.3.1.). Spojene frakcije su predstavljale čisti α -furanopingvizanol u masi od 410 mg, R_f (sa čistim CH_2Cl_2) = 0,4. Podaci NMR dati su u tabeli 4.1.2., dok su spektroskopski podaci predstavljeni u prilogu (1-12, 14), kao i u okviru Rezultata i diskusije (slike 4.1.3., 4.1.5., 4.1.6.–4.1.8.).

α -Furanopingvizanol

Retencioni indeks (DB-5MS), RI = 1760;

EI-MS m/z relativni intenzitet (%): 234 (2,4) [M^+], 124 (100), 123 (8,7), 95 (8,6), 125 (7,8), 109 (5,2), 91 (3,4), 160 (3,3), 41 (3,2), 107 (3,1);

Elementna analiza; izračunato za $C_{15}H_{22}O_2$ (%): C, 76,88, H, 9,46, O, 13,66; nađeno: C, 76,91, H, 9,50, O, 13,59;

IR (cm^{-1}): 3463 (O–H), 3102 (C–H), 1120 (C–O), 1501 (C=C);

UV-Vis (nm): 223,5 ($\epsilon=3428$); $\alpha_D^{20} = -0,302^\circ$ ($c = 1,0$, $CHCl_3$).

3.5.4. SINTEZA FURANOPINGVIZANONA

Rastvor α -furanopigvizanola (0,5 mmol, 117 mg) u CH_2Cl_2 (5 ml) je u kapima dodat rastvoru piridinium-hlorhromata (PCC, 1,0 mmol, 216 mg) u 10 ml CH_2Cl_2 na 0 °C. Dobijena smeša je ostavljena da se zagreje do sobne temperature. Mešanje je nastavljeno tokom dodatna dva sata. Nakon toga dodato je 15 ml dietil-etra, rastvorni deo je dekantovan, dok je nerastvorni deo crne boje ispran dva puta sa 10 ml Et_2O . Spojeni organski slojevi propušteni su kroz tanak sloj silika-gela, osušeni anhidrovanim $MgSO_4$ i upareni na rotacionom vakuum-uparivaču, *in vacuo*. U cilju uklanjanja tragova supstanci koje sadrže hrom, proizvod je prečišćavan pomoću MPLC (izokratsko eluiranje sa CH_2Cl_2 :heksan =1:1, v/v) što je rezultovalo, u skladu sa TLC, GC-MS i NMR analizama, čistim jedinjenjem (furanopigvizanon, jedinjenje **2**) u prinosu od 97% (113 mg). Furanopigvizanon je bio vidljiv na TLC pločama pod UV svetlom (R_f (čist dihlormetan) = 0,5) ali se nakon prskanja vanillin/ H_2SO_4 reagensom nije mogao vizualizovati. Podaci NMR su dati u tabeli 4.1.4., dok su spektroskopski podaci dati u prilogu 13,15-19, kao i u okviru Rezultata i diskusije, slike 4.1.11., 4.1.12., 4.1.14. i 4.1.15.

Furanopigvizanon

Retencioni indeks (DB-5MS), RI =1887;

EI-MS m/z relativni intenzitet (%): 232 (68,2) [M^+], 122 (100), 109 (73,4), 121 (43,2), 217 (41,1), 176 (36,1), 66 (33,7), 177 (30,3), 161 (26,7), 175 (18,8);

Elementna analiza; izračunato za $C_{15}H_{20}O_2$ (%): C, 77,55; H, 8,68; O, 13,77; nađeno: C 77,48, H, 8,72, O, 13,80;

IR (cm^{-1}): 3105 (C–H), 1675 (C=O), 1503 (C=C);

UV-Vis (nm): 270,5 ($\epsilon = 3259$); $\alpha_D^{20} = -0,259$ ($c = 1,2$, $CHCl_3$).

3.5.5. REDUKCIJA FURANOPINGVIZANONA

Smeša furanopingvizanona (0,1 mmol, 23,2 mg) i litijum-aluminijumidrida (1,0 mmol, 38,0 mg) mešala se u dietil-etru na sobnoj temperaturi tokom jednog sata. Potom je reakciona smeša ohlađena na 0 °C i obrađena sukcesivnim dodavanjem vode (1 ml), 15% NaOH (1 ml), i opet vode (1 ml). Smeša je potom ekstrahovana sa CH_2Cl_2 , osušena anhidrovanim $MgSO_4$ i uparena na rotacionom vakuum-uparivaču. Analize TLC, GC-MS i NMR potvrdile su da je proizvod reakcije bilo čist α -furanopingvizanol (23,0 mg, prinos 98%).

3.6. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE *CONOCEPHALUM CONICUM*

3.6.1. DOBIJANJE DIETIL-ETARSKIH EKSTRAKATA JETRENJAČE *C. CONICUM*

Biljni materijal jetrenjače *C. conicum* prikupljen je sa različitih lokaliteta širom Srbije. Uzorci iz šumskog područja u blizini sela Veliki Kupci označeni su kao **CC1**. Biljni materijal, tokom dalje analize označen kao **CC2**, odnosi se na uzorke *C. conicum* prikupljene tokom 2013. godine sa područja Vlasinskog jezera smeštenog, jugoistočna Srbija. Uzorci označeni kao **CC3** podrazumevaju materijal iste vrste prikupljen krajem maja 2016. godine sa obale potoka u blizini Velikih Kupaca (tabela 3.4.1.). U jesen 2018. godine, uzorak **CC4** je prikupljen sa zemljišta u blizini potoka na planini Jastrebac, dok **CC5** predstavlja materijal iste vrste prikupljen iste godine sa vlažnog zemljišta u blizini izvora reke Grze (tabela 3.4.1.).

Svež biljni materijal jetrenjače *C. conicum* (**CC1–CC5**; 80–400 g) je usitnjen, i nakon vaganja ostavljen da se macerira sa 2 L sveže destilovanog Et₂O (oslobođenog od peroksida i stabilizatora) na sobnoj temperaturi, zaštićen od direktne sunčeve svetlosti, tokom 7 dana uz povremeno mešanje. Nakon sedam dana maceracije, biljni materijal je odvojen filtracijom, a dietil-etarski ekstrakt je osušen iznad anhidrovanog MgSO₄. Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, dietil-etar je uklonjen destilacijom na rotacionom vakuum-uparivaču na sobnoj temperaturi. Suvi ostatak (uzorci **CC1–CC5**; 56 mg–1,8 g) je zatim gravitacionom filtracijom kroz kolone pakovane sa 2 g Celita (Merck, Darmštadt, Nemačka) očišćen od nerastvornih materija. Ostatak je potom koncentrisan na sobnoj temperaturi pomoću struje azota i pripremljen za GC-MS analizu, odnosno dalje frakcionisanje.

3.6.2. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE DIETIL-ETARSKIH EKSTRAKATA JETRENJAČE *C. CONICUM*

U cilju razdvajanja sastojaka, dietil-etarski ekstrakt *C. conicum*, **CC1** (pri procesu ekstrakcije obeležen kao SF-CONH), podvrgnut je *dry-flash* hromatografskom razdvajanju na

koloni silika-gela 60 (40-63 mm, Acros organics, Gell, Belgija) u skladu sa procedurama opisanim u Eksperimentalnom delu 3.3.3. Eluiranje je izvedeno gradijentno, počevši od smeše heksan:dietil-etar (99:1, v/v) do čistog metanola, kroz 65 frakcija (tabela 3.6.1.). Tok hromatografije praćen je pomoću TLC i GC-MS analize. Na osnovu GC-MS analize jedno od jedinjenja od interesa, jedinjenje **3**, predstavljale su frakcije SF-CONH 24-27 i SF-CONH 28, eluirane heksan:dietil-etrom (90:10, v/v) (tabela 3.6.1.). Ovo jedinjenje podvrgnuto je medicinskim testiranjima, detaljno opisanim u delu Rezultati i diskusija 4.3.7. Daljim eluiranjem i promenom eluenata (tabela 3.6.1.) nije bilo moguće izolovati čista nepoznata jedinjenja od interesa, što nas je podstaklo na dalje istraživanje.

Tabela 3.6.1. Prikaz rezultata frakcionacije *dry flash* hromatografijom dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum* (SF-CONH) poreklom iz Velikih Kupaca (CC1)

Eluent	Frakcije		Masa frakcija (mg)
Heksan:dietil-etar (99:1, v/v)	1-5	SF-CONH 1	31,5
		SF-CONH 2	3,6
		SF-CONH 3	25,2
		SF-CONH 4	8
		SF-CONH 5	
Heksan:dietil-etar (98:2, v/v)	6-14	SF-CONH 6	21,8
		SF-CONH 7	
		SF-CONH 8	4
		SF-CONH 9	
		SF-CONH 10	7,1
		SF-CONH 11	
		SF-CONH 12	
		SF-CONH 13	
Heksan:dietil-etar (95:5, v/v)	15-19	SF-CONH 14	
		SF-CONH 15	11,4
		SF-CONH 16	
		SF-CONH 17	4,8
		SF-CONH 18	14,7
Heksan:dietil-etar (90:10, v/v)	20-28	SF-CONH 19	4,2
		SF-CONH 20	23,8
		SF-CONH 21	18,2
		SF-CONH 22	8,3
		SF-CONH 23	
		SF-CONH 24	
		SF-CONH 25	18,6
		SF-CONH 26	
		SF-CONH 27	
		SF-CONH 28	5
		SF-CONH 29	36,1
		SF-CONH 30	
		SF-CONH 31	

Heksan:dietil-etar (75:25, v/v)	29-42	SF-CONH 32	32,2
		SF-CONH 33	
		SF-CONH 34	
		SF-CONH 35	
		SF-CONH 36	
		SF-CONH 37	21,1
		SF-CONH 38	
		SF-CONH 39	
		SF-CONH 40	
		SF-CONH 41	
		SF-CONH 42	
Heksan:dietil-etar (50:50, v/v)	43-52	SF-CONH 43	2,9
		SF-CONH 44	/
		SF-CONH 45	/
		SF-CONH 46	/
		SF-CONH 47	8,2
		SF-CONH 48	3,6
		SF-CONH 49	/
		SF-CONH 50	/
		SF-CONH 51	4,1
		SF-CONH 52	
Heksan:dietil-etar (25:75, v/v)	53-59	SF-CONH 53	14,7
		SF-CONH 54	
		SF-CONH 55	12,5
		SF-CONH 56	
		SF-CONH 57	17,2
		SF-CONH 58	
Dietil-etar (100, v/v)	60-63	SF-CONH 59	
		SF-CONH 60	13,3
		SF-CONH 61	
		SF-CONH 62	51,2
Dietil-etar:metanol (50:50, v/v)	64	SF-CONH 63	
Dietil-etar:metanol (50:50, v/v)	64	SF-CONH 64	24,3
Metanol (100, v/v)	65	SF-CONH 65	18,8

Hromatografsko razdvajanje **CC3 (SF-285)** sprovedeno je gradijentnim eluiranjem koristeći 50 ml 1%-tne smeše heksana i dietil-etra (0,5 ml dietil-etra i 49,5 ml heksana), koje je postepeno prelazilo na eluiranje čistim metanolom (tabela 3.6.2.). Razdvajanje je obuhvatilo ukupno 52 frakcije (tabela 3.6.2.). Eluiranjem smešom heksan/dietil-etar (90:10, v/v) dobijene su frakcije SF-285-19 i SF-285-20, koje su predstavljale čist konocefalenol. Tako izolovani konocefalenol korišćen je za dalja medicinska ispitivanja, kao što je objašnjeno u delu Rezultati i diskusija 4.3.7. Daljim spiranjima dobijene su frakcije, sa manje ili više prisutnim, pretežno istim, konstituentima analiziranog ekstrakta. Međutim, čisto nepoznato jedinjenje **3**, koje je ranije bilo

podvrgnuto medicinskim testiranjima, nije ponovo izolovano. Eluiranjem čistim dietil-etrom dobijene su frakcije SF-285-46 i SF-285-46-1 (tabela 3.6.2.), koje su predstavljale čista nepoznata jedinjenja **4** i **5**. Ova jedinjenja od interesa podvrgnuta su medicinskim istraživanjima, prema metodologiji opisanoj u delu Rezultati i diskusija 4.3.7.

Tabela 3.6.2. Prikaz rezultata frakcionacije *dry flash* hromatografijom dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum* (SF-285) poreklom iz Velikih Kupaca (CC3)

Eluent	Frakcije		Masa frakcia (mg)
Heksan:dietil-etar (99 :1, v/v)	1-6	SF-285-1	14,5
		SF-285-2	4
		SF-285-3	
		SF-285-4	193,8
		SF-285-5	81,6
		SF-285-6	10,8
Heksan:dietil-etar (98 :2, v/v)	7-10	SF-285-7	3,9
		SF-285-8	7,1
		SF-285- 9	15
		SF-285-10	
Heksan:dietil-etar (95%:5%)	11-18	SF-285-11	34,2
		SF-285-12	
		SF-285-13	
		SF-285-14	14,8
		SF-285-15	42
		SF-285-16	
		SF-285-17	63,9
		SF-285-18	
Heksan:dietil-etar (90 :10, v/v)	19-28	SF-285-19	70
		SF-285-20	
		SF-285-21	18,4
		SF-285-22	8,7
		SF-285-23	10,6
		SF-285-24	19,2
		SF-285-25	8,9
		SF-285-26	8,1
		SF-285-27	
		SF-285-28	8,7
Heksan:dietil-etar (75:25, v/v)	29-37	SF-285-29	25,3
		SF-285-30	21,3
		SF-285-31	64,4
		SF-285-32	
		SF-285-33	
		SF-285-34	
		SF-285-35	10,2
		SF-285-36	7,3
Heksan:dietil-etar (50 :50, v/v)	38-41	SF-285-37	
		SF-285-38	16,6
		SF-285-39	13
		SF-285-40	

		SF-285-41	6,8
Heksan:dietil-etar (25:75, v/v)	42-45	SF-285-42	34,8
		SF-285-43	
		SF-285-44	22,7
		SF-285-45	
Dietil-etar (100, v/v)	46-49	SF-285-46	6,8
		SF-46-1	3,4
		SF-285-47	7,7
		SF-285-48	6,3
		SF-285-49	
Dietil-etar:methanol (50:50, v/v)	50-51	SF-285-50	48,1
		SF-285-51	
Metanol (100, v/v)	52	SF-285-52	36,7

S obzirom na to da *dry flash* hromatografijom **CC-3** ekstrakta nismo dobili čisto jedinjenje **3**, koje je bilo potrebno za detaljnu strukturnu analizu, i imajući u vidu potrebu za dodatnim izolovanjem čistih jedinjenja **4** i **5**, sa istim ciljem, izvršili smo spajanje biljnog materijala sa različitih lokacija koji dokazano sadrže jedinjenja od interesa. Spojeni ekstrakti **CC1**, **CC3**, i **CC4** (4,85 g) podvrgnuti su gradijentnoj *dry-flash* hromatografiji na koloni silika-gela 60. Primenjen je gradijent koristeći smešu heksana i dietil-etra. Tok hromatografije praćen je pomoću TLC i GC-MS analize. Dobijeno je ukupno 50 frakcija. Na osnovu GC-MS analize utvrđeno je da frakcija 19 (260 mg; heksan–Et₂O, 11,5:1, v/v) i frakcija 27 (86 mg; heksan–Et₂O, 9:1, v/v) predstavljaju čista jedinjenja, konocefalenol i (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (jedinjenje **3**). Jedinjenja *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol (jedinjenje **4**) i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol (jedinjenje **5**) su izolovana kao čista iz frakcije 46 (51 mg; heksan–Et₂O, 1:19, v/v) i frakcije 49 (37 mg; čist Et₂O), nakon ponovljene izokratske hromatografije (heksan–Et₂O, 1:19, v/v) na koloni silika gela. NMR podaci analiziranih jedinjenja dati su u tabelama 4.3.2., 4.3.4. i 4.3.5., kao i u prilogima 21, 40, 49, 50, dok se spektroskopski podaci nalaze kako unutar priloga 22-36, 41-48, 51-58, tako i u okviru Rezultata i diskusije (slike 4.3.4., 4.3.7. i 4.3.9).

Konocefalenol [rel-(1*R*,9*S*)-brazila-5-en-10-ol; rel-(1*S*,7*αR*)-2-(1,6,6-trimetil-2,3,5,6,7,7*α*-heksahidro-1*H*-inden-4-il)propan-2-ol]:

Bezbojna uljasta supstanca;

Retencioni indeks (DB-5MS), RI= 1496;

EI-MS m/z relativni intenzitet (%): 222 (3) [M^+], 207 (59), 204 (100), 189 (99), 149 (90), 133 (71), 107 (54), 105 (60), 93 (54), 91 (62), 59 (82), 43 (81);

HREIMS m/z 222,1979 [M^+], (izračunati za $C_{15}H_{24}O$, 222,1984); anal. C 81,05, H 11,86, O 7,09 %, izračunati za $C_{15}H_{24}O$, C 81,02, H 11,79, O 7,19%.

(1Z,4E)-Lepidoza-1(10),4-dien-14-ol [izolepidozen-14-ol; (*rel*-(1*R*,4*Z*,8*E*,10*R*)-8,11,11-trimetilbiciklo[8.1.0]undeka-3,8-dien-3-il)metanol]

Bezbojna uljasta supstanca;

Retencioni indeks (DB-5MS), RI =1730;

EI-MS m/z relativni intenzitet (%): 220 (7) [M^+], 189 (29), 159 (20), 145 (15), 133 (22), 121 (100), 107 (96), 105 (62), 93 (98), 91 (73), 81 (34), 79 (56), 77 (46), 67(33), 55 (35), 41 (60);

IR (cm^{-1}) (neat) V_{max} 3276, 2916, 2849, 1645, 1443, 1376, 1239, 1157, 1015, 992, 907, 889, 856, 839, 719 cm^{-1} ;

HREIMS m/z 220,1798 [M^+], (izračunati za $C_{15}H_{24}O$, 220,1827); anal. C 81,81, H 10,96, O 7,23%, izračunati za $C_{15}H_{24}O$, C 81,76, H 10,98, O 7,26%.

***rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-Germakra-1(10),5-dien-11,14-diol** [2-(*rel*-(1*R*,2*E*,4*S*,7*Z*)-8-(hidroksimetil)-4-metilciklodeka-2,7-dien-1-il)-propan-2-ol]

Bezbojna uljasta supstanca;

Retencioni indeks (DB-5MS), RI =1904;

EI-MS m/z relativni intenzitet (%): 238 (2) [M^+], 149 (45), 147 (59), 119 (40), 105 (70), 93 (33), 92 (21), 91 (74), 80 (59), 79 (48), 59 (100);

IR (cm^{-1}) (neat) V_{max} 3254, 2962, 2908, 2850, 1662, 1437, 1375, 1361, 1282, 1215, 1164, 1132, 1114, 1082, 1062, 1040, 1028, 984, 927, 908, 888, 867, 859, 843, 810, 769, 732 cm^{-1} ;

HREIMS m/z : 238,1925 [M^+], (izračunati za $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$, 238,1933); anal. C 75,63, H 11,02, O 13,35%, izračunati za $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$, C 75,58, H 10,99, O 13,42%.

***rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-Humula-1(10),5-dien-7,14-diol** (germakranski sistem numeracije) [*rel*-(1*Z*,3*S*,5*E*,10*R*)-humula-1,6-dien-10,14-diol (farnezanski sistem numeracije), *rel*-(1*R*,3*E*,5*S*,8*Z*)-9-(hidroksimetil)-2,2,5-trimetilcikloundeka-3,8-dien-1-ol]

Bezbojna uljasta supstanca;

Retencioni indeks (DB-5MS), RI =1906;

EI-MS m/z relativni intenzitet (%): 238 (2) [M^+], 133 (30), 109 (38), 107 (88), 95 (99), 93 (33), 81 (100), 79 (34), 69 (39), 67 (67), 55 (65), 43 (35), 41 (76);

IR (cm^{-1}) (neat) V_{max} 3447, 2960, 2918, 2855, 1666, 1425, 1370, 1280, 1210, 1150, 1077, 984, 971, 927, 866, 815, 699 cm^{-1} ;

HREIMS m/z : 238,1941 [M^+], (izračunati za $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$, 238,1933); anal. C 75,55, H 10,98, O 13,47%, izračunati za $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$, C 75,58, H 10,99, O 13,42%

3.6.3. OKSIDACIJA FRAKCIJE 24

Frakcija 24 rastvorena je u dihlormetanu (30 mg u 5 mL dihlormetana). Uz mešanje, u kapima je dodavan piridinium-hlorhromat (100 mg, 0,46 mmol) suspendovan u 5 ml anhidrovanog dihlormetana na sobnoj temperaturi, sve dok rastvor nije zadržavao narandžastu boju. Nakon 2 h, dodat je Et_2O (20 ml), a supernatant je dekantovan od nerastvornog rezidualnog dela. Nerastvorni ostatak je ispran sa Et_2O (4×10 ml). Spojeni organski slojevi propušteni su kroz tanak sloj silika-gela i osušeni anhidrovanim MgSO_4 , a rastvarač je uklonjen na rotacionom vakuum-uparivaču. Spektroskopski podaci izolepidozen-14-ala dobijeni su analizom NMR

spektra snimljenog za oksidovani uzorak bez razdvajanja. NMR podaci predstavljeni su u tabeli 4.3.3., dok su spektroskopski podaci dati u Prilozima 37-39, 59.

Izolepidozen-14-al [(1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-al; (1*R**,4*Z*,8*E*,10*R**)-8,11,11-trimetilbiciklo[8.1.0]undeka-3,8-dien-3-il)metanol]

Retencioni indeks (DB-5MS), RI =1683;

EI-MS *m/z* relativni intenzitet (%): 218 (4) [M^+], 149 (26), 138 (34), 121 (71), 119 (24), 107 (100), 105 (46), 93 (71), 91 (69), 81 (33), 79 (45), 77 (38), 41 (36);

3.7. TESTIRANJE TOKSIKOLOŠKE/FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI ODABRANIH JEDINJENJA

3.7.1. LEKOVI I HEMIKALIJE KORIŠĆENI U ISPITIVANJIMA

Medijum za ćelijske kulture (RPMI-medijum, kupljen od Sigma-Aldrich, Sent Luis, MO, SAD) korišćen u svim eksperimentima, sastojao se od RPMI 1640 medijuma sa dodatih 20 mM/L HEPES i L-glutaminom (bez natrijum-bikarbonata). Ovaj medijum sadržao je i dodatak od 5% (w/v) seruma fetusa govečeta, 200 µg/mL streptomicina i 200 IU/mL penicilina G. Streptomicin i penicilin G kupljeni su od AppliChem, Darmštat, Nemačka. Deksametazon (Dex) je nabavljen od Galenike (Beograd, Srbija), dok su lipopolisaharid iz serotipa 0111:B4 *Escherichia coli* (LPS), konkanavalin A (ConA), natrium-3,3'-[(3,3'-dimetil[1,1'-bifenil]-4,4'-dil)bis(azo)]bis[5-amino-4-hidroksi-naftalen-2,7-disulfonat] (tripan-plavo, TB) i 3-(4,5-dimetiltijazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT) kupljeni od Sigma-Aldrich (St. Louis, Mizuri, SAD). Takođe, od hemikalija su tokom medicinskih testiranja korišćeni i etanol, metanol, sirćetna kiseina, hlorovodonična kiselina, dietil-etar, amonijum-hlorid, izopropanol, etidijum-bromid, EDTA, DMSO, PBS (fiziološki rastvor puferovanog fosfata pH 7,2–7,3), Tris-HCl pufer, kao i fosfatni pufer koji se sastojao od 17% polivinil-alkohola, 3 mM natrijum-adenin-dinukleotida (NAD^+), 150 mM natrijum-L-laktata, 0,32 mM 1-metoksifenazin-metosulfata, 5 ml natrijum-azida (NaN_3) i 5 mM tetrazolijumnitro-palvog (NBT). Svi ovi rastvarači i hemikalije korišćeni u istraživanju kupljeni su od kompanija Sigma-Aldrich (St. Louis, Mizuri, SAD), Merck (Darmšadt, Nemačka) ili Carl Roth (Karlsruhe, Nemačka).

3.7.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U eksperimentima obavljenim u ovoj disertaciji korišćeni su mužjaci i ženke pacova soja Wistar, starosti 2–3 meseca, težine 250–300 g. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22 ± 2 °C, vlažnost 60%, sa hranom i vodom dostupnom *ad libitum*) u Vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja, na Medicinskom fakultetu,

Univerziteta u Nišu. Svi eksperimentalni postupci sa životinjama sprovedeni su u skladu sa deklaracijom iz Helsinkija (2013.) i smernicama Evropske zajednice za etičko postupanje sa eksperimentalnim životinjama (Direktiva EU iz 2010. godine; 2010/63/ EU) i takođe su odobreni od strane lokalnog etičkog odbora (pod brojevima 01-6481-14 i 323-07-06862/2016-05/2).

3.7.3. IZOLOVANJE I KULTIVACIJA ČELIJA

Nakon eutanazije, eksperimentalna životinja je naprskana etanolom, trbušna duplja otvorena i špricom je, uz potpomaganje sahatnim staklom (kako bi sklonili creva), duplja isprana PBS-om. Eksudat je prikupljen špricom i prebačen u hladenu epruvetu. Pre odstranjivanja spoljnih delova slezina je održavana u sterilnim uslovima; preciznije, pincetom je uronjena u rastvor joda, a zatim isprana PBS-om. Slezina je potom pažljivo secirana na manje delove koristeći makaze, nakon čega je izvršena pasaža kroz 40- ,100- μm ćelijsko sito (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD). Komadići slezine su, jedan po jedan, trljani plastičnim delom šprica kroz sito, a zatim ispirani sa po 1 ml PBS-a. Tečnost je dopunjena do 20 ml u epruveti, nakon toga, epruveta je centrifugirana 10 min. pri 1200 rpm, a supernatant uklonjen. Zatim je dodato 2 ml PBS-a i 6 ml toplog izotoničnog rastvora amonijum-hlorida kako bi se lizirali eritrociti, koji bi inače bili prisutni na razmazu. Nakon inkubacije od 7 min., dodato je još 10 ml PBS-a, ponovo centrifugirano na gore pomenuti način, i potom odliven supernatant.

Nakon pripreme, splenociti su resuspendovani u RPMI-medijumu, pri čemu je koncentracija ćelija podešena na $2,5 \times 10^6$ ćelija/ml. Vijabilnost ovih ćelija određena je bojenjem tripan-plavim (>95% vijabilnih ćelija). Ćelije su zatim prebačene u mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemačka), pri čemu je svaki bunarić sadržao 100 μl ćelijske suspenzije. U ovu suspenziju dodat je ili RPMI-medijum sa 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ConA, ili RPMI-medijum sa 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Kao negativna kontrola korišćen je RPMI-medijum, dok je kao pozitivna kontrola korišćen deksametazon u konačnim koncentracijama od 1×10^{-1} mM i 10^{-6} M po bunariću.

Testirani su (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (jedinjenje 3), *rel*-(1(10)Z,4S,5E,7R)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol (jedinjenje 4), *rel*-(1(10)Z,4S,5E,7R)-humula-1(10),5-dien-

7,14-diol (jedinjenje 5) i konocefalenol u sedam različitih koncentracija: 5×10^{-4} , $2,5 \times 10^{-4}$, 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} i 1×10^{-8} M. Takođe, prilikom analize (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje 3), *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola (jedinjenje 4), *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diola (jedinjenje 5), pri tri najniže testirane koncentracije (1×10^{-6} , 1×10^{-7} i 1×10^{-8} M) izvršeno je i resuspendovanje ćelija splenocita u RPMI-medijumu uz podešavanje gustine na 2×10^6 ćelija/ml, kao i za α -furanopingvizanol (jedinjenje 1) i furanopingvizanon (jedinjenje 2). Jedinjenja α -furanopingvizanol i furanopingvizanon testirana su u devet koncentracija (od 10^{-4} do 10^{-8} M). Na gore navedene načine napunjene mikrotitarske ploče, inkubirane su na 37 °C tokom 24 i 48 h pod atmosferom sačinjenom od 95% vazduha sa 5% (v/v) ugljen-dioksida. Svi eksperimenti su izvođeni u kvadriplikatu i ponovljeni su tri puta.

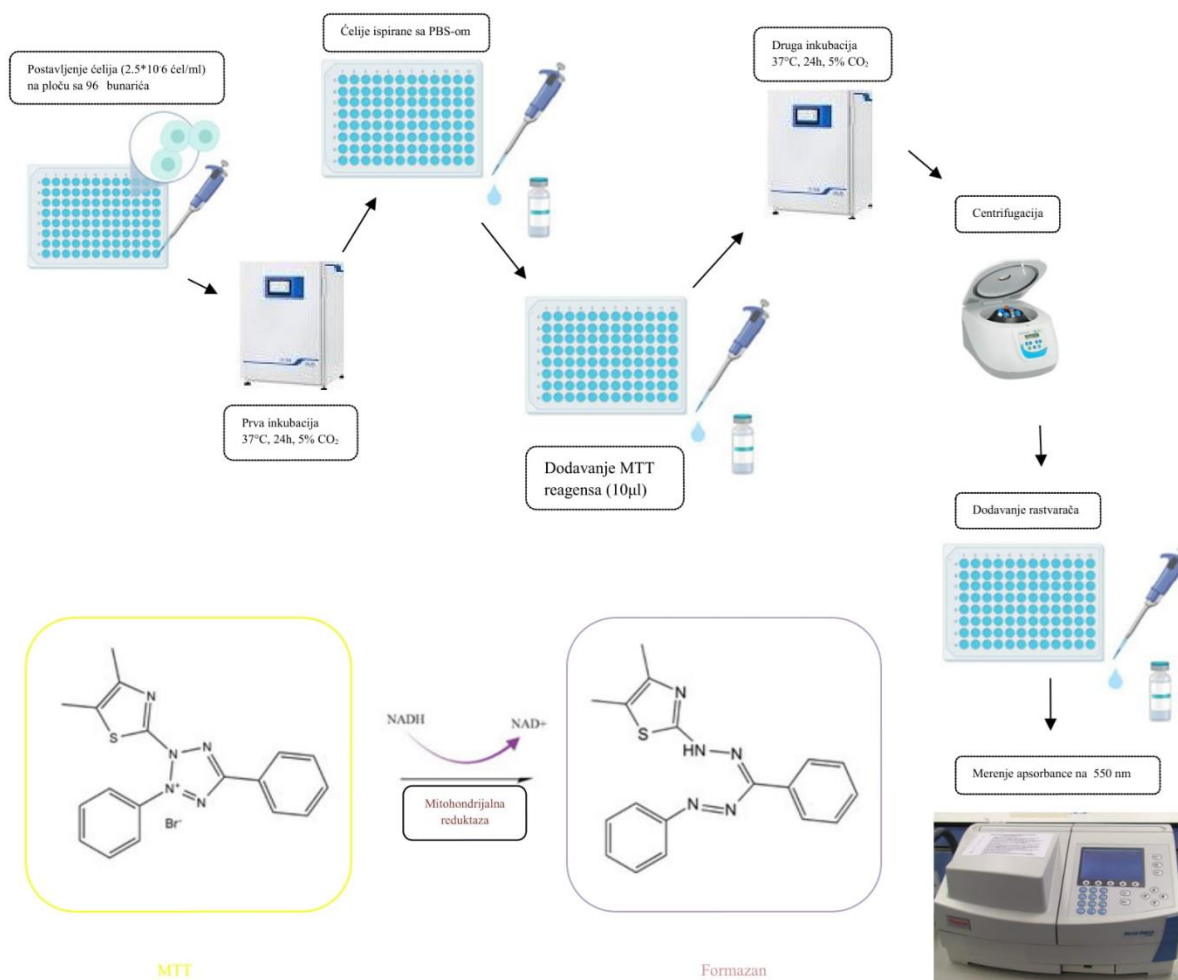
3.7.4. ĆELIJSKA VIJABILNOST

Ćelijska vijabilnost je određena na osnovu tri različita testa: MTT-testa, NR-testa i testa sa tripan-plavim (TB). Kolorimetrijska metoda koja omogućava preciznu kvantitativnu procenu citotoksičnosti i ćelijske proliferacije na osnovu metaboličke aktivnosti ćelija predstavlja MTT-test. Ova metoda se zasniva na sposobnosti mitohondrijalnih enzima da redukuju tetrazolijumske soli (MTT), koje su žute boje, u nerastvorne kristale formazana. Kako je formazan nerastvoran u vodi, kristali se rastvaraju u zakišeljnom izopropanolu, pri čemu nastaje ljubičasti rastvor (slika 3.7.1.), da bi se izvršila kvantifikacija. Koncentracija formazana u rastvoru se određuje spektrofotometrijski, merenjem apsorbance pomoću Mikroplejt čitača (ELISA čitača).

MTT test je rađen nakon 24 i 48 h inkubacije splenocita sa različitim koncentracijama (Eksperimentalni deo 3.7.3.) ispitivanih supstanci. Negativnu kontrolu predstavljali su splenociti kultivisani na isti način u RPMI-medijumu. U daljim eksperimentima, testiranja su sprovedena posle 48 h inkubiranja splenocita sa 2,5 µg/ml ConA ili 1 µg/ml LPS, sa, ili bez testiranih supstanci u različitim koncentracijama.

Naime, nakon izvršenog desetominutnog centrifugiranja (1200 rpm, 4 °C), supernatant je odliven, a ćelije su radi uklanjanja eventualne zastupljenosti seruma ispiranje PBS-om (zagrejan do sobne temperature), i ponovo centrifugirane pod istim uslovima. Ćelijski medijum je uklonjen,

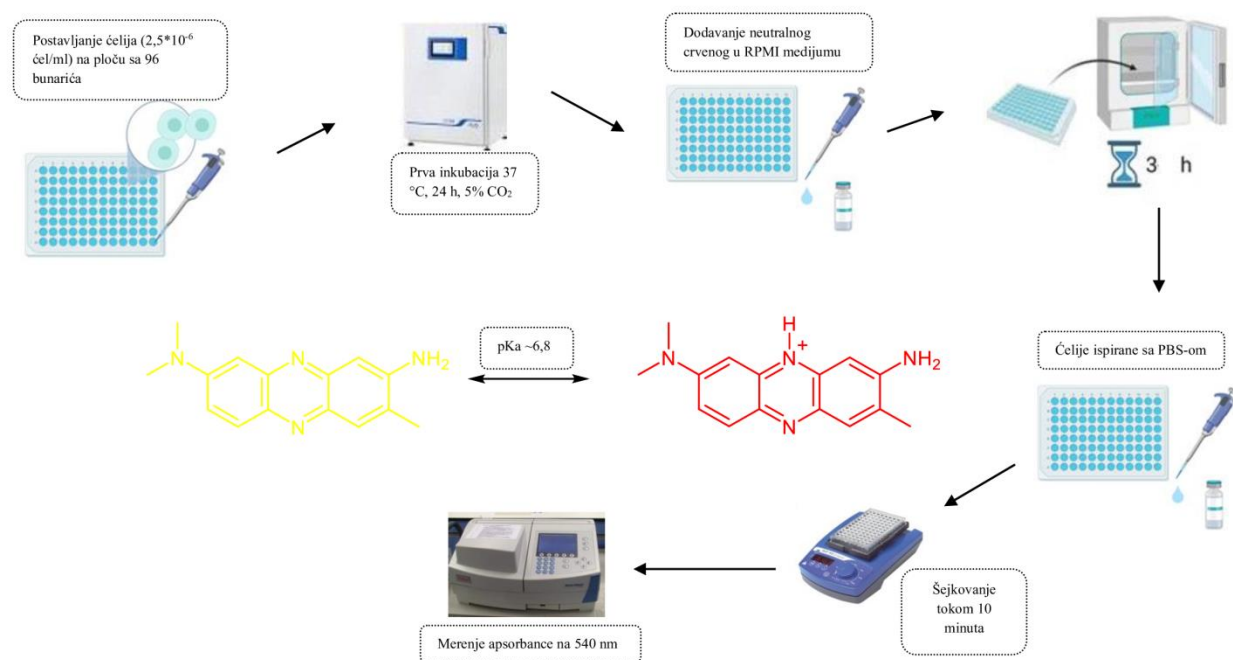
a svežih 100 μL RPMI-medijuma (RPMI sa 5% fetalnog telećeg seruma (*fetal calf serum*, FCS)) i 10 μL MTT rastvora (0,5 mg/ml rastvoreno u PBS-u; odavde pomoću igle i šprica izvađen pome-



Slika 3.7.1. Algoritam izvođenja MTT-testa

nuti rastvor i profiltriran kroz Pura disk (0,22 μm), pa tek od ovako profiltriranog rastvora je dodato navedenih 10 μL po bunariću MTT-a; sama fotosenzitivna epruveta sa MTT držana je u foliji) dodato je u mikrotitarske ploče. Ploče su inkubirane dodatna 4 h na 37°C u atmosferi sa 5% (v/v) ugljen-dioksida. Nakon inkubacije, u sve bunariće dodat je zakišeljani izopropanol (100 μL 0,04 M HCl u izopropanolu), a mikrotitarske ploče su šejkovane oko 10 min. na 37°C kako bi se rastvorili

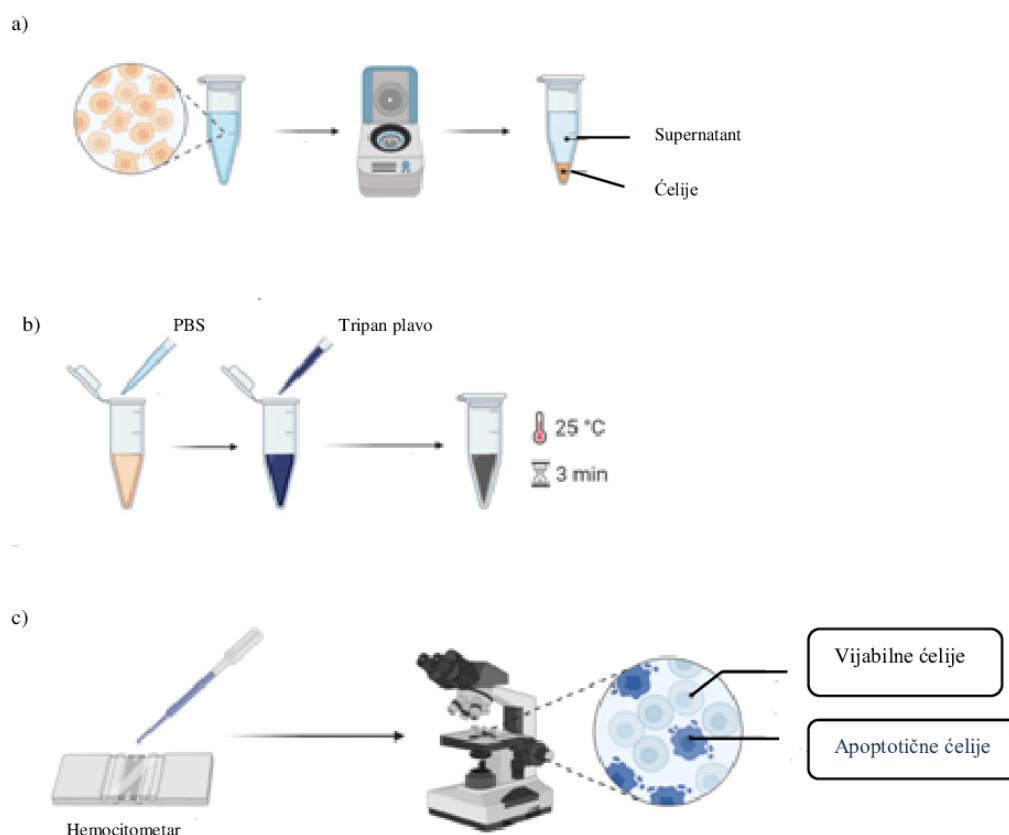
formirani kristali formazana. Nekoliko minuta nakon disolucije formazanskih kristala, absorbancu svakog bunarića merena je na 550 nm (Mosmann, 1983) koristeći automatski mikrolejt čitač (Multiscan Ascent, Labsystems, Finska). Aktivnost jedinjenja izražena je kao procenat vijabilnosti u odnosu na ćelije kultivisane u RPMI-medijumu ili LPS/ConA stimulise splenocite i predstavljena je kao vrednost $\pm$ standardna devijacija (slike 4.1.18., 4.3.16., 4.3.18. i 4.3.20.–4.3.22.).



Slika 3.7.2. Algoritam izvođenja testa Neutralno crveno

U testu neutralnog crvenog (procena funkcije lizozoma), koristi se boja neutralno crveno (NR) koja prodire u normalne (funkcionalne) lizosome i boji ih. NR (1:100 razblažen u RPMI sa 5% FCS) je pre dodavanja centrifugiran 10 min. na 1800 rpm, i nakon toga uzet je supernatant. Prateći protokol opisan u prethodnom delu teksta, i u ovom testu je nakon perioda inkubacije od 24 h sa jedinjenjima medijum uklonjen, a ćelije su ispirane i inkubirane još 3 h sa NR rastvorenim

u RPMI-medijumu (40 $\mu\text{g/ml}$, konačna koncentracija u medijumu, 37 °C). Nakon ovog trosatnog perioda, izvršeno je centrifugiranje, medijum je još jednom uklonjen, a ploče su isprane dva puta sa 150 μl PBS-a, uz ponovljeno centrifugiranje nakon toga. Intracelularna boja je rastvorena 1% (v/v) sirćetnom kiselinom u 50% (v/v) etanolu i šejkovanjem mikrotitarskih ploča tokom 10 min.



Slika 3.7.3. Algoritam izvođenja testa tripan-plavo. a) centrifugiranje ćelijske suspenzije praćeno odbacivanjem supernatanta b) resuspenzija (PBS, TB) c) mikroskopiranje uzorka na hemocitometru

Apsorbancija vezane boje merena je spektrofotometrijski na 540 nm. Dobijeni rezultati su izraženi kao procenat ćelijske sposobnosti da veže neutralno crveno u odnosu na sposobnost kultivisanih ćelija u RPMI-medijumu i predstavljeni su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (slike 3.7.2. i 4.1.19.). Svi eksperimenti su sprovedeni u kvadriplikatu i ponovljeni su tri puta.

Tripan-plavo (TB) test procenjuje vijabilnost ćelija (slika 3.7.3.) (Blake et al., 1997). Ćelije iz svakog bunarića, nakon inicijalnog koraka adheriranja u trajanju od 1,5 h, fiksirane su metanolom i bojene sa 100 µl rastvora tripan-plavog (0,4% rastvora TB u PBS). Višak boje je uklonjen, a broj vijabilnih (svetlih) i mrtvih (tamno plavih) ćelija prebrojan u komori hemocitometra, pod uvećanjem 40x. Boja je prilikom analize bila u kontaktu tokom 3 min. sa ćelijama. Rezultati su izraženi kao procenat (%) živih ćelija u odnosu na sto prebrojanih (slike 4.1.24. i 4.3.23.).

3.7.5. MIKROSKOPIRANJE SPLENOCITA

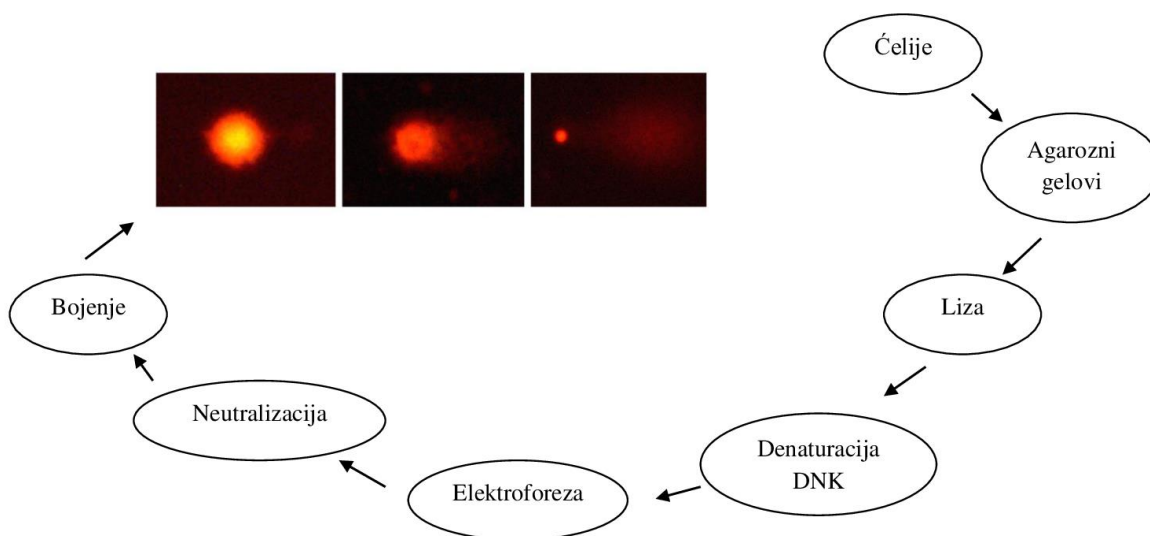
Nakon 24-časovnog perioda inkubacije splenocita sa α -furanopingvizanolom, furanopingvizanonom ili deksametazonom RPMI-medijum je uklonjen, a ćelije su inkubirane sa MTT ili NR (Eksperimentalni deo 3.7.4.). Po isteku inkubacije, mikrotitarske ploče su isprane PBS-om, a vizualizacija splenocita je izvršena mikroskopom koristeći Zeiss observer Z1 svetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Nemačka) pri uvećanju od 400x. Broj, oblik, morfološke karakteristike i prisustvo apoptotičnih ćelija/tela u kulturi splenocita su zabeleženi.

Pored toga, nakon 24 h inkubacije, uzet je alikvot od 100 µl kulture splenocita tretirane α -furanopingvizanolom, furanopingvizanonom ili deksametazonom i prebačen na čisto predmetno staklo. Koristeći citospin centrifugaciju (750 rpm, 5 min), splenociti su zalepljeni. Nakon sušenja, ćelije su fiksirane metanolom (6 min), podvrgnute Gimza bojenju (20 min na sobnoj temperaturi) i nakon toga posmatrane pod uvećanjem (1000x, 2000x; Carl Zeiss, Göttingen, Nemačka) (Radulović et al., 2015). Promene u ćelijskoj morfologiji su opisane na osnovu 200 posmatranih splenocita. Takođe su primećene i opisane tranzitorne forme splenocita (slika 4.1.21.) (Yofeey et al., 1965).

3.7.6. KOMET TEST

Komet test izveden je prateći standardnu proceduru opisanu od strane *Tice*-a i saradnika (Tice et al., 2000). Nakon inkubacije i centrifugiranja ćelija (Eksperimentalni deo 3.7.3.), ćelijska

suspenzija pomešana je sa agaroznim gelom (sporootapajuća agarozna u odnosu 1:1 (v/v)) i naneta na čisto predmetno staklo. Na ovaj sloj sa ćelijama nanet je još jedan sloj agaroze (ohlađene da bi očvrsla) bez ćelija. Zatim su ćelije podvrgnute liziranju, tokom noći, u rastvoru koji sadrži 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100 i 10% (v/v) DMSO na 4 °C, kako bi se dezintegrira-



Slika 3.7.4. Šematski prikaz ključnih koraka u Komet testu

le biološke membrane i oslobodila DNK za analizu. Pre elektroforeze (300 mA tokom 20 min. na 4 °C), predmetna stakla sa uzorcima su inkubirana u baznom (pH > 13) elektroforetskom puferu tokom 20 min. kako bi se omogućila denaturacija DNK. Nakon elektroforeze, uzorci su neutralisani sa 0,4 M Tris–HCl puferom tokom 10 min. i obojeni etidijum-bromidom. Uzorci su fotografisani kamerom Leica DMR fluorescentnog mikroskopa (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Nemačka) i dobijene fotografije dalje analizirane pomoću OpenComet softvera (Gyori et al., 2014). Step en oštećenja DNK izražen je kao procenat DNK u repu komete (slike 3.7.4. i 4.1.22.).

3.7.7. ODREĐIVANJE CELULARNIH PROTEINA, UKUPNOG SADRŽAJA DNK I RNK

Prethodno pripremljeni splenociti (Eksperimentalni deo 3.7.3.) prebačeni su u mikrotitarske ploče sa 24 bunarića (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) i inkubirani u RPMI-medijumu sa α -furanopingvizanolom i furanopingvizanonom (10^{-4} , 10^{-6} i 10^{-8} M), ili deksametazonom (10^{-6} M) tokom 24 h. Nakon perioda inkubacije ćelije su uklonjene iz mikrotitarskih ploča, centrifugirane i resuspendovane u PBS-u. Liziranje ćelija postignuto je ultrasonifikacijom epruveta koje su sadržale ćelije, tokom jednog minuta. Koncentracija proteina u lizatima ćelija određena je koristeći standardnu *Lowry*-evu metodu (Lowry et al., 1951). Izolovanje DNK i ukupne RNK izvedeno je iz 200 μ L ćelijskih lizata koristeći AllPrep DNK/RNK MiniKit, prateći uputstva proizvođača (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Sadržaj DNK ili RNK u dobijenim rastvorima (uzorci od 2 μ L), određen je na BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu, Tokyo, Japan) prateći standardni protokol (slika 4.1.23.) (Sukumaran, 2011).

3.7.8. ISPITIVANJE METABOLIZMA I DISTRIBUCIJE α -FURANOPIGVIZANOLA I FURANOPINGVIZANONA U ĆELIJAMA/MEDIJUMU

Prethodno pripremljeni splenociti (Eksperimentalni deo 3.7.3.) preneti su u mikrotitarske ploče sa 24 bunarića (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) i inkubirani sa α -furanopingvizanolom i furanopingvizanonom (10^{-4} M) tokom 24 h. Nakon isteka inkubacije, mikrotitarske ploče su centrifugirane, a medijum, oslobođen od ćelija, uklonjen je za dalju hemijsku analizu. Loptaste ćelije su prikupljene centrifugiranjem, isprane tri puta PBS-om, i zamrznute. U svrhu liziranja, ćelije su odmrznute, tretirane dietil-etrom, i podvrgnute ultrasonifikaciji. Ovaj postupak je doveo do pucanja ćelijske membrane kroz kavitaciju i omogućio ekstrakciju hidrofobnih molekula. Ćelijski ekstrakt je zatim podvrgnut GC-MS analizi.

3.7.9. BOJENJE LAKTAT-DEHIDROGENAZOM NA RAZMAZU SPLENOCITA

Histohemijsko LDH bojenje izvedeno je inkubiranjem ćelija 5 min. na 37 °C. Rastvor za bojenje sadržao je 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,45), 17% polivinil-alkohola, 3 mM NAD^+ , 150 mM natrijum-L-laktata, 0,32 mM 1-metoksifenazin-metosulfata, 5 mM NaN_3 i 5 mM nitro-plavo-

tetrazolijum soli. Kontrolne reakcije izvedene su upotrebom istog rastvora za bojenje, ali bez dodatka natrijum-L-laktata i NAD^+ (Van Noorden et al., 1986). Rezultati su iskazani na 100 izbrojanih ćelija (pri uvećanju od 1000x). Intenzitet bojenja procenjen je na osnovu modifikovane metode, prema *Song-u* i saradnicima (Song et al, 2018), na sledeći način: 3 (slab intenzitet), 2 (umeren intenzitet), 1 (jak intenzitet) i 0 (negativan) (tabela 4.3.8.).

3.8. STATISTIČKA ANALIZA

3.8.1. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA DOBIJENIH *IN VITRO* ĆELIJSKIM TESTOVIMA

Dobijeni rezultati bioloških testiranja, izraženi kao procenat vijabilnosti u odnosu na RPMI ili LPS/ConA- stimulisane splenocite, prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Statistički značajne razlike između uzoraka određene su jednosmernom (jednofaktorskom) analizom varijanse (One-Way ANOVA) i *Tukey-vim Post-hoc* testom za višestruka poređenja (GraphPad Prism version 5.03, San Dijego, CA, SAD). Razlike sa verovatnoćom (*p*) manjom od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

3.8.2. MULTIVARIJANTNA ANALIZA: METODA ANALIZE GLAVNIH KOMPONENTI I AGLOMERATIVNA HIJERARHIJSKA KLASTER ANALIZA

Metoda analize glavnih komponenti (PCA) i aglomerativna hijerarhijska klaster analiza (AHC) dobijenih skupova podataka izvedena je pomoću Excel plug-in programa XLSTAT, verzije 2014.4. (Addinsoft). U AHC analizi, Euklidska udaljenost je korišćena kao mera za procenu udaljenosti objekata, odnosno kao kriterijum za grupisanje, dok je *Ward*-ova metoda primenjena kao kriterijum agregacije. Broj posmatranih grupa (klasa objekata) odabran je na osnovu sličnosti unutar grupa i između grupa. Ova metoda je primenjena na osnovu sadržaja sastojaka u 19 upoređenih uzoraka, koji su korišćeni kao varijable.

3.9. MOLEKULSKO MODELOVANJE

Konformaciona analiza izolepidozen-14-ola (jedinjenje **3**), izolepidozen-14-ala, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola (jedinjenje **4**), *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diola (jedinjenje **5**) i konocefalenola izvršena je korišćenjem metode iz softvera Wavefunction's Spartan '14. (Ervajn, Kalifornija, SAD). Početni koraci uključivali su razmatranje maksimalnog broja smislenih konformera, što je prvenstveno podrazumevalo optimizaciju geometrije upotrebom poluempirijske PM6 metode i eliminaciju duplikata. Dalja analiza podrazumevala je selekciju konformera najniže energije u tri koraka, čime se broj razmatranih konformera sukcesivno smanjivao, koristeći viši nivo teorije kao i složenije osnovne skupove (*basis set*) za preciznije rezultate.

Korišćenjem poluempirijske PM6 metode, na osnovu izračunatih energija (optimizovane geometrije), odabrani su konformeri koji čine 99,99% svih prisutnih konformera. Zatim su izvedeni proračuni energije korišćenjem B3LYP-funkcionala sa 6-31+G* *basis set*-om na manjem broju konformera najniže energije, pri čemu su zadržani konformeri koji čine 99,99% Boltzmann-ove populacije. Treći korak podrazumevao je optimizaciju geometrije korišćenjem naprednih funkcionala i *basis set*-ova za odabrane konformere (oni koji čine 99%), nakon čega je izabrano 2-5 konformera najniže energije za finalnu optimizaciju (za više detalja pogledati prilog 59). Finalna optimizacija geometrije izabranih konformera najniže energije izvršena je upotrebom B3LYP funkcionala sa 6-311++G (2df, 2p) *basis set*-om. Izveštaji dobijeni korišćenjem Wavefunction's Spartan '14 softvera (jedan ili dva po jedinjenju), koji sadrže optimizovane podatke i dekartove koordinate konformera optimizovane geometrije, prikazani su u prilogu 59.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *P. cordaeana*

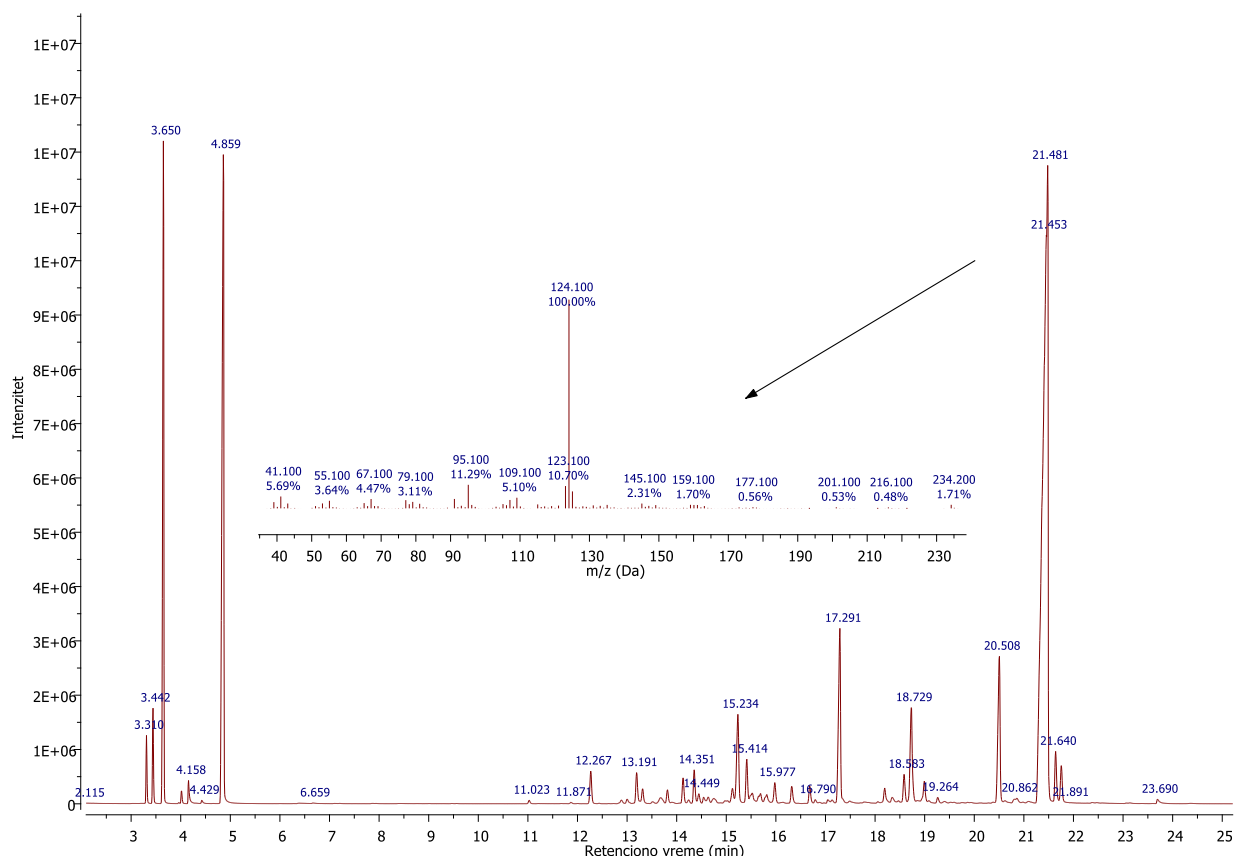
4.1.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *P. cordaeana*

Preliminarnom GC-MS analizom etarskog ulja uzoraka *P. cordaeana* (Eksperimentalni deo 3.4.2., 3.5.1.) uočeno je dominantno jedinjenje (1) koje čini 45% ukupne površine ispod pikova na hromatogramu (slika 4.1.1.). Međutim, upoređenje masenog spektra ovog jedinjenja sa spektrima iz baze podataka nije dalo pozitivno podudaranje, prema opisu u odeljku 3.2.6. Eksperimentalnog dela. Pored njega, detektovano je još jedno jedinjenje (2) koje, takođe, nije moglo da se identifikuje na taj način. Ostala identifikovana jedinjenja, to jest ona za koja su pronađeni odgovarajući maseni spektri i reticioni indeksi u dostupnim bazama ili literaturi, prikazana su u tabeli 4.1.1. Detalji o hromatografskom razdvajanju, korišćenim eluentima i broju eluiranih frakcija opisani su u odeljcima 3.5.1. i 3.5.3. Eksperimentalnog dela. Identifikovano je dvanaest sastojaka koji predstavljaju 86,5% detektovanih površina ispod pikova u hromatogramu analiziranog etarskog ulja. Najzastupljeniju klasu sekundarnih metabolita činili su terpeni, sa znatno većim udelom seskviterpena u odnosu na monoterpena (tabela 4.1.1.).

Od četiri identifikovana monoterpena (28,5%) dominantan je bio β -felandren (16%), praćen kamfenom (10,4%) (tabela 4.1.1.). Relativno mali broj detektovanih monoterpena kod ove biljne vrste poklapa se sa rezultatima Bukvički i saradnika, koji su takođe utvrdili značajnu zastupljenost β -felandrena u uzorcima *P. cordaeana* sakupljenim u Srbiji (Bukvički et al., 2012). Ukupno je detektovano osam seskviterpena (58%), od kojih je četiri oksigenovano (52,8%). Oksigenovanim seskviterpenima dominirao je neidentifikovani seskviterpen (jedinjenje 1), praćen deoksopingvizonom (4,9%) i (1(10)*E*,5*E*)-germakradien-11-olom (2,9%) (tabela 4.1.1.). U grupi ugljovodoničnih seskviterpena najzastupljeniji je bio 1-*epi*- α -pingvizen (0,8%).

Dominacija pingvizanskih seskviterpena, od kojih su neki prethodno poznati isključivo iz briofita reda *Porellales* (Opšti deo 2.6), potvrđuje njihov hemotaksonomski značaj. Pingvizani su, naime, karakteristični za vrste roda *Porella* i, s jedne strane, omogućavaju diferencijaciju vrsta ovog roda na specifične hemotipove (Opšti deo, sekcija 2.5) (Gilabert et al., 2011; Ludwiczuk et

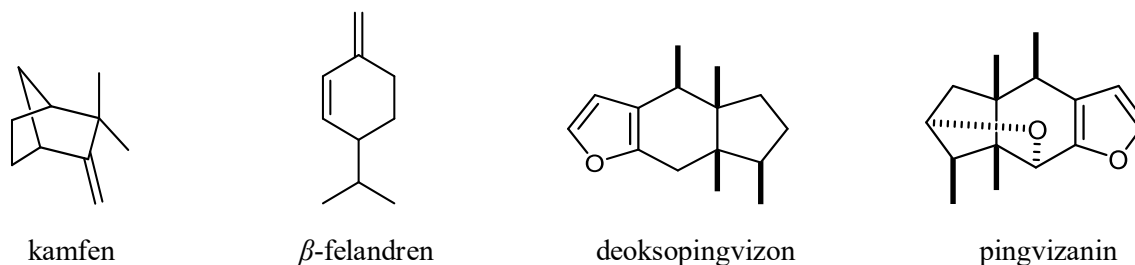
al., 2011). S druge strane, ranije studije njihovih sekundarnih metabolita ukazuju da ove vrste sintetišu jedinstvene seskviterpenoide. Važno je napomenuti da je za evropske uzorke vrste *P. cordaeana* karakteristično prisustvo većeg broja sekundarnih metabolita sa pingvizanskim skeletom (Asakawa, 1995a), što se poklapa sa dobijenim rezultatima.



Slika 4.1.1. Hromatogram etarskog ulja vrste *P. cordaeana*, kao i maseni spektar dominantnog jedinjenja **1**

Pregled prethodno objavljenih radova pokazuje da profil isparljivih konstituenata etarskog ulja jetrenjača zavisi ne samo od hemotipa, već i od drugih faktora, kao što su lokalitet, napadi insekata i drugi uticaji. Sekundarni metabolizam vrste *P. cordaeana* bio je predmet istraživanja u svega nekoliko radova (Opšti deo 2.5., Rezultati i diskusija 4.1.4.), pri čemu nijedan nije obuhvatio analizu sastava njenog etarskog ulja. Među isparljivim sekundarnim metabolitima ekstrakata vrste *P. cordaeana*, kao dominantni seskviterpeni detektovani su metaboliti pingvizanskog skeleta,

uključujući pingvizanin, izopingvizanin, spiropingvizanin, porelapingvizanolid, porelapingvizenon i drugi, uz β -kariofilen. Od monoterpena, najzastupljeniji su bili β -felandren, α -tujen, α - i β -pinen, kamfen, β -selinen, sabinen, mircen, γ -terpinen i limonen (Asakawa et al., 2018; Bukvički et al., 2012; Tosun et al., 2013; Toyota et al., 1989b), što se u značajnoj mjeri poklapa sa rezultatima analize etarskog ulja u ovom istraživanju (tabela 4.1.1.).



Slika 4.1.2. Neki od glavnih sastojaka etarskog ulja biljne vrste *P. cordaeana*

Sve navedeno, uz činjenicu da je najzastupljeniji konstituent analiziranog etarskog ulja ostao neidentifikovan, motivisalo je sprovođenje detaljnije analize. Etarsko ulje podvrgnuto je preparativnoj MPLC hromatografiji radi izolovanja čistog, jedinjenja **1**, kako je opisano u Eksperimentalnom delu (odjeljak 3.5.3.). Detaljna analiza, identifikacija i potvrda njegove strukture prikazana je u odeljku Rezultati i diskusija 4.1.2. Takođe, izolovano je i jedinjenje određene strukture **2**, uočeno tokom analize etarskog ulja, na retencionom vremenu od 23,75 min (Rezultati i diskusija 4.1.3.), i određena njegova struktura. Nakon toga, ispitivani su potencijalni biološki efekti novoizolovanih sekundarnih metabolita, jedinjenja **1** i **2**, na splenocite pacova, sa ciljem utvrđivanja njihove moguće medicinske primene (Rezultati i diskusija 4.1.5.). Dodatna količina jedinjenja **1**, potrebna za biološka istraživanja, izolovana je *dry flash* hromatografijom etarskog ulja ove biljne vrste, prema postupku opisanom u Eksperimentalnom delu 3.5.1.

Tabela 4.1.1. Hemijski sastav etarskog ulja jetrenjače *P. cordaeana*

RI ⁱ	Jedinjenje	Zastupljenost (%) ⁱⁱ	Identifikacija
939	α -pinen	1,3	RI, MS, Col ⁱⁱⁱ
956	kamfen	10,4	RI, MS, Col

1030	β -felandren	16,0	RI, MS
1365	1- <i>epi</i> - α -pingvizen	0,8	RI, MS
1371	β -elemen	tr ^{iv}	RI, MS
1384	trifara-9,14,-dien	0,4	RI, MS
1417	α -pingvizen	0,6	RI, MS
1577	deoksopingvizon	4,9	RI, MS
1640	(1(10) <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-1(10),5-germakradien-11-ol	2,9	RI, MS
1706	pingvizanin	4,2	RI, MS
1760	α -furanopingvizanol	45,0	RI, MS
1845	furanopingvizanon	tr	RI, MS
Ukupno identifikovano:		86,5	

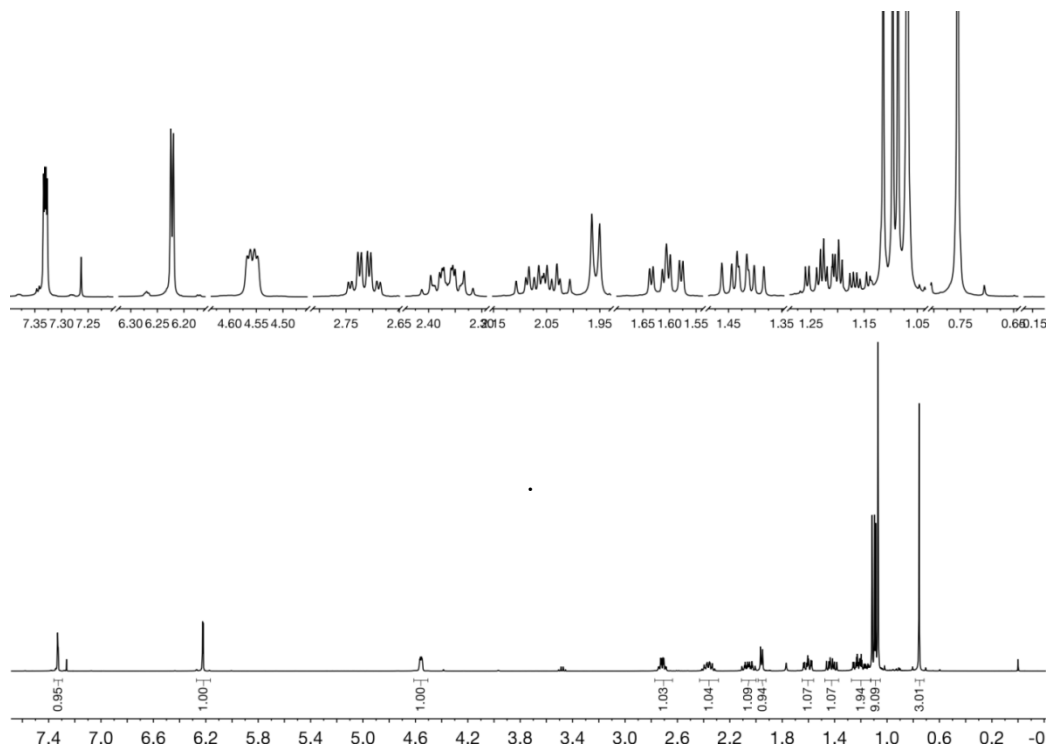
ⁱ Retencioni indeksi na koloni DB-5MS eksperimentalno određeni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana.
ⁱⁱ srednja vrednost tri analize;
ⁱⁱⁱ Metode identifikacije: MS = upoređivanje masenih spektara sa onima iz biblioteka (Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3), RI – upoređivanjem eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima, CoI – identifikacija sastojaka koinjektiranjem standardnih supstanci;
^{iv} tr - trag (<0,05%).

4.1.2. IZOLOVANJE I IDENTIFIKACIJA α -FURANOPINGVIZANOLA

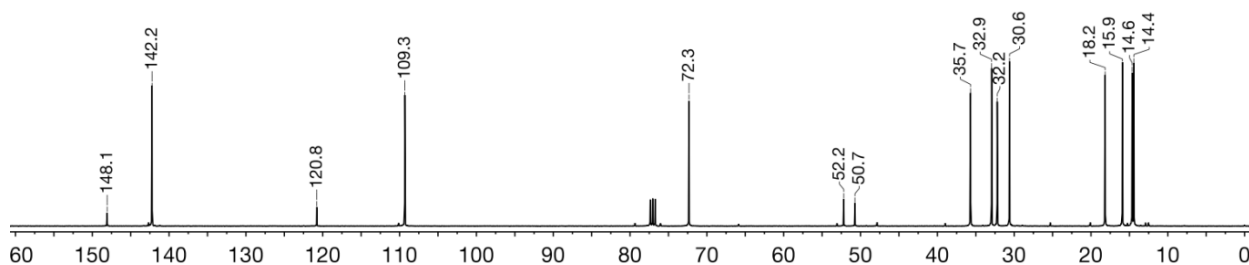
Dominantni sastojak etarskog ulja sa molekulskom masom od 234 amu nije se mogao identifikovati na osnovu poređenja masenog spektra sa dostupnim bazama masenih spektara. On je potom izolovan hromatografijom pri srednjim pritiscima na SiO₂ koloni, prema postupku opisanom u Eksperimentalnom delu 3.3.2. Za određivanje strukture i relativne stereochemije izolovanog jedinjenja, korišćena je serija NMR eksperimenata (¹H, selektivno ¹H homodekuplovanje, ¹³C, NOESY, gHSQC, HMBC, ¹H–¹H COSY, DEPT-90, DEPT-135) u rastvaračima CDCl₃ i C₆D₆, što je detaljno opisano u daljem tekstu i prilogima (1-19).

Molekulska formula ovog jedinjenja, **1** (C₁₅H₂₂O₂), određena je na osnovu podataka o elementarnom sastavu i potvrđena izotopskim odnosom [M+1]⁺/[M]⁺. Uočeni pomenuti odnos od 16,5% slagao se sa teorijski predviđenom vrednošću od 16,6%. Ovo je dodatno potkrepljeno brojem signala u ¹³C-NMR spektru (15 signala) i integraljenem signala u ¹H-NMR spektru, gde je uočeno svih 22 protona. Svi spektralni podaci, i u hlороformu-*d* i za benzen-*d*₆, navedeni su u tabeli 4.1.2., a numeracija ugljenika prikazana je na slici 4.1.4. Prisustvo kondenzovanog furanskog prstena (Pretsch et al., 2009) i sveukupna konektivnost unutar tricikličnog seskviterpenskog prstena sa četiri međusobno vicinalna hiralna centra koja nose metil-grupu u kontinuitetu, jasno su utvrđeni analizom 1D i 2D NMR spektara.

a)



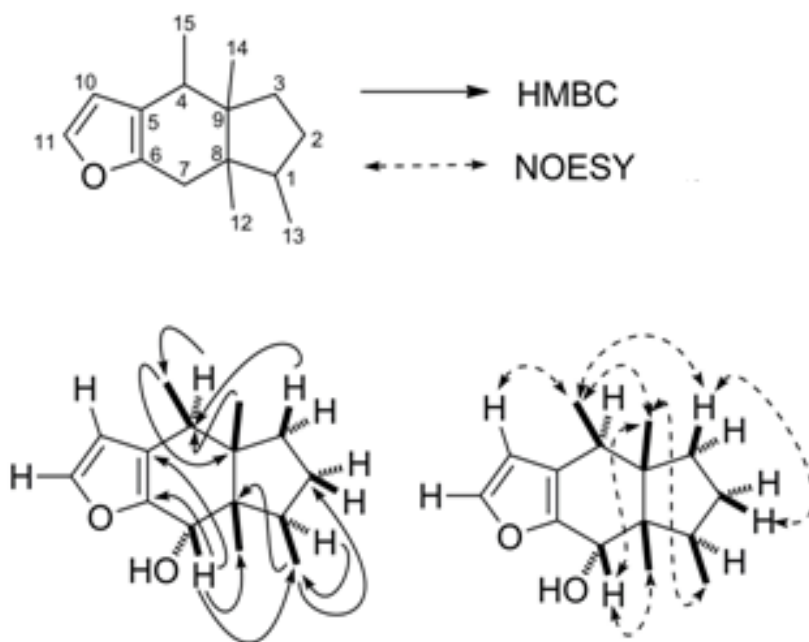
b)



Slika 4.1.3. a) ¹H-NMR spektar α -furanopingvizanola (jedinjenja **1**) (CDCl₃)
b) ¹³C-NMR spektar α -furanopingvizanola (jedinjenja **1**) (CDCl₃)

Dva signala vodonika zabeležena na 6,22 i 7,33 ppm u ¹H-NMR spektru u CDCl₃ ukazuju na prisustvo aromatičnog prstena. Na osnovu ¹³C-NMR spektra u CDCl₃, zaključeno je da samo četiri ugljenika pripadaju aromatičnom prstenu, što sugerise da aromatični sistem nije benzen (slika 4.1.3., prilog 2). Daljom analizom, koristeći vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja izmerenih u CDCl₃, zaključeno je da je prisutno furansko jezgro. Naime, činjenica da

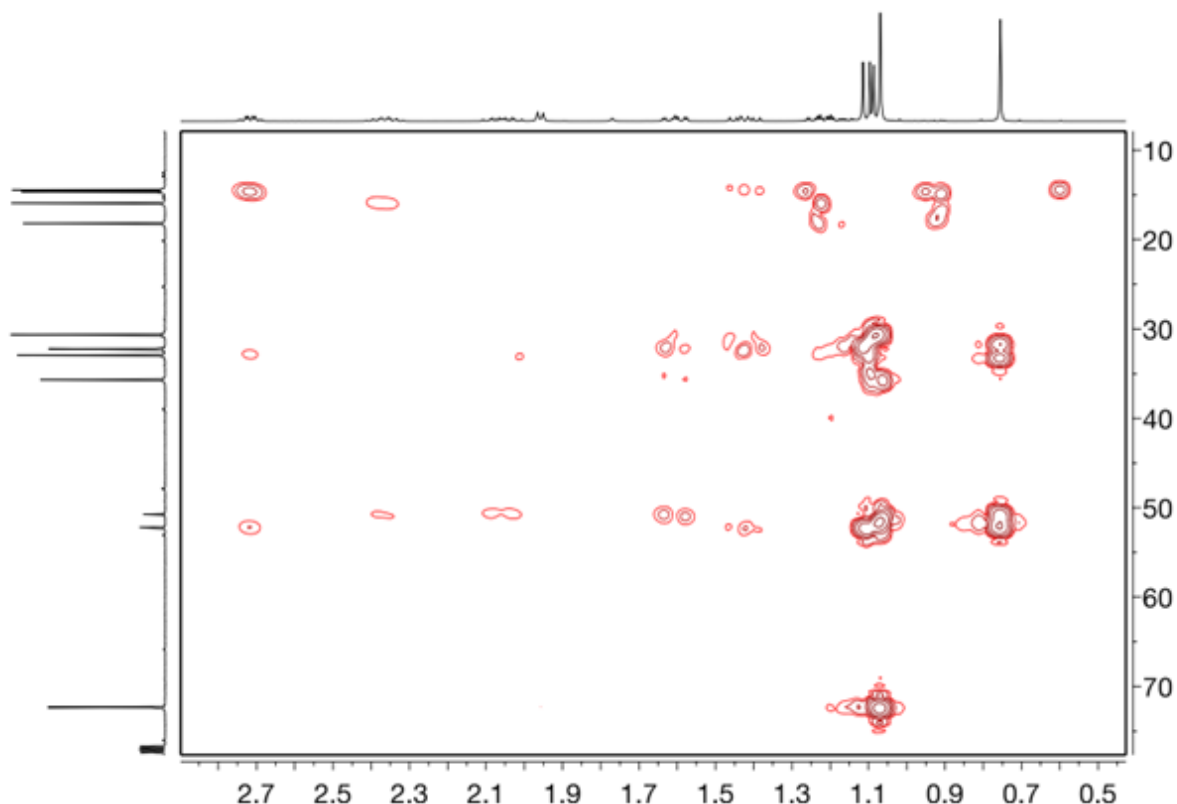
nijedan heteroatom, osim kiseonika, nije bio prisutan u molekulu isključuje prisustvo heteroaromatičnih grupa koje sadrže azot ili sumpor, dok su hemijska pomeranja dva CH ugljenika C11 (142,2 ppm) i C10 (109,3 ppm) dobro korespondirala sa literaturnim vrednostima δ_{C2} (143,0 ppm) i δ_{C3} (109,9 ppm) u samom furanu (Pretsche et al., 2009). Vrednosti hemijskih pomeranja protona vezanih za C10 (6,22 ppm) i C11 (7,39 ppm) takođe se poklapaju sa literaturnim vrednostima od 6,38 i 7,42 ppm za furan (Pretsche et al., 2009). Konstanta kuplovanja, $^3J_{10,11} = 1,9$ Hz, karakteristična je za H2-H3 kuplovanje u furanima (Pretsche et al., 2009). Prisustvo supstituisanog furanskog prstena je takođe sugerisano iz UV spektra jedinjenja **1** ($\lambda_{max}(CH_3CN)$ na 223,5 nm sa $\epsilon = 3428$).



Slika 4.1.4. Šema numeracije pingvizanskog skeleta, uz ključne NOESY i HMBC (H→C) korelacije α -furanopinguisanola (jedinjenje **1**), prikazane dole

Dalja analiza 1D i 2D NMR spektara omogućila je ustanovljavanje preostalog dela strukture ispitivanog jedinjenja. HMBC spektar (dat je na slici 4.1.5., kao i u prilogu 3, videti sliku 4.1.4. za ključne korelacije HMBC i NOESY interakcije) pokazao je korelaciju ugljenika sa hemijskim pomeranjem 120,8 ppm (C5) sa metil-protonima na 1,11 ppm (H15) kroz tri veze, kao i sa protonom sa 2,72 ppm (H4) kroz dve veze. U 1H - 1H COSY spektru (prilog 4) uočeno je da se

oba vodonika kupluju (vicinalna konstanta kuplovanja od 7,1 Hz). Na osnovu HSQC interakcije protoni H4 locirani su na ugljeniku C4, sa pomeranjem 32,2 ppm (prilog 1). Potvrda da je C4 vezan za furanski prsten dobijena je u HMBC korelaciji H4 i drugog ne-protonovanog ugljenika C6.



Slika 4.1.5. Uvećanje oblasti HMBC spektra jedinjenja 1 (0,5 – 3,0 ppm i 10 – 80 ppm) (CDCl_3)

Proton na 4,56 ppm (H7) pokazao je HMBC korelaciju sa C5 i C6, što sugerise da je ovaj proton na ugljeniku C7 (72,3 ppm) odmah do C6. Hemijsko pomeranje C7 ukazuje na oksigenaciju, i zaista H7 se kupluje sa OH protonom ($J = 5,6$ Hz). Važno je istaći da je H7, zbog kuplovanja sa H4 preko pet veza, dublet dubleta (*dd*) uz vrednost druge konstante kuplovanja od $J = 2,6$ Hz. H15 i H4 se kupluju sa (*cross-peaks*) u HMBC spektru sa alifatičnim kvaternernim ugljenikom C9 (52,2 ppm), koji je dodatno korelirao sa metil-protonima H14 (0,76 ppm). Signal H14 koreliše sa C4 kroz tri veze, što ukazuje na to da je C14 vezan za C9. U HMBC spektru, H7 korelirao je sa drugim alifatičnim kvaternernim ugljenikom (C8) i ugljenikom metil-grupe pored

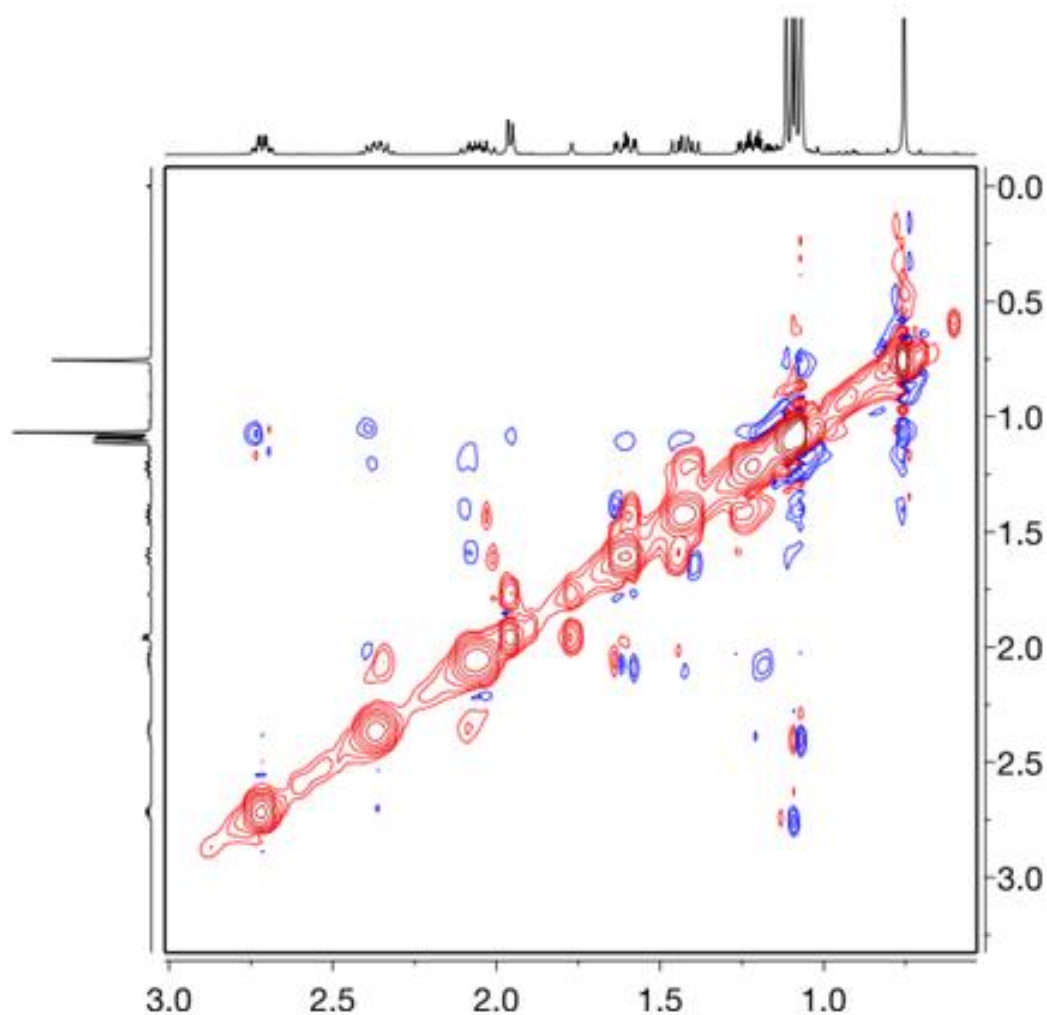
C8 na 15,9 ppm (C12). HMBC korelacija između C8 i H14 otkrila je da su ugljenici C4-C9 svi deo šestočlanog prstena.

U HMBC spektru, primećeno je da je C12 u korelaciji sa H1 (2,37 ppm). Ovaj proton se kupluje sa metil-grupom na 1,08 ppm (H13, $J_{1,13} = 6,7$ Hz) i diastereotopnim CH₂ protonima na 1,20 i 2,06 (H2 α i β). Ovi protoni su takođe povezani sa drugim parom CH₂ protona na 1,42 i 1,61 (H3 α i β). Lista konstanti kuplovanja prikazana je u tabeli 4.1.2. HMBC korelacija između C3 i H14, pokazala je prisustvo trećeg prstena (petočlanog, C1, C2, C3, C8, C9). Dakle, svi atomi u strukturi jedinjenja **1** su uzeti u obzir. Jedinjenje **1** predstavlja jedan od 32 moguća stereoizomera 7-hidroksi supstituisanog furanopingvizana (slika 4.1.4.).

Tabela 4.1.2. ¹H i ¹³C hemijska pomeranja (ppm) α -furanopingvizanola (jedinjenje **1**) u CDCl₃ i C₆D₆ (na 400 i 100,6 MHz, redom)

α-Furanopingvizanol (jedinjenje 1)					
Asignacija	Tip C/H	Hloroform- <i>d</i>		Benzen- <i>d</i> ₆	
		¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
C-1	CH	35,7	2,37 (<i>ddq</i>) $J_{1,13} = 6,7$ Hz $J_{1,2\alpha} = 7,9$ Hz $J_{1,2\beta} = 9,7$ Hz	36,1	2,28 (<i>ddq</i>) $J_{1,13} = 6,7$ Hz $J_{1,2\alpha} = 8,5$ Hz $J_{1,2\beta} = 9,9$ Hz
C-2	CH ₂	30,6	α : 1,20 (<i>dddd</i>) $J_{2\beta,2\alpha} = 13,0$ Hz $J_{1,2\alpha} = 7,9$ Hz $J_{2\alpha,3\beta} = 2,6$ Hz $J_{2\alpha,3\alpha} = 11,4$ Hz β : 2,06 (<i>dddd</i>) $J_{2\beta,2\alpha} = 13,0$ Hz $J_{1,2\beta} = 9,7$ Hz $J_{2\beta,3\alpha} = 7,3$ Hz $J_{2\beta,3\beta} = 9,5$ Hz	30,8	α : 1,09 (<i>dddd</i>) $J_{2\beta,2\alpha} = 13,5$ Hz $J_{1,2\alpha} = 8,5$ Hz $J_{2\alpha,3\beta} = 2,5$ Hz $J_{2\alpha,3\alpha} = 11,4$ Hz β : 1,87 (<i>dddd</i>) $J_{2\beta,2\alpha} = 13,5$ Hz $J_{1,2\beta} = 9,9$ Hz $J_{2\beta,3\alpha} = 7,3$ Hz $J_{2\beta,3\beta} = 9,5$ Hz
C-3	CH ₂	32,9	α : 1,42 (<i>ddd</i>) $J_{2\alpha,3\alpha} = 11,4$ Hz $J_{2\beta,3\alpha} = 7,3$ Hz $J_{3\beta,3\alpha} = 12,9$ Hz β : 1,61 (<i>ddd</i>) $J_{3\beta,3\alpha} = 12,9$ Hz $J_{2\alpha,3\beta} = 2,6$ Hz $J_{2\beta,3\beta} = 9,5$ Hz	33,2	α : 1,25 (<i>ddd</i>) $J_{2\alpha,3\alpha} = 11,4$ Hz $J_{2\beta,3\alpha} = 7,3$ Hz $J_{3\beta,3\alpha} = 12,7$ Hz β : 1,43 (<i>ddd</i>) $J_{3\beta,3\alpha} = 12,7$ Hz $J_{2\alpha,3\beta} = 2,5$ Hz $J_{2\beta,3\beta} = 9,5$ Hz
C-4	CH	32,2	2,72 (<i>dq</i>) $J_{4,15} = 7,1$ Hz $J_{4,7} = 2,6$ Hz	32,6	2,56 (<i>dq</i>) $J_{4,15} = 7,1$ Hz $J_{4,7} = 2,5$ Hz
C-5	Ar-C _q	120,8	-	120,6	-
C-6	Ar-C _q	148,1	-	149,1	-
C-7	CH	72,3	4,56 (<i>dd</i>) $J_{7,7OH} = 5,6$ Hz $J_{4,7} = 2,6$ Hz	72,1	4,40 (<i>dd</i>) $J_{7,7OH} = 5,4$ Hz $J_{4,7} = 2,2$ Hz
C-8	C _q	50,7	-	51,0	-
C-9	C _q	52,2	-	52,1	-
C-10	Ar-CH	109,3	6,22 (<i>d</i>) $J_{10,11} = 1,9$ Hz	109,5	6,07 (<i>d</i>) $J_{10,11} = 1,8$ Hz
C-11	Ar-CH	142,2	7,33 (<i>dd</i>) $J_{10,11} = 1,9$ Hz $J_{7,11} = 0,9$ Hz	142,2	7,15 (<i>dd</i>) $J_{10,11} = 1,8$ Hz $J_{7,11} = 0,8$ Hz
C-12	CH ₃	15,9	1,07 (<i>s</i>)	16,0	0,95 (<i>s</i>)
C-13	CH ₃	18,2	1,08 (<i>d</i>) $J_{1,13} = 6,7$ Hz	18,5	1,14 (<i>d</i>) $J_{1,13} = 6,7$ Hz
C-14	CH ₃	14,4	0,76 (<i>s</i>)	14,5	0,62 (<i>s</i>)
C-15	CH ₃	14,6	1,11 (<i>d</i>) $J_{4,15} = 7,1$ Hz	14,7	0,95 (<i>d</i>) $J_{4,15} = 7,1$ Hz
	OH-7		1,96 (<i>d</i>) $J_{7,7OH} = 5,6$ Hz		1,75 (<i>d</i>) $J_{7,7OH} = 5,4$ Hz

Jedinjenje **1** sadrži pet stereogenih centara, od kojih su dva kvaternerna. Usled male razlike u hemijskim pomeranjima signala vodonika C12, C13 i C15 metil-grupa u CDCl_3 (tabela 4.1.2.), određivanje relativne stereochemije u početku je bilo izazovno. Nakon detaljne analize NOESY spektra, koja je obuhvatala nekoliko važnih zapažanja, primećeno je da su H14, H15, H7 i H13

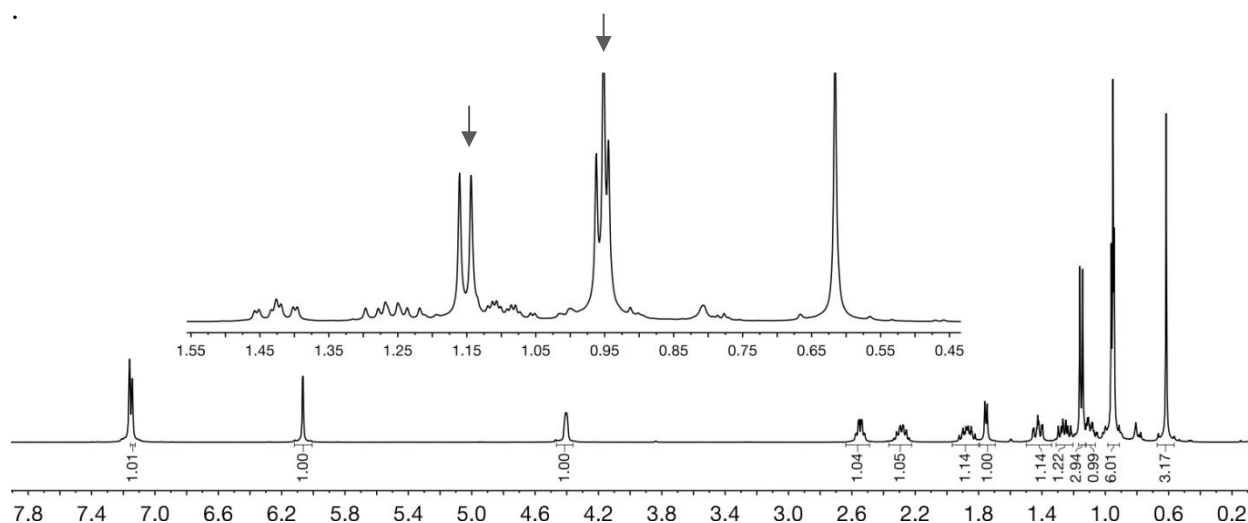


Slika 4.1.6. Uvećanje oblasti NOESY spektra jedinjenja **1** (0,5 – 3,0 ppm i 0,0 – 3,5 ppm) (CDCl_3)

locirani na istoj strani molekula. Ovaj zaključak je podržan primećenom NOESY interakcijom (slika 4.1.6., prilog 5) između H1 i H4, između H7 i H12 ili H13 metil-grupe (ili obe), kao i korelacija H14 sa H7, H15 i jednom (ili obe) od dve preostale metil-grupe. Iako se na osnovu

uočenih NOESY interakcija činilo očiglednim da su H14, H15, H7 i H13 na istoj strani molekula, preklapanje H12 i H13 metil-signala u ^1H -NMR spektru (slika 4.1.3.) onemogućava nedvosmisleno određivanje stereochemije centra C8.

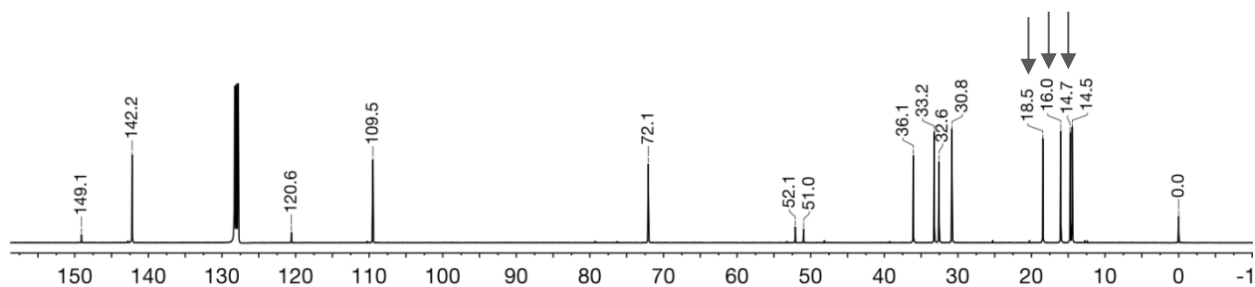
Radi određivanja konfiguracije centra na C8, snimljeni su svi NMR spektri (1D i 2D) ispitivanog jedinjenja u deuterisanom benzenu. Ovaj pristup je izabran zbog mogućnosti da aromatični rastvarač izazove razdvajanje signala metil-grupa (Berger i Braun, 2004), što bi omogućilo uočavanje razdvojenih NOESY signala koji su se preklapali u spektrima snimljenim u deuterisanom hloroformu (slika 4.1.6.). U spektrima snimljenim u C_6D_6 primećeno je da su signali H12 i H13 metil-grupa razdvojeni, ali su se, nažalost, signali H12 i H15 metil-grupa preklopili (slike 4.1.7. i 4.1.8., tabela 4.1.2., prilozi 8-11).



Slika 4.1.7. ^1H -NMR spektar α -furanopingvizanola (jedinjenja **1**) (C_6D_6)

Upoređivanjem je utvrđeno da se hemijska pomeranja ^{13}C , navedena u radu *Tori*-a i njegovih saradnika (Tori et al., 1993), u proseku razlikuju za 1,42 ppm u poređenju sa pomeranjima jedinjenja **1** u našim spektrima u istom rastvaraču (C_6D_6). Najveća razlika od 6,6 ppm zabeležena je za atom ugljenika, koji nosi hidroksilnu grupu (C7). Poznato je da ^{13}C -NMR pomeranja ne smeju da odstupaju, naročito ako su spektri snimljeni u istom rastvaraču (Grzonka i Davies, 1998). Prema

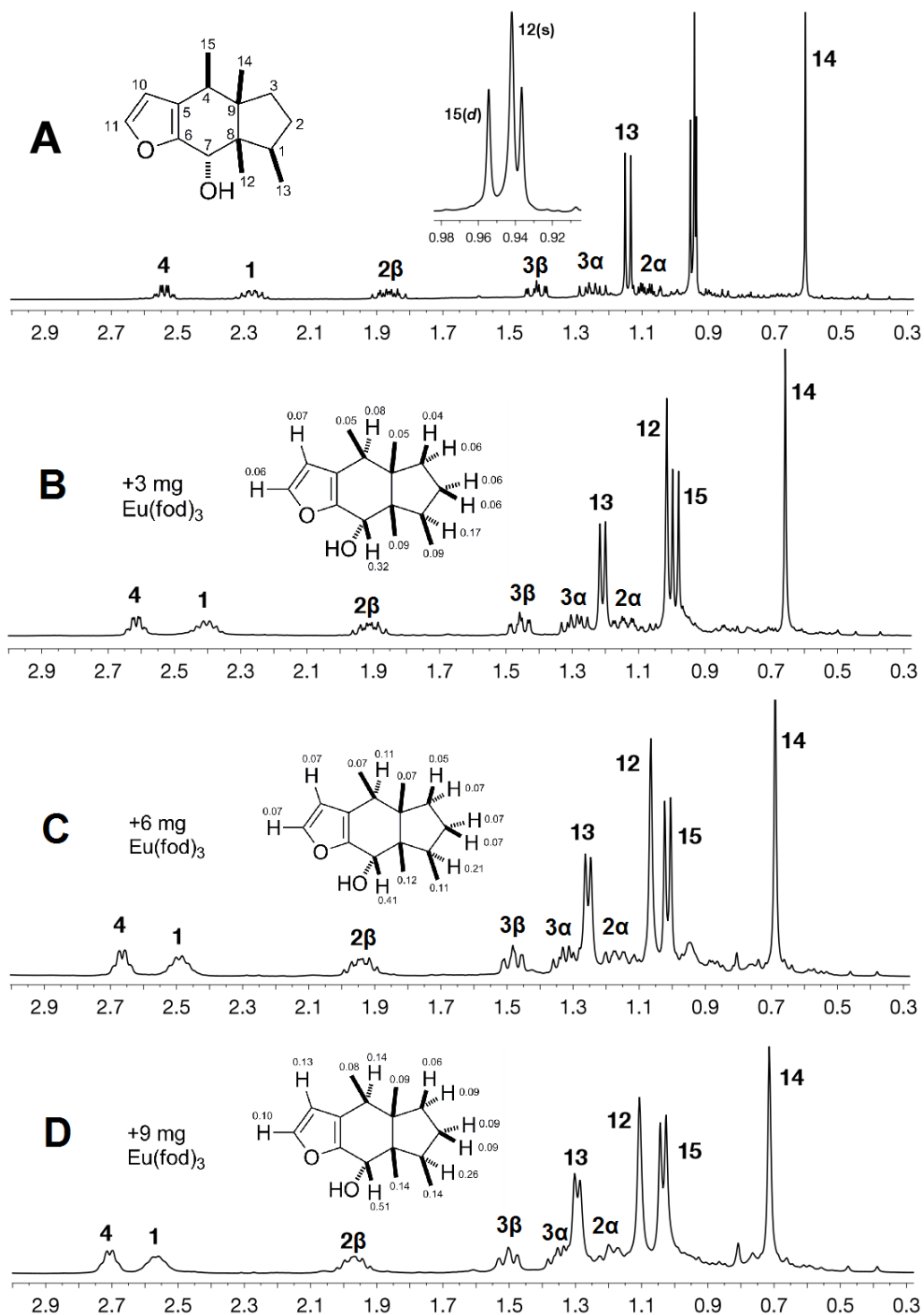
pomenutoj studiji koju su sprovedi *Grzonka* i *Davies*, odstupanja ^{13}C -NMR pomeranja do $\pm 0,5$ ppm smatraju se prihvatljivim za nepolarna jedinjenja, dok sve iznad tog raspona zahteva preispitivanje identiteta. Odstupanja u ^1H -NMR spektrima (razlike u vrednostima δ_{H} u deuterisanom benzenu za protone H1, H4 i H7 iznosile su 0,59, 0,14 i 0,12 ppm, redom), kao i velika razlika od 6,6 ppm za C7, mogu se objasniti samo nekom greškom u našoj analizi ili greškom tima iz Japana tokom razjašnjavanja strukture.



Slika 4.1.8. ^{13}C -NMR spektar α -furanopingvizanola (jedinjenja **1**) (C_6D_6)

Da bismo postigli rezoluciju signala metil-grupa korišćen je lantanoidni reagens, $\text{Eu}(\text{fod})_3$. Ovakvi reagensi hemijskog pomeranja koriste se za pojednostavljenje NMR spektra od 1970-ih (Cockerill et al., 1973), a u literaturi postoji niz studija koje izveštavaju o njihovoj upotrebi u razjašnjavanju strukture prirodnih proizvoda (Wright et al., 1992; Genčić i Radulović, 2015). Kompleksiranje $\text{Eu}(\text{fod})_3$ sa hidroksilnim kiseonikom jedinjenja **1** (α -furanopingvizanol) izvedeno je sa ciljem razdvajanja signala H12 metil-grupe od ostalih, što bi omogućilo posmatranje njenih interakcija u NOESY spektru. Takođe, očekivalo se da će ovo omogućiti dobijanje različitih vrednosti $\Delta\delta$ za jezgra u različitom prostornom rasporedu u odnosu na jon Eu^{3+} . Nadali smo se da bi nam analiza promene hemijskih pomeranja mogla pružiti dodatni uvid u relativnu konfiguraciju jedinjenja **1**.

Rezultati eksperimenata sa dodatkom lantanoidnog reagensa hemijskog pomeranja navedeni su u tabeli 4.1.3., a takođe su prikazani na slici 4.1.9. i prilogu 14. Dodavanjem 3, 6 i 9 mg $\text{Eu}(\text{fod})_3$ u rastvor α -furanopingvizanola (jedinjenje **1**) u benzenu- d_6 (5%, v/v), dobijene su tri



Slika 4.1.9. a) ^1H -NMR spektar jedinjenja **1** (uvećanje od 0,0 i 3,0 ppm u C_6D_6). (b), (c) i (d): ^1H -NMR i spektri dobijeni dodatkom lantanoidnog reagesa, kao i $\Delta\delta_{\text{H}}$ vrednosti dobijene nakon dodavanja 3, 6 i 9 mg $\text{Eu}(\text{fod})_3$, redom

grupe spektara. Svi signali u ^1H -NMR protonskom spektru, uključujući četiri metil-grupe, su se razdvojili (tabela 4.1.3.). Pomeranja u ^{13}C -NMR spektrima (tabela 4.1.3.) su se neznatno razlikovala (manje od 0,2 ppm za sve četiri metil-grupe pri najvišoj koncentraciji dodatog reagensa) u poređenju sa podacima pre dodavanja $\text{Eu}(\text{fod})_3$. Vrednosti $\Delta\delta_{\text{H}}$ (slika 4.1.9.) potvrdile su zaključke koji su već doneti na osnovu NOESY spektara, bez dodatog lantanoidnog reagensa. Poređenjem $\Delta\delta$ vrednosti H1 (0,26 ppm) i H13 (0,14 ppm), zaključeno je da je pomeranje H1 skoro dvostruko veće, kao i pomeranje H4 (0,14 ppm) u poređenju sa H15 (0,08 ppm). Ovo ukazuje da su ovi vodonici orijentisani na istu stranu u odnosu na rigidni prstenasti sistem kao i OH-grupa (α).

Signal H12 metil-protona pomeren je na isti način kao i H13 protoni, što sugerise da su oba bila β orijentisana. U obzir treba uzeti da bi, ako bi H12 bio na istoj strani kao i OH-grupa, vrednost $\Delta\delta$ bila znatno veća (tabele 4.1.2. i 4.1.3.). Relativna konfiguracija C8 je jednoznačno određena analizom NOESY spektra snimljenog za uzorak sa najvišom koncentracijom $\text{Eu}(\text{fod})_3$. Korelacija između protona H7 i H12 pokazala je da su oni na istoj strani molekula, što je konačno utvrdilo relativnu konfiguraciju svih centara molekula.

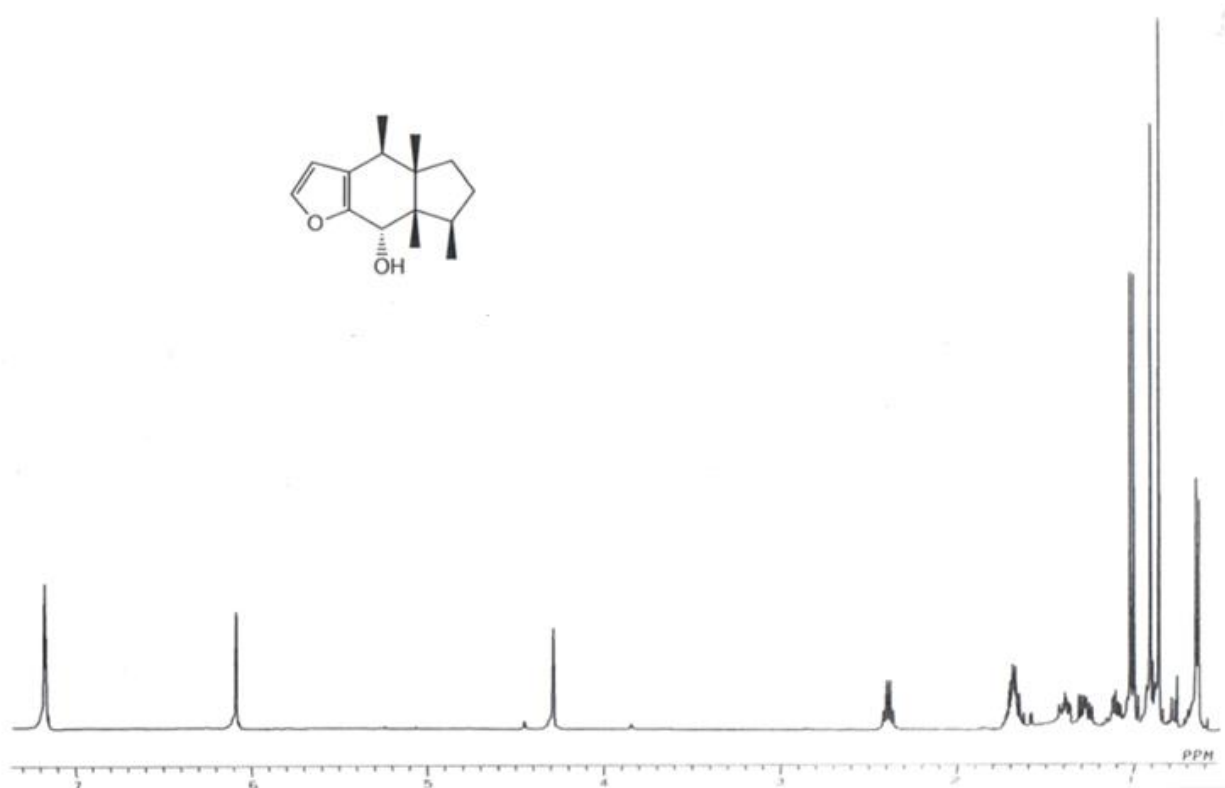
Na osnovu navedenih analiza i pregleda literature, utvrđeno je da jedinjenje **1** nije novi prirodni proizvod, budući da je jedinjenje sa istom strukturom i stereohemijom već izolovano i okarakterisano pre više od 20 godina (Tori et al., 1993). Međutim, primećeno je značajno neslaganje između spektralnih podataka prikazanih u radu *Tori*-ja i saradnika (Tori et al., 1993) i naših spektralnih podataka. Konkretno, njihov EI-MS spektar značajno se razlikuje od spektra našeg jedinjenja **1**. Ključna razlika je u odsustvu jona na m/z 124, koji je bio osnovni pik u našem spektru. Nasuprot tome, *Tori* i saradnici su utvrdili da je osnovni pik u njihovom spektru bio na m/z 125. Iako je ovaj jon takođe prisutan u spektru našeg analiziranog jedinjenja, on se pojavljuje samo kao pik sa intenzitetom od oko 8% u poređenju sa intenzitetom pika na m/z 124, što sugerise da se radi o izotopskoj verziji osnovnog pika, a ne o fragmentnom piku.

Tabela 4.1.3. ^1H -NMR protoni i ^{13}C -NMR hemijska pomeranja u C_6D_6 jedinjenja **1** sa dodatim $\text{Eu}(\text{fod})_3$

Asignacija	Ugljenik/Vodonik	^1H hemijsko pomeranje			^{13}C hemijska pomeranja
		+3 mg	+6 mg	+9 mg	+9 mg
C-1	CH	2,45	2,49	2,54	36,3
C-2	CH ₂	α : 1,15	α : 1,16	α : 1,18	30,9

		β :1,93	β :1,94	β :1,96	
C-3	CH ₂	α : 1,31 β :1,47	α : 1,32 β :1,48	α : 1,34 β :1,50	33,3
C-4	CH	2,64	2,67	2,70	32,8
C-5	Ar-C _q	-	-	-	120,9
C-6	Ar-C _q	-	-	-	149,7
C-7	CH	4,72	4,81	4,91	73,3
C-8	C _q	-	-	-	51,2
C-9	C _q	-	-	-	52,3
C-10	Ar-CH	6,14	6,14	6,20	109,7
C-11	Ar-CH	7,21	7,22	7,25	142,5
C-12	CH ₃	1,04	1,07	1,09	16,2
C-13	CH ₃	1,23	1,25	1,28	18,6
C-14	CH ₃	0,67	0,69	0,71	14,6
C-15	CH ₃	1,00	1,02	1,03	14,8

Dokazi da se jedinjenje **1** razlikuje od jedinjenja koje su prethodno izolovali japanski istraživači su nedvosmisleni. Analizirajući literaturno dostupne spektralne podatke ovih istraživača (Tori et al., 1993) (slika 4.1.10.) i poređenjem sa podacima dobijenim tokom ove analize, može se zaključiti da je ispitivano jedinjenje, izolovano iz uzoraka jetrenjače *P. cordaeana* sakupljenih u Srbiji, jedinjenje **1**, novo jedinjenje, zvanično imenovano kao **α -furanopingvizanol**. Iako su *Tori* i saradnici (Tori et al., 1993) tvrdili da su odredili relativnu konfiguraciju hiralnih centara molekula na osnovu NOE spektara razlike, na osnovu originalnih spektralnih podataka japanskih istraživača može se pretpostaviti da ti zaključci nisu mogli da budu donešeni. Loše razdvajanje signala koje je očigledno u spektrima koje su koristili *Tori* i saradnici verovatno je obstruiralo određivanje relativne konfiguracije. Trenutno, jedino što se može tvrditi je da jedinjenje koje su izolovali japanski istraživači nije jedinjenje **1**. Moguće objašnjenje je da su *Tori* i saradnici (Tori et al., 1993) ustvari izolovali diastereomer β -furanopingvizanol i netačno odredili relativnu konfiguraciju centra C7 (ovo može da objasni veliku razliku u hemijskom pomeranju ovog ugljenika). Ovu hipotezu pokušali smo da ispitamo inverzijom konfiguracije C7 jedinjenja **1** pomoću *Mitsunobu*-reakcije (Martin i Dodge, 1991). Nažalost ni nakon više pokušaja β -dijasteroizomer nije dobijen.



Slika 4.1.10. ^1H -NMR spektar navodnog α -furanopingvizanola preuzet iz rada *Tori*-a i njegovih saradnika (Tori et al., 1993)

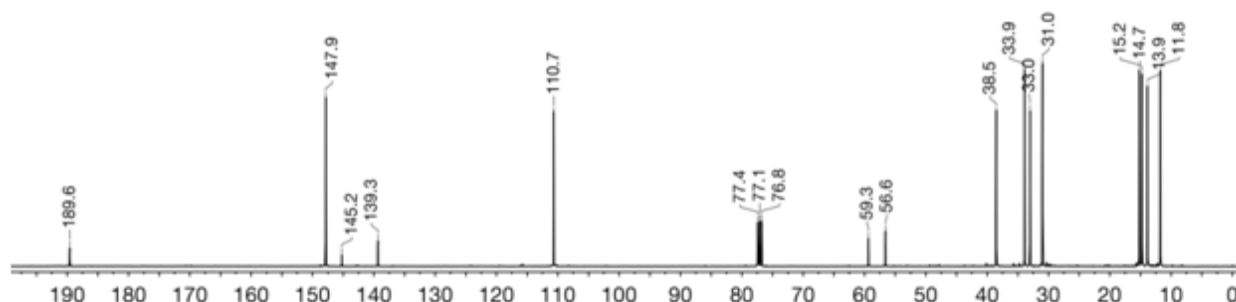
4.1.3. IDENTIFIKACIJA FURANOPINGVIZANONA

Slično kao i za jedinjenje **1**, GC-MS analizom etarskog ulja vrste *P. cordaeana* nije bilo moguće identifikovati jedinjenje **2** na osnovu poređenja njegovog masenog spektra sa spektrima iz baze podataka. Hromatografsko razdvajanje etarskog ulja nije rezultovalo u dobijanju čistog uzorka jedinjenja **2** za NMR analizu (Eksperimentalni deo 3.5.1.). Međutim, molekulski jon (na m/z 232) i pik na m/z 122 sugerisali su da bi ovo jedinjenje moglo biti keton, koji je u bliskoj vezi sa jedinjenjem **1**, tj. možda proizvod oksidacije jedinjenja **1**. Da bi se proverila ova pretpostavka, α -furanopingvizanol (jedinjenje **1**) je oksidovan pomoću PCC u odgovarajući keton, odnosno **furanopingvizanon** (jedinjenje **2**) (Eksperimentalni deo 3.5.4.). Struktura dobijenog proizvoda reakcije potvrđena je analizom IR, 1D i 2D NMR spektara. Spektralni podaci su navedeni u tabeli 4.1.4., a numeracija ugljenika je prikazana na slici 4.1.13.

Tabela 4.1.4 ^1H - i ^{13}C -NMR hemijska pomeranja (ppm) furanopingvizanona (jedinjenje **2**) u CDCl_3 (na 400 i 100,6 MHz)

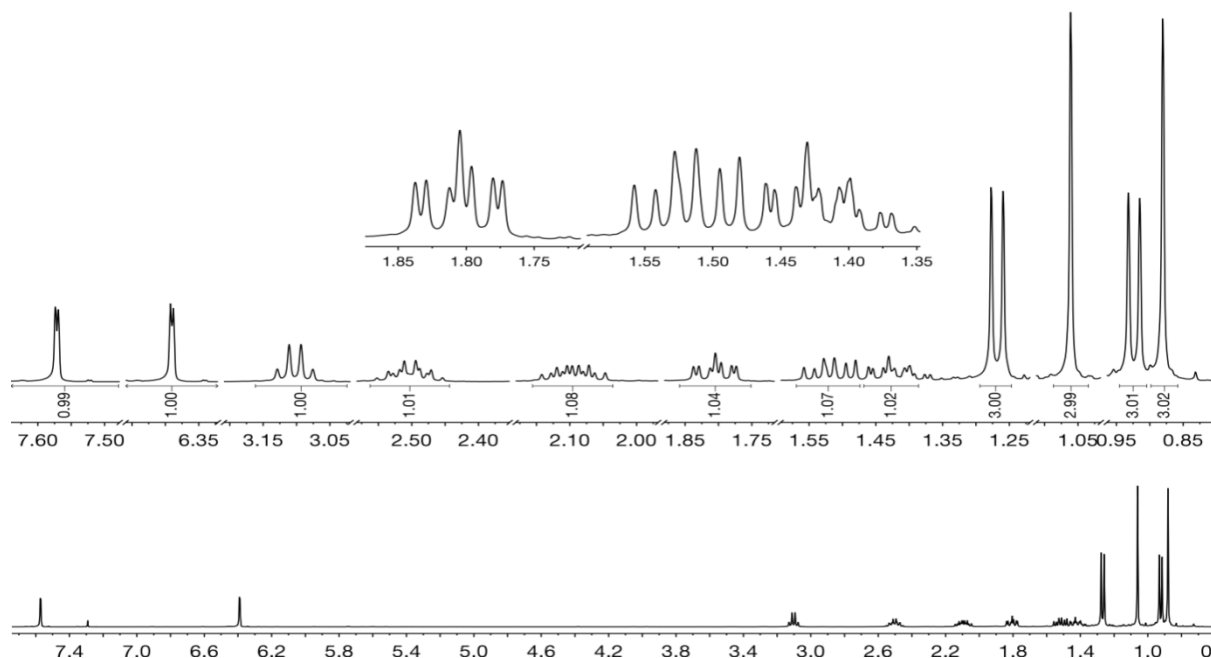
Furanopingvizanon (jedinjenje 2)			
Asignacija	C/H	Hloroform- <i>d</i>	
		^{13}C	^1H
C-1	CH	38,5	2,50 (<i>ddq</i>) $J_{1,13} = 6,8 \text{ Hz}$ $J_{1,2\alpha} = 9,2 \text{ Hz}$ $J_{1,2\beta} = 9,2 \text{ Hz}$
C-2	CH_2	31,0	α : 1,42 (<i>dddd</i>) $J_{2\beta,2\alpha} = 13,3 \text{ Hz}$ $J_{1,2\alpha} = 9,2 \text{ Hz}$ $J_{2\alpha,3\beta} = 3,0 \text{ Hz}$ $J_{2\alpha,3\alpha} = 12,6 \text{ Hz}$ β : 2,10 (<i>dddd</i>) $J_{2\beta,2\alpha} = 13,3 \text{ Hz}$ $J_{1,2\beta} = 9,2 \text{ Hz}$ $J_{2\beta,3\alpha} = 5,9 \text{ Hz}$ $J_{2\beta,3\beta} = 9,6 \text{ Hz}$
C-3	CH_2	33,9	α : 1,52 (<i>ddd</i>) $J_{2\alpha,3\alpha} = 12,6 \text{ Hz}$ $J_{2\beta,3\alpha} = 5,9 \text{ Hz}$ $J_{3\beta,3\alpha} = 12,6 \text{ Hz}$ β : 1,80 (<i>ddd</i>) $J_{3\beta,3\alpha} = 12,6 \text{ Hz}$ $J_{2\alpha,3\beta} = 3,0 \text{ Hz}$ $J_{2\beta,3\beta} = 9,6 \text{ Hz}$
C-4	CH	33,0	3,10 (<i>q</i>) $J_{4,15} = 7,1 \text{ Hz}$
C-5	Ar- C_q	139,3	-
C-6	Ar- C_q	145,2	-
C-7	$\text{C}=\text{O}$	189,6	-
C-8	C_q	59,3	-
C-9	C_q	56,6	-
C-10	Ar-CH	110,7	6,39 (<i>d</i>) $J_{10,11} = 1,7 \text{ Hz}$
C-11	Ar-CH	147,9	7,57 (<i>dd</i>), $J_{10,11} = 1,7 \text{ Hz}$ $J_{7,11} = 0,6 \text{ Hz}$
C-12	CH_3	11,8	1,06 (<i>s</i>)
C-13	CH_3	14,7	0,92 (<i>d</i>) $J_{1,13} = 6,8 \text{ Hz}$
C-14	CH_3	15,2	0,88 (<i>s</i>)
C-15	CH_3	13,9	1,27 (<i>d</i>) $J_{4,15} = 7,1 \text{ Hz}$

Eksperiment ko-injekcija jedinjenja **2** sa uzorkom etarskog ulja vrste *P. cordaeana* pokazao je da je furanopingvizanon (jedinjenje **2**) zaista prisutan u etarskom ulju. Pretraga literature otkrila je da ovo jedinjenje predstavlja novi prirodni proizvod. NMR hemijska pomeranja i konstante kuplovanja, izmereni u CDCl_3 (slike 4.1.11. i 4.1.12., prilog 13), jedinjenja **2** su navedeni u tabeli 4.1.4., a ključne interakcije na slici 4.1.13., dok su grafički 1D i 2D spektri dati u nastavku teksta, i u prilogima 15-19.



Slika 4.1.11. ^{13}C -NMR spektar furanopingvizanona (jedinjenja **2**) (CDCl_3)

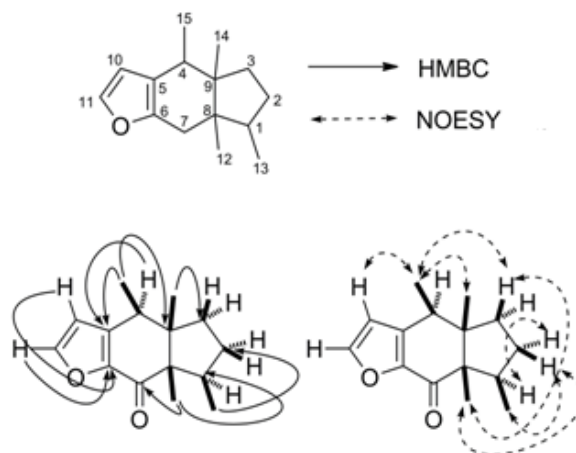
Detaljna analiza uključivala je seriju NMR eksperimenata (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, NOESY, HSQC, HMBC i ^1H - ^1H COSY). Kao što je to bilo slučaj sa analizom jedinjenja **1**, potvrđeno je prisustvo furanskog, šestočlanog i petočlanog prstena u strukturi jedinjenja **2**. Ključne informacije dobijene su analizom HMBC i NOESY interakcija (slike 4.1.14. i 4.1.15.). Naime, u HMBC spektru vidljiva je bila korelacija neprotonovanog ugljenika C5 (139,3 ppm) sa protonom H4 (3,1 ppm), kao i metil-protonima na 1,27 ppm (H15). Sami H15 protoni interaguju sa ugljenikom hemi-



Slika 4.1.12. ^1H -NMR spektar furanopingvizanona (jedinjenje **2**) (CDCl_3)

jskog pomeranja 56,6 ppm (C9). Daljom analizom utvrđeno je da se hemijsko pomeranje C9 u jedinjenju **2** ne razlikuje značajno od onog zabeleženog kod jedinjenja **1** (56,6 ppm naspram 52,2 ppm), dok se signal C5 kod jedinjenja **2** pomerio za skoro 20 ppm (139,3 ppm naspram 120,8 ppm). Signal vodonika na 4,56 ppm (H7) zabeležen kod jedinjenja **1**, je zajedno sa signalom OH-grupe nestao, što zajedno sa rezultatima ^{13}C -NMR analize, gde je na 189,6 ppm dodatno uočena karbonilna grupa, i pojavom intenzivne trake na 1675 cm^{-1} jasno ukazuje na formiranje konjugovane karbonilne grupe na C7. Konjugacija je dodatno potvrđena batohromnim

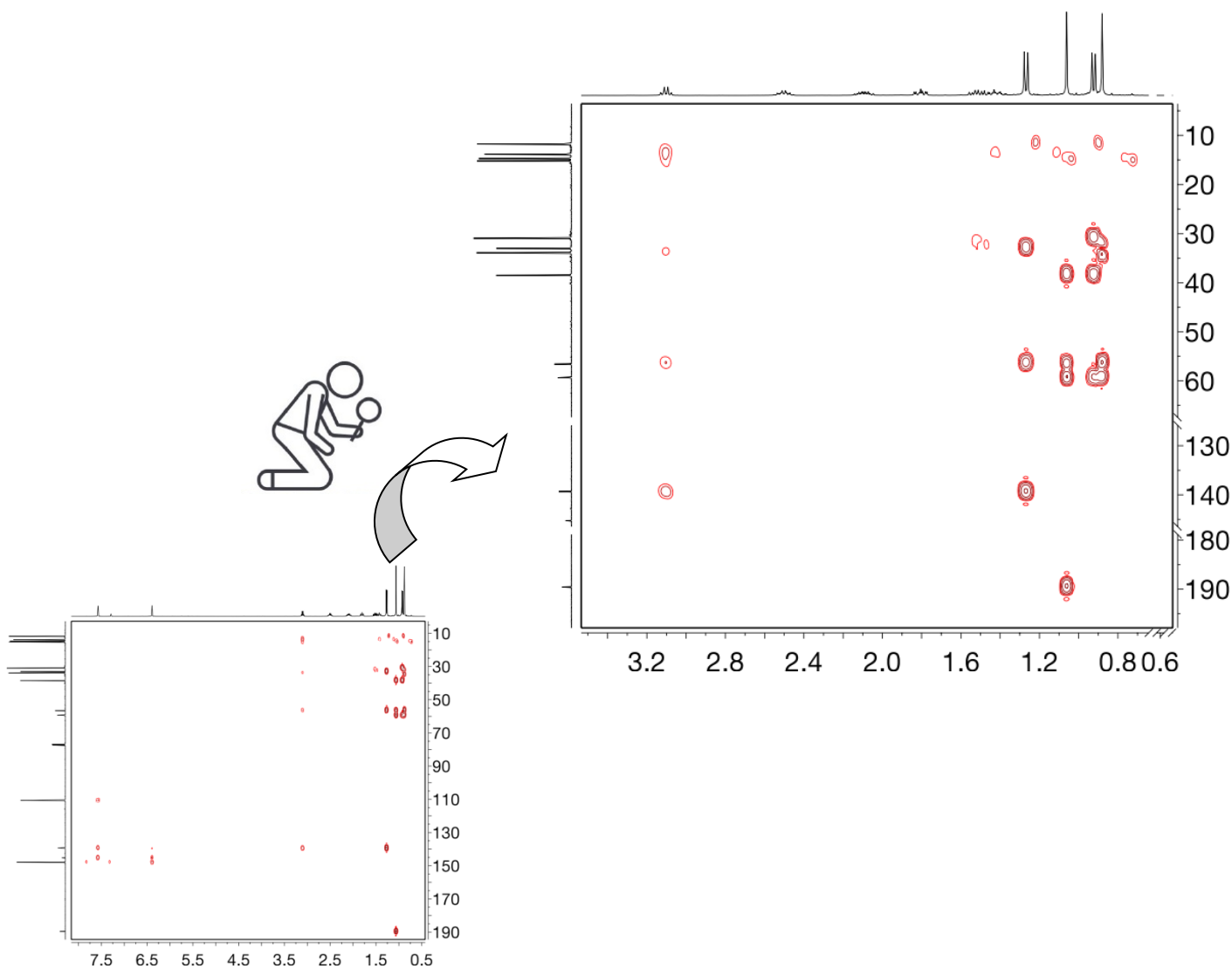
pomeranjem UV maksimuma ($\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{CN})$ na 270,5 nm sa $\varepsilon = 3259$). Formiranje karbonilne grupe na C7 rezultovalo je i pojednostavljanjem signala H4, koji je kao *dq* zabeležen u spektru jedinjenja **1**, transformisan u kvartet usled uklanjanja jedne konstante kuplovanja. Protoni H12 zabeleženi na 1,06 ppm, korelišu (u HMBC spektru) sa ugljenicima na 189,6 ppm (C7) i 38,5 ppm (C1), dok protoni na 0,92 ppm (H13) korespondiraju sa H2 α (1,42 ppm). C3 (33,9 ppm) je u korelaciji sa H14 (0,88 ppm) protonima metil-grupe, dok je za C6 (145,2 ppm) primećena i interakcija sa H10 (6,39 ppm) i H11 (7,57 ppm). Signali metil-grupa u ^1H -NMR protonskim spektrima su bili dobro razdvojeni što je omogućilo značajno jednostavnije određivanje relativne konfiguracije centara u poređenju sa jedinjenjem **1**.



Slika 4.1.13. Numeracije pingvizanskog skeleta, uz ključne NOESY i HMBC (H $\rightarrow$ C) korelacije furanopingvizanona (jedinjenje **2**), prikazane dole

Detaljnou analizom NOESY spektra primećena je interakcija H12 (1,06 ppm) ili H13 (0,92 ppm) metil-grupe, ili obe, sa H2 α (1,42 ppm). Daljim ispitivanjem interakcija protona, utvrđena je i interakcija H12 sa H3 α (1,52 ppm) i H3 β (1,8 ppm), uz detekciju korelacije H3 sa H15 (1,27 ppm). Protoni H15 korelišu sa susednim H14 i H10. Na ovaj način potvrđeno je da su H12, H13, H14 i H15 metil-grupe orijentisane na istu stranu molekula. Nasuprot tome, primećena korelacija H1 (2,5 ppm) i H2 β (2,1 ppm) svrstava njih same na međusobno istu, a od gore pomenutih metil-grupa, suprotnu stranu molekula (slike 4.1.11. i 4.1.15.).

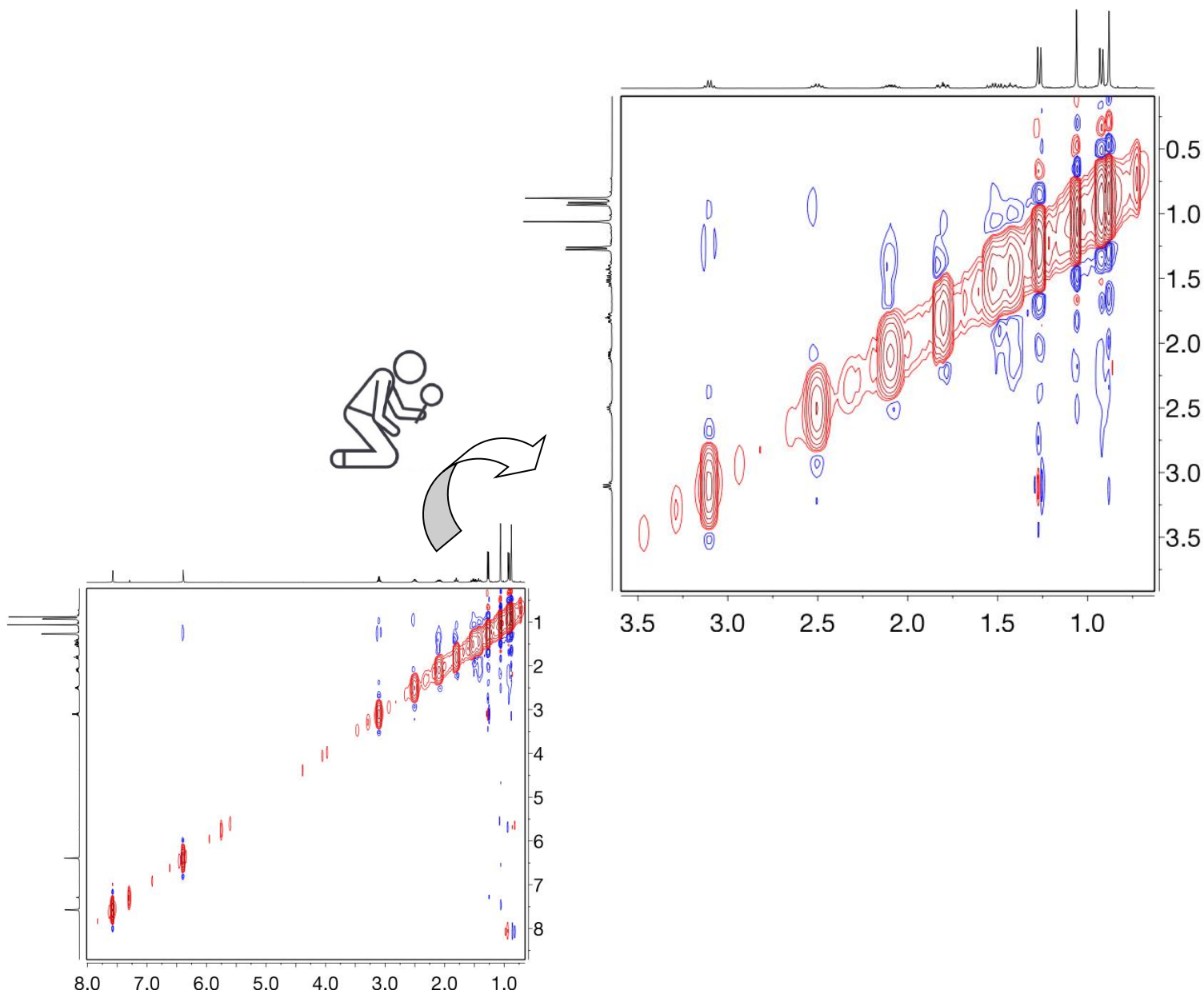
Interesantno je primetiti da je vrednost retencionog indeksa za keton **2** nekih 130 jedinica viša u odnosu na alkohol **1**. Ova neočekivana velika razlika verovatno potiče od velikog dipolnog momenta jedinjenja **2**, koje je posledica novouvedene keto-grupe i njene konjugacije sa furanskim prstenom, kao i male sposobnosti sterno zaklonjene alkoholne grupe jedinjenja **1** da gradi vodonične veze. Dobijanje furanopingvizanona je takođe pružilo mogućnost da se sintetiše β -fura-



Slika 4.1.14. HMBC spektar furanopingvizanona (jedinjenja **2**) i uvećanje oblasti HMBC spektra furanopingvizanona (CDCl_3)

nopingvizanol putem stereoselektivne redukcije jedinjenja **2**. Međutim, redukcija pomoću NaBH_4 i *Meerwein-Ponndorf-Verley* redukcije, pod uobičajenim uslovima, nije rezultovala ni u jednom

od dva moguća alkohola. Izolovano je samo polazno jedinjenje, iz reakcionih smeša. Kada je za redukciju korišćen LiAlH_4 (Eksperimentalni deo 3.5.5.), dobijeno je samo jedinjenje **1**, pri čemu ni tragovi β izomera nisu detektovani.



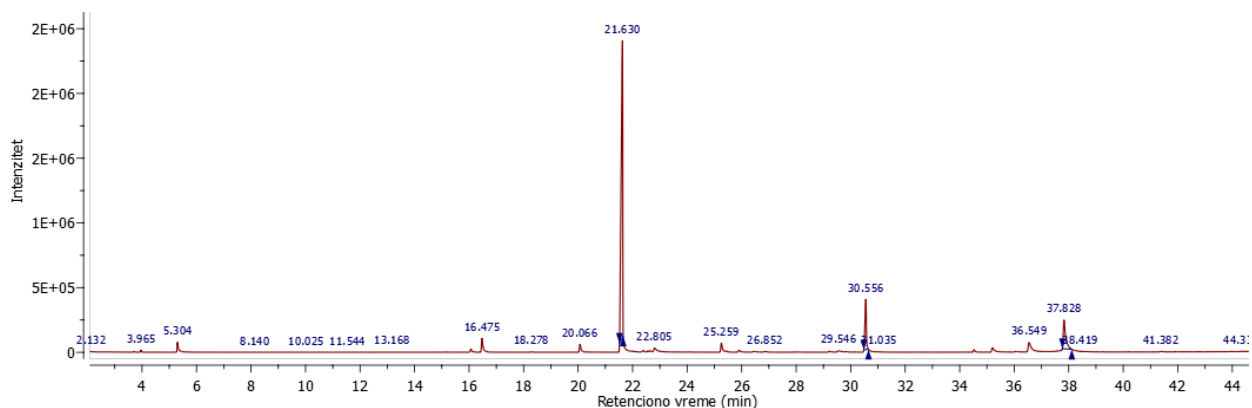
Slika 4.1.15. NOESY spektar furanopingvizanona (jedinjenja **2**) i uvećanje oblasti NOESY spektra furanopingvizanona (0,5– 3,5 ppm) (CDCl_3)

4.1.4. HEMIJSKI SASTAV DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA BILJNE VRSTE *P. cordaeana*

Za analizu dietil-etarskog ekstrakta vrste *P. cordaeana*, prikupljeno je 36,5 g svežeg biljnog materijala sa područja Suve planine u jugoistočnoj Srbiji. Nakon potapanja u dietil-etru i obrade (Eksperimentalni deo 3.5.2.), dobijen je ekstrakt u prinosu 0,94% (v/v), koji je potom podvrgnut GC-MS analizi. Broj detektovanih sekundarnih metabolita bio je vrlo mali – pouzdano je identifikovano samo pet jedinjenja, koja čine 66,6% ukupnog ekstrakta. Prisustvo α -furanopingvizanola zabeleženo je samo u tragu.

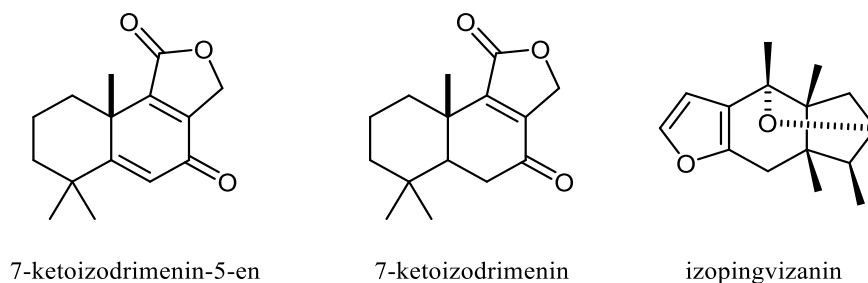
Jedini zabeleženi monoterpen predstavljao je β -felandren, sa udelom od 1,6% (slika 4.1.2., tabela 4.1.5.). Nizak sadržaj monoterpena u dietil-etarskom ekstraktu ovog biljnog materijala poklapa se sa nalazima Bukvički i saradnika (Bukvički et al., 2012), koji su analizirali metanolne, etanolne i etil-acetatne ekstrakte uzoraka *P. cordaeana* sakupljenih u Srbiji. U njihovim analizama, β -felandren je bio najzastupljeniji (12,1–15,54%), praćen limonenom (2,93–3,68%), cimenom (1,68–2,66%) i kamfenom (0,1–0,33%) koji su bili prisutni u svim uzorcima (Bukvički et al., 2012). S druge strane, uzorci ove vrste američkog porekla, u dihlormetanskom ekstraktu, sadržali su veći broj monoterpenskih ugljovodonika, uključujući mircen, γ -terpinen, α -tujen, sabinen, α -pinen, β -pinen i kamfen (Toyota et al., 1989b). Ovo dodatno ukazuje na mogućnost varijacije metaboličkog profila zavisno od geografskog porekla biljaka.

Među seskviterpenima, koji su činili 65% analiziranog ekstrakta, dominantan je bio pingvizanin (slike 4.1.2. i 4.1.16.) sa udelom od 62,8% (tabela 4.1.5.). Ova dominacija pingvizanina u ekstraktu je u slozi sa dostupnim literaturnim podacima. Dosadašnja istraživanja pokazala su da ova vrsta sadrži seskviterpene, pretežno pingvizane, praćene drimanima, monociklofarnezanima i elemanima, kao i diterpenoide (tipa kaurana) i flavonoide (Harrigan et al., 1993; Ludwiczuk et al., 2011; Toyota et al., 1989b). Šest radova se bavilo analizom sekundarnih metabolita vrste *P. cordaeana* (Opšti deo, 2.5.). Od toga, samo tri su se bavila ispitivanjem metabolita dietil-etarskog ekstrakta ove vrste, pri čemu su svi uzorci prikupljeni sa različitih lokaliteta u Turskoj (Asakawa et al., 2018; Tan et al., 2017; Tosun et al., 2013). Neka od identifikovanih jedinjenja po prvi put su pronađena u okviru ovih istraživanja (slike 2.5.3. i 4.1.17.; tabela 2.6.1.) (Harrigan et al., 1993; Tan et al., 2017; Toyota et al., 1989b).



Slika 4.1.16. Hromatogram dietil-etarskog ekstrakta vrste *P. cordaeana*

Prva analiza dietil-etarskog ekstrakta uzorka *P. cordaeana* pokazala je da pingvizanin (19%), perotetianal A (12,8%) i spiropingvizanin (9,4%) predstavljaju glavne komponente (Tosun et al., 2013). Uz njih, evidentirani su i drugi sekundarni metaboliti, uključujući sabinen, neotrifaradien, *cis*- β -elemen, (*Z*)- β -farnezen, ciklofarneza-5(14),8,10-trien, amorfen i izomere neofitadiena. U istom uzorku detektovano je prisustvo dvanaest dodatnih jedinjenja, koja nisu identifikovana (Tosun et al., 2013).



Slika 4.1.17. Odabrani sekundarni metaboliti dietil-etarskog ekstrakta *P. cordaeana*

Tan i saradnici su analizom dietil-etarskog ekstrakta uzorka *P. cordaeana*, pored fitola i stigmasterola (slika 2.5.4.), identifikovali četiri nova derivata pingvizanskog skeleta, nazvana

porelaacetali A-D (slika 2.5.3., tabela 2.6.1.) (Tan et al., 2017). Godinu dana kasnije, u uzorcima iste vrste, takođe iz Turske, zabeležen je i izopingvizanolid (tabela 2.6.1.), uz pingvizanin kao predstavnik pingvizanskih seskviterpena (Asakawa et al., 2018). U obrađenom uzorku prisustvo izopingvizanolida nije potvrđeno, ali je pingvizanin detektovan zajedno sa izopingvizaninom (1,5%), koji je ranije zabeležen kod samo tri vrste jetrenjača. Prisustvo izopingvizanina primećeno je kod jetrenjače *Frullania ericoides* iz porodice Frullaniaceae (Métoyer et al., 2016). Takođe, jedna od njih je i *Acrolejeunea securifolia* subsp. *caledonica* iz porodice Lejeuneaceae, sa područja Francuske (Coulerie et al., 2015), kao i sestrinska vrsta *P. cordaeana*, *P. platyphylla*, sa lokaliteta u Jorkširu (Connolly, 1990; Buchanan, 1994). Slični sekundarni metabolički profili podržavaju mogućnost da su porodice Lejeunaceae i Porellaceae potekle od zajedničkog pretka (Asakawa, 1982). Takođe, srodnost vrsta *P. cordaeana* i *P. platyphylla* potvrđuje i prisustvo porelapingvizanolida (tabela 2.6.1.), koji je, zajedno sa porelapingvizenonom i spiropingvizaninom, po prvi put izolovan iz metilen-hloridnog ekstrakta američkih uzoraka *P. cordaeana* u istraživanju Toyota i saradnika (Toyota et al., 1989b). Nijedan od ovih sekundarnih metabolita nije detektovan u našem analiziranom uzorku.

Tabela 4.1.5. Hemijski sastav dietil-etarskog ekstrakta jetrenjače *P. cordaeana*

RI ⁱ	Jedinjenje	Zastupljenost (%) ⁱⁱ	Identifikacija
1030	β -felandren	1,6	RI, MS ⁱⁱⁱ
1486	izolepidozen	0,7	RI, MS
1638	izopingvizanin	1,5	RI, MS
1706	pingvizanin	62,8	RI, MS
1760	α -furanopingvizanol	tr ^{iv}	RI, MS
Ukupno identifikovano:		66,6	
ⁱ Retencioni indeksi na koloni DB-5MS eksperimentalno određeni koinjekcijom homologe serije <i>n</i> -alkana. ⁱⁱ srednja vrednost tri analize; ⁱⁱⁱ Metode identifikacije: MS = upoređivanje masenih spektara sa onima iz biblioteka (Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3), RI – upoređivanjem eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima, Col – identifikacija sastojaka koinjektiranjem standardnih supastanci; ^{iv} tr - trag (<0,05%).			

Izolepidozen (slika 2.4.3.), ugljovodonični seskviterpen prisutan u manjem procentualnom udelu (tabela 4.1.5.), ranije nije bio identifikovan u ovoj biljnoj vrsti. Prvobitno je otkriven u *Preissia quadrata* iz porodice Marchantiaceae od strane Hardt i saradnika (Hardt et al., 1995), nakon čega je često navođen kao sastojak kod drugih predstavnika reda Porellales, kao što su *Frullania tamarisci*, *F. mammosa*, *F. bella*, *F. scalaris*, *Scapania aequiloba*, *Acromastigum tenax*, *A. caledonicum*, *Bazzania serrifolia*, *Acrolejeunea securifolia* subsp. *caledonica*,

Thysananthus comosus, *T. convolutus*, *T. spathulistipus*, *T. retusus*, *Dendrolejeunea fruticosa*, *Mastigolejeunea indica*, *Trocholejeunea sandvicensis* i druge jetrenjače (Coulerie et al., 2015; Ludwiczuk et al., 2013b; Métoyer et al., 2016; 2018; Sukkharak et al., 2011). Ostali sekundarni metaboliti pingvizanskog skeleta, prethodno identifikovani u biljnom materijalu vrste *P. cordaeana* (Asakawa et al., 2018; Bukvički et al., 2012; Harrigan et al., 1993; Tan et al., 2017; Tosun et al., 2013; Toyota et al., 1989b) različitog porekla, nisu detektovani u analiziranom uzorku koji je bio predmet naše studije. Pored pingvizana, u hemijskom profilu *P. cordaeana* prethodno su zabeleženi i norpingvizani: norpingvizanolid i norpingvizon-metil-estar (tabela 2.6.1.) (Harrigan et al., 1993; Toyota et al., 1989b), ali ni oni nisu identifikovani u obrađenom uzorku sakupljenom u Srbiji.

Sve navedeno ukazuje na potrebu za dodatnim prikupljanjem biljnog materijala vrste *P. cordaeana* sa različitih lokaliteta radi dalje analize. Pored geografskih faktora, neophodno je istražiti i sezonske promene, uslove životne sredine, kao i mikroklimatske karakteristike staništa koje mogu uticati na biosintezu specifičnih sekundarnih metabolita. Naime, varijabilnost u sadržaju i sastavu metabolita kao što su pingvizanin, izopingvizanin, i drugi pingvizanski derivati može biti povezana s različitim ekološkim stresorima, poput oscilacija u temperaturi, vlažnosti, ili prisustva određenih mikroorganizama u zemljištu.

Takođe, studije upoređivanja sekundarnog profila vrste *P. cordaeana* sa profilima blisko povezanih vrsta, kao što su *P. platyphylla* i članovi porodice *Lejeuneaceae*, mogle bi dodatno razjasniti filogenetske odnose i evolutivne puteve koji su doprineli diferencijaciji ovih metabolita. Ovakav pristup ne samo da može pomoći u određivanju biogeografskih obrazaca i mogućih migracionih ruta, već može otkriti i molekularne mehanizme koji stoje iza prilagođavanja specifičnim uslovima staništa.

4.1.5. ISPITIVANJE POTENCIJALNE IMUNOMODULATORNE AKTIVNOSTI NOVODETEKTOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA JETRENJAČE *P. cordaeana*

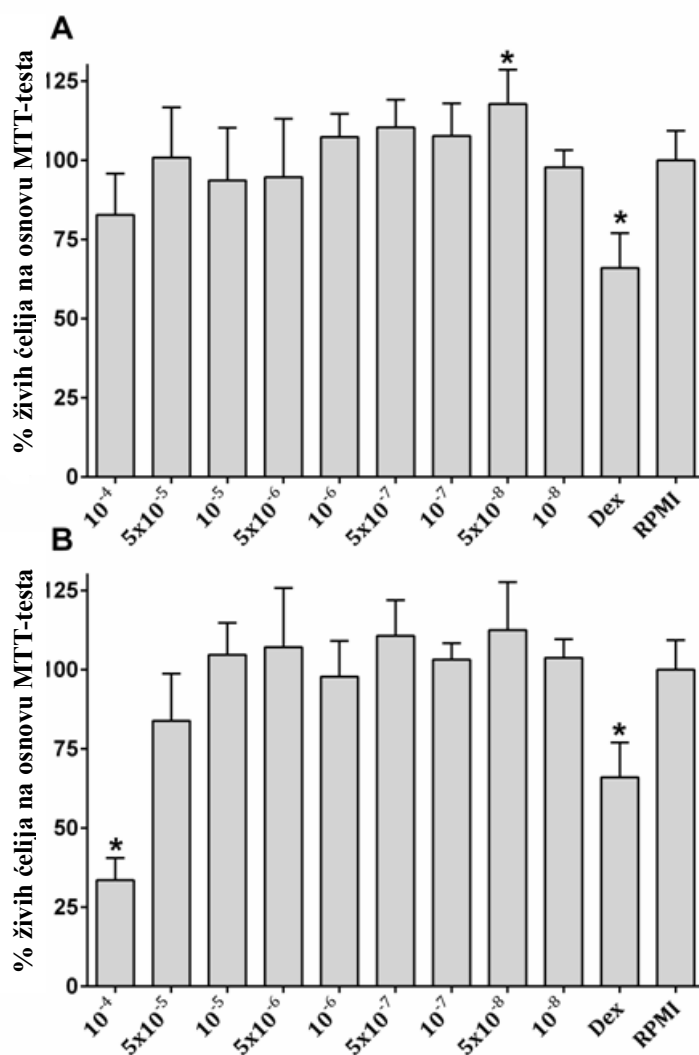
Splenociti (SPC) predstavljaju raznoliku grupu ćelija, koja uključuje B i T limfocite, dendritične ćelije i makrofage, od kojih svaka ima različit imunski odgovor (Rezultati i diskusija 4.3.7.). Efekat jedinjenja **1** i **2** izolovanih iz vrste *P. cordaeana* analiziran je kroz direktnu procenu ćelijske vijabilnosti, zasnovanu na očuvanju integriteta membrane zdravih ćelija koje ne propuštaju boje, što uključuje *in vitro* TB test, kao i indirektne metode zasnovane na proceni metaboličke aktivnosti. Metabolička aktivnost praćena je *in vitro* testovima, korišćenjem MTT i NR testova (Mosmann, 1983; Repetto et al., 2008; Strober, 2015). Svaka od ovih analiza pruža uvid u funkcionalno stanje različitih ćelijskih struktura i/ili njihov metabolički status. Dodatno, uticaj novodetektovanih jedinjenja na splenocite pacova ispitivan je putem Komet testa, mikroskopske analize ćelija, kao i procenom uticaja na sadržaj proteina, DNK i RNK.

Jedinjenja **1** i **2** su ispoljila različite efekte na vijabilnost splenocita pacova. Najviša testirana koncentracija jedinjenja **2** značajno je smanjila ćelijsku vijabilnost na osnovu MTT, NR i TB testova (slike 4.1.18., 4.1.19. i 4.1.24.). Poređenja radi, TB test je pokazao da je, nakon 24h inkubacije, jedinjenje **2**, u koncentraciji 10^{-6} M, izazvalo ćelijsku smrt približno 35% splenocita, dok je deksametazon (Dex), poznato citotoksično jedinjenje, u istoj koncentraciji smanjilo vijabilnost za 50% (slika 4.1.24.). Jedinjenje **1** nije statistički značajno menjalo vijabilnost splenocita u NR i TB testovima, dok je povećana vijabilnost ćelija uočena u MTT testu u jednoj od nižih koncentracija (5×10^{-5}).

Prihvaćena metoda za brzo i precizno ispitivanje potencijalne citotoksičnosti jedinjenja, praćenjem vijabilnosti i proliferacije ćelija, podrazumeva korišćenje tetrazolijumske soli, MTT. Žuta MTT u živim ćelijama može da prima elektrone od odgovarajućih supstrata odnosno koenzima (npr. NADH i NAD(P)H), i redukuje se u kristale formazana (slika 3.7.1.). Žive ćelije sa metabolički aktivnim mitohondrijama (sistem mitohondrijalne sukcinat-dehidrogenaze; NAD(P)H-zavisni enzimi ćelijske oksidoreduktaze) sposobne su da redukuju MTT. S obzirom na to, postoje dva moguća objašnjenja za povećanu redukciju MTT-a, odnosno indirektno povećanu vijabilnost ćelija na osnovu ovog testa. Ove mogućnosti obuhvataju ili povećanje proliferacije ćelija ili povećanje metaboličke aktivnosti mitohondrija. Nažalost, rezultati samog MTT testa ne

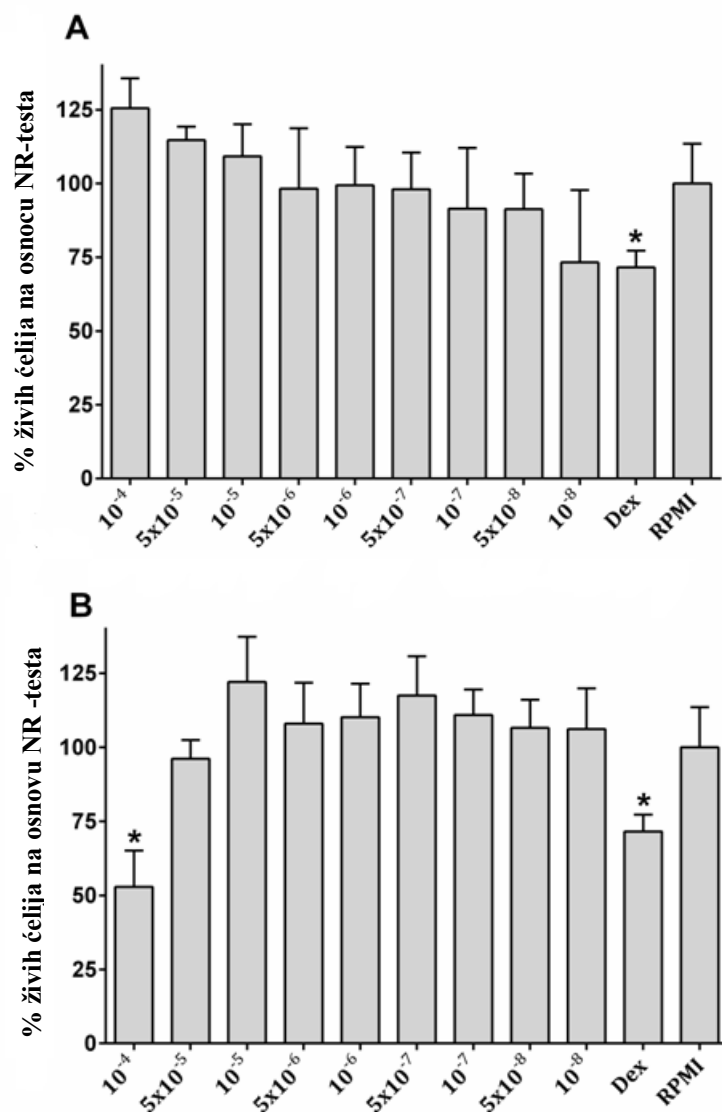
moгу napraviti razliku između ovih mogućih objašnjenja povećane vijabilnosti ćelija. Međutim, podaci dobijeni u testu neutralno crveno mogu pružiti neke informacije o ovom pitanju.

Kao neutralno naelektrisan molekul, neutralno crveno (NR) pasivnom difuzijom prolazi kroz ćelijsku membranu i akumulira se intracelularno u lizozomima. Tamo se protonuje i vezuje elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama za anjonska mesta ili fosfatne grupe na lizozomaln-



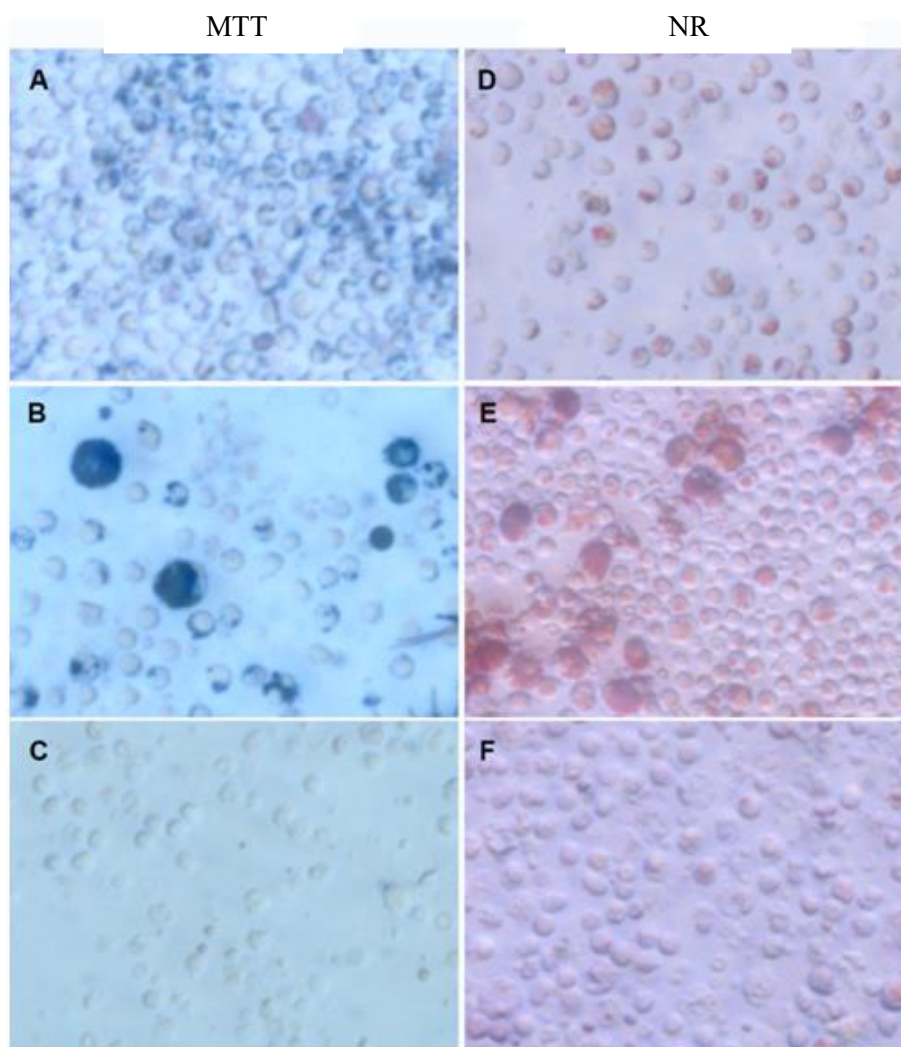
Slika 4.1.18. Efekat jedinjenja **1** (A), **2** (B) i deksametazona (Dex) na vijabilnost SPC, u poređenju sa preživljavanjem ćelija u RPMI medijumu, procenjeno na osnovu MTT-testa. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značaj je izračunat putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey*-evim *post hoc* testom. * $p < 0,0001$ vs. RPMI-tretirane ćelije

om matriksu. Preuzimanje NR zavisi od pH vrednosti; pri fiziološkom pH (7,3-7,5), boja nije naelektrisana i može da penetrira kroz ćelijske membrane, dok se pri nižem pH, kao u lizozomalnom okruženju (unutar lizozoma pH je niži (pH=5)), NR naelektriše pozitivno i kao takvo biva zadržano lizozomalnim matriksom. Oslabljena sposobnost ćelija da održe pH ravnote-



Slika 4.1.19. Efekat jedinjenja 1 (A), 2 (B) i deksametazona (Dex) na vijabilnost SPC, u poređenju sa preživljavanjem ćelija u RPMI medijumu, procenjeno na osnovu testa neutralno-crveno (NR). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značaj je izračunat putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey*-evim *post hoc* testom. * $p < 0,0001$ vs. RPMI-tretirane ćelije

žu ili specifični efekti na lizosome mogu rezultirati promenama u očitanjima NR testa (Repetto et al., 2008; Zurita et al., 2005). Zbog nedostatka dokaza o proliferaciji ćelija ili ćelijskoj smrti u našem NR testu, može se pretpostaviti da su SPC tretirani jedinjenjem **1** pokazali povećanu mitohondrijalnu aktivnost. (slika 4.1.19.) S druge strane, jedinjenje **2** dovelo je do smanjene vijabilnosti unutar oba testa (MTT, NR). Ovakve razlike u rezultatima dobijenim iz različitih testova vitalnosti ćelija, primećene su kod antineoplastičnih jedinjenja i nesteroidnih antiinflamatornih lekova (Chiba et al., 1998).



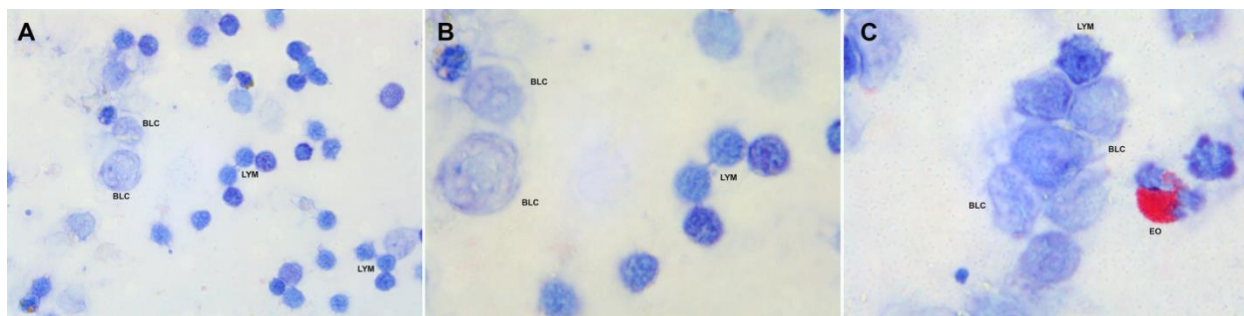
Slika 4.1.20. Izgled SPC u MTT (A-C) i NR (D-F) testovima: RPMI medijum (A i D), i RPMI medijum sa dodatim jedinjenjem **1** (B i E) ili **2** (C i F). Normalna akumulacija boje može se videti u ćelijama (A i D) a takođe su bile vidljive i izmenjene ćelije, potpuno ispunjene sa obe boje (B i E), i prazne (bele) ćelije (C i F)

Dalji izbor eksperimenata tokom ove analize bio je pažljivo osmišljen kako bi pružio uvid u mehanizme delovanja. Kulture splenocita inkubirane sa MTT-om i NR-om vizualizovane su pomoću svetlosnog mikroskopa. Interesantno je napomenuti da je među ćelijama tretiranim jedinjenjem **1** primećen povećan broj velikih, izmenjenih ćelija u poređenju sa sličnim ćelijama u kontrolnom medijumu (RPMI). Pored razlika u veličini, ove ćelije su pokazale karakterističnu akumulaciju MTT/NR boja. Normalni SPC su imali MTT/NR lokalizovan pretežno u mitohondrijama i blizu ćelijske membrane, kao i u ćelijskim lizozomima, dok su izmenjene ćelije bile potpuno ispunjene obema bojama (slike 4.1.20. B i E).

U slučaju jedinjenja **2**, u skladu sa uočenom smanjenom vijabilnošću u MTT i NR testovima (slika 4.1.18. i 4.1.19.), primećeno je da su veće koncentracije ovog jedinjenja dovele do smanjenja broja živih ćelija i smanjenja ćelijskog volumena, povećanja broja apoptotičkih ćelija i ćelijskih debrisa, i izazvali zgrudnjavanje ćelija. Smanjenje intracelularne akumulacije NR moglo se pratiti u ćelijama tretiranim jedinjenjem **2** do koncentracije od 5×10^{-6} M. Sa druge strane, drastično smanjenje redukcije MTT (bele prazne ćelije) bilo je vidljivo kod SPC tretiranih koncentracijom 10^{-4} M jedinjenja **2** (slika 4.1.20. C). Kada je reč o pozitivnoj kontroli, deksametazon je, u skladu sa očekivanjima, smanjio broj živih ćelija po bunarčiću i povećao broj nevijabilnih ćelija, i ćelijskih rezidua. Ipak, distribucija kristala formazana i NR u preostalim vijabilnim ćelijama tretiranim bilo Dex-om ili jedinjenjem **2**, nije se razlikovala od one u SPC tretiranim RPMI medijumom (negativna kontrola). Sva ova zapažanja sugerišu da jedinjenje **1** zaista ima drugačiji efekat na SPC u poređenju sa dva pomenuta citotoksična jedinjenja (Dex i jedinjenje **2**).

Reprezentativne slike SPC inkubiranih 24 h sa jedinjenjem **1**, dobijene pomoću imerzionog objektiva radi postizanja veće rezolucije i poboljšanog kvaliteta slike pri velikim uvećanjima, koje govore o stanju granulocita, ćelija nalik blastnim i limfocitima, prikazane su na slici 4.1.21. Limfociti su vrsta belih krvnih zrnaca koji, nakon nastanka u koštanoj srži, predstavljaju ćelije sa ključnom odbrambenom ulogom u imunološkom sistemu. Postoje tri morfološki iste, a funkcionalno različite grupe limfocita: B LYM, T LYM i NK ćelije, ćelijske ubice (Rezultati i diskusija 4.3.7., slika 4.3.19.). Normalni limfociti (LYM), koji se često nazivaju mali LYM (ovo je naziv i za B i T limfocite koji se ne mogu morfološki razlikovati) zabeleženi su tokom ove analize. Ove ćelije su prečnika 8 do 10 μm i imaju velika jedra i tanak obod citoplazme (Abbas et

al., 2015). Pored toga, veliki LYM (klasifikovan kao izmenjen) takođe je bio prisutan. Generalno, postojala su dva tipa ovih izmenjenih LYM: (i) prelazni LYM veći od normalnog LYM i (ii) još veći, aktivirani LYM (preko 15 μm), sa nebeskoplavom citoplazmom, ćelijama nalik blastu (slika 4.1.21.).



Slika 4.1.21. Izgled splenocita, pod imerzionim objektivom pri uvećanju x1000 (A) i x2000 (B i C), kada se tretira sa jedinjenjem **1**. Posmatrani su normani limfociti (LYM), aktivirane ćelije nalik blastnim (BLC) i eozinofilni granulociti (EO)

Ove izmenjene ćelije, u drastično različitom broju, detektovane su u svim razmazima iz ćelijskih kultura tretiranih jedinjenjima **1** ili **2**, kao i u RPMI kontroli (tabela 4.1.6.). Jedinjenje **1** izazvalo je pojavu ovih izmenjenih LYM u proseku kod $49 \pm 7\%$ pri koncentraciji 10^{-4} M, dok je kontrola sadržala $6 \pm 3\%$ velikih LYM. Jedinjenje **2** pokazalo je sličan efekat kao jedinjenje **1**, ali je bilo dva puta manje izraženo. Najverovatnije je tretman jedinjenjem **1**, uglavnom, a jedinjenjem **2** u manjoj meri, stimulisao i aktivirao LYM, što je rezultiralo deobom ćelija. Postoje prethodni radovi o jedinjenjima veoma različitih struktura, koja su izazvala sličan efekat. Na primer, fitohemaglutinin (PHA), lektin iz mahunarki, pokazao je da je moćan mitogen za LYM, izazivajući analogne morfološke promene tokom rasta i transformacije LYM *in vitro* (Yofeey et al., 1965). Takođe, konkanavalin A (Con A), drugi lektin, široko se koristi za *in vitro* studije mehanizama aktivacije T LYM (Di Sabato et al., 1987; Deng et al., 1996).

Radi daljeg razjašnjavanja mehanizma delovanja jedinjenja **1** i **2**, njihov potencijalni štetni efekat na DNK splenocita procenjen je u Komet testu. Komet test („single-cell gel electrophoresis” (SCGE)) omogućava pouzdanu, senzitivnu detekciju oštećenja DNK. Ovaj test je pogodan za otkrivanje niskog nivoa oštećenja DNK (prekidanje jednog lanca (single-standard breaks-SSB),

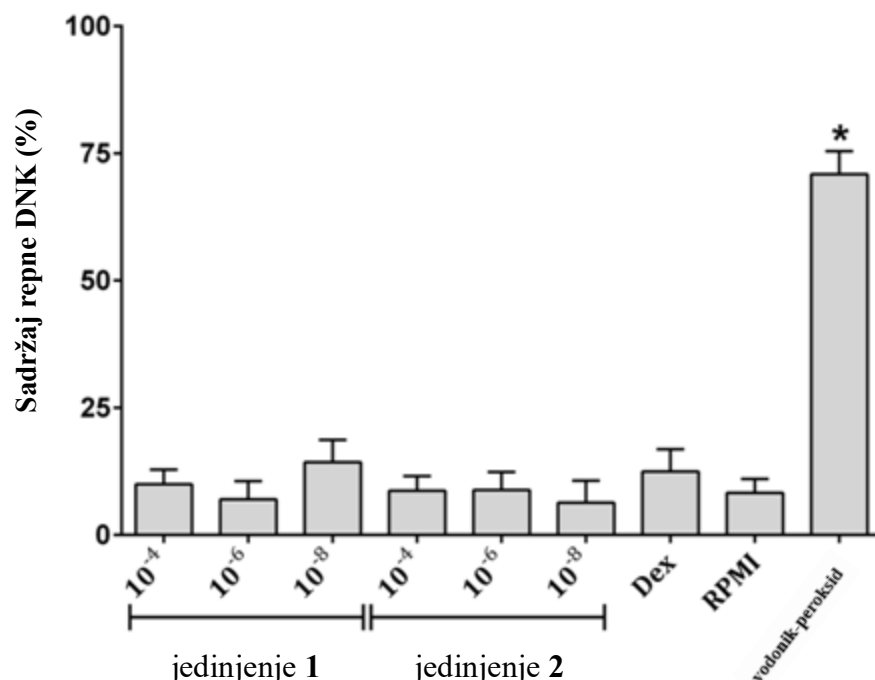
Tabela 4.1.6. Broj izmenjenih ćelija, posmatranih pod imerzionim objektivom, utvrđen nakon 24h inkubacije SPC sa jedinjenjima 1 i 2, ili u RPMI-medijumu

Jedinjenje	Jedinjenje 1			Jedinjenje 2			RPMI
Koncentracija aktivnog jedinjenja/bunariću (M)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	0
Prosečan % izmenjenih ćelija	49	33	26	23	20	9	6
SD	7	6	4	4	3	4	3
Max % izmenjenih ćelija	62	42	32	26	22	14	8
Min % izmenjenih ćelija	42	26	21	17	16	3	2
Medijalni % izmenjenih ćelija	47	32	27	25	20	11	6
<i>p</i> vrednost vs. RPMI	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns ⁱ	/
ⁱ Nije utvrđena statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolom tretiranom RPMI-medijumom							

alkalno labilna mesta, umrežavanje DNK-DNK/DNK-proteina itd.) što ga čini pouzdanim za procenu potencijalnih genotoksičnih efekata različitih jedinjenja (Tice et al., 2000). U skladu sa time da se ovaj test može izvesti na bilo kom tipu ćelija, pod uslovom da su žive i da se mogu dobiti u obliku suspenzije, nakon inkubacije i centrifugiranja pristupilo se daljoj analizi u skladu sa informacijama navedenim u Eksperimentalnom delu, 3.7.6. Rezultati Komet testa prikazani su na slici 4.1.22. Kao meru oštećenja DNK izabrali smo procenat DNK u parametru repa (Collins, 2008). SPC tretirani jedinjenjima 1 i 2 pokazali su niske nivoe oštećenja DNK, kao što su oni uočeni za ćelije negativne kontrole. Prema ovim rezultatima, oba testirana jedinjenja, u svim ispitivanim koncentracijama, nisu pokazala značajnu genotoksičnost u *in vitro* uslovima nakon 24-časovnog tretmana. Ovo ne isključuje početni efekat oštećenja DNK ovih jedinjenja, već jednostavno ukazuje na to da nije bilo oštećenja nakon reparacije DNK, za koju je poznato da se odvija u periodu od 24 h (Tice et al., 2000).

Prethodna istraživanja su pokazala da kratko izlaganje ćelija L5178Y tk+/- limfoma kod miševa Dex-u (3 h) izaziva slabo povećanje momenta repa, dok nakon produžene inkubacije (24 h) oštećenja DNK nisu bila detektovana, što ukazuje na apoptotički mehanizam delovanja (Lee et al., 2003). Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim tokom analize sa deksametazonom u okviru ove studije (24 h inkubacije, slika 4.1.22.). Navedeni nalazi sugerišu da bi pingvizani mogli da ispolje slično ponašanje kao Dex, tj. da mogu indukovati apoptozu SPC u određenim koncentracijama. Tokom apoptoze, DNK se razlaže na delove veličine nukleozoma, što smanjuje verovatnoću da Komet test može otkriti fragmente DNK u ovom slučaju (Collins et al., 2008). Važno je napomenuti da su slike snimljene tokom ispitivanja kometa otkrile mnogo manji broj

vidljivih kometa (ćelije sa DNK materijalom koncentrisanim u ćelijskom jedru) za sve koncentracije jedinjenja **2** i deksametazona, za koje se pokazalo da su citotoksični u gore pomenutim testovima. Ova zapažanja ukazuju na apoptozu kao mogući mehanizam delovanja jedinjenja **2** i deksametazona.



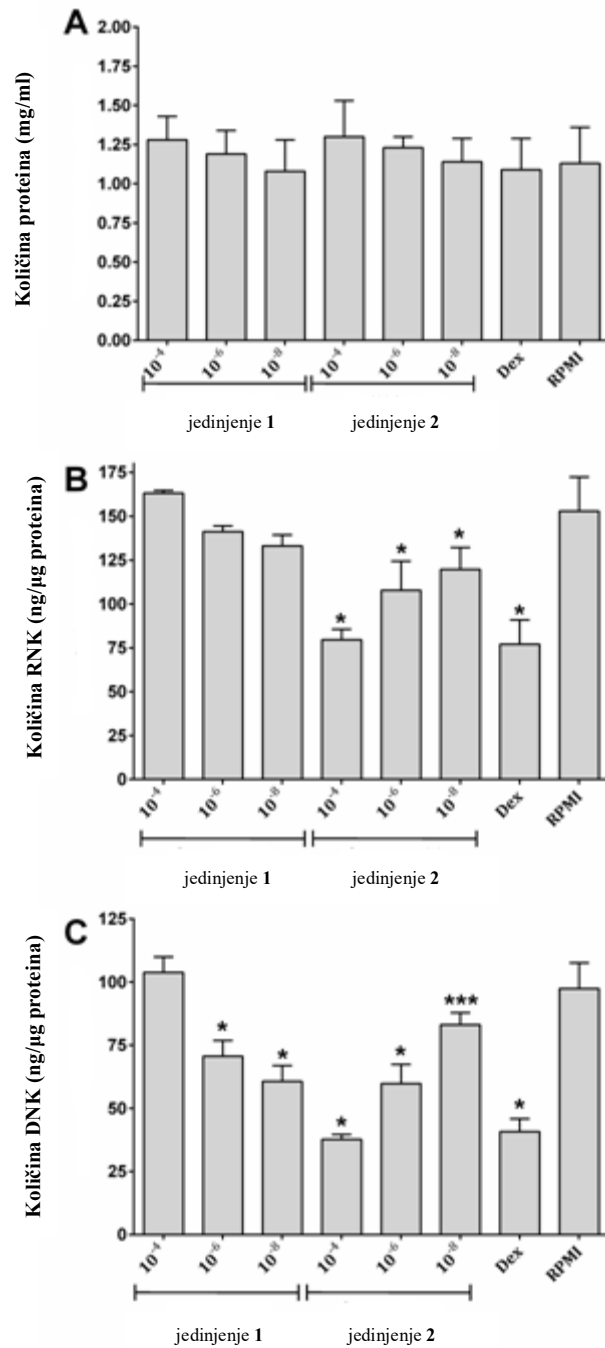
Slika 4.1.22. Efekat oštećenja DNK izražen kao % DNK u repu splenocita tretiranih jedinjenjima **1** i **2** tokom 24-časovnog perioda. Vrednosti su date kao srednja vrednost $\pm$ SD. # $p < 0,0001$ u odnosu na sve grupe

Analiza rezultata izvedenih testova, pretežno za jedinjenje **1**, ali i u određenoj meri za jedinjenje **2**, sugerise da postoji značajan broj SPC koje su, čini se, stimulisani i aktivirani, tj. podlegli ćelijskoj deobi. Od strane *Kaushansky*-a i saradnika, potvrđeno je da se nakon stimulacije malog limfocita u mirovanju (G_0), očekuje povećan transport i promene na membrani, uz naknadnu sintezu RNK i proteina tokom G_1 -faze. Ovaj proces je praćen sintezom DNK u S-fazi, što dovodi do formiranja blastnih ćelija. Nakon sazrevanja (G_2), blastne ćelije se dele (M-faza), što rezultira stvaranjem efektorskih i memorijskih ćelija (*Kaushansky et al., 2015*). Pažnja je zatim usmerena na potvrđivanje ove hipoteze, kroz verifikaciju povećane količine proteina, ukupne RNK i

genomske DNK u SPC, nakon tretmana testiranim jedinjenjima (slika 4.1.23.). Posle 24 h inkubacije sa jedinjenjem **1**, primećeno je povećanje količine RNK i DNK u SPC, sa povećanjem koncentracije ovog jedinjenja. Međutim, količina RNK se nije značajno razlikovala od količine RNK u netretiranim SPC. Zanimljivo je da su dve niže koncentracije (10^{-8} i 10^{-6} M) ovog jedinjenja izazvale značajno smanjenje količine DNK u poređenju sa kontrolom tretiranom RPMI. Genomska DNK u jezgri apoptotičkih ćelija je često fragmentirana. Ovi fragmenti se oslobađaju prilikom permeabilizacije ćelijske membrane, što rezultira sadržajem DNK koji je manji od onog u živim humanim LYM (Wang i Shi, 2002). Ovo ukazuje da jedinjenje **1**, u nižim koncentracijama, ispoljava citotoksično dejstvo, najverovatnije putem apoptotičkog mehanizma.

PHA i jedinjenje **1** izazivaju slične morfološke (svetlosno mikroskopske, histohemijske i fine strukturne) promene ćelija, dok je poznato da PHA izaziva i povećanje acetilovanja histona, kao i sintezu nove RNK i DNK, procenjene različitim metodama (Yoffey et al., 1965; Turk et al., 1969). Utvrđeno je da morfološke promene limfocita (LYM) ne moraju biti u korelaciji sa količinom nukleinskih kiselina (DNK, RNK) u njima (Turk et al., 1969). Takođe, odgovor na PHA zavisi od veličine LYM (mali, srednji, veliki), ali sinteza nukleinskih kiselina ne pokazuje istu zavisnost (Yoffey et al., 1965). Naime, u malim LYM (i u manjoj meri u drugim) značajna sinteza RNK omogućava ćeliji da se transformiše i kasnije započne sintezu DNK. Tokom prva 24 h inkubacije ćelija sa PHA, nivo RNK se značajno povećava, ali ovaj proces nije u korelaciji sa replikacijom DNK (u prva 24 h ovi procesi nisu usklađeni; Epstein i Stohlman, 1964).

U ovom eksperimentu, u prisustvu najviše koncentracije jedinjenja **1**, nakon 24 h inkubacije, detektovano je povećanje nivoa proteina, RNK i DNK, ali to nije bilo statistički značajno u poređenju sa kontrolnim ćelijama (slika 4.1.23.). Ovi rezultati su u suprotnosti sa zapažanjima pod inverzionim mikroskopom (smanjena gustina ćelija) i sa rezultatima MTT/NR/TB testova (slike 4.1.18; 4.1.19. i 4.1.24.). Ostale koncentracije jedinjenja **1** pokazale su smanjenje svih navedenih parametara, dok su testovi vijabilnosti pokazali različit trend aktivnosti (slike 4.1.18; 4.1.19. i 4.1.23.). Sve navedeno može se sažeti na sledeći način: različite koncentracije jedinjenja **1** ispoljavaju različite efekte na SPC. Dok dve niže koncentracije (10^{-8} i 10^{-6} mol/dm³) pokazuju blagi citotoksični efekat u testovima, najviše koncentracije deluju kao stimulansi SPC, uzrokujući njihovu blastnu transformaciju i konačnu ćelijsku deobu. Ovo je u skladu sa mikroskopskim i spektrofotometrijskim analizama, gde su blastne ćelije uočene u većem



Slika 4.1.23. Efekat jedinjenja 1 i 2 (pozitivna kontrola-deksametazon; negativna kontrola-RPMI-medijum) na ukupni sadržaj proteina (A), RNK (B) i genske DNK (C) u splenocitima. Vrednosti su date kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistička značajnost izračunata je jednosmernom analizom varijanse (*one-way* ANOVA) praćenom *Tukey*-ovim *post hoc* testom za višestruka poređenja. * $p < 0,0001$, *** $p < 0,01$ u odnosu na RPMI-tretirane ćelije

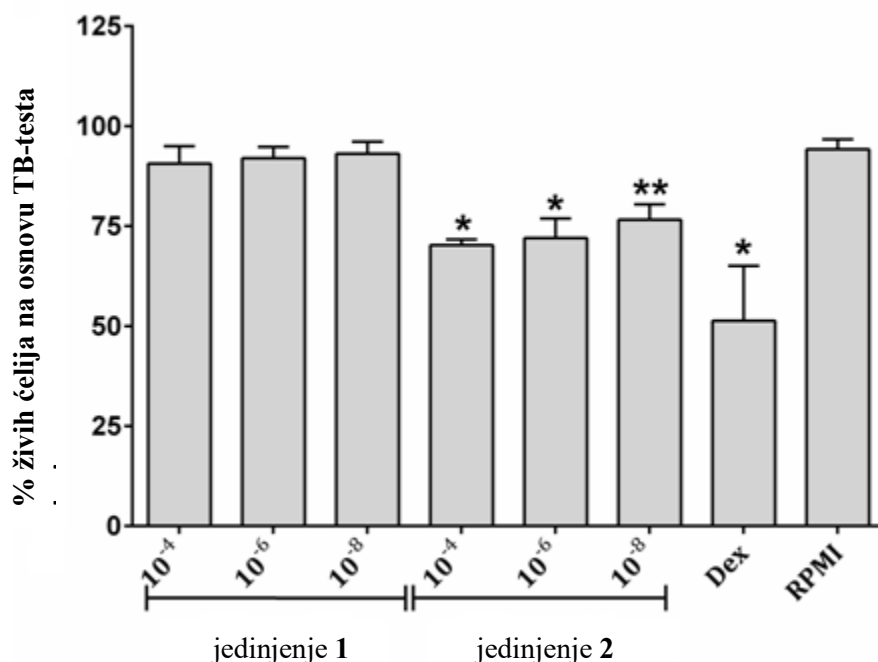
broju (tabela 4.1.6.), i/, ili citotoksičnost nije bila primećena, ili je zapaženo povećanje vijabilnosti (slike 4.1.18.; 4.1.19. i 4.1.24.).

Za jedinjenje **2** uočen je jasan citotoksični efekat zavisan od koncentracije, što se manifestuje smanjenjem količine DNK i RNK sa povećanjem koncentracije ovog jedinjenja u medijumu. Može se zaključiti da svi sprovedeni testovi ukazuju na citotoksični potencijal jedinjenja **2**: smanjen broj ćelija i smanjena MTT/NR/TB aktivnost (slike 4.1.18.; 4.1.19.; 4.1.23. i 4.1.24.). Smanjenje nivoa DNK snažno sugerise da se ćelijska smrt izazvana ovim jedinjenjem javlja putem apoptoze. S druge strane, merenje ukupne količine proteina pokazalo je odstupanje u obrascu delovanja jedinjenja **1** i **2** (kao i deksametazona), s obzirom na to da nije zabeleženo očekivano povećanje ili smanjenje. Ovo se može objasniti činjenicom da, iako su ćelije bile mrtve ili apoptotične, ili su počele da se dezintegrišu, one i dalje doprinose ukupnoj procenjenoj količini proteina. Na primer, nije zabeležena korelacija između rezultata toksičnosti u NR-testu i količine proteina procenjene u kulturi fibroblasta pluća hrčka (Chiba et al., 1998).

Nekoliko prethodno opisanih mehanizama, koji pretežno uključuju aktivnost antigena (njih četiri) i nespecifičnih stimulanasa (površinski efekti usled nakupljanja ćelija), pri čemu se neki od njih mogu povezati sa aktivnošću PHA i ConA, dovode do ćelijske indukcije i dalje transformacije i podele (Turk et al., 1969). Postoje publikacije koje istražuju dejstvo jedinjenja arsena, gde niže koncentracije stimulišu sintezu DNK, dok više koncentracije smanjuju ovu sintezu nakon interakcije sa ćelijskom membranom (Meng i Meng, 2000). Poznato je da nespecifično oštećenje limfocita ultrazvukom izaziva morfološke promene, ali ne dovodi do značajnog povećanja sinteze RNK i DNK u poređenju sa kontrolom (Turk et al., 1969). Nije moguće sa sigurnošću odrediti tačan mehanizam aktivacije splenocita (blastna transformacija) od strane jedinjenja **1** (i možda jedinjenja **2**), ali je verovatno da se javlja putem nespecifičnih stimulanasa.

Tokom procene toksičnih efekata dva pingvizana na kulturu SPC, ispitivana je njihova interakcija sa ćelijama. Ćelije tretirane sa oba jedinjenja su centrifugiranjem odvojene od medijuma, nakon čega su višestruko isprane radi uklanjanja adherentnog medijuma. Spojeni ispirci i medijum su iscrpno ekstrahovani dietil-etrom, a zatim su koncentrovani ekstrakti analizirani metodom GC-MS, kako bi se utvrdilo prisustvo jedinjenja **1** i **2**, kao i njihovih mogućih metabolita. Precipitirani SPC su takođe podvrgnuti istoj proceduri, s tim što je liza ćelija izvedena sonikacijom i ponovljenim ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja. Pingvizani **1** i **2**, kao i njima srodna

jedinjenja, nisu detektovani u ćelijskim ekstraktima, dok je u medijumu dokazano prisustvo jedinjenja **1** i **2**, bez drugih isparljivih metabolita.



Slika 4.1.24. Efekat jedinjenja **1** (A), **2** (B) i deksametazona (Dex) na vijabilnost SPC, u poređenju sa preživljavanjem ćelija u RPMI medijumu, na osnovu tripan plavo (TB) testa. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značajne razlike su izračunate putem *one-way* ANOVA testa praćen Tukey-evim *post hoc* testom. * $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$ u odnosu na RPMI-tretirane ćelije

Sa druge strane, ekstrakti medijuma, u slučaju jedinjenja **1** su, pored α -furanopingvizanola, sadržali i određenu količinu jedinjenja **2**. Poreklo furanopingvizanona (jedinjenje **2**) moglo bi se povezati sa mogućim dejstvom enzimskog sistema SPC, koji oksiduju jedinjenje **1** u keton, odnosno jedinjenje **2**. Opšte je poznato da se sekundarni alkoholi oksiduju do odgovarajućih ketona zahvaljujući brojnim P450 enzimima (Matsunaga et al., 1998). Citohromi P450 su poznati kao glavni enzimi faze I i verovatno najvažniji katalizatori među svim enzimima koji metabolišu ksenobiotike (Wang i Tompkins, 2008). Iako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su ovi enzimi posredovali u biotransformaciji α -furanopingvizanola (**1**) u furanopingvizanon (**2**), to se čini vrlo verovatnim. Naime, ekspresija citohroma P450 (CYP), pretežno u jetri, ali i u drugim tkivima, omogućava biotransformaciju različitih molekula, uključujući lekove, koji potencijalno dolaze u

kontakt sa ovim ćelijama. Utvrđeno je da su razlike u ekspresiji CYP1A i CYP3A u jetri između mužjaka pacova sojeva Vistar i Sprague-Dawley (SD) više od dva puta veće kod prvog soja (Kishida et al., 2008). Takođe, postoje polne razlike u ekspresiji CYP2C11, koji je odgovoran za metabolizam lekova i steroida, u SPC pacova. Ovaj enzim nije detektovan kod ženki SD soja pacova (Thangavel et al., 2007).

Navedena enzimski uzrokovana transformacija može imati važnu implikaciju gorenavedenog različitog efekta jedinjenja **1** na SPC ćelije u različitim koncentracijama. Utvrđeno je da jedinjenje **1** statistički značajno ne utiče na vitalnost SPC u NR i TB testovima, dok je povećana vijabilnost ćelija uočena u MTT-testu pri nižoj koncentraciji od 5×10^{-8} M. Pri koncentraciji od 10^{-4} M, jedinjenje **1** je indukovalo blastnu transformaciju SPC, dok je pri koncentracijama od 10^{-8} i 10^{-6} M delovalo kao citotoksični agens.

Može se spekulirati da pri nižim koncentracijama pomenuti enzimski sistem efikasno konvertuje jedinjenje **1** u jedinjenje **2**, koje potom ispoljava svoj citotoksični efekat. Međutim, čini se da je najviša testirana koncentracija jedinjenja **1**, korišćena za detekciju jedinjenja **1** i **2** i njihovih metabolita, prezasičila enzimski sistem, što dovodi do povećane količine jedinjenja **1**, koje poseduje stimulativni efekat na SPC. Najveće testirane koncentracije jedinjenja **2** značajno su smanjile vitalnost ćelija na osnovu MTT, NR i TB testova (slike 4.1.18.; 4.1.19. i 4.1.24.).

4.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *P. PLATYPHYLLA*

4.2.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *P. PLATYPHYLLA*

Analizom etarskog ulja jetrenjače *P. platyphylla* prikupljene sa dva lokaliteta— Veliki Kupci (Srbija) i planina Maljevica (Bugarska)—identifikovano je ukupno 15 sastojaka (tabela 4.2.1.). Među njima, najmanje je bilo monoterpena, dok su seskviterpeni činili dominantan deo ulja (tabela 4.2.1.). U analiziranom uzorku poreklom iz Srbije, seskviterpeni su činili 52,9% ukupnog sastava, od čega su četiri neoksigenovana seskviterpena doprinosila sa 18,6%, a šest oksigenovanih sa 34,3% (tabela 4.2.1.). Analiza uzoraka iz Bugarske pokazala je sličan hemijski profil, sa jednim identifikovanim seskviterpenom manje. Međutim, ukupni procentualni udeo seskviterpena bio je veći, dostigavši 76,9%, što od starta ukazuje na moguće regionalne razlike u hemijskom sastavu metabolita vrste *P. platyphylla*. U okviru uzoraka iz Bugarske detektovano je ukupno 12 sastojaka, koji su činili 92,1% analiziranog etaskog ulja. Među njima, dva su pripadala monoterpenima (11,7%), a identifikovan je i jedan oksigenovani diterpen (tabela 4.2.1.).

Paralelno s analizom etarskih ulja, sproveden je i detaljni pregled literature o isparljivim sekundarnim metabolitima vrste *P. platyphylla*. Vrste iz roda *Porella* poznate su kao bogat izvor seskviterpenoida različitih strukturnih tipova, uključujući drimanska, pingvizanska, gvajanska, pseudogvajanska, germakranska, aromadendranska i strijatanska jedinjenja. Ova široka varijabilnost u tipu seskviterpena može biti pokazatelj uticaja regionalnih faktora na hemijski sastav ovih biljaka, čime se potvrđuje značaj kombinovanja literaturnih i eksperimentalnih podataka za potpunije razumevanje hemijske raznolikosti unutar roda *Porella*.

U kontekstu ranijih istraživanja, prva studija koja se bavila analizom biljne vrste *P. platyphylla* (L.) Lindb. (*sin. Madotheca platyphylla* (L.) Dumort.) objavljena je još 1911. godine (Molisch, 1911). U tom istraživanju, *Molisch* je prijavio prisustvo saponarina (izoviteksin-7-glukozid), prirodnog biljnog glikozida iz grupe flavonoida. Rano otkriće saponarina u hemijskom profilu *P. platyphylla*, kasnije je potvrđeno analizom njenog metanolnog ekstrakta i poređenjem sa autentičnim uzorkom dobijenim iz biljke *Saponaria officinalis* (Nilsson, 1969). Tri godine kasnije,

isti autor je iz vodenometanoloznog ekstrakta uzoraka *P. platyphylla* izolovao saponarin, izoviteksin i novi flavonoid, apigenin-6,8-di-C-glukozid, što je ukazalo na to da ova „zidna jetrenjača“ (*Wall Scalewort*) može predstavljati potencijalno značajan izvor nepoznatih jedinjenja (Nilsson, 1973). Par godina kasnije analiza dietil-etarskog ekstrakta *P. platyphylla* sa fokusom na distribuciju hidrofilnih fenolnih jedinjenja, posebno flavonoida, sprovedena je od strane Mues-a, koji je istražio 16 populacija ove vrste prikupljenih u Bugarskoj (Mues, 1982). Dva glavna flavonoida: šaftozid (6-C- β -D-glukopiranozid-8-C- α -L-arabinopiranozid) i saponarin (isoviteksin-7- β -D-glukopiranozid), praćena su manje zastupljenim viceninom 2 (apigenin-6,8-di-C- β -D-glukopiranozid) i izoviteksinom (apigenin-6-C- β -D-glukopiranozid). Poređenjem ovih rezultata sa ranije objavljenim podacima Nilsson-a (Nilsson, 1973), može se zaključiti da je *P. platyphylla* hemijski promenljiva vrsta u pogledu sinteze flavonoida, što upućuje na mogućnost slične varijabilnosti i u drugim sekundarnim metabolitima.

Do sada se petnaest radova bavilo analizom sekundarnih metabolita vrste *P. platyphylla* (Opšti deo 2.5.). Prva analiza dietil-etarskog ekstrakta *P. platyphylla* sprovedena je od strane Huneck i Klaus (Huneck i Klaus, 1975). Iz uzoraka ove vrste, sakupljenih u Nemačkoj, nakon ekstrakcije izolovani su triterpenoid friedelin (0,01%) i β -sitosterin (*sin.* β -sitosterol, 0,03%) (Huneck i Klaus, 1975). Prisustvo ovih neisparljivih jedinjenja nije detektovano u obrađenim uzorcima, što je u skladu s očekivanjima (tabela 4.2.1.).

Dve godine kasnije, Suire i Bourgeois (Suire i Bourgeois, 1977) sproveli su prvu i do sada jedinu analizu etarskog ulja vrste *P. platyphylla*, poreklom iz Francuske. Ovo ulje, pored značajnog procenta neidentifikovanih jedinjenja (14,3%), sadržalo je sledeće sekundarne metabolite: α -pinen (3,7%), kamfen (15,0%), sabinen (0,7%), α -terpinen (44,1%), limonen (4,3%), β -felandren (14,0%), *p*-cimen (2,9%) i terpinolen (1,0%) (Suire i Bourgeois, 1977). U poređenju sa njihovim rezultatima, procentualna zastupljenost monoterpena na osnovu ove studije bila je značajno manja, dok se dominantno prisustvo samog β -felandrena poklapa (tabela 4.2.1.). U uzorcima etarskog ulja *P. platyphylla*, poreklom iz Bugarske, β -felandren (10,2%) je praćen i 1-*epi*- α -pingvizenom (1,5%) (tabela 4.2.1.). 1-*epi*- α -Pinguizen, koji se razlikuje od α -pingvizena jedino po orijentaciji metilgrupe na C-13 (tabela 2.6.1.), prethodno je identifikovan u samo tri vrste jetrenjača, od kojih jedna pripadala rodu *Porella*, tačnije hemotipu I (*P. obtusata*) (Gauvin-Bialecki, et al., 2010) (Opšti deo 2.5.). Ovo može implicirati da bi sekundarni metabolički profil pingvizana mogao pružiti uvid u

evolutivne mehanizme unutar ovog roda, kao i međusobne filogenetske odnose vrsta (Opšti deo 2.5.).

Tabela 4.2.1. Hemijski sastav etarskog ulja jetrenjače *P. platyphylla*

RI ⁱ	Jedinjenje	Uzorak ⁱⁱ		Identifikacija
		SF-KPK	BUG	
		% ⁱⁱⁱ		
1031	β -felandren	4,3	10,2	RI, MS, CoI ^{iv}
1365	1- <i>epi</i> - α -pingvizen	- ^v	1,5	RI, MS
1443	α -pingvizen	2,5	-	RI, MS
1447	ciklofarneza-5(14),8,10-trien	2,1	2,2	RI, MS
1451	(<i>E</i>)- β -farnezen	4,0	-	RI, MS
1482	germakren D	-	3,0	RI, MS
1486	izolepidozen	10,0	-	RI, MS
1559	(<i>E</i>)-nerolidol	-	8,4	RI, MS
1577	deoksopingvizon	4,1	5,1	RI, MS
1625	(4 <i>S</i> *,5 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *,7 <i>R</i> *)-1(10) <i>E</i> -lepidozen-5-ol	2,6	2,0	RI, MS
1640	(1 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-germakra-1,5-dien-11-ol	6,3	7,9	RI, MS
1706	pingvizanin	13,0	41,0	RI, MS
1760	α -furanopingvizanol	5,1	2,2	RI, MS
1776	metil-estar deoksopingvizon-12-oične kiseline ^{vi}	3,2	5,1	MS
2424	perotecijanal A	-	3,5	RI, MS
Ukupno identifikovano:		57,2	92,1	

ⁱ Retencioni indeksi na koloni DB-5MS eksperimentalno određeni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana;

ⁱⁱ Analizirani uzorci dobijenih etarskih ulja (SF-KPK-Veliki Kupci; BUG-planina Maljevica; tabela 3.4.1.);

ⁱⁱⁱ srednja vrednost tri analize;

^{iv} Metode identifikacije: MS = upoređivanje masenih spektara sa onima iz biblioteka (Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3), RI – upoređivanjem eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima, CoI – identifikacija sastojaka koinjektiranjem standardnih supastanci;

^v -/ nije detektovano;

^{vi} Identifikovan na osnovu poređenja MS iz *Cullmann* i *Becker*, 1999b.

Asakawa je 1979. godine analizom uzoraka *P. platyphylla* sakupljenih u Francuskoj, utvrdio strukture tri nova seskviterpena: pingvizanin (15,7%), pingvizanolid (0,2%) i β -pingvizendiol (3,7%) (tabela 2.6.1.) (Asakawa et al., 1979d). Motivisan ovim rezultatima, iste godine je, zajedno sa saradnicima, nastavio istraživanja koristeći biljni materijal iste vrste, takođe poreklom iz Francuske. Nakon ekstrakcije dietil-etrom, identifikovani su α - i β -pinen, kamfen, 3-

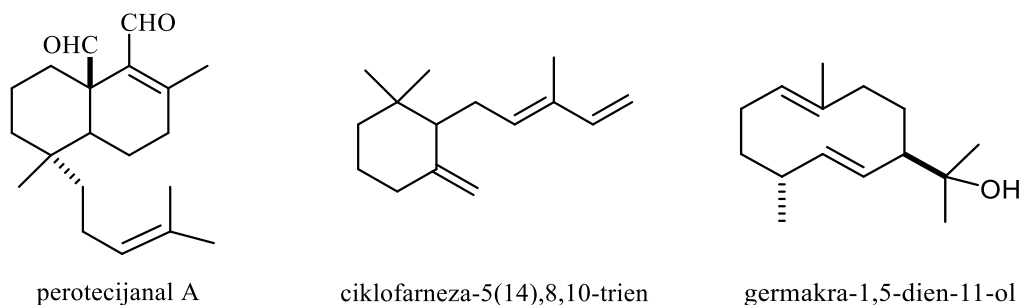
karen, α -terpinen, limonen, β -felandren, *p*-cimen, terpinolen, sabinen, kao i β -pingvizendiol (=platifilol), pingvizanin (=platifilin) i pingvizanolid (=platifiloid) (Asakawa et al., 1979c).

Asakawa je iste godine analizirao ekstrakt uzorka *P. platyphylla* prikupljenog u Bugarskoj, i nakon ekstrakcije dietil-etrom, zabeležio prisustvo sledećih jedinjenja: deoksopingvizona, pingvizona, pingvizanola, pingvizanina, pingvizanolida, β -pingvizendiola, kampesterola, stigmasterola, sitosterola i herbertusina (slika 2.5.4.; tabela 2.6.1.) (Asakawa et al., 1979b). Pre istraživanja prikazanog u disertaciji, ovo je bio jedini rad koji se bavio analizom isparljivih sekundarnih metabolita uzoraka vrste *P. platyphylla* poreklom iz Bugarske. Broj i sastav dominantnih seskviterpena u njihovim uzorcima pokazali su značajnu razliku u odnosu na naše rezultate (tabela 4.2.1.).

Pingvizanolid, izopingvizanolid, perotecijanal A i B, kampesterol, stigmasterol i sitosterol identifikovani su analizom dietil-etarskog ekstrakta uzoraka *P. platyphylla* prikupljenog sa Le Tanet, planinskog vrha u lancu Vogež koji se prostire duž granice između Francuske i Nemačke (slika 2.5.4., tabela 2.6.1.) (Asakawa et al., 1980a). Prisustvo pingvizanina (11,9%), fitola (0,2%) i stigmasterola (1,7%), kao i revidirana struktura perotecijanala B (1%) u 15-hidroksiperotecijanal na osnovu analize NMR spektara, potvrđeno je analizom dietil-etarskog ekstrakta švajcarskih uzoraka *P. platyphylla* (slika 2.5.4., tabela 2.6.1.) (Nagashima et al., 1996a). Iste godine, analizom metanolnog ekstrakta engleskih uzoraka *P. platyphylla*, identifikovani su perotecijanal B (0,1%), porelapingvizanolid (0,2%), β -pingvizendiol (0,7%) i pingvizanin (3,7%) (tabela 2.6.1), kao i nova jedinjenja: seskviterpen pingvizanskog skeleta, metil-2 α -hidroksi-6-okso-11-pingvizanoat (0,2%), i hemiacetal sakulatanskog diterpenoida [(5*S*,9*S*,10*R*,13*S*)-11,13-epoksi-8(12),17-sakulatadien-13 β ,15 ξ -diol] [(13*S*)-15 ξ -hidroksisakulaporelin] (0,4%) (slika 2.5.4.) (Buchanan et al., 1996). Unutar analiziranih uzoraka, perotecijanal B nije detektovan, ali je srodan diterpenski dialdehid, perotecijanal A (slika 4.2.1.), detektovan u etarskom ulju *P. platyphylla* poreklom iz Bugarske u količini od 3,5% (tabela 4.2.1.), što još jednom potvrđuje da su ova dva perotecijanala hemotaksonomski markeri vrsta roda *Porella* tipa B (Asakawa et al., 1979e; 1980a).

Procentualni sadržaj metabolita u nekim od gore navedenih radova nije dat, ali se pri poređenju sastava, u smislu prisustva pingvizana, delimično slaže sa rezultatima dobijenim našom analizom (tabela 4.2.1.). Prema profilu dominantnih sekundarnih metabolita, koji se mogu upoređivati, naša etarska ulja mogu se smatrati najbližijim onom koje su analizirali Tosun i

saradnici (tabela 4.2.1.). Dominantni metaboliti dietil-etarskog ekstrakta uzoraka *P. platyphylla* poreklom iz Turske bili su: pingvizanin (18%) i spiropingvizanin (10,5%), uz kamfen, sabinen, neotrifaradien, *cis*- β -elemen, ciklofarneza-5(14),8,10-trien, aristolohen, amorfen i neofitadienske izomere 1, 2 i 3 (Tosun et al., 2013). Za ovu vrstu zabeležen je i veliki broj neidentifikovanih jedinjenja. Procentualna zastupljenost dominantnog oksigenovanog seskviterpena, pingvizanina, u uzorcima etarskog ulja *P. platyphylla*, poreklom iz Srbije, bila je slična (13%) onoj u gore navedenom radu (Tosun et al., 2013), dok su primerci sakupljeni u Bugarskoj bili skoro četiri puta bogatiji u smislu sadržaja ovog metabolita (41%) (tabela 4.2.1.). Asakawa i saradnici su još jednom analizom etarskih ekstrakata uzoraka poreklom iz Turske potvrdili dominantno prisustvo pingvizanina, koji je praćem velikim procentualnim udelom izopingvizanolida i neidentifikovanih seskviterpena pingvizanskog tipa (Asakawa et al., 2018). Tokom naše analize, izopingvizanolid nije identifikovan (tabela 4.2.1.). Na osnovu gore navedenih podataka, pouzdano se može zaključiti da je pingvizanin glavni sastojak evropskih primeraka *P. platyphylla*, dok drugi sekundarni metaboliti variraju.



Slika 4.2.1. Strukture odabranih sekundarnih metabolita biljne vrste *P. platyphylla*

Pored pingvizanina, dominantni oksigenovani seskviterpeni u analiziranim uzorcima iz Velikih Kupaca uključuju deoksopingvizon (4,1%), (1*E*,5*E*)-germakra-1,5-dien-11-ol (6,3%) i *rel*-(4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,*E*)-1(10)*E*-lepidozen-5-ol (2,6%) (slike 4.2.1. i 4.3.10.; tabela 4.2.1.). Procentualni udeo ovih metabolita u uzorcima sakupljenim u Bugarskoj bio je gotovo identičan (tabela 4.2.1.). Sa druge strane, dominantni neoksisgenovani seskviterpeni: izolepidozen (10%), (*E*)- β -farnezen (3,96%) i α -pingvizanin (2,5%), prisutni u uzorcima iz Velikih Kupaca, nisu detektovani u uzorcima

poreklom iz Bugarske, čak ni u tragovima. Značajna razlika ogleda se i u velikom prisustvu (*E*)-nerolidola (8,4%) u uzorcima iz Bugarske, što predstavlja prvo zabeleženo prisustvo ovog isparljivog sekundarnog metabolita kod vrste *P. platyphylla*. Zajedničko prisustvo ciklofarneza-5(14),8,10-triena, s druge strane, donekle približava sastav analiziranih uzoraka (slike 4.3.12. i 4.2.1.; tabela 2.6.1.). U etarskom ulju poreklom iz Bugarske, uz ciklofarneza-5(14),8,10-trien (2,2%), kao dominantni neoksigenovani seskviterpen prisutan je i germakren D (3%) (slika 4.3.12.).

Daljom analizom naših uzoraka potvrđeno je prisustvo α -furanopigvizanola (tabela 4.2.1.), seskviterpena koji je kao novi prirodni proizvod pronađen analizom etarskog ulja vrste *P. cordaeana* poreklom iz Srbije (Rezultati i diskusija 4.1.1., 4.1.2. i 4.1.3.). Ovo još jednom potvrđuje da su *P. cordaeana* i *P. platyphylla* sestrinske vrste, čija se srodnost ogleda i u postojanju međuspecijskog hibrida, *P. baueri* (Schiffn.) C. Jens. (Boisselier-Dubayle et al., 1998).

Na osnovu rezultata analize uzoraka *P. platyphylla* poreklom iz Bugarske i Srbije, kao i dostupnih literaturnih podataka, može se zaključiti da ova vrsta proizvodi širok spektar terpenoidnih metabolita, uključujući mono-, seskvi-, di- i triterpenoide. Hemijska varijabilnost metabolita, posebno seskviterpena pingvizanskog skeleta, predstavlja značajan aspekt hemijskog profila ove vrste.

Razlike u hemijskim profilima, uključujući različite tipove seskviterpena i drugih sekundarnih metabolita, mogu biti rezultat genetskih razlika unutar populacija ili vrste. Ako su hemijski profili genetski određeni, to bi moglo omogućiti razlikovanje „hemijskih varijeteta“ unutar iste vrste, pri čemu bi različite genetske linije imale specifične hemijske sastave. Alternativno, varijacije u hemijskom profilu mogu biti posledica specifičnih ekoloških faktora, kao što su tip tla i sezonske promene temperature, vlažnosti i drugih klimatskih uslova. Ekotipovi, koji su specifične varijante unutar vrste prilagođene određenim ekološkim uslovima, često pokazuju razlike u sekundarnim metabolitima, što ih čini važnim i u kontekstu hemijske ekologije i farmakologije. Primera radi, antimikrobna aktivnost vrste *P. platyphylla* u odnosu na Gram-pozitivne bakterije već je dokazana (Pavletić i Stilinović, 1963), međutim, aktivne supstance koje doprinose ovoj aktivnosti još uvek nisu identifikovane, što ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima. Sve navedeno, uključujući prisustvo neidentifikovanih sekundarnih metabolita u

profilu *P. platyphylla*, zabeleženih u brojnim analizama, ukazuje na to da ova vrsta još uvek nije dovoljno istražena, a mnogi aspekti njenog hemijskog profila ostaju nepoznati.

4.3. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *C. CONICUM*

4.3.1. HEMIJSKI SASTAV DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA BILJNE VRSTE *C. CONICUM*

Svež biljni materijal jetrenjače *C. conicum* prikupljen je sa različitih lokacija u Srbiji (tabela 3.4.1.), u različitim količinama (Eksperimentalni deo 3.6.1.). Nakon GC-MS analize, odabrani dietil-etarski ekstrakti podvrgnuti su hromatografskom razdvajanju (Eksperimentalni deo 3.6.2.). U uzorku označenom kao **CC1** identifikovana su 43 jedinjenja, što predstavlja 11,7% analiziranog ekstrakta (tabela 4.3.1.), dok je u uzorku **CC2** detektovan 61 sekundarni metabolit, sa udelom od 83,4%. Rezultati analize sastava navedenih uzoraka prikazani su zajedno sa sastojcima ostalih analiziranih ekstrakata *C. conicum* u tabeli 4.3.1. U materijalu označenom kao **CC3** identifikovano je 56 sastojaka, što čini 31,2% sastava ekstrakta. Analiza uzorka **CC4** rezultovala je sa 169 identifikovanih sastojaka, koji su činili 63% ovog ekstrakta. Analizom ekstrakta biljnog materijala iste vrste, prikupljenog iste godine sa vlažnog zemljišta blizu izvora reke Grze (**CC5**), identifikovano je ukupno 168 metabolita (72,3%) (tabela 4.3.1.).

Terpeni su predstavljali najzastupljeniju klasu kod svih analiziranih ekstrakata *C. conicum*, sa znatno većim udelom seskviterpena u poređenju sa monoterpenima i diterpenima (tabela 4.3.1.). U svim analiziranim dietil-etarskim ekstraktima identifikovano je ukupno 36 monoterpena i 65 seskviterpena. Uzorak **CC1** bio je najsiromašniji po pitanju sekundarnih metabolita, sa samo dva detektovana monoterpena, sabinenom i kamfenom, prisutnim u tragovima, i 23 seskviterpena (6,3%). Međutim, na dalji rad veoma nas je motivisalo da dominantni seskviterpen, praćen konocefalenolom (1,2%), u ovom uzorku nije mogao da se identifikuje na osnovu podudaranja sa spektrima iz baze podataka, kako je objašnjeno u metodologiji (odeljak 3.2.6, Eksperimentalni deo). Stoga je ovo jedinjenje označeno kao nepoznato jedinjenje **3** (3,7%).

Među monoterpenima (4,6%) u uzorku **CC2**, takođe je najzastupljeniji bio sabinen (4,4%) (slika 4.3.1.). Dominantni seskviterpeni, među 28 zabeleženih (76,7%), bili su konocefalenol (16,9%), aristola-1(10),8-dien (11,3%), 1(10)-aristolen (5,1%), izolepidozen-14-al (ranije imenovan kao bicilogermakren-14-al; Rezultati i diskusija 4.3.2.) (4,4%), persilfiperfolan-1-ol

(4,2%), kao i seskviterpeni brazilanskog skeleta (tabela 4.3.1., slike 2.4.3., 2.4.5., 4.3.1. i 4.3.15.). Sadržaj monoterpena u uzorku **CC3** (1,8%) bio je sličan sadržaju u prethodnim uzorcima, dok je pored dominantnog konocefalenola (6,5%) uočena i značajnija količina izolepidozena (2,9%) među 25 identifikovanih seskviterpena (19,0%).

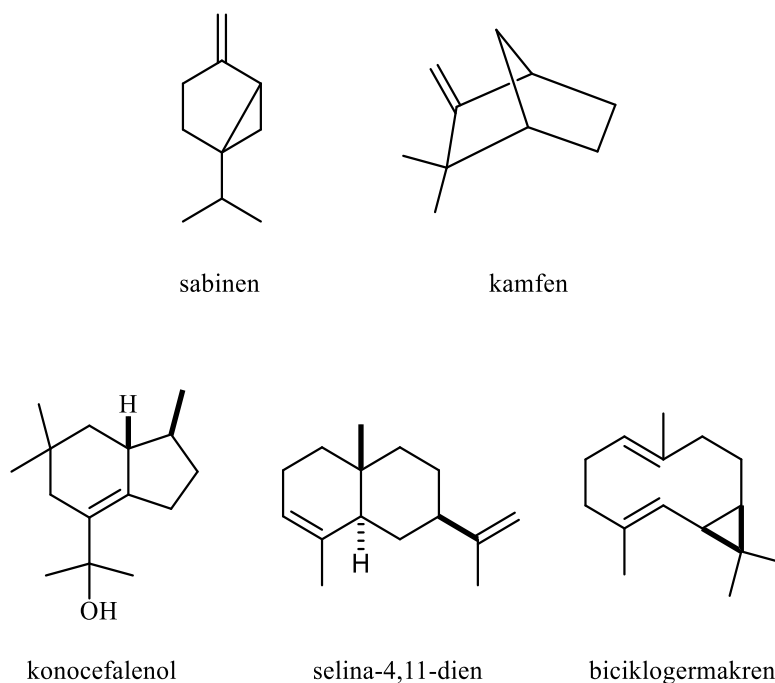
U uzorku **CC4** detektovano je 49 seskviterpena, koji su činili 28,5% ekstrakta, i 29 monoterpena, sa ukupnim udelom od 9,7%. Od 18 oksigenovanih monoterpena (0,7%), *cis*-sabinen-hidrat bio je najzastupljeniji (0,2%), uz prisustvo *trans*-sabinen-hidrata, borneola, mentola, terpinen-4-ola i bornil-acetata, svaki po 0,1%. Među 32 oksigenovana seskviterpena (15,9%) takođe je dominirao konocefalenol (4,5%), praćen jedinjenjem **3** (2,6%). Jedanaest neoksigenovanih monoterpena činilo je 9% analiziranog ekstrakta **CC4**, dok su od 17 neoksigenovanih seskviterpena (12,6%) najviše zastupljeni bili aristola-1(10),8-dien (3,9%), brazila-5,10-dien (2,6%), nardošina-7,9,11-trien (1,8%), kao i još dva seskviterpena brazilanskog skeleta: brazila-5(10),6-dien (1,4%) i brazila-1(6),5(10)-dien (1,1%) (slike 2.4.3 i 2.4.5.).

Uzorak **CC5** okarakterisan je prisustvom 25 monoterpena (7,1%) među kojima je, kao što se i očekivalo, preovlađivao sabinen (5,3%). Seskviterpeni su činili 31,1% ovog dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum* prikupljenog pored reke Grze, sa 24 neoksigenovana (20,6%) i 20 oksigenovanih seskviterpena (10,5%). U ovoj grupi su, pored konocefalenola (5,4%), dominirali aristola-1(10),8-dien (6,7%), nardošina-7,9,11-trien (2,9%) i različiti brazilani (tabela 4.3.1.).

Možemo jasno zaključiti da je sabinen bio najdominantniji monoterpen svih pet analiziranih ekstrakata, sa udelom koji varira od manje od 0,05% do 6,9%, dok je kamfen bio prisutan do 0,4%. Dominacija sabinena među monoterpenima povezuje *C. conicum* evropskog porekla sa hemotipom I japanskih uzoraka iste (Opšti deo 2.4.). Pored sabinena, u određenim ekstraktima prisutni su bili i drugi monoterpeni istog skeleta. Tako su **CC2**, **CC4** i **CC5** sadržali *cis*-sabinen-hidrat, bilo u tragovima **CC2** i **CC5**, ili u relativnoj količini od 0,2% u ekstraktu **CC4**. *trans*-Sabinen-hidrat je prisutan u pomenutim ekstraktima u sadržaju $\leq 0,1\%$, dok je sabina-keton detektovan isključivo u uzorku **CC2**. Pregled ostalih identifikovanih monoterpena prikazan je u tabeli 4.3.1.

Seskviterpeni, prisutni u svim analiziranim uzorcima, obuhvataju ukupno 11 jedinjenja, uključujući četiri neoksigenovana i sedam oksigenovanih derivata. Među neoksigenovanim seskviterpenima identifikovani su brazila-5(10),6-dien (tr-3,9%), aristola-1(10),8-dien (0,1–

11,3%), brazila-1(6),5(10)-dien (0,1–5,9%), i nardošina-7,9,11-trien (tr-2,9%), što je očekivano jer evropske uzorke *C. conicum* karakteriše njihova značajna zastupljenost. Naime, brazila-5(10),6-dien i brazila-1(6),5(10)-dien su kao nova jedinjenja identifikovani upravo analizom etarskog ulja *C. conicum* prikupljenog u severnoj Nemačkoj (Melching i Köning, 1999), dok su naknadno okarakterisani kao jedni od najvažnijih sekundarnih metabolita kriptične vrste “L” (Ludwiczuk et al., 2008; 2011).



Slika 4.3.1. Strukture odabranih sekundarni metaboliti dietil-etarskih ekstrakata vrste *C. conicum*

Generalno, retko je vršena analiza sastava sekundarnih metabolita ove vrste. Prva hromatografska analiza dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum* evropskog porekla, koju je izvela Benešová sa saradnicima, pokazala je prisustvo *n*-alkana, δ -kadinena, fridelina, lignocerinske kiseline, triterpenskih alkohola i triterpenskih diola (Benešová et al., 1969b). Nakon toga, više od 30 godina predmet interesovanja bila je analiza sastava dietil-etarskih ekstrakta *C. conicum* japanskog i kineskog porekla (Opšti deo 2.4), sve do 2008. godine. Tada je, uz prethodno

razjašnjenje da ova vrsta predstavlja kompleks od šest kriptičnih vrsta (Opšti deo 2.4), kriptična vrsta “L” *C. conicum* evropskog porekla ponovo postala predmet interesovanja istraživača (Ludwiczuk et al., 2008; 2013).

Među oksigenovanim seskviterpenima koji su identifikovani u svim našim analiziranim uzorcima, najzastupljeniji je bio konocefalenol (1,2–16,9%), tercijarni alkohol brazilanskog tipa i karakterističan marker evropskih uzoraka *C. conicum* (Ludwiczuk et al., 2013a). Struktura konocefalenola prvi put je određena nakon izolovanja iz evropskih uzoraka *C. conicum* i detaljne analize NMR spektra koju je izveo Connolly (Connolly, 1988). Relativna konfiguracija C9 metilgrupe ovog jedinjenja određena je skoro deset godina kasnije kao 1*R*,9*S* (Tori et al., 1995). Naša analiza prvi put donosi potpunu NMR asignaciju konocefalenola u CDCl₃, izvedenu uz opsežne 1D i 2D NMR eksperimente, uključujući i potpunu ¹H-NMR spinsku simulaciju (Radulović et al., 2019) (prilozi 22 i 40). Važno je istaći da su četiri analizirana ekstrakta, svi osim CC1, sadržala brazila-5,10-dien u udelu od 1,2 do 5,6%, za koji se smatra da može biti glavni dehidratacioni proizvod konocefalenola (Melching i Köning, 1999). Još jedno jedinjenje brazilanskog skeleta, brazil-4-en-10-ol, bilo je prisutno u tragovima pa do 0,6% u svim uzorcima *C. conicum*. U analiziranim ekstraktima takođe su detektovani sledeći oksigenovani seskviterpeni: presilfiperfolan-1-ol (0,3–4,2%), daktilol (0,3–2,9%), izolepidozen-14-al (biciklogermakren-14-al; 0,3–4,4%), aristolon (tr–2,9%) i (1(10)*E*,5*E*)-1(10),5-germakradien-11-ol, kojeg je bilo najmanje (tr–0,1%). Strukture ovih jedinjenja prikazane su na slikama 2.4.3. i 4.3.15.

Pored aristolona, koji se nalazio u svim analiziranim ekstraktima, treba spomenuti da su se oni međusobno razlikovali po neravnomernoj distribuciji ostalih aristolanskih seskviterpena (aristolani=6,11-cikloeremofilani). Naime, aristolen (slika 2.4.3.) je bio prisutan u ekstraktima CC2–CC5 (0,4–7,5%), dok se sadržaj 1(10)-aristolena u ovim ekstraktima kretao od 0,3 do 5,1%. 4,5-di-*epi*-Aristolohen prisutan je u tragovima u uzorcima CC2, CC4 i CC5. Ekstrakt biljnog materijala prikupljenog sa šumskog područja u blizini Velikih Kupaca, CC1, nije sadržao ni jedno od gore pomenuta dva jedinjenja.

Pored aristolanskih seskviterpena, jetrenjače sadrže i različite selinenske seskviterpene (Asakawa et al., 2013a). Tako je selina-3,11-dien-6α-ol identifikovan u CC3 (0,2%) i CC5 (0,1%), δ-selinen u CC4 (0,2%) i CC5 (0,3%), dok su u ekstraktu CC5 detektovani β-selinen (0,2%) i selina-5,7(11)-dien. Kao jedini sekundarni metabolit selinenskog skeleta u prethodnim analizama

dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum* evropskog porekla detektovan je selina-4,11-dien (slika 4.3.1.), koji je kod nas nađen u **CC3** (0,2 %) i **CC2** (u tragovima). On je ranije detektovan samo u ekstraktu *C. conicum* poreklom iz Grčke (5 %) i Italije (0,5 %) (Ludwiczuk et al., 2013a) što, uz jedinjenja istog skeleta iz naših uzoraka evropskog porekla, sugeriše da bi njihovo prisustvo takođe moglo biti od značaja.

Naši ekstrakti su se međusobno razlikovali i po neravnomernoj distribuciji germakrana i sekundarnih metabolita biciklogermakranskog skeleta. Germakren A detektovan je u uzorcima **CC2**, **CC3** i **CC5** sa relativnim sadržajima od 0,7, 0,2 i 0,2%. Germakren D je činio 3,7% uzorka **CC2**, dok je u **CC4** i **CC5** bio prisutan u tragovima. (1(10)*E*,5*E*)-1(10),5-Germakradien-4-ol (sin. germakren D-4-ol) je identifikovan sa manje od 0,05% u **CC2** i **CC4**, dok je germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol bio prisutan u nešto većem udelu u **CC4** (0,6%) i **CC5** (0,5%). Biciklogermakren je najzastupljeniji seskviterpenski ugljovodonik i jedan od najvažnijih prekursora za različite ciklične seskviterpenoide (Asakawa et al., 2013a). Prisutan je u malim količinama u uzorcima **CC1**, **CC3** i **CC5**, dok je izobiciklogermakren identifikovan samo u **CC5**, i to u tragovima (tabela 4.3.1.). Sa druge strane, izobiciklogermakrenal je detektovan u **CC2** (0,8%), **CC4** (0,3%) i **CC5** (0,5%). Rezultati naše analize podudaraju se sa rezultatima koje su objavili *Ludwiczuk* i saradnici gde su dietil-etarski ekstrakti ove jetrenjače evropskog porekla okarakterisani prisustvom biciklogermakranskih seskviterpena (biciklogermakren, biciklogermakren-14-al, kao što smo prethodno naveli preimenovan u izolepidozen-14-al, Rezultati i diskusija 4.3.2.), 4 β -hidroksigermakra-1(10),5-dien, 1(10),5-germakradien-4 α -ol, 1(10),4-germakradien-6 α -ol, 1(10),4-germakradien-12-al, 1(10),5-germakradien-11-ol i germakren D) (Ludwiczuk et al., 2008; 2013).

Takođe karakteristični sekundarni metaboliti ove vrste su seskviterpeni izolepidozanskog skeleta (Ludwiczuk et al., 2008; 2013). Analizom naših ekstrakata zaključeno je da izolepidozen nije detektovan samo u uzorku **CC2**, dok se u drugim uzorcima njegova zastupljenost kretala do 2,9%. Od drugih jedinjenja lepidozanskog skeleta (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-al (sin. izolepidozen-14-al) bio je prisutan u svim uzorcima (0,3-4,4%), dok je *rel*-(4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,*E*)-1(10)-lepidozen-5-ol zabeležen samo u uzorku **CC4**.

Sa veoma sličnim retencionim ponašanjem izolepidozen-14-alu u uzorcima **CC1**, **CC3**, **CC4** i **CC5** uočeno je prethodno pomenuto nepoznato jedinjenje, nazvano jedinjenje **3** (0,1-3,7%),

čiji se molekulski jon na m/z 220, i osnovni jon na m/z 121, uz dodatne intenzivne jone u masenom spektru, podudaraju sa jonima jednog od sastojaka koje su zapazili *Ludwiczuk* i saradnici (*Ludwiczuk et al.*, 2013a). U ovoj studiji analizirano je 10 uzoraka *C. conicum*, uključujući četiri evropskog porekla (iz Italije, Gruzije, Grčke i Španije) (*Ludwiczuk et al.*, 2013a). Evropski uzorci, pored konocefalenola, sadržali su brazila-5,10-dien, izolepidozen, biciklogermakren-14-al (što je u slozi sa našim analizama) i nepoznato jedinjenje (u pojedinim uzorcima sa udelom većim od 30%). Ovo ukazuje da se kriptična vrsta “L”, u smislu njenih sekundarnih metabolita, najviše razlikuje od ostalih kriptičnih vrsta *C. conicum*. Detaljnom analizom uzoraka od **CC1-CC5** zapažena su još dva nepoznata seskviterpenska jedinjenja, označena kao jedinjenje **4** i jedinjenje **5**, koja su u tragovima prisutna u uzorcima **CC1**, **CC3** i **CC4** (tabela 4.3.1.).

Među diterpenima u analiziranim uzorcima identifikovana su tri izomera neofitadiena, što je u skladu sa prethodnim nalazima iz analize dietil-etarskih ekstrakata *C. conicum* kriptične vrste “L,” gde je njihova zastupljenost bila u rasponu do 2,8% (*Ludwiczuk et al.*, 2013a). U radu *Ludwiczuk* i saradnika, procentualno najzastupljeniji bio je neofitadien (izomer I), što delimično odgovara našim rezultatima, gde je ovaj izomer dostigao 1,7% u uzorku **CC3**. Nasuprot tome, neofitadien (izomer I) nije detektovan u uzorcima **CC2** i **CC4**, dok je u **CC1** i **CC5** prisutan sa 0,5% i 0,8%. Izomer II neofitadiena detektovan je u uzorcima **CC3** (0,4%) i **CC5** (0,3%), dok je izomer III bio prisutan u svih pet analiziranih ekstrakata do 0,6% (tabela 4.3.1). Najverovatnije poreklo neofitadiena je artefaktsko, jer se zna da oni nastaju pirolizom hlorofila u injektoru instrumenta.

Malozastupljeni sastojci u ekstraktima obuhvatali su i GLV-jedinjenja (green leaf volatiles), organska jedinjenja koja predstavljaju grupu raznolikih odbrambenih isparljivih metabolita biljaka. 1-Okten-3-il-acetat prisutan je u svim analiziranim uzorcima do 0,9%. Tragovi okten-3-ola su bili prisutni u uzorcima **CC3**, **CC4** i **CC5**, dok se većina drugih GLVs nalazila u uzorcima **CC4** i **CC5** (tabela 4.3.1.). 1-Okten-3-il-acetat i 1-okten-3-ol ukazuju da je miris *C. conicum* istovetan karakterističnom mirisu pečuraka uglavnom posledica prisustva mešavine ova dva *green leaf* metabolita (*Suire et al.*, 1982). GLVs nastaju tokom metabolizma masnih kiselina delovanjem oksidaza, a strukturno predstavljaju najčešće aldehide, alkohole i njihove estre sa šest ugljenika u ugljovodoničnom lancu (*Matsui et al.*, 2012). Dok C6-aldehidi odvrćaju predatore, C6-alkoholi i estri pretežno su inertni (*Matsui et al.*, 2012). Analizom ekstrakata *C. conicum*

potvrđeno je prisustvo velikog broja masnih kiselina (Negi et al., 2020). Masne kiseline veoma su važne kako za fiziološke i biološke funkcije (Glime, 2017; Jocković et al., 2008) životnog ciklusa biljaka, tako i sa aspekta insekticidne aktivnosti (linolna, oleinska, linoleinska kiselina itd.) (Khan i Usman, 2012).

Pored toga, sastav voska i kutina ove jetrenjače pokazao se kao veoma zanimljiv. Gasno-hromatografska analiza (GC) voska ekstrahovanog heksanom iz *C. conicum* u neutralnim, kiselim i osapunjivim frakcijama potvrdila je prisustvo 17 C18-C34 *n*-alkana, 17 C8-C30 *n*-karboksilnih kiselina (osim C11, C13, C15, C21, C27, C29), 13 C12-C28 *n*-alkanola (osim C13, C15, C21, C27), kao i četiri C15-C18 metil-estra *n*-karboksilnih kiselina. Dominantna jedinjenja svake serije bila su heptakozan, palmitinska kiselina, 1-heksakozanol i metil-palmitat (Suemitsu et al., 1974). *Caldicott* i *Eglinton* su, analizirajući sastav kutina *C. conicum*, koji je uz heksadekansku (26,8%) i 15-hidroksiheksadekansku kiselinu (11,7%) sadržao seriju 2-hidroksi derivata alkanskih kiselina, ukazali na povezanost prisustva 2-hidroksi kiselina sa značajem razvoja kutikule za kolonizaciju tla. Naime, prisustvo 2-hidroksi derivata alkanskih kiselina je indikator da su jetrenjače razvile hemijske mehanizme za opstanak na kopnu, čime se naglašava njihov značaj u širem evolucijskom kontekstu, kao jedne od najranijih biljnih vrsta koje su uspele da kolonizuju tlo (*Caldicott* i *Eglinton*, 1976).

Od 19 identifikovanih masnih kiselina samo je palmitinska (heksadekanska) kiselina (C16:0) detektovana u svim analiziranim ekstraktima. Njena zastupljenost kretala se od manje od 0,05% u uzorku **CC2** do 5,2% u uzorku dietil-etarskog ekstrakta biljnog materijala prikupljenog kod Grze (**CC5**). Iako je njen procentualni udeo manji, dominacija palmitinske kiseline u našem istraživanju slaže se s njenom zastupljenošću (17,86-68%) u prethodnim analizama heksanskih, dihlormetanskih, hloroformskih, etil-acetatnih i metanolnih ekstrakata turskog porekla, gde je jedan od njih pokazao i slabu insekticidnu aktivnost prema žitnom žišku (Abay et al., 2012) (Opšti deo 2.4.). Slična palmitinskoj kiselini, ω -7-mononezasićena masna kiselina, palmitoleinska kiselina (C16:1), bila je prisutna u uzorcima **CC1** (0,3%), **CC4** (4,2%), **CC5** (1,7%), kao i polinezasićena ω -3 linoleinska kiselina (C18:3) (**CC1** (0,3%), **CC4** (6,3%), **CC5** (6,5%)). ω -5 Masna kiselina, (Z)-11-heksadecenska kiselina (C16:1), bila je prisutna samo u uzorku **CC1** (0,5%). Polinezasićena ω -6 masna kiselina, arahidonska kiselina (C20:4), takođe je detektovana u

uzorcima **CC1** (0,2%), **CC4** (0,4%), **CC5** (u tragovima), dok se polinezasićena ω -3 masna kiselina, timnodonska kiselina (C20:5), nalazila u uzorcima **CC1** (0,1%) i **CC4** (0,5%).

Ekstrakte **CC4** i **CC5** karakterisalo je i prisustvo miristinske kiseline (C14:0) sa zastupljenostima od 0,5% i 0,1%, kao i pentadekanske kiseline (C15:0); 0,2% (**CC4**) i 0,1% (**CC5**). Isti ekstrakti sadržali su pelargonsku kiselinu (C9:0) i heptansku kiselinu (C7:0), ali u tragu. U uzorku **CC5** prisutni su i tragovi kaprilne kiseline (C8:0) i kapronske kiseline (C6:0), dok je njihova procentualna zastupljenost u **CC4** bila 0,1%, za obe. Buterna kiselina (C4:0) detektovana je jedino u uzorku **CC5** (trag), dok su lignocerinska kiselina (C24:0) (0,3%) i behenska kiselina (C22:0) (0,4%), zasićene masne kiseline, identifikovane isključivo u **CC4**. Takođe, među sastojcima uzorka **CC4** identifikovane su arahidonska kiselina (C20:0), laurinska kiselina (C12:0), kaprinska kiselina (C10:0) i valerijanska kiselina (C5:0). Kao malozastupljeni sastojci naših analiziranih ekstrakata detektovana su i jedinjenja proizašla iz metabolizma masnih kiselina poput: *n*-alkana, dugolančanih aldehida i estara masnih kiselina (tabela 4.3.1.).

Sve prethodno navedeno motivisalo je dalju analizu s ciljem određivanja struktura jedinjenja **3**, **4** i **5**, detektovanih u ovim ekstraktima, kao i ispitivanja njihove potencijalne biološke aktivnosti (Rezultati i diskusija 4.3.7.). Višestruka hromatografska razdvajanja uključivala su hromatografisanje svih uzoraka sa lokaliteta Veliki Kupaci, **CC1** i **CC3**, kao i uzorka biljnog materijala sa planine Jastrebac (**CC4**) (Eksperimentalni deo 3.6.2.). Tako su hromatografskim razdvajanjem ekstrakta *C. conicum* poreklom iz šumskog područja Velikih Kupaca frakcije spirane smešom heksana i dietil-etera (heksan:dietil-etar (90%:10%, v/v)) (Eksperimentalni deo 3.6.2.) predstavljale čisto jedinjenje **3** (korišćeno za dalja ispitivanja objašnjena u Rezultati i diskusija 4.3.7.). Hromatografijom dela biljnog materijala prikupljenog na području Velikih Kupaca, ali sa druge lokacije, pored potoka, u dve frakcije, spirane sa smešom heksana i dietil-etera (heksan:dietil-etar (90%:10%, v/v), SF-285-19,20) dobijen je čist konocefalenol. Nakon spiranja dietil-etrom u frakcijama SF-285-46 i SF-285-461 (Eksperimentalni deo 3.6.2.) dobijena su čista jedinjenja **4** i **5** (korišćena za dalja ispitivanja objašnjena u Rezultati i diskusija 4.3.7.). Dodatne količine jedinjenja **3-5** dobijene su hromatografijom spojenih ekstrakata materijala iz Velikih Kupaca sa onima sa planine Jastrebac (**CC1**, **CC3** i **CC4**) (Eksperimentalni deo 3.6.2., korišćeno za dalja ispitivanja objašnjena u Rezultati i diskusija 4.3.2.; 4.3.3. i 4.3.4.).

Tabela 4.3.1. Hemijski sastav dietil-etarskih ekstrakta jetrenjače *C. conicum*

RI ⁱ	RI ⁱⁱ	Jedinjenje	Uzorci ⁱⁱⁱ					ID ^{iv}
			CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	
755	762	1-pentanol				0,1		RI, MS, CoI
776	763	buterna kiselina					tr	RI, MS, CoI
787	785	(<i>R</i> *, <i>S</i> *)-2,3-butandiol					tr	RI, MS
796	799	heksanal				tr		RI, MS, CoI
800	800	oktan				tr		RI, MS, CoI
815	815	2-metilpiridin				0,1		RI, MS
827	827	3-metilbutanska kiselina				0,1	0,1	RI, MS, CoI
831	831	2-metilbutanska kiselina				tr		RI, MS, CoI
847	848	(<i>Z</i>)-3-heksen-1-ol				tr	1,0	RI, MS
858	863	1-heksanol				tr		RI, MS, CoI
862	875	pentanska kiselina				tr		RI, MS, CoI
883	889	2-heptanon				tr		RI, MS, CoI
900	900	nonan					tr	RI, MS, CoI
902	901	heptanal				tr	tr	RI, MS, CoI
917	924	metil-heksanoat					tr	RI, MS
928	924	α -tujen		tr		0,1	0,1	RI, MS
936	932	α -pinen					tr	RI, MS, CoI
949	945	α -fenhen					tr	RI, MS
953	946	kamfen	tr	0,2	tr	0,4	0,2	RI, MS, CoI
957	952	benzaldehyd				0,2	tr	RI, MS, CoI
962	959	1-heptanol				tr	tr	RI, MS, CoI
965	967	heksanska kiselina				0,1	tr	RI, MS, CoI
968	974	(5 <i>Z</i>)-okta-1,5-dien-3-ol					tr	RI, MS
974	974	1-okten-3-ol			tr	tr	tr	RI, MS, CoI
979	976	sabinen	tr	4,4	1,7	6,9	5,3	RI, MS
978	978	1-okten-3-on					tr	RI, MS

979	979	3-oktanon				tr		RI, MS
985	984	β -pinen	tr			0,4	0,1	RI, MS, CoI
989	988	β -mircen	tr	tr		0,3	0,2	RI, MS
991	988	3-oktanol				tr	tr	RI, MS
993	997	etil-heksanoat					tr	RI, MS
998	998	oktanal				tr	tr	RI, MS, CoI
1009	1002	α -felandren				0,1	tr	RI, MS
1020	1020	α -terpinen	tr			tr	0,1	RI, MS, CoI
1027	1020	<i>p</i> -cimen	tr			0,1	tr	RI, MS, CoI
1031	1024	limonen		0,1		0,5	0,4	RI, MS, CoI
1033	1026	1,8-cineol					tr	RI, MS, CoI
1034	1034	lavanda lakton				tr		RI, MS
1039	1036	fenilacetaldehid				0,1	tr	RI, MS
1046	1042	γ -heksalakton				tr	tr	RI, MS
1051	1049	(2 <i>E</i>)-oktenal				tr		RI, MS
1057	1057	1-fenil-1-etanol				tr		RI, MS
1058	1054	γ -terpinen				0,1	0,1	RI, MS
1063	1060	(2 <i>E</i>)-okten-1-ol				tr	tr	RI, MS
1065	1063	1-oktanol				tr		RI, MS, CoI
1066	1062	heptanska kiselina				tr	tr	RI, MS, CoI
1076	1070	<i>cis</i> -sabinen-hidrat	tr			0,2	tr	RI, MS
1090	1086	terpinolen	tr	tr		0,1	0,1	RI, MS
1092	1097	etil-heptanoat					tr	RI, MS
1096	1095	linalool				tr	tr	RI, MS
1100	1098	<i>trans</i> -sabinen-hidrat	tr			0,1	0,1	RI, MS
1106	1110	1-okten-3-il-acetat	tr	0,9	0,2	0,9	0,9	RI, MS
1112	1106	2-fenil-1-etanol				0,1	tr	RI, MS, CoI
1120	1120	3-oktil-acetat				0,1	0,1	RI, MS
1121	1123	metil-oktanoat					tr	RI, MS

1136	1136	<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol		tr		RI, MS
1138	1140	4-ketoizoforon		tr		RI, MS
1141	1138	<i>p</i> -ment-3-en-1-ol		tr		RI, MS
1146	1141	kamfor		tr	tr	RI, MS
1162	1154	sabina-keton	tr			RI, MS
1162	1162	benzoeva kiselina		tr		RI, MS, CoI
1164	1165	1,3-dimetoksibenzen		tr		RI, MS
1165	1166	pinokamfeol		tr		RI, MS
1165	1167	oktanska kiselina		0,1	tr	RI, MS, CoI
1171	1165	borneol		0,1		RI, MS, CoI
1173	1175	metil-benzoat			tr	RI, MS
1174	1167	mentol		0,1		RI, MS, CoI
1181	1181	terpinen-4-ol	tr	0,1	tr	RI, MS
1184	1179	<i>p</i> -cimen-8-ol		tr		RI, MS
1186	1178	naftalen		tr	tr	RI, MS, CoI
1192	1196	etil-oktanoat			tr	RI, MS
1195	1186	α -terpineol		tr		RI, MS
1197	1197	(<i>Z</i>)-okt-2-en-1-il-acetat		0,1	tr	RI, MS
1202	1201	dekanal		0,1	tr	RI, MS, CoI
1209	1207	<i>trans</i> -piperitol		tr		RI, MS
1220	1219	<i>cis</i> -sabinen-hidrat-acetat			0,2	RI, MS
1221	1217	β -ciklocitral		tr		RI, MS
1228	1224	3-fenil-1-propanol		tr		RI, MS
1240	1243	etil-fenilacetat		0,1	tr	RI, MS
1242	1239	karvon		tr		RI, MS
1245	1251	fenilacetatna kiselina		0,1	tr	RI, MS
1253	1253	<i>trans</i> -sabinen-hidrat-acetat		tr	0,2	RI, MS
1265	1267	nonanska kiselina		tr	tr	RI, MS, CoI
1269	1267	1-dekanol		tr		RI, MS, CoI

1270	1268	(Z)-2-fenil-2-butenal					tr	RI, MS
1287	1287	bornil-acetat			tr	0,1	tr	RI, MS
1289	1293	2-undekanon				tr		RI, MS, CoI
1292	1290	indol				tr		RI, MS
1292	1294	etil-nonanoat					tr	RI, MS
1298	1294	2-undekanol					tr	RI, MS
1300	1298	karvakrol				tr		RI, MS, CoI
1300	1299	terpinen-4-il-acetat					tr	RI, MS
1303	1305	undekanal				tr	tr	RI, MS, CoI
1320	1324	metil-dekanoat					tr	RI, MS
1337	1325	brazila-5,10-dien		5,6	1,2	2,6	2,9	RI, MS
1343	1346	α -terpinil-acetat					tr	RI, MS
1350	1359	neril-acetat				tr	tr	RI, MS, CoI
1354	1345	α -kubeben				tr	tr	RI, MS
1359	1355	4-hidroksibenzaldehid				tr	tr	RI, MS
1369	1365	3,4-dimetoksistiren				0,2	0,7	RI, MS
1364	1364	dekanska kiselina				tr		RI, MS, CoI
1367	1377	silfiperfol-6-en			0,1		0,2	RI, MS
1369	1370	brazila-5(10),6-dien	tr	3,9	0,6	1,4	1,1	RI, MS
1383	1374	α -kopaen				tr	tr	RI, MS
1390	1390	1-tetradecene				tr		RI, MS
1394	1395	etil-dekanoat	tr					RI, MS
1396	1389	β -elemen		tr	tr	0,1	0,1	RI, MS
1400	1400	tetradekan		tr		tr		RI, MS, CoI
1405	1408	dodekanal				tr		RI, MS, CoI
1413	1409	α -gurjunen		tr		tr	tr	RI, MS
1429	1423	aristolen		7,5	0,6	0,4	2,4	RI, MS
1433	1421	akora-3,5-dien					0,2	RI, MS
1439	1429	aristola-1(10),8-dien	0,1	11,3	0,9	3,9	6,7	RI, MS

1438	1431	1(10)-aristolen (<i>sin.</i> ^v β -gurjunen)		5,1	0,4	0,3	1,5	RI, MS
1449	1442	brazila-1(6),5(10)-dien	0,1	5,9	0,5	1,1	1,7	RI, MS
1452	1444	nardošina-7,9,11-trien	tr	0,3	0,3	1,8	2,9	RI, MS
1453	1445	<i>epi</i> - β -santalen			tr			RI, MS
1456	1454	(<i>E</i>)- β -farnezen	tr			tr	0,2	RI, MS
1466	1468	6,11-epoksi-izodaukan	tr					RI, MS
1467	/	brazil-4-en-10-ol ^{vi}	tr	0,6	0,2	0,2	0,2	MS
1472	1469	selina-4,11-dien		tr	0,2			RI, MS
1478	1471	4,5-di- <i>epi</i> -aristolohen		tr		tr	tr	RI, MS
1482	1485	δ -selinen				0,2	0,3	RI, MS
1485	1489	izobicklogermakren					tr	RI, MS
1486	1483	izolepidozen	0,2		2,9	0,8	tr	RI, MS
1488	1484	germakren D		3,7		tr	tr	RI, MS
1490	1495	γ -amorfen					tr	RI, MS
1495	1488	β -selinen					0,2	RI, MS
1503	1497	konocefalenol	1,2	16,9	6,5	4,5	5,4	RI, MS, NMR
1505	1500	biciklogermakren	tr		0,5		tr	RI, MS
1506	1503	germakren A		0,7	0,2		0,2	RI, MS
1520	1510	metil-dodekanoat					tr	RI, MS
1523	1525	presilfiperfolan-1-ol	0,3	4,2	1,0	1,2	1,0	RI, MS
1523	1514	kubebol				tr		RI, MS
1528	1522	δ -kadinen		tr		tr	tr	RI, MS
1532	1525	dihidroaktinidiolid					tr	RI, MS
1563	1565	dodekanska kiselina				tr		RI, MS, CoI
1564	1561	(<i>E</i>)-nerolidol				0,1	tr	RI, MS
1566	1556	daktilol	0,3	2,9	0,8	1,0	1,0	RI, MS
1568	1566	maliol		tr				RI, MS
1570	1558	selina-5,7(11)-dien					tr	RI, MS
1580	1574	(1(10) <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-1(10),5-germakradien-4-ol		tr		tr		RI, MS

		(<i>sin.</i> germakren D-4-ol)						
1582	1577	spatulenol		tr		tr		RI, MS
1588	1582	kariofilen-oksid		tr				RI, MS, CoI
1600	1600	heksadekan		tr		tr		RI, MS, CoI
1601	1589	viridiflorol				0,2		RI, MS
1609	1606	tetradekanal				0,2		RI, MS
1605	1600	rozifoliol	tr	tr		0,1	0,1	RI, MS
1614	1620	murola-4,10(14)-dien-1 β -ol				tr	tr	RI, MS
1622	1596 ^{vii}	nardošina-7,9-dien-11-ol				0,1		RI, MS
1625	1620	<i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> , <i>E</i>)-1(10)-lepidozen-5-ol				tr		RI, MS
1632	1629	<i>allo</i> -aromadendren-epoksid	0,1			0,3		RI, MS
1637	1627	1- <i>epi</i> -kubenol				0,5	tr	RI, MS
1640	1633	(1(10) <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-1(10),5-germakradien-11-ol	tr	tr	0,1	0,1	0,1	RI, MS
1649	1640	<i>epi</i> - α -murolol				tr		RI, MS
1650	1642	selina-3,11-dien-6 α -ol			0,2		0,1	RI, MS
1651	1654	<i>cis</i> -metil-dihidrojasmonat				0,2		RI, MS
1663	1680	germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol				0,6	0,5	RI, MS
1678	1674	heksil-salicilat				0,2		RI, MS
1682	1668	14-hidroksi-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-kariofilen				0,1		RI, MS
1683	-	(1 <i>Z</i> ,4 <i>E</i>)-lepidoza-1(10),4-dien-14-al (<i>sin.</i> izolepidozen-14-al)	0,3	4,4	0,8	1,7	0,4	NMR
1686	1683	<i>epi</i> - α -bisabolol					tr	RI, MS
1691	1688	šiobunol	tr			tr	0,2	RI, MS
1700	1700	heptadekan		0,5		tr		RI, MS, CoI
1710	1711	pentadekanal					tr	RI, MS
1720	1726	metil-tetradekanoat				tr	0,1	RI, MS
1730	-	(1 <i>Z</i> ,4 <i>E</i>)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (<i>sin.</i> izolepidozen-14-ol) (3)	3,7		1,0	2,6	0,1	NMR
1740	1741	izobiciklogermakrenal		0,8		0,3	0,5	RI, MS
1760	1763	tetradekanska kiselina				0,5	0,1	RI, MS, CoI

1763	1765	β -kostol				0,1		RI, MS
1762	1764	2-metilheptadekan		tr				RI, MS
1766	1763	loliolid					0,1	RI, MS
1759	1759	ciklokolorenon				1,0		RI, MS
1762	1762	aristolon	tr	2,9	tr	0,9	0,7	RI, MS
1770	1772	3-metilheptadekan		tr				RI, MS
1772	1766	drimenol	tr			0,1	0,1	RI, MS
1788	1774	<i>epi</i> -ciklokolorenon				0,1		RI, MS
1792	1792	8 α -acetoksielemol	tr			tr		RI, MS
1791	1795	etil-tetradekanoat					0,1	RI, MS
1800	1800	oktadekan	tr	0,7		tr		RI, MS, CoI
1805	1816	1 <i>H</i> -indol-3-karboksaldehid				0,3		RI, MS
1822	1822	metil-pentadekanoat				0,4	0,1	RI, MS
1835	1841	neofitadien (izomer I)	0,5		1,7		0,8	RI, MS
1852	1855	heksahidrofarnezil-aceton		tr		0,1	tr	RI, MS
1860	1857	pentadekanska kiselina				0,2	0,1	RI, MS, CoI
1863	/	neofitadien (izomer II)			0,4		0,3	MS
1872	1864	benzil-salicilat				0,1		RI, MS
1881	/	neofitadien (izomer III)	0,3	tr	0,5	0,1	0,6	MS
1890	1897	etil-pentadekanoat					0,1	RI, MS
1900	1900	nonadekan		tr		tr		RI, MS, CoI
1904	-	<i>rel</i> -(1(10) <i>Z</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>R</i>)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol (4)	tr		tr	tr		NMR
1906	-	<i>rel</i> -(1(10) <i>Z</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>R</i>)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol (5)	tr		tr	tr		NMR
1910	1912	metil-(<i>Z</i>)-9-heksadecenoat					0,1	RI, MS
1923	1926	metil-heksadekanoat				0,1	1,6	RI, MS
1940	1941	(<i>Z</i>)-9-heksadecenska kiselina	0,3			4,2	1,7	RI, MS
1961	1959	heksadekanska kiselina	1,1	tr	0,3	4,8	5,2	RI, MS, CoI
1990	1992	etil-heksadekanoat	0,1		tr	tr	2,6	RI, MS

2000	2000	eikozan		tr		tr	RI, MS, CoI
2024	2021	oktadekanal				tr	RI, MS
2082	2077	1-oktadekanol	tr		tr		RI, MS
2092	2095	metil-linoleat	0,2	0,1		0,4	RI, MS
2100	2100	heneikozen		tr	tr		RI, MS, CoI
2102	2108	metil-linolenat	1,2			0,9	RI, MS
2104	2095	metil-oleat				0,1	RI, MS
2114	2117	(<i>E</i>)-fitol			0,3	2,1	RI, MS
2117	2117	(<i>Z</i>)-11-heksadecenska kiselina	0,5				RI, MS
2124	2124	metil-oleat				0,2	RI, MS
2145	2143	linolna kiselina	0,3		6,3	6,5	RI, MS
2160	2155	etil-linoleat			tr	0,6	RI, MS
2167	2169	etil-linolenat			0,7	1,4	RI, MS
2172	2168	etil-oleat			tr	0,3	RI, MS
2191	2196	etil-oktadekanoat				0,3	RI, MS
2200	2200	dokozan			tr		RI, MS, CoI
2217	2218	(<i>E</i>)-fitil-acetat				0,3	RI, MS
2258	2274	metil-arahidonat				0,1	RI, MS
2265	2282	metil-(<i>Z, Z, Z, Z, Z</i>)-5,8,11,14,17-eikozapentaenoat				0,1	RI, MS
2287	2294	1-trikozen				tr	RI, MS
2300	2300	trikozen	0,1	tr		tr	RI, MS, CoI
2312	2324	arahidonska kiselina	0,2		0,4	tr	RI, MS
2320	2334	(<i>Z, Z, Z, Z, Z</i>)-5,8,11,14,17-eikozapentaenska kiselina	0,1		0,5		RI, MS
2325	2329	metil-eikozanoat				0,1	RI, MS
2364	2364	eikozanska kiselina			tr		RI, MS
2391	2394	etil-eikozanoat		tr		0,1	RI, MS
2400	2400	tetrakozan		tr			RI, MS, CoI
2426	2430	metil-heneikozanoat				tr	RI, MS

2491	/	etil-heneikozanoat					tr	RI, MS
2491	2498	1-dokozanol			0,3			RI, MS
2491	2492	1-pentakozen	0,3					RI, MS
2500	2500	pentakozan		tr		0,2	0,2	RI, MS, CoI
2527	2530	metil-dokozanoat					0,4	RI, MS
2568	2564	dokozanska kiselina				0,4		RI, MS, CoI
2593	2596	etil-dokozanoat			0,5		0,5	RI, MS
2600	2600	heksakozan		tr			tr	RI, MS, CoI
2628	1631	metil-trikozanoat			0,5		0,1	RI, MS
2631	2632	tetrakozanal			0,3			RI, MS
2693	2698 ^{viii}	etil-trikozanoat			0,1		0,2	RI, MS
2700	2700	heptakozan		tr	0,2	0,7	0,5	RI, MS, CoI
2728	2729	metil-tetrakozanoat			tr		0,6	RI, MS
2772	2760	tetrakozanska kiselina				0,3		RI, MS
2793	2797	etil-tetrakozanoat			1,2		0,8	RI, MS
2823	2809	(sve- <i>E</i>)-skvalen		tr	1,1	0,2	tr	RI, MS
2831	2833	heksakozanal	0,2	tr	1,1	0,2	tr	RI, MS
2894	/	etil-pentakozanoat			tr		0,1	MS
2900	2900	nonakozan		tr	0,5	0,2	0,2	RI, MS, CoI
2928	2930	heptakozanal			0,2			RI, MS
2929	2929	metil-heksakozanoat					0,1	RI, MS
2951	2951	δ -tokoferol			tr	0,2		RI, MS
2993	2980 ^{viii}	etil-heksakozanoat			tr		0,2	RI, MS
3039	3039	oktakozanal			1,3	0,1		RI, MS
3100	3100	hentriakontan		tr	0,2		0,2	RI, MS, CoI
3134	3144	metil-oktakozanoat					0,1	RI, MS
3194	3180 ^{viii}	etil-oktakozanoat					0,1	RI, MS

ⁱRI_{exp} – eksperimentalno određeni retencioni indeksi koinjekcijom homologe serije *n*-alkana (C₇-C₃₂) na DB-5MS koloni;

ⁱⁱRI_{lit} – literaturne vrednosti RI;

ⁱⁱⁱ uzorci dietil-etarskih ekstrakata (**CC1**- Veliki Kupci, (listopadno šumsko); **CC2**- Vlasinsko jezero, **CC3**- Veliki Kupci, (obala potoka), **CC4**- Planina Jastrebac, **CC5**- Vrelo reke Grze (tabela 3.4.1.));

^{iv} Metode identifikacije: MS = upoređivanje masenih spektara sa onima iz biblioteka (Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3, RI – upoređivanjem eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima, CoI – identifikacija sastojaka koinjektiranjem standarda, NMR – identifikacija ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom;

^v *sin.* – sinonim;

^{vi} Sastojak identifikovan na osnovu rada *Ludwiczuk* i saradnika (Ludwiczuk et al., 2013a);

^{vii} Sastojak identifikovan prema *Wing* i saradnicima (Wing et al., 1991);

^{viii} Linearni retencioni indeksi na DB-1 koloni.

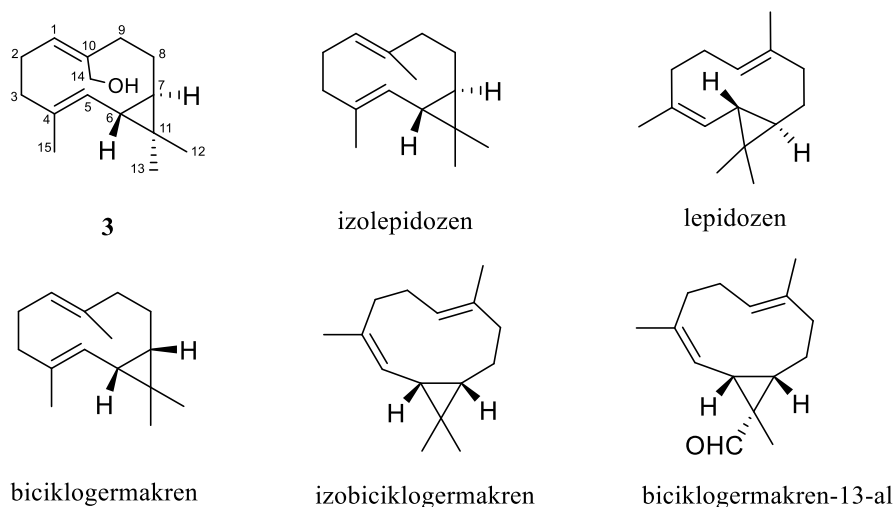
4.3.2. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE (1Z,4E)-LEPIDOZA-1,(10),4-DIEN-14-OLA

U želji da se reprodukuju ekstrakti koje su pripremili *Ludwiczuk* i saradnici, a koji sadrže jedinjenje **3**, pripremljeni su ekstrakti populacija kompleksa *C. conicum* u dietil-eteru (Et₂O) sakupljenih sa evropskih lokaliteta (tabela 3.4.1.). GC-MS analiza je ukazala na prisustvo jedinjenja **3** u tri od pripremljenih ekstrakata (tabela 4.3.1.). Ovi ekstrakti su objedinjeni i podvrgnuti hromatografiji, čime je dobijena frakcija koja sadrži jedinjenje **3** (Ekspreimentalni deo 3.6.1.). Pored toga, na ovaj način je izolovano i drugo, manje polarno jedinjenje, konocefalenol, tercijarni alkohol karakterističan za evropske populacije *C. conicum*. Konocefalenol je inicijalno identifikovan na osnovu podudaranja MS i RI podataka sa literaturom, a zatim potvrđen NMR spektroskopijom (Cossy et al., 1997; Ludwiczuk et al., 2013a; Tori et al., 1995). Takođe, izvršena je kompletna NMR atribucija konocefalenola u CDCl₃, što je zahtevalo opsežne 1D i 2D NMR eksperimente, kao i simulaciju ¹H-NMR celokupnog spina (Radulović et al., 2019) (prilozi 20, 22-27 i 40). Struktura jedinjenja **3** je, kako je na dalje detaljno objašnjeno, određena primenom IR, MS i NMR metoda (snimljenih u hloroformu-*d* i benzenu-*d*₆), uključujući simulaciju ¹H-NMR-a i poređenje NMR podataka sa poznatim jedinjenjima sličnih struktura (slika 4.3.2. i tabela 4.3.2.).

Jedinjenje **3** (slika 4.3.2.) predstavlja monooksigenovani seskviterpen sa molekulskom formulom C₁₅H₂₄O, kako se zaključuje iz HREIMS analize (molekulski jon na *m/z* 220, Δ=-0,0029 amu). Prisustvo alkoholne grupe bilo je očigledno kako iz masenog spektra (prilog 36), tako i iz vrednosti retencionog indeksa (RI 1730) (Adams, 2007) i vibracija istezanja OH-grupe uočene kao širokopojasna apsorpcija na 3100–3400 (maksimum na 3276) cm⁻¹. ¹H-NMR (benzen-*d*₆; prilozi 21, 28 i 40) spektar jedinjenja **3** jasno je pokazao dva signala na δ_H -0,16 i 0,75, navodeći na moguće postojanje supstituisanog ciklopropanskog prstena, zajedno sa dva olefinska protonska signala na δ_H 4,76 i 4,61, tri signala metil-grupe, sa dva singleta na δ_H 1,06 i 1,13 koji odgovaraju geminalnim metil-grupama, kao što se zaključuje iz gHMBC spektra (slika 4.3.3., prilozi 21 i 32), i dublet na δ_H 1,54 (*J* = 1,3 Hz), što implicira alilno spregnutu metil-grupu na dvostrukoj vezi.

Analize ¹³C-NMR (prilozi 21, 30 i 40), DEPT-90, DEPT-135 i gHSQC (prilog 31) spektara ukazale su da jedinjenje **3** sadrži 15 neekvivalentnih atoma ugljenika: tri metil-grupe, pet dijastereotopnih metilenskih grupa, od kojih je jedna bila oksigenovana, dve ciklopropanske i dve

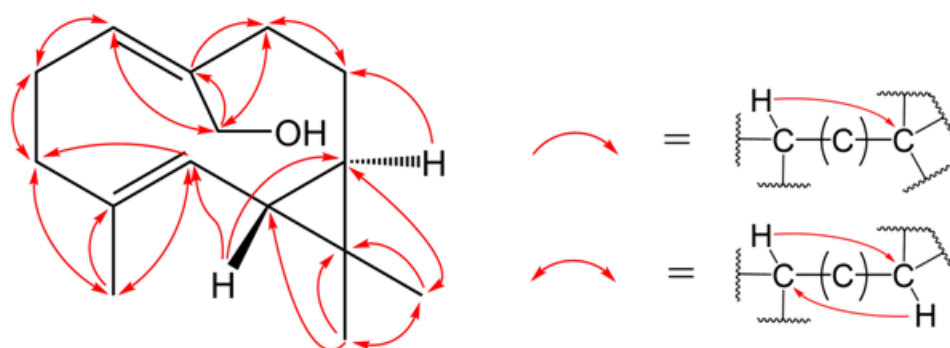
olefin metinske grupe, kao i tri neprotonovana atoma ugljenika, od kojih su dva bila deo dve postojeće dvostruke veze (tabela 4.3.2.; ova tabela takođe sadrži NMR podatke relevantnih strukturno srodnih seskviterpena (Hardt et al., 1995; McMurry i Bosch, 1985; 1987; Toyota et al., 1988), sa nedvosmisleno utvrđenim stereostrukturama (slika 4.3.2.)). Par diastereotopnih protona, na δ_H 4,07 (H-14a) i 3,63 (H-14b), vezanih za oksigenovani atom sp^3 -hibridizovanog ugljenika (C-14), na δ_C 60,0, bio je deo primarnog alilnog alkohola, što je potvrđeno C–H kuplovanjem jednog od pomenutih olefinskih protona (δ_H 4,76, H-1) i C-14. OH-proton (0,48 ppm) nestaje nakon dodavanja D_2O , koji se kupluje sa H-14a i H-14b (prilog 29), potvrđujući njegov položaj. Dve trisupstituisane dvostruke veze i ciklopropanski prsten čine tri od četiri nezasićenja jedinjenja **3**, što ukazuje na prisustvo dodatnog prstena u strukturi. Ovo sužava broj mogućih poznatih ugljeničnih skeleta na stereoizomerne biciklogermakrane i lepidozane.



Slika 4.3.2. Šema numeracije atoma i strukturna formula jedinjenja **3** (izolepidozen-14-ol, *sin.* (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol; (1*R**,4*Z*,8*E*,10*R**)-8,11,11-trimetilbiciklo[8.1.0]undeka-3,8-dien-3-il)metanol) izolovanog iz *C. conicum*, i srodnih poznatih jedinjenja sa nedvosmisleno utvrđenim (stereo)strukturama

Konektivnost, koja ukazuje na biciklo[8.1.0]undekanski skelet, i položaj dvostrukih veza i metil-grupa zaključeni su na osnovu analize 2D NMR spektara (prilozi 21, 28-33, 40, kao i slike 4.3.3. i 4.3.4.). Ovo je odgovaralo ili biciklogermakra-1(10),4-dien-14-olu ili lepidozu-1(10),4-dien-14-olu (**3**, slika 4.3.2.), koji se razlikuju u konfiguraciji kondenzacije 3- i 10-članog prstena.

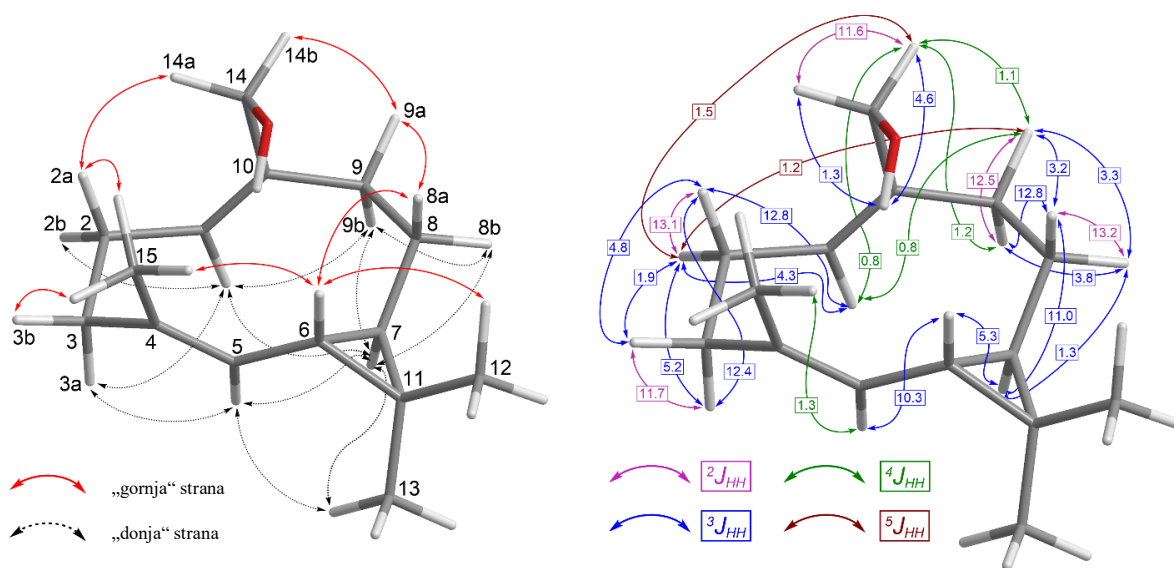
trans-Kondenzacija je nagoveštena iz vrednosti vicinalne konstante kuplovanja od 5,3 Hz između čvornih protona H-6 i H-7 (u poređenju sa vrednošću od 8,8 Hz za *cis* raspored u biciklogermakren-13-alu (slika 4.3.2.)) (Bramwell et al., 1969, Toyota et al., 1988), što je dalje potvrđeno poređenjem drugih vrednosti *J* i hemijskih pomeranja srodnih stereoizomernih jedinjenja A-D (tabela 4.3.2., slika 4.3.2.) (Hardt et al., 1995; McMurry i Bosch, 1985; 1987; Toyota et al., 1988), kao i uočenih NOESY interakcija (slika 4.3.4., i prilozi 21, 28 i 30), npr. H-6–H-12 i H-7–H-13. Prilikom GC-MS analize jedinjenje **3** je eluiralo kao jedan oštar pik, dok je karakteristika *cis*-kondenzovanih biciklogermakrena da se preuređuju u bicikloelemanske artefakte Cope-ovim premeštanjem u viskotemperaturnim zonama gasnog hormatograma. Ovo je još jedna potvrda *trans*-kondenzacije ovih prstenova (prilog 34) (Setzer, 2008).



Slika 4.3.3. Ključne gHMBC interakcije jedinjenja **3**

Dakle, preostalo je da se utvrdi konfiguracija dvostrukih veza unutar lepidozanskog jezgra jedinjenja **3**. Geometrija C-4–C-5 dvostruke veze prvobitno je predložena kao *E* iz karakteristične ¹³C-NMR vrednosti hemijskog pomeranja pripadajuće vezane metil-grupe, δ_c 17,7, dok bi se za *Z*-geometriju očekivala vrednost oko 24 ppm (Hardt et al., 1995; Matsuo et al., 1981c; McMurry i Bosch, 1985; 1987). Ovu tvrdnju podržavaju i uočene NOESY interakcije (H-6–H-15 i H-3a/b–H-5) prikazane na slici 4.3.4. Dakle, jedinjenje **3** poseduje seskviterpenski skelet isti kao izolepidozen (slika 4.3.2.), s obzirom na to da su njegovi NMR podaci u saglasnosti sa objavljenim vrednostima (Hardt et al., 1995; Matsuo et al., 1981c) za jedinjenja koja poseduju ovaj skelet (tabela 4.3.2.), a razlikuju se od NMR podataka lepidozena (slika 4.3.2.) i biciklogermakrenskih

seskviterpena (slika 4.3.2.) koji se tiču hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja protona H-6 i H-7, kao i pomeranja ugljenika C-15. Za preostalu 1,10-dvostruku vezu se, u skladu sa navedenim, pretpostavlja da je *E*, nakon čega je ova konfiguracija potvrđena na osnovu dipolarnog kuplovanja protona H-2–H-14 i H-1–H-9 (slika 4.3.4.). Stoga je ustanovljeno da je jedinjenje **3**, koje su prvobitno uočili *Ludwiczuk* i saradnici (*Ludwiczuk et al.*, 2013a), zapravo **(1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol** (predlaže se polu-trivijalno ime izolepidozen-14-ol). Ovaj seskviterpenol se dobro uklapa u već poznati profil metabolita vrste *C. conicum* (*Melching i König*, 1999).



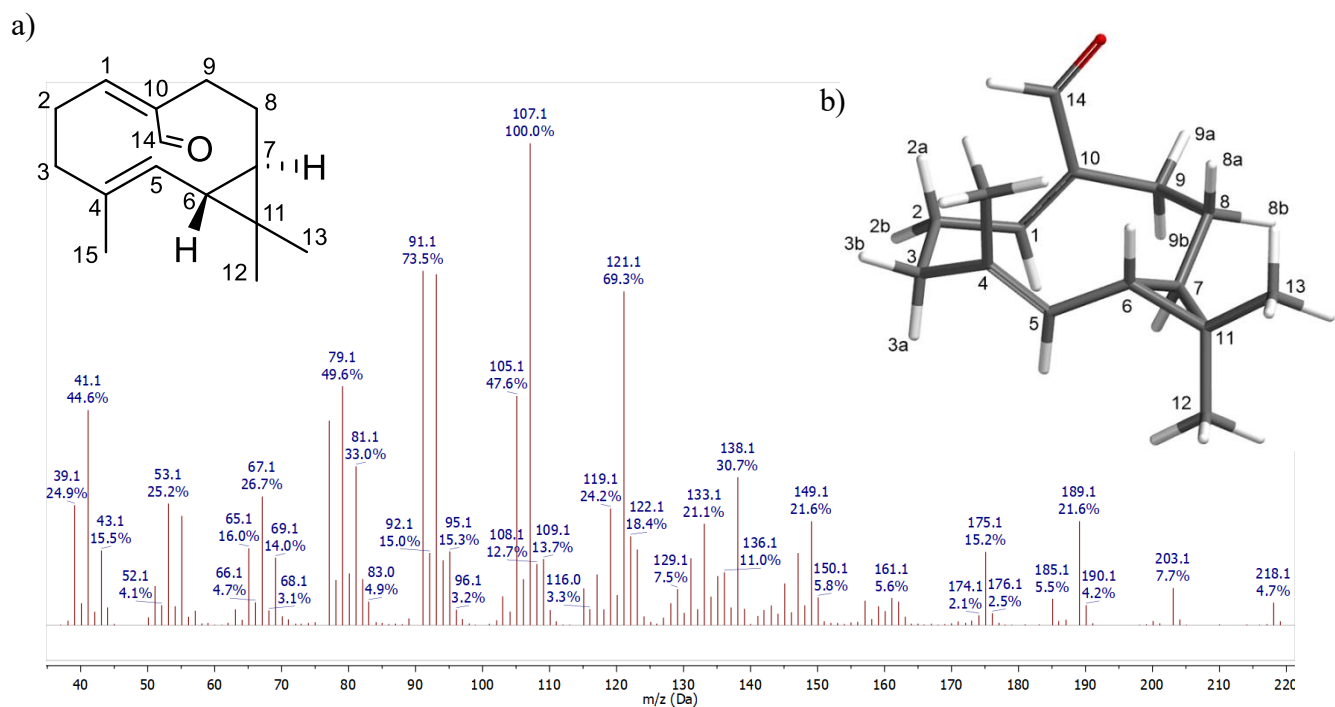
Slika 4.3.4. Levo: Ključne NOESY interakcije jedinjenja **3** i oznaka dijastereotopnih vodonika. Radi jasnoće, NOESY interakcije između atoma vodonika sa jedne strane desetočlanog prstena su prikazane crvenim strelicama, dok su interakcije vodonika sa suprotne strane prikazane isprekidanim strelicama. Desno: Uočene vrednosti konstanti kuplovanja ^1H - ^1H ($>0,7$ Hz) jedinjenja **3**

Tabla 4.3.2. ¹H (400 MHz) i ¹³C (100,6 MHz) NMR spektroskopski podaci (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (**3**) (benzen-*d*₆) i jedinjenja A–E

Položaj	δ_{H} , m (J u Hz) ⁱ								δ_{C} (ppm)				
	3ⁱⁱ	Aⁱⁱⁱ	A	B^{iv}	C^v	D^{vi}	E^{vii}	3	A	A	B	E	
1	4,76, ddt ^{viii} t ^{viii} (12,3, 4,3, 0,8, 0,7)	4,82, d (14,0)	4,83, dd (11,7, 3,2)	5,19, t (8,2)	4,81, m	5,03, m	4,96, m	131,3	131,9	132,0	132,9	125,8	
2a	2,39, dddd (-13,1, 12,4, 12,3, 4,8)	1,80-2,55, m	2,52, m	1,60–2,50, m	2,4, dt (13, 3,4)		2,10, m	29,7	29,3 ^{ix}	29,3	32,0 ^x	26,0	
2b	1,99, dddddd(-13,1, 5,2, 4,3, 1,9, 1.5, 1.2)		2,1–2,24, m		1,68–2,13, m		1,98, m						
3a	2,11, ddd (12,4, -11,7, 5,2)				2,2, m		2,26, ddd (11,7, 3,7, 3,7)	41,2	41,1	41,1	31,1 ^x	40,9	
3b	2,10, ddd (-11,7, 4,8, 1,9)				1,68-2,13, m		1,96, m						
4								134,2	134,9	134,9	133,1	131,3	
5	4,61, dd (10,3, 1,3)	4,56, d (11,7)	4,58, br d (10,2)	5,0, d (9,0)	4,33, d (12)	4,96, d (10)	4,96, m	132,8	132,1	132,1	125,3	122,2	
6	0,75, dd (10,3, 5,3)	0,78, m	0,81, dd (10,2, 5,0)	0,70, m	0,59, m	0,4, m	2,13, dd (11,7, 8,8)	37,6	36,2	36,2	26,0 ^x	35,2	
7	-0,16, ddd (11,0, 5,3, 1,3)	-0,1, m	-0,07 ddd (9,6, 5,0, 1,0)	0,00, m	1,1–1,3, m		1,43, ddd (12,5, 8,8, 2,9)	41,8	42,3	42,2	34,0 ^x	36,9	
8a	1,87, dddd (-13,2, 3,8, 3,3, 1,3)	1,80-2,55, m	1,92, dt (13,7, 3,0)	1,60–2,50, m	1,68–2,13, m		2,05, dddd (13,2, 4,4, 3,5, 2,9)	26,7	24,9	24,9	24,8	25,8	
8b	1,02, dddd (-13,2, 12,8, 11,0, 3,2)		1,00–1,10, m		1,1–1,3, m		1,94, tdd (13,2, 12,5, 3,5)						
9a	2,80, dddddd (-12,5, 3,3, 3,2, 1,2,1,1, 0,8)		2,29, dt (12,7, 3,0)		1,68–2,13, m		2,52, dt (13,2, 3,5)	37,8	40,4	40,4	40,4	37,0	
9b	1,79, dddddd (12,8, -12,5, 3,8, 1,2, 0,7)		2,00, td (12,7, 4,0)				1,75, td (13,2, 4,4)						
10								131,9	127,2 ^{xii}	127,2 ^{xii}	126,8 ^{xii}	139,8	
11								25,5	24,3	24,3	22,4 ^{xi}	35,7	
12	1,16, s	1,12, s	1,13, s	1,06, s	1,07, s	1,03, s	1,27, s	23,8	23,0	23,0	19,0 ^{xi}	20,1	
13	1,02, s	1,05, s	1,06, s	0,98, s	1,01, s	0,98, s	9,60, s	22,5	21,9	21,8	21,8 ^{xi}	203,5	
14a	4,07, ddd (-11,6, 1,3, 0,7)	1,61, s ^{xiii}	1,63, d (1,0) ^{xiii}	1,61, s ^{xiii}	1,65, s	1,4, s	1,50 br s	60,0 ^{xii}	16,3 ^{xii}	16,3 ^{xii}	15,4 ^{xii}	20,8	
14b	3,63, dddddd (-11,6, 4,6, 1,5, 1,2,1,1)												
15	1,46, d (1,3)	1,50, s	1,52, s	1,73, s	1,46, s	1,17, s	1,69, br s	17,7	17,3	17,3	24,1	16,2	
OH-14	0,48, dd (4,6, 1,3) ^{xiii}	-	-	-	-	-	-						

ⁱAko je $|J| \leq 0,7$ Hz, konstante kuplovanja nisu navedene u ovoj tabeli, ali su prikazane u prilogu 21. ⁱⁱVećina protonskih rezonanci na 400 MHz pojavila se kao signali višeg reda i/ili sa regionima preklapljenih signala; predstavljene vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja, uključujući njihov znak, određene su iz manualne iterativne pune spinske ¹H-NMR simulacije (Radulović et al., 2019). ⁱⁱⁱPodaci za izolepidozen (Hardt et al., 1995; Mc.Murry i Boch 1985; 1987). ^{iv}Podaci za lepidozen (Mc.Murry i Boch, 1987). ^vPodaci za biciklogermakren (Mc. Murry i Boch, 1987). ^{vi}Podaci za izobiciklogermakren (Mc.Murry i Boch, 1987). ^{vii}Podaci za biciklogermakren-13-al (Toyota et al., 1988). ^{viii}Pseudomultipllet, kao na primer, dublet dubleta, ali sa dve slične *J* vrednosti koje bi se verovatno pojavile kao pseudo-triplet. ^{ix}Ispravljeno sa 39,33 na 29,33 zbog očigledne štamparske greške: hemijska pomeranja su navedena u opadajućem redu. ^{x,xii}Asignacija se može izmeniti. ^{xiii}Nije uporedivo; (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (**3**) ima oksigenaciju na položaju 14; E ima formil-grupu (C-13). ^{xiiii}Široki signal.

(1*Z*,4*E*)-Lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (jedinjenje **3**) i srodni seskviterpeni karakterišu se složenošću njihovih ^1H -NMR spektara (Adio, 2009) zbog značajnog preklapanja signala, postojanja signala višeg reda i mogućeg postojanja nekoliko važnih konformacija usled fleksibilnosti velikih prstenova. Ovo obično dovodi do toga da publikacije ne navode tačna hemijska pomeranja svih vodonika, i, što je još važnije, vrednosti konstanti kuplovanja, kao što se može videti iz literaturnih primera datih u tabeli 4.3.2. (Hardt et al., 1995; McMurry i Bosch, 1985; 1987; Toyota et al., 1988). Ovde je potpuna ^1H -NMR spektralna simulacija omogućila potpunu asignaciju hemijskih pomeranja i utvrđivanje vrednosti konstanti kuplovanja (slika 4.3.4., tabela 4.3.2., prilozi 21 i 40). Uočene grupe vicinalnih konstanti kuplovanja čije su vrednosti iznad 10 Hz olakšale su asignaciju pseudoaksijalnih (antiperiplanarnih) i pseudoekvatorijalnih vodonika (slika 4.3.4.), a dodatno su iskorišćene za utvrđivanje dominantnog konformera ovog sistema nalik na dvostruku stolicu, za koji je ranije ustanovljeno da je konformer sa najnižom energijom za ger-



Slika 4.3.5. Maseni spektar izolepidozen-14-ala sa: a) šema numeracije atoma izolepidozen-14-ala (*sin.* (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-al; (1*R**,4*Z*,8*E*,10*R**)-8,11,11-trimetilbiciklo[8.1.0]undeka-3,8-dien-3-il)metanal) – strukturna formula, b) šema numeracije atoma izolepidozen-14-ala–3D model

makrene (Adio, 2009). Za razliku od germakrena (Adio, 2009), posmatrani NMR spektri (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**) (prilog 28) svedoče o nepostojanju sporih konformacionih procesa i dominaciji jednog konformera, verovatno kao posledica uvođenja *trans*-kondenzovanog ciklopropanskog prstena. Ova konformacija takođe objašnjava neočekivano malu polarnost (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**), koji je izolovan sa kolone SiO₂ spiranjem sa 10% (v/v) Et₂O u heksanu. Naime, OH-grupa ovog jedinjenja je orijentisana prema „unutrašnjosti“ molekula, što doprinosi smanjenju polarnosti (slika 4.3.4.).

Prisustvo biciklogermakren-14-ala, srodnog metabolita, utvrđeno je (Connolly, 1990), isključivo za jetrenjaču *C. conicum* (Ludwiczuk et al., 2013a; Melching i Köning, 1999). Ovaj metabolit se razlikuje od (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola po prisustvu formil-grupe umesto alkoholne grupe i po *cis*-kondenzovanom tročlano-desetočlanom prstenastom sistemu (slika 4.3.5.). Literaturna pretraga upućuje na podatke iz poglavlja knjige (Connolly, 1990), koje sadrži podatke sa prve naučne konferencije posvećene briofitama i njihovoj hemiji (Zinsmeister & Mues, 1990). NMR podaci navedeni u pomenutoj knjizi za biciklogermakren-14-al, koji uključuju samo šest protonskih signala (H-1, H-5, H-6, H-7, H-14 i H-15 (Connolly, 1990)), jedini su dostupni u literaturi. Svi kasniji radovi i istraživanja koji pominju biciklogermakren-14-al citiraju ovo poglavlje, bez ponavljanja tih podataka. Analizom δ i *J* vrednosti za H-6 i H-7, sa vicinalnom konstantom od 5,2 Hz karakterističnom za *trans*-kondenzovani ciklopropanski prsten, kao i za H-5 i H-15, jasno je da prijavljeni biciklogermakren-14-al u stvari nije derivat biciklogermakrena, već izolepidozena, odnosno da vrlo verovatno predstavlja izolepidozen-14-al.

Drugo po redu izolavanje navodnog biciklogermakren-14-ala takođe je iz jetrenjače *C. conicum* (Melching i Köning, 1999). Ova identifikacija zasnovana je na poređenju NMR podataka sa onima iz pomenutog poglavlja knjige (Connolly, 1990), dok je kopija ¹H-NMR biciklogermakren-14-al spektra navedena u doktorskoj disertaciji Melching-a (1999). Upoređenje spektra pokazuje blisko podudaranje podataka sa onim datim kod Connolly-a. Ovo jedinjenje je kasnije uključeno u komercijalnu kolekciju masenih spektara i retencionih indeksa, MassFinder, (The Mass Finder Online Terpenoids Library List, 2020) od strane V. Königa, a nakon toga su ga Ludwiczuk i saradnici (Ludwiczuk et al., 2013a), uslovno, identifikovali u brojnim uzorcima *C. conicum*. Ova identifikacija putem GC-MS oslanjala se na podudaranje MS i RI podataka sa

podacima iz biblioteke MassFinder-a. Stoga predlažemo da se promeni identitet biciklogermakren-14-ala u izolepidozen-14-al.

Pošto su sve količine (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**) utrošene za testiranja, kao što je opisano u Rezultatima i diskusiji 4.3.7., bilo je nemoguće dokazati pogrešnu identifikaciju biciklogermakren-14-ala oksidacijom čistog uzorka (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**). Stoga je manja hromatografska frakcija, koja sadrži 11% (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (jedinjenje **3**), oksidovana piridijum-hlorhromatom (Eksperimentalni deo 3.6.3.). Ovo je rezultiralo značajno smanjenom količinom (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**) (prilog 35), dok je povećana količina formiranog izolepidozen-14-ala, sa retencionim indeksom i masenim spektrom koji savršeno odgovaraju onima za biciklogermakren-14-al iz MassFinder-a (slika 4.3.5.). NMR spektri oksidovanog uzorka i spektralna simulacija pružili su dovoljno informacija za identifikaciju izolepidozen-14-ala i za upoređivanje podataka sa onima koje je dao Connolly (slika 4.3.5., tabela 4.3.3., prilog 37-39) (Connolly, 1990).

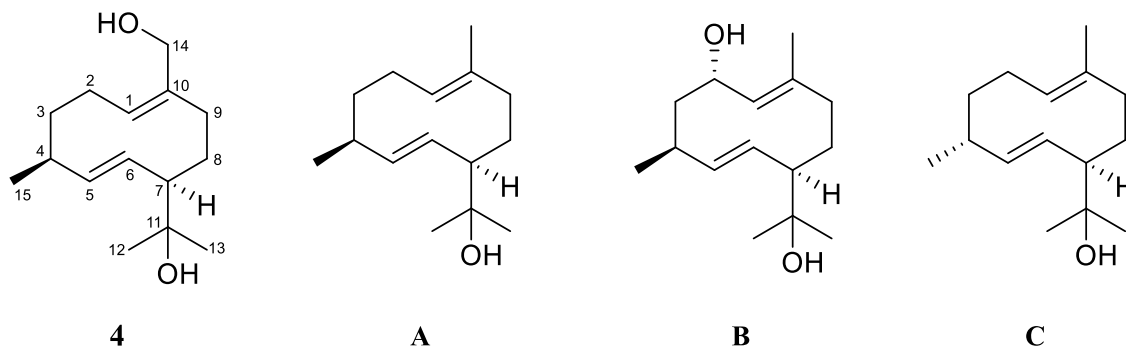
Table 4.3.3. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR podaci izolepidozen-14-ala asignirani iz smeše (hloroform-*d*, NMR parametri su izvedeni iz manualne iterativne potpune spinske analize, početna tačka su bili parametri dobijeni iz pune spinske analize (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**), ^{13}C -NMR hemijska pomeranja dobijena su iz grHSQC spektra)

Položaj	δ_{H} (integral, m, J (Hz) ^a)	δ_{C}
1	6,3092 (1 H, ddt ^{ps} dt ^{ps} , $^3J_{1,2a} = 13,4$, $^3J_{1,2b} = 4,3$, $^4J_{1,9a} = ^4J_{1,9b} = 0,7$, $^4J_{1,3a} = 0,5$, $^4J_{1,3b} = ^4J_{1,14} = 0,3$)	153,2
2a	2,4137 (1 H, ddddq ^{ps} , $^2J_{1,2a} = 13,4$, $^2J_{2b,2a} = -12,7$, $^3J_{2a,3b} = 12,4$, $^3J_{2a,3a} = 3,4$, $^5J_{2a,9b} = ^5J_{2a,9a} = ^4J_{2a,14} = 0,3$)	28,0
2b	1,9684 (1 H, dddddd, $^2J_{2b,2a} = -12,7$, $^3J_{2b,3b} = 5,2$, $^3J_{1,2b} = 4,3$, $^3J_{2b,3a} = 1,9$, $^5J_{2b,9a} = 1,2$, $^5J_{2b,14} = 1,1$, $^5J_{2b,9b} = 0,6$)	
3a	2,1218 (1 H, dddd ^{ps} , $^2J_{3b,3a} = -11,7$, $^3J_{2a,3a} = 3,4$, $^3J_{2b,3a} = 1,9$, $^4J_{1,3a} = 0,5$, $^4J_{3a,5} = ^5J_{3a,6} = 0,3$)	41,3
3b	2,1404 (1 H, dddt ^{ps} d, $^3J_{2a,3b} = 12,4$, $^2J_{3b,3a} = -11,7$, $^3J_{2b,3b} = 5,2$, $^4J_{3b,5} = ^5J_{3b,6} = 0,4$, $^4J_{1,3b} = 0,3$)	
4	/	134,1 ^b
5	4,8062 (1 H, ddq ^{ps} , $^3J_{5,6} = 10,5$, $^4J_{5,15} = 1,2$, $^4J_{3b,5} = ^4J_{3a,5} = ^4J_{5,7} = 0,3$)	131,7
6	0,6231 (1 H, ddt ^{ps} oct ^{ps} , $^3J_{5,6} = 10,5$, $^3J_{6,7} = 5,3$, $^4J_{6,8a} = ^5J_{3b,6} = 0,4$, $^5J_{3a,6} = ^4J_{6,12} = ^4J_{6,13} = 0,3$)	36,5
7	-0,1003 (1 H, ddddec ^{ps} , $^3J_{7,8b} = 11,2$, $^3J_{6,7} = 5,3$, $^3J_{7,8a} = 1,3$, $^4J_{5,7} = ^4J_{7,9b} = ^4J_{7,9a} = ^4J_{7,12} = ^4J_{7,13} = 0,3$)	40,6
8a	1,8552 (1 H, ddddd, $^2J_{8b,8a} = -13,2$, $^3J_{8a,9b} = 3,8$, $^3J_{8a,9a} = 3,3$, $^3J_{7,8a} = 1,3$, $^4J_{6,8a} = 0,4$)	27,0
8b	1,0453 (1 H, dddd, $^2J_{8b,8a} = -13,2$, $^3J_{8b,9b} = 12,8$, $^3J_{7,8b} = 11,2$, $^3J_{8b,9a} = 3,2$)	
9a	2,9412 (1 H, ddddq ^{ps} , $^2J_{9a,9b} = -13,0$, $^3J_{8a,9a} = 3,3$, $^3J_{8b,9a} = 3,2$, $^5J_{2b,9a} = 1,2$, $^4J_{1,9a} = 0,7$, $^4J_{9a,14} = ^5J_{2a,9a} = ^4J_{7,9a} = 0,3$)	33,7
9b	1,7612 (1 H, dddddd, $^2J_{9a,9b} = -13,0$, $^3J_{8b,9b} = 12,8$, $^3J_{8a,9b} = 3,8$, $^4J_{1,9b} = 0,7$, $^5J_{2b,9b} = 0,6$, $^4J_{9b,14} = 0,4$, $^5J_{2a,9b} = 0,3$)	
10	/	131,9 ^b
11	/	25,4 ^b
12	1,0241 (1 H, t ^{ps} , $^4J_{7,12} = ^4J_{6,12} = 0,3$)	22,2
13	1,1249 (1 H, t ^{ps} , $^4J_{7,13} = ^4J_{6,13} = 0,3$)	23,0
14	10,0463 (1 H, ddq ^b , $^4J_{2e,14} = 1,1$, $^4J_{9b,14} = 0,4$, $^4J_{1,14} = ^5J_{9a,14} = ^4J_{2a,14} = 0,3$)	190,2
15	1,4653 (1 H, dd, $^4J_{5,15} = 1,2$)	17,1

^aVrednosti konstanti kuplovanja inicijalno su izvedene iz eksperimenata ^1H homoselektivnog dekuplovanja, a potom su utajčnjene kroz manuelnu iterativnu potpunu spinsku analizu. Za detalje pogledati priloge 37-39; ^bPretpostavljena hemijska pomeranja usled analogije sa (1Z,4E)-lepidoza-1(10),4-dien-14-olom (**3**); ^{ps}Pseudo, to jest pseudo multiplet. Na primer, dublet dubleta, sa dve slične J vrednosti, verovatno će izgledati kao pseudo-triplet.

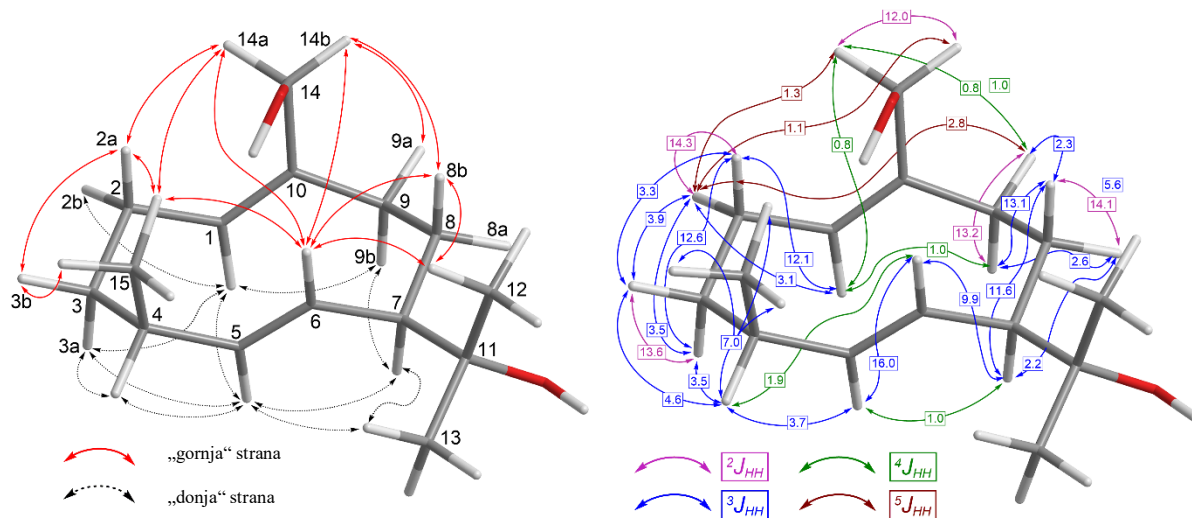
4.3.3. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA

Hromatografijom na koloni SiO₂, koja je eluirana smešom heksan-Et₂O (1:19, v/v), kao 46. frakcija, dobijeno je čisto jedinjenje **4** (slika 4.3.6.) (Eksperimentalni deo 3.6.2.). Ovo polarno jedinjenje je u MS davalo molekulski jon na m/z 238 i fragmentne jone na m/z 220 [M-H₂O]⁺ i 202 [M-2H₂O]⁺, što ukazuje da je ovo jedinjenje verovatno seskviterpenski diol (prilog 48). Tri signala olefinskih protona na δ_H 5,63 (H-5), 5,17 (H-1) i 4,87 (H-6) bila su jasno vidljiva u ¹H-NMR (hloroform-*d*) spektru jedinjenja **4** (prilog 41). Vrednost vicinalne konstante kuplovanja od 16 Hz između protona H-5 i H-6 (slika 4.3.7.) nedvosmisleno potvrđuje *trans*-geometriju jedne od dvostrukih veza (C-5–C-6). Tri signala metil-grupa, koji obuhvataju dva singleta na δ_H 1,07 i 1,16 i jedan dublet na δ_H 1,09 ($J = 7,0$ Hz), predstavljaju tri od ukupno 15 detektovanih neekvivalentnih ¹³C-NMR signala, podržavajući hipotezu o seskviterpenskom skeletu. Na osnovu ¹³C-NMR (prilog 44), DEPT-90 i DEPT-135 spektara, ostali signali atoma ugljenika su direktno dodeljeni za četiri sp²-hibridizovana C-atoma (tri metinske-grupe C-1, C-5, i C-6, i jedna neprotonovana, C-10), dve sp³-hibridizovane metinske-grupe, pet sp³-hibridizovanih metilenskih grupa, od kojih je jedna jednostruko oksigenovana, i još jedan oksigenovani ne-protonovani sp³-hibridizovani atom ugljenika. Kombinacijom podataka iz ¹H- i ¹³C-NMR, kao i gHSQC i gHMBC spektara utvrđeno je da jedinjenje **4** sadrži dvostruko nezasićeni desetočlani prsten, koji poseduje hidroksi-metil i 2-hidroksi-2-propil-supstituente, kao i dve dvostruke veze (slika 4.3.7. i prilozi 41, 43-46). Ovo odgovara derivatima germakrana koji imaju jednu primarnu i jednu tercijarnu alkoholnu funkcionalnu grupu na C-14 i C-11 (slika 4.3.6.). Asignacija svih ¹H- i ¹³C-NMR rezonanci prikazana je u tabeli 4.3.4., dok su svi podaci koji se odnose na vrednosti konstanti kuplovanja i hemijska pomeranja dobijeni manuelnom iterativnom spektralnom simulacijom, kao u slučaju (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola (jedinjenje **3**). Nakon toga, u cilju razjašnjenja strukture jedinjenja **4** ostala su da se reše još dva stereohemijska pitanja, koja podrazumevaju geometriju dvostruke veze C-1–C-10 i relativnu konfiguraciju dva hiralna centra na C-4 i C-7.



Slika 4.3.6. Strukture izolovanog jedinjenja **4** sa šemom numeracije, (*rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol, sinonim 2-(*rel*-(1*R*,2*E*,4*S*,7*Z*)-8-(hidroksimetil)-4-metilciklodeka-2,7-dien-1-il)propan-2-ol (**4**)), kao i poznatih, srodnih, seskviterpena sa nedvosmisleno utvrđenim (stereo)strukturama: (4*S*,7*R*)-germakra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (**A**), 1(10)*E*,5*E*-germakradien-2,11-diol (**B**) i alohedikariol (**C**)

Z-konfiguracija trisupstituisane C-1–C-10 dvostruke veze lako je zaključena iz NOESY kros-pikova H-2a sa H-14a i H-14b, kao i između H-1 i H-9b (slika 4.3.7., prilog 47). Dominacija jednog konformera jedinjenja **4** bila je očigledna iz uočene homoalilne konstante kuplovanja (2,8 Hz) preko dvostruke veze C-1–C-10 između H-2b i H-9a (slika 4.3.7.), što je i očekivano ako su dva vodonika pseudoekvatorijalna na ciklodekadienskom prstenu sa dve *trans*-endociklične dvostruke veze koji se prilagođavaju konformaciji stolice (slika 4.3.7.). Ovo je snažno podržano vrednoistima konstanti kuplovanja reda veličine od 10-13 Hz, karakterističnih za niz pseudo-aksijalnih vodonika, gde su uključeni i protoni sa dvostruke veze (slika 4.3.7.). Jedan od ovih pseudo-aksijalnih vodonika na δ_H 2,30 (H-7) bio je antiperiplanaran u odnosu na dva vodonika na δ 4,87 (H-6) i 1,25 (H-8b, slika 4.3.7.), postavljajući hidroksiizopropil-grupu u pseudoekvatorijalni položaj. Ovaj niz pseudoaksijalnih protona prekinut je samo na C-4, gde je metil-grupa (C-15) zauzimala pseudo-aksijalni položaj, o čemu svedoče male vrednosti vicinalnih konstanti kuplovanja za δ_H 2,47 (H-4). Ovi argumenti, kao i brojne uočene NOESY interakcije (slika 4.3.7., prilozi 47 i 49) nedvosmisleno su potvrdili (4*S**,7*R**)-relativnu konfiguraciju dva hiralna centra, kao i pretpostavljenu konformaciju jedinjenja **4**. Dva jedinjenja, (4*S*,7*R*)-germakra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ol (**A**, slika 4.3.6.) i 1(10)*E*,5*E*-germakradien-2,11-diol (**B**, slika 4.3.6.), poseduju istu relativnu konfiguraciju centara C-4 i C-7, nedvosmisleno utvrđenu rendgenskom strukturnom analizom u slučaju (4*S*,7*R*)-germakra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ola (Toyota et al., 1997). Relevantni NMR podaci (4*S*,7*R*)-germakra-1(10)*E*,5*E*-dien-11-ola (Ganßer et al., 1995) i 1(10)*E*,5*E*-germa-



Slika 4.3.7. Levo: ključne NOESY-interakcije jedinjenja 4 i označavanje dijastereotopnih vodonika. Radi jasnoće, NOESY-interakcije između atoma vodonika sa jedne strane desetočlanog prstena su prikazane crvenim strelicama, dok su interakcije vodonika sa suprotne strane prikazane isprekidanim strelicama. Desno: uočene vrednosti konstanti kuplovanja ^1H - ^1H ($>0,7$ Hz) za jedinjenje 4

kradien-2,11-diola (Guan et al., 2005) su u potpunoj saglasnosti sa onima koji se odnose na jedinjenje 4 (tabela 4.3.4.), dok se podaci za alohedikariol (C, slika 4.3.6.) ne poklapaju (Valle et al., 1986) (određena suprotna relativna konfiguracija ($4R^*, 7R^*$) stereoselektivnom sintezom (Zhabinskii et al., 1996)). Dakle, jedinjenje 4 predstavlja *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol, novo prirodno jedinjenje.

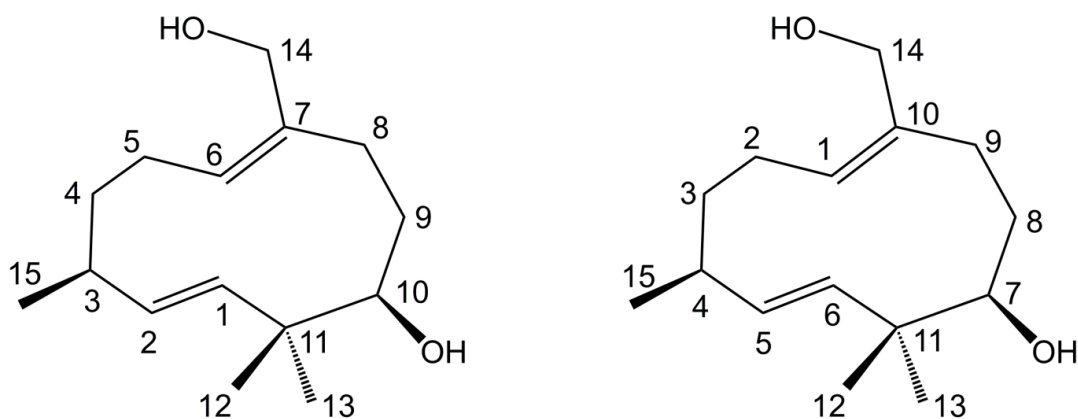
Table 4.3.4. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR spektroskopski podaci jedinjenja **4** (hloroform-*d*), kao i jedinjenja **A–C** (korišćena je numeracija sa slike 4.3.6.)

Položaj	$\delta_{\text{H}}, \text{m (J u Hz)}^i$				δ_{C}			
	4ⁱⁱ	Aⁱⁱⁱ	B(CD₃OD)^{iv}	C^{v,v}	4	A	B(CD₃OD)	C
1	5,17, ddddt ^{vii} (12,1, 3,1, 1,0, 0,8, 0,7)	5,03, br d (12, 3,5)	4,96, br d (10,3)	4,95 – 5,20	135,0	130,7	134,3	127,1
2a	2,54, dddd (-14,3, 12,6, 12,1, 3,3)	2,41, dddd (14, 12,5, 12,0, 3,5)	4,39, td (10,3, 3,9) ^{vii,ix}	- ^x				
2b	1,97, dddddd (-14,3, 3,9, 3,5, 3,1, 2,8, 1,3, 1,1)	1,90, dddd (14, 3,5, 3,0)	/ix	-	23,5	22,1	66,0 ^{viii}	22,7
3a	1,76, dtd (-13,6, 12,6, 3,5,0,7)	1,71, dtd (13,5, 12,0, 3,5)	1,86, m	-				
3b	1,56, dddd (-13,6, 4,6, 3,9, 3,3)	1,53, dtd (13,5, 3,5, 3,0)	1,60, m	-	32,7	32,9	42,9 ^{viii}	41,0
4	2,47, qddddd (7,0, 4,6, 3,7, 3,5, 1,9)	2,43, m (7,2, 3,7, 3,5) ^{xi}	2,47, m	-	34,0	33,9	33,7	40,4
5	5,63, dd (16, 3,7)	5,66, dd (16, 3,7)	5,42, dd (16,0, 3,6)	4,95 – 5,20	142,6	143,2	140,7	143,9
6	4,87, ddd (16, 9,9, 1,9)	4,97, dd (16, 10)	4,92, ddd (16,0, 10,0, 2,0)		126,3	123,8	126,3	130,2
7	2,30, ddd (11,6, 9,9, 2,2)	2,23, m (11,4, 10,0, 3,5) ^{xi}	2,21, m	-	58,8	59,0	60,0	58,0
8a	1,57, dddd (-14,1, 5,6, 2,6, 2,2)	1,47, dtd (14, 3,5) ^{xii}	1,72, m	-				
8b	1,26, dddd (-14,1, 13,1, 11,6, 2,3)	1,25, dddd (14, 11,5, 11,4)	1,36, m	-	22,6	23,8	23,4	35,6
9a	2,70, dddddd (-13,2, 5,6, 2,8, 2,3,1,0, 0,8, 0,7)	2,21, m (4, 3,5) ^{xi}	2,21, m	-	36,7	41,4	42,4	28,4
9b	2,14, dddd (-13,2, 13,1, 2,6, 1,0)	2,22, m (11,5, 3,5) ^{xi}	2,31, m	-				
10					133,9	131,2	136,5	131,5
11					72,0	71,8	72,8	71,5
12	1,07, s	1,07, s	1,06, s	1,07, s	26,6	26,4	25,8	22,6
13	1,16, s	1,16, s	1,08, s	1,15, s	26,9	26,9	28,8	26,7
14a	4,42, ddt ^{vii} (-12,0, 1,1, 0,8)	1,55, br ^{xiii}	1,60, brs ^{xiii}	1,53, brs ^{xiii}	61,0	16,8 ^{viii}	17,4 ^{viii}	16,8 ^{viii}
14b	3,90, ddd (-12,0, 1,3, 1,0)							
15	1,09, d (7,0)	1,11, d (7,2)	1,09, d (7,0)	0,90, d (6,7)	14,9	14,8	16,0	26,6
OH-11	1,65 ^{xiii}	/	/	/				
OH-14								

ⁱ $|J| < 0,7$ Hz, konstante kuplovanja nisu navedene u ovoj tabeli, ali su prikazane u prilogu 49. ⁱⁱ Većina protonskih rezonanci na 400 MHz pojavila se kao signali višeg reda i/ili sa regionima preklapljenih signala; predstavljene vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja, uključujući njihov znak, određene su na osnovu manuelne iterativne potpune spinske ^1H -NMR simulacije (Radulović et al., 2019). ⁱⁱⁱ Podaci preuzeti iz rada Genßber et al., 1995. ^{iv} Podaci preuzeti iz rada Guan et al., 2005. ^v Podaci preuzeti iz rada Zhabinskii et al., 1996. ^{vi} Podaci preuzeti iz rada Valle et al., 1986. ^{vii} Pseudomultipliet, kao na primer, dublet dubleta, ali sa dve slične J vrednosti koje bi se verovatno pojavile kao pseudo-triplet. ^{viii} Nije uporedivo: **4** i **A** imaju oksigenaciju u položajima 14 i 2, redom. ^{ix} Ispravljeno iz ddd u td zbog očigledne štamparske greške. ^x Podaci nisu dati u citiranom radu. ^{xi} Rezonance su deo preklapanja i/ili signala višeg reda; (nepotpuna) lista vrednosti konstanti kuplovanja izvedena je iz odgovarajućih, nepreklapajućih signala protona, datih u citiranom radu (Valle et al., 1986; Zhabinskii et al., 1996). ^{xii} U originalnom radu nema konstanti kuplovanja (Valle et al., 1986; Zhabinskii et al., 1996). ^{xiii} Široki signal.

4.3.4. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE *rel*-(1(10))*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA

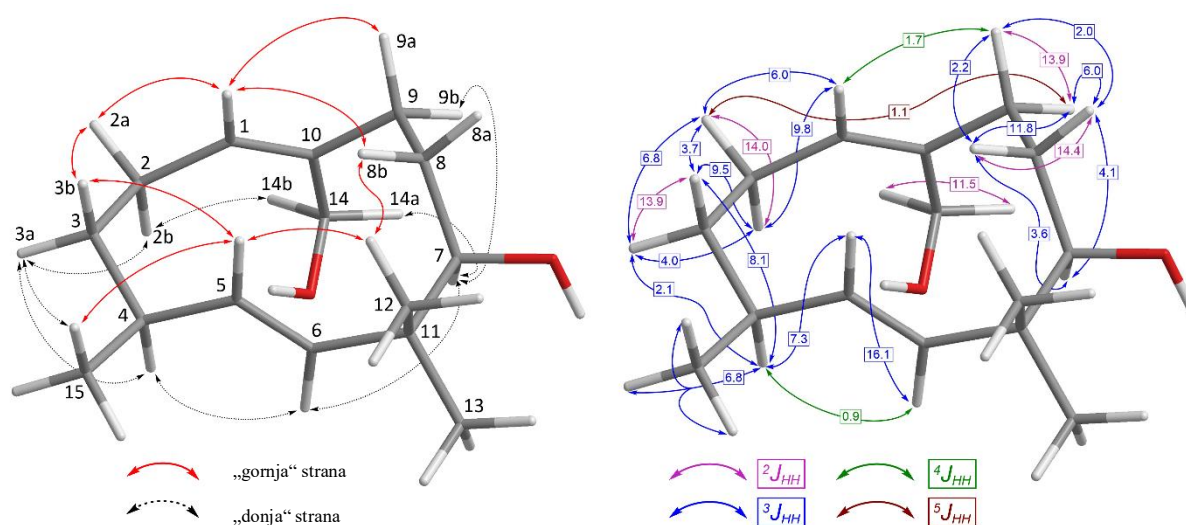
Treće nepoznato jedinjenje (jedinjenje **5**) eluiralo je sa kolone SiO₂ odmah nakon *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola (jedinjenje **4**), i umalo je ostalo neprimećeno zbog skoro neprimetno male razlike u vrednostima RI (oko 2 indeksa), kao i sličnosti MS ovog i jedinjenja **4** (prilog 55). Isti molekulski jon, na *m/z* 238, koji odgovara formuli C₁₅H₂₆O₂ ($\Delta = 0,0008$ amu na osnovu HREIMS) i fragmentni joni na *m/z* 220 i 202 uočeni u MS, ukazuju da jedinjenje **5** takođe predstavlja seskviterpenski diol. ¹³C-NMR (prilog 52), DEPT-90 i DEPT-135 spektri su potvrdili prisustvo 15 neekvivalentnih atoma ugljenika.



Slika 4.3.8. Šema numeracije atoma jedinjenja **5**; Levo: šema numeracije atoma jedinjenja **5** izvedena iz farnezana – (*rel*-(1*E*,3*S*,6*Z*,10*R*)-humula-1,6-dien-10,14-diol; Desno: šema numeracije atoma jedinjenja **5** izvedena iz germakrana – (*rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol, sin. (1*R**,3*E*,5*S**,8*Z*)-9-(hidroksimetil)-2,2,5-trimetilcikloundeka-3,8-dien-1-ol). Germakranski tip numeracije korišćen je prilikom asignacije radi lakšeg poređenja NMR podataka

Prisustvo dve dvostruke veze, jedne trisupstituisane i jedne simetrično disupstituisane, direktno je zaključeno iz postojanja signala četiri sp²-hibridizovana C-atoma, od kojih su tri metinske-grupe C-1, C-5 i C-6, dok je jedan (C-10) bio neprotonovani ugljenik (slika 4.3.8.). Ovo je podržano uočenim protonskim signalima na δ_H 5,12 (H-1), 5,11 (H-5) i 4,98 (H-6) (tabela 4.3.5. i prilozi 50 i 52). Vrednost vicinalne konstante kuplovanja H-5 i H-6 (16,1 Hz) nedvosmisleno ukazuje na *trans*-geometriju ove dvostruke veze. Svih jedanaest preostalih rezonanci odgovaraju sp³-hibridizovanim C-atomima, uključujući dve metinske-grupe, od kojih je jedna oksigenovana (C-7), tri metilenske-grupe, među kojima je jedna vezana za atom kiseonika (C-14) i tri atoma ugljenika metil-grupa (C-12, C-13 i C-15) (slika 4.3.8.).

Dva singleta na δ_H 0,93 i 1,00, kao i jedan dublet na δ_H 0,98 ($J = 6,8$ Hz) potvrđuju prisustvo ove tri metil-grupe (tabela 4.3.5.). Konektivnost jedinjenja **5** zaključena je analizom gHSQC i gHMBC korelacija (prilozi 53, 57 i 58), koja odgovara jedanaestočlanom prstenu sa tri metil-grupe i dve dvostruke veze, što sugerise da ono predstavlja seskviterpenski diol tipa humulana (slika 4.3.8.). NOESY kros-pikovi H-2a/2b i H-14a/14b, kao i H-1 i H-9b (slika 4.3.9., prilog 54) otkrili su Z-konfiguraciju trisupstituisane C-1–C10 dvostruke veze. Ostatak



Slika 4.3.9. Levo: ključne NOESY-interakcije jedinjenja **5** i označavanje diastereotopnih vodonika (germakranski sistem numeracije). Radi jasnoće, NOESY-interakcije atoma vodonika sa jedne strane jedanaestočlanog prstena prikazane su crvenim strelicama, dok su interakcije vodonika sa suprotne strane prikazane isprekidanim strelicama. **Desno:** uočene vrednosti konstanti kuplovanja ($>0,7$ Hz) jedinjenja **5**

određivanja strukture i stereohemije zahtevao je detaljno poznavanje vrednosti 1H - 1H konstanti kuplovanja koje su bile sadržane u višestruko preklapljenim multipletima, koji potiču od četiri diastereotopne CH_2 i dve CH grupe. J vrednosti su, uz dosta napora, dobijene manuelnom iterativnom potpunom spinskom analizom, kao što je ranije opisano (Radulović et al., 2019). Podaci iz simuliranog 1H -NMR spektra dati su kako u tabeli 4.3.5 i slici 4.3.9., tako i u prilogima 50 i 51.

Niz konstanti kuplovanja vrednosti 7-10 Hz, počevši od H-1 i završavajući sa H-5, sugerise da je konformer jedinjenja **5**, nalik na stolicu, dominantan u konformacionoj ravnoteži, sa metil-grupom na C-4 u pseudoekvatorijalnoj poziciji. Ovo je dodatno potkrepljeno uočenim NOESY-interakcijama H-5 sa H-3b i H-15, kao i H-4 sa H-6 (slika 4.3.9.). Vrednosti dve male

vicinalne konstante kuplovanja od oko 4 Hz dobro se slažu sa konformacijom samo jednog diastereoizomera jedinjenja **5**, i to onog koji poseduje *rel*-(4*S*,7*R*)-konfiguraciju, dok konformacija epimera na C-7 zahteva veliku konstantu kuplovanja između H-7 i H-8b (oko 10 Hz, slika 4.3.9.). Podudarnost NMR podataka poznatog jedinjenja (Asakawa et al., 2008; Toyota et al., 2004), nedvosmisleno utvrđene konfiguracije, sa dobijenim podacima jedinjenja **5** (tabela 4.3.5.), potvrđuje predloženu relativnu konfiguraciju na C-4 i C-7 stereocentrima. Dakle, jedinjenje **5** predstavlja *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol (germakranski sistem numeracije), što je novi prirodni proizvod (slika 4.3.8.).

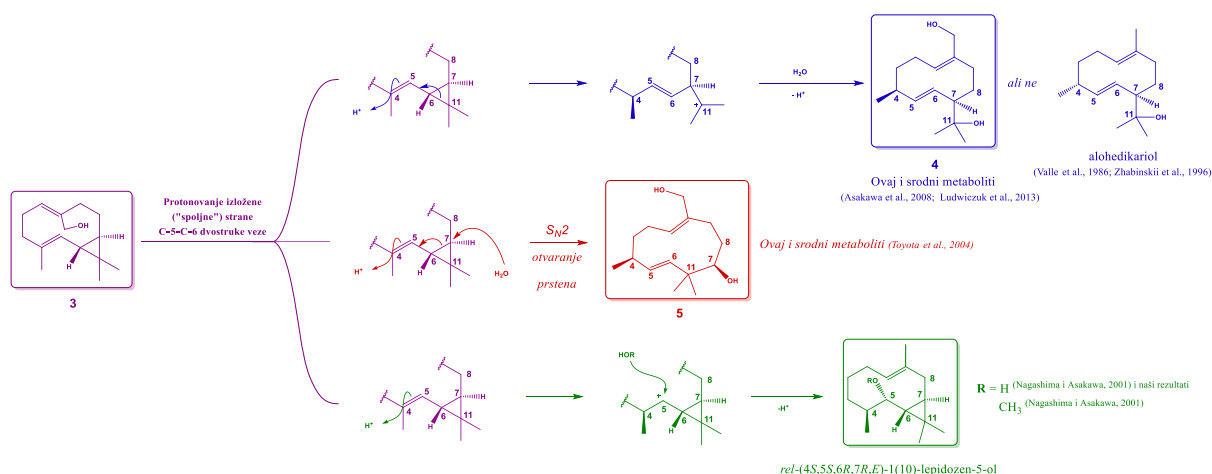
Tabela 4.3.5. ¹H (400 MHz) i ¹³C (100,6 MHz) NMR spektroskopski podaci jedinjenja **5** (hloroform-*d*) i 1,6-humuladien-10-ola (Asakawa et al., 2008; Toyota et al., 2004)

položaj	δ_H , m (J, Hz) ^a		δ_C	
	jedinjenje 5 ^b	1,6-humuladien-10-ol	jedinjenje 5	1,6-humuladien-10-ol
1	5,12, ddd (10,2, 6,0, 1,7)	5,15, dd (16,7)	133,2	127,2 ^c
2a	2,27, dddd (-14,0, 9,5, 6,0, 4,0)	- ^d	26,7	27,1
2b	2,25, dddd (-14,0, 10,2, 6,8, 3,7, 1,1)			
3a	1,64, dddd (-13,9, 6,8, 4,0, 2,1)	-	36,2	35,7
3b	1,45, dddd (-13,9, 9,5, 8,1,3,7)	-	38,4	38,3
4	2,17, ddd (7,3, 6,8, 0,9)	-	38,4	38,3
5	5,11, ddd (16,1, 7,3, 0,6)	5,05, dd (16,0)	136,0	136,8
6	4,98, dd (16,1,0,9)	4,95, bt (7,0)	135,9	133,8
7	3,19, dd (4,1, 3,6)	3,18 br s	80,4	80,4
8a	1,79 dddd (-14,4, 11,8, 3,6, 2,2)	-	33,6	32,7
8b	1,51 dddd, (-14,4, 6,2, 4,1, 2,0)			
9a	2,28, dddd (-14,7, 6,2, 2,2, 1,7, 1,1)	-	30,3	35,7 ^c
9b	2,04, ddd (-14,7, 11,8, 2,0)			
10			133,9	132,7 ^c
11			40,4	40,4
12	0,93, s	0,94, s	19,0	18,9
13	1,00, s	1,02, s	26,6	26,7
14a	4,15, d (-11,5)	1,58, d (1,0) ^c	62,4	19,6 ^c
14b	3,98, d (-11,5)			
15	0,98, d (7,0)	0,98, d (7,0)	20,7	20,6
OH-7	1,83 ^e	-		
OH-14				

^a $|J| < 0,7$ Hz, konstante kuplovanja nisu prikazane u ovoj tabeli već u prilogu 50. ^b Većina protonskih rezonanci na 400 MHz pojavila se kao signali višeg reda i/ili sa regionima preklapanja signala; predstavljene vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja, uključujući njihov znak, određene su na osnovu manualne iterativne pune ¹H-NMR spinske simulacije (Radulović et al., 2019). ^c Nije uporedivo: jedinjenje **5** ima OH-grupu na položaju 14. ^d Podaci nisu dati. ^e Široki signal.

4.3.5. (BIO)HEMIJSKA POVEZANOST NOVOIDENTIFIKOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE *C. CONICUM*

Nakon što smo razjasnili strukture nepoznatih jedinjenja: (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol (jedinjenje **3**), *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol (jedinjenje **4**) i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol (jedinjenje **5**), i razmotrili njihove glavne konformere, primetili smo verovatnu (bio)hemijsku vezu koja postoji između ovih metabolita. Može se logički zamisliti mehanistički put koji počinje od (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola i daje *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol ili *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol (slika 4.3.10.). *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-Germakra-1(10),5-dien-11,14-diol i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol mogu poticati od adicije jednog molekula vode na (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol, odnosno njegove hidratacije koja uključuje dvostruku vezu C-4–C-5 i ciklopropanski prsten. Čini se da dvostruka veza i tročlani prsten formiraju konjugovani sistem (Smith i March, 2006) za koji se, aktiviran protonovanjem na C-4, očekuje da reaguje na tri moguća načina: dva obuhvataju otvaranje ciklopropanskog prstena putem cepanja ili C-6–C-7, ili C-6–C-11 veza, dok jedan od načina čuva tročlani prsten, ali dovodi do 1,2-adicije na C-4–C-5 dvostruku vezu sa anti-Markovnikovljevom regiohemijom (slika 4.3.10.). Prostorni raspored dvostruke veze



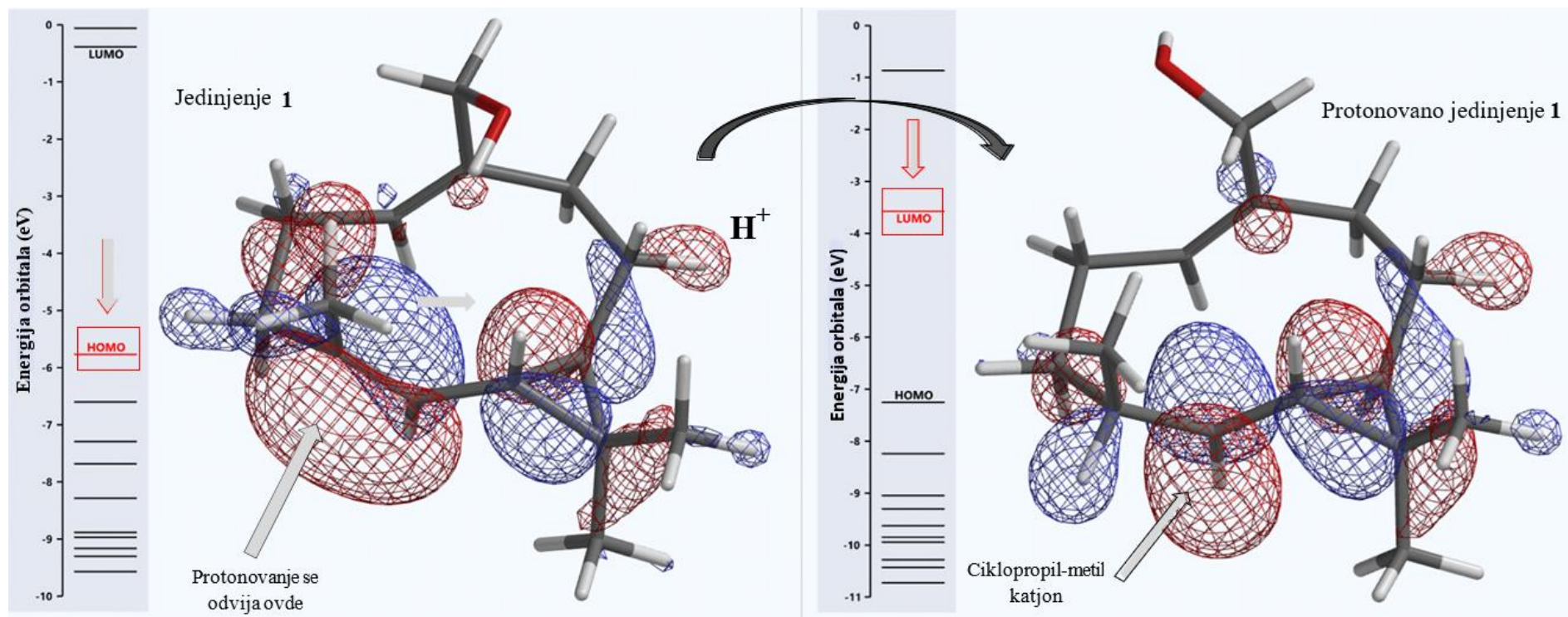
Slika 4.3.10. Predložena (bio)hemijska povezanost između jedinjenja 3-5

C-4–C-5 prema ciklopropil-grupi u (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-olu odgovara maksimalnom preklapanju između π -sistema dvostruke veze i „savijenih“ orbitala (C-6–C-7 i C-6–C-11 veze) tročlanog prstena (Smith i March, 2006).

Protonovanje na više supstituisanom C-atomu C-4–C-5 dvostruke veze dovodi do formiranja stabilnog karbkatjona konjugovanog sa ciklopropil-grupom (Smith i March, 2006). Ovo protonovanje takođe menja LUMO koeficijent na C-7 i C-11 (slika 4.3.11.), čineći prsten podložnim formiranju tercijarnog karbkatjona na C-11, cepanjem veze C-6–C-11, ili nukleofilnim napadom na C-7 (slika 4.3.10.). Kvenčovanje C-11 katjona, germakril-tipa, molekulom vode, praćeno deprotonovanjem, rezultira formiranjem jedinjenja **4** (slike 4.3.10. i 4.3.11.). Pomenuta konformacija, sa H-5 i H-6 koji su antiperiplanarni, diktira *trans*-geometriju novoformirane C-5–C-6 dvostruke veze jedinjenja **4**, dok početno protonovanje jedinjenja **3**, na „spoljnoj“, nezaklonjenoj strani, određuje konfiguraciju na C-4 sa pseudoaksijalnom metil-grupom, u odnosu na pseudoekvatorijalni supstituent na C-7. Ova stereohemijska transformacija je vidljiva u stereohemiji *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola.

Napad H₂O S_N2-tipa na protonovano jedinjenje **3**, na manje zaklonjeni položaj C-7, dovodi do otvaranja tročlanog prstena i promene konfiguracije na C-7, pretvarajući lepidozenski u humulanski skelet (slika 4.3.10.). Relativne konfiguracije na C-4 i C-7, i očekivana *trans*-geometrija dvostruke veze C-5–C-6, potvrđene su u *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diolu (jedinjenje **5**). Bitno je skrenuti pažnju da su kao treći tip proizvoda molekula izolepidozenske strukture, nastalih u slučaju protonovanja dvostruke veze C-4–C-5 i formiranja katjona na C-5 uz njegovo naknadno kvenčovanje od strane H₂O ili MeOH, u literaturi navedeni i *rel*-(4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,*E*)-1(10)-lepidozen-5-ol i njegov O-metil-etar (slika 4.3.10.), identifikovani od strane *Nagashimae* i *Asakawae* (Nagashima i Asakawa, 2001). Relativna konfiguracija centara na C-4 i C-5 sugerise *sin*-adiciju, što se i očekuje od katjonskog mehanizma sa intraanularno zaklonjenom dijastereotopnom stranom C-5 katjona (slika 4.3.10.).

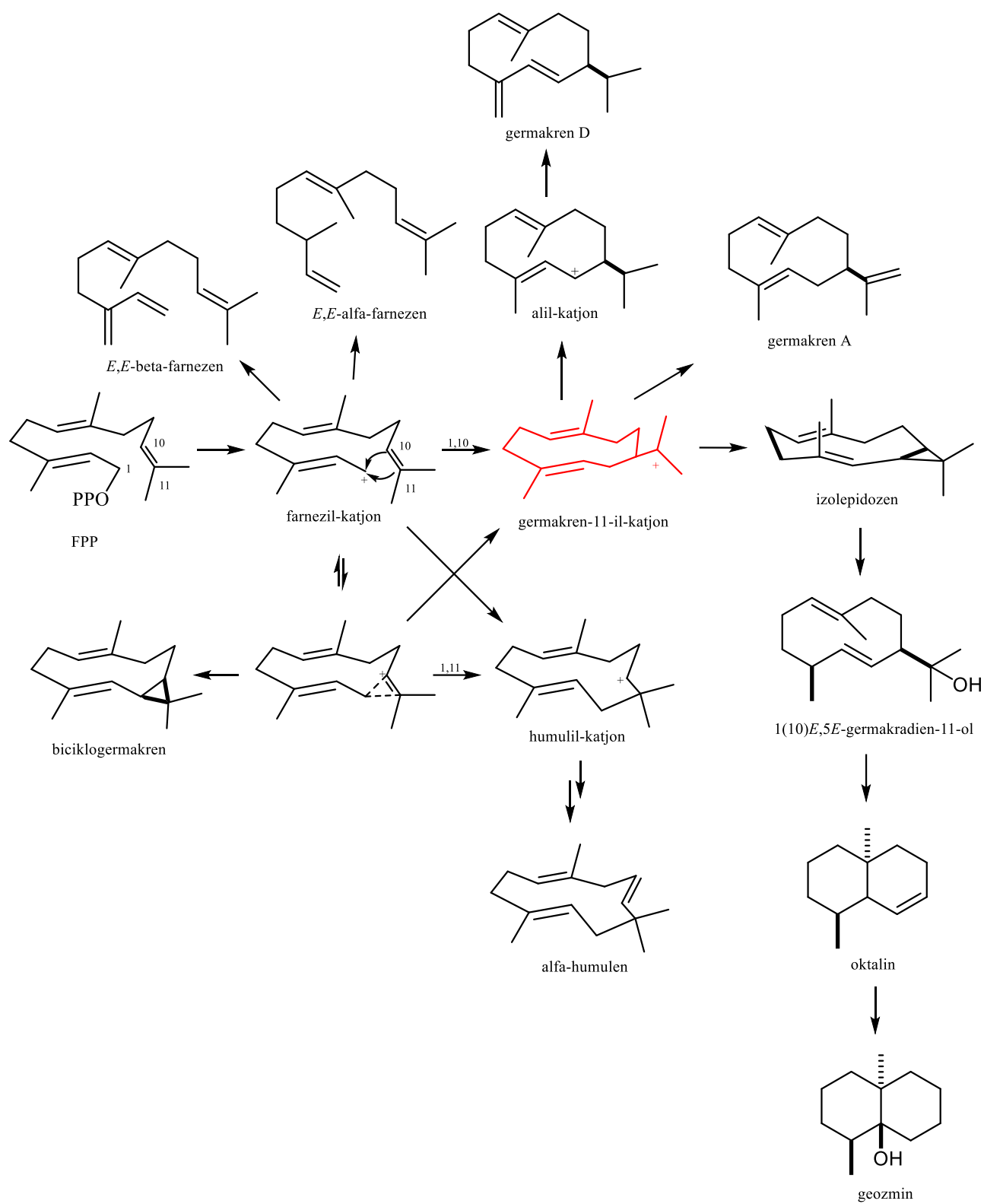
Kako bi se opisane hemijske interkonverzije mogle smatrati čisto hemijskim, bez uključivanja enzima, pretražili smo literaturu za biosintetski put koji međusobno povezuje srodna jedinjenja kao što je (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ol povezan sa *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diolom i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diolom. Zanimljivo je istaći da jedan enzim iz vrste roda *Streptomyces* međusobno povezuje visoko srodne derivate izolepidozena i germakrena sa geozminom



Slika 4.3.11. Levo: HOMO-orbitala jedinjenja 3 (izolepidozen-14-ol) sa verovatnim mestom protonovanja. Desno: LUMO-orbitala intermedijera, protonovano jedinjenje 3, koja predviđa moguću reaktivnost/mesta za nukleofilni napad koji dovodi do formiranja jedinjenja 4 i 5. Detalji proračuna su dati u prilogu 59

(Cane et al., 2006; Jiang et al., 2007). Germakradienol-geozmin sintaza je bifunkcionalni enzim sa dva nezavisna aktivna mesta, od kojih svako ima različite katalitičke funkcije. *N*-Terminalna polovina ovog proteina pretvara farnezil-difosfat (FPP) (univerzalni aciklični prekursor seskviterpena, slika 4.3.12.) u germakradienol (slika 4.3.12.) i germakren D (slika 4.3.12.) (85:15). Nakon toga, germakradienol se oslobađa u medijum i ponovo vezuje za aktivno mesto C-terminalnog domena, koje katalizuje njegovu kiselo-katalizovanu ciklizaciju-fragmentaciju do geozmina (slika 4.3.12.) (Jiang et al., 2007). Serija studija (Cane et al., 2006; He i Cane, 2004; Jiang et al., 2006; 2007; Jiang i Cane, 2008) pokazala je da biosinteza geozmina počinje uobičajenim C-11 germakril-katjonom (slika 4.3.12.) na aktivnom mestu „1”, nastavljajući preko derivata izolepidozena (slika 4.3.12.). Ovaj derivat se transformiše, na način sličan onom predloženom za konverziju (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola u *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol (slika 4.3.10.), u novi derivat germakrana, 1(10)*E*,5*E*-germakradien-11-ol (slika 4.3.12.), koji poseduje migriranu dvostruku vezu, sa C-4–C-5 na C-5–C-6, i C-11 alkoholnu grupu. Zatim se dešava oksidativna degradacija do trinorseskviterpena, geozmina (slika 4.3.12.), na drugom aktivnom mestu istog enzima. Kada su izvedeni eksperimenti mutacije, koja je izbrisala drugo aktivno mesto enzima, dobijen je očekivani proizvod, izolepidozen (slika 4.3.12.).

Pretpostavlja se da u kompleksu *C. conicum* postoji enzim sličan onom iz *S. coelicolor* (Cane et al., 2006; He i Cane, 2004; Jiang et al., 2006; 2007). Međutim, njegovo delovanje se razlikuje po glavnom ishodu tj. stvaranju (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola, derivat izolepidozena, i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola, specifičnog derivata germakrana, što ukazuje na postojanje aktivnog mesta „1”. Aktivno mesto „2”, odgovorno za formiranje geozmina (slika 4.3.12.), može biti odsutno ili mutirano. Ovo je podstaklo potragu za geozminom među metabolitima *C. conicum* koristeći i podatke *Ludwiczuk* i saradnika (*Ludwiczuk et al.*, 2013a). U skladu sa objašnjenjem u odeljku Rezultati i diskusija 4.3.1. izvedena je detaljna analiza Et₂O-ekstrakata *C. conicum* (CC1– CC5, pomoću GC-MS (pošto se geozmin i većina srodnih metabolita smatraju dovoljno isparljivim), čiji rezultati jasno pokazuju odsustvo geozmina (tabela 4.3.1.). Iako nijedan uzorak nije sadržao geozmin, miris svih Et₂O-ekstrakata bio je izrazito zemljani, što sugerise da je geozmin možda prisutan u količinama manjim od praga detekcije. Otežana detekcija je u skladu sa činjenicom da, uprkos tome što geozmin proizvodi veliki broj



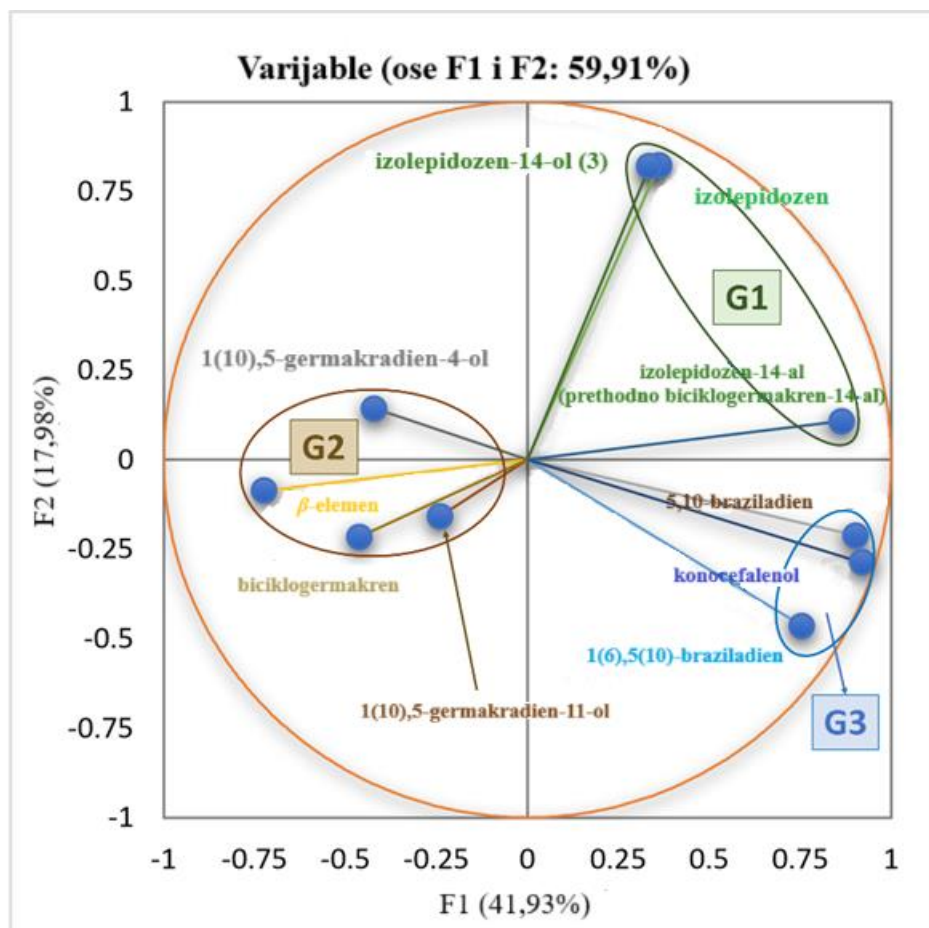
Slika 4.3.12. Prikaz odabranih, literaturno dostupnih, sekundarnih metabolita poreklom od germakradien-11-il-katjona (Dickschat et al., 2014; Gonzalez et al., 2014; Jiang et al., 2007)

organizama (neki od predstavnika bakterija, gljiva, viših biljaka, uključujući jetrenjače), on dokazano ima posebno nizak prag detekcije, od 10.100 delova na milijardu milijardi. Nakon istraživanja koje su sprovedi *Berthelot* i *André* (*Berthelot* i *André*, 1891), više od 800 radova posvećeno je proučavanju proizvodnje, detekcije i remedijacije geozmina. Pored njegove biološke i hemijske važnosti, on je i ekonomski relevantan jer utiče na kvalitet hrane pošto je utvrđena povezanost geozmina sa nepoželjnim ukusima u vodi za piće, vinu, ribi i drugim namirnicama (*Berthelot* i *André*, 1891; *Darriet et al.*, 2000; *Heil* i *Lindsay*, 1988; *Spiteller et al.*, 2002). U okviru naših istraživanja, u pokušaju da se ukoncentruje isparljivi geozmin, izvršena je hidrodestilacija veće količine svežeg materijala *C. conicum* pomno očišćenog od zemljišta. Uzorak dobijenog etarskog ulja sadržao je geozmin, ali samo 0,1%. Zaključujemo da enzim koji pretvara izolepidozene u geozmin preko germakrana može biti prisutan u *C. conicum* (prilog 56) čime se povećava potencijalni značaj ove vrste.

Motivisani prethodnom koizolacijom deoksi-derivata jedinjenja **4** i **5**, germakra-1(10),5-dien-11-ola i humula-1(10),5-dien-7-ola (*sin.* humula-1,6-dien-10-ol), iz vrste *C. japonicum* (*Asakawa et al.*, 2008) (sada *S. japonica*), i sa ciljem istraživanja moguće kvantitativne veze između identifikovanih sastojaka, izveli smo multivarijantnu statističku analizu podataka o sastavu sekundarnih metabolita (*Radulović et al.*, 2014). Uporedna statistička analiza hemijskog sastava dietil-etarskih ekstrakata biljne vrste *C. conicum*, dobijenih u našim istraživanjima, sa podacima koje su analizirali *Ludwiczuk* i saradnici (*Ludwiczuk et al.*, 2013a), urađena je pomoću analize glavnih komponenti (PCA) i aglomerativne hijerarhijske klaster analize (AHC). Za obe metode korišćen je procentualni sadržaj sastojaka (>1%; AHC- α i PCA- α) kao varijable, a rezultati su prikazani na slikama 4.3.13. i 4.3.14.

Analize glavnih komponenti (PCA) prvobitno su rađene korišćenjem svih identifikovanih jedinjenja kao varijabli, a zatim smanjenjem njihovog broja na osnovu njihove relativne zastupljenosti, logičke biohemijske povezanosti i relevantnosti za ove uzorke. Ovo smanjenje podataka na kraju je dovelo do toga da prve dve glavne komponente objašnjavaju oko 60% varijanse uzorka, sugerišući pouzdanu klasifikaciju. Na grafikonu (*biplot*, glavne komponente F1 i F2) prikazanom na slici 4.3.13. uočava se grupisanje derivata izolepidozena G1, (biciklo)germakrana G2 i brazilana G3, što implicira verovatnu biosintetičku vezu unutar ovih grupa. Biciklogermakren-14-al (tokom naše analize korigovan u izolepidozen-14-al, kao što je

sugerisano u delu Rezultati i diskusija 4.3.2.) koji se pojavljuje u radu *Ludwiczuk* i saradnika (Ludwiczuk et al., 2013a), smešten je u grupu G1 zajedno sa drugim derivatima izolepidozena, čime se još jednom potvrđuje njegov identitet (slika 4.3.13.).



Slika 4.3.13. Analize glavnih komponenti (PCA) za 19 uzoraka (ovde analiziranih (CC1-CC5) i podataka iz rada *Ludwiczuk* i saradnika (A1, A2, F1, F2, J1, J2, L1-L4, PA, S1-S4) (Ludwiczuk et al., 2013a)) dietil-etarskog ekstrakta *C. conicum*

Takođe, razdvajanje grupa G1 i G2 implicira divergentno biosintetičko poreklo ovih, na prvi pogled, blisko povezanih seskviterpena. Iako bi se očekivalo da je germakra-1(10),5-dien-11-ol (slika 4.3.12.) bliže povezan sa grupom G1 (slika 4.3.13.), svrstan je u grupu G2, što sugerise da se on može formirati i od drugih bicikličnih prekursora. Analiza je prepoznala i β -elemen kao artefakt, koji nastaje usled toplotno indukovano Cope-ovog premeštanja biciklogermakrena

(prilog 34), sa ostalim germakranima u grupi G2. Pored toga, konocefalenol i njegovi dehidratacioni proizvodi, braziladieni, izdvojeni su u grupu G3.

Tabla 4.3.6. Pirsonova korelaciona matrica odabranih metabolita *C. conicum*

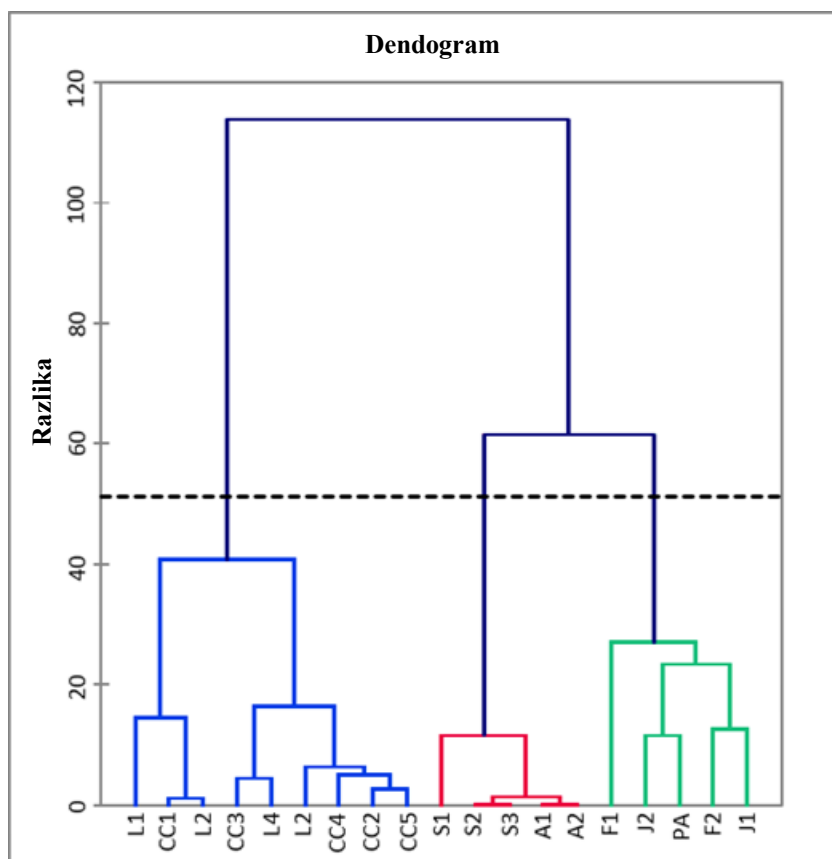
Varia ^a	5,10-braziladien	β -elemen	1(6),5(10)-braziladien	izolepidozen	konocefalenol	biciklogermakren	1(10),5-germakradien-14-ol	1(10),5-germakradien-11-ol	1,10-izolepidozadien-14-al	1,10-izolepidozadien-14-ol
5,10-braziladien	1	-0,508	0,696	0,224	0,912	-0,220	-0,311	-0,300	0,841	0,049
β -elemen	-0,508	1	-0,417	-0,218	-0,570	-0,007	0,446	0,542	-0,453	-0,311
1(6),5(10)-braziladien	0,696	-0,417	1	-0,088	0,849	-0,161	-0,245	-0,210	0,590	-0,052
izolepidozen	0,224	-0,218	-0,088	1	0,146	-0,209	0,035	-0,237	0,415	0,673
konocefalenol	0,912	-0,570	0,849	0,146	1	-0,235	-0,349	-0,326	0,736	0,063
biciklogermakren	-0,220	-0,007	-0,161	-0,209	-0,235	1	-0,104	-0,009	-0,185	-0,135
1(10),5-germakradien-14-ol	-0,311	0,446	-0,245	0,035	-0,349	-0,104	1	-0,036	-0,262	-0,185
1(10),5-germakradien-11-ol	-0,300	0,542	-0,210	-0,237	-0,326	-0,009	-0,036	1	-0,253	-0,188
1,10-izolepidozadien-14-al	0,841	-0,453	0,590	0,415	0,736	-0,185	-0,262	-0,253	1	0,395
1,10-izolepidozadien-14-ol	0,049	-0,311	-0,052	0,673	0,063	-0,135	-0,185	-0,188	0,395	1

^aVrednosti prikazane masnijim slovima razlikuju se od 0 sa nivoom značajnosti $\alpha > 0,05$.

Pirsonova korelaciona matrica pokazala je jake pozitivne korelacije između izolepidozena i izolepidozen-14-ola (jedinjenje **3**), kao i izolepidozen-14-ala (tabla 4.3.6.), što verovatno potiče od hemoselektivne oksidacije izolepidozena. Nažalost, pošto su *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol (jedinjenje **4**) i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol (jedinjenje **5**) pre ovog rada bili nepoznati, nisu mogli biti uključeni u ovu analizu, a njihova biohemijska veza sa ostalim metabolitima nije ispitana na ovaj način.

Koristeći iste varijable, aglomerativna hijerarhijska klaster analiza (AHC) pokazala je grupisanje uzoraka (slika 4.3.14.) na način istovetan onom koji su prethodno objavili *Ludwiczuk* i saradnici (*Ludwiczuk et al.*, 2013a). U dendogramu dobijenom klaster analizom, vidi se da se uzorci (**CC1–CC5**) zajedno sa ostatkom uzoraka *C. conicum* (L1-L4) evropskog porekla, nalaze unutar iste grupe (klade), grupe I. U okviru ove evropske, najbrojnije grupe, moglo se uočiti dodatno grupisanje u podgrupe (slika 4.3.14.) na osnovu razlika u relativnim količinama

konocefalenola i izolepidozena, čineći ova dva jedinjenja glavnim hemotaksonomskim markerima evropske zmijske jetrenjače. Unutar L1-L4, uz gorepomenuta jedinjenja izolepidozen (3,4-12,9%) i konocefalenol (1,9-11,2%), nalazila se značajna količina sabinena (16,1- 17,5%), dok je u CC1-CC5 količina sabinena bilo znatno manja, od 1,7 do 6,9% (Rezultati i diskusija 4.3.1., tabela 4.3.1.). Drugu, najmanje brojnu grupu II dobijenu AHC-analizom činili su uzorci *C. conicum* prikupljeni iz Kine, SAD i Poljske. U S1, poreklom iz Kine, i S2 i S3 iz Poljske, uz sabinen (10,3-22,1%) dominirale su izražene količine kubebola (14,2-20,4%), 1,(10),5-germakradien-4 α -ola (3,2-8,8%) i 1-*epi*-kubebola (2,4-5,1%). S1 se po sastavu 22,7% sekundarnih metabolita pokazao



Slika 4.3.14. Dendrogram (AHC-analiza; procenti sastojaka koji se koriste kao varijable) koji predstavlja odnose razlika hemijskog sastava 19 upoređenih uzoraka dietil-etarskih ekstrakata *C. conicum* dobijenih euklidskim razlikama (kriterijum agregacije – Ward-ova metoda)

primetno drugačijim u odnosu na S2 i S3, posedujući 10,0% aristola-1(10),8-diena, 7,2% nardošina-7,9,11-triena i 5,5% izolepidozena, smeštajući ga u posebnu podgrupu. S2 i S3 su smešteni u istu podgrupu sa A1-A2 (slika 4.3.14.), a međusobna sličnost ogleda se u prisustvu 1-*epi*-kubebola i kadina-1,4-diena. Hemijska sličnost na osnovu prisustva β -kariofilena, germakrena D i ciklokolorenona odvaja uzorke poreklom iz Japana, F i J, u posebnu grupu III. Ciklokolorenon (41,4%) bio je najdominantniji sastojak ekstrakta F1 uz sabinen (13,8%) i α -gurjunen (9,1%), dok je u F2 dominirao germakren D (22,4%), praćen 1-okten-3-il-acetatom (19,0%) i sabinenom (16,6%). U J2 su uz sabinen (25,0%) dominirali presilfiperfolan-9 α -ol (7,6%) i biciklogermakren (4,8%), koji nisu bili prisutni u J1. Takođe, 1(10),4-germakradien-12-al je detektovan isključivo u uzorku J2 (Ludwiczuk et al., 2013a).

Na osnovu gore navedenog, jasno je da ekološko-geografski faktori utiču na biosintezu sekundarnih metabolita, a moguća je i varijabilnost u aktivnosti enzima odgovornih za sekundarni metabolizam biljaka. Vredi napomenuti da primećena veza između (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-dien-14-ola, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diola, koja ukazuje da derivat izolepidozena može biti tačka grananja za humulane i germakrane, predstavlja novi biosintetski put koji bi mogao da funkcioniše paralelno sa prihvaćenim (farnezil-katjon ciklizuje do humulil-katjona (slika 4.3.12.)) (Croteau i Gundy, 1984; Yu et al., 2008). Slična veza između biciklogermakrena i humulena je ranije sugerisana (Gonzalez et al., 2014) (slika 4.3.12.). Ova transformacija bi mogla biti i od sintetičkog značaja.

4.3.6. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *C. CONICUM*

Analizirani su uzorci etarskih ulja vrste *C. conicum* koja je bila prikupljena na dve lokacije u Srbiji. U martu 2016. godine, izvršena su tri prikupljanja svežeg biljnog materijala jetrenjače *C. conicum* (oznake SF-COK, SF-COK1 i SF-COK2) u šumskom području sela Veliki Kupci, nakon čega je pristupljeno hidrodestilaciji prema metodologiji opisanoj u odeljku 3.4.2. Eksperimentalni deo. Prinosi tri izvedene hidrodestilacije kretali su se od 0,02 do 0,03% (v/v). Nakon GC-MS analize uočeno je prisustvo jedinjenja **3**, prethodno detektovanog u dietil-etarskim ekstraktima *C. conicum* (videti odeljak 4.3.1. Rezultati i diskusija), dok prisustvo jedinjenja **4** i **5** nije zabeleženo.

Rezultati detaljne GC-MS analize etarskog ulja su predstavljani u tabeli 4.3.7. Identifikovano je 53 sastojka koji čine 94,9% analiziranog ulja, pri čemu su terpeni bili dominantna klasa sa 49 jedinjenja: 44,3% monoterpena i 45,0% seskviterpena. Tokom marta iste godine, prikupljen je i biljni materijal *C. conicum* iz Jelašničke klisure, čijom je hidrodestilacijom dobijeno 0,04% etarskog ulja (oznake SF-CON). U njemu je identifikovan 51 sastojak, čineći 87,6% analiziranog ulja, ali jedinjenja **3**, **4** i **5** nisu detektovana (tabela 4.3.7.). Ova razlika dodatno potvrđuje uticaj lokacije ili ekotipa na sastav etarskog ulja.

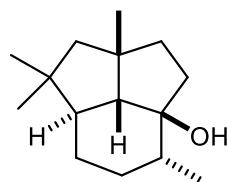
U sklopu 20 identifikovanih monoterpena u SF-COK znatno su dominantniji bili neoksigenovani, s obzirom da je njih dvanaest činilo 40,7% analiziranog etarskog ulja. Nasuprot tome osam detektovanih oksigenovanih monoterpena predstavljali su samo 3,6% etarskog ulja. Među njima terpinen-4-ol, *cis*-sabinen-hidrat i *trans-p*-ment-2-en-1-ol zauzimali su 1,9%, 1,5% i 0,2%, redom, dok su ostali bili prisutni samo u tragovima (tabela 4.3.7.). U skladu sa očekivanjem, sabinena (28,0%) je bio dominantan sastojak, što se slaže sa rezultatima analize dietil-etarskih ekstrakata *C. conicum* istog porekla (tabela 4.3.1.). Limonen (2,9%), β -mircen (1,7%), kamfen, β -pinen i γ -terpinen (svi po 1,8%) predstavljali su dominantne neoksigenovane monoterpe, dok su ostali monoterpeni činili ili manje od jednog procenta, ili su bili zastupljeni u tragovima (tabela 4.3.7.). Sa druge strane, u etarskom ulju SF-CON, sabinen i limonen bili su prisutni samo u tragovima. U ovom uzorku identifikovano je petnaest monoterpena (7%) (tabela 4.3.7.), što je znatno manje u odnosu na njihov udeo u SF-COK (44,3%). Šest neoksigenovanih monoterpena SF-CON prisutni su samo u tragovima, dok je među devet oksigenovanih bio dominantan terpinen-4-ol (3%) uz *cis*-sabinen-hidrat (1,7%). Ovi rezultati su u skladu sa onim dobijenim analizom etarskog ulja *C. conicum* iz Velikih Kupaca (tabela 4.3.7.).

Seskviterpen sa vrednošću retencionog indeksa od 1300 jedinica u analiziranim etarskim uljima predstavljao je jedinjenje brazilanskog skeleta, brazila-1,10-dien (0,7% i 0,6%) (slika 2.2.1., tabela 4.3.7.), što je u skladu sa prisustvom velike količine koncefalenola ((1*R*,9*S*)-brazila-5-en-10-ol) u kriptičnoj vrsti “L” (slika 4.3.1) (Szweykowski et al., 2005) (Opšti deo 2.4.). U uzorku SF-COK, među 18 identifikovanih neoksigenovanih seskviterpena (18,1%) najzastupljeniji su bili izolepidozen (4,6%), brazila-5,10-dien (4,3%), brazila-1(6),5(10)-dien (3,1%) i brazila-5(10),6-dien (1,7%) jasno potvrđujući dominaciju brazilana i pripadnost gorepomenutoj kriptičnoj vrsti (slike 2.4.3 i 2.4.5.). Dominantni neoksigenovani seskviterpeni u SF-CON su takođe sadržali

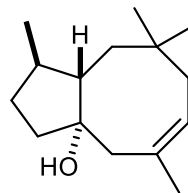
jedinjenja brazilanskog skeleta, sa brazila-1(6),5(10)-dienom (5,4%), brazila-5,10-dienom (4%), brazila-5(10),6-dienom (1,8%) i izolepidozenom (3,8%) kao dominantnim sastojcima. Međutim, primećena je značajna razlika u gotovo devetostruko većem prisustvu aristola-1(10),8-diena (tabela 4.3.7.). Nardošina-7,9,11-trien, detektovan u analiziranim dietil-etarskim ekstraktima *C. conicum* (od tragova do 2,9%) (Rezultati i diskusija 4.3.1.) činio je samo 0,4% etarskog ulja uzoraka iz Velikih Kupaca. Nasuprot tome, u SF-CON nardošina-7,9,11-trien predstavljao je jedan od dominantnijih neoksigenovanih seskviterpena (2,7%). Ostali identifikovani neoksigenovani seskviterpeni etarskog ulja jelašničkih uzoraka *C. conicum* podrazumevali su još njih 12 (6,6%) (tabela 4.3.7.).

Pored koncefalenola, koji je činio nešto više od petnaest procenata (15,4%) etarskog ulja SF-COK (tabela 4.3.7.), identifikovano je još 10 oksigenovanih seskviterpena, koji su ukupno obuhvatali 26,9% uzorka. Među njima značajniji udeo imali su persilfiperfolan-1-ol (3%) i daktilol (2,7%), praćeni sa još dva jedinjenja lepidozanskog skeleta: *rel*-(4*S*,5*S*,6*R*,7*R*)-1(10)-lepidozen-5-ol (1,1%) i izolepidozen-14-al (1,1%), kao i jednim germakranskog, (*E,E*)-1(10),5-germakradien-11-ol (2,5%) (slika 4.3.15.). Sličan sadržaj dominantnog koncefalenola (17,2%) u uzorku SF-CON, praćen je znatno višim sadržajem (1(10)*E*,5*E*)-1(10),5-germakradien-11-ola (7,3%), kao i većim udelima izolepidozen-14-ala (6,8%), persilfiperfolan-1-ola (4,3%) i daktilola (4,0%). Ove razlike u relativnom sadržaju izolepidozen-14-ala i (1(10)*E*,5*E*)-1(10),5-germakradien-11-ola između analiziranih etarskih ulja mogu ukazivati na razlike u biosintezi sekundarnih metabolita (slika 4.3.12.).

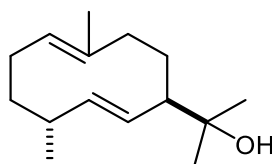
Izolepidozen-14-ol (jedinjenje **3**), zabeležen odmah nakon izolepidozen-14-ala (tabela 4.3.7.), predstavljao je 1% etarskog ulja *C. conicum* iz V. Kupaca (SF-COK) dok, kao što je rečeno, u etarskom ulju SF-CON nije detektovano među trinaest identifikovanih oksigenovanih seskviterpena (44,7%). Sklono je spekulisanju da bi se razlike u procentualnom prisustvu, ili odsustvu, jedinjenja izolepidozanskog i germakranskog skeleta unutar analiziranih etarskih ulja (tabela 4.3.7.) mogle povezati kako sa predloženim, tako i poznatim putem njihove biosinteze objašnjenim u delu 4.3.5. Rezultata i diskusije (slike 4.3.10. i 4.3.12.). Ovo bi potencijalno objasnilo i odsustvo izolepidozen-14-ola (jedinjenje **3**) u etarskom ulju *C. conicum* iz Jelašničke klisure.



persilfiperfolan-1-ol



daktilol



(1(10)*E*,5*E*)-1(10),5-germakradien-11-ol

Slika 4.3.15. Odabrani sekundarni metaboliti etarskog ulja *C. conicum*

Takođe, zabeležena su i četiri prethodno spomenuta „green leaf“ derivata (Rezultati i diskusija 4.3.1). Prisustvo 1-okten-3-il-acetata potvrđeno je u svim analiziranim ekstraktima (tabela 4.3.1.), ali je njegova procentualna zastupljenost u etarskom ulju bila znatno veća (5,4%, 2,1%) (tabela 4.3.7.). Količina 3-oktil-acetata i 3-oktanola u uzorcima dietil-etarskih ekstrakata **CC4** i **CC5**, kao i analiziranih etarskih ulja *C. conicum*, bila je veoma slična, dok uzorci **CC1**, **CC2** i **CC3** nisu sadržali ovo jedinjenje ni u tragovima. 1-Okten-3-ol detektovan je u etarskom ulju biljnog materijala iz Jelašničke klisure, kao i u ekstraktima **CC3**, **CC4** i **CC5**, ali samo u tragovima. Ostali „green leaf“ derivati detektovani u dietil-etarskim ekstraktima ove jetrenjače nisu bili prisutni ni u jednom analiziranom etarskom ulju.

Do sada se sedam radova bavilo hemijskim sastavom etarskog ulja *C. conicum* (Andersen et al., 1977; Joshi et al., 2000; Lu i Lou, 2004; Melching et al., 1999; Melching i König, 1999; Suire i Burgeois, 1977; Valterová et al., 1992), od kojih se četiri odnosi na uzorke ove vrste evropskog porekla.

Prvi objavljeni rad, od strane Suire i Burgeois, bavio se analizom sastava etarskog ulja *C. conicum* poreklom iz Francuske. Na osnovu njihove analize dominirali su monoterpeni, gde su najzastupljeniji bili sabinen (64,3%) i γ -terpinen (11,5%) praćeni α -pinenom (0,1%), kamfenom

(2,5%), mircenom (4,2%), α -terpinenom (6,0%), limonenom (4,7%), β -felandenom (1,5%), p -cimenom (0,5%) i terpinolenom (3,9%) (Suire i Burgeois, 1977). Svi navedeni sekundarni metaboliti detektovani su i u našem uzorku poreklom iz Velikih Kupaca, ali sa različitim procentualnim udelom (tabela 4.3.7.). Sastavom ovog etarskog ulja se skoro punih 20 godina niko nije bavio do *Velterová*-e i njenih saradnika. U okviru ovog istraživanja, među 13 identifikovanih sastojaka dominirao je monoterpen sabinen, sa procentom zastupljenosti od 37,0%, što je uporedivo sa našim uzorkom SF-COK. Pored sabinena, zabeleženo je prisustvo γ -terpinena (15%), α -terpinena (8%), α -tujena i limonena (6%), kamfena (3%), terpinolena (3%), mircena (3%), β -pinena (2%), β -felandrena (2%), p -cimena (2%) i α -pinena (1%) (Valtrová et al., 1992). Ovi podaci su takođe u skladu sa našim rezultatima (tabela 4.3.7.).

U narednim godinama identifikovani su seskviterpeni u ovom etarskom ulju, među kojima su neki predstavljali nove prirodne proizvode. Analizom etarskog ulja *C. conicum*, prikupljenog u julu na području južne Nemačke, izolovana su, uz već poznate sastojke ((-)-selin-11-en-4-ol, (+)-selina-4,11-dien, 3,4-dimetoksistiren, (-)-germakradien-11-ol, konocefalenol, (-)- α -selinen, (+)- β -selinen, (-)-biciklogermakren, (-)-izolepidozen, biciklogermakren-14-al (verovatno izolepidozen-14-al) i presilpiperfolan-1-ol) i tri nova seskviterpena brazilanskog tipa: brazila-5,10-dien, brazila-5(10),6-dien i brazila-1(6),5(10)-dien čije je prisustvo potvrđeno i ovim radom (tabela 4.3.7.) (Melching i König, 1999). Iste godine, *Melching* i saradnici su iz etarskog ulja *C. conicum* poreklom iz Austrije izolovali (-)-aromadendran-5-ol, (+)-aromadendr-4-en-12-ol, *ent*-(-)-gvaj-5-en-11-ol, *ent*-(-)-viridiflorol, (-)-leden, (+)-izoleđen, (+)- α -gurjunen i γ -gurjunen (Melching et al., 1999). Analizirana etarska ulja vrste *C. conicum* unutar disertacije najsljednija sa uzorcima ove vrste nemačkog porekla. Generalno, u okviru ranije analiziranih uzoraka etarskih ulja *C. conicum* ispoljena je dominacija mono- i seskviterpena pri čemu je ovaj odnos išao i do 93,4% prema 7% u korist monoterpena, u biljnom materijalu poreklom sa Himalaja analiziranih od strane *Joshi* i saradnika (Joshi et al., 2000). Međutim, iako su seskviterpeni bili manje zastupljeni, mnogi su okarakterisani kao novi prirodni proizvodi. Analizom etarskog ulja *C. conicum* poreklom iz Srbije utvrđeno je gotovo izjednačeno procentualno prisustvo mono- i seskviterpena, ili dominantno prisustvo seskviterpena (tabela 4.3.7.) što, uz po prvi put identifikovan, izolepidozen-14-ol (jedinjenje 3), kao i dodatne neidentifikovane potencijalno nepoznate sastojke koji se navode u literaturi, ukazuje da je dalja analiza ovog etarskog ulja od interesa.

Tabela 4.3.7. Hemijski sastav etarskih ulja vrste *C. conicum*

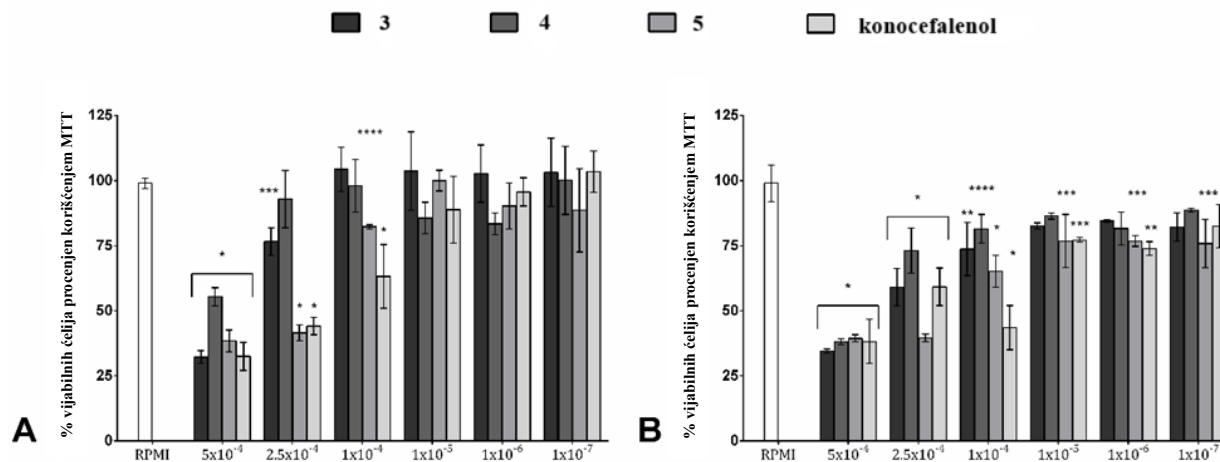
RI ⁱ	Jedinjenje	Uzorak ⁱⁱ		Identifikacija
		SF-COK	SF-CON	
		% ⁱⁱⁱ		
904	heptanal	tr ^{iv}	- ^v	RI, MS, CoI ^{vi}
927	α -tujen	0,8	-	RI, MS
936	α -pinen	0,2	tr	RI, MS, CoI
954	kamfen	1,8	tr	RI, MS, CoI
972	sabinen	28,0	tr	RI, MS
977	1-okten-3-ol	-	tr	RI, MS
983	β -pinen	1,8	-	RI, MS, CoI
989	β -mircen	1,7	-	RI, MS
997	3-oktanol	tr	tr	RI, MS
1009	α -felandren	0,1	-	RI, MS
1020	α -terpinen	0,9	-	RI, MS, CoI
1027	<i>p</i> -cimen	0,1	-	RI, MS, CoI
1030	limonen	2,9	tr	RI, MS, CoI
1057	γ -terpinen	1,8	tr	RI, MS
1069	<i>cis</i> -sabinen-hidrat	1,5	1,7	RI, MS
1086	terpinolen	0,6	tr	RI, MS
1102	<i>trans</i> -sabinene-hidrat	-	2,0	RI, MS
1098	linalool	tr	tr	RI, MS
1103	1-okten-3-il-acetat	5,4	2,1	RI, MS
1115	3-oktil-acetat	0,2	tr	RI, MS
1136	<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	0,2	0,3	RI, MS
1181	terpinen-4-ol	1,9	3	RI, MS
1198	α -terpineol	tr	tr	RI, MS
1200	<i>cis</i> -piperitol	tr	tr	RI, MS
1211	<i>trans</i> -piperitol	tr	tr	RI, MS
1286	bornil-acetat	tr	tr	RI, MS
1300	brazila-1,10-dien	0,7	0,6	RI, MS
1331	brazila-5,10-dien	4,3	4	RI, MS
1362	silfiperfol-6-en	tr	tr	RI, MS
1369	brazila-5(10),6-dien	1,7	1,8	RI, MS
1388	β -elemen	tr	0,4	RI, MS
1406	α -gurjunen	-	tr	RI, MS
1422	aristolen	0,3	2,3	RI, MS
1430	aristola-1(10),8-dien	1	8,9	RI, MS
1433	1(10)-aristolen (<i>sin.</i> ^{viii} β -gurjunen)	0,2	1,5	RI, MS
1439	brazila-1(6),5(10)-dien	3,1	5,4	RI, MS
1444	nardošina-7,9,11-trien	0,4	2,7	RI, MS

1456	<i>epi-β</i> -santalen	tr	-	RI, MS
1452	(<i>E</i>)- <i>β</i> -farnezen	tr	tr	RI, MS
1466	6,11-epoksi-izodaukan	tr	tr	RI, MS
1472	selina-4,11-dien	tr	0,7	RI, MS
1480	germakren D	tr	tr	RI, MS
1482	izolepidozen	4,6	3,8	RI, MS
1502	<i>β</i> -himahalen	-	tr	RI, MS
1494	konocefalenol	15,4	17,2	RI, MS, Col
1498	biciklogermakren	1,5	1,0	RI, MS
1508	germakren A	0,3	0,7	RI, MS
1524	presilfiperfolan-1-ol	3,0	4,3	RI, MS
1568	maliol	-	tr	RI, MS
1557	daktiol	2,7	4,0	RI, MS
1589	viridiflorol	tr	0,5	RI, MS
1605	rozifoliol	tr	tr	RI, MS
1611	<i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> , <i>S</i>),(<i>E</i>)-1(10)- lepidozen-5-ol	1,1	1,8	RI, MS
1614	nardošina-7,9-dien-11-ol	0,1	1,6	RI, MS
1621	<i>allo</i> -aromadendren-epoksid	-	0,6	RI, MS
1638	(1(10) <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-1(10),5-germakradien-11- ol	2,5	7,3	RI, MS
1654	<i>epi-α</i> -murolol	-	tr	RI, MS
1699	(1 <i>Z</i> ,4 <i>E</i>)-lepidoza-1(10),4-dien-14-al (<i>sin.</i> izolepidozen-14-al)	1,1	6,8	RI, MS, NMR
1738	izolepidozen-14-ol	1,0	-	RI, MS, NMR
1758	aristolon	-	0,6	RI, MS
1774	drimenol	tr	-	RI, MS
Ukupno identifikovano:		94,9	87,6	

ⁱRetencioni indeksi na koloni DB-5MS eksperimentalno određeni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana;
ⁱⁱUzorci etarskih ulja: SF-CON-uzorak poreklom iz Jelašničke klisure; SF-COK- uzorak poreklom iz Velikih Kupaca, tabela 3.4.1.;
ⁱⁱⁱsrednja vrednost tri analize;
^{iv}tr - trag (<0,05%);
^v-/ nije detektovano;
^{vi}Metode identifikacije: MS = upoređivanje masenih spektara sa onima iz biblioteka (Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3), RI – upoređivanjem eksperimentalno dobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima, Col – identifikacija sastojaka koinjektiranjem standardnih supstanci;
^{vii}*sin.* – sinonim.

4.3.7. IMUNOMODULATORNI I CITOTOKSIČNI EFEKAT NOVOIZOLOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA JETRENJAČE *C. CONICUM*

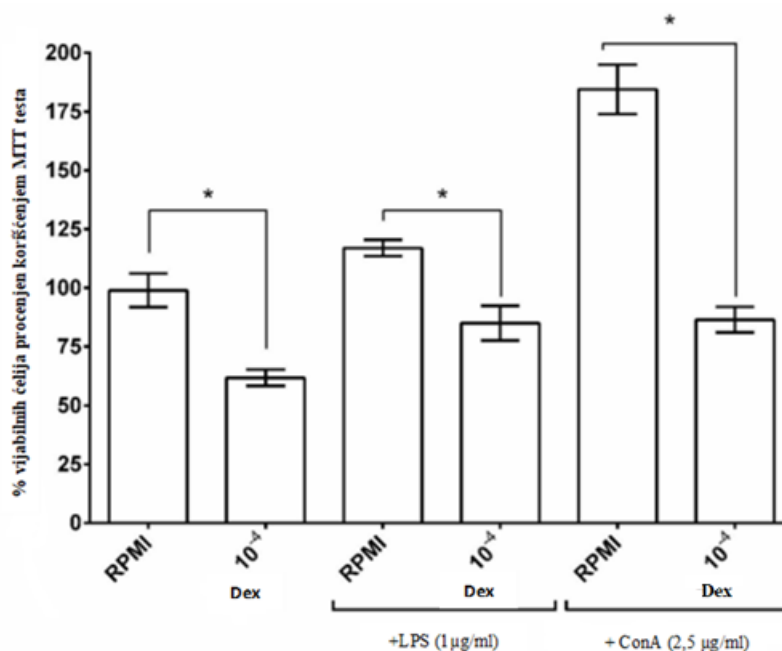
Imunomodulatorna aktivnost izolovanih jedinjenja 3-5 i konocefalenola ispitivana je kroz njihov efekat na primarne limfocite slezine (Eksperimentalni deo 3.7.3.), organa ključnog za funkcionisanje imunog sistema. U uslovima *in vitro*, kulture primarnih limfocita pacova, tretirane su supstancama od interesa tokom 24 i 48 h, pri različitim koncentracijama. Potencijalni imunomodulatorni i citotoksični efekti ovih jedinjenja određivani su pomoću MTT-testa (Eksperimentalni deo 3.7.4.) na nestimulisane i stimulisane (*E. coli* lipopolisaharid, LPS, i konkanavalin A, ConA) splenocite (SPC). Tokom prva 24 h, testirana jedinjenja ispoljila su izražen citotoksični efekat na nestimulisane SPC. Sva četiri jedinjenja prouzrokovala su smrt ćelija posle 24 h u koncentracionom opsegu od 1×10^{-4} do 5×10^{-4} M, pri čemu je u tri slučaja najviša koncentracija dovela do smanjenja vijabilnosti za više od 70% (slika 4.3.16.).



Slika 4.3.16. Efekat nakon 24-h (A), 48-h (B) tretmana različitim koncentracijama (M) jedinjenja 3-5 i konocefalenola na vijabilnost SPC (sposobnost redukcije-MTT). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značaj izračunat je putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey-evim post hoc* testom. **** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,0001$ u odnosu na netretirane ćelije

Generalno, efekti ispitivanih supstanci na vijabilnost SPC zavise od njihove koncentracije, pri čemu povećanje koncentracije uzrokuje značajno smanjenje broja vijabilnih ćelija. Jedinjenje

5 pokazalo je statistički značajnu citotoksičnost pri svim testiranim koncentracijama nakon produžene inkubacije (48 h) sa splenocitima, u poređenju sa ćelijama tretiranim medijumom (RPMI, procenat živih ćelija izražen kao 100%) (slika 4.3.16.). Ovi nalazi sugerišu da je jedinjenje 5 najtoksičniji agens među testiranim jedinjenjima. Nakon 48-h tretmana sa analiziranim jedinje-



Slika 4.3.17. Efekat deksametazona (Dex; 1×10^{-4} M) na vijabilnost/proliferaciju splenocita, sa ili bez prisustva ConA/LPS. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značaj izračunat je putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey*-evim post hoc testom. * $p < 0,0001$ u odnosu na netretirane ćelije

njima, pri konačnoj koncentraciji 1×10^{-4} M, uglavnom je bilo vijabilno 60–80% SPC (slika 4.3.16.), dok je poznati citotoksični agens, deksametazon, pri istoj koncentraciji smanjio vijabilnost ćelija na 65% (slika 4.3.17.). Pri koncentracijama većim od 10^{-5} M jedinjenja **3** i **4** su statistički značajno smanjila vijabilnost SPC nakon 24 i 48 h inkubacije (slika 4.3.16.). Nakon 48 h inkubacije, u slučaju konocefalenola, samo najniža koncentracija (1×10^{-7} M) nije imala značajne efekte na vijabilnost SPC. Dakle, metabolička aktivnost/vijabilnost nestimuliranih SPC bila je značajno smanjena pri dejstvu viših koncentracija ispitivanih jedinjenja, pri čemu su uočene značajne inhibitorne promene u kapacitetu redukcije MTT-a.

Nakon 24 h kultivacije, pod svetlosnim mikroskopom, netretirani SPC su okrugle ćelije, uglavnom jednake veličine, sa povremeno prisutnim većim ili manjim ćelijama (slika 4.3.18. A).

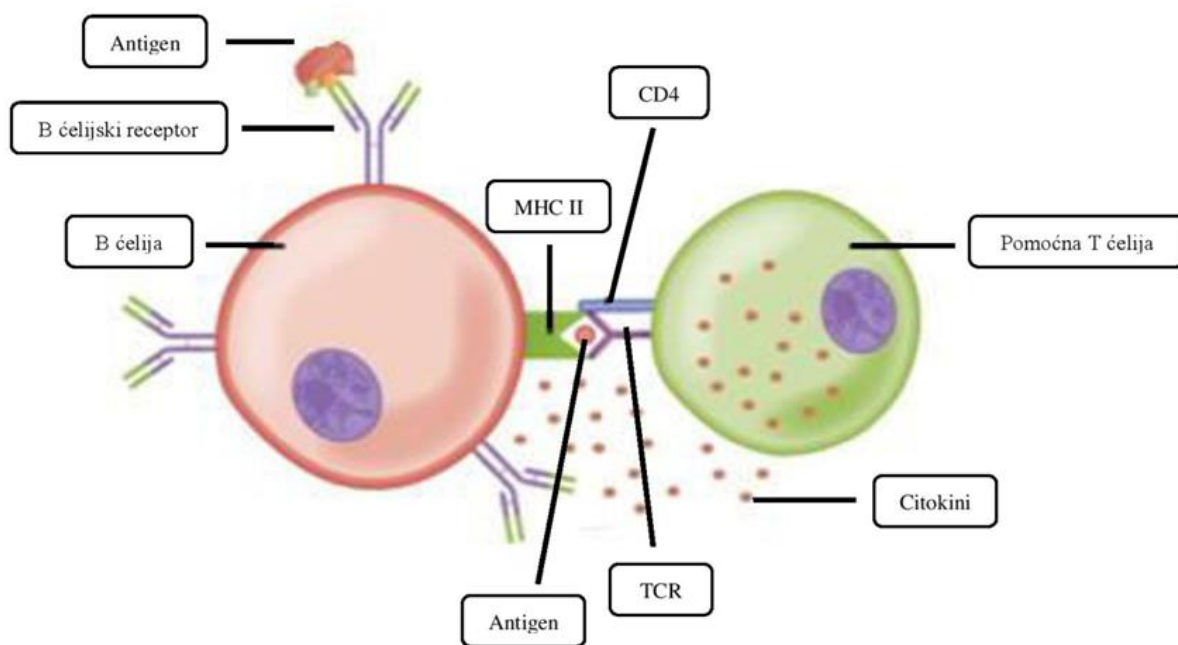
Usled fomiranja formazana u SPC je pod mikroskopom vidljiva tamnoplava akumulacija kristala unutar ćelija (u mitohondrijama ili blizu ćelijske membrane) ili u njihovoj blizini. Nakon tretmana različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja (jedinjenja **3-5** i konocefalenol) utvrđeno je da ona nisu izazvala smanjenje broja ćelija, ali su korišćene najveće koncentracije testiranih jedinjenja smanjile sposobnost ćelijskih mitohondrija da redukuju MTT. Kao rezultat toga tretirani SPC su uočeni kao prazne ćelije bez akumuliranih plavih kristala formazana (slika 4.3.18. B). Sa smanjenjem koncentracije testiranih jedinjenja, nisu nađene značajne vidljive razlike u broju ćelija i količini redukovanog MTT u poređenju sa netretiranom kontrolom (slika 4.3.18. A). Kao što se i očekivalo, Dex je nakon primene smanjio broj ćelija, ali nije promenio njihovu sposobnost prevođenja MTT u formazan (slika 4.3. 18. C).



Slika 4.3.18. Izgled splenocita u MTT-testu (uvećanje x 1000): RPMI-medijum (A), RPMI-medijum u koji je dodata najviša koncentracija jedinjenja **5** (B) ili 1×10^{-4} M deksametazon (C)

Tokom prethodnih istraživanja, navedenih u Rezultatima i diskusiji 4.1.5., otkriveno je da su dva seskviterpena, α -furanopingvizanol (jedinjenje **1**) i furanopingvizanon (jedinjenje **2**), identifikovana u etarskom ulju jetrenjače *P. cordaeana*, ispoljila međusobno različite efekte na funkcionisanje SPC, nakon primene bez stimulatora. U višoj koncentraciji (1×10^{-4} M), α -furanopingvizanol je indukovao blastnu transformaciju SPC, dok je u nižim koncentracijama (1×10^{-8} – 1×10^{-6} M) delovao kao citotoksični agens. Nasuprot tome, furanopingvizanon je pokazao izraženu citotoksičnost i izazvao apoptozu SPC smanjenjivanjem nivoa DNK u ćelijama. Jedan od najvažnijih organa imunog sistema upravo je slezina, sačinjena od B (Bly) i T (Tly) limfocita, makrofaga, dendritičnih ćelija, NK ćelija i crvenih krvnih zrnaca. Pravilno funkcionisanje T i B

limfocita (slika 4.3.19.) je od presudnog značaja za imunološki sistem, s obzirom na to da njihova disfunkcija može dovesti do ozbiljnih bolesti kao što su limfocitopenija, teška kombinovana imunodeficijencija, sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS), limfom T ćelija (nehodžkinov), multipla skleroza, sistemski eritematozni lupus, hronična limfocitna leukemija, hronična limfoblastna leukemija, kao i mnoge druge.



Slika 4.3.19. Princip aktiviranja imunološkog sistema od strane pomoćnih T ćelija (T_H) tokom infekcije

U okviru analize procenjeni su efekti jedinjenja **3-5** i konocefalenola na proliferaciju SPC koristeći simultanu aktivaciju T- i B-limfocita upotrebom ConA ili LPS. Jedinjenja **3-5** i konocefalenol u svim testiranim koncentracijama značajno smanjuju proliferativni odgovor limfocita na mitogen T ćelija, konkanavalin A (ConA), posle 48 h (slika 4.3.20.). Modulatorna aktivnost definisana je kao aktivnost jedinjenja koja inhibira stimulisane proliferaciju SPC, dok u istoj koncentraciji ne ispoljava citotoksičnost na nestimulisane SPC. Poređenjem rezultata dobijenih za nestimulisane ćelije (slika 4.3.16.) sa onim dobijenim nakon stimulacije sa ConA, jedinjenja **3, 4** i konocefalenol su pri koncentracijama od 1×10^{-7} do 1×10^{-5} M pokazala izražene

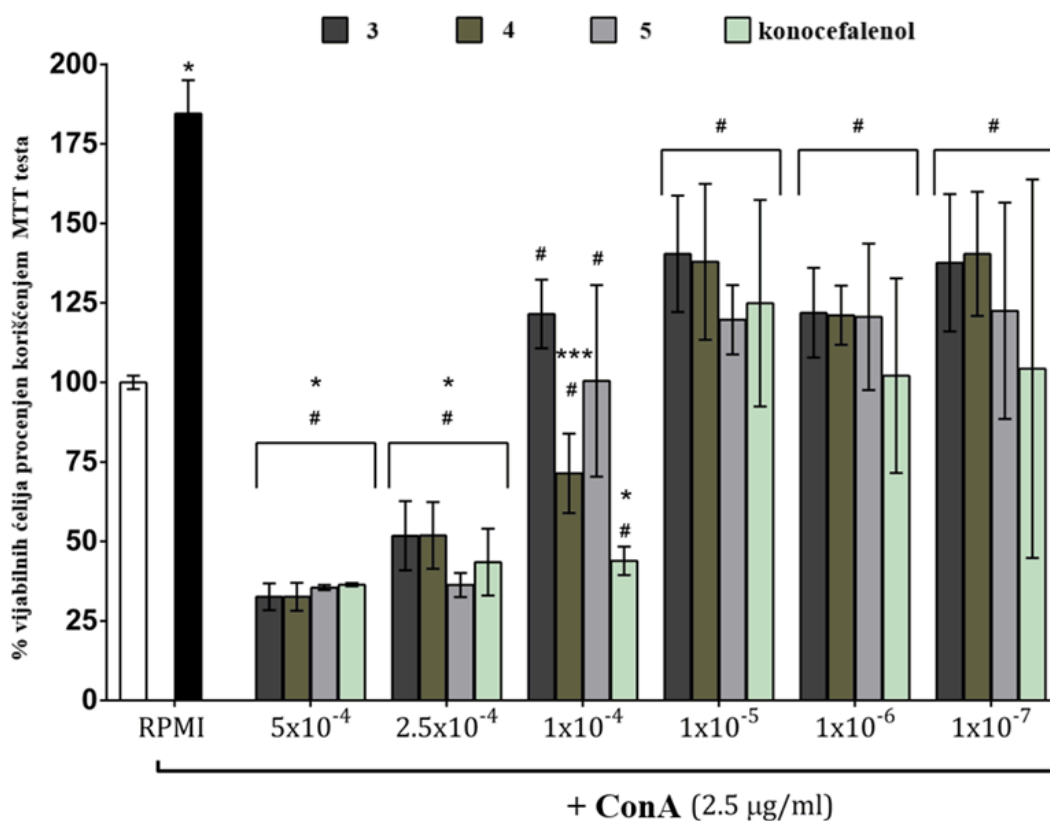
modulatorne efekte (slike 4.3.16. i 4.3.20.). Sa druge strane, deksametazon je u prisustvu ConA doveo do smanjenja vijabilnosti/proliferacije limfocita od 185% do 85% (slika 4.3.17.).

Splenociti stimulirani sa ConA korišćeni su kao model *in vitro* funkcije T limfocita, što u određenoj meri imitira *in vivo* sistem. Kao što je već navedeno, T limfociti igraju ključnu ulogu u kontroli homeostaze imunološkog sistema, imunološkom odgovoru na tumor i uklanjanju patogena (Abbas et al., 2015). Aktivacija naivnih Tly sa ConA oponaša angažovanje TCR sa srodnim antigenom, što inicira signalne puteve koji dovode do višestrukih ćelijskih odgovora, uključujući aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju T ćelija, kao i ekspresiju citokina (Palacios, 1982) (slika 4.3.19.). Svaki od ovih procesa može biti farmakološki modulisan, predstavljajući značajne terapijske ciljeve za razvoj savremenih i inovativnih antiinflamatornih lekova (Dinarello, 2010) ili imunoterapijskih strategija zasnovanih na primeni monoklonskih antitela (Martin et al., 2013). Jedinjenja **3**, **4** i konocefalenol mogu uticati na jedan ili više ovih ćelijskih događaja povezanih sa aktivacijom TCR (slika 4.3.19.).

U slučaju stimulacije LPS-om, snažnim modulatorom BLy, naši rezultati pokazali su da izolovana jedinjenja **4**, **5** i konocefalenol u tri najveće koncentracije (5×10^{-4} , $2,5 \times 10^{-4}$ i 1×10^{-4} M) značajno smanjuju proliferaciju SPC (slika 4.3.21.), ali pri istim koncentracijama ispoljavaju i izražen citotoksični efekat (slika 4.3.16.). Nasuprot tome, pomenuta jedinjenja u nižim koncentracijama (1×10^{-7} – 1×10^{-5} M) i jedinjenje **3** (1×10^{-7} – 1×10^{-4} M) nisu uticala na proliferativni odgovor SPC na LPS (slika 4.3.21.). Više koncentracije jedinjenja **3** (5×10^{-4} i $2,5 \times 10^{-4}$ M) pokazale su citotoksični potencijal, uz antiproliferativni efekat (slike 4.3.16. i 4.3.21.). Pozitivna kontrola, deksametazon, primenjen zajedno sa LPS, smanjila je vijabilnost/proliferaciju SPC sa 120% na približno 85% (slika 4.3.17.).

Može se zaključiti da sva četiri testirana jedinjenja u nižim koncentracijama nisu modulirala imunološki odgovor SPC na LPS. Dobro je poznato da su *in vitro* odgovori B ćelija na LPS izuzetno robusni (Dziarski, 1982). Prethodni podaci pokazali su da B ćelije nakon stimulacije sa LPS pokazuju pojačanu regulaciju kostimulatornih molekula (CD80, CD86), receptora B ćelija, i molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II (MHC II) (Burger i Vitetta, 1991; Hathcock et al. 1994). Obe studije snažno podržavaju činjenicu da aktivirane LPS-om B ćelije slezine deluju kao antigen-prezentujuće ćelije, igrajući ključnu ulogu u pokretanju i održavanju imunoloških odgovora specifičnog za antigen. Nedavno istraživanje ukazuje da se LPS-om može

aktivirati signalizacija putem receptora sličnih Toll-u u B limfocitima. Zajedno sa drugim važnim signalnim putevima povezanim sa B ćelijskim receptorom, signalizacija preko *Toll*-nalik receptora igra ključnu ulogu u diferencijaciji i aktivaciji B ćelija (Hua i Hou, 2013). Međutim, čini se da netoksične koncentracije svih testiranih jedinjenja (**3-5**, konocefalenol) ne utiču na LPS-om indukovane imunološke odgovore B ćelija, niti na mehanizme povezane sa B ćelijama (Hua et al., 2013). Najperspektivnija imunomodulatorna jedinjenja su **3** i **4**, koja pri višim koncentracijama



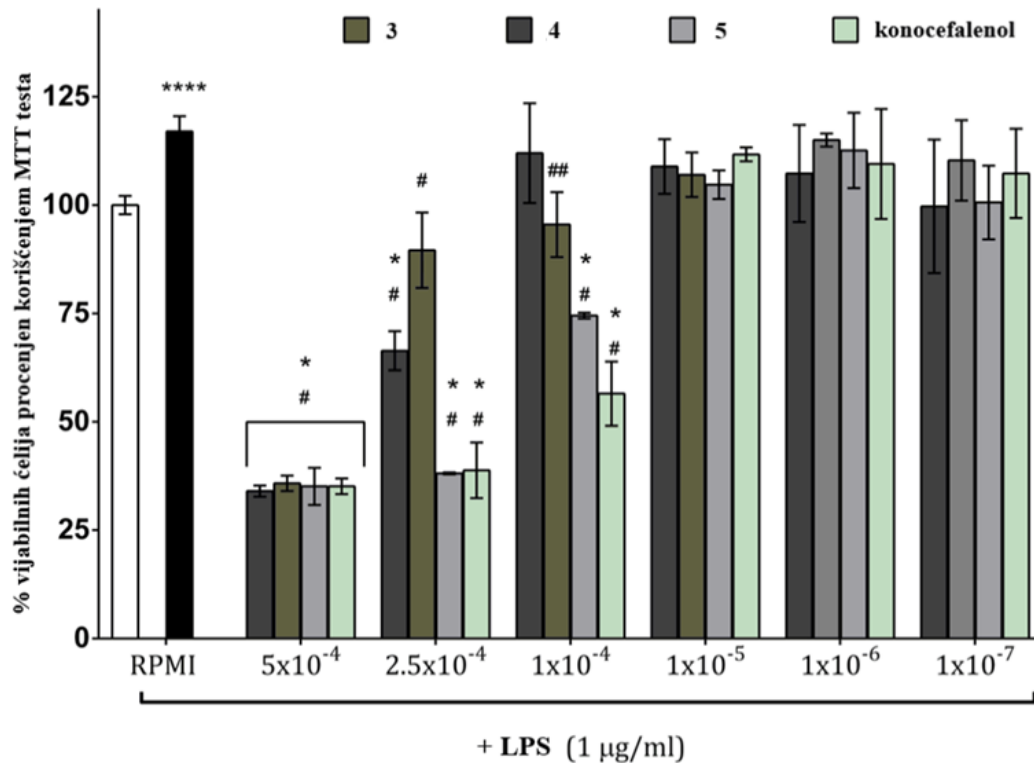
Slika 4.3.20. Efekti različitih koncentracija (M) jedinjenja **3-5** i konocefalenola na vijabilnost/proliferaciju ćelija slezine stimulisane sa ConA (2,5 µg/mL) tokom 48 h. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD; statistički značaj izračunat je putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey-evim post hoc* testom. *** $p < 0,01$, * $p < 0,0001$ u odnosu na netretirane ćelije; # $p < 0,0001$ u odnosu na ćelije stimulirane sa ConA

(od 1×10^{-4} do 5×10^{-4} M) izazivaju citotoksične efekte protiv SPC-a, dok pri nižim koncentracijama (od 1×10^{-7} do 1×10^{-5} M) deluju kao modulatori aktivnosti T limfocita slezine, inhibirajući rast i proliferaciju ćelija izazvanu mitogenom (stimulatorom, ConA).

Dobijeni rezultati tokom gorepomenutih analiza nisu pokazali da li su zbirni efekti testiranih jedinjenja na proliferaciju SPC posledica njihovog direktnog uticaja na T/B limfocite, indirektnog delovanja na druge ćelije slezine (makrofage i dendritične ćelije), ili oba faktora. Jedno od mnogih pitanja koja proizilaze iz ovog istraživanja je, da li ova imunološka *in vitro* zapažanja imaju pandan *in vivo*. U cilju rasvetljenja imunomodulatorne aktivnosti i potencijalne medicinske/farmakološke primene pristupili smo daljoj analizi. Ispitivan je uticaj niskih koncentracija (od 1×10^{-8} do 1×10^{-6} M) naša tri novoizolovana seskviterpenoida (jedinjenja **3-5**) na vijabilnost i membransku permeabilnost splenocita pacova, kao i aktivnost LDH. Dobijeni rezultati su potom upoređeni sa prethodnim nalazima.

Jedinjenja **3-5** (od 1×10^{-8} do 1×10^{-6} M) su prvo testirana kako bismo utvrdili njihove efekte na vijabilnost limfocita slezine u *in vitro* modelima korišćenjem MTT i TB testova, što bi opisalo funkciju mitohondrija i ćelijskih membrana. Rezultati MTT analize (slika 4.3.22.) impliciraju da niže koncentracije testiranih jedinjenja samo blago utiču na sposobnost ćelija da metabolišu MTT. Jedinjenja **4** i **5** su pri koncentracijama od 1×10^{-7} M i 1×10^{-8} M, smanjila vijabilnost splenocita tokom MTT-testa, dok jedinjenje **3** nije pokazalo ovaj efekat ni pri jednoj od koncentracija. Ovi rezultati ukazuju da u testiranim koncentracijama jedinjenja **3**, **4** i **5** nisu citotoksična. Deksametazon, korišćen u ovom istraživanju, smanjio je sposobnost ćelija slezine pacova da metabolišu MTT (pri koncentraciji 1×10^{-6} M vijabilnost je smanjena 50%, slika 4.3.22.), što je u skladu sa našim istraživanjima (Rezultati i diskusija 4.1.5., slika 4.3.17.). Vredno je pomenuti da su na osnovu MTT-analize ekstrakti *Marchantia convoluta* inhibirali proliferaciju ćelija jetre i pluća (Xiao et al., 2006). Međutim, ovi objavljeni rezultati odnose se na kancerske ćelije, koje se razlikuju od netransformisanih splenocita, što potencijalno ukazuje da testirana jedinjenja mogu biti manje toksična za normalne ćelije.

Dalji tok našeg istraživanja oslanjao se na dobro poznatu činjenicu da integritet ćelijske membrane predstavlja jedan od ključnih kriterijuma za razlikovanje mrtvih i živih ćelija (Avelar-Freitas et al., 2014). Test tripan-plavim (TB) predstavlja jednu od prvih metoda za određivanje vijabilnosti ćelija koji se danas široko koristi za procenu citotoksičnosti (Altman et al., 1993; Avelar-Freitas et al., 2014; Louis i Siegel, 2011) (Eksperimentalni deo 3.7.4.). Ova boja, sa molekulskom masom od približno 1000 Da, ne može proći kroz ćelijsku membranu. U tom smislu, TB ulazi samo u ćelije sa oštećenim membranama i boji ih u plavo (Avelar-Freitas et al., 2014).

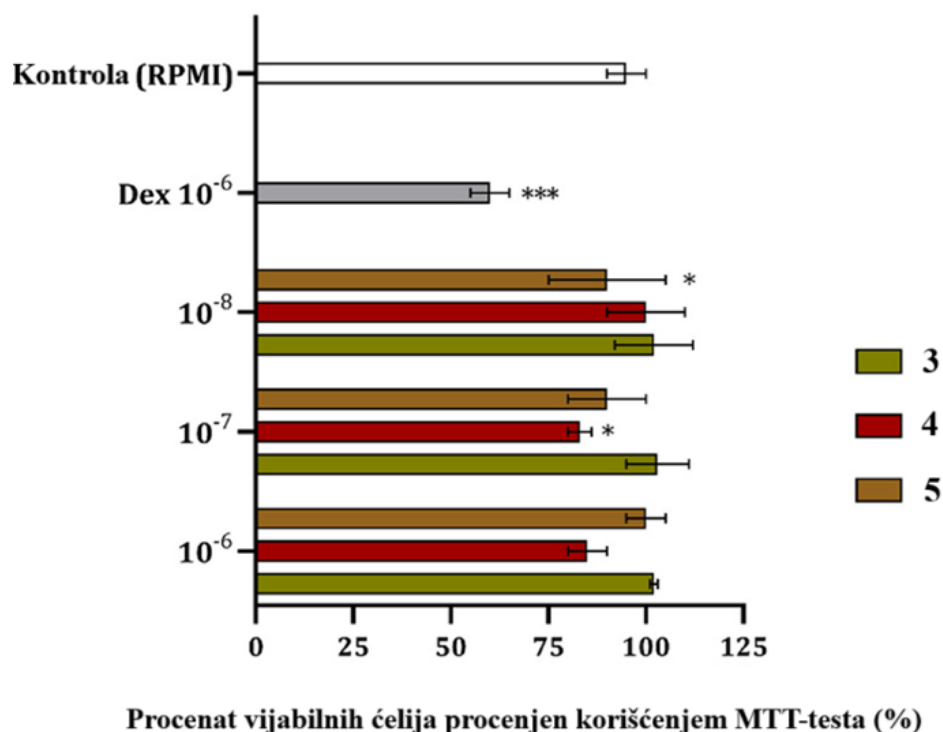


Slika 4.3.21. Efekat različitih koncentracija (M) jedinjenja **3-5** i konocefalena na vijabilnost/proliferaciju ćelija slezine, stimulisanih LPS-om (1 µg/mL) tokom 48 h. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD; statistički značaj izračunat je putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey-evim post hoc* testom. **p* < 0,0001 u odnosu na netretirane ćelije; **** RPMI kontrola, #*p* < 0,0001, ##*p* < 0,001 u odnosu na ćelije stimulirane sa LPS

Prema rezultatima dobijenim u TB-testu, pokazalo se da je jedinjenje **3**, pri koncentracijama 1×10^{-8} i 1×10^{-6} M, dovelo do 25-50% smrtnosti limfocita slezine pacova, kao i jedinjenje **5** pri 10^{-7} M. Tretman jedinjenjem **4** promenio je propustljivost ćelijske membrane koja je detektovana TB-testom samo u koncentraciji od 10^{-6} M (slika 4.3.23.). S druge strane, nakon 24-h tretmana sa Dex-om pri istoj koncentraciji, oko 75% splenocita je bilo vijabilno prema TB-testu (slika 4.3.23.).

Rezultati TB-testa ukazuju da jedinjenja **3** i **4**, u najvišoj testiranoj koncentraciji, mogu potencijalno izazvati ili smrt ćelija ili povećati propustljivost ćelijske membrane (slika 4.3.23.), dok je jedinjenje **5** uticalo na propustljivost ćelijske membrane pri koncentraciji od 10^{-7} M (slika 4.3.23.). Naše istraživanje, opisano u delu Rezultata i diskusije 4.1.5., pokazalo je da jedinjenja

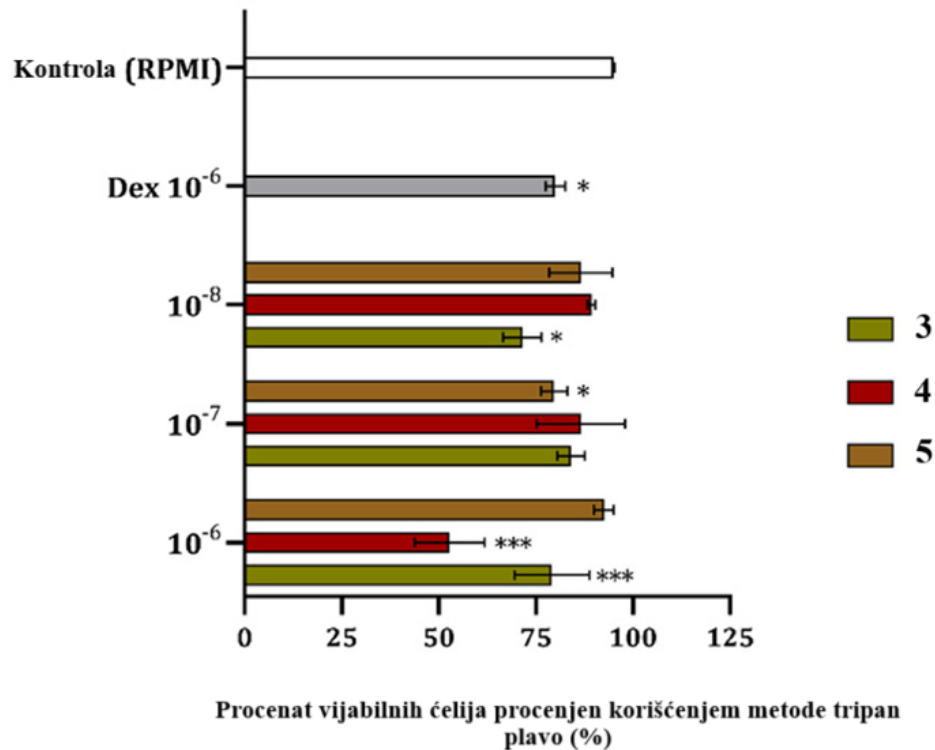
izolovana iz druge vrste jetrenjače različito utiču na ćelijsku vijabilnost, a dobijeni rezultati TB-testa preklapaju se sa onima iz MTT-testa. Drugi istraživači su utvrdili da je 14 h nakon *in vitro*



Slika 4.3.22. Procenat vijabilnih ćelija procenjen korišćenjem MTT testa nakon 24 h inkubacije sa različitim koncentracijama testiranih jedinjenja 3, 4, i 5, kao i sa Dex-om pri koncentraciji od 10^{-6} M. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značaj izračunat je putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey-evim post hoc* testom. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ u odnosu na RPMI-tretirane ćelije

tretmana sa 10^{-6} M Dex detektovano 50% vijabilnih splenocita miševa, korišćenjem TB-bojenja (Nair-Menon et al., 1996). Prema TB-testu, nakon 24 h tretmana istom koncentracijom deksametazona, 75% splenocita je ostalo vijabilno (slika 4.3.23.). Tokom naše analize smrtnost ćelija (25% ćelija je bilo obojeno, zaprljano sa TB), izazvana nakon 24 h od strane Dex-a, niža je u odnosu na rezultate u prethodnim analizama koje su se ticale metabolita *C. conicum*, dok su se u našem istraživanju koje se ticalo *P. cordaeana* (Rezultati i diskusija 4.1.5.) rezultati složili sa većinom objavljenih za istraživanje splenocita miševa.

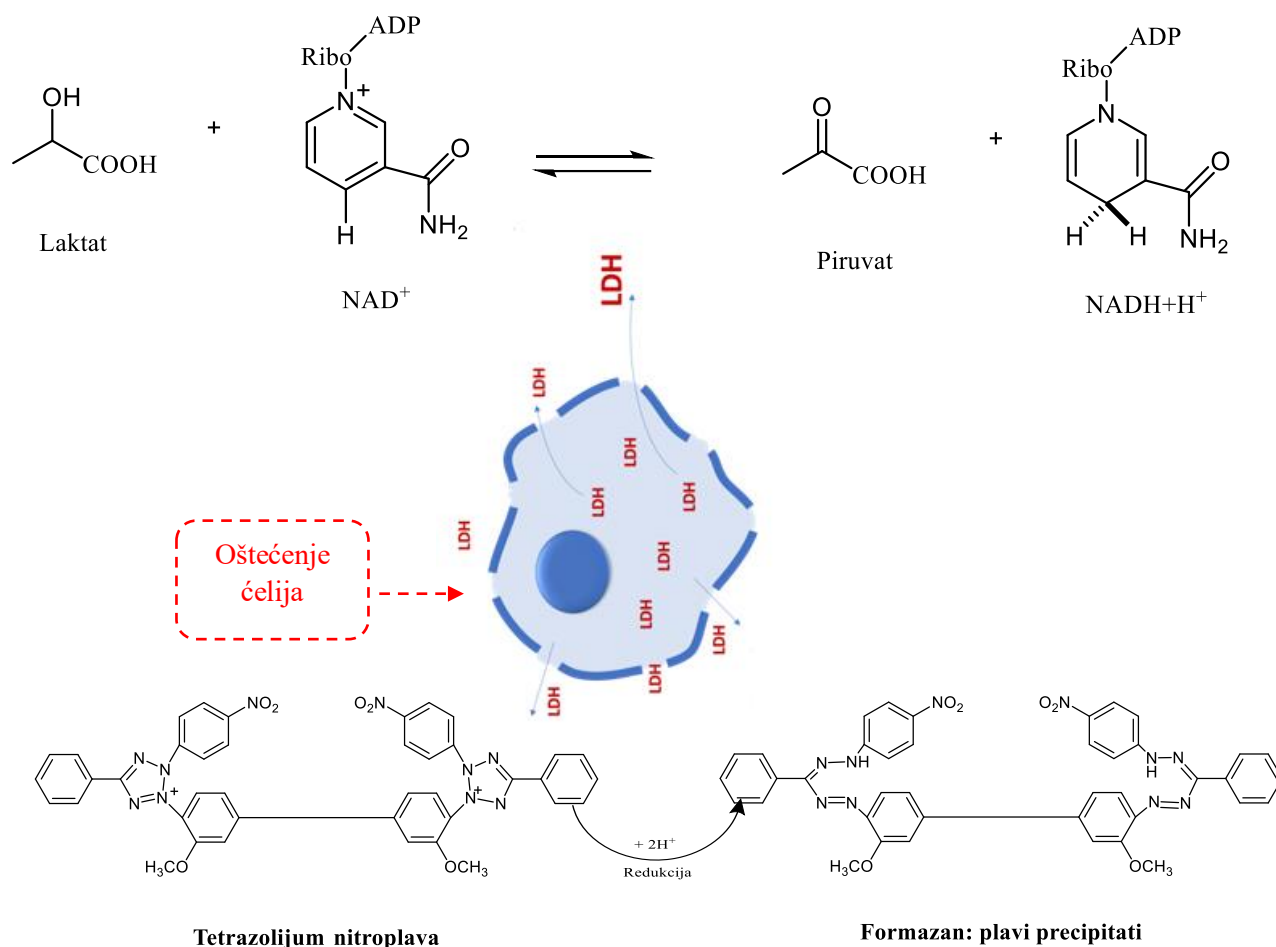
Naime, našom prethodnom MTT analizom primećeno je smanjenje sposobnosti živih ćelija da redukuju MTT, što je obično povezano sa funkcionisanjem mitohondrija. Kao što je rečeno



Slika 4.3.23. Procentat vijabilnih ćelija procenjen je korišćenjem metode tripan plavo 24 h nakon inkubacije sa različitim koncentracijama jedinjenja **3**, **4**, i **5**, kao i sa Dex-om pri koncentraciji 10^{-6} M. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD; statistički značaj izračunat je putem *one-way* ANOVA testa praćen *Tukey*-evim *post hoc* testom. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$ u odnosu na RPMI-tretirane ćelije

MTT test pruža informacije o stanju mitohondrija i metaboličkoj aktivnosti ćelija, ali ne direktno o stanju ćelijske membrane. Upravo ovo navelo nas je da preispitamo delovanje jedinjenja od interesa na SPC pacova kroz analize koje bi otkrile funkcionisanje ćelijske membrane. Ćelijska membrana omogućava komunikaciju ćelije sa spoljašnjom sredinom, transport molekula i određene metaboličke funkcije. Glavni molekuli membrane su amfifilni, obuhvatajući polarne, hidrofilne, i apolarne, hidrofobne delove (Lombard, 2014). Pod različitim fiziološkim i patološkim uslovima, ćelijska membrana je izložena stresu koji može nastati usled delovanja proteina, toksina i mehaničke aktivnosti, što sve primorava ćeliju da se prilagodi novim uslovima kako bi preživela (Espiritu, 2021). Određeni mehanizmi ćelijske smrti uključuju pucanje ćelijske membrane, što izaziva inflamatornu reakciju i imunomodulatorne efekte (Espiritu, 2021). Tokom ove faze, intracelularni sadržaj se oslobađa u okolinu, na primer, u ekstracelularnu tečnost, plazmu i medijum za ćelijsku kulturu.

Jedan od markera oštećenja ćelije/membrane je laktat-dehidrogenaza (LDH), koja se koristi za praćenje ovakvih ćelijskih događaja, čak i u kliničkoj praksi (Krishnamurthy net al., 2021). LDH je enzim anaerobne faze glikolize, koji uključuje 5 izoenzima izgrađenih od H (gen hromozoma 12) i M (gen hromozoma 11) podjedinica. Učestvuje u procesu pretvaranja ugljenih hidrata u energiju koju ćelije koriste za svoje potrebe. Konkretno, LDH katalizuje reakciju oksidacije L–laktata u piruvat, pri čemu ulogu akceptora vodonika igra NAD^+ (slika 4.3.24.). Povećanje nivoa LDH u krvi uzrokuje akutna/hronična oštećenja ćelija. Oštećenje ćelija dovodi do oslobađanja laktata, što u slučaju ćelija kancera može dovesti do proliferacije. Utvrđeno je da je aktivnost LDH povezana sa različitim stadijumima razvoja tumora, od tumorogeneze do rasta



Slika 4.3.24. Detekcija oslobađanja LDH kroz oštećene ćelijske membrane

tumora, a čak se može koristiti i kao indikator njegove progresije (Fiume et al., 2014). Tako, molekuli koji potencijalno inhibiraju LDH mogu biti dobri kandidati za antikancerske lekove.

Našu analizu sprovedi smo korišćenjem testa na LDH (Eksperimentalni deo 3.7.9.) za jedinjenja **3-5**, pri čemu je intenzitet bojenja splenocita procenjen u poređenju sa kontrolnim ćelijama tretiranim RPMI-medijumom (tabela 4.3.8.) (slika 4.3.25.A). Tretman jedinjenjem **3** izazvao je koncentraciono zavisno smanjenje intenziteta bojenja, sugerišući ili curenje LDH ili smanjenje njegove aktivnosti (tabela 4.3.8.). Na osnovu nalaza intenziteta bojenja, samo jedinjenje **4** nije izmenilo količinu LDH (tabela 4.3.8. i slika 4.3.25.B). Nakon 24 h izlaganja ćelija dejstvu jedinjenja **5**, zabeleženo je smanjenje intenziteta bojenja u ćelijama tretiranim koncentracijama 1×10^{-6} i 1×10^{-7} M (tabela 4.3.8. i slika 4.3.25.C).

Tabela 4.3.8. Efekat jedinjenja **3-5** na intenzitet bojenja splenocita na LDH

Jedinjenje	Koncentracija (M)	Relativni intenzitet bojenja ⁱ
3	10^{-6}	1
	10^{-7}	2
	10^{-8}	3
4	10^{-6}	3
	10^{-7}	3
	10^{-8}	3
5	10^{-6}	1
	10^{-7}	1
	10^{-8}	2
Dex	10^{-6}	2
RPMI-kontrola	-	3
ⁱ Intenzitet bojenja ocenjen je na sledeći način: 1 (jak intenzitet), 2 (umeren intenzitet), 3 (slab intenzitet) i 0 (negativan).		

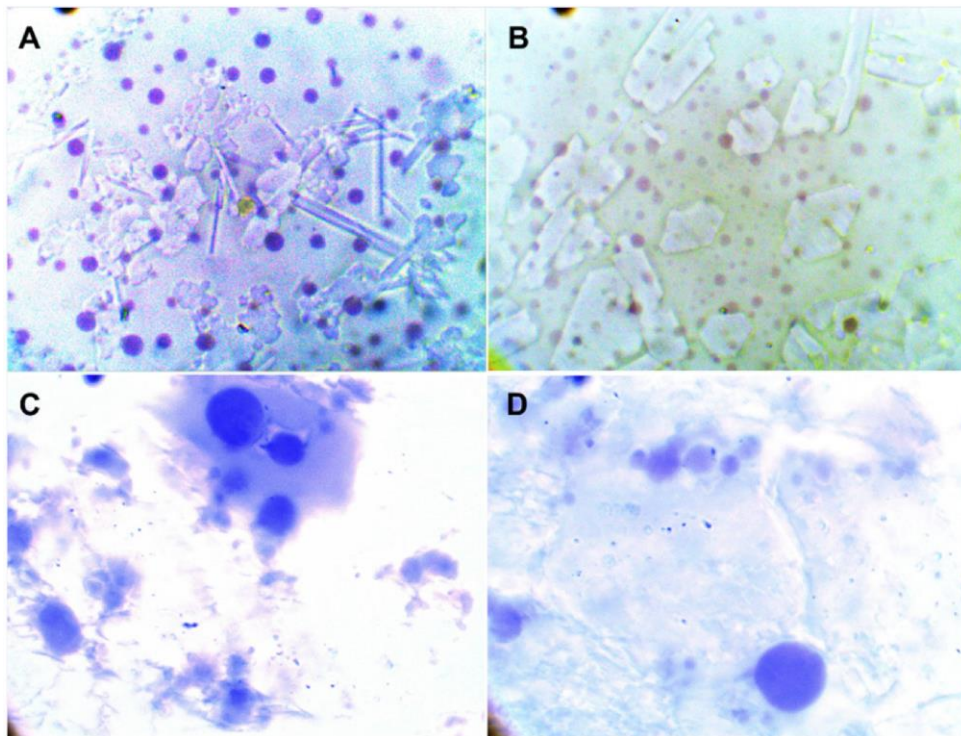
Prilikom našeg istraživanja, utvrđeno je da aplikacija deksametazona izaziva smanjenje intenziteta bojenja splenocita na LDH (tabela 4.3.8.), što može biti posledica smanjenja aktivnosti LDH usled njegove inhibicije ili smanjenja količine enzima unutar ćelija nakon njegovog curenja. U studiji *Li*-a i saradnika na humanim hondrocitima tretiranim Dex-om u koncentracijama od 0,5-1 μ M, nije zabeležena promena u intracelularnoj aktivnosti LDH, niti povećanje njegovog curenja u medijum tokom 48 h inkubacije (Li et al., 2022). S druge strane, koncentracija od 0,5 μ M Dex-

a izazvala je povećanje curenja LDH iz izloženih ćelija hepatoma (Rajarman et al., 2007). Ove razlike mogu biti uzrokovane različitim tipovima ćelija tretiranim Dex-om, što uključuje različitu fluidnost ćelijskih membrana, kao što se vidi u razlikama između normalnih i tumorskih ćelija. Takođe, splenociti su prilično osetljivi na dejstvo kortikosteroida, što može dovesti do ćelijske smrti/oštećenja, a to je povezano sa povećanom permeabilnošću membrane i curenjem LDH. Sličan efekat se može očekivati i kod izolovanih seskviterpenoida iz ekstrakta *C. conicum* u našim eksperimentima. Povećana permeabilnost membrane može uzrokovati da LDH procuri, što dovodi do povećanja intenziteta bojenja (tabela 4.3.8.).

Poredeći rezultate dobijene putem TB i LDH, u skladu sa prethodno navedenim literaturnim nalazima koji se tiču Dex (Rajaraman, et al., 2007), predloženi mehanizam uticaja membranske permeabilnosti na lakoću curenja LDH potencijalno bi se mogao predložiti za jedinjenje **3**, koje je dovelo do povećanja akumulacije TB i smanjenja intenziteta bojenja na LDH sa smanjenjem koncentracije (slika 4.3.23. i tabela 4.3.8.). Sa druge strane, jedinjenja mogu inhibirati aktivnost LDH. Aktivnost LDH je povezana sa različitim fazama razvoja tumora, od tumorogeneze, preko napredovanja tumora, rasta, i može se koristiti kao indikator prognoze bolesti. Molekuli koji potencijelno inhibiraju LDH mogli bi biti dobar kandidat za lekove protiv raka.

Rezultati dobijeni prilikom izvođenja našeg istraživanja mogu se sažeti na sledeći način: različite koncentracije testiranih jedinjenja pokazuju različite efekte na vijabilnost, aktivnost i proliferaciju SPC. Prilikom prvog *in vitro* testa redukcije MTT, primenjena jedinjenja su nakon 24 i 48 h inkubacije pokazala citotoksični potencijal, pri čemu je jedinjenje **5** ispoljilo izraženu citotoksičnost u svim testiranim koncentracijama. Jedinjenja **3** i **4** su u višim koncentracijama (od 1×10^{-4} do 5×10^{-4} M) ispoljavala citotoksično dejstvo na SPC, dok su pri nižim koncentracijama (od 1×10^{-7} do 1×10^{-5} M), uz konocefalenol, delovala kao modulatori aktivnosti T limfocita slezine inhibiranjem ćelijskog rasta/proliferacije izazvane mitogenom (stimulator, ConA), bez efekta na vijabilnost SPC. Zato se ova dva jedinjenja mogu smatrati obećavajućim imunomodulatornim agensima. U slučaju LPS-stimulacije B limfocita, testirana jedinjenja u nižim koncentracijama nisu modulisala imunološki odgovor SPC na LPS. S druge strane, jedinjenja **4** i **5**, kao i konocefalenol, su pri tri najviše koncentracije, uz izražen citotoksični efekat, značajno smanjili

proliferaciju SPC. Dve najviše koncentracije jedinjenja **3** su, pored registrovanog antiproliferativnog efekta, takođe ispoljile i citotoksičnost.



Slika 4.3.25. Mikroskopski izgled (uvećanje $\times 1000$) ćelija obojenih na LDH dobijenih različitim tretmanima: (A) RPMI-tretirane ćelije, (B) ćelije tretirane jedinjenjem **4** pri koncentraciji od 1×10^{-6} M, (C) ćelije tretirane jedinjenjem **5** pri koncentraciji od 1×10^{-7} M, i (D) ćelije tretirane Dex-om pri koncentraciji od 1×10^{-6} M

Daljom analizom, pri nižim testiranim koncentracijama jedinjenja **3-5** (od 1×10^{-8} do 1×10^{-6} M), poredeći rezultate MTT i TB testova uočena su značajna neslaganja u efektima koje su ispoljila testirana jedinjenja (slike 4.3.22. i 4.3.23.), što nije bio slučaj za Dex. Jedno od mogućih objašnjenja može biti da jedinjenja **3-5** povećavaju permeabilnost membrane, naročito najlipofilnije jedinjenje **3**, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata, sugerišući citotoksični potencijal ovih jedinjenja. S druge strane, povećanje permeabilnosti ćelijske membrane može biti korisna osobina molekula, jer ovakve supstance mogu igrati ulogu u eliminaciji ćelija kancera putem mehanizama odbrane domaćina (Geurink et al., 2013).

Razlike u citotoksičnosti, između tri testirana seskviterpena, mogu biti posledica njihove različite hemijske strukture i potencijalne interakcije sa ćelijskim membranama. Naši rezultati mogu se smatrati interesantnim, gledajući analizirana jedinjenja kao potencijalne antikancerogene agense, s obzirom na to da mogu posedovati oštećujuća svojstva za membrane, kao i aktivnosti u smeru inhibicije LDH, što su sve željene osobine za ove tipove lekova (Fiume et al., 2014; Jendrossek i Manerba, 2003). Poznato je da metastatske tumorske ćelije poseduju veću fluidnost plazma membrane u poređenju sa nemetastatskim ćelijama. U tom kontekstu, obnavljanje kontaktne inhibicije između ćelija smanjenjem fluidnosti membrane postiže se povećanjem krutosti ćelijskih membrana (Clarke et al., 1990; Wiseman et al., 1992). Molekuli sa ovakvim osobinama mogu usporiti ćelijsku deobu smanjenjem fluidnosti membrane. *Ferreira* i saradnici (Ferreira et al., 2005) opisali su da poznati NSAIL povećavaju fluidnost membrana splenocita miševa na način zavisen od koncentracije. Zaključno, sumiranjem svih rezultata dobijenih tokom analiza, smatramo da otkriveni specifični modulatorni/imunosupresivni efekti izolovanih jedinjenja **3-5** mogu biti obećavajuća polazna tačka za dalje ispitivanje njihove aktivnosti. Predstojeće studije trebale bi se fokusirati na detaljnije razumevanje molekularnih mehanizama odgovornih za oštećenje membrane izazvano ovim jedinjenjima, kao i na procenu njihovog potencijala za terapijske primene.

5. IZVOD

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je hemijski sastav etarskih ulja i ekstrakata tri vrste jetrenjača, dve iz familije Porellaceae (*Porella platyphylla* i *P. cordaeana*), kao i vrste *Conocephalum conicum* iz familije Conocephalaceae. Etarska ulja su dobijena hidrodestilacijom koristeći Klevendžerov aparat, nakon čega su analizirana GC-MS metodom. Hromatografskim razdvajanjem etarskih ulja i ekstrakata izolovana su čista jedinjenja, čije su strukture određene kombinovanjem detaljnih spektralnih metoda (1D- i 2D-NMR, GC-MS, FTIR, HRMS, itd.) i hemijske analize. Neka od izolovanih jedinjenja predstavljaju nove prirodne proizvode. Biološka aktivnost i farmakološki potencijal sekundarnih metabolita ispitivani su različitim metodama na limfocitima pacova.

Dobijeni su sledeći rezultati:

- ❖ Iz etarskog ulja vrste *P. cordaeana* izolovana su dva nova seskviterpena. Prvo jedinjenje, nazvano α -furanopingvizanol, identifikovano je kao glavni sastojak etarskog ulja na osnovu detaljne NMR analize nakon izolovanja pomoću MPLC hromatografije. Drugo jedinjenje, označeno kao furanopingvizanon, predstavljalo je oksidacioni proizvod α -furanopingvizanola, čija je struktura potvrđena nakon oksidacije pomoću PCC reagensa i analize korišćenjem 1D i 2D NMR tehnika.
- ❖ Rezultati istraživanja imunomodulatorne aktivnosti α -furanopingvizanola i furanopingvizanona mogu se sumirati kako sledi:
 - a) Efekti α -furanopingvizanola
 - Pri koncentraciji od 5×10^{-8} M, α -furanopingvizanol je povećao vijabilnost ćelija u MTT testu, dok u TB i NR testovima nije zabeležen značajan uticaj na vijabilnost splenocita (SPC).
 - Koncentracija od 10^{-4} M izazvala je blastnu transformaciju SPC, dok su koncentracije od 10^{-8} M i 10^{-6} M ispoljile citotoksični efekat.
 - Mikroskopska analiza je potvrdila pojavu velikih izmenjenih limfocita (LYM) kod $49 \pm 7\%$ ćelija pri najvišim koncentracijama što, uz stimulaciju i aktivaciju LYM, sugeriše stimulaciju deobe ćelija.
 - Komet test nije pokazao genotoksičnost ni pri jednoj ispitivanoj koncentraciji.

- Niže koncentracije α -furanopingvizanola (1×10^{-8} M i 1×10^{-6} M) dovele su do smanjenja DNK, što ukazuje na potencijalni apoptotički mehanizam ćelijske smrti.

b) Efekti furanopingvizanona

- Veće koncentracije ovog jedinjenja izazvale su značajno smanjenje vijabilnosti ćelija u MTT i NR testovima, što je bilo praćeno redukcijom ćelijskog volumena, povećanjem broja apoptotičkih ćelija i zgrudnjavanjem ćelijskih ostataka.
- Komet test nije pokazao značajnu genotoksičnost nakon 24 časa tretmana, ali je smanjenje DNK i RNK ukazalo na citotoksični efekat zavisen od koncentracije, verovatno uzrokovan apoptozom.
- Nasuprot očekivanog, nije primećeno povećanje ili smanjenje ukupnih proteina, što bi moglo biti objašnjeno doprinosom apoptotičnih i dezintegriranih ćelija ukupnom sadržaju proteina.
- U TB testu, pri koncentraciji od 10^{-6} M, furanopingvizanon je smanjio vijabilnost za 35%, dok je deksametazon pri istoj koncentraciji smanjio vijabilnost za 50%.

Effekti α -furanopingvizanola i furanopingvizanona značajno variraju u zavisnosti od koncentracije. α -Furanopingvizanol pokazuje imunomodulatorni potencijal stimulacijom ćelijske deobe pri višim koncentracijama, dok niže koncentracije ukazuju na citotoksični efekat. S druge strane, furanopingvizanon deluje prvenstveno citotoksično, sa dominantnim apoptotičkim mehanizmom delovanja. Rezultati ukazuju na njihovu potencijalnu primenu u imunomodulaciji i istraživanju ćelijske biologije.

- ❖ Detaljne GC-MS analize etarskih ulja vrste *P. platyphylla*, prikupljenih sa područja Srbije (Veliki Kupci) i Bugarske (planina Maljevica), omogućile su identifikaciju ukupno 15 jedinjenja, koja su činila 57,2% i 92,1% sastava analiziranih uzoraka, respektivno. U uzorcima iz Srbije, seskviterpeni su činili 52,9%, dok su u uzorcima sakupljenim u Bugarskoj činili 76,9%. Dominantna jedinjenja uključuju pingvizanin (13% u uzorku iz Srbije, 41% u uzorku iz Bugarske), oksigenovane seskviterpene poput deoksopingvizona i(1*E*,5*E*)-germakra-1,5-dien-11-ol, te neoksisgenovane seskviterpene poput izolepidozena (10%) u srpskim uzorcima. Prisustvo α -furanopingvizanola, koji je prvobitno identifikovan

u *P. cordaeana* tokom prethodnog dela ove disertacije, potvrđeno je i u oba uzorka *P. platyphylla*, što dodatno ukazuje na sličnost između ovih sestrinskih klada. Značajne razlike između uzoraka ukazuju na hemijsku varijabilnost metabolita i naglašavaju pingvizanske seskviterpene kao ključni aspekt hemijskog profila vrste.

- ❖ Izolovanje i detaljna analiza hemijskog sastava dietil-etarskih ekstrakata vrste *C. conicum*, sa pet različitih staništa, omogućila je identifikaciju 43, 61, 56, 169 odnosno 168 sastojaka, sa udelom koji se kretao od 11,7%-83,4% od ukupno detektovanih jedinjenja. Dominantnu klasu jedinjenja činili su terpeni, uključujući 36 monoterpena i 65 seskviterpena. Među monoterpenima, sabinen i kamfen su bili najzastupljeniji, dok su od seskviterpena dominirali brazila-5(10),6-dien, aristola-1(10),8-dien i nardošina-7,9,11-trien. Oksigenovani seskviterpeni, kao što je konocefalenol, bili su značajno prisutni, dok je hemijska raznolikost ekstrakata dodatno istaknuta neravnomernom distribucijom aristolanskih i selinenskih seskviterpena, kao i metabolita germakranskog i biciklogermakrenskog skeleta. Posebnu pažnju privukla su nova seskviterpenska jedinjenja, uključujući derivat lepidozenskog skeleta, imenovan kao (1*Z*,4*E*)-lepidozal-1(10),4-dien-14-ol, i seskviterpenski diol germakranskog skeleta sa strukturom *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola. Dodatna analiza NMR spektra identifikovala je novo jedinjenje seskviterpenskog diola, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol, što ga čini još jednim novim prirodnim proizvodom. Oksidacijom novoidentifikovanog izolepidozen-14-ola potvrđeno je prisustvo izolepidozen-14-ala, čime je ispravljena prethodna literaturna greška koja je identifikovala ovo jedinjenje kao biciklogermakren-14-al. Izolovanje čistog konocefalenola, izvedeno tehnikom *dry flash* hromatografije, omogućilo je dodatnu potvrdu njegove strukture putem MS i NMR analiza, dok je detaljna asignacija signala doprinela razumevanju njegove hemijske prirode. Ova studija pružila je značajan doprinos unapređenju karakterizacije hemijskih profila vrste *C. conicum*, kroz identifikaciju novih prirodnih proizvoda i korekciju ranije pogrešno interpretiranih rezultata.
- ❖ Nakon identifikacije izolepidozen-14-ola, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diola, predložena je

potencijalna (bio)hemijska povezanost između ovih jedinjenja. Ova veza, koja uključuje izolepidozen kao tačku grananja ka humulanima i germakranima, mogla bi predstavljati novi biosintetički put, paralelan sa prihvaćenim putem ciklizacije farnezil-katjona do humulil-katjona (Croteau i Gundy, 1984; Yu et al., 2008). Slična povezanost biciklogermakrena i humulena ranije je sugerisana (Gonzalez et al., 2014). Multivarijantna statistička analiza podataka o sekundarnim metabolitima (Radulović et al., 2014) pokazala je značajne biosintetičke povezanosti. Statističko poređenje hemijskog sastava dietil-etarskih ekstrakata vrste *C. conicum* sa rezultatima Ludwiczuk i saradnika (2013) sprovedeno je pomoću PCA i AHC analize. Grafikon glavnih komponenti (PCA) uzoraka *C. conicum* grupiše derivate izolepidozena (G1), (biciklo)germakrana (G2) i brazilana (G3), što potvrđuje njihovu biosintetičku povezanost. Biciklogermakren-14-al, korigovan u izolepidozen-14-al, svrstava se u G1, zajedno sa ostalim derivatima izolepidozena. Pirsonova korelacija ukazuje na jaku povezanost između izolepidozena i njegovih oksidativnih derivata (izolepidozen-14-ol i izolepidozen-14-al), što verovatno potiče od hemoselektivne oksidacije. Hijerarhijskom klaster analizom (AHC) dobijeni dendrogram grupiše evropske uzorke (CC1–CC5 i L1–L4) u kladu I, dok se podklade razlikuju prema količinama konocefalenola i izolepidozena, koji su ključni hemotaksonomski markeri evropskih primeraka *C. conicum*.

- ❖ Za određivanje biološke/farmakološke aktivnosti izolepidozen-14-ola (**3**), *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola (**4**), *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diola (**5**) i konocefalenola, kulture primarnih limfocita pacova (SPC), tretirane su supstancama u trajanju od 24 i 48 h. Rezultati su pokazali da *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol ispoljava najjači citotoksični potencijal pri visokim koncentracijama, dok su *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol i izolepidozen-14-ol značajno smanjili vijabilnost SPC pri koncentracijama $\geq 1 \times 10^{-5}$ M. Samo najniža testirana koncentracija konocefalenola (1×10^{-7} M) nije pokazala značajan citotoksični efekat nakon dvadesetčetvoročasovne inkubacije. Pri nižim koncentracijama (1×10^{-7} do 1×10^{-5} M), izolepidozen-14-ol, *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol i konocefalenol inhibiraju ConA-stimulaciju T limfocita bez uticaja na vijabilnost, dok su na LPS-stimulaciju B limfocita viši koncentracioni opsezi *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diola, *rel*-(1(10)Z,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-

1(10),5-dien-7,14-diola i konocefalenola ispoljili citotoksične efekte. Niže koncentracije (1×10^{-7} do 1×10^{-5} M) ovih jedinjenja bile su, uz izolepidozen-14-ol (1×10^{-7} do 1×10^{-4} M), imunološki neutralne. TB-test je ukazao da izolepidozen-14-ol i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol pri koncentraciji 1×10^{-6} M mogu povećati permeabilnost ćelijske membrane, dok *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-dien-7,14-diol utiče na propustljivost membrane pri 1×10^{-7} M. Povećanje permeabilnosti ćelijskih membrana sugerše potencijalnu antikancerogenu upotrebu, omogućavajući eliminaciju tumorskih ćelija putem povećane osetljivosti membrane (Geurink et al., 2013). Izolepidozen-14-ol i *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germakra-1(10),5-dien-11,14-diol se izdvajaju kao najperspektivniji imunomodulatorni agensi, jer pri nižim koncentracijama ispoljavaju imunomodulatorne efekte, dok na višim koncentracijama pokazuju citotoksičnost. Ovi rezultati ukazuju na potencijal ovih jedinjenja za dalji razvoj u terapiji maligniteta, s obzirom na njihove efekte na membransku permeabilnost i inhibiciju LDH, ključne karakteristike antikancerogenih agenasa (Fiume et al., 2014; Jendrossek i Manerba, 2003).

6. SUMMARY

In this doctoral dissertation, the chemical composition of essential oils and extracts from three liverwort species was examined: two species from the family Porellaceae (*Porella platyphylla* and *Porella cordaeana*) and one species, *Conocephalum conicum*, from the family Conocephalaceae. Essential oils were obtained via hydrodistillation using a Clevenger apparatus and subsequently analyzed using GC-MS. Pure compounds were isolated through chromatographic separation of the essential oils and extracts, and their structures were determined by combining spectroscopic methods (1D- and 2D-NMR, GC-MS, FTIR, HRMS, etc.) and chemical transformations. Some of the isolated compounds represent new natural products. The biological activity and pharmacological potential of selected secondary metabolites were evaluated using various methods on rat lymphocytes.

The following results were obtained:

- ❖ From the essential oil of *P. cordaeana*, two new sesquiterpenes were isolated. The first compound, named α -furanopinguisanol, was identified as the main constituent of the essential oil based on detailed NMR analysis after isolation via MPLC chromatography. The second compound, designated as furanopinguisanon, was identified as an oxidation product of α -furanopinguisanol. Its structure was confirmed based on the oxidation of the alcohol with PCC reagent and analysis using 1D and 2D NMR techniques.
- ❖ The results of the immunomodulatory activity studies of α -furanopinguisanol and furanopinguisanon can be summarized as follows:
 - c) Effects of α -furanopinguisanol
 - At a concentration of 5×10^{-8} M, α -furanopinguisanol increased cell viability in the MTT assay, while no significant effect on splenocytes viability was observed in the TB and NR assays.
 - A concentration of 10^{-4} M induced blast transformation of splenocytes, whereas concentrations of 10^{-8} M and 10^{-6} M exhibited cytotoxic effects.
 - Microscopic analysis confirmed the presence of large transformed lymphocytes in $49 \pm 7\%$ of cells at the highest concentrations, suggesting cell division stimulation via lymphocyte activation.

- The comet assay did not reveal genotoxicity at any tested concentration.
- Lower concentrations of α -furanopinguisanol (1×10^{-8} M and 1×10^{-6} M) resulted in DNA quantity reduction, indicating a potential apoptotic mechanism of cell death.

d) Effects of furanopinguisanone

- Higher concentrations of this compound caused a significant reduction in cell viability in the MTT and NR assays, accompanied by a decrease in cell volume, an increase in apoptotic cells, and aggregation of cell debris.
- The comet assay did not show significant genotoxicity after 24 hours of treatment, but DNA and RNA amount reduction indicated a concentration-dependent cytotoxic effect, likely due to apoptosis.
- Contrary to expectations, no changes in total protein levels were observed, which could be explained by the contribution of apoptotic and disintegrated cells to the total protein content.
- In the TB assay, at a concentration of 10^{-6} M, furanopinguisanone reduced viability by 35%, while dexamethasone at the same concentration reduced viability by 50%.

The effects of α -furanopinguisanol and furanopinguisanone vary significantly depending on concentration. α -Furanopinguisanol demonstrates immunomodulatory potential by stimulating cell division at higher concentrations, while lower concentrations suggest a cytotoxic effect. Conversely, furanopinguisanone primarily exhibits cytotoxic effects with a dominant apoptotic mechanism of action. These findings suggest their potential applications in immunomodulation and cell biology research.

- ❖ Detailed GC-MS analyses of the essential oils of *P. platyphylla* collected from Serbia (Veliki Kupci) and Bulgaria (mountain Maljevica) enabled the identification of a total of 15 compounds, constituting 57.2% and 92.1% of the analyzed samples, respectively. In the Serbian samples, sesquiterpenes accounted for 52.9%, while in the Bulgarian samples, they represented 76.9%. Dominant compounds included pinguisanine (13% in the Serbian sample, 41% in the Bulgarian sample), oxygenated sesquiterpenes such as

deoxopinguisone and (1*E*,5*E*)-germacra-1,5-dien-11-ol, and non-oxygenated sesquiterpenes like isolepidozene (10%) in the Serbian samples. The presence of α -furanopinguisanol, initially identified in *P. cordaeana* during the earlier part of this dissertation, was also confirmed in both *P. platyphylla* samples, further highlighting the similarity between these sister clades. Significant differences between the samples indicate the chemical variability of metabolites and emphasize pinguisane sesquiterpenes as a key aspect of the species chemical profile.

- ❖ The isolation and detailed analysis of the chemical composition of diethyl-ether extracts of *Conocephalum conicum*, collected from five localities, enabled the identification of 43, 61, 56, 169, and 168 compounds, with their proportions ranging from 11.7% to 83.4% of the total detected compounds. The dominant class of compounds were terpenes, including 36 monoterpenes and 65 sesquiterpenes. Among the monoterpenes, sabinene and camphene were the most abundant, while the dominant sesquiterpenes were brasila-5(10),6-diene, aristola-1(10),8-diene, and nardosina-7,9,11-triene. Oxygenated sesquiterpenes, such as conocephalenol, were present in significant amounts, while the chemical diversity of the extracts was further emphasized by the uneven distribution of aristolane- and selinene-type sesquiterpenes, as well as metabolites of the germacrane and bicyclgermacrane skeleton. Special attention was drawn to new sesquiterpene compounds, including a derivative of the lepidozane skeleton, named (1*Z*,4*E*)-lepidoza-1(10),4-diene-14-ol, and a sesquiterpene diol of the germacrane skeleton with the structure *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol. Additional NMR spectral analysis identified a new sesquiterpene diol compound, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-diene-7,14-diol. Oxidation of the newly identified isolepidozen-14-ol confirmed the presence of isolepidozen-14-al, thereby correcting a previous literature error wherein this compound was identified as bicyclgermacren-14-al. The isolation of pure conocephalenol, carried out using dry-flash chromatography, enabled further confirmation of its structure through MS and NMR analyses, while the detailed signal assignment contributed to the understanding its chemical nature. This study made a significant contribution to the characterization of the chemical profiles of *C. conicum* species by identifying new natural products and correcting previously misinterpreted results.

- ❖ After the identification of isolepidozen-14-ol, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol, and *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-diene-7,14-diol, a potential (bio)chemical relationship between these compounds was proposed. This connection, which involves isolepidozene as the branching point towards humulanes and germacrane, could represent a new biosynthetic pathway, parallel to the accepted pathway of farnesyl cation cyclization to humulyl cation (Croteau and Gundy, 1984; Yu et al., 2008). A similar relationship between bicyclogermacrane and humulane had been previously suggested (Gonzalez et al., 2014). Multivariate statistical analysis of the secondary metabolite data (Radulović et al., 2014) revealed significant biosynthetic linkages. A statistical comparison of the chemical composition of diethyl-ether extracts from *C. conicum* with the results from Ludwiczuk and colleagues (2013) was carried out using PCA and AHC analysis. The PCA plot of *C. conicum* samples groups the isolepidozane derivatives (G1), (bicyclo)germacrane (G2), and brasilane (G3), confirming their biosynthetic connection. Bicyclogermacren-14-al, corrected to isolepidozen-14-al, is classified in G1, along with other isolepidozane derivatives. Pearson's correlation indicates a strong relationship between isolepidozane and its oxidative derivatives (isolepidozen-14-ol and isolepidozen-14-al), likely arising from chemoselective oxidation. The AHC dendrogram groups European samples (CC1–CC5 and L1–L4) in clade I, with subclades differing according to the amounts of conocephalenol and isolepidozene, which are key chemotaxonomic markers of European *C. conicum* specimens.
- ❖ To determine the biological/pharmacological activity of isolepidozen-14-ol (3), *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol (4), *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-diene-7,14-diol (5), and conocephalenol, rat primary lymphocyte cultures were treated with the substances for 24 and 48 hours. The results showed that *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-diene-7,14-diol exhibited the strongest cytotoxic potential at the highest tested concentrations, while *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol and isolepidozen-14-ol significantly reduced splenocyte viability at concentrations $\geq 1 \times 10^{-5}$ M. Only the lowest tested concentration of conocephalenol (1×10^{-7} M) did not show a significant cytotoxic effect after a 24-hour incubation. At lower concentrations (1×10^{-7} to 1×10^{-5} M), isolepidozen-14-ol, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol, and conocephalenol inhibited ConA-stimulated T lymphocytes

without affecting viability, while higher concentration ranges of *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol, *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-diene-7,14-diol, and conocephalenol exhibited cytotoxic effects on LPS-stimulated B lymphocytes. Lower concentrations (1×10^{-7} to 1×10^{-5} M) of these compounds, along with isolepidozen-14-ol (1×10^{-7} to 1×10^{-4} M), were immunologically neutral. The TB test indicated that isolepidozen-14-ol and *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol at a concentration of 1×10^{-6} M could increase cell membrane permeability, while *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-humula-1(10),5-diene-7,14-diol affected membrane permeability at 1×10^{-7} M. The increase in membrane permeability suggests potential anticancer use, enabling the elimination of tumor cells via enhanced membrane sensitivity (Geurink et al., 2013). Isolepidozen-14-ol and *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-germacra-1(10),5-diene-11,14-diol emerge as the most promising immunomodulatory agents, as they exhibit immunomodulatory effects at lower concentrations, while at higher concentrations, they show cytotoxicity. These results indicate the potential of these compounds for further development in cancer therapy, considering their effects on membrane permeability and LDH inhibition, key characteristics of anticancer agents (Fiume et al., 2014; Jendrossek and Manerba, 2003).

7. LITERATURA

- Abad, A., Agulló, C., Cunat, A. C., & Perni, R. H. (1999). Enantioselective Synthesis of Herbertane Sesquiterpenes. Synthesis of (-)-Herbertene and (-)- α -Herbertenol. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(5), 1741-1744.
- Abay, G., Karakoç, Ö. C., Tüfekçi, A. R., Koldaş, S., & Demirtas, I. (2012). Insecticidal activity of *Hypnum cupressiforme* (Bryophyta) against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 51, 6-10.
- Abay, G., Altun, M., Karakoc, O. C., Gul, F., & Demirtas, I. (2013). Insecticidal activity of fatty acid-rich Turkish bryophyte extracts against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16(10), 806-816.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology*. 8th Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 199-337.
- Adam, K. P., & Becker, H. (1993). Phenanthrenes and other phenolics from *in vitro* cultures of *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry*, 35(1), 139-143.
- Adams, R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, 4th Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 1-804.
- Adio, A. M. (2009). Germacrenes A–E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. *Tetrahedron*, 65(8), 1533-1552.
- Agarwal, R., Diwanay, S., Patki, P., & Patwardhan, B. (1999). Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(1), 27-35.
- Akiyama, H., Hiraoka, T., & Inoue, S. (1998). Chromosome numbers and karyotypes of three sibling species of the *Conocephalum conicum* complex in Japan. *Bryological research*, 7(4), 105-108.
- Akiyama, H., & Odrzykoski, I. J. (2020). Phylogenetic re-examination of the genus *Conocephalum* Hill.(Marchantiales: Conocephalaceae). *Bryophyte Diversity and Evolution*, 42(1), 1-18.
- Alam, A. (2012). Some Indian bryophytes known for their biologically active compounds. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3(2), 239-246.
- Altman, S. A., Randers, L., & Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology Progress*, 9(6), 671-674.
- Andersen, N. H., Ohta, Y., Liu, C. B., Kramer, C. M., Allison, K., & Huneck, S. (1977). Sesquiterpenes of thalloid liverworts of the genera *Conocephalum*, *Lunularia*, *Metzgeria* and *Riccardia*. *Phytochemistry*, 16(11), 1727-1729.
- Ando, H. (1983). Use of bryophytes in China 2. Mosses indispensable to the production of Chinese gallnuts. *Proceedings of the Bryological Society of Japan*, 3, 124-125.

Anton, H., Kraut, L., Mues, R., & Maria, I. M. (1997). Phenanthrenes and bibenzyls from a *Plagiochila* species. *Phytochemistry*, 46(6), 1069-1075.

Anton, H., Schoeneborn, R., & Mues, R. (1999). Bibenzyls and Bisbibenzyls from a Neotropical *Plagiochila* Species. *Phytochemistry*, 52, 1639.

Aponte, J. C., Yang, H., Vaisberg, A. J., Castillo, D., Málaga, E., Verástegui, M., Casson, L. K., Stivers, N., Bates, P. J., Rojas, R., Fernandez, I., Lewis, W. H., Sarasara, C., Sauvian, M., Gilman, R. H., & Hammond, G. B. (2010). Cytotoxic and anti-infective sesquiterpenes present in *Plagiochila disticha* (Plagiochilaceae) and *Ambrosia peruviana* (Asteraceae). *Planta Medica*, 76(07), 705-707.

Arbiyanti, H. (1991). *Chemical Constituents of the Liverworts Frullanoides and Trocholejeunea Genera*. Master Thesis, Tokushima Bunri University.

Ariyo, O. A., Shonubi, O. O., Oyesiku, O. O., & Akande, A. O. (2011). Antimicrobial activity of the indigenous liverwort, *Riccia nigerica* Jones, from Southwestern Nigeria. *Evansia*, 28(2), 43-48.

Asakawa, Y., Toyota, M., & Aratani, T. (1976)a. Un nouvel alcool sesquiterpénique de *Porella vernicosa* et *Porella densifolia* (hépatiques). *Tetrahedron Letters*, 17(40), 3619-3622.

Asakawa, Y., Toyota, M., Uemoto, M., & Aratani, T. (1976)b. Sesquiterpenes of six *Porella* species (Hepaticae). *Phytochemistry*, 15(12), 1929-1931.

Asakawa, Y., Takemoto, T., Toyota, M., & Aratani, T. (1977). Sacculatal and isosacculatal, two new exceptional diterpenedials from the liverwort, *Trichocoleopsis sacculata*. *Tetrahedron Letters*, 18(16), 1407-1410.

Asakawa, Y., Toyota, M., & Takemoto, T. (1978). Sesquiterpenes from *Porella* species. *Phytochemistry*, 17(3), 457-460.

Asakawa, Y., Huneck, S., Toyota, M., Takemoto, T., & Suire, S. (1979)a. Mono- and sesquiterpenes from *Porella arboris-vitae*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 46, 163-167.

Asakawa, Y., Tokunaga, N., Toyota, M., Takemoto, T., Hattori, S., Mizutani, M., & Suire, C. (1979)b. Chemosystematics of bryophytes II. The distribution of terpenoids in Hepaticae and Anthocerotae. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 46, 67-76.

Asakawa, Y., Tokunga, N., Toyota, M., Takemoto, T., & Suire, C. (1979)c. Chemosystematics of bryophytes I. The distribution of terpenoid of Bryophytes. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 45, 395-407

Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., & Suire, C. (1979)d. Pinguisanin, pinguisanolide and β -pinguisenediol, three new pinguisane-type sesquiterpenes from *Porella platyphylla*. *Phytochemistry*, 18(8), 1349-1353.

Asakawa, Y., Toyota, M., & Takemoto, T. (1979)e. New diterpenes from *Porella perrottetiana*. *Phytochemistry*, 18(10), 1681-1685.

Asakawa, Y., & Takemoto, T. (1979). Sesquiterpene lactones of *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 18(2), 285-288.

Asakawa, Y., Suire, C., Toyota, M., Tokunaga, N., Takemoto, T., Hattori, S., & Mizutani, M. (1980)a. Chemosystematics of bryophytes V. The distribution of terpenoids and aromatic compounds in European and Japanese Hepaticae. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 48, 285-303.

Asakawa, Y., Toyota, M., Kano, M., & Takemoto, T. (1980)b. Dehydropinguisanin, dehydropinguisenol and pinguisenol, three pinguisane-type sesquiterpenes from *Trocholejeunea sandvicensis*. *Phytochemistry*, 19(12), 2651-2654.

Asakawa, Y., Toyota, M., & Takemoto, T. (1980)c. Four new sacculatane-type diterpenoids from *Trichocoleopsis sacculata* and *Pellia endiviaefolia*. *Phytochemistry*, 19(8), 1799-1803.

Asakawa, Y., Yamamura, A., Waki, T., & Takemoto, T. (1980)d. Caespitenone, a new cyclopropanoid pseudoguaiane and *ent*-sesquiterpenes from *Porella* species. *Phytochemistry*, 19(4), 603-607.

Asakawa, Y., Matsuda, R., & Suire, C. (1981)a. Pinguisane-type sesquiterpenes from *Ptilidium pulcherrimum*. *Phytochemistry*, 20(6), 1427-1428.

Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., & Mues, R. (1981)b. Aromatic esters and terpenoids of the liverworts in the genera *Trichocolea*, *Neotrichocolea* and *Trichocoleopsis*. *Phytochemistry*, 20(12), 2695-2699.

Asakawa, Y., Toyota, M., & Takemoto, T. (1981)c. Two guaiane-type sesquiterpene lactones and their related sesquiterpene lactones from *Porella japonica*. *Phytochemistry*, 20(2), 257-261.

Asakawa, Y. (1982)a. Chemical constituents of the Hepaticae, In: Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W. (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Vol. 42). Springer, Vienna, 1-285.

Asakawa, Y. (1982)b. Terpenoids and aromatic compounds as chemosystematic indicators in Hepaticae and Anthocerotae. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 53, 283-293.

Asakawa, Y., Takikawa, K., Toyota, M., Ueda, A., Tori, M., & Kumar, S. S. (1987). Sesqui- and Diterpenoids from the Liverworts *Porella densifolia* subsp. *appendiculata* and *Porella densifolia* var. *fallax*. *Phytochemistry*, 26(4), 1019-1022.

Asakawa, Y. (1988). Chemical evolution of mono- and sesquiterpenoids of liverworts. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 64, 97-108.

Asakawa, Y. (1990). In *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy*, D. H. Zinsmeister, R. Mues (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 369-410.

Asakawa, Y. (1994). Highlights in phytochemistry of hepaticae-biologically active terpenoids and aromatic compounds. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10-11), 2193-2196.

Asakawa, Y. (1995)a. Chemical constituents of the Bryophytes. In: Herz, W., Kirby, W.B., Moore, R.E., Steglich, W., Tamm, Ch. (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* (Vol. 65). Springer, Vienna, 1-562.

Asakawa, Y., Toyota, M., Tanaka, H., Hashimoto, T., & Joulain, D. (1995)b. Chemical Constituents of an Unidentified Malaysian Liverwort *Asterella* (?) Species. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 78, 183-188.

Asakawa, Y., Toyota, M., Nakaishi, E., & Tada, Y. (1996). Distribution of terpenoids and aromatic compounds in New Zealand liverworts. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 80, 271-295.

Asakawa, Y., Toyota, M., Nakaishi, E., & Taka, Y. (1997). Distribution of terpenoids and aromatic compounds in the liverwort *Isotachis* species. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 83, 257-263.

Asakawa, Y., Toyota, M., & Nagashima, F. (2001). Sesquiterpene lactones and acetogenin lactones from the Hepaticae and chemosystematics of the liverworts *Frullania*, *Plagiochila* and *Porella*. *Heterocycles*, 54(2), 1057-1093.

Asakawa, Y. (2004). Chemosystematics of the Hepaticae. *Phytochemistry*, 65(6), 623-669.

Asakawa, Y. (2007). Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, 79(4), 557-580.

Asakawa, Y., Toyota, M., Baser, K. H. C., von Reuß, S. H., König, W. A., Erol, B., Ozenoglu, H., & Gokler, I. (2007). Volatile components of Turkish liverworts. In *51st Symposium on Chemistry of Terpenes, Essential Oils and Aromatics* (Vol. 263). Nagahama, Japan: Symposium Papers.

Asakawa, Y., Toyota, M., Nagashima, F., & Hashimoto, T. (2008). Chemical constituents of selected Japanese and New Zealand liverworts. *Natural Product Communications*, 3(2), 1934578X0800300238.

Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2009). Bryophytes: bio-and chemical diversity, bioactivity and chemosystematics. *Heterocycles*, 77(1), 99-150.

Asakawa, Y. (2012). Liverworts-potential source of medicinal compounds. *Medicinal & Aromatic Plants*, 1, 1-2.

Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2013)a. Chemical constituents of bryophytes: Bio-and chemical diversity, biological activity, and chemosystematics. In A. D. Kinghorn, H. Falk, & J. Kobayashi (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Vol. 95). Springer-Verlag, 1-796.

Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2013)b. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, 91, 52-80.

Asakawa, Y. (2015). Search for new liverwort constituents of biological interest. *Natural Products: Recent Advances*, 25-92.

- Asakawa, Y., Baser, K. H. C., Erol, B., Von Reuß, S., König, W. A., Ozenoglu, H., & Gökler, I. (2018). Volatile components of some selected Turkish liverworts. *Natural Product Communications*, 13(7), 1934578X1801300729.
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E. & Brito-Melo, G. E. A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47, 307-315.
- Ayer, W. A., & Law, D. A. (1962) Lycopodium Alkaloids. IV. The Constitution and Stereochemistry of *Lycoclavine*, an Alkaloid of *Lycopodium clavatum* var. *megastachyon*. *Canadian Journal of Chemistry*, 40(11), 2088-2100.
- Azuelo, A. G., Sariana, L. G., & Pabualan, M. P. (2011). Some medicinal bryophytes: their ethnobotanical uses and morphology. *Asian Journal of Biodiversity*, 2(1), 50-80.
- Baek, S. H., Perry, N. B., Weavers, R. T., & Tangney, R. S. (1998). Geranyl phenyl ethers from the New Zealand liverwort *Trichocolea hatcheri*. *Journal of Natural Products*, 61(1), 126-129.
- Baek, S. H., Perry, N. B., & Lorimer, S. D. (2003). *ent*-Costunolide from the liverwort *Hepatostolonophora paucistipula*. *Journal of Chemical Research*, 2003(1), 14-15.
- Baek, S. H., Phipps, R. K., & Perry, N. B. (2004). Antimicrobial Chlorinated Bibenzyls from the Liverwort *Riccardia marginata*. *Journal of Natural Products*, 67(4), 718-720.
- Baker, R., Selwood, D. L., Swain, C. J., Webster, N. M., & Hirshfield, J. (1988). Synthetic studies towards the pinguinanes; synthesis of 4-*epi*-pinguisone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (3), 471-480.
- Barlow, A. J., Compton, B. J., Hertewich, U., Lorimer, S. D., & Weavers, R. T. (2005). Sesquiterpenes from the New Zealand Liverwort *Lepidolaena hodgsoniae*. *Journal of Natural Products*, 68(6), 825-831.
- Barrero, A. F., Alvarez-Manzaneda, E., & Lara, A. (1996). Novel tricyclic sesquiterpenes from *Juniperus thurifera* L. Chemical confirmation of the duprezianane skeleton. *Tetrahedron Letters*, 37(21), 3757-3760.
- Barrero, A. F., Arteaga, P., Quílez, J. F., Rodríguez, I., & Herrador, M. M. (1997). Sesquiterpene glycosides and phenylpropanoid esters from *Phonus arborescens* (*Carthamus arborescens*). *Journal of Natural Products*, 60(10), 1026-1030.
- Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Lara, A., & Cortes, M. (2000). Chemical composition of the essential oil from *Drimys winteri* Forst. wood. *Journal of Essential Oil Research*, 12(6), 685-688.
- Bartholomew-Began, S. E. (1991). A morphogenetic re-evaluation of *Haplomitrium* Nees (Hepatophyta). *Bryophytorum Bibliotheca*, 41, 1-297.
- Basar, S., Koch, A., & König, W. A. (2001). A verticillane-type diterpene from *Boswellia carterii* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(5), 315-318.

- Bascones-Martinez, A., Mattila, R., Gomez-Font, R., & Meurman, J. H. (2013). Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 19(1), e24.
- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. A., & Cobianchi, R. C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 52(8), 1479-1482.
- Basile, A., di Nuzzo, R. A., Capasso, C., Sorbo, S., Capasso, A., & Carginale, V. (2005). Effect of cadmium on gene expression in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Gene*, 356, 153-159.
- Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Cardi, M., & Esposito, S. (2013). Ultrastructural changes and Heat Shock Proteins 70 induced by atmospheric pollution are similar to the effects observed under in vitro heavy metals stress in *Conocephalum conicum* (Marchantiales–Bryophyta). *Environmental Pollution*, 182, 209-216.
- Belcik, F. P., & Wiegner, N. (1980). Antimicrobial activities or antibiosis of certain eastern US liverwort, lichen and moss extracts. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 96, 94.
- Beneš, I., Beizae, N., Vaněk, T., Váňa, J., & Herout, V. (1981). Campesteryl behenate, a chemical character of the liverwort genus *Calypogeia*. *Phytochemistry*, 20(10), 2438-2439.
- Benešová, V., Samek, Z., Herout, V., & Šorm, F. (1969)a. On terpenes. CXCVIII. Isolation and structure of pinguisone from *Aneura pinguis* (L.) Dum. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 34(2), 582-592.
- Benešová, V., Herout, V., & Šorm, F. (1969). Plant substances. XXX. Components of liverworts (*Hepaticae*) *Aneura pinguis* (L.) Dum., *Riccardia sinuata* (Hook.) Trev., *R. incurvata* Lindb., and *Conocephalum conicum* (L.) Underw. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 34(6), 1810–1814.
- Bendre, A. M., & Kumar, A. (2010). *Textbook of Practical Botany* (Vol. 2). Meerut, India: Global Media, 1-452.
- Berger, S., & Braun, S. (2004). *200 and more NMR experiments*. Weinheim: Wiley-Vch, 305-307.
- Bernasconi, S., Ferrari, M., Gariboldi, P., Jommi, G., Sisti, M., & Destro, R. (1981). Synthetic study of pinguisane terpenoids. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1994-2001.
- Berthelot, M. & André, G. (1891). Sur l'odeur propre de la terre. *Comptes Rendus*, 112, 598–599.
- Blake, C. A., Nair-Menon, J. U., & Campbell, G. T. (1997). Estrogen can protect splenocytes from the toxic effects of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol. *Endocrine*, 6, 243-249.
- Bland, J. M. (1971). *Forests of Lilliput: The realm of mosses and lichens*. Prentice-Hall, Inc, 1-210
- Bläs, B., Zapp, J., & Becker, H. (2004). *ent*-Clerodane diterpenes and other constituents from the liverwort *Adelanthus lindenbergerianus* (Lehm.) Mitt. *Phytochemistry*, 65(1), 127-137.

- Boisselier-Dubayle, M. C., Lambourdiere, J., & Bischler, H. (1998). The leafy liverwort *Porella baueri* (Porellaceae) is an allopolyploid. *Plant Systematics and Evolution*, 210(3), 175-197.
- Borovichev, E. A., Kalinauskaite, N., & Konstantinova, N. A. (2009). On the distribution of *Conocephalum conicum* and *C. salebrosum* (Marchantiophyta) in Russia. *Arctoa*, 18, 115-120.
- Bovi Mitre, G., Kamiya, N., Bardón, A., & Asakawa, Y. (2004). Africane-type sesquiterpenoids from the Argentine liverwort *Porella swartziana* and their antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, 67(1), 31-36.
- Bramwell, A. F., Crombie, L., Hemesley, P., Pattenden, G., Elliott, M., & Janes, N. F. (1969). Nuclear magnetic resonance spectra of natural pyrethrins and related compounds. *Tetrahedron*, 25(8), 1727-1741.
- Brandt, M. (1995). *Der Ursprung des aufrechten Ganges: zur Fortbewegung der plio-pleistozänen Hominiden*. Hänssler, p 168.
- Braun, N. A., Meier, M., Schmaus, G., Hölscher, B., & Pickenhagen, W. (2003). Enantioselectivity in Odor Perception: Synthesis and Olfactory Properties of Iso- β -Bisabolol, a New Natural Product. *Helvetica Chimica Acta*, 86(7), 2698-2708.
- Brémond, P., Vanthuyne, N., & Audran, G. (2009). Synthesis of (+)-striatene: confirmation of its stereostructure. *Tetrahedron Letters*, 50(41), 5723-5725.
- Buchanan, M. (1994). *Natural products from the hepaticae* (PhD thesis). University of Glasgow, Faculty of Science, Scotland.
- Buchanan, M. S., Connolly, J. D., & Rycroft, D. S. (1996). Pinguisane and sacculatane terpenoids from the liverwort *Porella platyphylla*. *Phytochemistry*, 43(6), 1249-1253.
- Bukvički, D., Gottardi, D., Veljic, M., Marin, P. D., Vannini, L., & Guerzoni, M. E. (2012). Identification of volatile components of liverwort (*Porella cordaeana*) extracts using GC/MS-SPME and their antimicrobial activity. *Molecules*, 17(6), 6982-6995.
- Burger, C., & Vitetta, E. S. (1991). The response of B cells in spleen, Peyer's patches, and lymph nodes to LPS and IL-4. *Cellular immunology*, 138(1), 35-43.
- Bungert, M., Gabler, J., Adam, K. P., Zapp, J., & Becker, H. (1998). Pinguisane sesquiterpenes from the liverwort *Porella navicularis*. *Phytochemistry*, 49(4), 1079-1083.
- Burgess, E. J., Larsen, L., & Perry, N. B. (2000). A Cytotoxic Sesquiterpene Caffate from the Liverwort *Bazzania novae-zelandiae*. *Journal of natural products*, 63(4), 537-539.
- Caldicott, A. B., & Eglinton, G. (1976). Cutin acids from bryophytes: an ω -1 hydroxy alkanoic acid in two liverwort species. *Phytochemistry*, 15(7), 1139-1143.
- Campbell, E. O., Markham, K. R., Moore, N. A., Porter, L. J., & Wallace, J. W. (1979). Taxonomic and phylogenetic implications of comparative flavonoid chemistry of species in the family Marchantiaceae. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 45, 185.

- Cane, D. E., He, X., Kobayashi, S., Ōmura, S., & Ikeda, H. (2006). Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase. *The Journal of Antibiotics*, 59(8), 471-479.
- Carginale, V., Sorbo, S., Capasso, C., Trinchella, F., Cafiero, G., & Basile, A. (2004). Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma*, 223(1), 53-61.
- Casas, C., Bruges, M., & Infante, M. (2009). *Handbook of liverworts and hornworts of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands*. Institut d'Estudis Catalans; Secció de Ciències Biològiques. Barcelona, 1-177.
- Chandra, S., Chandra, D., Barh, A., Pandey, R. K., & Sharma, I. P. (2017). Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 94-98.
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro*, 12(3), 251-258.
- Chiu, P. L., Patterson, G. W., & Fenner, G. P. (1985). Sterols of bryophytes. *Phytochemistry*, 24(2), 263-266.
- Clarke, R., Van Den Berg, H. W., & Murphy, R. F. (1990). Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 β -estradiol. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(21), 1702-1705.
- Clarke, P. A., Black, R. J., & Blake, A. J. (2006). Enantioselective synthesis of the bicyclo [4.3. 0] nonane ring system of the pinguisane-type sesquiterpenoids via a Brønsted acid promoted transannular enol alkylation. *Tetrahedron Letters*, 47(9), 1453-1455.
- Cockerill, A. F., Davies, G. L., Harden, R. C., & Rackham, D. M. (1973). Lanthanide shift reagents for nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Reviews*, 73(6), 553-588.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith C.C., & Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151.
- Connolly, J. D. (1988). New compounds from the Euphorbiaceae, the Meliaceae and Hepaticae. In A. Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry: Structure Elucidation (Part A)* (Vol. 2). Elsevier, 273-274.
- Connolly, J. D. (1990). Monoterpenoids and sesquiterpenoids from the Hepaticae. In H. D. Zinsmeister & R. Mues (Eds.), *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Clarendon Press, Oxford University Press, p 41.
- Connolly, J. D., Rycroft, D. S., Srivastava, D. L., Cole, W. J., Ifeadike, P., Kimbu, S. F., Singh, J., Hughes, M., Thom, C., Gerhard, U., Organ, A. J., Smith, J. R., & Harrison, L. J. (1999). Aromatic compounds from the liverwort *Plagiochila spinulosa*. *Phytochemistry*, 50(7), 1159-1165.

- Corda, A. J. C. (1829). Genera Hepaticarum. In P. M. Opiz (Ed.), *Naturalientausch [12] Beiträge zur Naturgeschichte*. C. W. Enders, 643–655.
- Cossy, J., BouzBouz, S., & Hakiki, A. (1997). A very short and efficient synthesis of (+)-conocephalenol. *Tetrahedron Letters*, 38(51), 8853-8854.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Coulerie, P., Thouvenot, L., Nour, M., & Asakawa, Y. (2015). Chemical originalities of New Caledonian liverworts from Lejeuneaceae family. *Natural Product Communications*, 10(9), 1934578X1501000903
- Crandall-Stotler, B., & Stotler, R. E. (2000). Morphology and classification of Marchantiophyta. In A. J. Shaw & B. Goffinet (Eds.), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, 21.
- Crandall-Stotler, B., Stotler, R. E., & Long, D. G. (2008). Morphology and classification of the *Marchantiophyta*. In B. Goffinet & A. J. Shaw (Eds.), *Bryophyte Biology* (2nd ed.). Cambridge University Press, 1.
- Croteau, R., & Gundy, A. (1984). Cyclization of farnesyl pyrophosphate to the sesquiterpene olefins humulene and caryophyllene by an enzyme system from sage (*Salvia officinalis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 233(2), 838-841.
- Cullmann, F., Adam, K. P., Zapp, J., & Becker, H. (1996). Pelliatin, a macrocyclic lignan derivative from *Pellia epiphylla*. *Phytochemistry*, 41(2), 611-615.
- Cullmann, F., & Becker, H. (1999)a. Lignans from the liverwort *Lepicolea ochroleuca*. *Phytochemistry*, 52(8), 1651-1656.
- Cullmann, F., & Becker, H. (1999)b. Sesquiterpenoids from the Liverwort *Porella canariensis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54(3-4), 151-155.
- Dai, C. (2015). A chinese medicine composition for treating tuberculosis of chest wall. China, CN104367814.
- Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., & Dubourdieu, D. (2000). Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4835-4838.
- Degola, F., De Benedictis, M., Petraglia, A., Massimi, A., Fattorini, L., Sorbo, S., Basile, A., & Sanità di Toppi, L. (2014). A Cd/Fe/Zn-responsive phytochelatin synthase is constitutively present in the ancient liverwort *Lunularia cruciata* (L.) Dumort. *Plant and Cell Physiology*, 55(11), 1884-1891.
- Deng, X., Wang, X., & Andersson, R. (1996). Alterations in endothelial barrier permeability in multiple organs during overactivation of macrophages in rats. *Shock (Augusta, Ga.)*, 6(2), 126–133.

- Dickschat, J. S., Pahirulzaman, K. A., Rabe, P., & Klapschinski, T. A. (2014). An improved technique for the rapid chemical characterisation of bacterial terpene cyclases. *ChemBioChem*, 15(6), 810-814.
- Dillenius, J. J. (1741). *Historia muscorum*. Oxford, UK, Millan, p. 576.
- Dinarello, C. A. (2010). Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*, 140(6), 935-950.
- Ding, H. (1982). Medicinal spore-bearing plants of China. *Shanghai Science and Technology Press, Shanghai*, 1-409.
- Di Sabato, G., Hall, J. M., & Thompson, L. (1987). T cell mitogens and polyclonal B cell activators. In *Methods in enzymology* (Vol. 150). Academic Press, 3-17.
- Duckett, J. G., Ligrone, R., Andrews, N., & Renzaglia, K. S. (2000). The enigma of pegged and smooth rhizoids in marchantialean hepatics: A functional explanation. *American Journal of Botany*, 87(6), 6.
- Dumortier, B. C. J. (1822). *Commentationes botanicae*. Ch. Casterman-Dieu.
- Dumortier, B. C. J. (1835). *Recueil d'Observations sur les Jungermanniacées* 14. J.-A. Blanquart, Tournay, 27.
- Dziarski, R. (1982). Preferential induction of autoantibody secretion in polyclonal activation by peptidoglycan and lipopolysaccharide. I. *In vitro* studies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 128(3), 1018-1025.
- Epstein, L. B., & Stohlman Jr, F. (1964). RNA synthesis in cultures of normal human peripheral blood. *Blood*, 24(1), 69-75.
- Espiritu, R. A. (2021). Repairing plasma membrane damage in regulated necrotic cell death. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2751-2759.
- Feld, H., Rycroft, D. S., & Zapp, J. (2004). Chromenes and prenylated benzoic acid derivatives from the liverwort *Pedinophyllum interruptum*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 59(7), 825-828.
- Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L., Cordeiro-da-Silva, A., Tavares, J., & Reis, S. (2005). Effect of anti-inflammatory drugs on splenocyte membrane fluidity. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 144-149.
- Figueiredo, A. C., Sim-Sim, M., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Santos, P. A., Fontinha, S. S., Schripsema, J., Deans, S. G., & Scheffer, J. J. (2002). Composition of the essential oil from the liverwort *Marchesinia mackaii* (Hook.) SF Gray grown in Portugal. *Journal of Essential Oil Research*, 14(6), 439-442.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J.G., Pedro, L. G., Fontinha, S. S., Sim-Sim, M., Sergio, C., Luis, L., & Scheffer, J. J. C. (2006). *Asterella africana* (Mont.) A. Evans grown on Madeira and in mainland Portugal: morphological data and composition of the essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(3), 534-538.

- Fiume, L., Manerba, M., Vettrano, M., & Di Stefano, G. (2014). Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*, 6(4), 429-445.
- Flowers, S. (1957). Ethnobotany of the Goshute Indians of Utah. *The Bryologist*, 60(1), 11-14.
- Forrest, L. L., Davis, E. C., Long, D. G., Crandall-Stotler, B. J., Clark, A., & Hollingsworth, M. L. (2006). Unraveling the evolutionary history of the liverworts (Marchantiophyta): multiple taxa, genomes and analyses. *The Bryologist*, 109(3), 303-334.
- Frahm, J. P. (2004). Recent developments of commercial products from bryophytes. *The Bryologist*, 107(3), 277-283.
- Fujita, Y., Ueda, T., & Ono, T. (1956). Study on essential oils of Hepaticae 1. Essential oils of *Bazzania pompeana*. *Journal of the Japanese Chemical Society*, 77, 400-401.
- Fukuyama, Y., & Kodama, M. (1996). Search for novel neurotrophic factor-like substances in natural products. *FFI J*, 169, 45-56.
- Fukuyama, Y., Tori, M., Wakamatsu, M., & Asakawa, Y. (1988). Norpinguisone methyl-ester and norpinguisanolide, pinguisane-type norsequisiterpenoids from *Porella elegantula*. *Phytochemistry*, 27(11), 3557-3561.
- Fukuyama, Y., Matsumoto, K., Tono, Y., Yokoyama, R., Takahashi, H., Minami, H., Okazaki, H. & Mitsumoto, Y. (2001). Total syntheses of neuroprotective mastigophorenes A and B. *Tetrahedron*, 57(33), 7127-7135.
- Gambacorta, A., Botta, M., & Turchetta, S. (1988). Bicyclo [3.3.1]nonane approach to pinguisane terpenoids: Total synthesis of ($\pm$) pinguisone. *Tetrahedron*, 44(15), 4837-4846.
- Ganßer, D., Pollak, F. C., & Berger, R. G. (1995). A sesquiterpene alcohol from *Streptomyces citreus* CBS 109.60. *Journal of Natural Products*, 58(11), 1790-1793.
- Gauvin-Bialecki, A., Ah-Peng, C., Smadja, J., & Strasberg, D. (2010). Fragrant Volatile Compounds in the Liverwort *Drepanolejeunea madagascariensis* (Steph.) Grolle: Approach by the HS-SPME Technique. *Chemistry & Biodiversity*, 7(3), 639-648.
- Gea-Banacloche, J. C. (2006). Immunomodulation. *Principles of Molecular Medicine*, 893-904.
- Genčić, M. S., & Radulović, N. S. (2015). Lanthanide-induced shift reagents enable the structural elucidation of natural products in inseparable complex mixtures—the case of elemene from *Inula helenium* L. (Asteraceae). *RSC Advances*, 5(89), 72670-72682.
- Geurink, P. P., Van der Linden, W. A., Mirabella, A. C., Gallastegui, N., de Bruin, G., Blom, A. E., Voges, M. J., Mock, E. D., Florea, B. I., van der Marel, G. A., Driessen, C., Van der Stelt, M., Groll, M., Overkleeft, H. S. & Kisselev, A. F. (2013). Incorporation of non-natural amino acids improves cell permeability and potency of specific inhibitors of proteasome trypsin-like sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 1262-1275.

- Ghani, N. A., Ludwiczuk, A., Ismail, N. H., & Asakawa, Y. (2016). Volatile components of the stressed liverwort *Conocephalum conicum*. *Natural Product Communications*, 11(1), 1934578X1601100130.
- Gilabert, M., Ramos, A. N., Schiavone, M. M., Arena, M. E., & Bardón, A. (2011). Bioactive sesqui- and diterpenoids from the Argentine liverwort *Porella chilensis*. *Journal of Natural Products*, 74(4), 574-579.
- Glime, J. M., & Saxena, D. (1991). *Uses of bryophytes*. Today & Tomorrow's Printers & Publishers.
- Glime, J. M. (2017). Medical uses: Biologically active substances. In J. M. Glime (Ed.), *Bryophyte Ecology*. Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Chapt. 2-1. <https://digitalcommons.mtu.edu/oabooks/4>
- Glime, J. M. (2021). *Bryophyte ecology*. Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. <https://digitalcommons.mtu.edu/oabooks/4>
- Goffinet, B., Shaw, J. A. 2009. *Bryophyte biology*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Goren, A. C., Piozzi, F., Akcicek, E., Kılıç, T., Çarıkçı, S., Mozioğlu, E., & Setzer, W. N. (2011). Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, 4(4), 448-453.
- González, A. G., Aguiar, J. M., Martín, J. D., & Norte, M. (1975). Three new sesquiterpenoids from the marine alga *Laurencia perforata*. *Tetrahedron Letters*, 16(29), 2499-2502.
- Gonzalez, V., Touchet, S., Grundy, D. J., Faraldos, J. A., & Allemann, R. K. (2014). Evolutionary and mechanistic insights from the reconstruction of α -humulene synthases from a modern (+)-germacrene A synthase. *Journal of the American Chemical Society*, 136(41), 14505-14512.
- Gottsche, C. M. (1843). Anatomische-physiologische Untersuchungen über *Haplomitrium hookeri* N. v. E. mit Vergleichung anderer Lebermoose. *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldinae-Carolinae Naturae Curiosorum*, 20, 267-289.
- Govindaparyi, H., Leleeka, M., Nivedita, M., & Uniyal, P. L. (2010). Bryophytes: indicators and monitoring agents of pollution. *A Journal of Environment and Biodiversity*, 1(1), 35-41.
- Gradstein, S. R., Matsuda, R., & Asakawa, Y. (1981). Studies on Colombian Cryptogams XIII. Oil bodies and terpenoids in *Lejeuneaceae* and other selected Hepaticae. *Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht*, 512(1), 231-248.
- Gradstein, S. R., Matsuda, R., & Asakawa, Y. (1985). A chemosystematic survey of terpenoids and aromatic compounds in the *Lejeuneaceae* (Hepaticae). Contribution to a monograph of the *Lejeuneaceae* subfamily *Ptychanthoideae*, in S. R. Gradstein (Ed.), J. Cramer, Vaduz, p. 63-86.

- Gradstein, S. R., Asakawa, Y., Mues, R., & Klein, R. (1988). On the taxonomic significance of secondary metabolites in the *Lejeuneaceae* (Hepaticae). *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 64, 159–168.
- Grammes, C., Burkhardt, G., & Becker, H. (1994). Triterpenes from *Fossombronia* liverworts. *Phytochemistry*, 35(5), 1293–1296.
- Gray, S. F. (1821). *Natural arrangement of British plants: According to their relations to each other, as pointed out by Jussieu, De Candolle, Brown, &c.: Including those cultivated for use with an introduction to botany, in which the terms newly introduced are explained* (Vol. 2). Baldwin, Cradock and Joy.
- Grzonka, M., & Davies, A. N. (1998). Empirical Investigation on the Reproducibility of ^{13}C NMR Shift Values. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38(6), 1096–1101.
- Guan, S., Grabley, S., Groth, I., Lin, W., Christner, A., Guo, D., & Sattler, I. (2005). Structure determination of germacrane-type sesquiterpene alcohols from an endophyte *Streptomyces griseus* subsp. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(12), 1028–1031.
- Gulabani, A. (1974). Bryophytes as economic plants. *Botanica*, 14, 73–75.
- Guo, L., Wu, J. Z., Han, T., Cao, T., Rahman, K., & Qin, L. P. (2008). Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. *Molecules*, 13(9), 2114–2125.
- Guo, D. X., Du, Y., Wang, Y. Y., Sun, L. M., Qu, J. B., Wang, X. N., & Lou, H. X. (2009). Secondary metabolites from the liverwort *Ptilidium pulcherrimum*. *Natural Product Communications*, 4(10), 1319.
- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., & Clement, M. V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457–465.
- Haase, B., & Schneider, M. P. (1993). Enzyme assisted synthesis of enantiomerically pure δ -lactones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 4(5), 1017–1026.
- Hardt, I. H., Rieck, A., König, W. A., & Muhle, H. (1995). Isolepidozene, a diastereomer of bicyclogermacrene, in some liverworts. *Phytochemistry*, 40(2), 605–606.
- Harinantenaina, L., & Asakawa, Y. (2004)a. Chemical constituents of Malagasy liverworts, Part II: Mastigophoric acid methyl ester of biogenetic interest from *Mastigophora diclados* (Lepicoleaceae subf. Mastigophoroideae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(11), 1382–1384.
- Harinantenaina, L., & Asakawa, Y. (2004)b. Constituents of *Isotachis aubertii* (Isotachidaceae) collected in Madagascar. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(11), 1073–1078.
- Harinantenaina, L., Quang, D. N., Takeshi, N., Hashimoto, T., Kohchi, C., Soma, G. I., & Asakawa, Y. (2005). Bis (bibenzyls) from Liverworts Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Inducible NOS in

RAW 264.7 Cells: A Study of Structure–Activity Relationships and Molecular Mechanism. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1779-1781.

Harinantenaina, L., & Asakawa, Y. (2007). Malagasy liverworts, source of new and biologically active compounds. *Natural Product Communications*, 2(6), 1934578X0700200616.

Harinantenaina, L., Kida, S., & Asakawa, Y. (2007). Phytochemistry of three selected liverworts: *Conocephalum conicum*, *Plagiochila barteri* and *P. terebrans*. *Arkivoc*, 7, 22-29.

Harrigan, G. G., Ahmad, A., Baj, N., Glass, T. E., Gunatilaka, A. A. L., & Kingston, D. G. I. (1993). Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. *Journal of Natural Products*, 56(6), 921-925.

Harris, T. M. (1938). *The British Rhaetic Flora* (Vol. 12). The British Museum (Natural History), London, 9-80.

Harris, T. M. (1939). Naiadita, a fossil bryophyte with reproductive organs. *Annales Bryologici*, 12(17), 388-413.

Harris, E. S. (2008). Ethnobotany: traditional uses and folk classification of bryophytes. *The Bryologist*, 169-217.

Hashimoto, T., Tanaka, H., & Asakawa, Y. (1994). Stereostructure of plagiochiline A and conversion of plagiochiline A and stearylvelutinal into hot-tasting compounds by human saliva. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(7), 1542-1544.

Hashimoto, T., Irita, H., Yoshida, M., Kikkawa, A., Toyota, M., Koyama, H., Motoike, Y. & Asakawa, Y. (1998)a. Chemical constituents of the Japanese liverworts *Odontoschisma denudatum*, *Porella japonica*, *P. acutifolia* subsp. *tosana* and *Frullania hamatiloba*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 84, 309-314.

Hashimoto, T., Irita, H., Tanaka, M., Takaoka, S., & Asakawa, Y. (1998)b. Two novel Diels-Alder reaction-type dimeric pinguicane sesquiterpenoids and related compounds from the liverwort *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. *Tetrahedron letters*, 39(19), 2977-2980.

Hashimoto, T., Irita, H., Takaoka, S., Tanaka, M., & Asakawa, Y. (2000). New chlorinated cyclic bis(bibenzyls) from the liverworts *Herbertus sakuraii* and *Mastigophora diclados*. *Tetrahedron*, 56(20), 3153-3159.

Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., & Hodes, R. J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(2), 631-640.

Hattori, S. (1978). Studies on the Asiatic species of the genus *Porella* (Hepaticae). VII. A synopsis of Asiatic Porellaceae. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 44, 91-120.

He, X., & Cane, D. E. (2004). Mechanism and Stereochemistry of the Germacradienol/Germacrene D Synthase of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of the American Chemical Society*, 126(9), 2678-2679.

- Heil, T. P., & Lindsay, R. C. (1988). Volatile compounds in flavor-tainted fish from the upper Wisconsin River. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 23(5), 489-512.
- Heinrichs, J., Anton, H., Gradstein, S. R., & Mues, R. (2000). Systematics of *Plagiochila* sect. *Glaucescences* Carl (Hepaticae) from tropical America: a morphological and chemotaxonomical approach. *Plant Systematics and Evolution*, 220(1), 115-138.
- Heinrichs, J., Groth, H., Lindner, M., Feldberg, K., & Rycroft, D. S. (2004). Molecular, morphological, and phytochemical evidence for a broad species concept of *Plagiochila bifaria* (Hepaticae). *The Bryologist*, 107(1), 28-40.
- Heinrichs, J., Kreier, H. P., Feldberg, K., Schmidt, A. R., Zhu, R. L., Shaw, B., Shaw, A. A., & Wissemann, V. (2011). Formalizing morphologically cryptic biological entities: new insights from DNA taxonomy, hybridization, and biogeography in the leafy liverwort *Porella platyphylla* (Jungermanniopsida, Porellales). *American Journal of Botany*, 98(8), 1252-1262.
- Hentschel, J., Zhu, R. L., Long, D. G., Davison, P. G., Schneider, H., Gradstein, S. R., & Heinrichs, J. (2007). A phylogeny of *Porella* (Porellaceae, Jungermanniopsida) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(2), 693-705.
- He-Nygrén, X., Juslén, A., Ahonen, I., Glenny, D., & Piippo, S. (2006). Illuminating the evolutionary history of liverworts (Marchantiophyta)-towards a natural classification. *Cladistics*, 22(1), 1-31.
- Hertewich, U. M., Zapp, J., & Becker, H. (2003). Secondary metabolites from the liverwort *Jamesoniella colorata*. *Phytochemistry*, 63(2), 227-233.
- Hillier, S. G., & Lathe, R. (2019). Terpenes, hormones and life: Isoprene rule revisited. *Journal of Endocrinology*, 242(2), R9-R22.
- Von Holle, G. (1857). *Ueber die Zellenbläschen der Lebermoose*. Heidelberg, 26.
- Horak, Y. I., Lytvyn, R. Z., Homza, Y. V., Zaytsev, V. P., Mertsalov, D. F., Babkina, M., Nikitina, V. E., Lis, T., Kinzhybalo, V., Matychuk, S. V., Zbukov, I. F., Varlamov, A. A., & Obushak, M. D. (2015). The intramolecular Diels–Alder vinylfuran (IMDAV) reaction: a short approach to aza-analogues of pinguisane-type sesquiterpenes. *Tetrahedron Letters*, 56(30), 4499-4501.
- Hsiao, G., Teng, C. M., Wu, C. L., & Ko, F. N. (1996). Marchantin H as a natural antioxidant and free radical scavenger. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 334(1), 18-26.
- Hsieh, M. T., Liu, H. J., Ly, T. W., & Shia, K. S. (2009). A concise total synthesis of (±)-acutifolone A. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7(16), 3285-3290.
- Hsu, D. C., & Katelaris, C. H. (2009). Long-term management of patients taking immunosuppressive drugs. *Australian Prescriber*, 32(3).
- Hu, R. (1987). *Bryology*. Higher Education Press, 1-465.
- Hu, X. (2015). *Chinese medicinal surface anesthesia liquid for tooth extraction*. Faming Zhuanli, CN 104644895 A 20150527.

Hua, Z., & Hou, B. (2013). TLR signaling in B-cell development and activation. *Cellular & Molecular Immunology*, 10(2), 103-106.

Huang W. J., Wu, C. L., Lin, C. W., Chi, L. L., Chen, P. Y., Chiu, C. J., Huang, C. Y., & Chen, C. N. (2010). Marchantin A, a cyclic bis(bibenzyl ether), isolated from the liverwort *Marchantia emarginata* subsp. *tosana* induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters*, 291(1), 108-119.

Huneck, S., & Klaus, S. (1975). Inhaltsstoffe der Moose-17-Über die Inhaltsstoffe weiterer Lebermoose (Dr. Sinske Hattori zum 60. Geburtstag in Hochachtung gewidmet). *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, (39), 215–234.

Ichikawa, T. (1982). Biologically active substances in mosses. *Bryon (Kanagawa koke no kai)*, 2, 1-2.

Ichikawa, T., Namikawa, M., Yamada, K., Sakai, K., & Kondo, K. (1983). Novel cyclopentenonyl fatty acids from mosses, *Dicranum scoparium* and *Dicranum japonicum*. *Tetrahedron Letters*, 24(32), 3337-3340.

Ivković, I., Bukvički, D., Novaković, M., Ivanović, S., Stanojević, O., Nikolić, I., & Veljić, M. (2021). Antibacterial properties of thalloid liverworts *Marchantia polymorpha* L., *Conocephalum conicum* (L.) Dum. and *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort. *Journal of the Serbian Chemical Society*, (12), 1249-1258.

Iqbal, M., Black, R. J., Winn, J., Reeder, A. T., Blake, A. J., & Clarke, P. A. (2011). Studies on transannulation reactions across a nine-membered ring: the synthesis of natural product-like structures. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(14), 5062-5078.

Jendrossek, V., & Handrick, R. (2003). Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 3(5), 343-353.

Jiang, J., He, X., & Cane, D. E. (2006). Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germacradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin. *Journal of the American Chemical Society*, 128(25), 8128-8129.

Jiang, J., He, X., & Cane, D. E. (2007). Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology*, 3(11), 711-715.

Jiang, J., & Cane, D. E. (2008). Geosmin biosynthesis. Mechanism of the fragmentation–rearrangement in the conversion of germacradienol to geosmin. *Journal of the American Chemical Society*, 130(2), 428-429.

Jocković, N., Andrade, P. B., Valentao, P., & Sabovljević, M. (2008). HPLC-DAD of phenolics in bryophytes *Lunularia cruciata*, *Brachytheciastrum velutinum* and *Kindbergia praelonga*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(12), 1161-1167.

Joshi, P. K., Pant, A. K., Bisht, M., & Mathela, C. S. (2000). Comparative Study of the Terpenoid Compositions of Himalayan Thalloid Liverworts. *Asian Journal of Chemistry*, 12(4), 1344-1346.

- Joulain, D., & König, W. A. (1998). The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Hamburg. Verlag: EB-Verlag, Hamburg, Germany, 1-685.
- Kaushansky, K., Lichtman, M., Prchal, J., Levi, M. M., Press, O., Burns, L., & Caligiuri, M. (2015). *Williams Hematology*. 9th Edition. McGraw-Hill, 1-2505.
- Khan, A., & Usman, R. (2012). Fatty acid profile and biological activities of the aerial parts of *Desmodium elegans* Dc. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 12(1), 92-95.
- Khetwal, K. S. (1984). Flavonoids of *Conocephalum conicum*. *Fitoterapia*, 55, 360-361.
- Kim, Y. C., da S Bolzani, V., Baj, N., Gunatilaka, A. L., & Kingston, D. G. (1996). A DNA-damaging sesquiterpene and other constituents from *Frullania nisquallensis*. *Planta Medica*, 62(01), 61-63.
- Kim, H. N., Nitasaka, E., I. J., O., & Yamazaki, T. (2001). Phylogenetic relationships among taxa of the liverwort *Conocephalum conicum* (Conocephalaceae) revealed by psbA sequence. *Genes & Genetic Systems*, 76(5), 279-288.
- Kishida, T., Muto, S. I., Hayashi, M., Tsutsui, M., Tanaka, S., Murakami, M., & Kuroda, J. (2008). Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 33(4), 447-457.
- Van Klink, J. W., Zapp, J., & Becker, H. (2002). Pinguisane-type sesquiterpenes from the South American liverwort *Porella recurva* (Taylor) Kuhnemann. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(5-6), 413-417.
- Komala, I., Ito, T., Nagashima, F., Yagi, Y., & Asakawa, Y. (2009). New sesqui- and diterpenoids from the liverwort *Chandonanthus hirtellus*. In *53rd Symposium on Chemistry of Terpenes, Essential Oils and Aromatics, Nara, Japan, Symposium Papers*, 266.
- Komala, I., Ito, T., Nagashima, F., Yagi, Y., & Asakawa, Y. (2010)a. Cytotoxic, radical scavenging and antimicrobial activities of sesquiterpenoids from the Tahitian liverwort *Mastigophora diclados* (Brid.) Nees (Mastigophoraceae). *Journal of Natural Medicines*, 64, 417.
- Komala, I., Ito, T., Nagashima, F., Yagi, Y., Kawahata, M., Yamaguchi, K., & Asakawa, Y. (2010)b. Zierane Sesquiterpene Lactone, Cembrane and Fusicoccane Diterpenoids, from the Tahitian Liverwort *Chendonanthus hirtellus*. *Phytochemistry* 71, 1387.
- Komala, I., Ito, T., Nagashima, F., Yagi, Y., & Asakawa, Y. (2011). Cytotoxic bibenzyls, and germacrane- and pinguisane-type sesquiterpenoids from Indonesian, Tahitian and Japanese liverworts. *Natural Product Communications*, 6(3), 1934578X1100600301.
- Kondoh, M., Suzuki, I., Sato, M., Nagashima, F., Simizu, S., Harada, M., Fujili, M., Osada, H., Asakawa, Y., & Watanabe, Y. (2004). Kaurene diterpene induces apoptosis in human leukemia cells partly through a caspase-8-dependent pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 115-122.

- Kondoh, M., Suzuki, I., Harada, M., Nagashima, F., Fujii, M., Asakawa, Y., & Watanabe, Y. (2005)a. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during *ent*-11 α -hydroxy-16-kauren-15-one-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Planta Medica*, 71(03), 275-277.
- Kondoh, M., Nagashima, F., Suzuki, I., Harada, M., Fuji, M., Asakawa, Y., & Watanabe, Y. (2005)b. Induction of apoptosis by new *ent*-kaurene-type diterpenoids isolated from the New Zealand liverwort *Jungermannia* species. *Planta Medica*, 71, 1005.
- Kraut, L., Mues, R., & Sim-Sim, M. (1994). Sesquiterpene lactones and 3-benzylphthalides from *Frullania muscicola*. *Phytochemistry*, 37(5), 1337-1346.
- Kraut, L., Klaus, T., Mues, R., Eichert, T., & Zinsmeister, H. D. (1997). Isolation and synthesis of rufulamide, an oligopeptide analogue from *Metzgeria rufula*. *Phytochemistry*, 45(8), 1621-1626.
- Krishnamurthy, K., Medina, A. M., & Howard, L. (2021). The utility of elevated serum lactate dehydrogenase in current clinical practice. *Laboratory Medicine*, 52(2), e17-e22.
- Krutov, S. M., Samek, Z., Benešova, V., & Herout, V. (1973). Isolation and the structure of deoxopinguisone from the liverwort *Ptilidium ciliare*. *Phytochemistry*, 12(6), 1405-1407.
- Kumar, K., Nath, V., & Asthana, A. K. (2007). Concept of bryophytes in classical text of Indian ethnobotanical prospective. In V. Nath & A. K. Asthana (Eds.), *Current Trends in Bryology*. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, 215-220.
- Kunz, S., Burkhardt, G., & Becker, H. (1993). Riccionidins A and B, anthocyanidins from the cell walls of the liverwort *Ricciocarpos natans*. *Phytochemistry*, 35(1), 233-235.
- Labbé, C., Faini, F., Villagrán, C., Coll, J., & Rycroft, D. S. (2005). Antifungal and insect antifeedant 2-phenylethanol esters from the liverwort *Balantiopsis cancellata* from Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 247-249.
- Labbé, C., Faini, F., Villagrán, C., Coll, J., & Rycroft, D. S. (2007). Bioactive polychlorinated bibenzyls from the liverwort *Riccardia polyclada*. *Journal of Natural Products*, 70(12), 2019-2021.
- Lahlou, E. H., Hashimoto, T., & Asakawa, Y. (2000). Chemical constituents of the liverworts *Plagiochasma japonica* and *Marchantia tosaana*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 88, 271-275.
- Le Tarnec, C. L. (2004). The European Pharmacopoeia: a common European initiative by the council of Europe. *Chimia*, 58(11), 798-798.
- Lee, M., Kwon, J., & Chung, M. K. (2003). Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 541(1-2), 9-19.
- Li, X., Wang, G., Zhao, J., Ding, H., Cunningham, C., Chen, F., Flynn, D. C., Reed, E., & Li, Q. Q. (2005). Antiproliferative effect of β -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is

mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(7), 894-904.

Li, Y. (2015). Chinese medicine composition for treating heat-toxin skin ulcer by external application. *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 104623278 A 20150520.

Li, G. (2016). *Chinese medicine for treating colorectal adenomatous polyps*. Faming Zhuanli Shenqing, CN 105560616 A 20160511.

Li, Q., Chen, H., Li, Z., Zhang, F., & Chen, L. (2022). Glucocorticoid caused lactic acid accumulation and damage in human chondrocytes via ROS-mediated inhibition of Monocarboxylate Transporter 4. *Bone*, 155, 116299.

Lin, S. J., & Wu, C. L. (1996). Isoplagiochilide from the liverwort *Plagiochila elegans*. *Phytochemistry*, 41(5), 1439-1440.

Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relates, cum differentiis species, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexual digestas* (Vol. 2). Impensis Laurentii Salvii, 1-560.

Lohmann, C. E. J. (1903). Beitrag zur chemie und biologie der leber moose. *Beihefte zum botanischen Centralblatt*, 15, 215–256.

Lombard, J. (2014). Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biology Direct*, 9(1), 1-35.

Lorimer, S. D., & Perry, N. B. (1994). Antifungal hydroxy-acetophenones from the New Zealand liverwort, *Plagiochila fasciculata*. *Planta Medica*, 60(04), 386-387.

Lorimer, S. D., Perry, N. B., Foster, L. M., Burgess, E. J., Douch, P. G. S., Hamilton, M. C., Donaghy, M. J., & McGregor, R. A. (1996). A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2842-2845.

Lorimer, S. D., Perry, N. B., Burgess, E. J., & Foster, L. M. (1997). 1-Hydroxyditerpenes from two New Zealand liverworts, *Paraschistochila pinnatifolia* and *Trichocolea mollissima*. *Journal of Natural Products*, 60(4), 421-424.

Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Mammalian cell viability: methods and protocols*, 7-12.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275.

Lu, Z. & Lou, H. (2004). Studies on the chemical constituents of the essential oil from *Conocephalum conicum*. *Natural Product Research and Development*, 16(2), 133-135.

Lu, Z. Q., Fan, P. H., Ji, M., & Lou, H. X. (2006). Terpenoids and bisbibenzyls from Chinese liverworts *Conocephalum conicum* and *Dumortiera hirsuta*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 8(1-2), 187-192.

- Lubaina, A. S., Pradeep, D. P., Aswathy, J. M., Remya Krishnan, M. K. V., & Murugan, K. (2014). Traditional knowledge of medicinal bryophytes by the kani tribes of Agasthiyarmalai biosphere reserve, southern western ghats. *Indo American Journal of Pharm Research*, 4, 2116-2121.
- Ludwiczuk, A., Nagashima, F., Gradstein, R. S., & Asakawa, Y. (2008). Volatile components from selected Mexican, Ecuadorian, Greek, German and Japanese liverworts. *Natural Product Communications*, 3(2), 1934578X0800300205.
- Ludwiczuk, A., Komala, I., Pham, A., Bianchini, J. P., Raharivelomanana, P., & Asakawa, Y. (2009). Volatile components from selected Tahitian liverworts. *Natural Product Communications*, 4(10), 1934578X0900401015.
- Ludwiczuk, A., Gradstein, S. R., Nagashima, F., & Asakawa, Y. (2011). Chemosystematics of *Porella* (Marchantiophyta, Porellaceae). *Natural Product Communications*, 6(3), 1934578X1100600303.
- Ludwiczuk, A., Odrzykoski, I. J., & Asakawa, Y. (2013)a. Identification of cryptic species within liverwort *Conocephalum conicum* based on the volatile components. *Phytochemistry*, 95, 234-241.
- Ludwiczuk, A., Sukkharak, P., Gradstein, R., Asakawa, Y., & Glowinski, K. (2013)b. Chemical relationships between liverworts of the family Lejeuneaceae (Porellales, Jungermanniopsida). *Natural Product Communications*, 8(11), 1934578X1300801104.
- Ma, B., Guo, H. F., & Lou, H. X. (2007). A new lignan and two eudesmanes from *Lepidozia vitrea*. *Helvetica Chimica Acta*, 90(1), 58-62.
- Madsen, G. C., & Pates, A. L. (1952). Occurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plants growing in Florida. *Botanical Gazette*, 113(3), 293-300.
- Markham, K. R., Porter, L. J., Mues, R., Zinsmeister, H. D., & Brehm, B. G. (1976). Flavonoid variation in the liverwort *Conocephalum conicum*: evidence for geographic races. *Phytochemistry*, 15(1), 147-150.
- Markham, K. R., & Porter, L. J. (1978). Chemical constituents of the bryophytes. In J. B. Harborne & T. Swain (Eds.), *Progress in Phytochemistry* (Vol. 5). Pergamon Press, 181-272.
- Martin, S. F., & Dodge, J. A. (1991). Efficacious modification of the Mitsunobu reaction for inversions of sterically hindered secondary alcohols. *Tetrahedron Letters*, 32(26), 3017-3020.
- Martin, A., Tisch, R. M., & Getts, D. R. (2013). Manipulating T cell-mediated pathology: targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. *Clinical immunology*, 148(1), 136-147.
- Martini, U., Zapp, J., & Becker, H. (1998). Chlorinated macrocyclic bisbibenzyls from the liverwort *Bazzania trilobata*. *Phytochemistry*, 47(1), 89-96.
- Matsunaga, T., Kishi, N., Tanaka, H., Watanabe, K., Yoshimura, H., & Yamamoto, I. (1998). Major cytochrome P450 enzyme responsible for oxidation of secondary alcohols to the corresponding ketones in mouse hepatic microsomes: Oxidation of 7-hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to 7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol. *Drug Metabolism and Disposition*, 26(10), 1045-1047.

Matsui, K., Sugimoto, K., Mano, J. I., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2012). Differential metabolisms of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *PLOS one*, 7(4), e36433.

Matsuo, A., Nakayama, M., Hayashi, S., & Nagai, K. (1980). Fatty acid ethyl esters in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 19(8), 1848-1849.

Matsuo, A., Atsumi, K., Nadaya, K., Nakayama, M., & Hayashi, S. (1981)a. ¹³C NMR chemical shifts of ovalifoliene and related compounds with the 2, 3-seco-alloaromadendrane skeleton: Structure of (+)-9 α -acetoxyovalifoliene, a plant growth inhibitor. *Phytochemistry*, 20(5), 1065-1068.

Matsuo, A., Atsumi, K., Nakayama, M., & Hayashi, S. (1981)b. Structures of *ent*-2, 3-secoalloaromadendrane sesquiterpenoids, which have plant-growth-inhibitory activity, from *Plagiochila semidecurrans* (liverwort). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2816-2824.

Matsuo, A., Kubota, N., Nakayama, M., & Hayashi, S. (1981)c. (-)-Lepidozenal, a sesquiterpenoid with a novel *trans*-fused bicyclo(8.1.0)undecane system from the liverwort *Lepidozia vitrea*. *Chemistry Letters*, 10(8), 1097-1100.

Matsuo, A., Nozaki, H., Kubota, N., Uto, S., & Nakayama, M. (1984). Structures and conformations of (-)-isobicyclogermacrenal and (-)-lepidozenal, two key sesquiterpenoids of the *cis*- and *trans*-10, 3-bicyclic ring systems, from the liverwort *Lepidozia vitrea*: X-ray crystal structure analysis of the hydroxy derivative of (-)-isobicyclogermacrenal. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 203-214.

Matsuo, A., Ono, K., Hamasaki, K., & Nozaki, H. (1996). Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Phytochemistry*, 42(2), 427-430.

McMurry, J. E., & Bosch, G. K. (1985). Synthesis of bicyclogermacrene and lepidozene. *Tetrahedron Letters*, 26(18), 2167-2170.

McMurry, J. E., & Bosch, G. K. (1987). Synthesis of macrocyclic terpenoid hydrocarbons by intramolecular carbonyl coupling: bicyclogermacrene, lepidozene, and casbene. *The Journal of Organic Chemistry*, 52(22), 4885-4893.

Melching, S., Bülow, N., Wihstutz, K., Jung, S., & König, W. A. (1997). Natural occurrence of both enantiomers of cadina-3,5-diene and δ -amorphene. *Phytochemistry*, 44(7), 1291-1296.

Melching, S., & König, W. A. (1999). Sesquiterpenes from the essential oil of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 51(4), 517-523.

Melching, S. (1999). *Isolierung, Strukturaufklärung und stereochemische Untersuchungen neuer sesquiterpenoider Verbindungen aus vier Chemotypen des Lebermooses Conocephalum conicum* (Doctoral dissertation, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky).

Melching, S., Warmers, U., König, W. A., & Muhle, H. (1999). Two aromadendrane type alcohols from the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 51(2), 277-280.

Meng, Z. Q., & Meng, N. Y. (2000). Effects of arsenic on blast transformation and DNA synthesis of human blood lymphocytes. *Chemosphere*, 41(1-2), 115-119.

Métayer, B., Coulerie, P., Lebouvier, N., Hnawia, E., Thouvenot, L., Asakawa, Y., Raharivelomanana, P., & Nour, M. (2016). Volatile constituents of new Caledonian *Frullania* species. *Natural Product Communications*, 11(8), 1934578X1601100832.

Métayer, B., Lebouvier, N., Hnawia, E., Herbette, G., Thouvenot, L., Asakawa, Y., Nour, M., & Raharivelomanana, P. (2018). Chemotypes and biomarkers of seven species of new Caledonian liverworts from the *Bazzanioideae* subfamily. *Molecules*, 23(6), 1353.

Métayer, B., Lebouvier, N., Hnawia, E., Thouvenot, L., Wang, F., Harinantenaina Rakotondraibe, L., Raharivelomanana, P., Asakawa, Y., & Nour, M. (2019). Chemotaxonomy and cytotoxicity of the liverwort *Porella viridissima*. *Natural Product Research*, 35(12), 2099–2102.

Miller, J. W., & Ellsworth, R. (1979). Mastery Learning: The Effects of Time Constraints and Unit Mastery Requirements. *Educational Research Quarterly*, 4(4), 40-48.

Mirbel, C. F. (1835). Researches anatomiques et physiologiques sur le *Marchantia polymorpha*. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences, de l'Institut de France*, 13, 337-436.

Molisch, H. (1911). Über das Vorkommen von Saponarin bei einem Lebermoos (*Madotheca platyphylla*). *Journal of the Chemical Society*, 89. Borntraeger, 487–491.

Morison, R. (1699). *Plantarum historiae universalis Oxoniensis pars tertia*. Theatro Sheldoniano, 1-657.

Morita, H., Tomizawa, Y., Tsuchiya, T., Hirasawa, Y., Hashimoto, T., & Asakawa, Y. (2009). Antimitotic activity of two macrocyclic bis(bibenzyls), isoplagiochins A and B from the liverwort *Plagiochila fruticosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(2), 493-496.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

Mues, R. (1982). Occurrence and absence of C-glycosylflavones in species of the liverwort genera *Blepharostoma*, *Herbertus*, *Mastigophora*, *Porella*, *Ptilidium* and *Trichocolea*: an indication of taxonomic significance?. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 53, 271-281.

Muller, K. (1905). Beitrag zur Kenntnis der ätherischen Öle bei Lebermoosen. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 45, 299–319.

Nabeta, K., Ohkubo, S., Hozumi, R., & Katoh, K. (1998). Macrocyclic bisbibenzyls in cultured cells of the liverwort, *Heteroscyphus planus*. *Phytochemistry*, 49(7), 1941-1943.

Nagashima, F., Nishioka, E., Kameo, K., Nakagawa, C., & Asakawa, Y. (1991). Terpenoids and aromatic compounds from selected Ecuadorian liverworts. *Phytochemistry*, 30(1), 215-217.

Nagashima, F., Izumo, H., Tori, M., Asakawa, Y., Kan, Y., & Takaoka, S. (1993). Terpenoids and Aromatic Compounds from Panamanian Liverwort *Bryopteris filicina* (Lejeuneaceae). In 37th

Symposium on Chemistry of Terpenes, Essential Oils and Aromatics, Okinawa, Japan, Symposium Papers (Vol. 44).

Nagashima, F., Tanaka, H., Toyota, M., Hashimoto, T., Kan, Y., Takaoka, S., Tori, M., & Asakawa, Y. (1994)a. Sesqui- and diterpenoids from *Plagiochila* species. *Phytochemistry*, 36(6), 1425-1430.

Nagashima, F., Izumo, H., Takaoka, S., Tori, M., & Asakawa, Y. (1994)b. Sesqui- and diterpenoids from the Panamanian liverwort *Bryopteris filicina*. *Phytochemistry*, 37(2), 433-439.

Nagashima, F., Momosaki, S., Watanabe, Y., Toyota, M., Huneck, S., & Asakawa, Y. (1996)a. Terpenoids and aromatic compounds from six liverworts. *Phytochemistry*, 41(1), 207-211.

Nagashima, F., Momosaki, S., Watanabe, Y., Takaoka, S., Huneck, S., & Asakawa, Y. (1996)b. Sesquiterpenoids from the liverworts *Bazzania trilobata* and *Porella canariensis*. *Phytochemistry*, 42(5), 1361-1366.

Nagashima, F., Izumo, H., Ishimaru, A., Momosaki, S., Toyota, M., Hashimoto, T., & Asakawa, Y. (1996)c. Africane- and monocyclofarnesane-type sesquiterpenoids from the liverwort *Porella subobtusa*. *Phytochemistry*, 43(6), 1285-1291.

Nagashima, F., Takaoka, S., Huneck, S., & Asakawa, Y. (1999). Sesqui- and diterpenoids from *Ptilidium ciliare* and *Barbilophozia* species (liverworts). *Phytochemistry*, 51(4), 563-566.

Nagashima, F., & Asakawa, Y. (2001). Sesqui- and diterpenoids from two Japanese and three European liverworts. *Phytochemistry*, 56(4), 347-352.

Nagashima, F., Kondoh, M., Uematsu, T., Nishiyama, A., Saito, S., Sato, M., & Asakawa, Y. (2002). Cytotoxic and Apoptosis-Inducing *ent*-Kaurane-Type Diterpenoids from the Japanese Liverwort *Jungermannia truncata* Nees. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(6), 808-813.

Nagashima, F., Kondoh, M., Kawase, M., Simizu, S., Osada, H., Fujii, M., Watanabe, Y., & Asakawa, Y. (2003)a. Apoptosis-inducing properties of *ent*-kaurene-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncata*. *Planta Medica*, 69(04), 377-379.

Nagashima, F., Kasai, W., Kondoh, M., Fujii, M., Watanabe, Y., Braggins, J. E., & Asakawa, Y. (2003)b. New *ent*-kaurene-type diterpenoids possessing cytotoxicity from the New Zealand liverwort *Jungermannia* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(10), 1189-1192.

Nagashima, F., Matsumura, N., Ashigaki, Y., & Asakawa, Y. (2003)c. Chemical constituents of the liverworts *Bryopteris filicina*, *Plagiochila asplenoides*, and *Porella canariensis*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 94, 197-204.

Nagashima, F., Sekiguchi, T., Takaoka, S., & Asakawa, Y. (2004). Terpenoids and aromatic compounds from the New Zealand liverwort *Plagiochila*, *Schistochila*, and *Heteroscyphus* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52, 556.

Nagashima, F., Kondoh, M., Fujii, M., Takaoka, S., Watanabe, Y., & Asakawa, Y. (2005). Novel cytotoxic kaurane-type diterpenoids from the New Zealand liverwort *Jungermannia* species. *Tetrahedron*, 61(19), 4531-4544.

- Nagashima, F., Kuba, Y., Ogata, A., & Asakawa, Y. (2010). Sesqui- and diterpenoids from three New Zealand liverworts: *Bazzania novae-zelandiae*, *Gackstroemia* sp. and *Dendromastigophora* sp. *Natural Product Research*, 24(1), 68–75.
- Nair-Menon, J. U., Campbell, G. T., & Blake, C. A. (1996). Toxic effects of octylphenol on cultured rat and murine splenocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 139(2), 437-444.
- Nakaishi, E. (1996). *Phytochemical studies on the New Zealand liverworts*. Master's thesis, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan.
- Nakamura, I. (1995). *Phytochemical studies on some Jungermannia and Plagiochila species*. Doctoral dissertation, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan.
- Nees Von Esembeck, C. G. (1833). *Naturgeschichte der Europäischen Lebermoose* (Vol. 1). August Rüger.
- Negi, K., Asthana, A. K., & Chaturvedi, P. (2020). GC–MS analysis and antifungal activity of acetone extract of *Conocephalum conicum* (L) Underw (Liverwort) against aflatoxins producing fungi. *South African Journal of Botany*, 131, 384-390.
- Ng, D., Yang, Z., & Garcia-Garibay, M. A. (2004). Total synthesis of (±)-herbertenolide by stereospecific formation of vicinal quaternary centers in a crystalline ketone. *Organic Letters*, 6(4), 645-647.
- Neves, M., Morais, R., Gafner, S., Stoeckli-Evans, H., & Hostettmann, K. (1999). New sesquiterpene lactones from the Portuguese liverwort *Targionia lorbeeriana*. *Phytochemistry*, 50(6), 967-972.
- Nilsson, E. (1969). Moss pigments. 10. Isovitexin-7-glucoside in *Porella platyphylla* (L.) Lindb. *Acta Chemica Scandinavica*, 23, 2910-2911.
- Nilsson, E. (1973). Apigenin-6,8-di-C-glycoside from *Porella platyphylla*. *Phytochemistry*, 12, 722-723.
- Niranjan, A., Sahu, V., & Asthana, A. K. (2014). Phenolic compounds in thalloid liverworts growing in moss house. *Natural Products*, 10(1), 30-33.
- Niu, C., Qu, J. B., & Lou, H. X. (2006). Antifungal bis [bibenzyls] from the Chinese liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Chemistry & Biodiversity*, 3(1), 34-40.
- Van Noorden, C. J., Frederiks, W. M., Aronson, D. C., Marx, F., Bosch, K., Jonges, G. N., Vogels, C. M., & James, J. (1986). Changes in the acinar distribution of some enzymes involved in carbohydrate metabolism in rat liver parenchyma after experimentally induced cholestasis. *Virchows Archiv B*, 52, 501-511.
- Novaković, M., Bukvicki, D., Andjelkovic, B., Ilic-Tomic, T., Veljic, M., Tesevic, V., & Asakawa, Y. (2019). Cytotoxic activity of riccardin and perrottetin derivatives from the liverwort *Lunularia cruciata*. *Journal of Natural Products*, 82(4), 694-701.

- Novaković, M., Simić, S., Koračak, L., Zlatović, M., Ilic-Tomic, T., Asakawa, Y., Nikodinović-Runić, J., & Opsenica, I. (2020). Chemo- and biocatalytic esterification of marchantin A and cytotoxic activity of ester derivatives. *Fitoterapia*, 142, 104520.
- Ohta, Y., Andersen, N. H., & Liu, C. B. (1977). Sesquiterpene constituents of two liverworts of genus *Diplophyllum*: novel eudesmanolides and cytotoxicity studies for enantiomeric methylene lactones. *Tetrahedron*, 33(6), 617-628.
- Odrzykoski, I. J., & Szweykowski, J. (1991). Genetic differentiation without concordant morphological divergence in the thallose liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Systematics and Evolution*, 178, 135-152.
- Omatsu, I. (2004). *Phytochemical studies on 14 New Zealand liverworts*. Master's thesis, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan.
- Ono, K., Sakamoto, T., Tanaka, H., & Asakawa, Y. (1996). Sesquiterpenoids from a cell suspension culture of the liverwort *Porella vernicosa* Lindb. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(1), 53-56.
- Palacios, R. (1982). Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*, 128(1), 337-342.
- Pant, G., & Tewari, S. D. (1989). Various human uses of bryophytes in the Kumaun region of Northwest Himalaya. *The Bryologist*, 92(1), 120-122.
- Pavletić, Z., & Stilinović, B. (1963). Untersuchungen über die antibiotische Wirkung von Moosextrakten auf einige Bakterien. *Acta Botanica Croatica*, 22(1), 133-139.
- Pejin, B., Newmaster, S., Sabovljević, M., Miloradovic, Z., Grujic-Milanovic, J., Ivanov, M., Mihailovic Stanojevic, N., Jovovic, D., Tesevic, V., and Vajs, V. (2011)a. Antihypertensive effect of the moss *Rhodobryum ontariense* in vivo. *Journal of Hypertension*. 29: e315-e316.
- Pejin, B., Vujisic, L., Sabovljević, M., Tesevic, V., and Vajs, V. (2011)b. Preliminary data on essential oil composition of the moss *Rhodobryum ontariense* (Kindb.) Kindb. *Cryptogamie, Bryologie*, 32(2), 113-117.
- Perry, N. B., & Foster, L. M. (1995). Sesquiterpene/quinol from a New Zealand liverwort, *Riccardia crassa*. *Journal of Natural Products*, 58(7), 1131-1135.
- Perry, N. B., Foster, L. M., Lorimer, S. D., May, B. C., Weavers, R. T., Toyota, M., Nakaishi, E., & Asakawa, Y. (1996). Isoprenyl phenyl ethers from liverworts of the genus *Trichocolea*: Cytotoxic activity, structural corrections, and synthesis. *Journal of Natural Products*, 59(8), 729-733.
- Perry, N. B., Burgess, E. J., Baek, S. H., Weavers, R. T., Geis, W., & Mauger, A. B. (1999). 11-Oxygenated cytotoxic 8,9-seco-kauranes from a New Zealand liverwort, *Lepidolaena taylorii*. *Phytochemistry*, 50(3), 423-433.
- Pinheiro, M. D. F. D. S., Lisboa, R. C. L., & Brazão, R. D. V. (1989). Contribuição ao estudo de briófitas como fontes de antibióticos. *Acta Amazonica*, 19, 139-145.

- Pretsch, E., Badertscher, M., & Bühlmann, P. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-433.
- Pfeffer, W. (1874). Die Ölkörper der Lebermoose. *Flora*, 57, 2–6, 17–27, 33–43.
- Porter, L. J. (1981). Geographic races of *Conocephalum* (Marchantiales) as defined by flavonoid chemistry. *Taxon*, 30(4), 739-748.
- Pressel, S., Ligrone, R., Duckett, J. G., & Davis, E. C. (2008). A novel ascomycetous endophytic association in the rhizoids of the leafy liverwort family, Schistochilaceae (Jungermanniidae, Hepaticopsida). *American Journal of Botany*, 95(5), 531-541.
- Pryce, R. (1972). Metabolism of lunularic acid to a new plant stilbene by *Lunularia cruciata*. *Phytochemistry*, 11(4), 1355-1364.
- Qu, J., Xie, C., Guo, H., Yu, W., & Lou, H. (2007)a. Antifungal dibenzofuran bis(bibenzyl)s from the liverwort *Asterella angusta*. *Phytochemistry*, 68(13), 1767-1774.
- Qu, J. B., Xie, C. F., Ji, M., Shi, Y. Q., & Lou, H. X. (2007)b. Water-soluble constituents from the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Helvetica Chimica Acta*, 90(11), 2109-2115.
- Quang, D. N., & Asakawa, Y. (2010). Chemical constituents of the Vietnamese liverwort *Porella densifolia*. *Fitoterapia*, 81(6), 659-661.
- Raddi, G. (1808). Di alcune specie nuove e rare di piante crittogame ritrovate nei contorni di Firenze. *Atti della Accademia delle Scienze di Siena*, 9: 230–240.
- Raddi, G. (1818). Jungermanniografia Etrusca 1–45. Modena. *Memorie di Matematica e Fisica della Società Italiana delle Scienze, Modena*, 18(14–56), 1820.
- Radulović, N. S., Mladenović, M. Z., & Blagojević, P. D. (2014). (Un) Targeted Metabolomics in Asteraceae: Probing the Applicability of Essential–Oil Profiles of *Senecio* L.(Senecioneae) Taxa in Chemotaxonomy. *Chemistry & Biodiversity*, 11(9), 1330-1353.
- Radulović, N. S., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Cakić, N. D., Bogdanović, G. A., & Živanović, A. V. (2015). Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from Crimson Bottlebrush flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. *Food Research International*, 77, 280-289.
- Radulović, N. S., Mladenović, M. Z., Stojanović, N. M., Randjelović, P. J., & Blagojević, P. D. (2019). Structural elucidation of presilphiperfolane-7 α ,8 α -diol, a bioactive sesquiterpenoid from *Pulicaria vulgaris*: a combined approach of solvent-induced chemical shifts, GIAO calculation of chemical shifts, and full spin analysis. *Journal of Natural Products*, 82(7), 1874-1885.
- Rajaraman, G., Wang, G. Q., Yan, J., Jiang, P., Gong, Y., & Burczynski, F. J. (2007). Role of cytosolic liver fatty acid binding protein in hepatocellular oxidative stress: effect of dexamethasone and clofibrate treatment. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 295, 27-34.

- Randelović, V., Jušković, M., & Zlatković, B. (2006). *Praktikum iz botanike. 1, Anatomija i morfologija biljaka*. Biološko društvo „Dr Sava Petrović“.
- Rao, D. N. (1982). Responses of bryophytes to air pollution. In *Bryophyte Ecology*. Springer, Dordrecht, 445-471.
- Rao, M. (2009). *Microbes and non-flowering plants: Impact and applications*. Ane Books Pvt Ltd., New Delhi, p. 213–214.
- Remesh, M., & Manju, C. N. (2009). Ethnobryological notes from Western Ghats, India. *The Bryologist*, 532-537.
- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Von Reuß, S. H., & König, W. A. (2004). Corsifurans A–C, 2-arylbenzofurans of presumed stilbenoid origin from *Corsinia coriandrina* (Hepaticae). *Phytochemistry*, 65(23), 3113-3118.
- Von Reuß, S. H., & König, W. A. (2005). Olefinic isothiocyanates and iminodithiocarbonates from the liverwort *Corsinia coriandrina*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2005(6), 1184–1188.
- Roig y Mesa, J. T. (1945). *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicidad y Divulgación, Habana, 1-872.
- Russell, J., & Bulman, S. (2005). The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. *New Phytologist*, 165(2), 567-579.
- Ružička, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), 357-367.
- Rycroft, D. S., & Cole, W. J. (1998). 15-Acetoxypinguisone and a Cyclocuparanol from the Liverwort *Cryptothallus mirabilis* Malmb. *Journal of Chemical Research, Synopses*, (9), 600-601.
- Rycroft, D. S., Cole, W. J., & Rong, S. (1998). Highly oxygenated naphthalenes and acetophenones from the liverwort *Adelanthus decipiens* from the British Isles and South America. *Phytochemistry*, 48(8), 1351-1356.
- Rycroft, D. S., Cole, W. J., Aslam, N., Lamont, Y. M., & Gabriel, R. (1999). Killarniensolide, methyl orsellinates and 9, 10-dihydrophenanthrenes from the liverwort *Plagiochila killarniensis* from Scotland and the Azores. *Phytochemistry*, 50(7), 1167-1173.
- Rycroft, D. S., & Cole, W. J. (2001). Hydroquinone derivatives and monoterpenoids from the Neotropical liverwort *Plagiochila rutilans*. *Phytochemistry*, 57(3), 479-488.
- Rycroft, D. S., Cole, W. J., Heinrichs, J., Groth, H., Renker, C., & Pröschold, T. (2002). Phytochemical, morphological, and molecular evidence for the occurrence of the neotropical liverwort *Plagiochila stricta* in the Canary Islands, new to Macaronesia. *The Bryologist*, 105(3), 363-372.

Rycroft, D. S. (2003). Chemosystematics and the liverwort genus *Plagiochila*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 93, 331-342.

Sabovljević, A., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Vujičić, M., Pejin, B., & Sabovljević, M. (2011). Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4), 565-571.

Sadamori, M. (2009). *Studies on the new biologically active substances of Tahitian and Tokushima's Plagiochila genus*. Doctoral dissertation, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan.

Saito, T. (1998). Phytochemical Studies on the Liverworts from *Conocephalum*, *Chiloscyphus* and *Pallavicinia* Genera. Master's Thesis, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan.

Samecka-Cymerman, A., & Kempers, A. J. (1996). Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macrophytes around Wrocław, Poland. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 35(3), 242-247.

Samecka-Cymerman, A., Marczonek, A., & Kempers, A. J. (1997). Bioindication of heavy metals in soil by liverworts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33(2), 162-171.

Sanders, S. (1996). *Phytochemische Untersuchungen der Lebermoose Jamesoniella rubricaulis (Nees) Grolle und Lepidozia reptans (L.) Dum.* Ph.D. thesis, Saarbrücken University, Saarbrücken, Germany.

Satake, K., Soma, M., Seyama, H., & Uehiro, T. (1983). Accumulation of mercury in the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. in an acid stream Kashiranashigawa in Japan. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (AGRIS)*, 99, 80-92.

Scher, J. M., Burgess, E. J., Lorimer, S. D., & Perry, N. B. (2002). A cytotoxic sesquiterpene and unprecedented sesquiterpene-bisbibenzyl compounds from the liverwort *Schistochila glaucescens*. *Tetrahedron*, 58(39), 7875-7882.

Scher, J. M., Zapp, J., & Becker, H. (2003). Lignan derivatives from the liverwort *Bazzania trilobata*. *Phytochemistry*, 62(5), 769-777.

Scher, J. M., Speakman, J. B., Zapp, J., & Becker, H. (2004). Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) SF Gray. *Phytochemistry*, 65(18), 2583-2588.

Schinzer, D., Ringe, K., Jones, P. G., & Döring, D. (1995). Total synthesis of β -pinguisene. *Tetrahedron Letters*, 36(23), 4051-4054.

Schinzer, D., & Ringe, K. (1996). Total syntheses of ($\pm$)- β -pinguisene and ($\pm$)-pinguisenol. *Tetrahedron*, 52(21), 7475-7485.

Schuster, R. M. (1979). The phylogeny of the Hepaticae. In G. C. S. Clarke & J. G. Duckett (Eds.), *Bryophyte systematics: The Systematics Association Special* (Vol. 14). Academic Press, New York, 41-82.

Schuster, R. M. (1980). *The Hepaticae and Anthocerotae of North America* (Vol. 1). Columbia University Press, New York, 1-1334.

Schuster, R. M. (1984). Comparative morphology and anatomy of the Hepaticae. In R. M. Schuster (Ed.), *New Manual of Bryology* (Vol. 2). Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, 760–891.

Schwartner, C., Bors, W., Michel, C., Franck, U., Müller-Jakic, B., Nenninger, A., Asakawa, Y. & Wagner, H. (1995). Effect of marchantins and related compounds on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase and their antioxidant properties: a structure activity relationship study. *Phytomedicine*, 2(2), 113-117.

Secretariat GBIF (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2025-02-15.

Setzer, W. N. (2008). Ab initio analysis of the Cope rearrangement of germacrane sesquiterpenoids. *Journal of Molecular Modeling*, 14, 335-342.

Sha, C. K., Liao, H. W., Cheng, P. C., & Yen, S. C. (2003). Synthesis of a highly hindered hydrindanone via α -carbonyl radical cyclization: enantiospecific formal syntheses of (–)-pinguisenol and (–)- α -punguisene. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(22), 8704-8707.

Sharma, S. (2007). *Marchantia polymorpha* L.: A bioaccumulator. *Aerobiologia*, 23(3), 181-187.

Shi, Y. Q., Liao, Y. X., Qu, X. J., Yuan, H. Q., Li, S., Qu, J. B., & Lou, H. X. (2008). Marchantin C, a macrocyclic bisbibenzyl, induces apoptosis of human glioma A172 cells. *Cancer Letters*, 262(2), 173-182.

Shi, Y. Q., Zhu, C. J., Yuan, H. Q., Li, B. Q., Gao, J., Qu, X. J., Sun, B., Cheng, Y., Li, S., Li, X., & Lou, H. X. (2009). Marchantin C, a novel microtubule inhibitor from liverwort with anti-tumor activity both *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Letters*, 276(2), 160-170.

Shiina, J., & Nishiyama, S. (2005). The first total synthesis of acutifolone A, a pinguisane-type sesquiterpenoid isolated from the Japanese liverwort *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. *Tetrahedron Letters*, 46(45), 7683-7686.

Shiina, J., Oikawa, M., Nakamura, K., Obata, R., & Nishiyama, S. (2007). Synthesis of Pinguisane-Type Sesquiterpenoids Acutifolone A, Pinguisenol, and Bisacutifolones by a Diels–Alder Dimerization Reaction, *Wiley Online Library*, 5190-5197.

Shirsat, R. P. (2008). Ethnomedicinal uses of some common bryophytes and pteridophytes used by tribals of Melghat region (Ms), India. *Ethnobotanical Leaflets*, 2008(1), 92.

Shu, Y. F., Wei, H. C., & Wu, C. L. (1994). Sesquiterpenoids from liverworts *Lepidozia vitrea* and *L. fauriana*. *Phytochemistry*, 37(3), 773-776.

Shu, X. (2015). Chinese medical ointment formula for treating burn and scald, and its preparation method. China, CN104337940 A.

Shukla, S., Bajpai, V. K., & Kim, M. (2014). Plants as potential sources of natural immunomodulators. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, 17-33.

- Shy, H. S., Wu, C. L., Paul, C., König, W. A., & Ean, U. J. (2002). Chemical constituents of two liverworts *Metacalypogeia alternifolia* and *Chandonanthus hirtellus*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 49(4), 593-598.
- Sinha, R. K., Herat, S., & Tandon, P. K. (2007). Phytoremediation: role of plants in contaminated site management. *Environmental bioremediation technologies*, chapter 14, 315-330.
- Singh, M., Singh, S., Nath, V., Sahu, V., & Singh Rawat, A. K. (2011). Antibacterial activity of some bryophytes used traditionally for the treatment of burn infections. *Pharmaceutical Biology*, 49(5), 526-530.
- Smith, A. J. E. (1990). *The liverworts of Britain and Ireland*. Cambridge University Press, 1-362.
- Smith, M. B., & March, J. (2006). *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (6th ed.). John Wiley & Sons, 219-241.
- So, M. L., Chan, W. H., Xia, P. F., & Cui, Y. (2002). Two new cyclic bis(bibenzyl)s, isoriccardinquinone A and B from the liverwort *Marchantia paleacea*. *Natural Product Letters*, 16(3), 167-171.
- Song, K. J., Yu, X. N., Lv, T., Chen, Y. L., Diao, Y. C., Liu, S. L., Wang, Y. K., & Yao, Q. (2018). Expression and prognostic value of lactate dehydrogenase-A and -D subunits in human uterine myoma and uterine sarcoma. *Medicine*, 97(14), e0268.
- Spiteller, D., Jux, A., Piel, J., & Boland, W. (2002). Feeding of [5, 5-2H₂]-1-desoxy-D-xylulose and [4, 4, 6, 6, 6-2H₅]-mevalolactone to a geosmin-producing *Streptomyces* sp. and *Fossombronia pusilla*. *Phytochemistry*, 61(7), 827-834.
- Spjut, R. W., Suffness, M., Cragg, G. M., & Norris, D. H. (1986). Mosses, liverworts, and hornworts screened for antitumor agents. *Economic Botany*, 40(3), 310-338.
- Srikrishna, A., & Vijaykumar, D. (1997). Stereocontrolled synthesis of (±)-α-pinguisene and (±)-pinguisenol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (22), 3295-3296.
- Srikrishna, A., & Vijaykumar, D. (1998). Enantiospecific synthesis of (+)-pinguisenol, (+)-pinguisen-10-one and (-)-pinguisen-8, 10-dione. *Tetrahedron Letters*, 39(27), 4901-4904.
- Srikrishna, A., & Vijaykumar, D. (2000). An enantiospecific approach to pinguisanes from (R)-carvone. Total synthesis of (+)-pinguisenol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (16), 2583-2589.
- Steere, W. C. (1946). Cenozoic and Mesozoic bryophytes of North America. *The American Midland Naturalist*, 36(2), 298-324.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3-B.
- Suemitsu, R., Fujita, S., Emoto, Y., & Inada, S. (1974). Wax component of *Conocephalum conicum*. *Science and Engineering Review of Doshisha University*, 15(3), 191-197.

- Suire, C., & Burgeois, G. (1977). Les monoterpenes de *Conocephalum conicum*, *Frullania tamarisci* et *Porella platyphylla*. *Phytochemistry* 16, 284-285.
- Suire, C., Asakawa, Y., Toyota, M., & Takemoto, T. (1982). Chirality of terpenoids isolated from the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 21(2), 349-352.
- Suire, C., Bouvier, F., Backhaus, R. A., Bégu, D., Bonneau, M., & Camara, B. (2000). Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a new role of oil bodies. *Plant Physiology*, 124(3), 971-978.
- Sukkharak, P., Ludwiczuk, A., Asakawa, Y., & Gradstein, R. (2011). Studies on the genus *Thysananthus* (Marchantiophyta, Lejeuneaceae) 3. Terpenoid chemistry and chemotaxonomy of selected species of *Thysananthus* and *Dendrolejeunea fruticosa*. *Cryptogamie, Bryologie*, 32(3), 199-209.
- Sukumaran, S. (2011). Concentration determination of nucleic acids and proteins using the micro-volume bio-spec nano spectrophotometer. *Journal of Visualized Experiments*, (48), e2699.
- Sun, Z. (2014). Chinese medicinal liniment for treating lower extremity varicose ulcer. China, CN104127529 A.
- Sun, C. (2017). Chinese medicine for treating pulpitis. China, CN107334976 A.
- Suzuki, I., Kondoh, M., Nagashima, F., Fujii, M., Asakawa, Y., & Watanabe, Y. (2004)a. A comparison of apoptosis and necrosis induced by *ent*-kaurene-type diterpenoids in HL-60 cells. *Planta Medica*, 70(05), 401-406.
- Suzuki, I., Kondoh, M., Harada, M., Koizumi, N., Fujii, M., Nagashima, F., Koizumi, N., Asakawa, Y., & Watanabe, Y. (2004)b. An *ent*-kaurene diterpene enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukemia cells. *Planta Medica*, 70(08), 723-727.
- Suzuki, T., Tomehiro, N., Sato, Y., Kobayashi, T., Ishii-Watanabe, A., Shinozaki, Y., Nishimaki-Mogami, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Inoue, K., Ohno, Y., Yamaguchi, T., & Kawanishi, T. (2008). The novel compounds that activate farnesoid X receptor: The diversity of their effects on gene expression. *Journal of Pharmacological Sciences*, 107(3), 285-294.
- Szweykowski, J., Buczkowska, K., & Odrzykoski, I. J. (2005). *Conocephalum salebrosum* (Marchantiopsida, Conocephalaceae)-a new Holarctic liverwort species. *Plant Systematics and Evolution*, 253, 133-158.
- Tag, H., Das, A. K., & Loyi, H. (2007). Anti-inflammatory plants used by the Khamti tribe of Lohit district in eastern Arunachal Pradesh, India. *Natural Product Radiance*, 6(4), 334-340.
- Taira, Z., Takei, M., Endo, K., Hashimoto, T., Sakiya, Y., & Asakawa, Y. (1994). Marchantin A trimethyl ether: its molecular structure and tubocurarine-like skeletal muscle relaxation activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), 52-56.

Takeda, R., Naoki, H., Iwashita, T., & Hirose, Y. (1981). Ptychanolide, a sesquiterpenoid with a new type skeleton from the liverwort *Ptychanthus striatus* (Lehm. et Lindenb.) nees. *Tetrahedron Letters*, 22(52), 5307-5310.

Takeda, R., Naoki, H., Iwashita, T., Mizukawa, K., Hirose, Y., Isida, T., & Inoue, M. (1983). Sesquiterpenoid Constituents of the Liverwort, *Ptychanthus striatus* (Lehm. et Lindenb.) Nees. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 56(4), 1125-1132.

Tamehiro, N., Sato, Y., Suzuki, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Yokoyama, S., Kawanishi, T., Ohno, Y., Inoue, K., Nagao, T., & Nishimaki-Mogami, T. (2005). Riccardin C: A natural product that functions as a liver X receptor (LXR) α -agonist and an LXR β -antagonist. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579(24), 5299–5304.

Tan, C. Y., Inagaki, M., Chai, H. B., Lambrechts, M. K., Önder, A., Kiremit, H. Ö., & Rakotondraibe, L. H. (2017). Phytochemical and cytotoxic investigations of pinguisanoids from liverwort *Porella cordaeana*. *Phytochemistry Letters*, 19, 77-82.

Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2(3), 211–218.

Tazaki, H., Nabeta, K., Okuyama, H., & Becker, H. (1995). Biosynthesis of pinguisone in an axenic culture of the liverwort *Aneura pinguis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(1), 158-160.

Tazaki, H., Soutome, H., Nabeta, K., Okuyama, H., & Becker, H. (1996). Pinguisone derivatives from an axenic culture of the liverwort *Aneura pinguis*. *Phytochemistry*, 42(2), 465-468.

Tazaki, H., Soutome, H., Iwasaki, T., Nabeta, K., & Arigoni, D. (1997). Stable isotope labelling studies on the biosynthesis of pinguisane-type sesquiterpenes in axenic cultures of *Aneura pinguis*. *Chemical Communications*, (12), 1101-1102.

Tazaki, H., Ishikawa, F., Soutome, H., & Nabeta, K. (1998). Grandilobalides A, B and C, sesquiterpenes from the liverwort *Porella grandiloba*. *Phytochemistry*, 48(5), 851-856.

Tazaki, H., Hayashida, T., Nakasuga, I., & Nabeta, K. (1999)a. Terpenoids from the liverworts *Bazzania yoshinagana* and *Porella fauriei*. *Research Bulletin of Obihiro University. Natural Science (Japan)*, 21(3), 53–59.

Tazaki, H., Iwasaki, T., Kawakami, Y., & Nabeta, K. (1999)b. 1,2-Hydride shift in the biosynthesis of pinguisane-type sesquiterpenes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(9), 1667-1668.

Thangavel, C., Dhir, R. N., Volgin, D. V., & Shapiro, B. H. (2007). Sex-dependent expression of CYP2C11 in spleen, thymus and bone marrow regulated by growth hormone. *Biochemical pharmacology*, 74(10), 1476-1484.

The MassFinder Online Terpenoids Library List, https://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library_List (accessed May 2020).

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J-C, & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.

Tori, M., Arbiyanti, H., Taira, Z., & Asakawa, Y. (1992). Spirodensifolins A and B, new rearranged pinguisane sesquiterpenoids, from the liverwort *Frullanoides densifolia*. *Tetrahedron Letters*, 33(28), 4011-4012.

Tori, M., Arbiyanti, H., Taira, Z., & Asakawa, Y. (1993). Terpenoids of the liverwort *Frullanoides densifolia* and *Trocholejeunea sandvicensis*. *Phytochemistry*, 32(2), 335-348.

Tori, M., Nakashima, K., Asakawa, Y., Connolly, J. D., Harrison, L. J., Rycroft, D. S., Singh, J. & Woods, N. (1995). Structure of conocephalenol, a sesquiterpenoid alcohol from the European liverwort *Conocephalum conicum*: Determination of the absolute configuration by total synthesis. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (5), 593-597.

Tori, M., Nakashima, K., Takeda, T., Kan, Y., Takaoka, S., & Asakawa, Y. (1996). Novel sesquiterpenoids from the Colombian liverwort *Porella swartziana*. *Tetrahedron*, 52(18), 6339-6354.

Tori, M., Makino, C., Hisazumi, K., Sono, M., & Nakashima, K. (2001). Synthesis of a homochiral ketone having a pinguisane skeleton using phenylethylamine as a chiral auxiliary: a formal total synthesis of deoxopinguisone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12(2), 301-307.

Tosun, A., Küpeli Akkol, E., Süntar, I., Özenoğlu Kiremit, H., & Asakawa, Y. (2013). Phytochemical investigations and bioactivity evaluation of liverworts as a function of anti-inflammatory and antinociceptive properties in animal models. *Pharmaceutical Biology*, 51(8), 1008-1013.

Toyota, M., Nagashima, F., Fukuyama, Y., Honda, S., & Asakawa, Y. (1988). Bicyclogermacrene type sesquiterpenoid from the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 27(10), 3317-3319.

Toyota, M., Nagashima, F., & Asakawa, Y. (1989)a. Striatane- and pinguisane-type sesquiterpenoids and phytane-type diterpenoid from the liverwort *Porella navicularis*. *Phytochemistry*, 28(6), 1661-1665.

Toyota, M., Nagashima, F., & Asakawa, Y. (1989)b. Volatile components and pinguisane-type sesquiterpenoids from the liverwort *Porella cordaeana*. *Phytochemistry*, 28(12), 3383-3387.

Toyota, M., Ueda, A., & Asakawa, Y. (1991). Sesquiterpenoids from the liverwort *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. *Phytochemistry*, 30(2), 567-573.

Toyota, M., Koyama, H., Hashimoto, T., & Asakawa, Y. (1995). Sesquiterpenoids from the liverwort *Dicranolejeunea Yoshinagana* (Hatt.) Mizut. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(4), 714-716.

Toyota, M., Saito, T., & Asakawa, Y. (1996). A phenethyl glycoside from *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 43(5), 1087-1088.

Toyota, M., Saito, T., Matsunami, J., & Asakawa, Y. (1997). A comparative study on three chemotypes of the liverwort *Conocephalum conicum* using volatile constituents. *Phytochemistry*, 44(7), 1265-1270.

Toyota, M., Tanimura, K., & Asakawa, Y. (1998). Cytotoxic 2,3-secoaromadendrane-type sesquiterpenoids from the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Planta Medica*, 64(5), 462-464.

Toyota, M., Yonehara, Y., Horibe, I., Minagawa, K., & Asakawa, Y. (1999). A revision of the positive sign of the optical rotation and its maximum value of α -eudesmol. *Phytochemistry*, 52(4), 689-694.

Toyota, M., Omatsu, I., & Asakawa, Y. (2001). New chroman derivatives from the Japanese liverworts *Metacalypogeia cordifolia* and *Cephalozia otaruensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(7), 924-926.

Toyota, M., Omatsu, I., Braggins, J., & Asakawa, Y. (2004). New humulane-type sesquiterpenes from the liverworts *Tylimanthus tenellus* and *Marchantia emarginata* subsp. *tosana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(4), 481-484.

Turk, A., Glade, P. R., & Chessin, L. N. (1969). Blast-like transformation induced in peripheral blood lymphocytes by cellular injury: a comparison of sonication and phytohemagglutinin. *Blood*, 33(2), 329-340.

Uyehara, T., Kabasawa, Y., Kato, T., & Furuta, T. (1985). Photochemical rearrangement approach to the total synthesis of ($\pm$)-pinguisone and ($\pm$)-deoxopinguisone. *Tetrahedron Letters*, 26(19), 2343-2346.

Uyehara, T., Kabasawa, Y., & Kato, T. (1986). Rearrangement Approaches to Cyclic Skeletons. IV. The Total Synthesis of ($\pm$)-Pinguisone and ($\pm$)-Deoxopinguisone Based on Photochemical [1, 3] Acyl Migration of a Bicyclo [3.2.2] non-6-en-2-one. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 59(8), 2521-2528.

Vaillant, S. (1727). *Botanicion Parisiense*. Leiden, Netherlands.

Valcic, S., Zapp, J., & Becker, H. (1997). Plagiochilines and other sesquiterpenoids from *Plagiochila* (Hepaticae). *Phytochemistry*, 44(1), 89-99.

Valle, M. G., Appendino, G., Nano, G. M., & Picci, V. (1986). Prenylated coumarins and sesquiterpenoids from *Ferula communis*. *Phytochemistry*, 26(1), 253-256.

Valterová, I., Unelius, C. R., Vrkoč, J., & Norin, T. (1992). Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons from the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 31(9), 3121-3123.

Van den Brink, M. R., Alpdogan, Ö., & Boyd, R. L. (2004). Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 856-867.

- Van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463–471.
- Vashistha, H., Dubey, R. C., & Pandey, N. (2007). Antimicrobial activity of three bryophytes against human pathogens. *Current Trends in Bryology*. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun, India, p. 47-59.
- Vashishta, B. R., Singh, A. K., & Kumar, A. (2010). *Botany for degree students: Bryophyta*. S Chand & Company Limited, 517.
- Veljić, M., Ćirić, A., Soković, M., Janačković, P., & Marin, P. D. (2010). Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. *Archives of Biological Sciences*, 62(2), 381-385.
- Veljić, M., Vukov, D., & Sabovljević, M. (2018). *Biologija briofita I: Morfologija i sistematika*. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad; Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
- Verpoorte, R. K., Kim, H. K., & Choi, Y. H. (2006). Plants as source of medicines, new perspectives. In R. J. Bogers, L. E. Craker, & D. Lange (Eds.), *Medicinal and aromatic plants: Agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects* (Vol. 17). Springer, 261-273.
- Vincent, C. D., Lawlor, A. J., & Tipping, E. (2001). Accumulation of Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by the bryophyte *Scapania undulata* in three upland waters of different pH. *Environmental Pollution*, 114(1), 93-100.
- Wada, K., & Munakata, K. (1971). Insect Feeding Inhibitors in Plants: Part III. Feeding Inhibitory Activity of Terpenoids in Plants. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(1), 115-118.
- Wagner, H. (1999). *Immunomodulatory Agents from Plants*, Springer, Basel, 1-365.
- Wang, F. (2015). An analgesic chinese medicine liquid used in soft wart treatment. China, CN104474212.
- Wang, R., & Shi, Y. F. (2002). A simplified protocol for apoptosis assay by DNA content analysis. *Biotechniques*, 33, S88-S91.
- Wang, H., & Tompkins, L. M. (2008). CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Current Drug Metabolism*, 9(7), 598-610.
- Wang, G., Li, X., Huang, F., Zhao, J., Ding, H., Cunningham, C., Coad, J. E., Flynn, D. C., Reed, E., & Li, Q. Q. (2005). Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 62(7–8), 881–893.
- Watts, G. (1891). *A dictionary of the economic products of India* (Part V). Delhi, 1-676.

- Wei, H. C., Ma, S. J., & Wu, C. L. (1995). Sesquiterpenoids and cyclic bisbibenzyls from the liverwort *Reboulia hemisphaerica*. *Phytochemistry*, 39(1), 91-97.
- Wellman, C. H., Osterloff, P. L., & Mohiuddin, U. (2003). Fragments of the earliest land plants. *Nature*, 425(6955), 282-285.
- Wiseman, H., Smith, C., Halliwell, B., Cannon, M., Arnstein, H. R., & Lennard, M. S. (1992). Droloxifene (3-hydroxytamoxifen) has membrane antioxidant ability: potential relevance to its mechanism of therapeutic action in breast cancer. *Cancer Letters*, 66(1), 61-68.
- Wong, S. M., Oshima, Y., Pezzuto, J. M., Fong, H. H., & Farnsworth, N. R. (1986). Plant anticancer agents XXXIX: Triterpenes from *Iris missouriensis* (Iridaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(3), 317-320.
- Wood, W. F., Lancaster, W. C., Fisher, C. O., & Stotler, R. E. (1996). *trans*-Methyl cinnamate: The major volatile from some populations of the liverwort, *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, 42(1), 241-242.
- Wren, R. W. (1956). *Potters New Encyclopedia of Botanical Drugs and Preparations*. 7th ed. Harper & Row, London, 1-400.
- Wright, A. D., König, G. M., & Sticher, O. (1992). The enhanced role of a lanthanide shift reagent in the structure elucidation and ¹H NMR and ¹³C NMR characterization of some marine natural products. *Phytochemical Analysis*, 3(2), 73-79.
- Wu, P. C. (1977). *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par can be used for curing cardiovascular disease. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 15, 93.
- Wu, P. C. (1982). Some uses of mosses in China. *Bryological Times*, 13, 5.
- Wu, X. Z., Cheng, A. X., Sun, L. M., & Lou, H. X. (2008). Effect of plagiochin E, an antifungal macrocyclic bis(bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1478-1485.
- Wu, X. Z., Cheng, A. X., Sun, L. M., Sun, S. J., & Lou, H. X. (2009). Plagiochin E, an antifungal bis(bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1790(8), 770-777.
- Xiao, J. B., Chen, X. Q., Zhang, Y. W., Jiang, X. Y., & Xu, M. (2006). Cytotoxicity of *Marchantia convoluta* leaf extracts to human liver and lung cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39, 731-738.
- Xie, C. F., Qu, J. B., Wu, X. Z., Liu, N., Ji, M., & Lou, H. X. (2010). Antifungal macrocyclic bis(bibenzyls) from the Chinese liverwort *Ptargiochasm intermedlum* L. *Natural Product Research*, 24(6), 515-520.

- Xue, X., Sun, D. F., Sun, C. C., Liu, H. P., Yue, B., Zhao, C. R., Lou, H., & Qu, X. J. (2012). Inhibitory effect of riccardin D on growth of human non-small cell lung cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *Lung Cancer*, 76(3), 300-308.
- Yadav, J. S., Singh, S., & Das, S. (2017). An Enantioselective Approach to Pinguisane Sesquiterpenes: Total Synthesis of (–)-Pinguisenol and (–)-Isonaviculol. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(19), 2824-2830.
- Yadav, J. S., Singh, S., & Das, S. (2018). Stereoselective Total Syntheses of Acutifolone A, Bisacutifolone A and B, Pinguisenol, and Isonaviculol. *ACS Omega: An Open Access Journal of the American Chemical Society*, 3(1), 636–647.
- Yan, X., Zhou, J., & Xie, G. (1999). *Traditional Chinese medicines: Molecular structures, natural sources, and applications*. Ashgate Publishing Co., Routledge Taylor & Francis Group, 1-1024.
- Yang, R., Zhang, Z., Pei, X., Han, X., Wang, J., Wang, L., Z. Long, S. Xiaoyi, & Li, Y. (2009). Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. *Food Chemistry*, 113(2), 464-470.
- Yang, S. (2013). Traditional Chinese medicinal preparation for external application for treating infant impetigo. Faming Zhuanli Shenqing, CN 103356757 A 20131023.
- Yofeey, J. M., Winter, G. C. B., Osmond, D. G., & Meek, E. S. (1965). Morphological studies in the culture of human leucocytes with phytohaemagglutinin. *British Journal of Haematology*, 11(4), 488-497.
- Yoshida, T., Hashimoto, T., Takaoka, S., Kan, Y., Tori, M., Asakawa, Y., Pezzuto, J. M., Pangsupart, T., & Cordell, G. A. (1996). Phenolic constituents of the liverwort: four novel cyclic bisbibenzyl dimers from *Blasia pusilla* L. *Tetrahedron*, 52(46), 14487-14500.
- Yoshida, T., Toyota, M., & Asakawa, Y. (1997). Isolation, structure elucidation, and chemical derivatization of new cyclic bisbibenzyl dimer, pusilatin E, from the liverwort *Riccardia multifida* subsp. *decrescens*. *Journal of Natural Products*, 60, 145-147.
- Yu, F., Okamoto, S., Nakasone, K., Adachi, K., Matsuda, S., Harada, H., Misawa, N. & Utsumi, R. (2008). Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith). *Planta*, 227, 1291-1299.
- Zhabinskii, V. N., Minnaard, A. J., Wijnberg, J. B., & de Groot, A. (1996). Relative and absolute configuration of allohedycaryol. Enantiospecific total synthesis of its enantiomer. *The Journal of Organic Chemistry*, 61(12), 4022-4027.
- Zhang, C., Chen, X., Crandall-Stotler, B., Qian, P., Köllner, T. G., Guo, H., & Chen, F. (2019). Biosynthesis of methyl (*E*)-cinnamate in the liverwort *Conocephalum salebrosum* and evolution of cinnamic acid methyltransferase. *Phytochemistry*, 164, 50-59.

Zhou, X., Yang, Q., Wang, S., Tang, H., Xie, Y., Cao, W., & Sun, J. (2015). Traditional Chinese medicine compound preparation for treating bee toxin. Faming Zhuanli Shenqing, CN 104324092 A 20150204.

Zinsmeister, D. H. & Mues, R. (1990). *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy*, Oxford University Press: Oxford, 1-470.

Zlatković, B., & Šarac, Z. (2016). *Praktikum iz sistematike biljaka* (1st ed.). Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet u Nišu.

Zurita, J. L., Jos, Á., del Peso, A., Salguero, M., López-Artíguez, M., & Repetto, G. (2005). Ecotoxicological evaluation of the antimalarial drug chloroquine. *Aquatic Toxicology*, 75(2), 97-107.

8. PRILOZI

– SPISAK PRILOGA –

PRILOG 1. HSQC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANE OBLASTI HSQC SPEKTRA (0,5 – 3,0 PPM i 10 – 45 PPM) (CDCl_3)

PRILOG 2. DEPT-135 SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CH_3 i CH SIGNALI SU POZITIVNI, A CH_2 SIGNALI SU NEGATIVNI) (CDCl_3)

PRILOG 3. HMBC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CDCl_3)

PRILOG 4. ^1H - ^1H COSY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI COSY SPEKTRA (0,5 – 3,5 PPM i 0,5 – 3,5 PPM) (CDCl_3)

PRILOG 5. NOESY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CDCl_3)

PRILOG 6. HOMONUKLEARNI DEKUPLOVANI PROTONSKI SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA FREKVENCA DEKUPLOVANJA JE OZNAČENA STRELICOM (CDCl_3)

PRILOG 7. DEPT-135 SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CH_3 I CH SIGNALI SU POZITIVNI, A CH_2 SIGNALI SU NEGATIVNI) (C_6D_6)

PRILOG 8. HSQC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI HSQC SPEKTRA (0,5 – 3,0 PPM I 10 – 45 PPM) (C_6D_6)

PRILOG 9. HMBC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI HMBC SPEKTRA (0,5 – 3,0 PPM I 10 – 45 PPM) (C_6D_6)

PRILOG 10. ^1H - ^1H COSY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI ^1H - ^1H COSY SPEKTRA (0,5 – 5,0 PPM I 0 – 2,5 PPM) (C_6D_6)

PRILOG 11. NOESY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI NOESY SPEKTRA (0,5 – 3,5 PPM I 0,5 – 3,0 PPM) (C_6D_6)

PRILOG 12. HOMONUKLEARNO DEKUPLOVANJE PROTONSKOG SPEKTRA α -FURANOPINGVIZANOLA. FREKVENCA DEKUPLOVANJA JE OZNAČENA STRELICOM (C_6D_6)

PRILOG 13. DEPT-135 SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA. (CH_3 I CH SIGNALI SU POZITIVNI, A CH_2 SIGNALI SU NEGATIVNI) (CDCl_3)

PRILOG 14. HSQC (IZNAD) I HMBC (ISPOD) SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA NAKON DODAVANJA 9 MG $\text{Eu}(\text{fod})_3$

PRILOG 15. HSQC SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA (CDCl_3)

PRILOG 16. UVEĆANE OBLASTI HSQC SPEKTRA FURANOPINGVIZANONA (0,8 – 3,2 PPM I 10 – 40 PPM) (CDCl_3)

PRILOG 17. ^1H - ^1H COSY SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA (CDCl_3)

PRILOG 18. UVEĆANJE OBLASTI ^1H - ^1H COSY SPEKTRA FURANOPINGVIZANONA (0,5 – 3,5 PPM) (CDCl_3)

PRILOG 19. HOMONUKLEARNO-DEKUPLOVANI PROTONSKI SPEKTAR
FURANOPINGVIZANONA. FREKVENCA DEKUPLOVANJA JE OZNAČENA STRELICOM (C₆D₆)

PRILOG 20. ¹H (400 MHz) I ¹³C (100,6 MHz) NMR PODACI KONOCEFALENOLA (HLOOROFORM-*d*, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE)

PRILOG 21. ¹H (400 MHz) I ¹³C (100,6 MHz) NMR PODACI (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA (BENZEN-*d*₆, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE), I UOČENE gHMBC I NOESY INTERAKCIJE

PRILOG 22. ŠEMA NUMERACIJE ATOMA ZA KONOCEFALENOL

PRILOG 23. ŠEMA NUMERACIJE ATOMA ZA KONOCEFALENOL – 3D MODEL

PRILOG 24. ¹H-NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR KONOCEFALENOLA I
ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 25. GORNJI DEO: SIMULIRANI ¹H-NMR SPEKTAR KONOCEFALENOLA; SREDNJI DEO: ¹H-NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR KONOCEFALENOLA ODMAH NAKON RASTVARANJA UZORKA U HLOOROFORMU-*d*; DONJI DEO: ¹H-NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) ISTOG UZORKA POSLE 24 h

PRILOG 26. ¹³C-NMR (100,6 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR KONOCEFALNOLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 27. MASENI SPEKTAR KONOCEFALENOLA

PRILOG 28. ¹H-NMR (400 MHz, BENZEN-*d*₆) SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA I ODOGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 29. GORE: UVEĆANJE ¹H-NMR (400 MHz, BENZEN-*d*₆) SPEKTRA (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA KOJE ODGOVARA SIGNALIMA H-14a, H-14b, I OH-14. DOLE: IZGLED OVIH SIGNALA PRI IRADIJACIJI OH-14 PROTONA (NA 0,48 PPM) U EKSPERIMENTU SELEKTIVNOG HOMONUKLEARNOG DEKUPLOVANJA

PRILOG 30. ¹³C-NMR (100,6 MHz, BENZEN-*d*₆) SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 31. gHSQC SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA

PRILOG 32. gHMBC SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA

PRILOG 33. NOESY SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA

PRILOG 34. GORNJI DEO: TIC HROMATOGRAM BICIKLOGERMAKRENA KOJI SADRŽI PROIZVOD *COPE*-OVOG PREMEŠTANJA, β-ELEMEN; DONJA STRANA: TIC HROMATOGRAM UZORKA (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA (DOBIJEN POD ISTIM USLOVIMA), KOJI NE POKAZUJE PROIZVODE *COPE*-OVOG PREMEŠTANJA

PRILOG 35. UVEĆANJA TIC HROMATOGRAMA *C. CONICUM* Et₂O HROMATOGRAFSKE FRAKCIJE 24 PRE (LEVO) I POSLE (DESNO) OKSIDACIJE

PRILOG 36. MASENI SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA

PRILOG 37. ^1H -NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR HROMATOGRAFSKE FRAKCIJE (24) KOJI SADRŽI *ca.* 9% (BAZIRANO NA GC-MS) IZOLEPIDOZEN-14-ALA; ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA DOBIJENOG (CRVENO) I SIMULIRANOG (PLAVO) SPEKTRA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 38. UVEĆANJA COSY SPEKTRA IZOLEPIDOZEN-14-ALA

PRILOG 39. UVEĆANJA gHSQC SPEKTRA IZOLEPIDOZEN-14-ALA

PRILOG 40. ^1H (400 MHz) I ^{13}C (100,6 MHz) NMR SPEKTROSKOPSKI PODACI (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA (BENZEN-*d*₆) I KONOCEFALENOLA (HLOOROFORM-*d*)

PRILOG 41. ^1H -NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA I ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 42. ŠEMA NUMERACIJE ATOMA *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA – 3D MODEL

PRILOG 43. KLJUČNE gHMBC INTERAKCIJE *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA

PRILOG 44. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 45. gHSQC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA

PRILOG 46. gHMBC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA

PRILOG 47. NOESY SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA

PRILOG 48. MASENI SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA

PRILOG 49. ^1H (400 MHz) I ^{13}C (100,6 MHz) NMR PODACI *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA (HLOOROFORM-*d*, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE), I UOČENE gHMBC I NOESY INTERAKCIJE

PRILOG 50. ^1H (400 MHz) I ^{13}C (100,6 MHz) NMR PODACI *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA (HLOOROFORM-*d*, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE), I UOČENE gHMBC I NOESY INTERAKCIJE

PRILOG 51. ^1H -NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA I ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 52. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA

PRILOG 53. gHSQC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA

PRILOG 54. UVEĆANJE NOESY SPEKTRA *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA

PRILOG 55. MASENI SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA

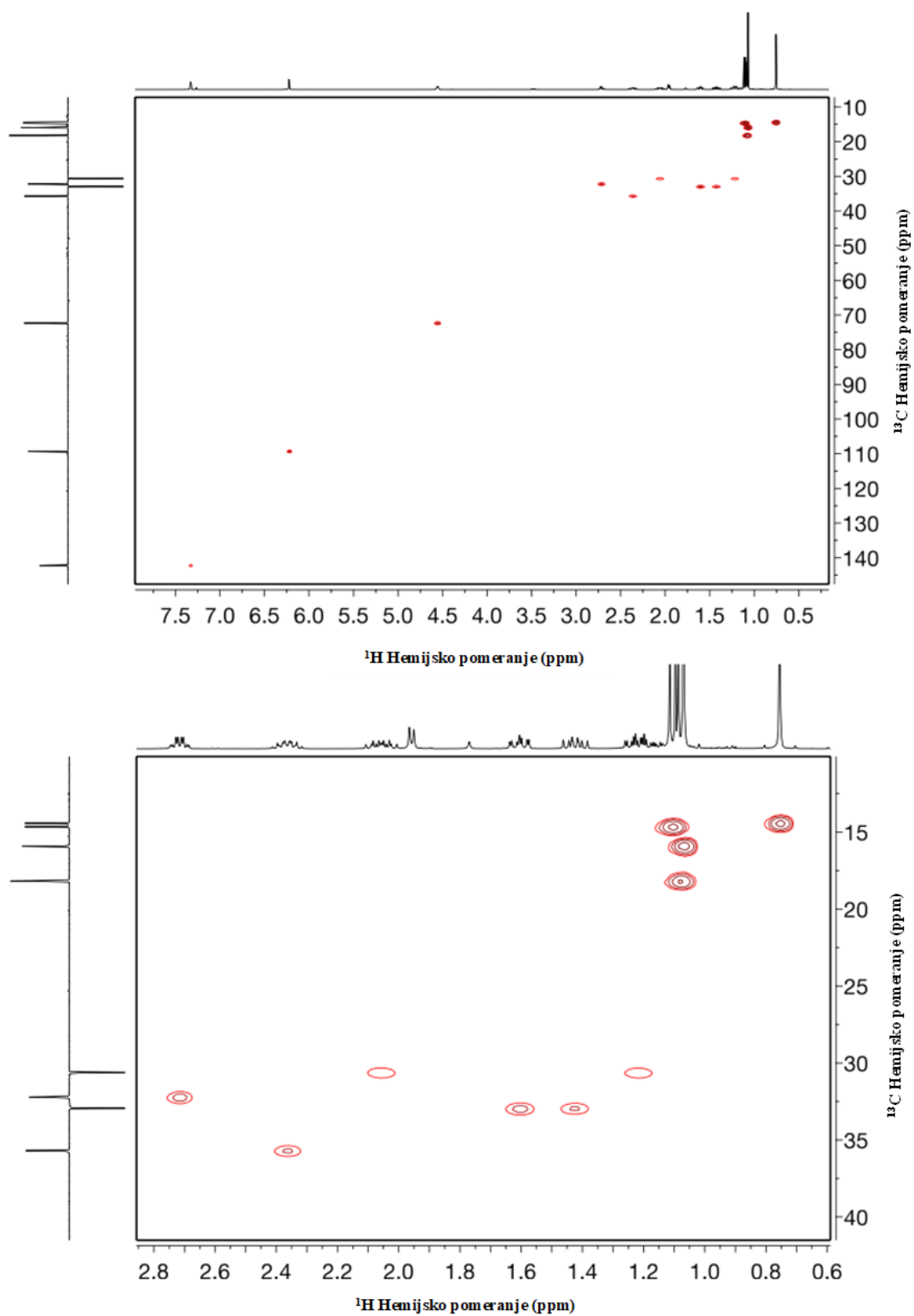
PRILOG 56. TIC HROMATOGRAM ETARSKOG ULJA *C. CONICUM* (GORNJA STRANA) SA OBELEŽENIM PIKOM GEOZMINA; POREĐENJE MASENOG SKENA PIKA I MASENOG SPEKTRA GEOZMINA IZ LITERATURE (DONJA STRANA)

PRILOG 57. gHMBC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA

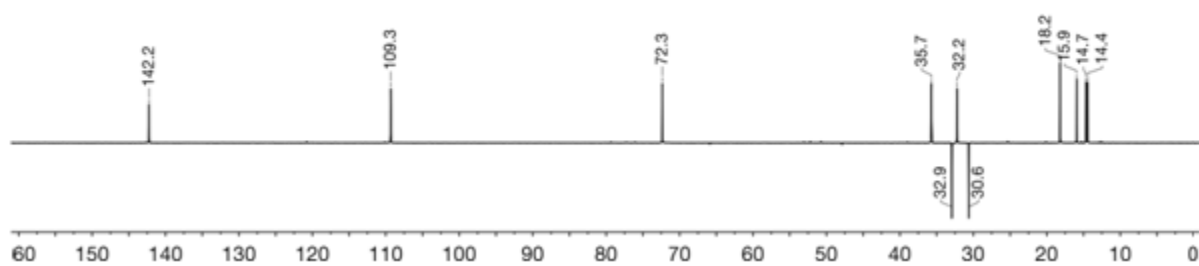
PRILOG 58. KLJUČNE gHMBC INTERAKCIJE *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA

PRILOG 59. DETALJI OPTIMIZACIJE GEOMETRIJE

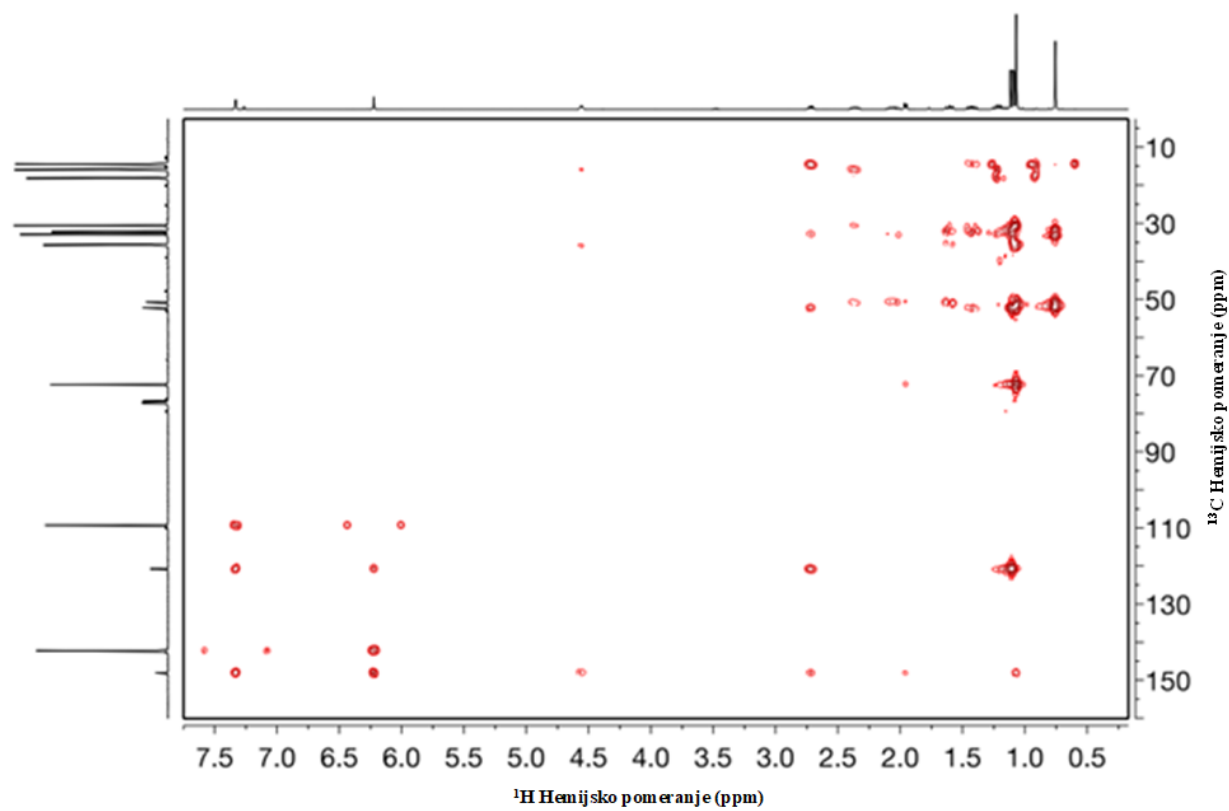
PRILOG 1. HSQC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANE OBLASTI HSQC SPEKTRA (0,5 – 3,0 PPM i 10 – 45 PPM) (CDCl_3)



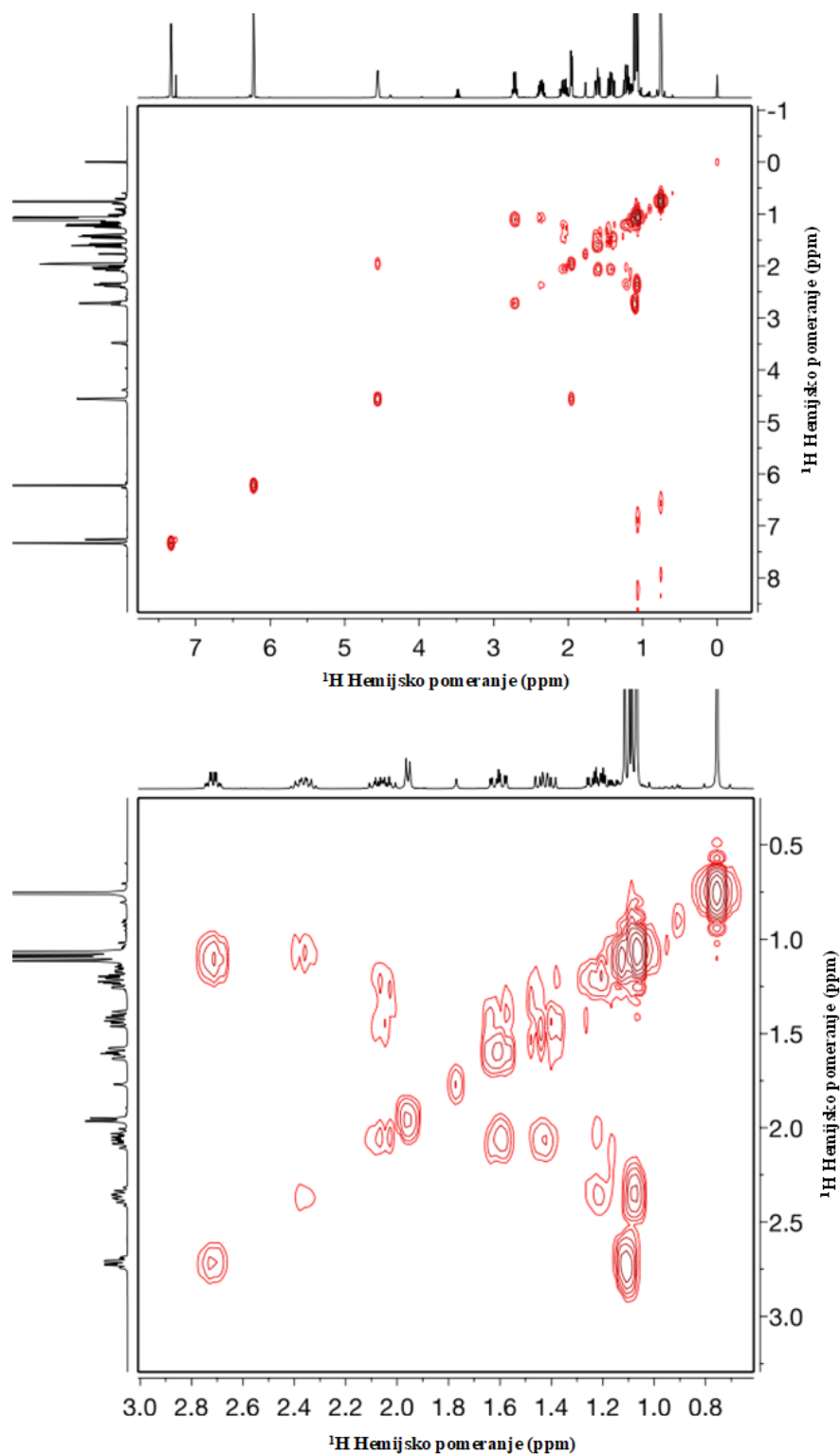
PRILOG 2. DEPT-135 SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CH_3 i CH SIGNALI SU POZITIVNI, A CH_2 SIGNALI SU NEGATIVNI (CDCl_3))



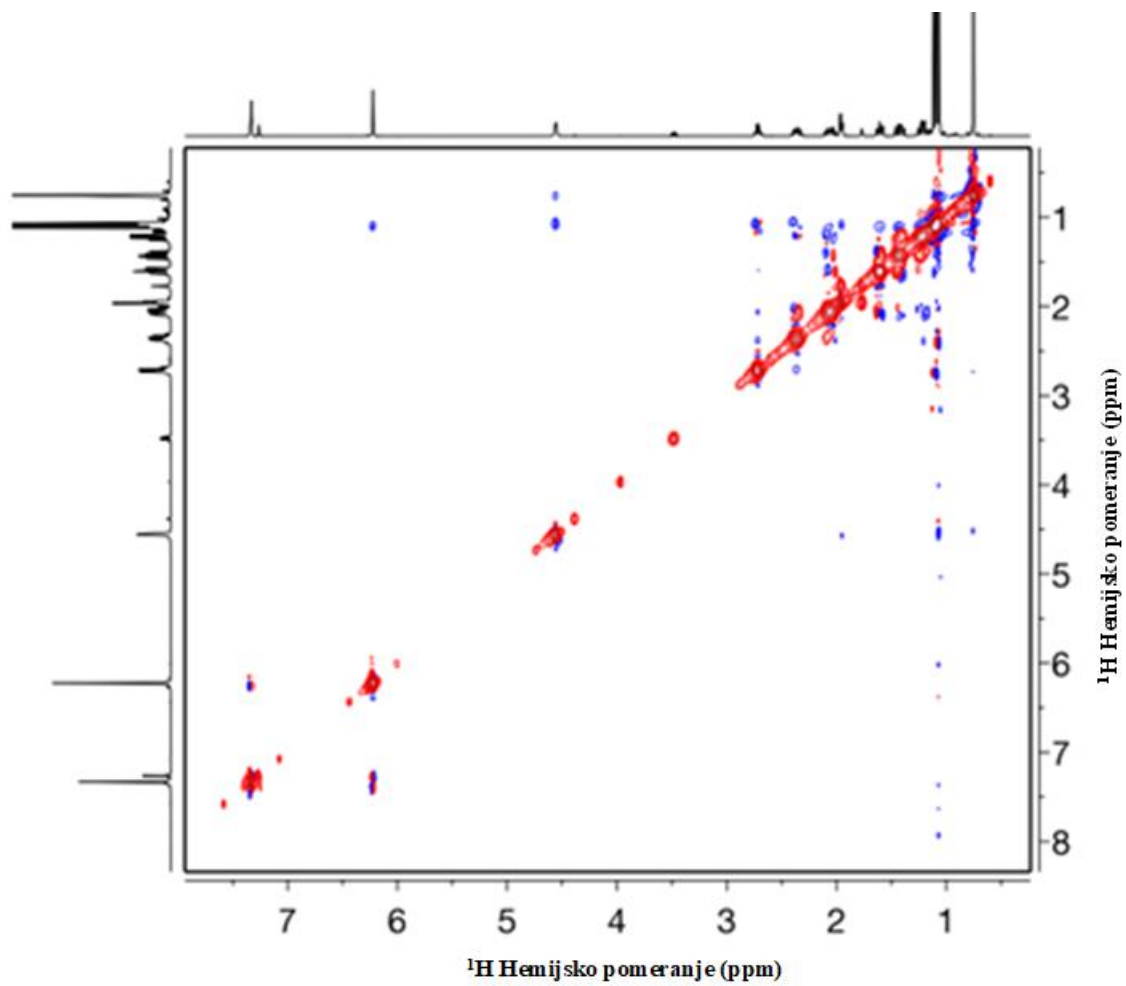
PRILOG 3. HMBC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CDCl_3)



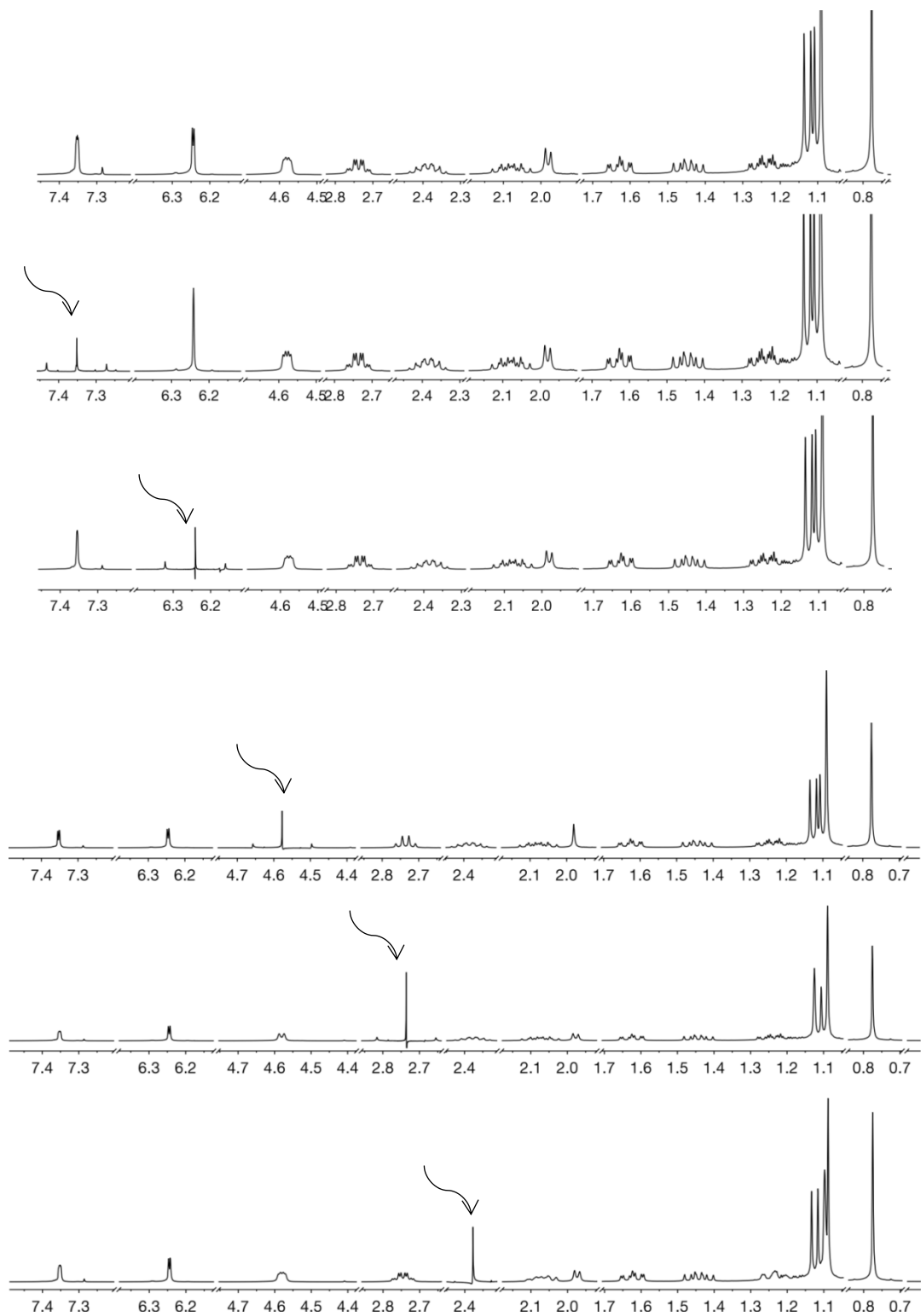
PRILOG 4. ^1H - ^1H COSY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI COSY SPEKTRA (0,5 – 3,5 PPM i 0,5 – 3,5 PPM) (CDCl_3)

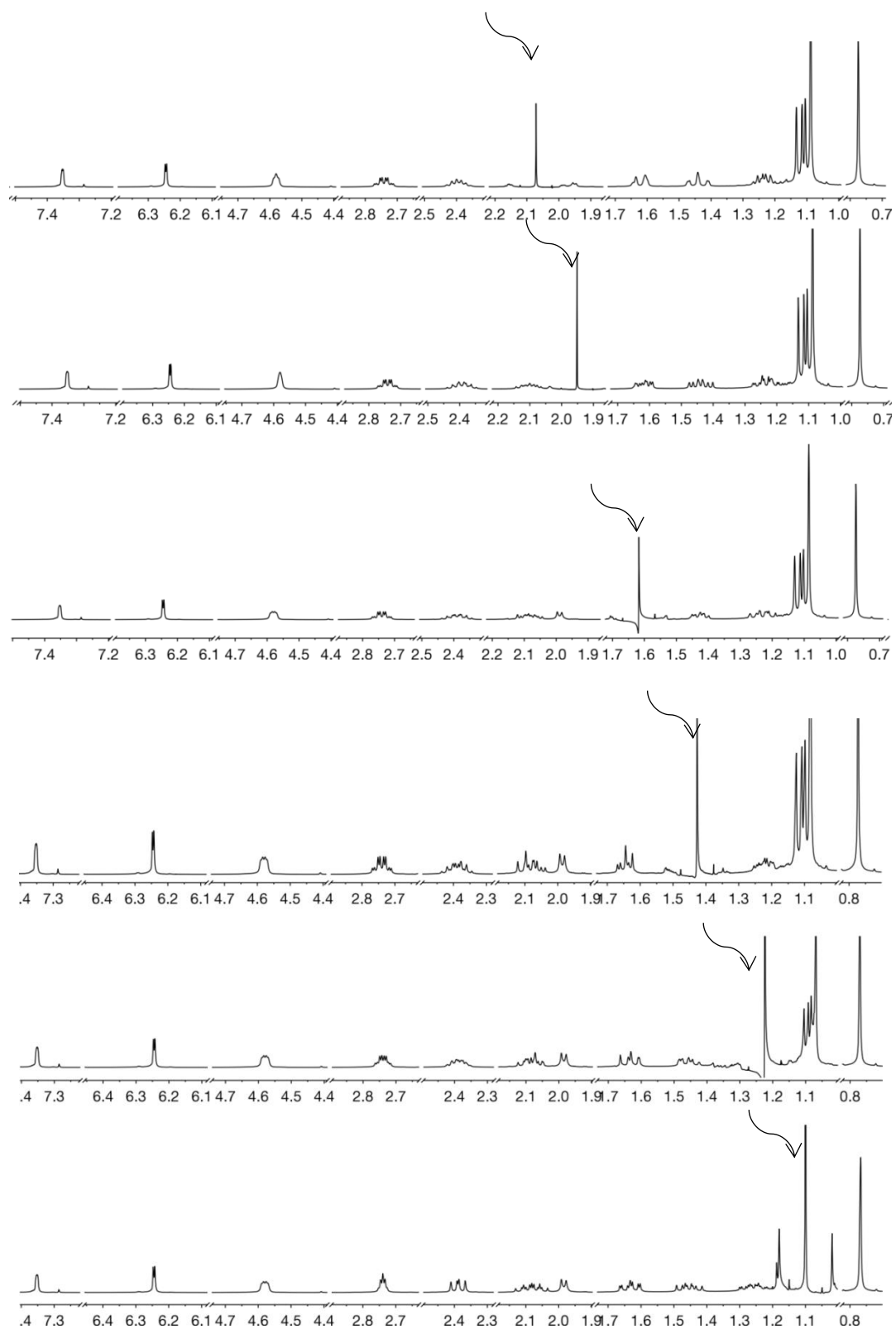


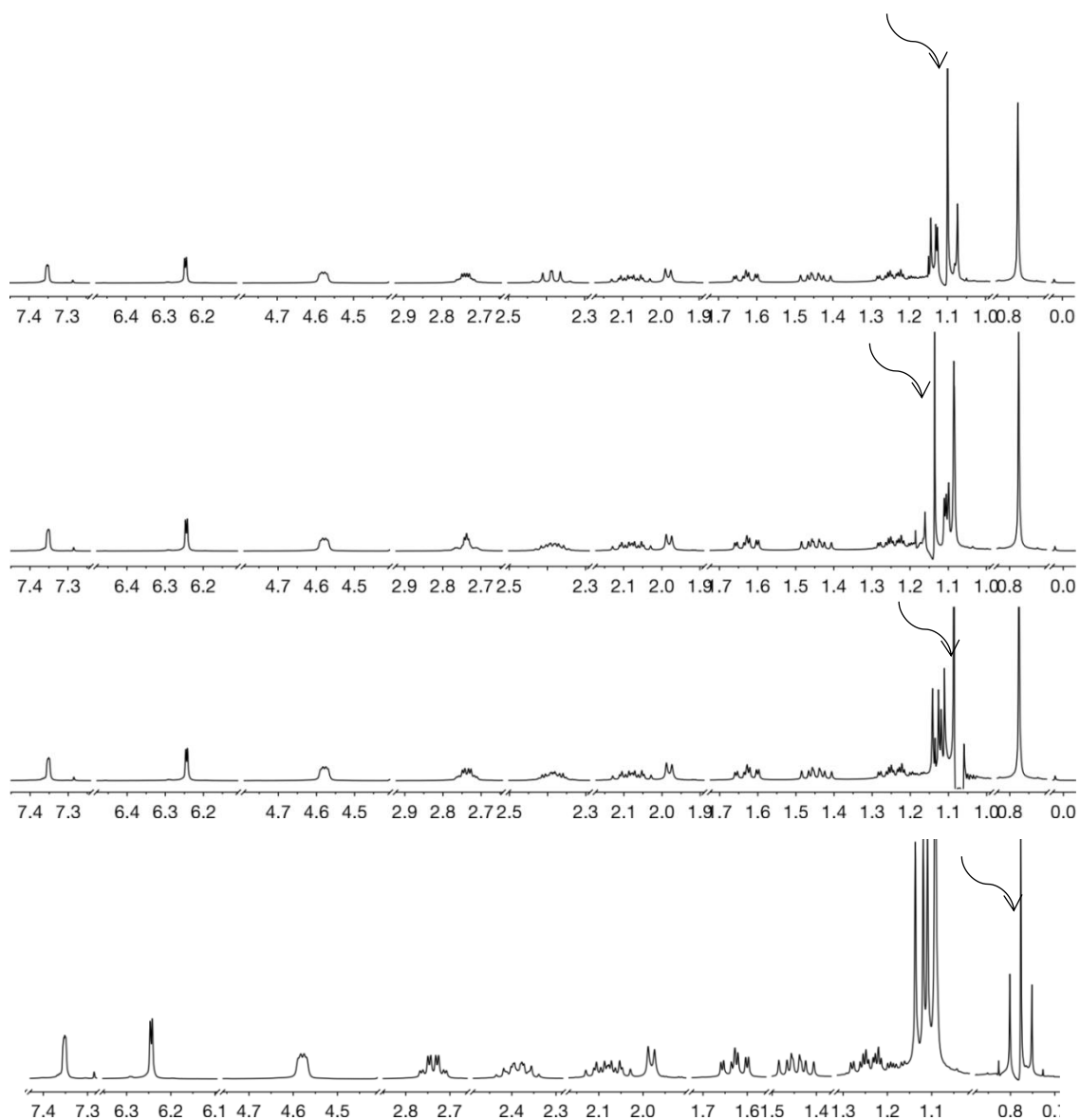
PRILOG 5. NOESY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CDCl_3)



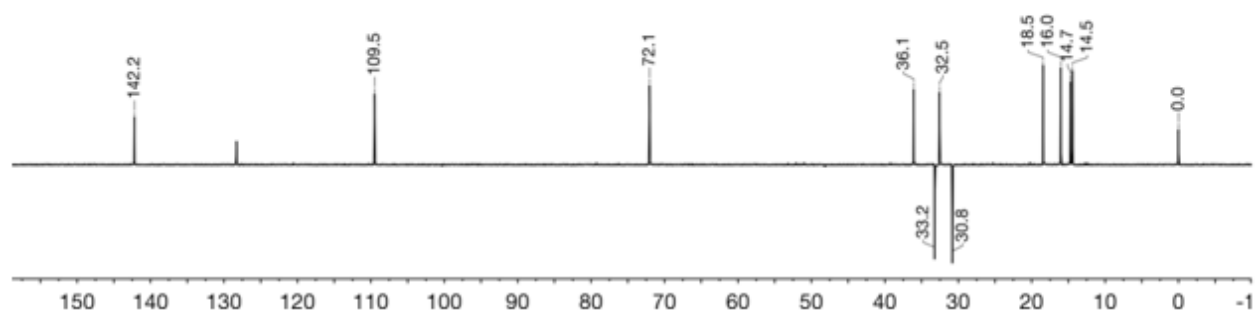
PRILOG 6. HOMONUKLEARNI DEKUPLOVANI PROTONSKI SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA. FREKVENCA DEKUPLOVANJA JE OZNAČENA STRELICOM (CDCl₃)



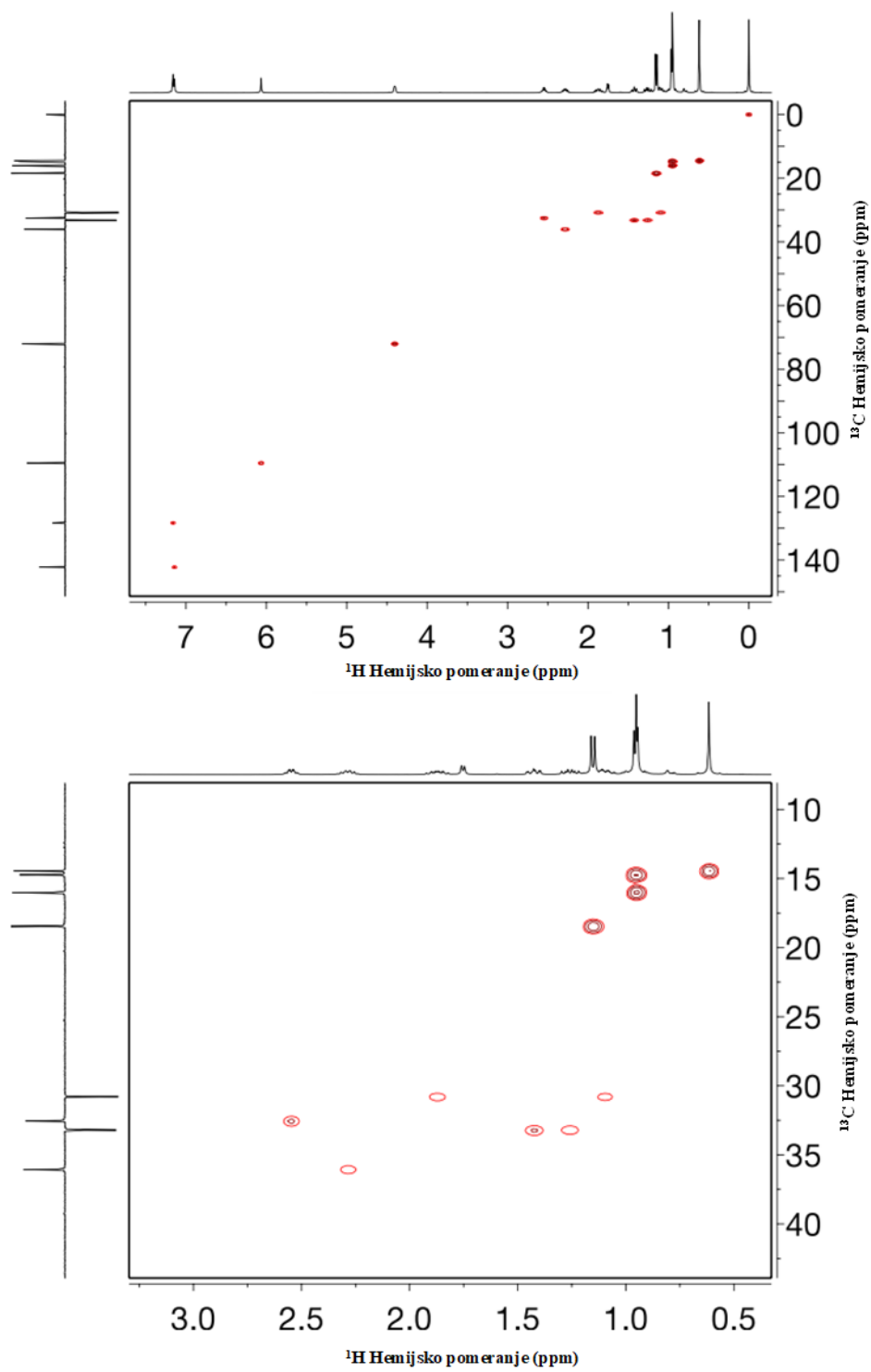




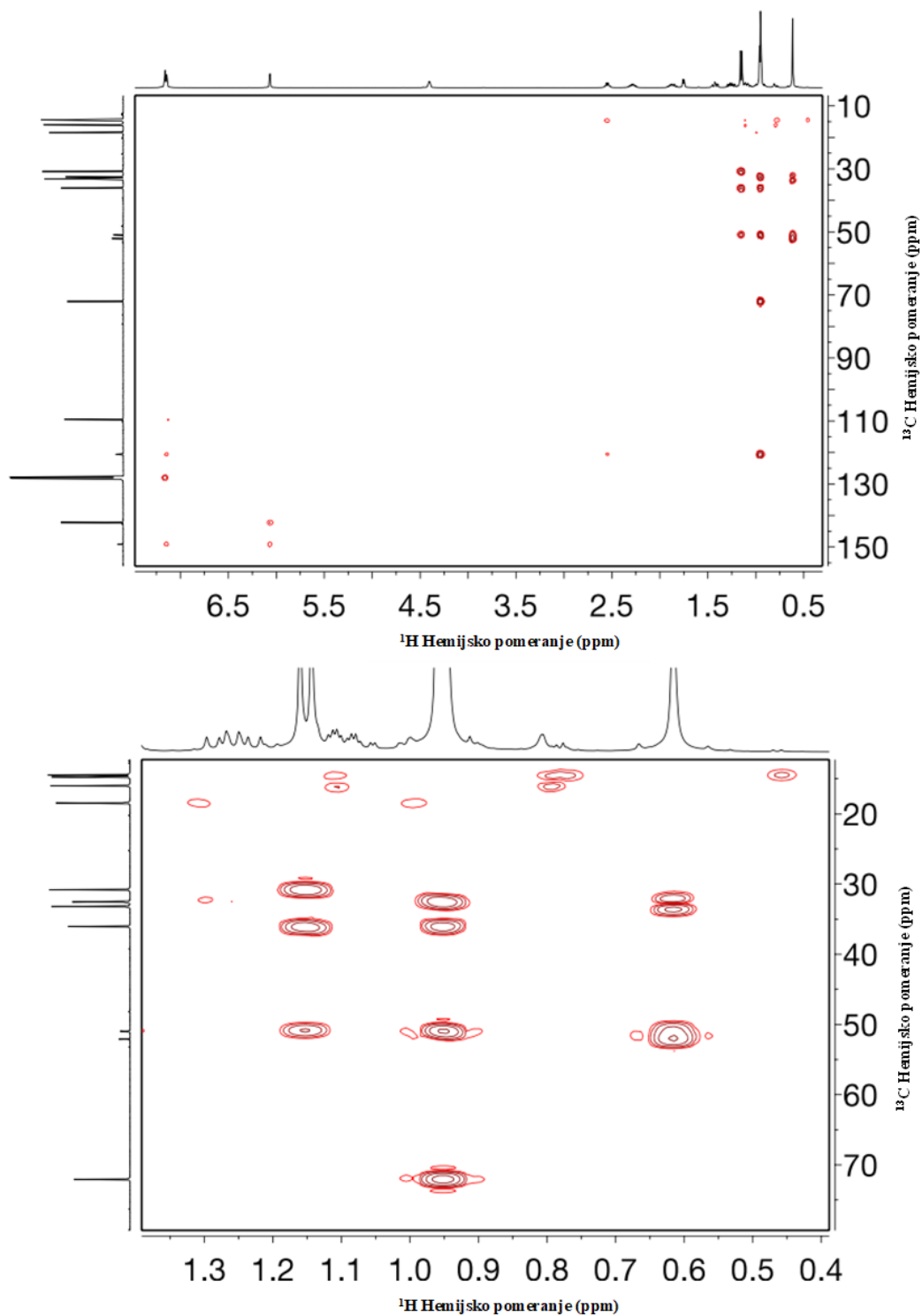
PRILOG 7. DEPT-135 SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA (CH_3 I CH SIGNALI SU POZITIVNI, A CH_2 SIGNALI SU NEGATIVNI (C_6D_6))



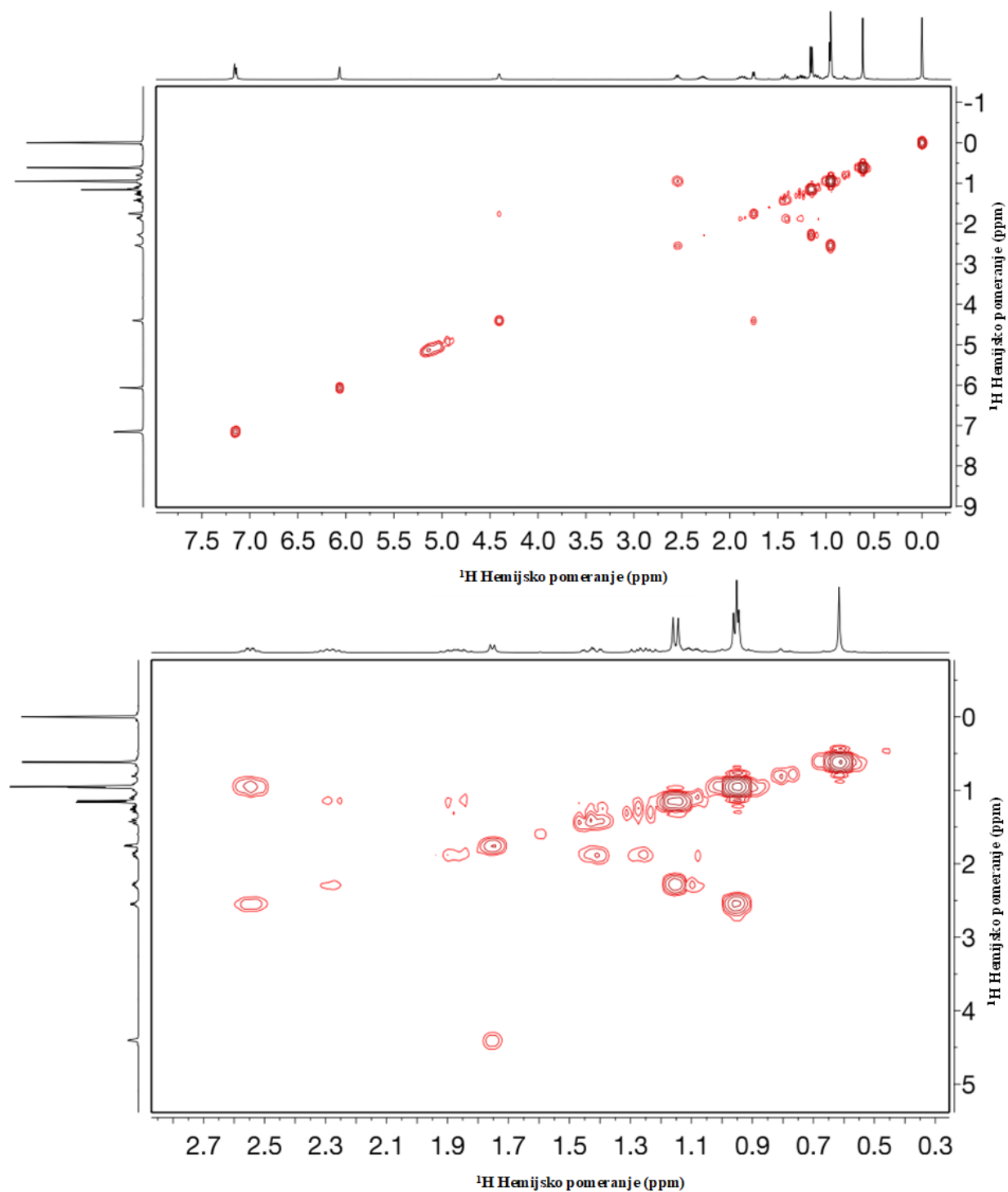
PRILOG 8. HSQC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI HSQC SPEKTRA (0,5 – 3,0 PPM I 10 – 45 PPM) (C_6D_6)



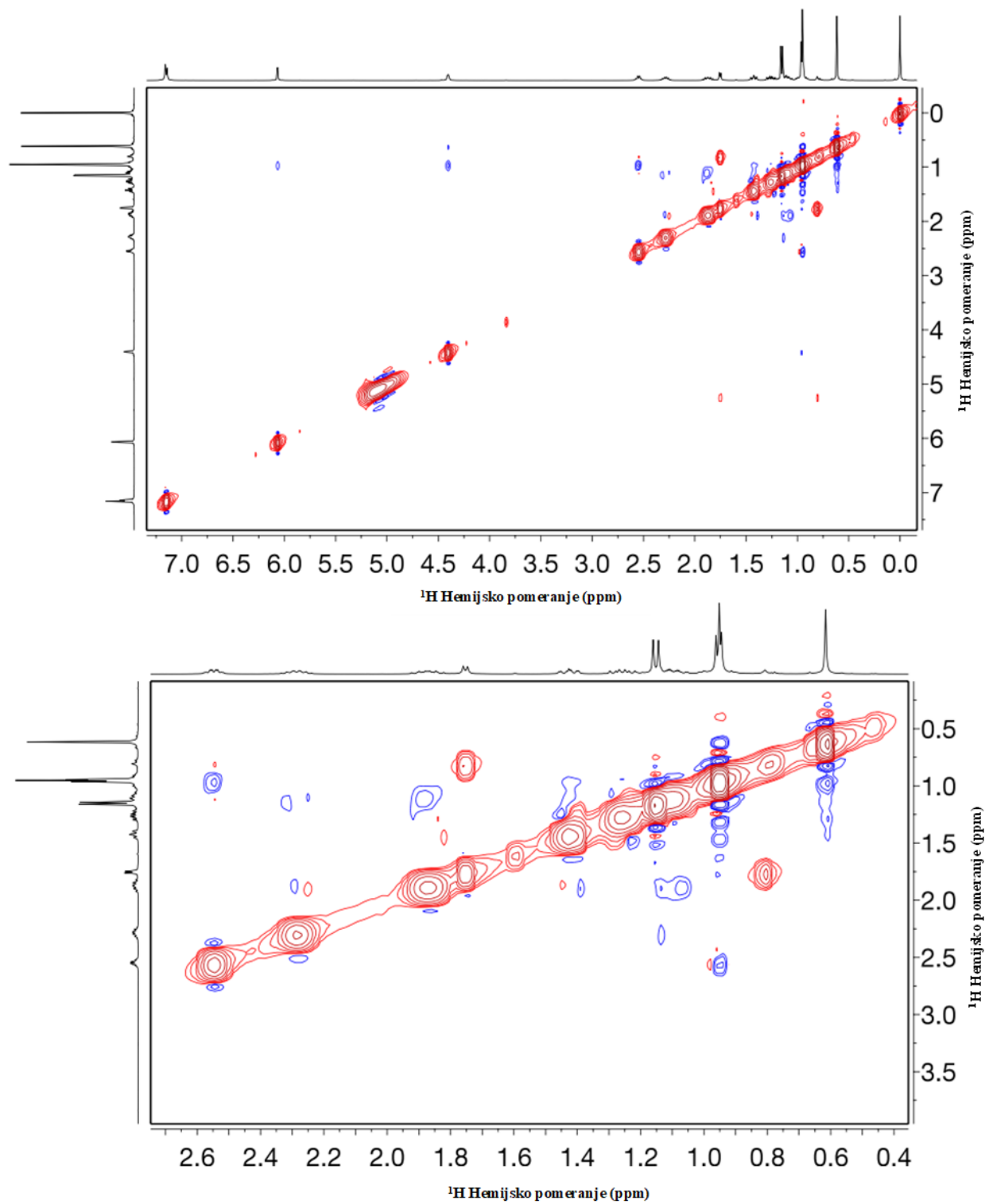
PRILOG 9. HMBC SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI HMBC SPEKTRA (0,5 – 3,0 PPM I 10 – 45 PPM) (C_6D_6)



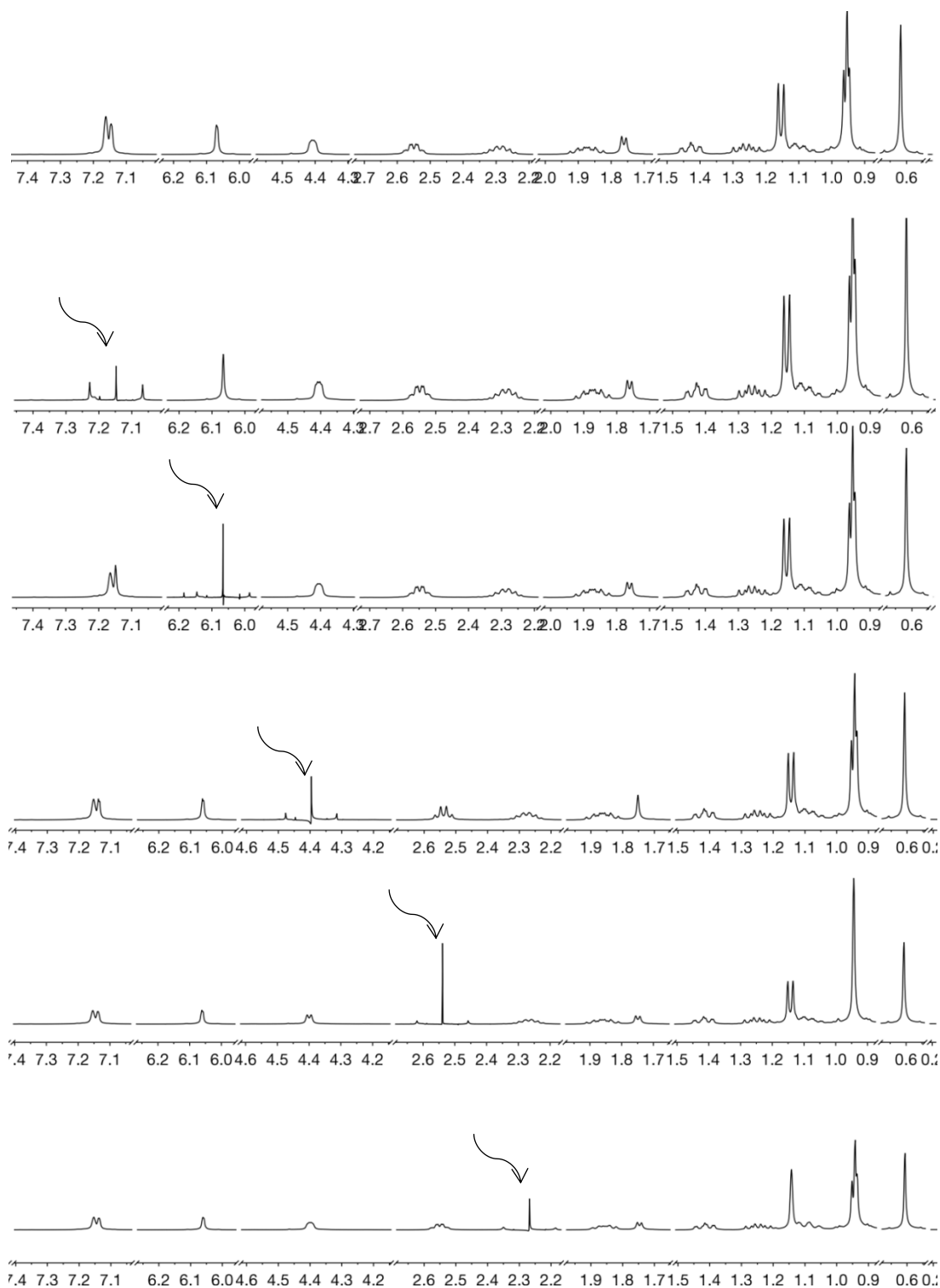
PRILOG 10. ^1H - ^1H COSY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI ^1H - ^1H COSY SPEKTRA (0,5 – 5,0 PPM I 0 – 2,5 PPM) (C_6D_6)

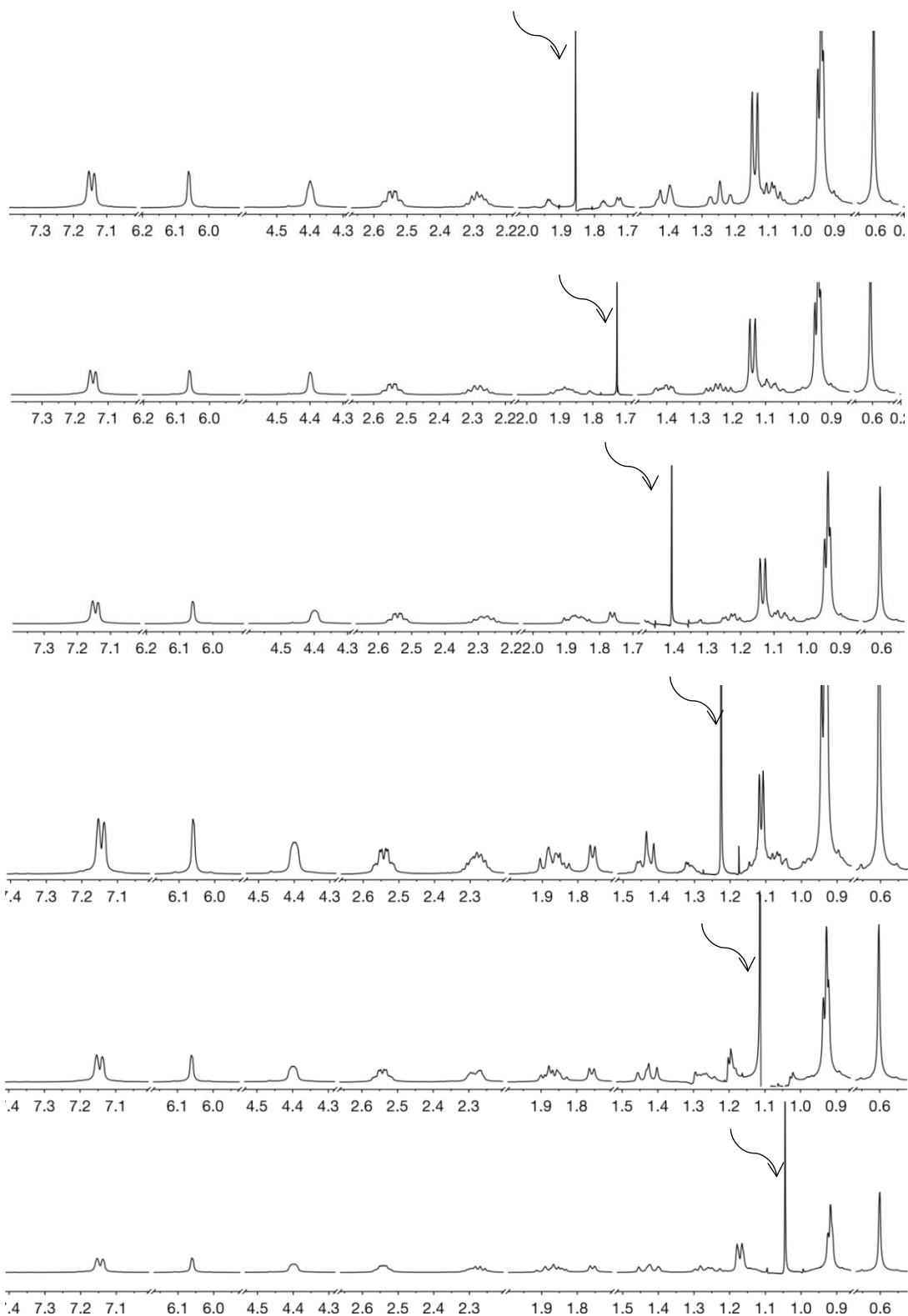


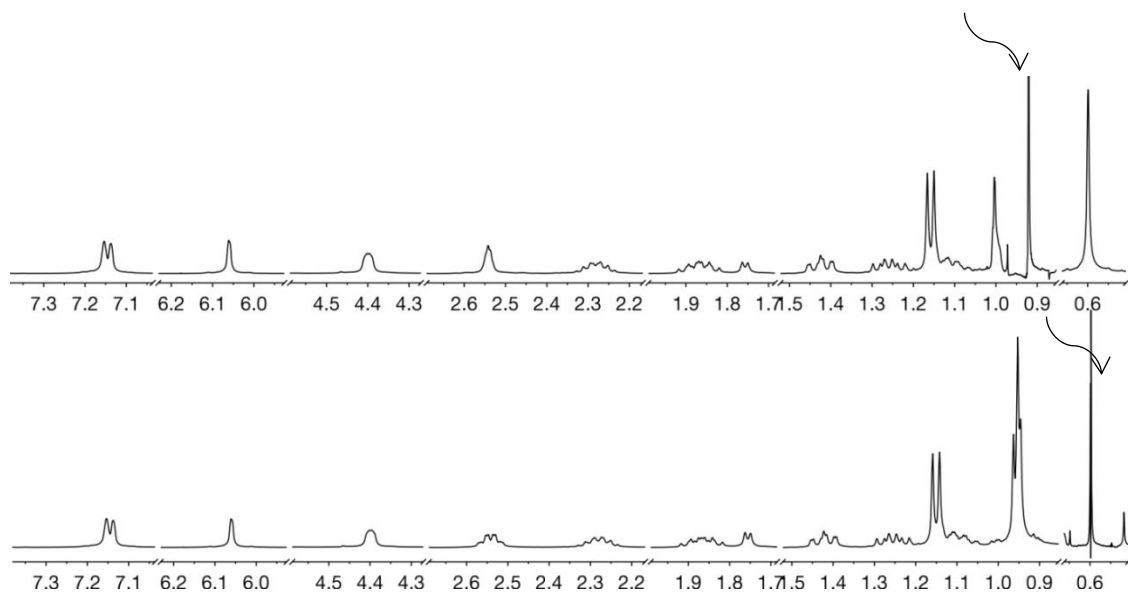
PRILOG 11. NOESY SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA I UVEĆANJE OBLASTI NOESY SPEKTRA (0,5 – 3,5 PPM I 0,5–3,0 PPM) (C_6D_6)



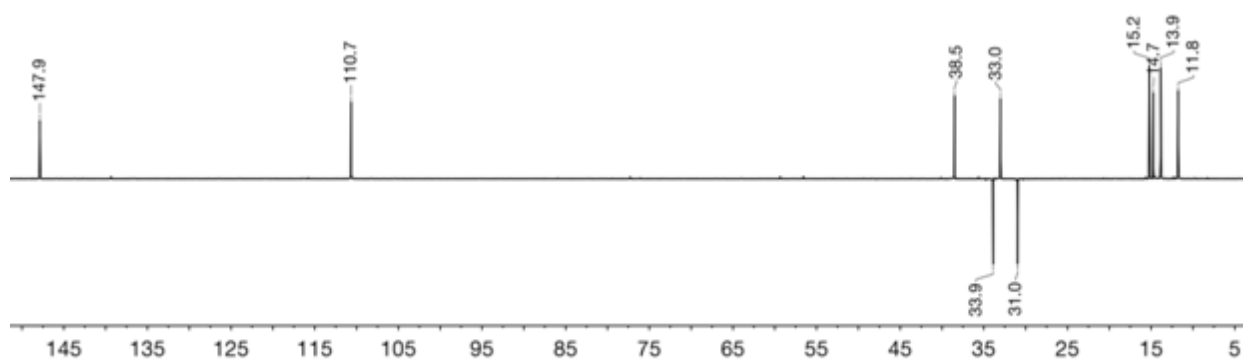
PRILOG 12. HOMONUKLEARNO DEKUPLOVANJE PROTONSKOG SPEKTRA α -FURANOPINGVIZANOLA. FREKVENCA DEKUPLOVANJA JE OZNAČENA STRELICOM (C_6D_6)



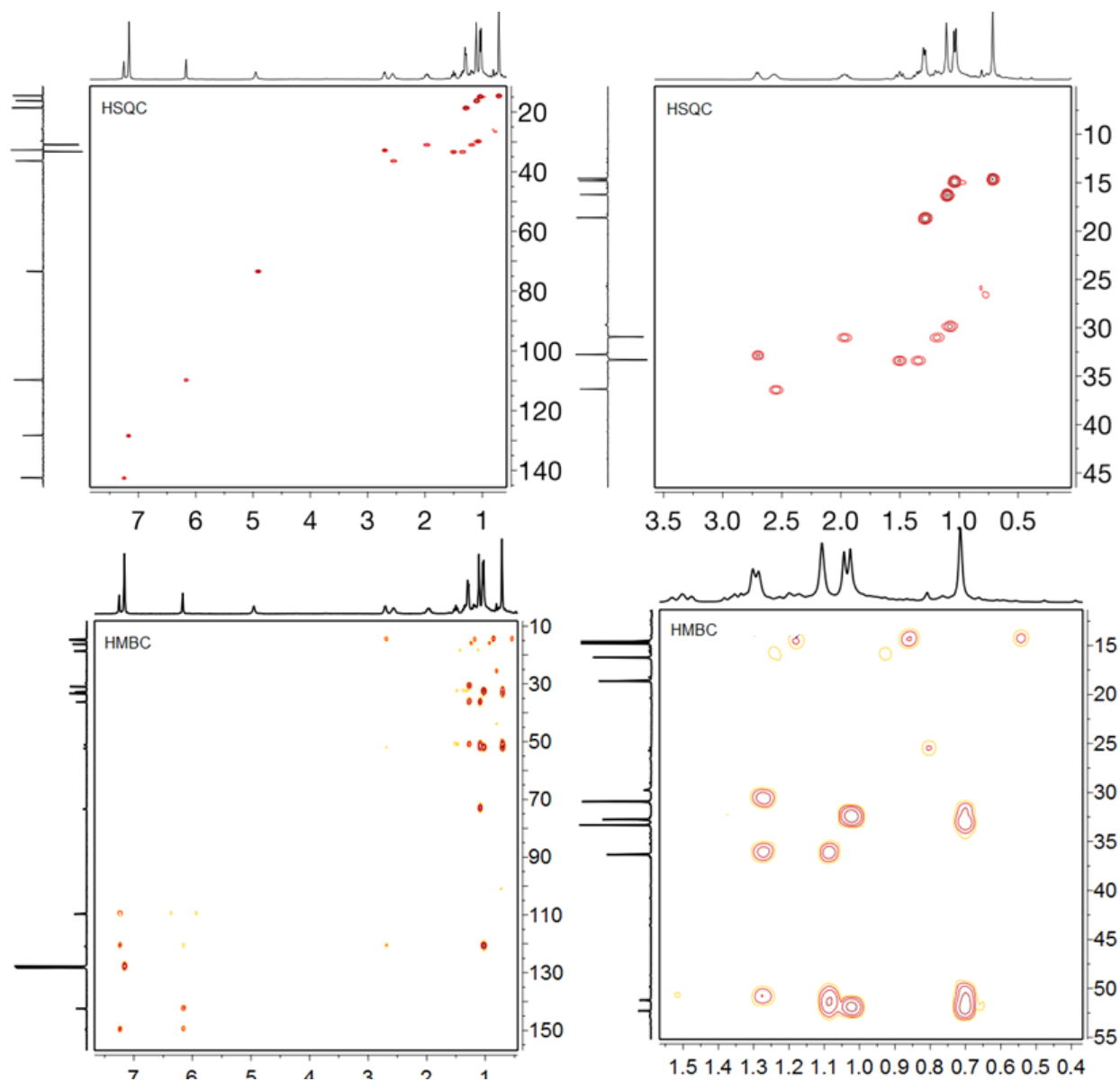




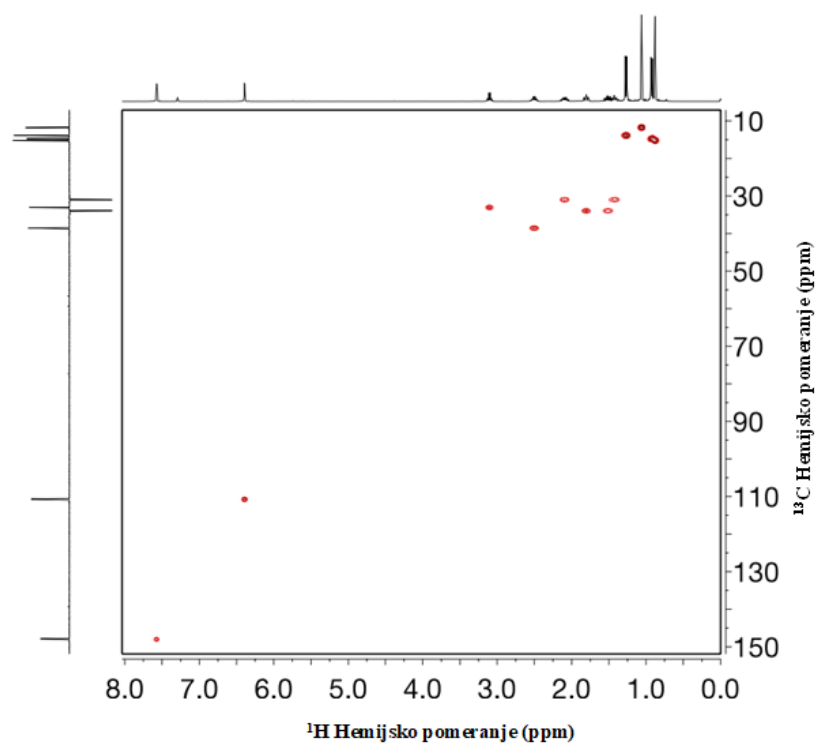
PRILOG 13. DEPT-135 SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA. (CH_3 I CH SIGNALI SU POZITIVNI, A CH_2 SIGNALI SU NEGATIVNI (CDCl_3))



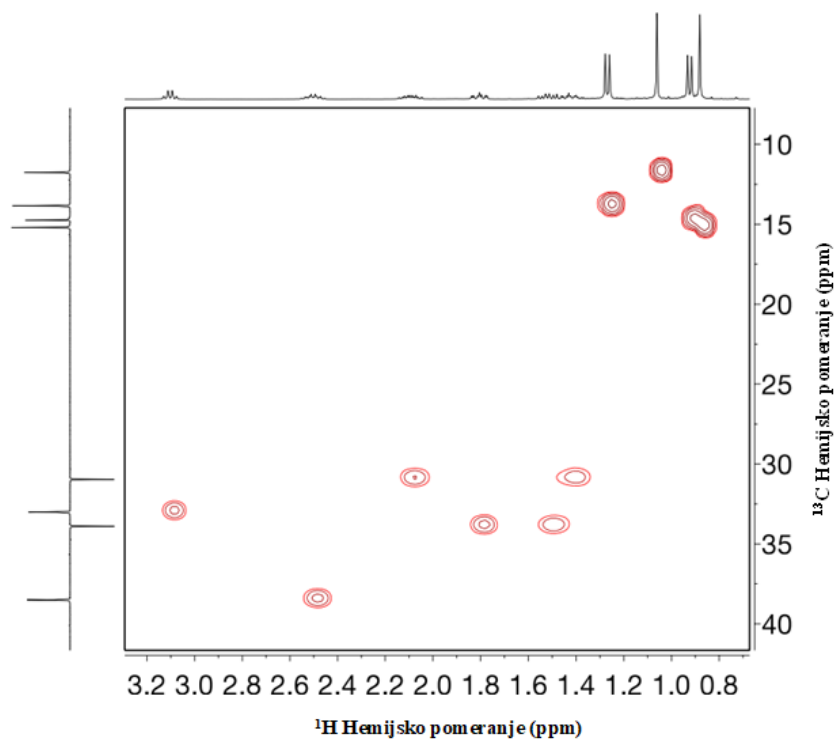
PRILOG 14. HSQC (IZNAD) I HMBC (ISPOD) SPEKTAR α -FURANOPINGVIZANOLA NAKON DODAVANJA 9 MG $\text{Eu}(\text{fod})_3$



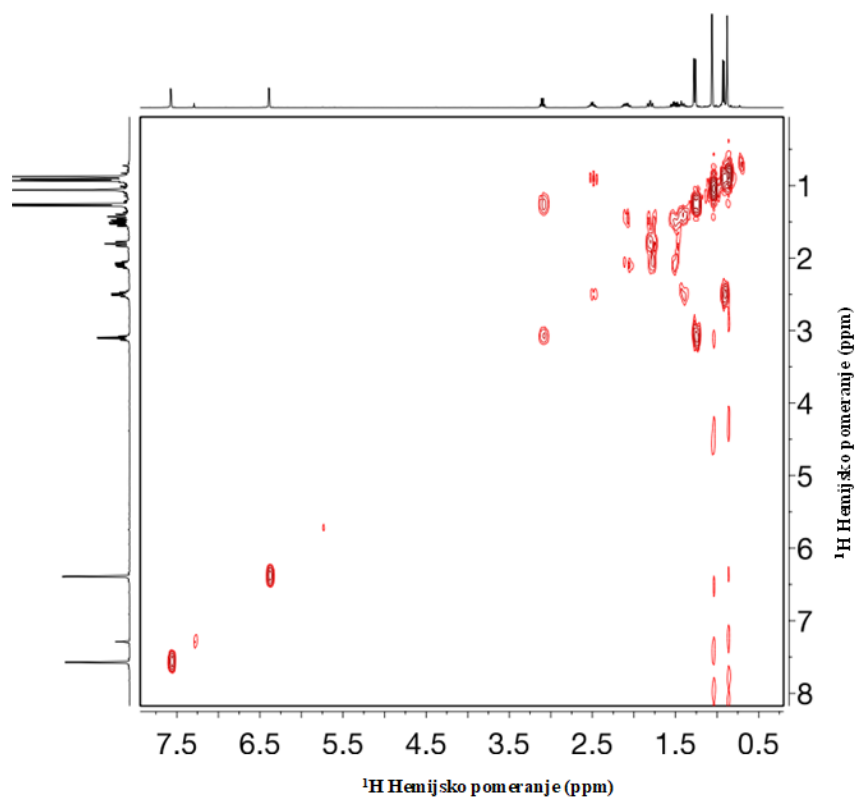
PRILOG 15. HSQC SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA (CDCl₃)



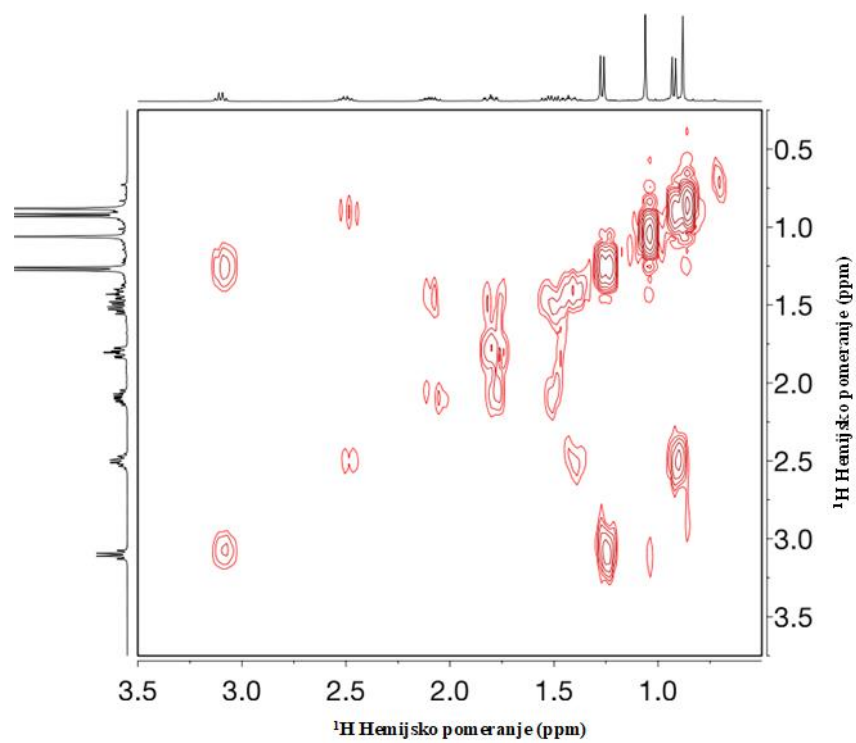
PRILOG 16. UVEĆANE OBLASTI HSQC SPEKTRA FURANOPINGVIZANONA (0,8 – 3,2 PPM I 10 – 40 PPM) (CDCl₃)



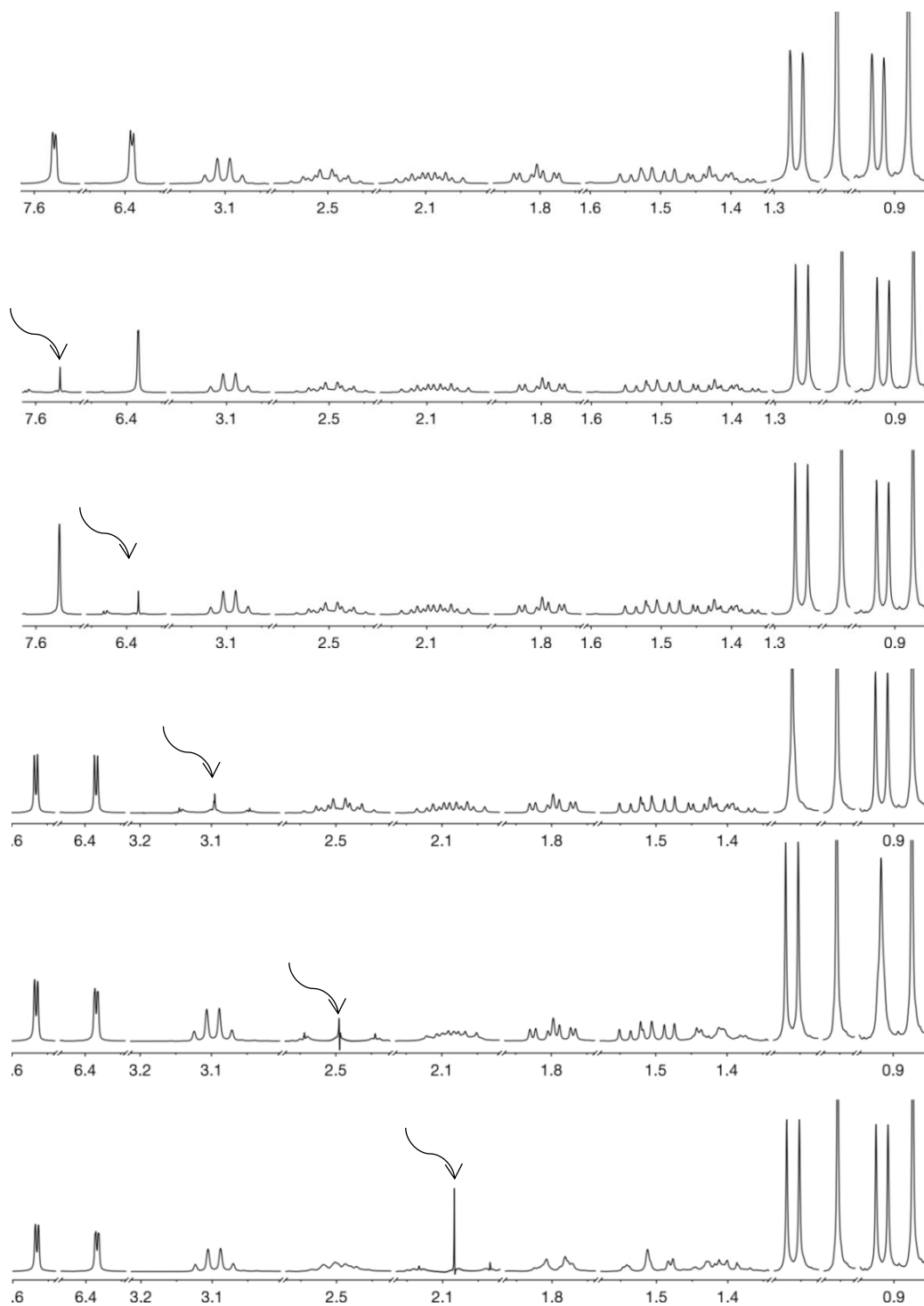
PRILOG 17. ^1H - ^1H COSY SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA (CDCl_3)

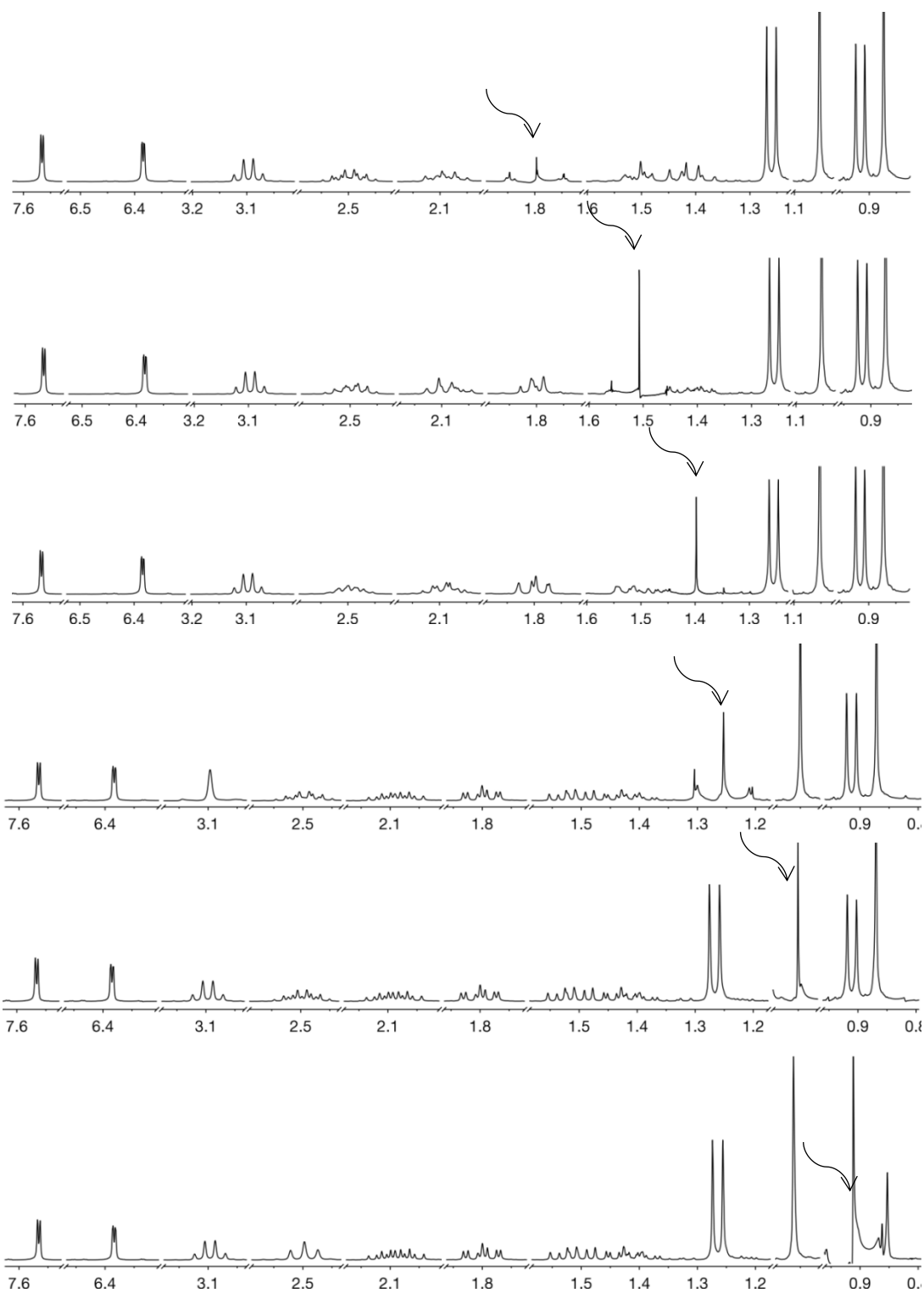


PRIOLOG 18. UVEĆANJE OBLASTI ^1H - ^1H COSY SPEKTRA FURANOPINGVIZANONA (0,5 – 3,5 PPM) (CDCl_3)



PRILOG 19. HOMONUKLEARNO DEKUPLOVANI PROTONSKI SPEKTAR FURANOPINGVIZANONA. FREKVENCA DEKUPLOVANJA JE OZNAČENA STRELICOM (CDCl_3)





PRILOG 20. ^1H (400 MHz) I ^{13}C (100,6 MHz) NMR PODACI KONOCEFALENOLA (HLOOROFORM-*d*, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE)

Položaj	δ_{H} (integral, m, J (Hz) ^a)	δ_{C}
1	1,6800 (1 H, t ^b dddd, $^3J_{1,9} = ^3J_{1,2b} = 12,0$, $^3J_{1,2a} = 5,2$, $^5J_{4a} = 3,3$, $^4J_{1,7b} = 2,0$, $^4J_{1,7a} = 1,5$, $^5J_{1,4b} = 1,2$)	48,1
2a	1,5240 (1 H, ddddd, $^2J_{2b,2a} = -12,2$, $^3J_{1,2a} = 5,2$, $^4J_{2a,4a} = 0,9$, $^4J_{2a,4b} = 0,5$, $^4J_{2a,9} = 0,3$)	40,2
2b	0,8020 (1 H, dddt ^b , $^2J_{2b,2a} = -12,2$, $^3J_{1,2b} = 12,0$, $^4J_{2b,4b} = 0,7$, $^4J_{2b,9} = ^4J_{2b,4a} = 0,4$)	
3	/	29,8
4a	1,7800 (1 H, ddddd, $^2J_{4a,4b} = -17,0$, $^5J_{1,4a} = 3,3$, $^5J_{4a,7a} = 2,8$, $^5J_{4a,7b} = 2,4$, $^4J_{2a,4a} = 0,9$, $^4J_{2b,4a} = 0,4$)	41,3
4b	1,7750 (1 H, ddddd, $^2J_{4a,4b} = -17,0$, $^5J_{4b,7b} = 2,8$, $^5J_{4b,7a} = 2,4$, $^5J_{4b,1} = 1,2$, $^4J_{2b,4b} = 0,7$, $^4J_{2a,4b} = 0,5$)	
5	/	132,2
6	/	136,3
7a	2,5210 (1 H, ddddddd, $^2J_{7a,7b} = -17,6$, $^3J_{7a,8b} = 9,4$, $^5J_{4a,7a} = 2,8$, $^5J_{4b,7a} = 2,4$, $^3J_{7a,8a} = 1,6$, $^4J_{1,7a} = 1,5$, $^3J_{7a,9} = 0,7$)	29,3
7b	2,5485 (1 H, ddddddd, $^2J_{7a,7b} = -17,6$, $^3J_{7b,8b} = 10,4$, $^3J_{7b,8a} = 8,0$, $^5J_{4b,7b} = 2,8$, $^5J_{4a,7b} = 2,4$, $^4J_{1,7b} = 2,0$, $^4J_{7b,9} = 0,5$)	
8a	1,8560 (1 H, ddddd, $^2J_{8a,8b} = -12,2$, $^3J_{7b,8a} = 8,0$, $^3J_{8a,9} = 6,0$, $^3J_{7a,8a} = 1,6$)	33,9
8b	1,1610 (1 H, ddddd, $^2J_{8a,8b} = -12,2$, $^3J_{8b,9} = 12,0$, $^3J_{7b,8b} = 10,4$, $^3J_{7a,8b} = 9,4$)	
9	1,2460 (1 H, t ^b dddd, $^3J_{1,9} = ^3J_{8b,9} = 12,0$, $^3J_{8a,9} = 6,0$, $^4J_{7a,9} = 0,7$, $^4J_{7b,9} = 0,5$, $^4J_{2b,9} = 0,4$, $^4J_{2a,9} = 0,3$)	40,5
10	/	74,6
11	1,3223 (3 H, s)	30,0 ^c
12	1,3221 (3H, s)	29,1 ^c
13	0,9810 (3H, s) ^d	18,1
14	0,8479 (3 H, s) ^d	26,6
15	0,9990 (1 H, d, $^3J_{9,15} = 6,3$)	32,4
OH-10	1,66 (1 H, široki signal)	/

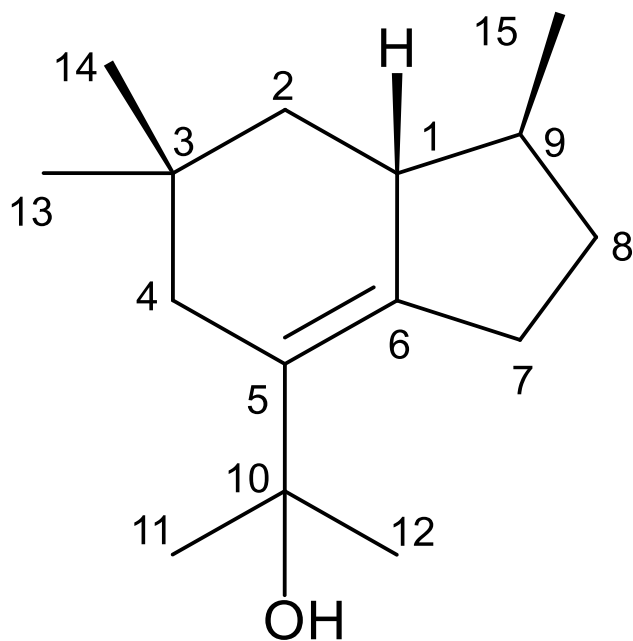
^aVrednosti konstanti kuplovanja su prvobitno izvedene iz ^1H -NMR eksperimenata homoselektivnog dekoplovanja, a zatim su utačnjene manualnom iterativnom punom spinskom analizom. Za detalje pogledati Prilog 59. ^bPseudo, to jest pseudo multiplet. Na primer, dublet dubleta sa dve slične J vrednosti bi se verovatno pojavio kao pseudo-triplet. ^cAsignacija se može izmeniti. ^dAsignacija bazirana na gHMBC interakciji H-13 (a ne H-14) sa C-5 (W-odnos).

PRILOG 21. ¹H (400 MHz) I ¹³C (100,6 MHz) NMR PODACI (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA (BENZEN-*d*₆, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE), I UOČENE gHMBC I NOESY INTERAKCIJE

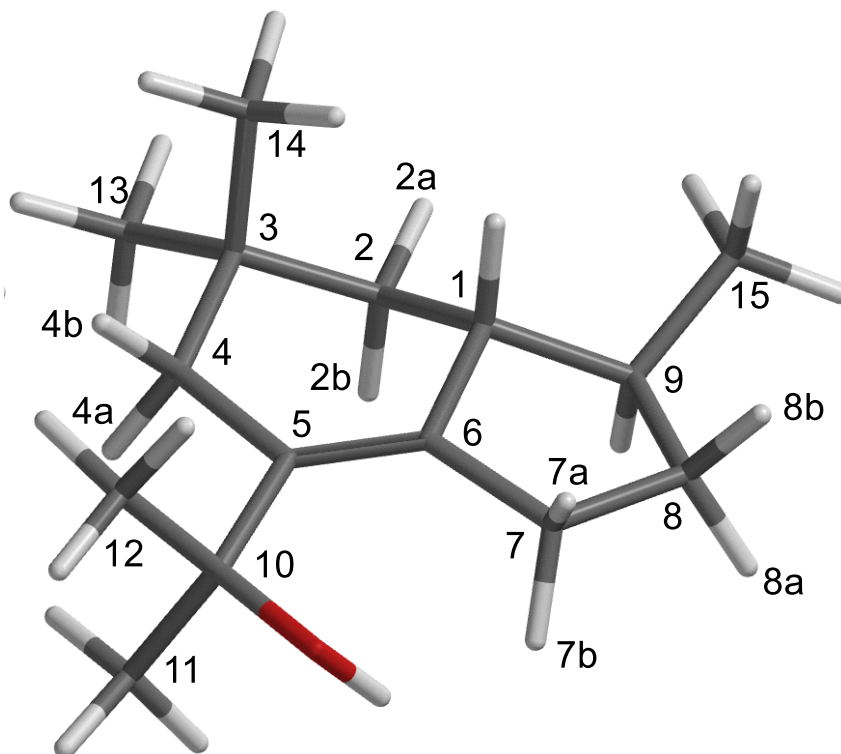
Položaj	δ _H (integral, m, <i>J</i> (Hz) ^a)	δ _C	gHMBC ^b	NOESY ^c
1	4,7603 (1 H, ddt ^d dd, ³ <i>J</i> _{1,2a} = 12,3, ³ <i>J</i> _{1,2b} = 4,3, ⁴ <i>J</i> _{1,9a} = ⁴ <i>J</i> _{1,14b} = 0,8, ⁴ <i>J</i> _{1,9b} = ⁴ <i>J</i> _{1,14a} = 0,7, ⁴ <i>J</i> _{1,3a} = 0,5, ⁴ <i>J</i> _{1,3b} = 0,3)	131,3	2, 9, 10, 14	2b, 3a, 3b, 9b, 7
2a	2,3937 (1 H, ddddt ^d , ² <i>J</i> _{2b,2a} = -13,1, ³ <i>J</i> _{2a,3a} = 12,4, ² <i>J</i> _{1,2a} = 12,3, ³ <i>J</i> _{2a,3b} = 4,8, ⁵ <i>J</i> _{2a,9b} = ⁵ <i>J</i> _{2a,9a} = 0,3)	29,7	1, 3, 9, 10	2b, 14a, 15
2b	1,9904 (1 H, dddddd, ² <i>J</i> _{2b,2a} = -13,1, ³ <i>J</i> _{2b,3a} = 5,2, ³ <i>J</i> _{1,2b} = 4,3, ³ <i>J</i> _{2b,3b} = 1,9, ⁵ <i>J</i> _{2b,14b} = 1,5, ⁵ <i>J</i> _{2b,9a} = 1,2, ⁵ <i>J</i> _{2b,9b} = 0,6, ⁵ <i>J</i> _{2b,14a} = 0,3)		1, 3, 10	1, 2a
3a	2,1144 (1 H, dddddd, ³ <i>J</i> _{2a,3a} = 12,4, ² <i>J</i> _{3b,3a} = -11,7, ³ <i>J</i> _{2b,3a} = 5,2, ⁴ <i>J</i> _{1,3a} = 0,5, ⁴ <i>J</i> _{3a,5} = 0,4)	41,2	1, 2, 5, 15	1, 5, 15
3b	2,0958 (1 H, dddddd, ² <i>J</i> _{3b,3a} = -11,7, ³ <i>J</i> _{2a,3b} = 4,8, ³ <i>J</i> _{2b,3b} = 1,9, ⁴ <i>J</i> _{3b,5} = 0,4, ⁴ <i>J</i> _{1,3b} = 0,3)		1, 2, 5, 15	1, 15
4	/	134,2	/	/
5	4,613 (1 H, ddq ^d , ³ <i>J</i> _{5,6} = 10,3, ⁴ <i>J</i> _{5,15} = 1,3, ⁴ <i>J</i> _{3b,5} = ⁴ <i>J</i> _{3a,5} = ⁴ <i>J</i> _{5,7} = 0,4)	132,8	3, 7, 15	3a, 7, 13
6	0,7481 (1 H, ddd, ³ <i>J</i> _{5,6} = 10,3, ³ <i>J</i> _{6,7} = 5,3, ⁴ <i>J</i> _{6,8a} = 0,4)	37,6	4, 5, 7, 8, 11, 12	8a, 12, 14a, 14b, 15
7	-0,1637 (1 H, ddddoct ^d , ³ <i>J</i> _{7,8a} = 11,0, ³ <i>J</i> _{6,7} = 5,3, ³ <i>J</i> _{7,8b} = 1,3, ⁴ <i>J</i> _{5,7} = 0,4, ⁴ <i>J</i> _{7,9b} = ⁴ <i>J</i> _{7,12} = ⁴ <i>J</i> _{7,13} = 0,3)	41,8	5, 6, 9, 13	1,5, 8b, 9b, 13
8a	1,8652 (1 H, dddddd, ² <i>J</i> _{8b,8a} = -13,2, ³ <i>J</i> _{8a,9b} = 12,8, ³ <i>J</i> _{7,8a} = 11,0, ³ <i>J</i> _{8a,9a} = 3,2, ⁴ <i>J</i> _{6,8a} = 0,4, ⁷ <i>J</i> _{8a,15} = 0,3)	26,7	6, 7, 9, 10	6, 8b, 9a, 12
8b	1,019 (1 H, dddddd, ² <i>J</i> _{8b,8a} = -13,2, ³ <i>J</i> _{8b,9b} = 3,8, ³ <i>J</i> _{8b,9a} = 3,3, ³ <i>J</i> _{7,8b} = 1,3)		6, 7, 9, 10	7, 8a, 9a, 9b
9a	2,8038 (1 H, dddddd ^d , ² <i>J</i> _{9a,9b} = -12,5, ³ <i>J</i> _{8b,9a} = 3,3, ³ <i>J</i> _{8a,9a} = 3,2, ⁵ <i>J</i> _{2b,9a} = 1,2, ⁴ <i>J</i> _{9a,14b} = 1,1, ⁴ <i>J</i> _{1,9a} = 0,8, ⁴ <i>J</i> _{9a,14a} = 0,5, ⁵ <i>J</i> _{2a,9a} = ⁴ <i>J</i> _{7,9a} = 0,3)	37,8	1, 7, 8, 10	8b, 8a, 9b, 14b, 14a
9b	1,7922 (1 H, dddddd ^d , ³ <i>J</i> _{8a,9b} = 12,8, ² <i>J</i> _{9a,9b} = -12,5, ³ <i>J</i> _{8b,9b} = 3,8, ⁴ <i>J</i> _{9b,14b} = 1,2, ⁴ <i>J</i> _{1,9b} = 0,7, ⁵ <i>J</i> _{2b,9b} = 0,6, ⁵ <i>J</i> _{2a,9b} = ⁴ <i>J</i> _{9b,14a} = 0,3)		8, 10, 14	1,7, 8b, 9a
10	/	131,9	/	/
11	/	25,5	/	/
12	1,0241 (1 H, d, ⁴ <i>J</i> _{7,12} = 0,3)	22,5	6, 7, 11, 13	6, 8a
13	1,1562 (1 H, d, ⁴ <i>J</i> _{7,13} = 0,3)	23,8	6, 7, 11, 12	5, 7
14a	4,0684 (1 H, dddddd ^d , ² <i>J</i> _{14a,14a} = -11,6, ³ <i>J</i> _{14a, OH-14} = 1,3, ⁴ <i>J</i> _{1,14a} = 0,7, ⁴ <i>J</i> _{9a,14a} = 0,5, ⁵ <i>J</i> _{2b,14a} = ⁴ <i>J</i> _{9b,14a} = 0,3)	60,0	1, 9, 10	2a, 9a, 6, 14b
14b	3,6289 (1 H, dddddd, ² <i>J</i> _{14a,14b} = -11,6, ³ <i>J</i> _{14b, OH-14} = 4,6, ⁵ <i>J</i> _{2b,14b} = 1,5, ⁴ <i>J</i> _{9b,14b} = 1,2, ⁴ <i>J</i> _{9a,14b} = 1,1, ⁴ <i>J</i> _{1,14b} = 0,8, ⁵ <i>J</i> _{2a,14b} = 0,3)		1, 9, 10	9a, 6, 14a
15	1,4653 (1 H, dd, ⁴ <i>J</i> _{5,15} = 1,3, ⁷ <i>J</i> _{8a,15} = 0,3)	17,7	3, 4, 5	2a, 3a, 3b,6
OH-14	0,4830 (1 H, dd, ³ <i>J</i> _{14b, OH-14} = 4,6, ³ <i>J</i> _{14a, OH-14} = 1,3; br s)	/	/	/

^aKonstante kuplovanja su prvobitno izvedene iz ¹H-NMR eksperimenata homoselektivnog dekuplovanja, a zatim su utačnjene manualnom iterativnom punom spinskom analizom. Za detalje pogledati Prilog 59. ^bgHMBC korelacije uočene između vodonika u ovom radu i ugljenika na navedenom položaju. ^cKros pikovi uočeni u NOESY spektru. ^dPseudo, to jest pseudo multiplet. Na primer, dublet dubleta, sa dve slične *J* vrednosti bi se pojavio kao pseudo-triplet.

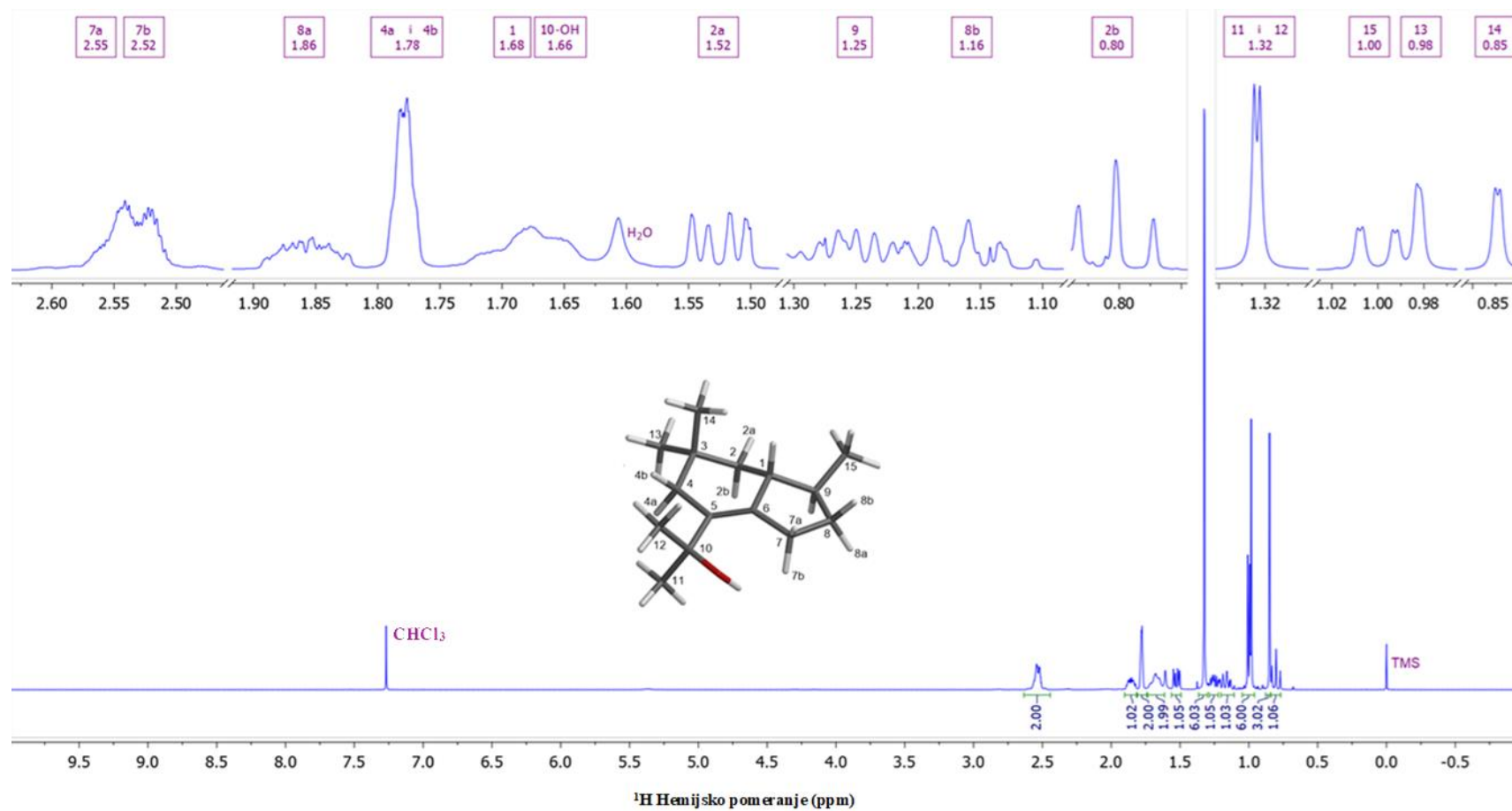
PRILOG 22. ŠEMA NUMERACIJE ATOMA ZA KONOCEFALENOL



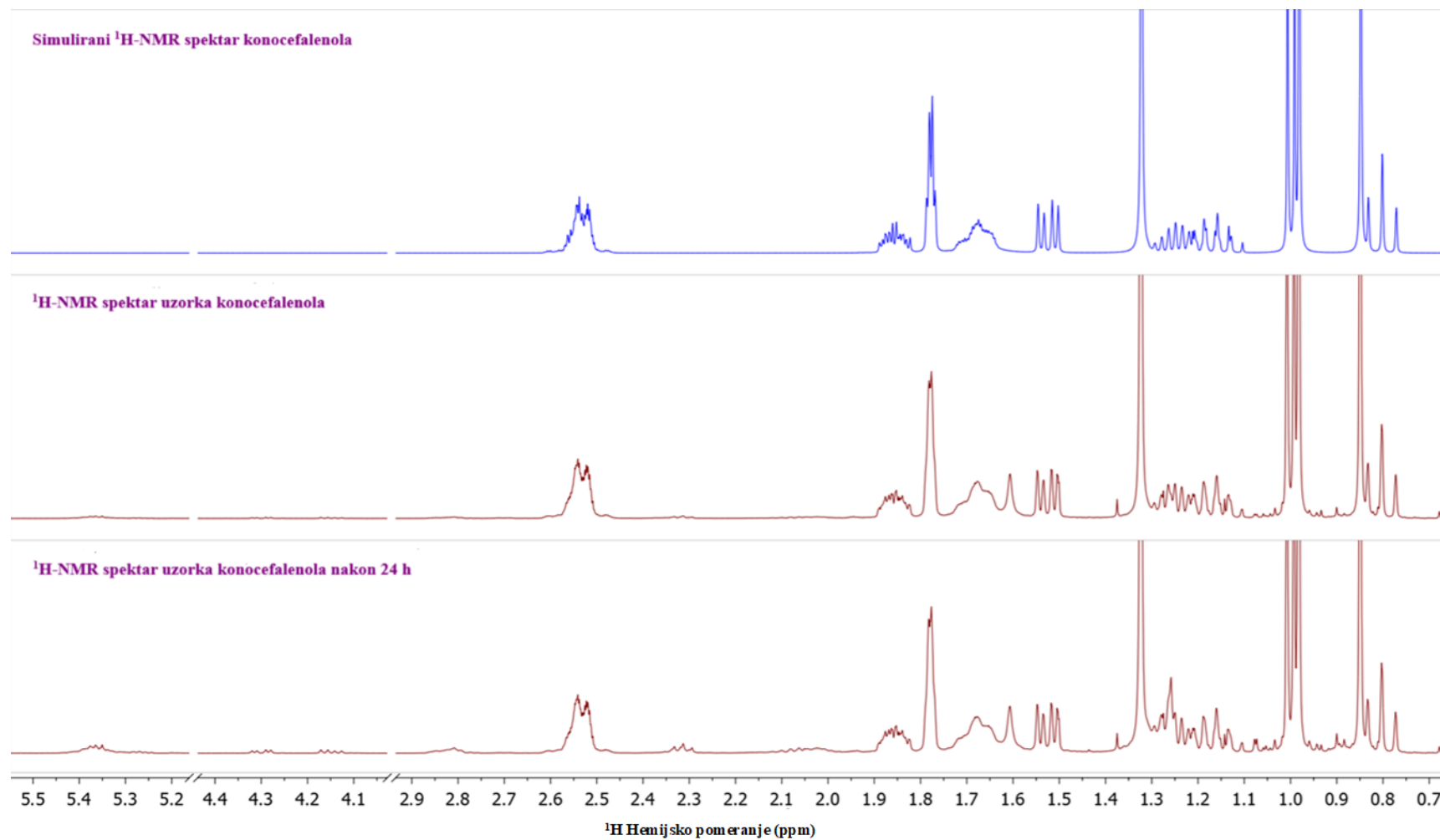
PRILOG 23. ŠEMA NUMERACIJE ATOMA ZA KONOCEFALENOL-3D MODEL



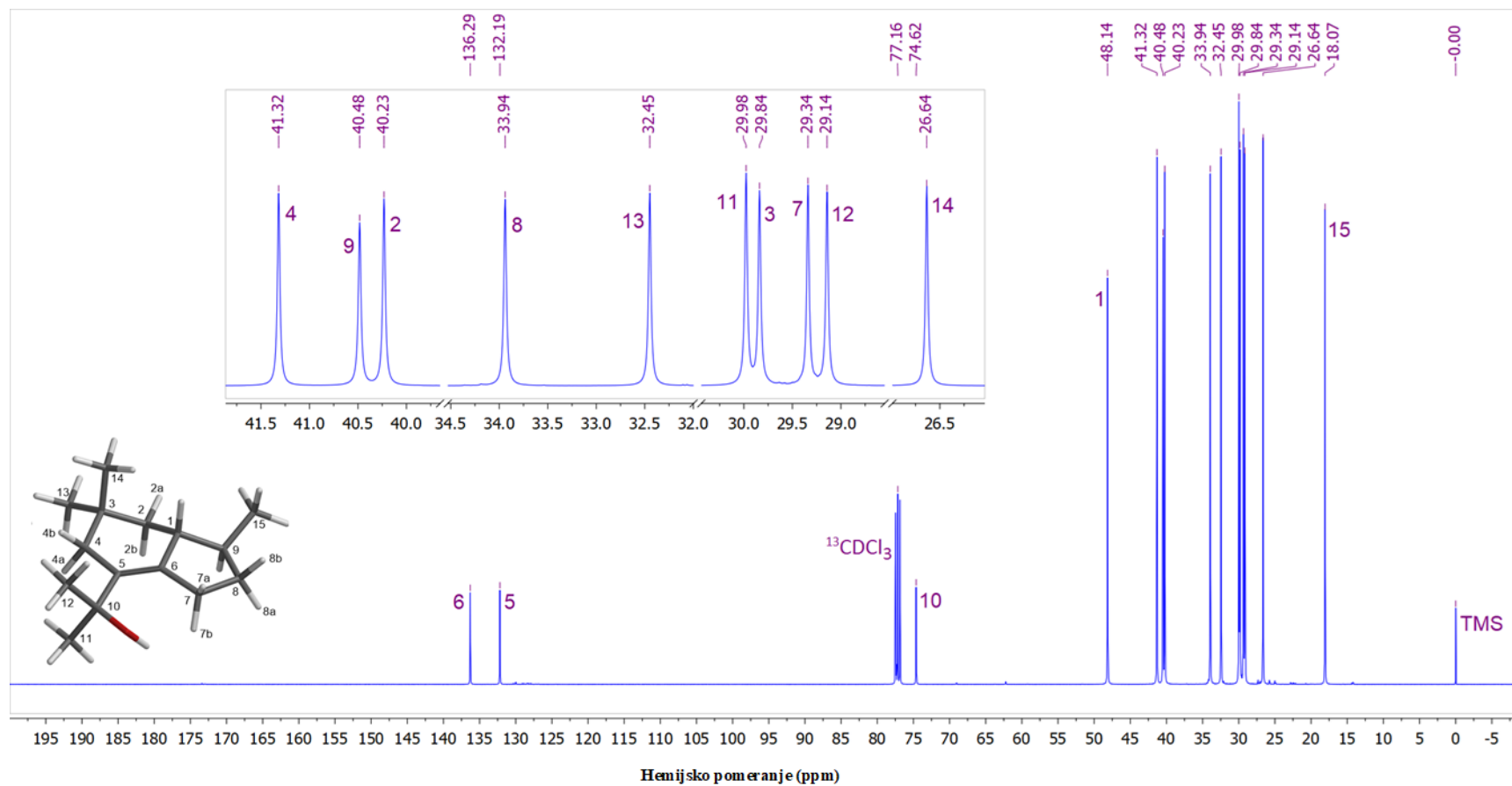
PRILOG 24. ^1H -NMR (400 MHz, Hloroform- d) SPEKTAR KONOCEFALENOLA I ODOGOVARAJUĆE UVEĆANJE SA ASIGNACIJOM SIGNALA



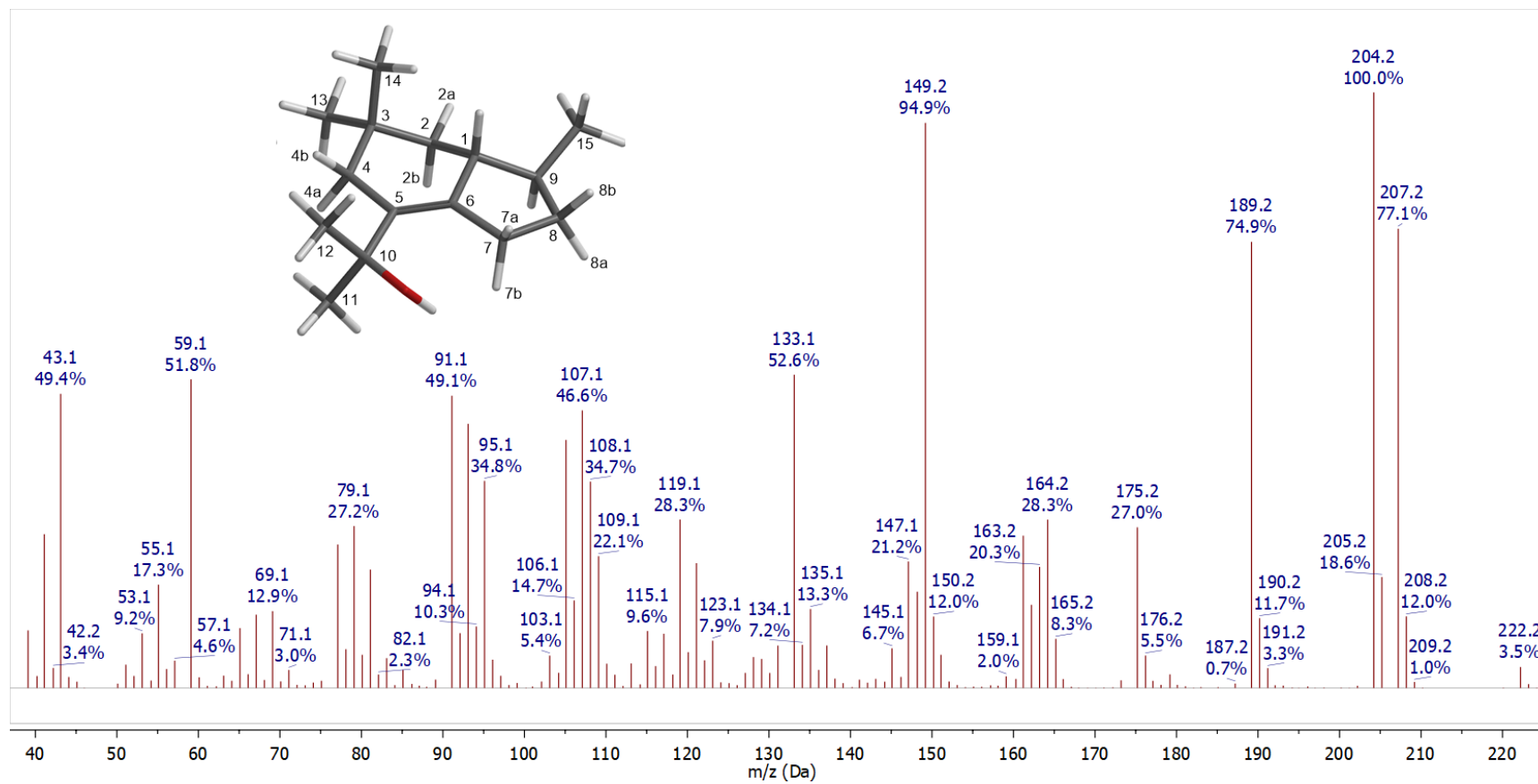
PRILOG 25. GORNJI DEO: SIMULIRANI ^1H -NMR SPEKTAR KONOCEFALENOLA; SREDNJI DEO: ^1H -NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) SPEKTAR KONOCEFALENOLA ODMAH NAKON RASTVARANJA UZORKA U HLOOROFORMU-*d*; DONJI DEO: ^1H -NMR (400 MHz, HLOOROFORM-*d*) ISTOG UZORKA POSLE 24 h



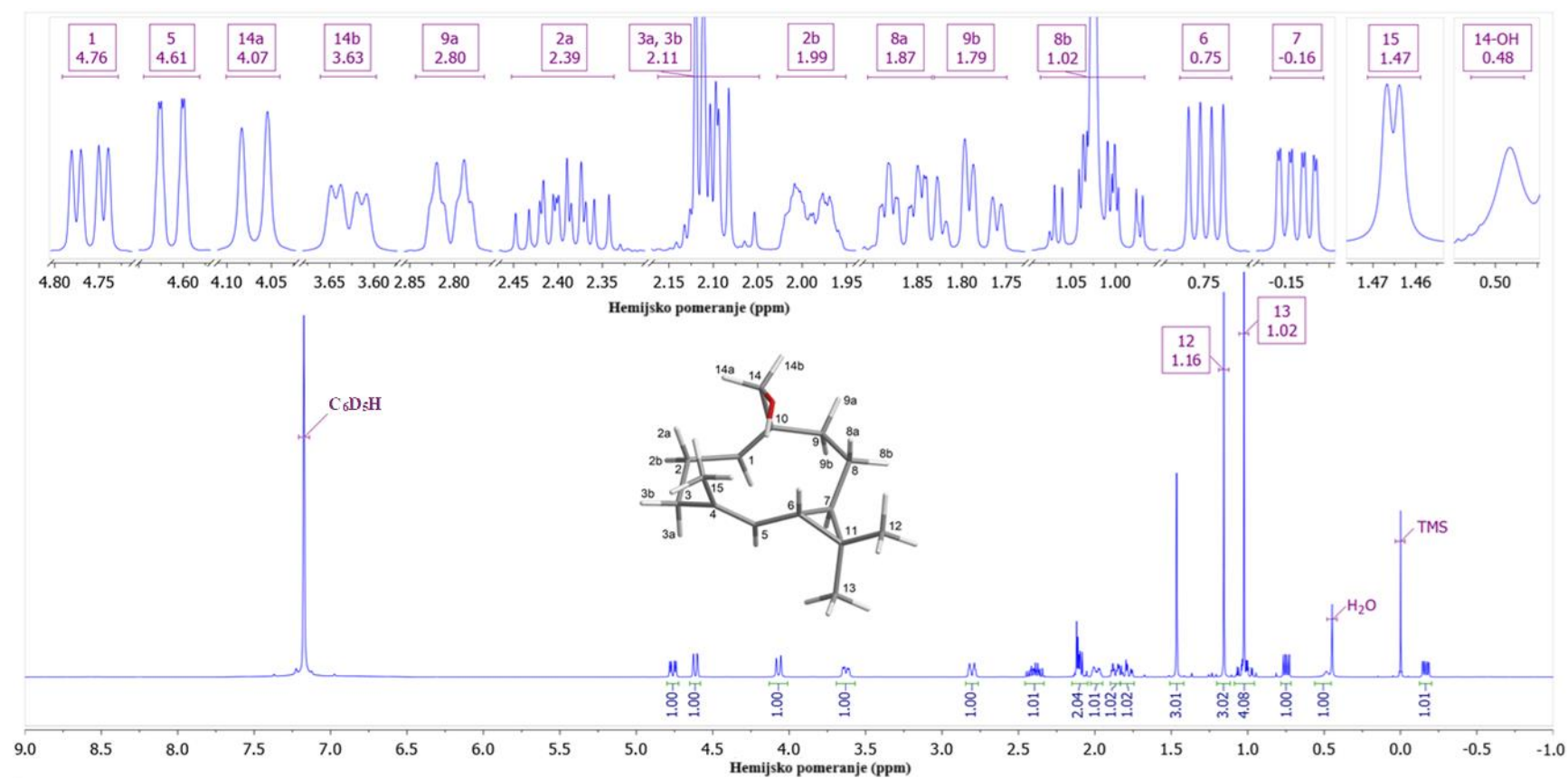
PRILOG 26. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, H₂O-*d*) SPEKTAR KONOCEFALENOLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



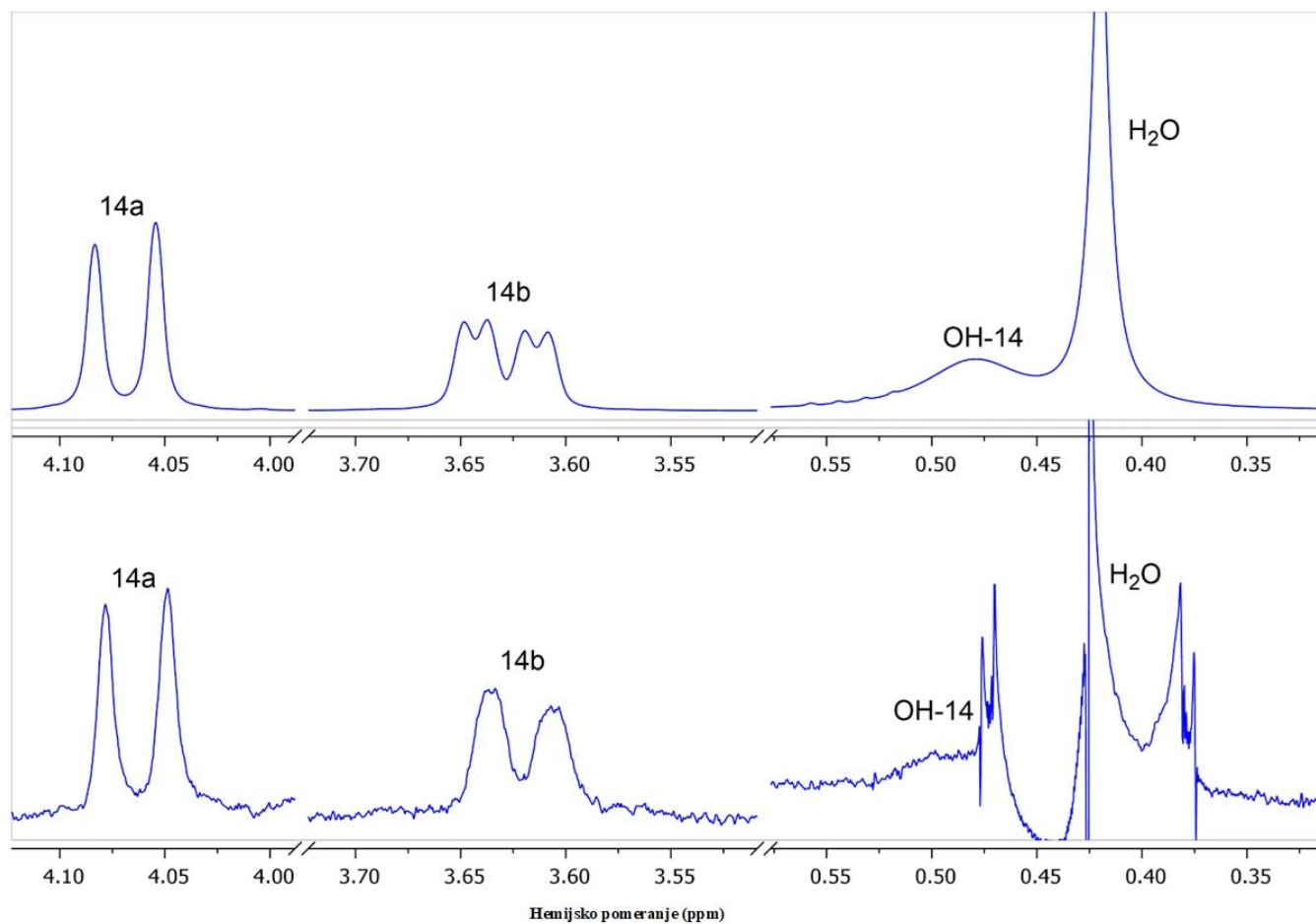
PRILOG 27. MASENI SPEKTAR KONOCEFALENOLA



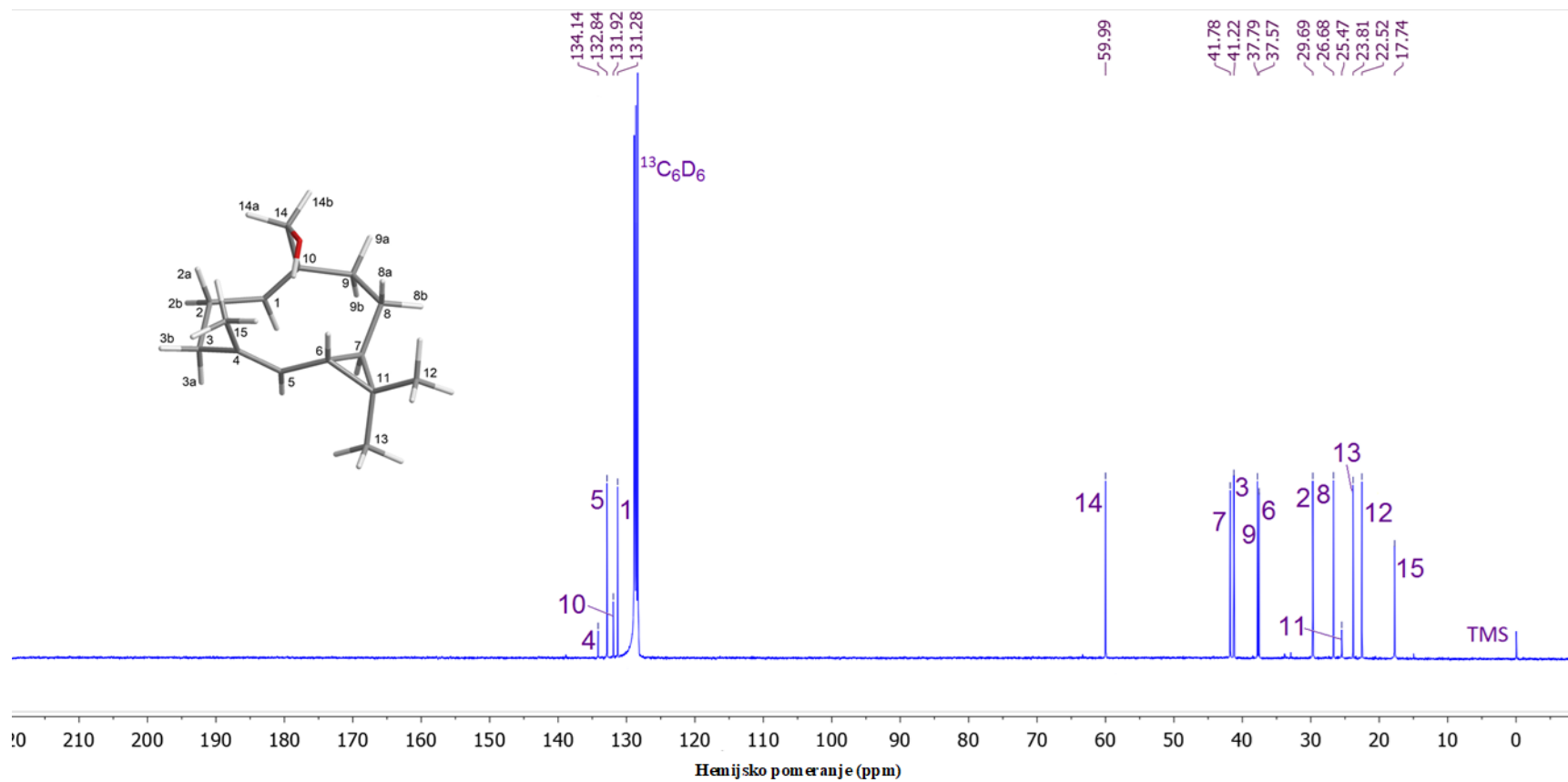
PRILOG 28. ^1H -NMR (400 MHz, BENZEN- d_6) SPEKTAR (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA I ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



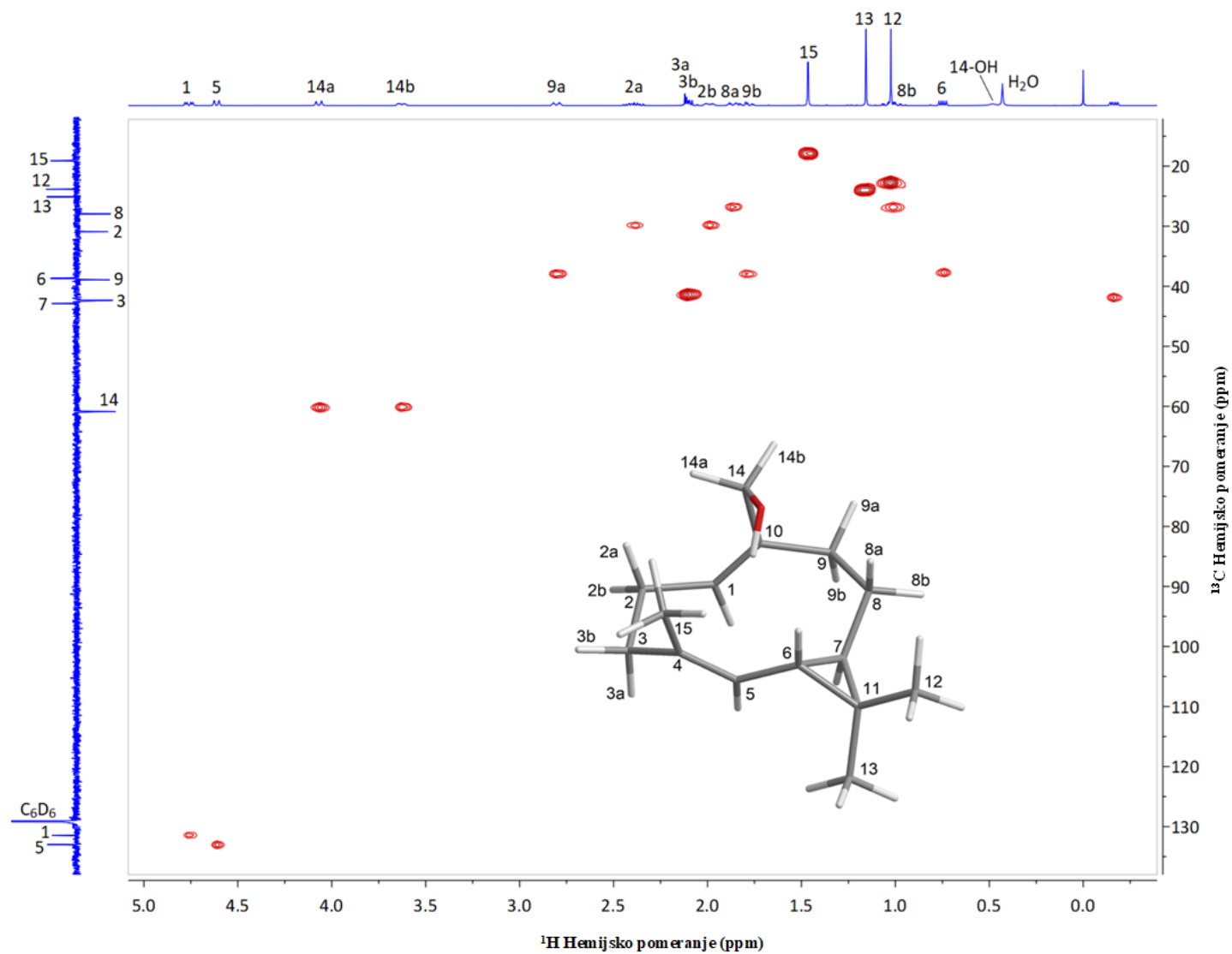
PRILOG 29. GORE: UVEĆANJE ^1H -NMR (400 MHz, BENZEN- d_6) SPEKTRA (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA KOJE ODGOVARA SIGNALIMA H-14a, H-14b, I OH-14. DOLE: IZGLED OVIH SIGNALALA PRI IRADIJACIJI OH-14 PROTONA (NA 0,48 ppm) U EKSPERIMENTU SELEKTIVNOG HOMONUKLEARNOG DEKUPLOVANJA



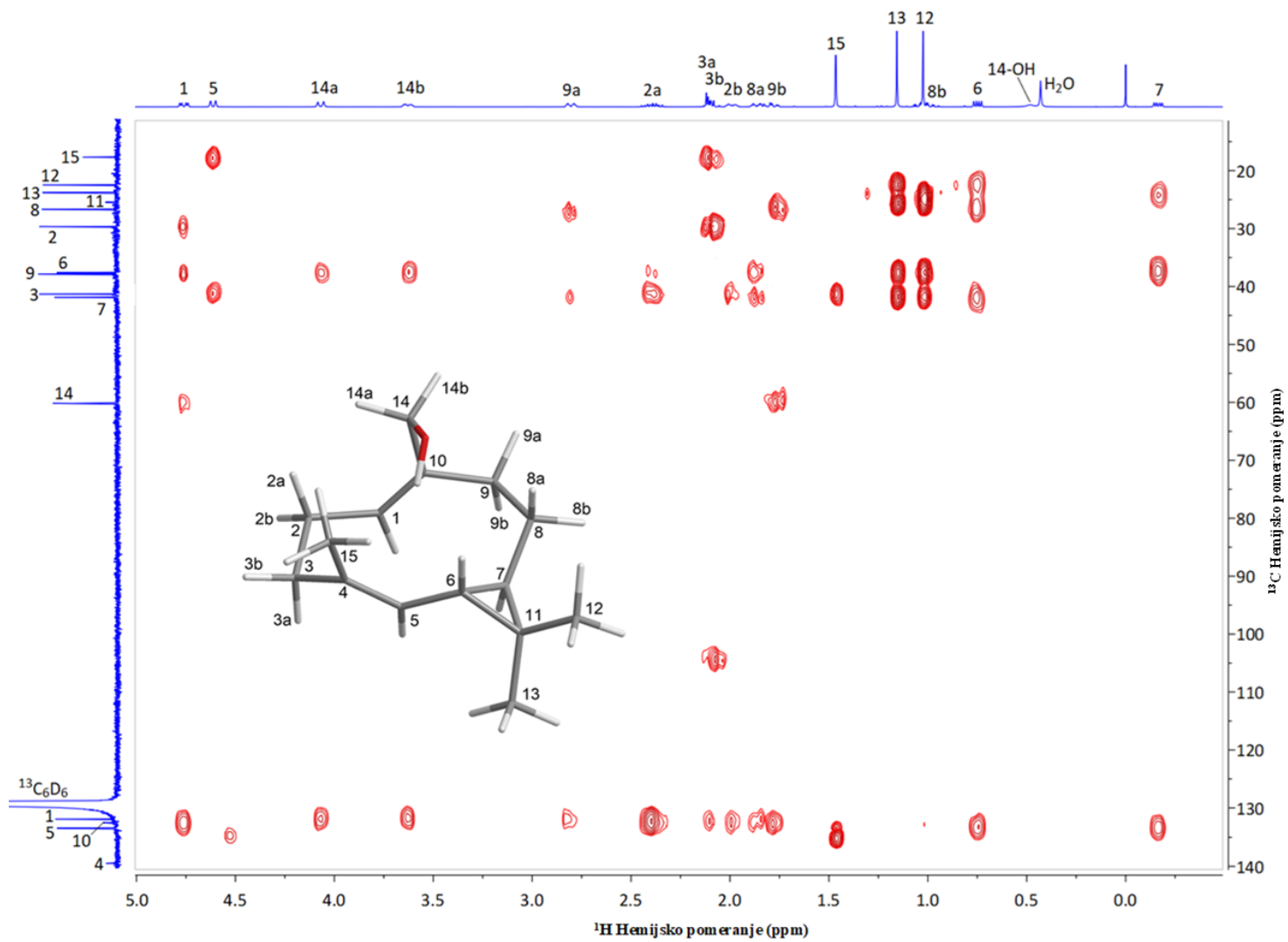
PRILOG 30. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, BENZEN- d_6) SPEKTAR (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



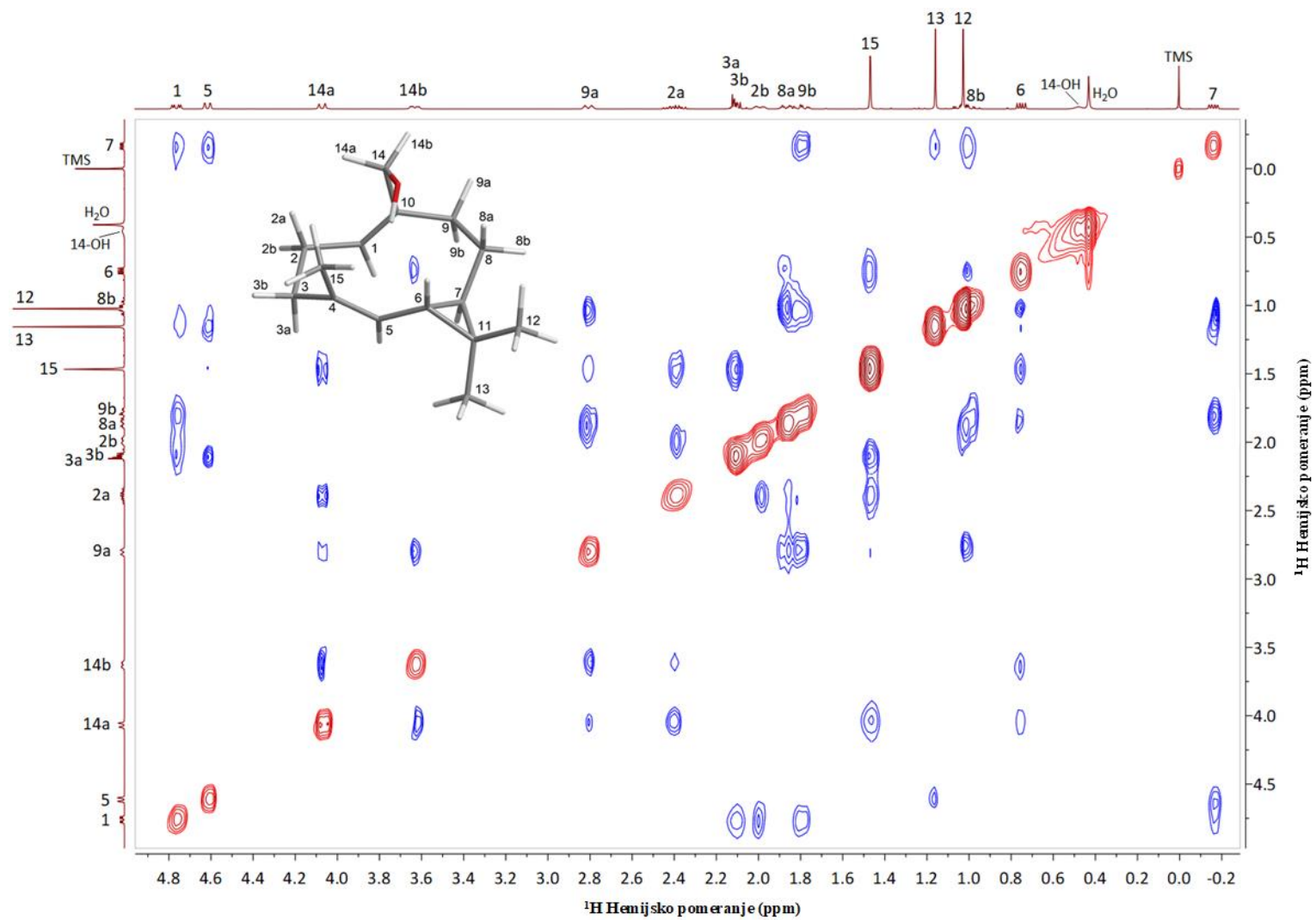
PRILOG 31. gHSQC SPEKTAR (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA



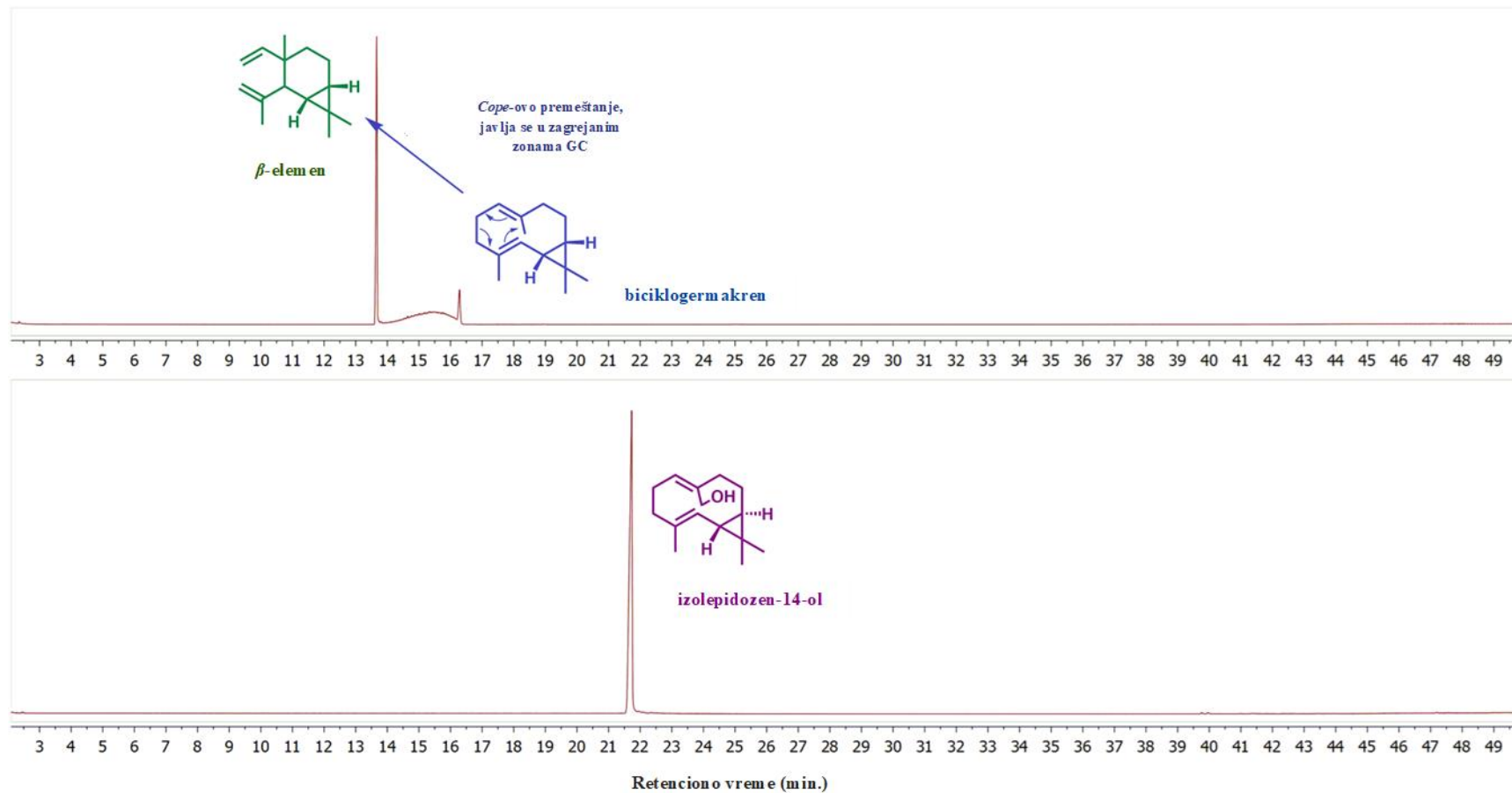
PRILOG 32. gHMBC SPEKTAR (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA



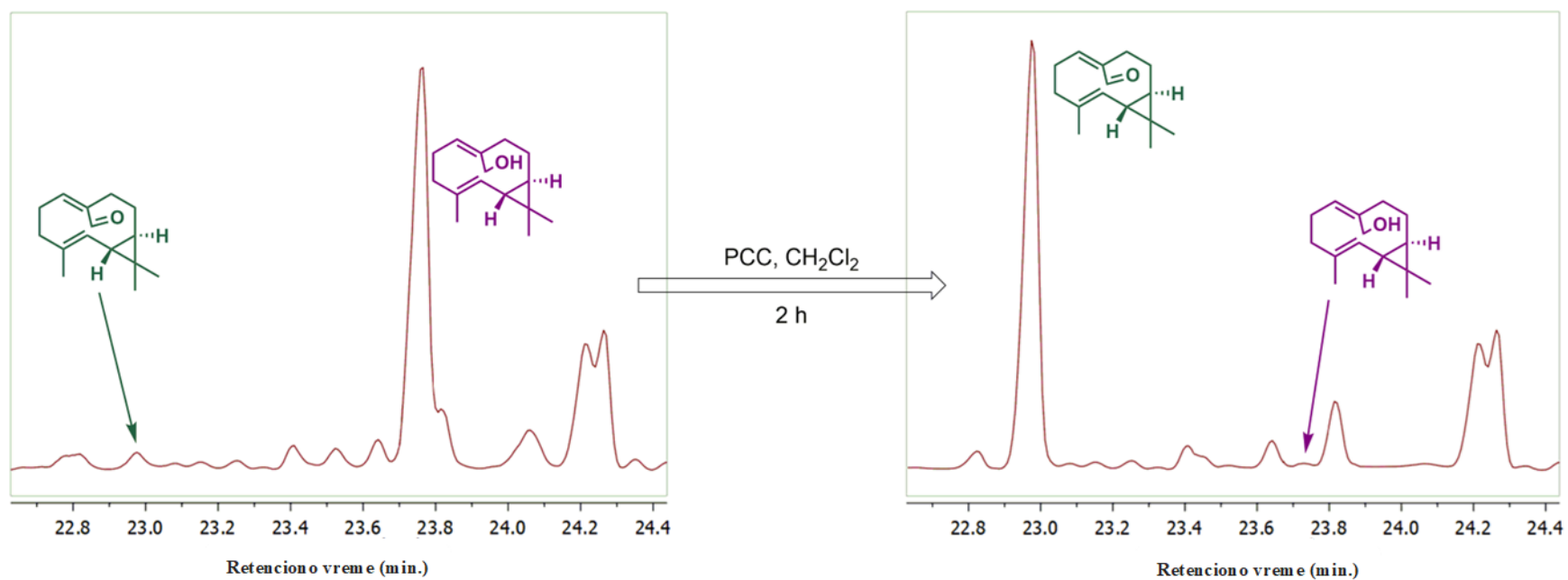
PRILOG 33. NOESY SPEKTAR (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA



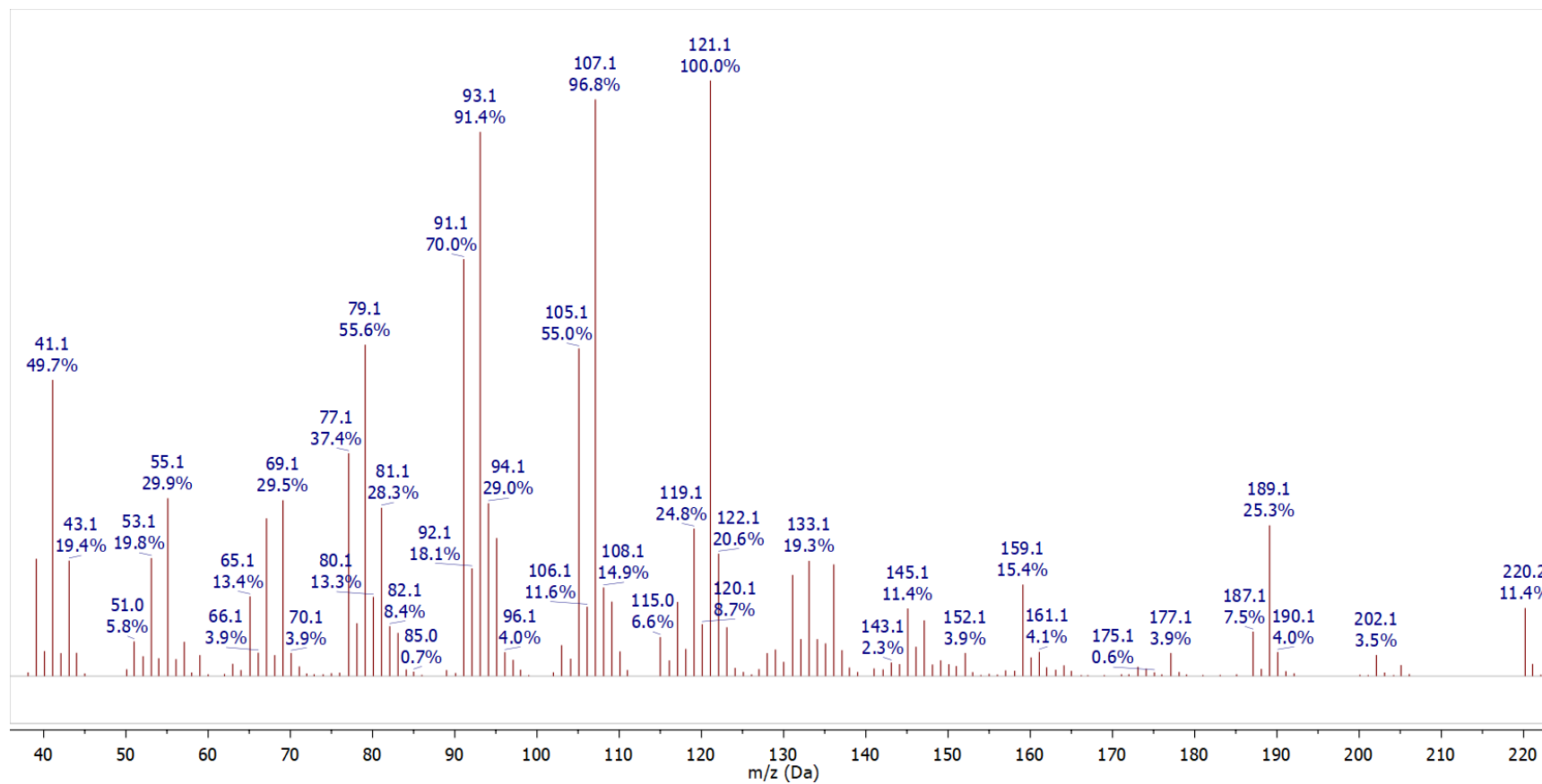
PRILOG 34. GORNJI DEO: TIC HROMATOGRAM BIKIKLOGERMAKRENA KOJI SADRŽI PROIZVOD *COPE*-OVOG PREMEŠTANJA, β -ELEMEN; DONJI DEO: TIC HROMATOGRAM UZORKA (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA (DOBIJEN POD ISTIM USLOVIMA), KOJI NE POKAZUJE PROIZVODE *COPE*-OVOG PREMEŠTANJA



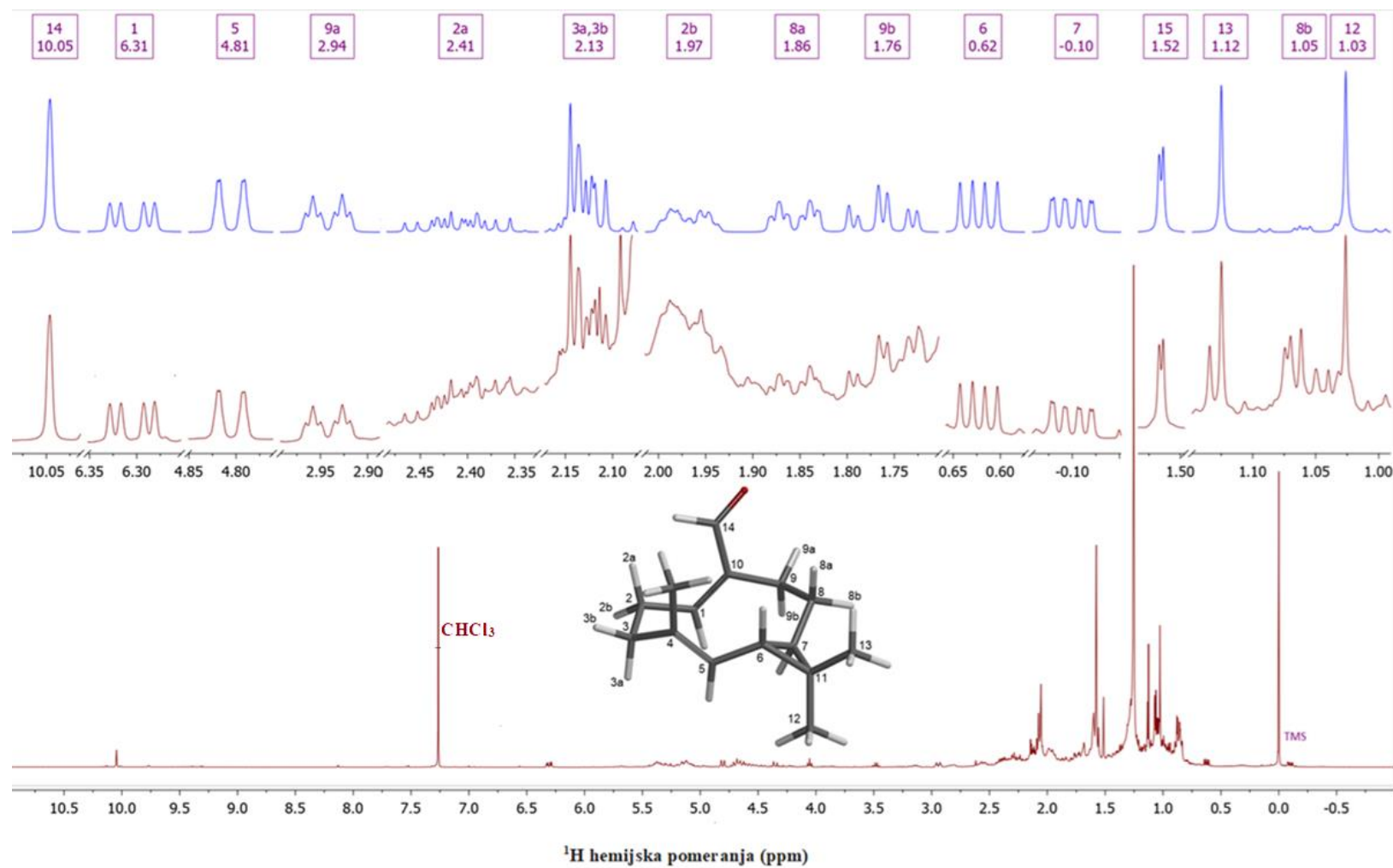
PRILOG 35. UVEĆANJA TIC HROMATOGRAMA *C. CONICUM* Et₂O HROMATOGRAFSKE FRAKCIJE 24 PRE (LEVO) I POSLE (DESNO) OKSIDACIJE



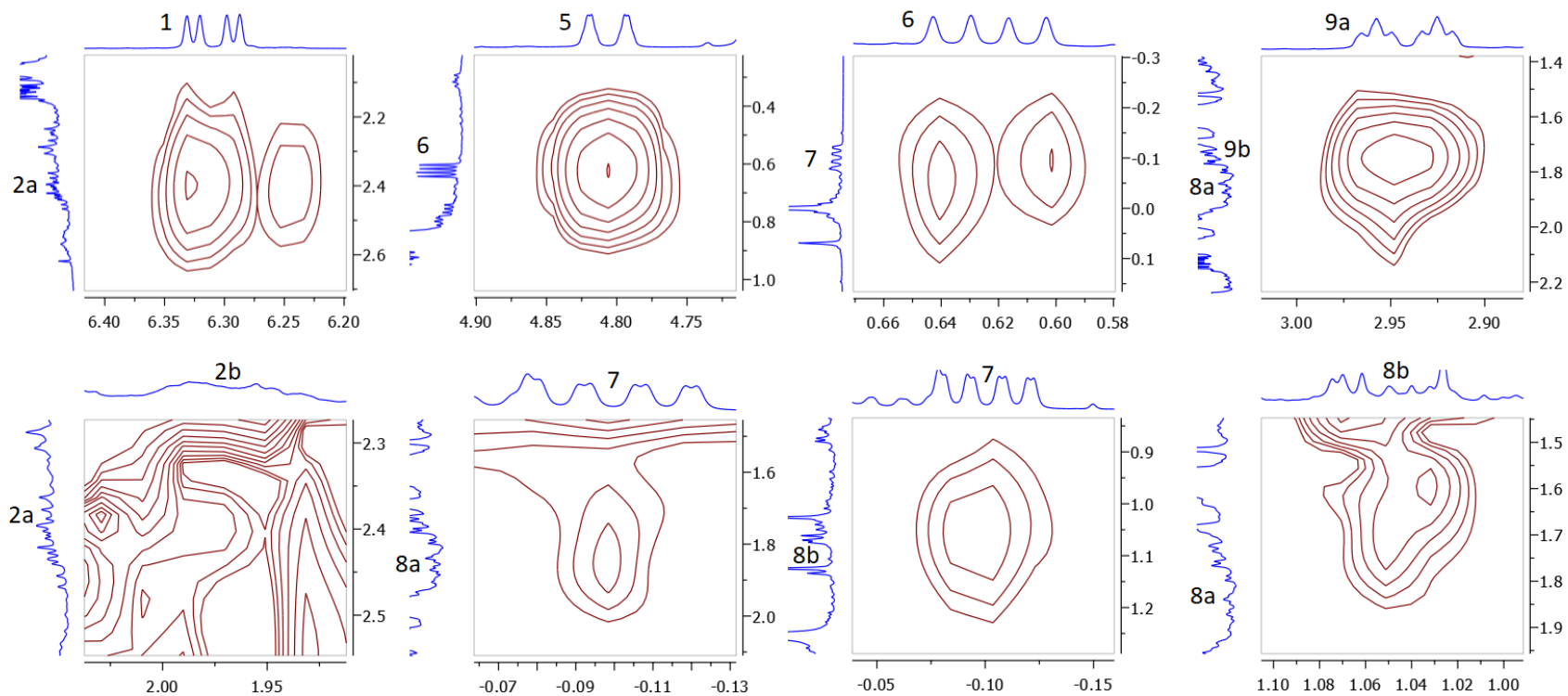
PRILOG 36. MASENI SPEKTAR (1Z,4E)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA



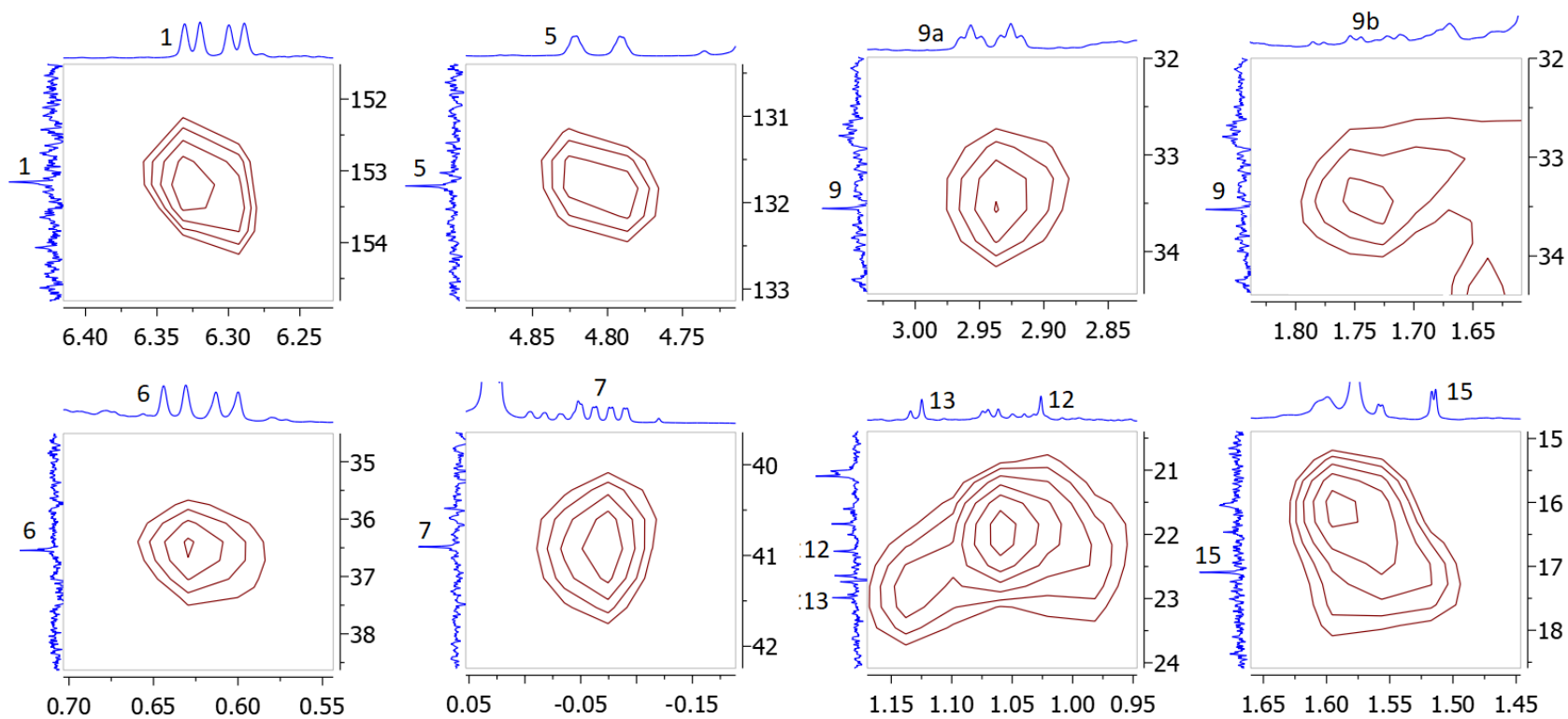
PRILOG 37. ^1H -NMR (400 MHz, H_2O) SPEKTAR HROMATOGRFSKE FRAKCIJE (24) KOJI SADRŽI *ca.* 9% (BAZIRANO NA GC-MS) IZOLEPIDOZEN-14-ALA; ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA DOBIJENOG (CRVENO) I SIMULIRANOG (PLAVO) SPEKTRA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



PRILOG 38. UVEĆANJA COSY SPEKTRA IZOLEPIDOZEN-14-ALA



PRILOG 39. UVEĆANJA gHSQC SPEKTRA IZOLEPIDOZEN-14-ALA

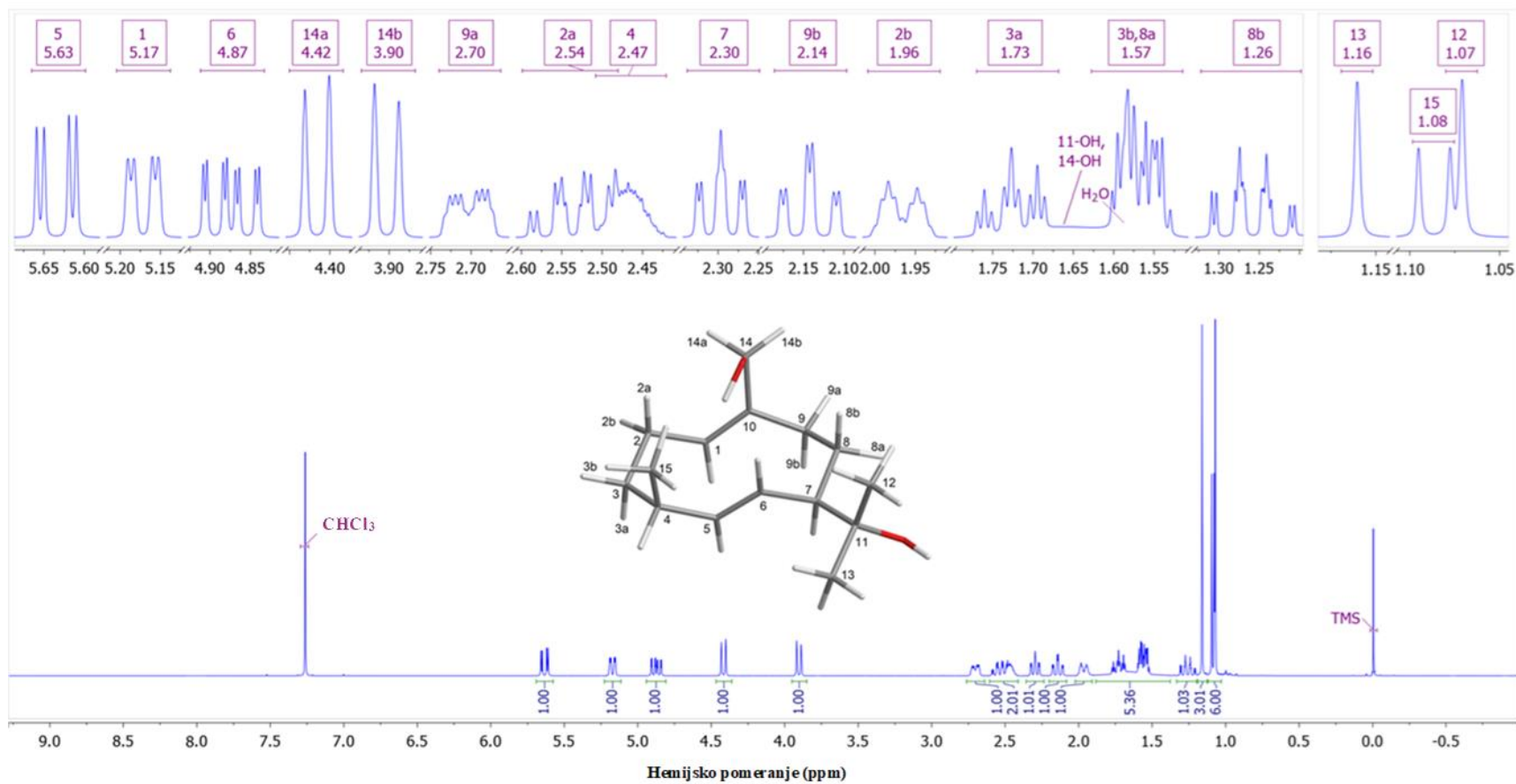


PRILOG 40. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR SPEKTROSKOPSKI PODACI (1*Z*,4*E*)-LEPIDOZA-1(10),4-DIEN-14-OLA (BENZEN- d_6) I KONOCEFALENOLA (HLOOROFORM-*d*)

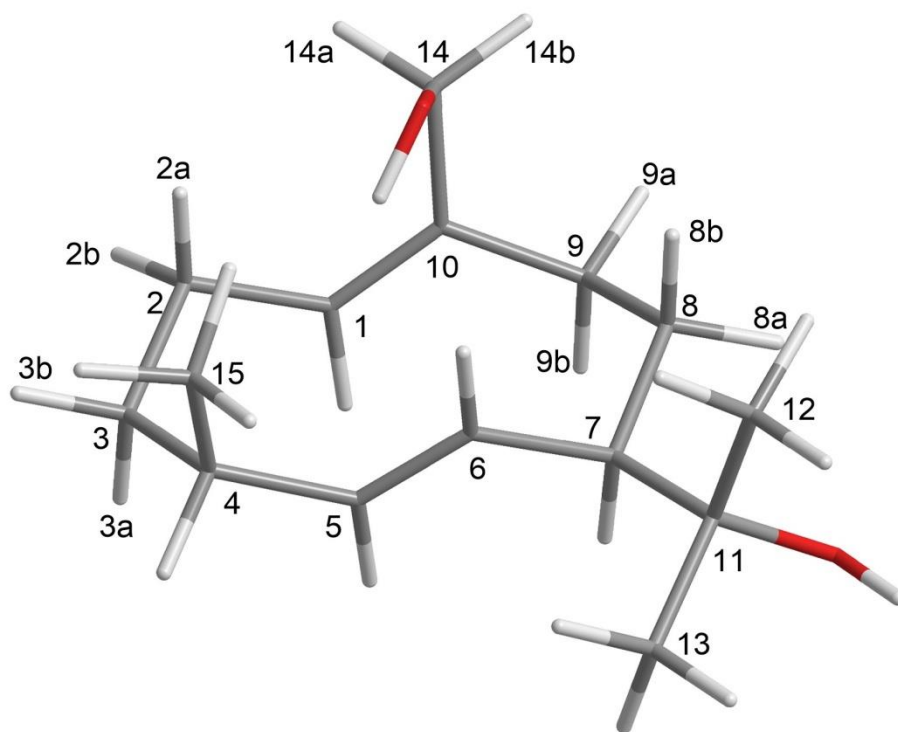
Položaj	1^b		KONOCEFALENOL	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} , m (<i>J</i> u Hz) ^a	δ_{C} (ppm)	δ_{H} , m (<i>J</i> u Hz) ^a
1	131,3, CH	4,76, ddt ^c (12,3, 4,3, 0,8, 0,7)	48,1, CH	1,68, t ^c dddd (12,0, 5,2, 3,3, 2,0, 1,5, 1,2)
2a	29,7, CH ₂	2,39, dddd (−13,1, 12,4, 12,3, 4,8)	40,2, CH ₂	1,52, ddd (−12,2, 5,2, 0,9)
2b		1,99, dddddd (−13,1, 5,2, 4,3, 1,9, 1,5, 1,2)		0,80, ddd (−12,2, 12,0, 0,7)
3a	41,2, CH ₂	2,11, ddd (12,4, −11,7, 5,2)	29,8, C	
3b		2,10, ddd (−11,7, 4,8, 1,9)		
4a	134,2, CH ₂		41,3, CH ₂	1,78, dddd (−17,0, 3,3, 2,8, 2,4, 0,9)
4b				1,77, dddd (−17,0, 2,8, 2,4, 1,2, 0,7)
5	132,8, CH	4,61, dd (10,3, 1,3)	132,2, C	
6	37,6, CH	0,75, dd (10,3, 5,3)	136,3, C	
7/7a	41,8, CH ₂	−0,16, ddd (11,0, 5,3, 1,3)	29,3, CH ₂	2,52, dddddd (−17,6, 9,4, 2,8, 2,4, 1,6, 1,5, 0,7)
7b				2,55, dddddd (−17,6, 10,4, 8,0, 2,8, 2,4, 2,0)
8a	26,7, CH ₂	1,87, dddd (−13,2, 3,8, 3,3, 1,3)	33,9, CH ₂	1,86, dddd (−12,2, 8,0, 6,0, 1,6)
8b		1,02, dddd (−13,2, 12,8, 11,0, 3,2)		1,16, dddd (−12,2, 12,0, 10,4, 9,4)
9a/9	37,8, CH ₂	2,80, dddddd (−12,5, 3,3, 3,2, 1,2,1,1, 0,8)	40,5, CH ₂	1,25, t ^c dddd (12,0, 6,3, 6,0, 0,7)
9b		1,79, dddddd (12,8, −12,5, 3,8, 1,2, 0,7)		
10	131,9, C		74,6, C	
11	25,5, C		30,0, CH ₃	1,32, s
12	23,8, CH ₃	1,16, s	29,1, CH ₃	1,32, s
13	22,5, CH ₃	1,02, s	32,4, CH ₃	0,98, ^d s
14a/14	60,0 ^g CH ₂	4,07, ddd (−11,6, 1,3, 0,7)	26,6, CH ₃	0,85, ^d s
14b		3,63, dddd (−11,6, 4,6, 1,5, 1,2,1,1)		
15	17,7, CH ₃	1,46, d (1,3)	18,1, CH ₃	1,00, d (6,3)
OH-10				1,66 (br s)
OH-14		0,48, dd (4,6, 1M3) ^e		

^a $|J| \leq 0,7$ Hz, konstante kuplovanja nisu prikazane ovde već u Prilozima 20 i 21. ^bVećina protonskih rezonanci na 400 MHz pojavila se kao signali višeg reda i/ili sa regionima preklopljenih signala; predstavljene vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja, uključujući njihov znak, određene su iz manualne iterativne ^1H -NMR pune spinske simulacije (Radulović et al., 2019). ^cPseudomultiplet, kao na primer, dublet dubleta, ali sa dve slične *J* vrednosti koje bi se verovatno pojavile kao pseudo-triplet. ^dAsignacija zasnovana na gHMBC interakciji kroz četiri veze H-13 (a ne H-14) i C-5 (*W*-odnos, Prilog 23). ^eŠiroki signal.

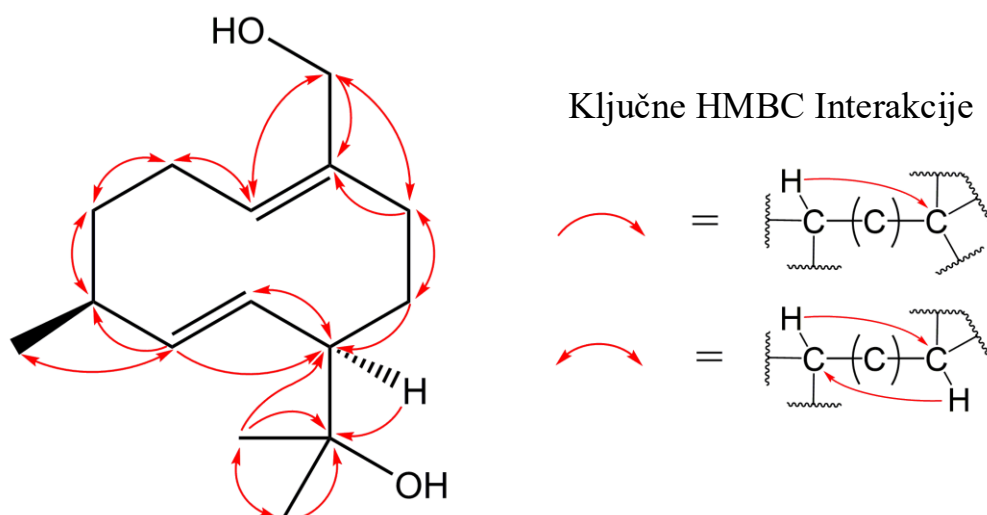
PRILOG 41. ^1H -NMR (400 MHz, H_2O) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA I ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



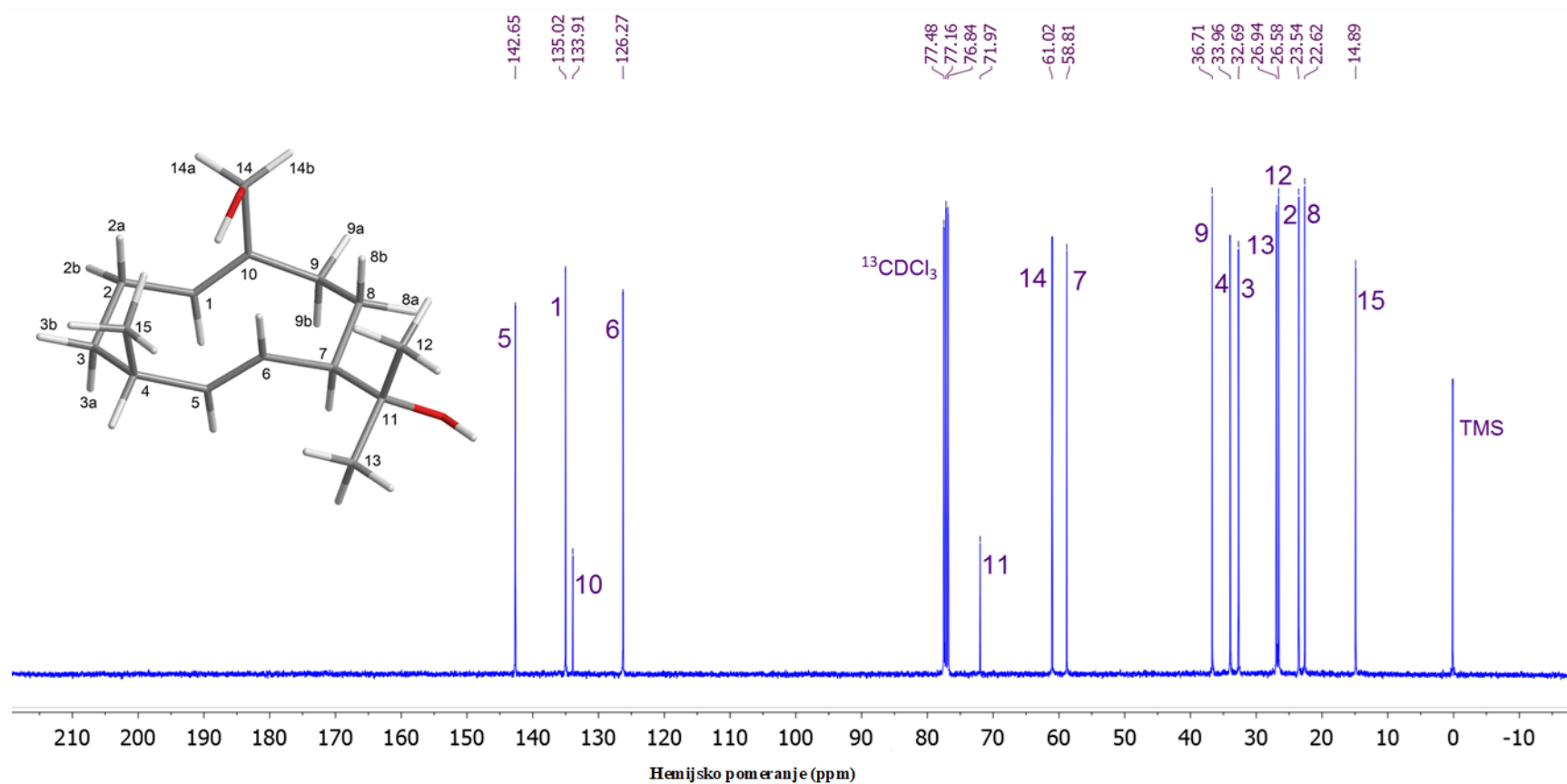
PRILOG 42. ŠEMA NUMERACIJE ATOMA *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA–3D MODEL



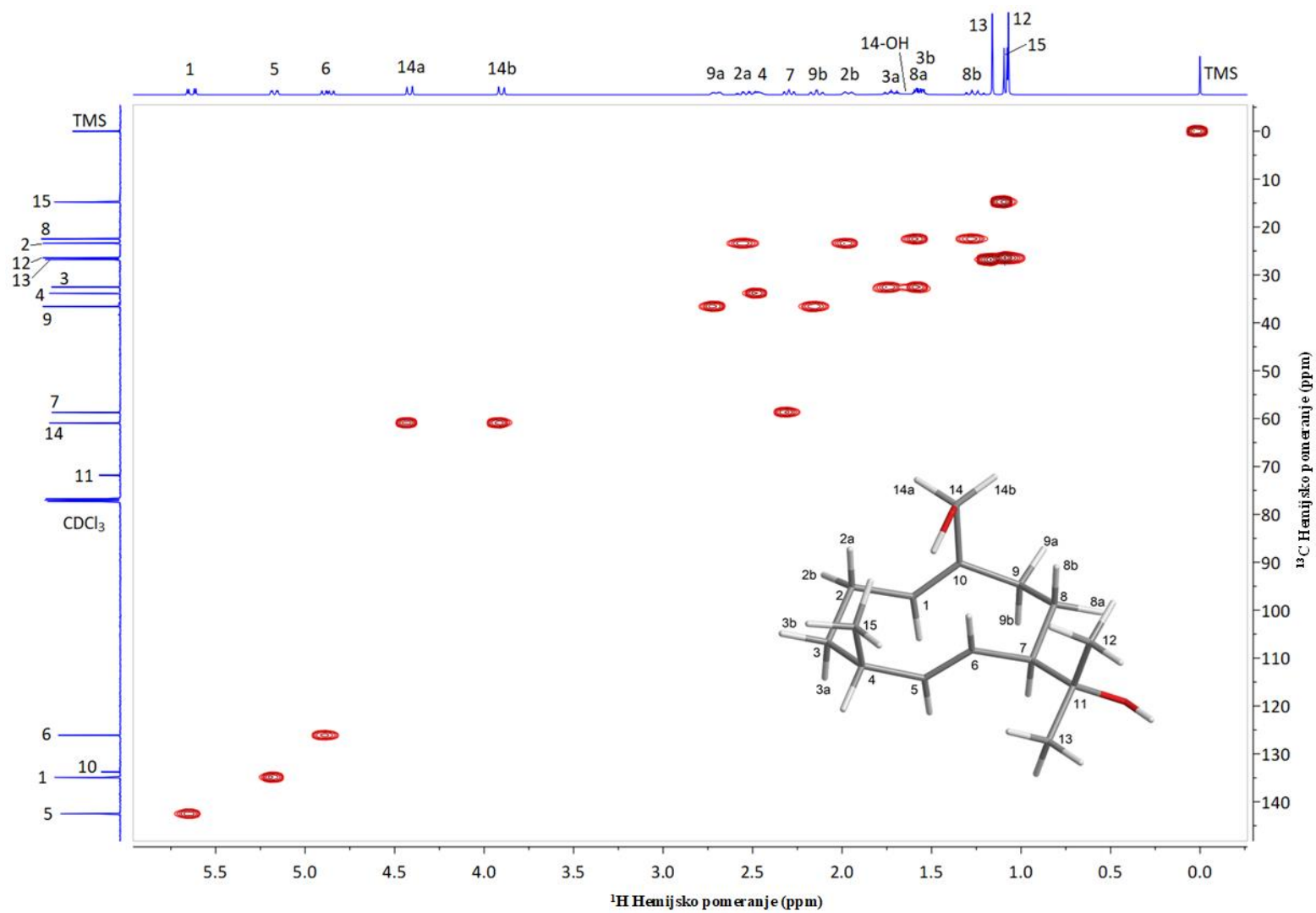
PRILOG 43. KLJUČNE gHMBC INTERAKCIJE *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA



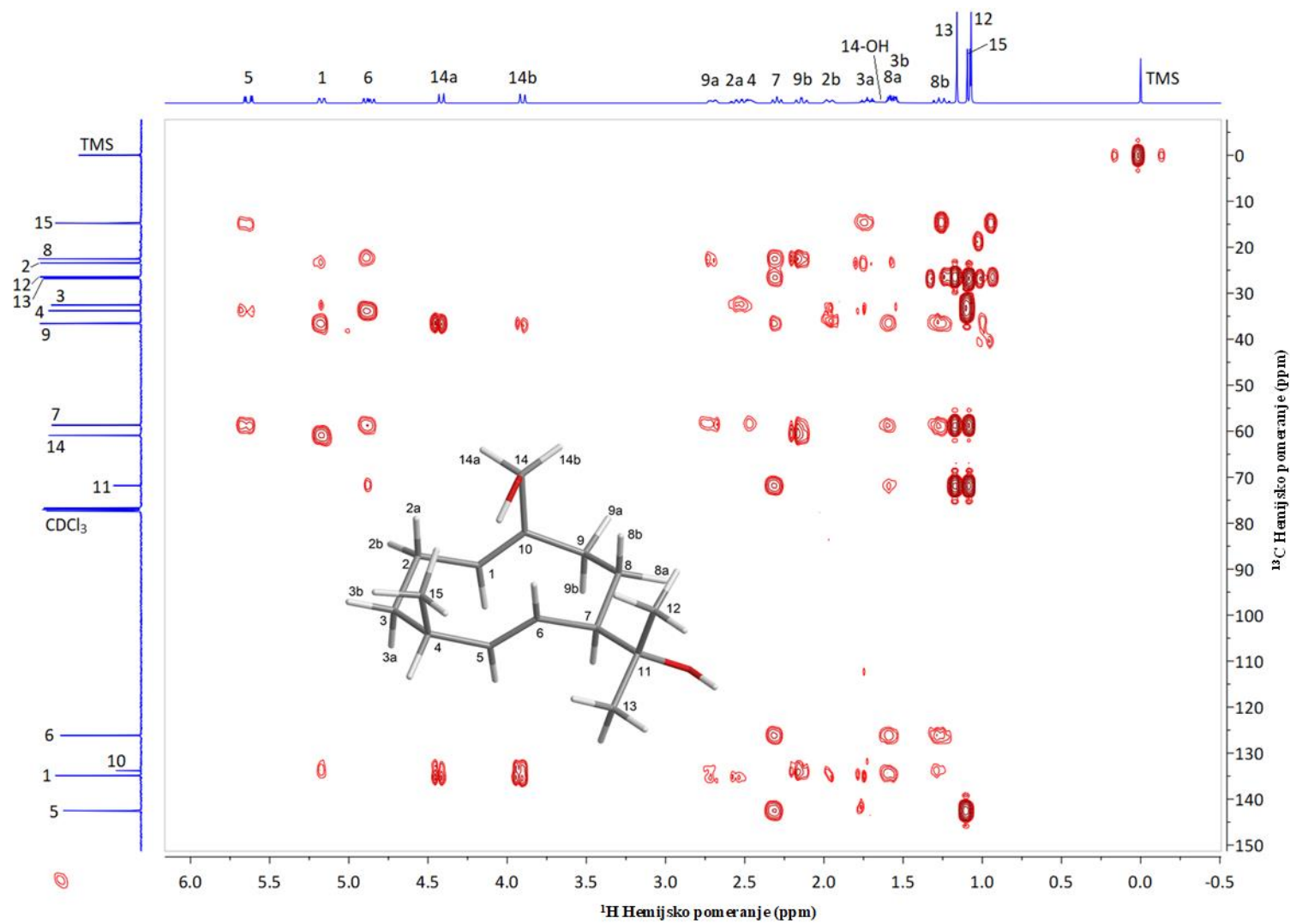
PRILOG 44. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, H₂OFORM-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



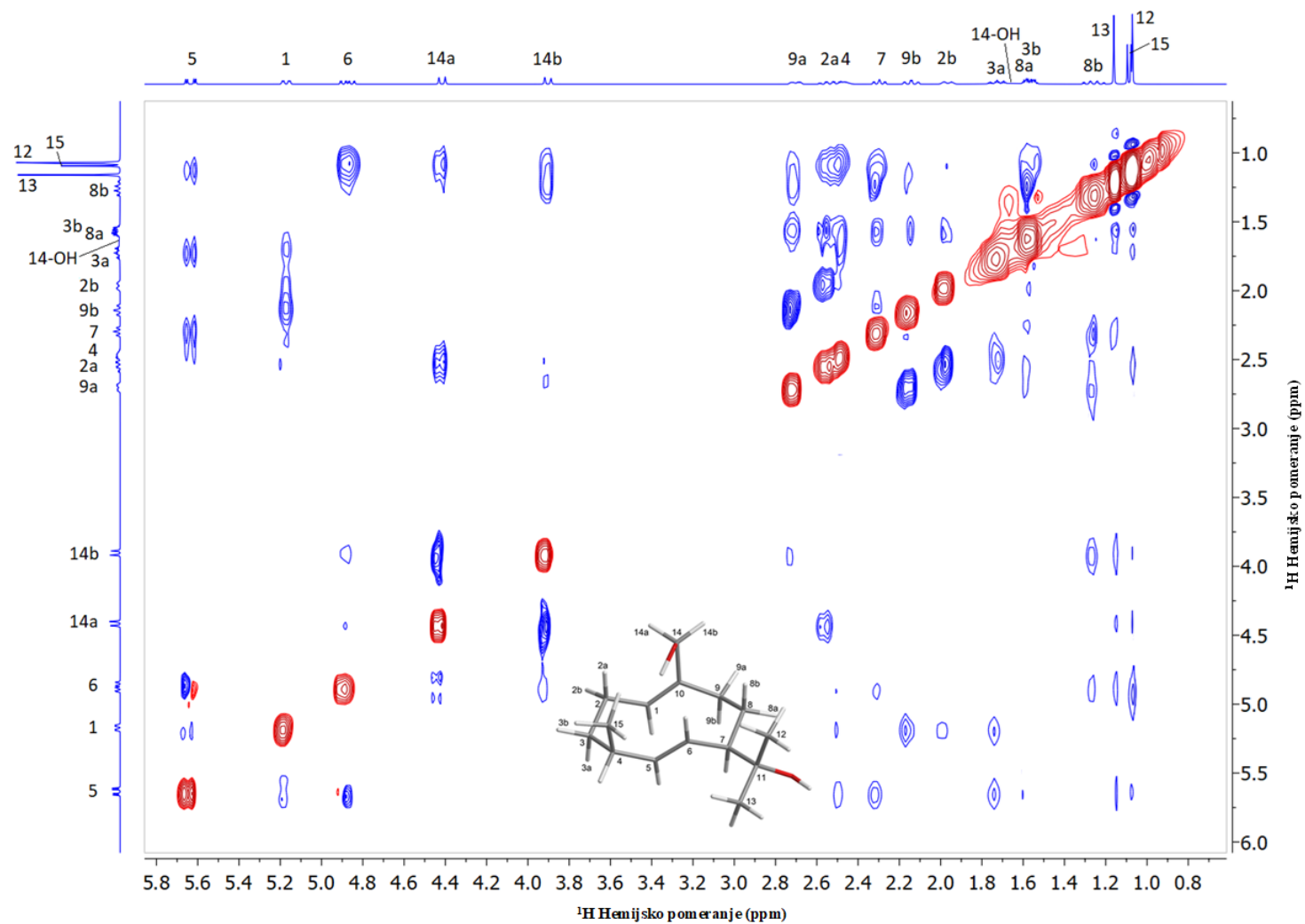
PRILOG 45. gHSQC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA



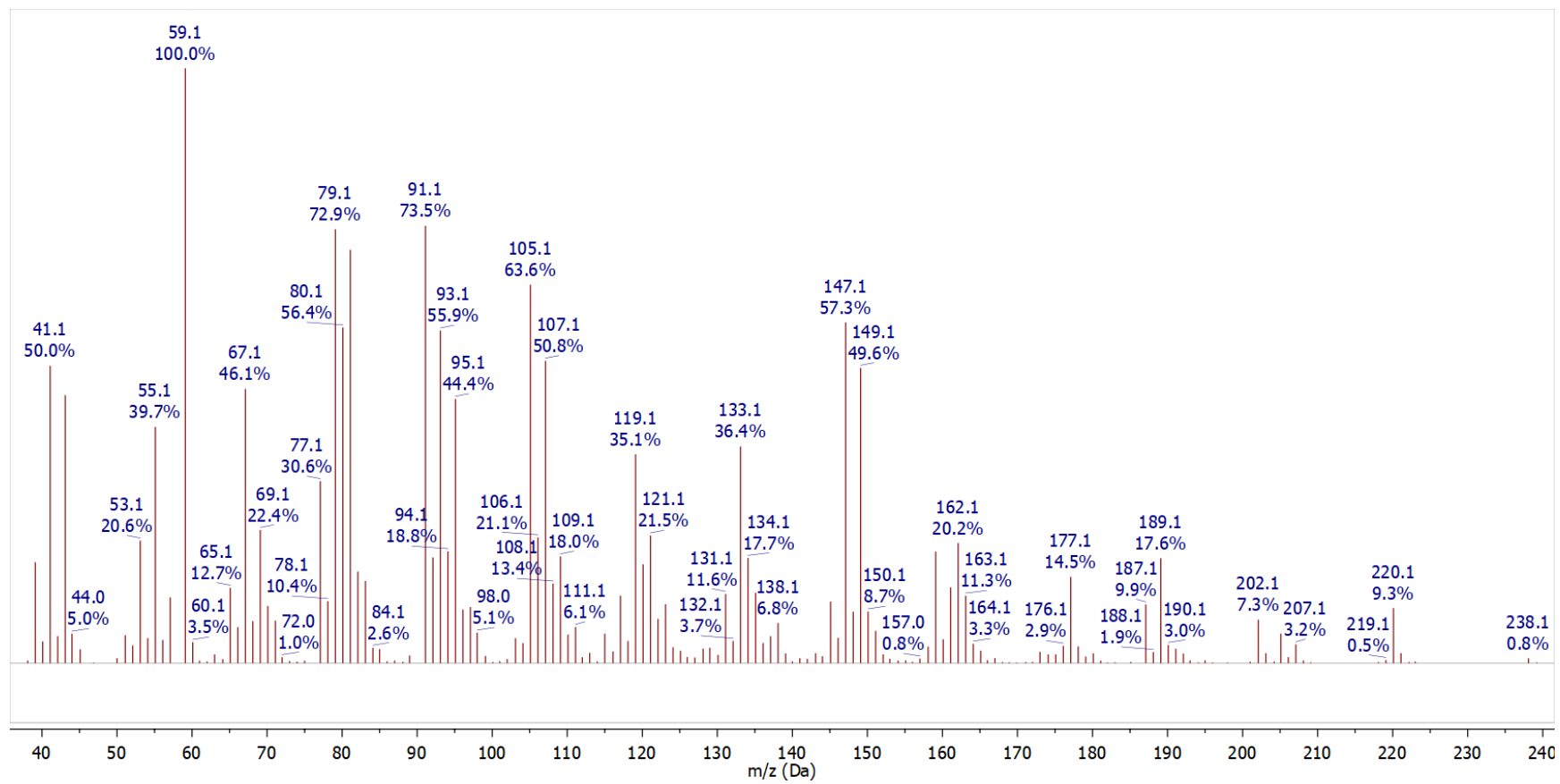
PRILOG 46. gHMBC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA



PRILOG 47. NOESY SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA



PRILOG 48. MASENI SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA



PRILOG 49. ^1H (400 MHz) I ^{13}C (100,6 MHz) NMR PODACI *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-GERMAKRA-1(10),5-DIEN-11,14-DIOLA (HLOOROFORM-*d*, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE), I UOČENE gHMBC I NOESY INTERAKCIJE

Položaj	δ_{H} (integral, m, J (Hz) ^a)	δ_{C}	gHMBC ^b	NOESY ^c
1	5,1713 (1 H, dddd ^d , $^3J_{1,2a} = 12,1$, $^3J_{1,2b} = 3,1$, $^4J_{1,9b} = 1,0$, $^4J_{1,14a} = 0,8$, $^4J_{1,9a} = ^4J_{1,3a} = 0,7$, $^4J_{1,14b} = 0,6$)	135,0	2, 3, 9, 10, 14	2b, 3a, 5, 9b
2a	2,5354 (1 H, ddddq ^d , $^2J_{2b,2a} = -14,3$, $^3J_{2a,3a} = 12,6$, $^2J_{1,2a} = 12,1$, $^3J_{2a,3b} = 3,3$, $^5J_{2a,14a} = 0,5$, $^5J_{2a,9b} = ^5J_{2a,9a} = ^5J_{2a,14b} = 0,4$)		1, 3, 10	2b, 3b, 14a, 14b, 15
2b	1,9660 (1 H, dddddddd, $^2J_{2b,2a} = -14,3$, $^3J_{2b,3b} = 3,9$, $^3J_{2b,3a} = 3,5$, $^3J_{1,2b} = 3,1$, $^5J_{2b,9a} = 2,8$, $^5J_{2b,14b} = 1,3$, $^5J_{2b,14a} = 1,1$, $^5J_{2b,9b} = 0,5$, $^3J_{2b,4} = 0,4$)	23,5	1, 3, 4, 9, 10	1, 2a, 3b
3a	1,7256 (1 H, ddt ^d dq, $^2J_{3b,3a} = -13,6$, $^3J_{2a,3a} = 12,6$, $^3J_{2b,3a} = ^3J_{3a,4} = 3,5$, $^4J_{1,3a} = 0,7$, $^4J_{3a,15} = 0,4$)	32,7	1, 2, 4, 5, 15	1, 4, 5
3b	1,5650 (1 H, ddddq, $^2J_{3b,3a} = -13,6$, $^3J_{3b,4} = 4,6$, $^3J_{2b,3b} = 3,9$, $^3J_{2a,3b} = 3,3$, $^4J_{3b,15} = 0,3$)		1, 2, 4, 6	2b, 2a, 4, 15
4	2,4675 (1 H, ddddd, $^3J_{4,15} = 7,0$, $^3J_{3b,4} = 4,6$, $^3J_{4,5} = 3,7$, $^3J_{3a,4} = 3,5$, $^4J_{4,6} = 1,9$)	34,0	3, 7	3a, 3b, 5, 15
5	5,6338 (1 H, ddq, $^3J_{5,6} = 16$, $^3J_{4,5} = 3,7$, $^4J_{5,15} = 0,3$)	142,6	4, 7, 15	1, 3a, 4, 7, 12, 13
6	4,8742 (1 H, dddd, $^3J_{5,6} = 16$, $^3J_{6,7} = 9,9$, $^4J_{4,6} = 1,9$, $^4J_{6,8b} = 0,4$)	126,3	4, 7, 8, 11	8b, 12, 13, 14b, 14a, 15
7	2,2965 (1 H, ddddsept ^d , $^3J_{7,8b} = 11,6$, $^3J_{6,7} = 9,9$, $^3J_{7,8a} = 2,2$, $^4J_{7,9b} = 0,4$, $^4J_{7,12} = ^4J_{7,13} = 0,3$)	58,8	5, 6, 8, 9, 12, 13	5, 8a, 8b, 9b, 11, 12, 13
8a	1,5710 (1 H, dddd, $^3J_{8a,8b} = -14,1$, $^3J_{8a,9a} = 5,6$, $^3J_{8a,9b} = 2,6$, $^3J_{7,8a} = 2,2$)	22,6	6, 7, 9, 10, 11	8b, 9a, 9b, 12, 13
8b	1,2590 (1 H, dddd, $^3J_{8a,8b} = -14,1$, $^3J_{8b,9b} = 13,1$, $^3J_{7,8b} = 11,6$, $^3J_{8b,9a} = 2,3$, $^4J_{6,8b} = 0,4$)		6, 7, 9, 10	6, 7, 8a, 9a, 12, 14b
9a	2,7023 (1 H, ddddddd ^d , $^2J_{9a,9b} = -13,2$, $^3J_{8a,9a} = 5,6$, $^5J_{2b,9a} = 2,8$, $^3J_{8b,9a} = 2,3$, $^4J_{9a,14b} = 1,0$, $^4J_{9a,14a} = 0,8$, $^4J_{1,9a} = 0,7$, $^5J_{2a,9a} = ^4J_{7,9b} = 0,4$)	36,7	1, 7, 8, 10	8a, 8b, 9b, 14b
9b	2,1423 (1 H, ddddtd ^d , $^2J_{9a,9b} = -13,2$, $^3J_{8b,9b} = 13,1$, $^3J_{8a,9b} = 2,6$, $^4J_{1,9b} = 1,0$, $^5J_{2b,9b} = 0,5$, $^5J_{2a,9b} = ^4J_{9b,14b} = 0,4$, $^4J_{9b,14a} = 0,3$)		7, 8, 10, 14	1, 7, 8a, 9a
10	/	133,9	/	/
11	/	72,0	/	/
12	1,0709 (1 H, d, $^4J_{7,12} = 0,3$)	26,6	7, 11, 13	5, 6, 7, 8a, 8b
13	1,1604 (1 H, d, $^4J_{7,13} = 0,3$)	26,9	7, 11, 12	5, 6, 7, 8a
14a	4,4155 (1 H, ddt ^d dd, $^2J_{14b,14a} = -12,0$, $^5J_{2b,14a} = 1,1$, $^4J_{9a,14a} = ^4J_{1,14a} = 0,8$, $^5J_{2a,14a} = 0,5$, $^4J_{9b,14a} = 0,3$)	61,0	1, 9, 10	2a, 6, 14b, 15
14b	3,9035 (1 H, ddddd, $^2J_{14b,14a} = -12,0$, $^5J_{2b,14b} = 1,3$, $^4J_{9a,14b} = 1,0$, $^4J_{1,14b} = 0,6$, $^4J_{9b,14b} = 0,4$, $^5J_{2a,14b} = 0,4$)		1, 9, 10	2a, 6, 8b, 9a, 14a, 15
15	1,0864 (1 H, ddq ^d , $^3J_{4,15} = 7,0$, $^4J_{3a,15} = 0,4$, $^4J_{3b,15} = ^4J_{5,15} = 0,3$)	14,9	3, 4, 5	2a, 3b, 3a, 4, 5, 6, 14a, 14b
OH-11 OH-14	1,65 (2 H, brs)	/	/	/

^a Vrednosti konstanti kuplovanja su prvobitno izvedene iz NMR eksperimenata ^1H homoselektivnim dekuplovanjem, a zatim utučnjene manualnom iterativnom punom spinskom analizom. Za detalje pogledati Prilog 59. ^bgHMBC korelacije između vodonika u ovom redu i ugljenika u navedenom položaju. ^cKros pikovi uočeni u NOESY spektru. ^dPseudo, to jest pseudo multiplet. Na primer, dublet dubleta sa dve slične J vrednosti bi se verovatno pojavio kao pseudo-triplet.

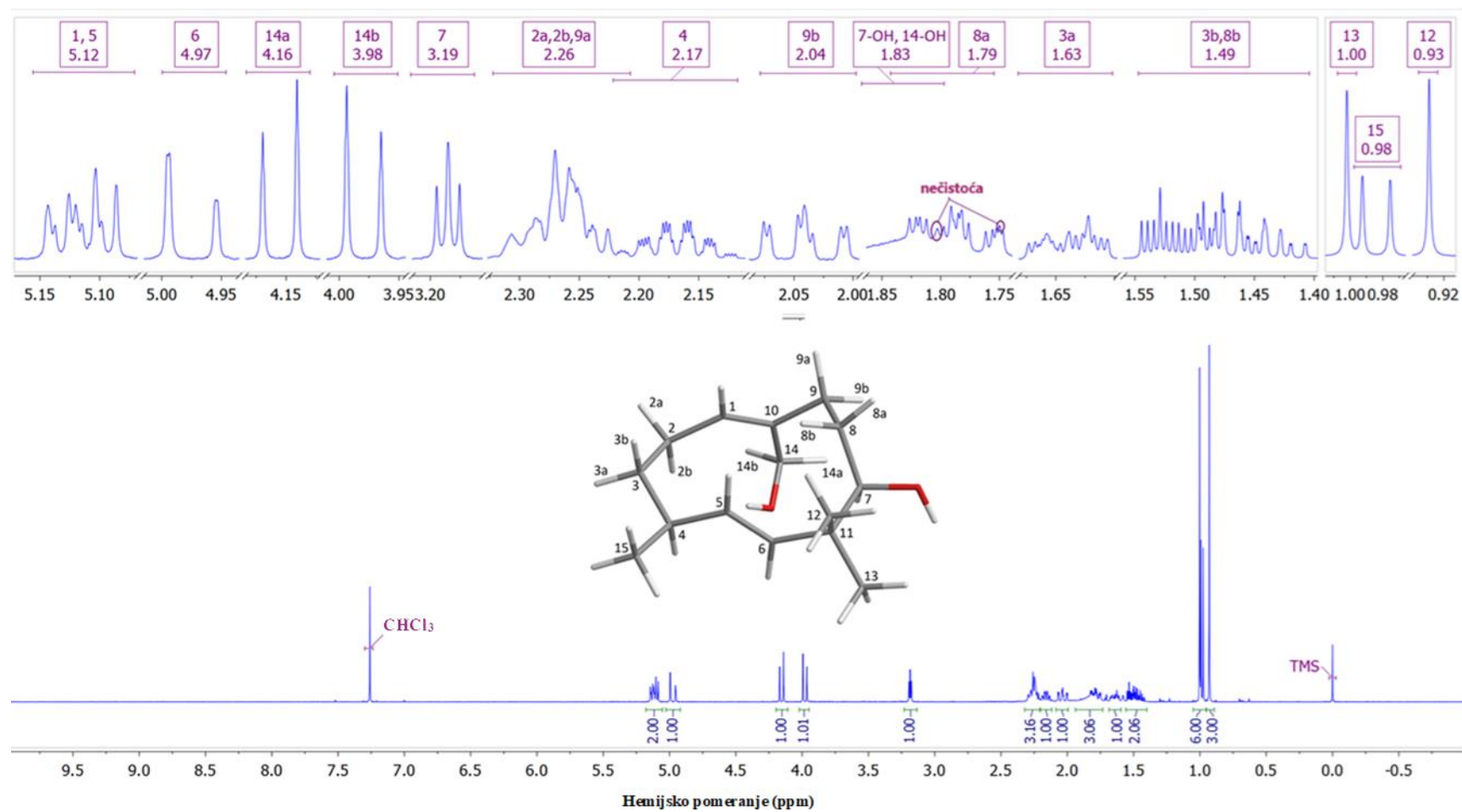
PRILOG 50. ^1H (400 MHz) I ^{13}C (100,6 MHz) NMR PODACI *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA (HLOOROFORM-*d*, NMR PARAMETRI SU IZVEDENI IZ MANUALNE ITERATIVNE PUNE SPINSKE ANALIZE), I UOČENE gHMBC I NOESY INTERAKCIJE

Položaj	δ_{H} (integral, m, J (Hz) ^a)	δ_{C}	gHMBC ^b	NOESY ^c
1	5,1200 (1 H, ddd ³ $J_{1,2b} = 9,8$, $^3J_{1,2a} = 6,0$, $^4J_{1,9a} = 1,7$, $^4J_{1,9b} = 0,5$)	133,2	2, 3, 9, 14	2a, 2b, 8a, 8b, 9a
2a	2,2710 (1 H, ddddd, $^2J_{2a,2b} = -14,0$, $^3J_{2a,3a} = 6,8$, $^3J_{1,2a} = 6,0$, $^3J_{2a,3b} = 3,7$, $^5J_{2a,9a} = 1,1$)	26,7	1, 3, 4, 10, 14	1, 3a, 3b, 14a, 14b, 15
2b	2,2450 (1 H, ddddd, $^2J_{2a,2b} = -14,0$, $^3J_{1,2b} = 9,8$, $^3J_{2b,3b} = 9,5$, $^3J_{2b,3a} = 4,0$, $^5J_{2b,9a} = 0,5$)		1, 3, 4, 10, 14	1, 3a, 3b, 14a, 14b, 15
3a	1,6380 (1 H, dddd, $^2J_{3a,3b} = -13,9$, $^3J_{2b,3a} = 6,8$, $^3J_{2a,3a} = 4,0$, $^3J_{3a,4} = 2,1$)	36,2	1, 2, 4, 5, 15	2b, 2a, 4, 15
3b	1,4545 (1 H, ddddd, $^2J_{3a,3b} = -13,9$, $^3J_{2a,3b} = 9,5$, $^3J_{3b,4} = 8,1$, $^3J_{2b,3b} = 3,7$, $^4J_{3b,5} = 0,6$)		1, 2, 4, 5, 15	2b, 2a, 5
4	2,1685 (1 H, dddd, $^3J_{3b,4} = 8,1$, $^3J_{4,5} = 7,3$, $^3J_{4,15} = 6,8$, $^4J_{4,6} = 0,9$)	38,4	2, 3, 5, 6, 15	3a, 6
5	5,1122 (1 H, ddd ³ $J_{5,6} = 16,1$, $^3J_{4,5} = 7,3$, $^4J_{3b,5} = 0,6$)	136,0	4, 3, 6, 11, 15	3b, 13, 12, 15
6	4,9773 (1 H, dd, $^3J_{5,6} = 16,1$, $^4J_{4,6} = 0,9$)	135,9	4, 5, 7, 11, 12, 13	4,7, 8a,13,14a
7	3,1851 (1 H, dd, $^3J_{7,8b} = 4,1$, $^3J_{7,8a} = 3,6$)	80,4	9, 11, 12	6, 8b, 9b, 12, 13, 14a, 14b
8a	1,7865 (1 H, dddd, $^2J_{8b,8a} = -14,4$, $^3J_{8a,9b} = 11,8$, $^3J_{7,8a} = 3,6$, $^3J_{8a,9a} = 2,2$)	33,6	9, 10, 11	1, 12
8b	1,5120 (1 H, dddd, $^3J_{8b,8a} = -14,4$, $^3J_{8b,9a} = 6,2$, $^3J_{7,8b} = 4,1$, $^3J_{8b,9b} = 2,0$)		9, 10, 11	1, 7
9a	2,2780 (1 H, ddddq ^d , $^2J_{9a,9b} = -14,7$, $^3J_{8b,9a} = 6,2$, $^3J_{8a,9a} = 2,2$, $^4J_{1,9a} = 1,7$, $^5J_{2b,9a} = 1,1$, $^4J_{9a,14a} = ^4J_{9a,14b} = ^5J_{2a,9a} = 0,5$)	30,3	1, 7, 8, 10, 14	1, 14b, 14a
9b	2,0410 (1 H, dddq ^d , $^2J_{9a,9b} = -14,7$, $^3J_{8a,9b} = 11,8$, $^3J_{8b,9b} = 2,0$, $^4J_{1,9b} = ^4J_{9b,14a} = ^4J_{9b,14b} = 0,5$)		1, 7, 8, 10, 14	7, 14a, 14b
10	/	133,9	/	/
11	/	40,4	/	/
12	0,9290 (1 H, s)	19,0	6, 7, 11, 13	5, 7, 8a
13	1,0019 (1 H, s)	26,6	6, 7, 11, 12	5, 6, 7
14a	4,1540 (1 H, dt ^d , $^2J_{14a,14b} = -11,5$, $^4J_{9a,14a} = ^4J_{9b,14a} = 0,5$)	62,4	1, 9	2b, 6, 7, 9a, 9b, 14b
14b	3,9805 (1 H, dt ^d , $^2J_{14a,14b} = -11,5$, $^4J_{9a,14b} = ^4J_{9b,14b} = 0,5$)		1, 9	2b, 7, 9a, 9b, 14a
15	0,9840 (1 H, d, $^3J_{4,15} = 6,8$)	20,7	3, 4, 5	5, 2a, 2b
OH-7, OH-14	1,83 (2 H, br s)	/	/	/

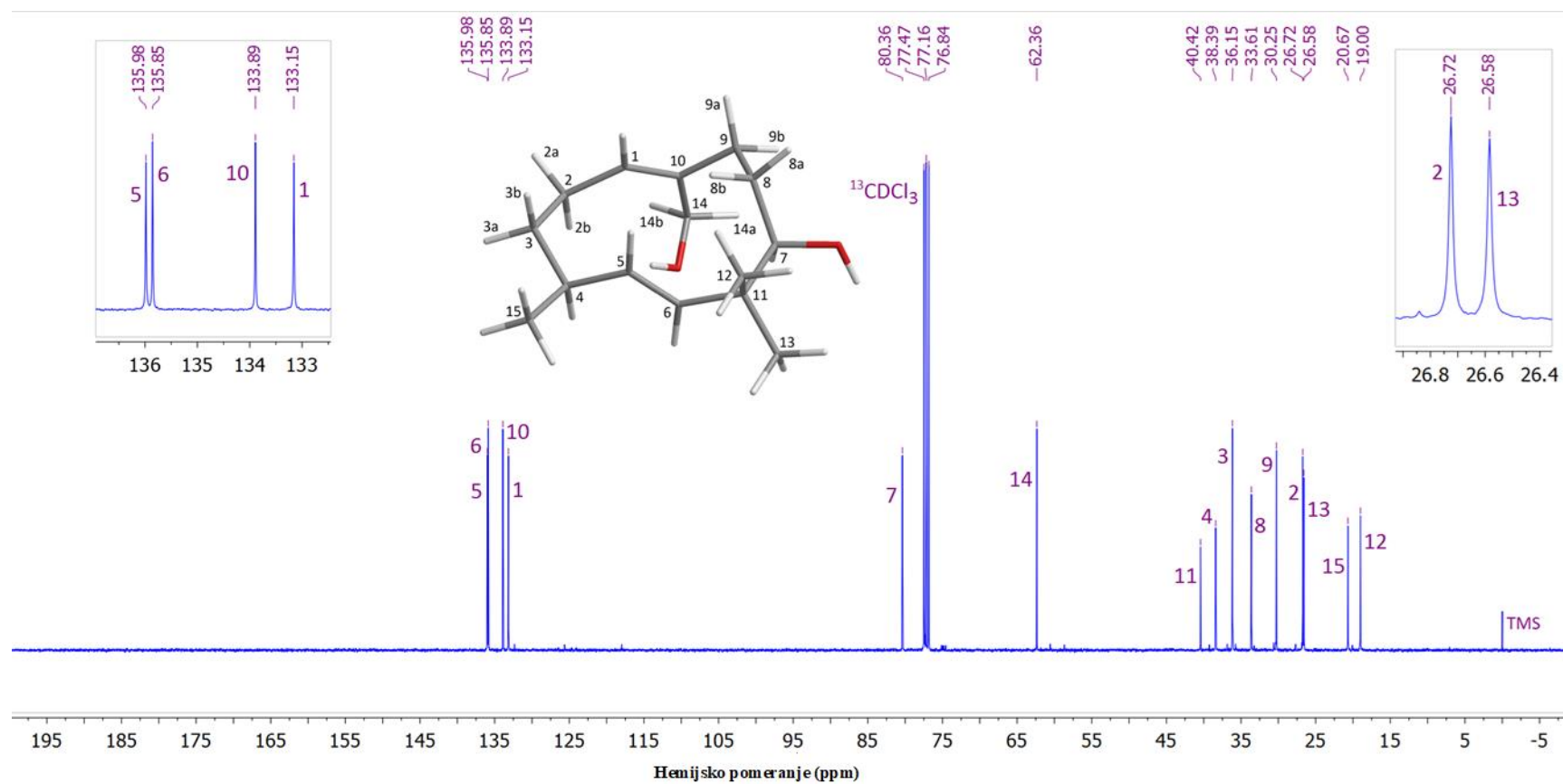
^a Vrednosti konstanti kuplovanja su prvobitno izvedene iz NMR eksperimenata ^1H homoselektivnim dekuplovanjem, a zatim utučnjene manualnom iterativnom punom spinskom analizom. Za detalje pogledati Prilog 59. ^bgHMBC korelacije primećene između vodonika u ovom redu i ugljenika u navedenom položaju. ^c Kros pikovi uočeni u NOESY spektru.

^dPseudo, to jest pseudo multiplet. Na primer, dublet dubleta sa dve slične J vrednosti bi se verovatno pojavio kao pseudo-triplet.

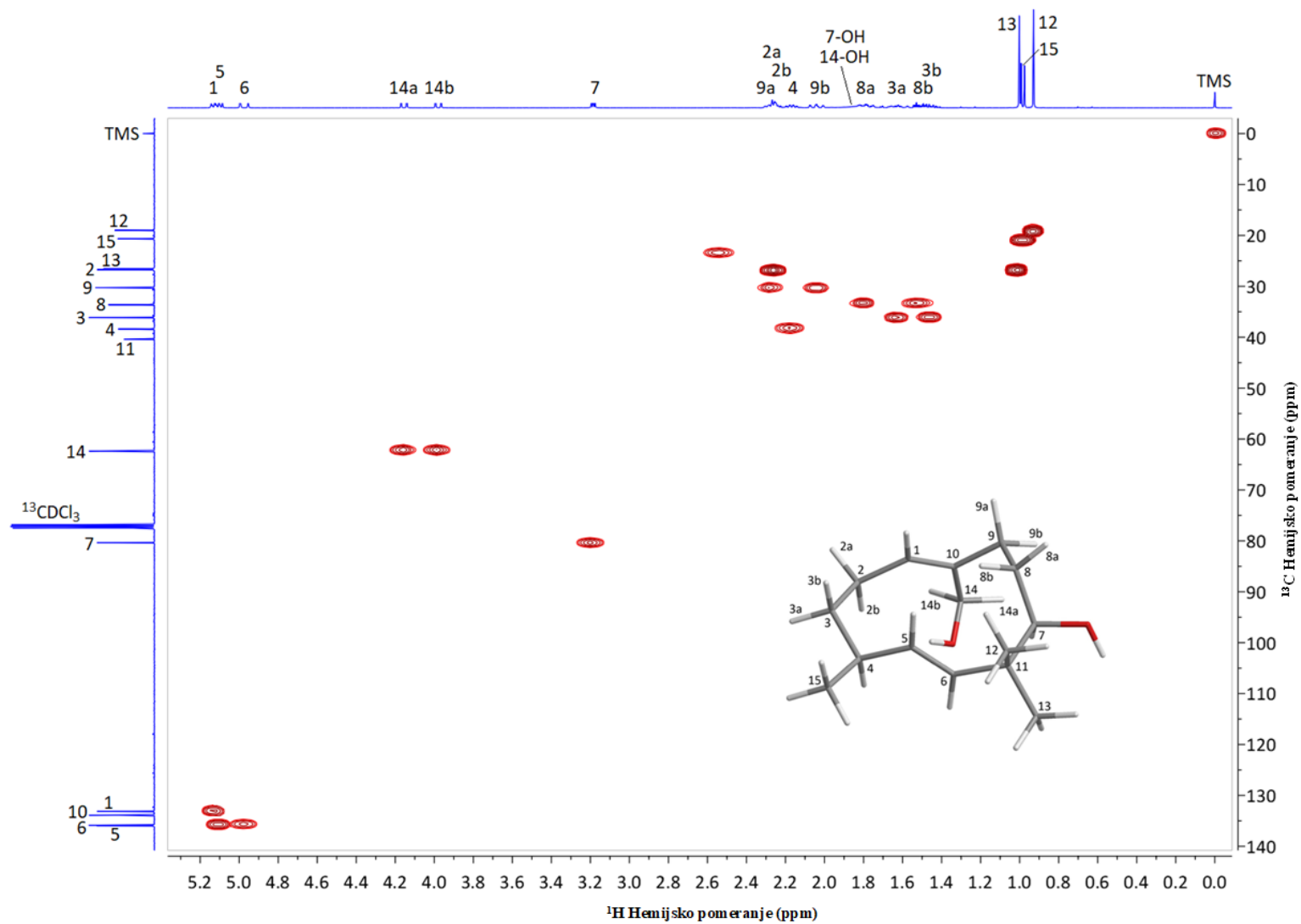
PRILOG 51. ^1H -NMR (400 MHz, H₂O-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA I ODGOVARAJUĆA UVEĆANJA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



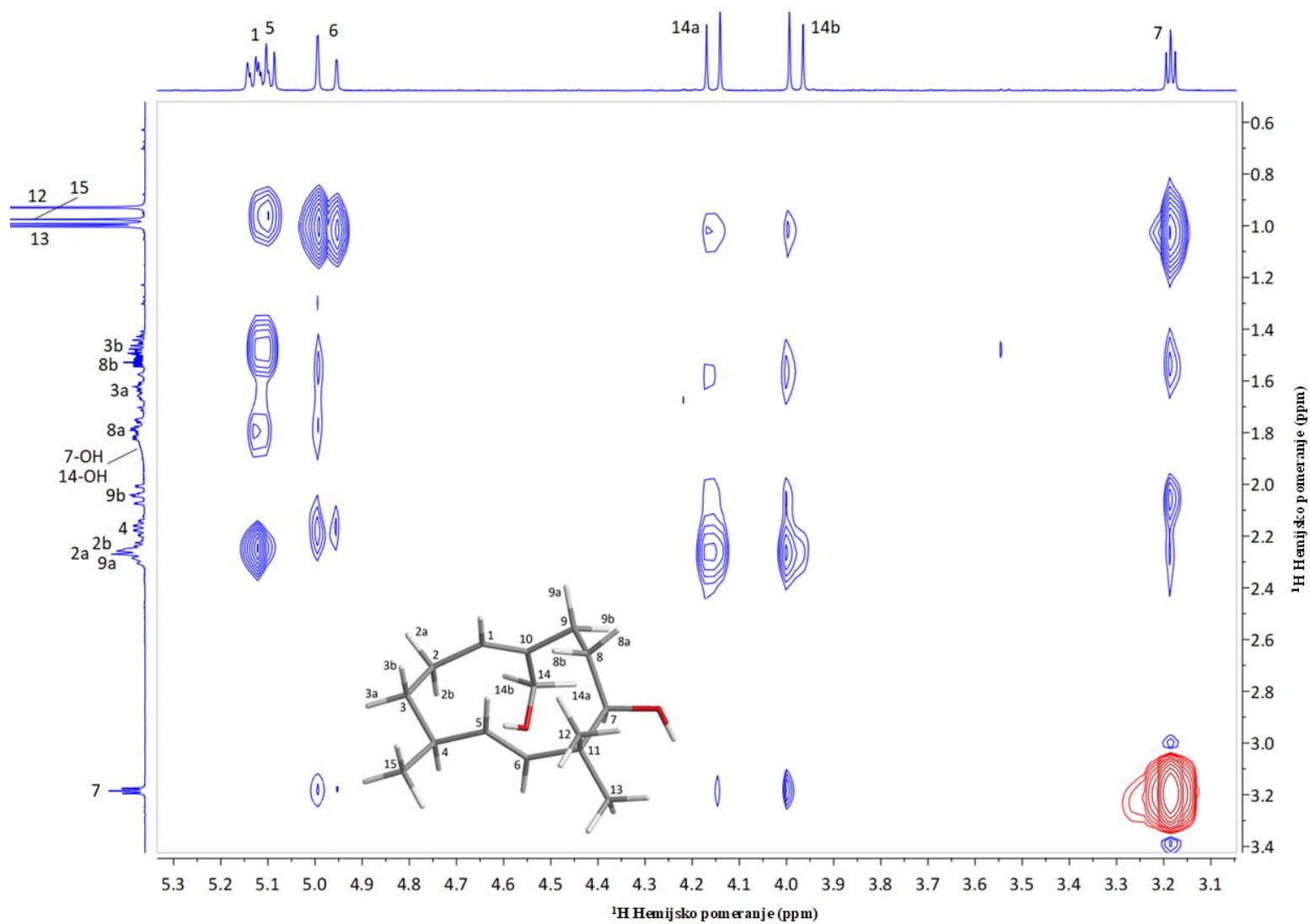
PRILOG 52. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, H₂O-*d*) SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA SA ASIGNACIJOM SIGNALA



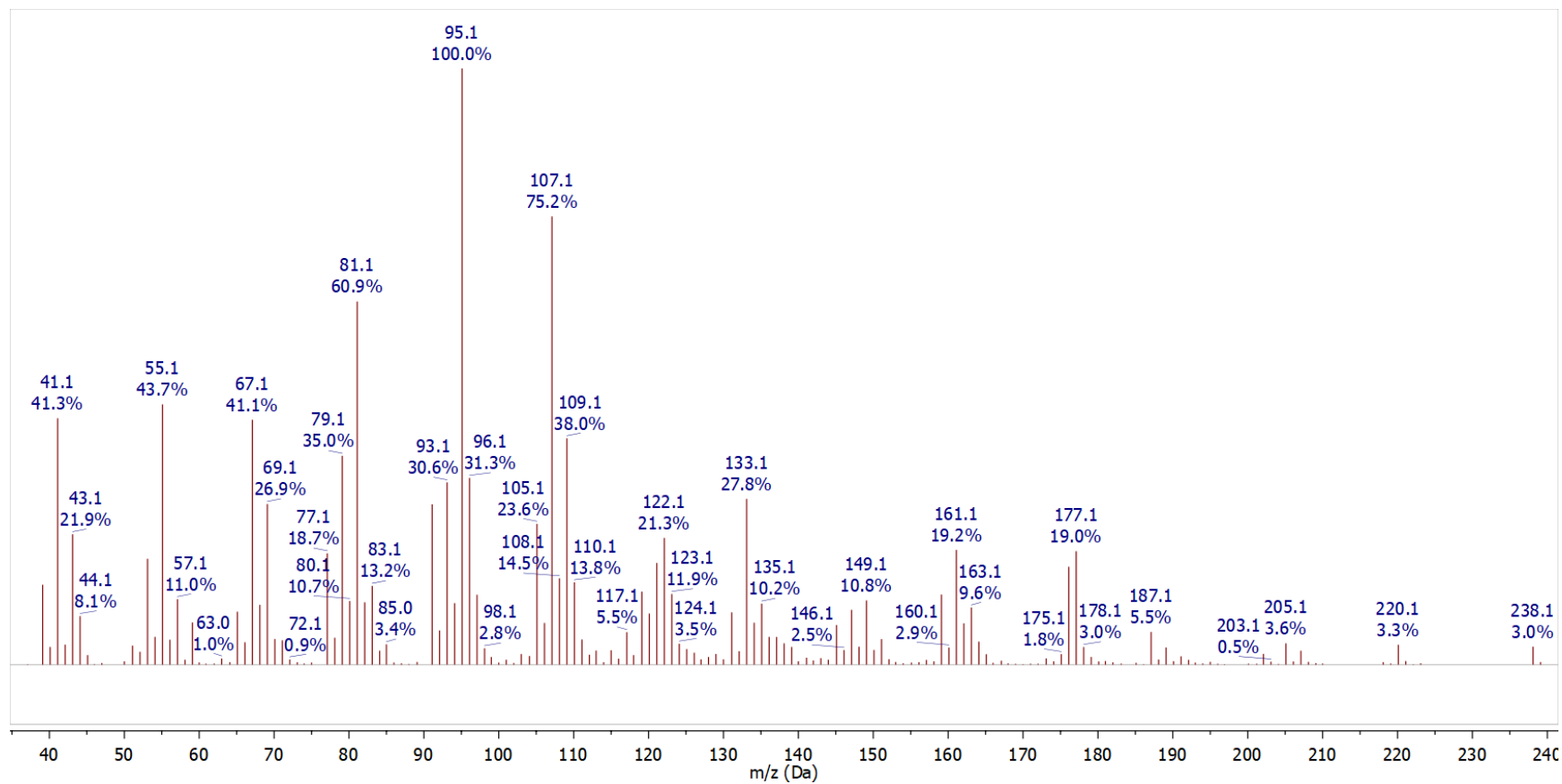
PRILOG 53. gHSQC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA



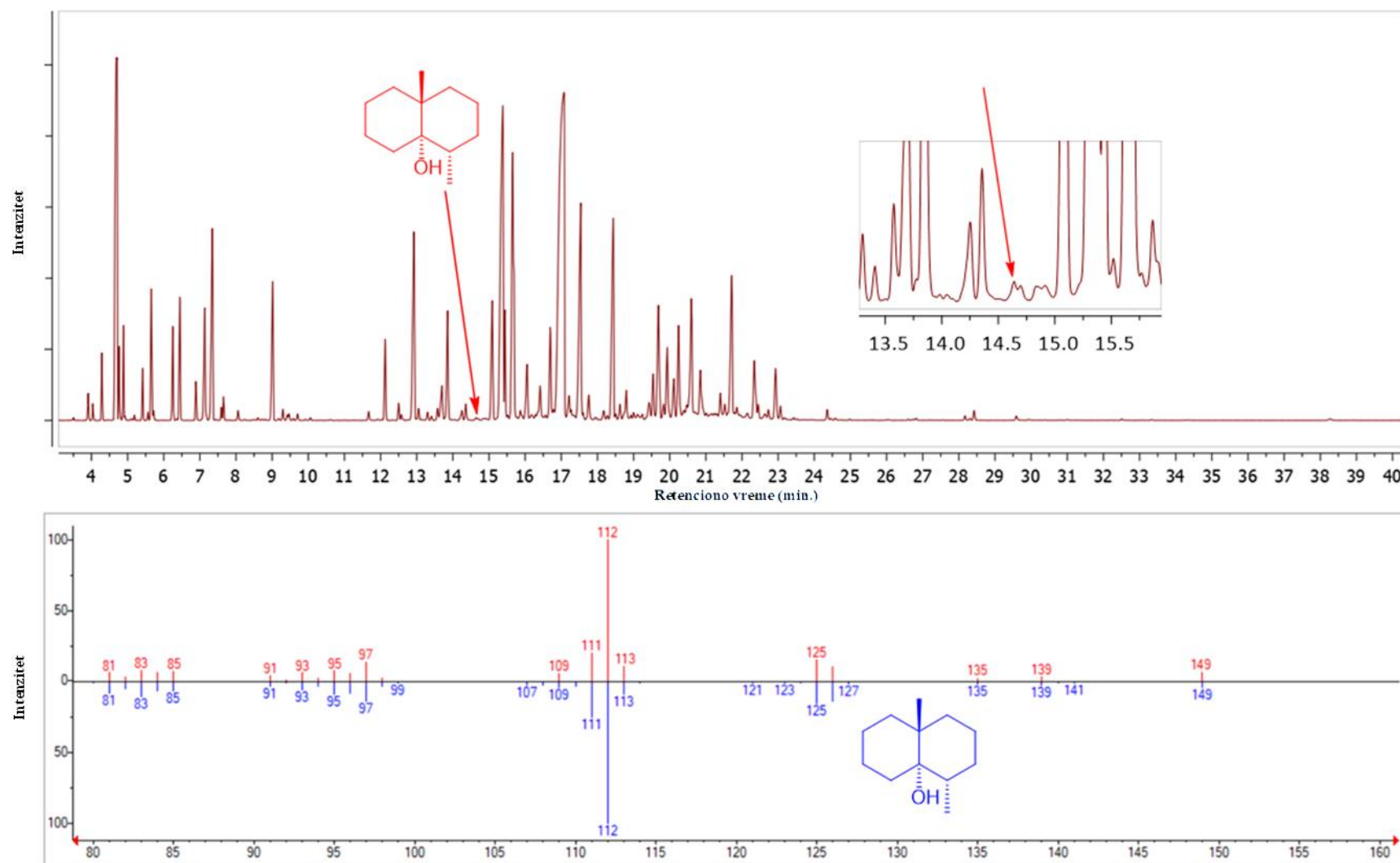
PRILOG 54. UVEĆANJE NOESY SPEKTRA *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA



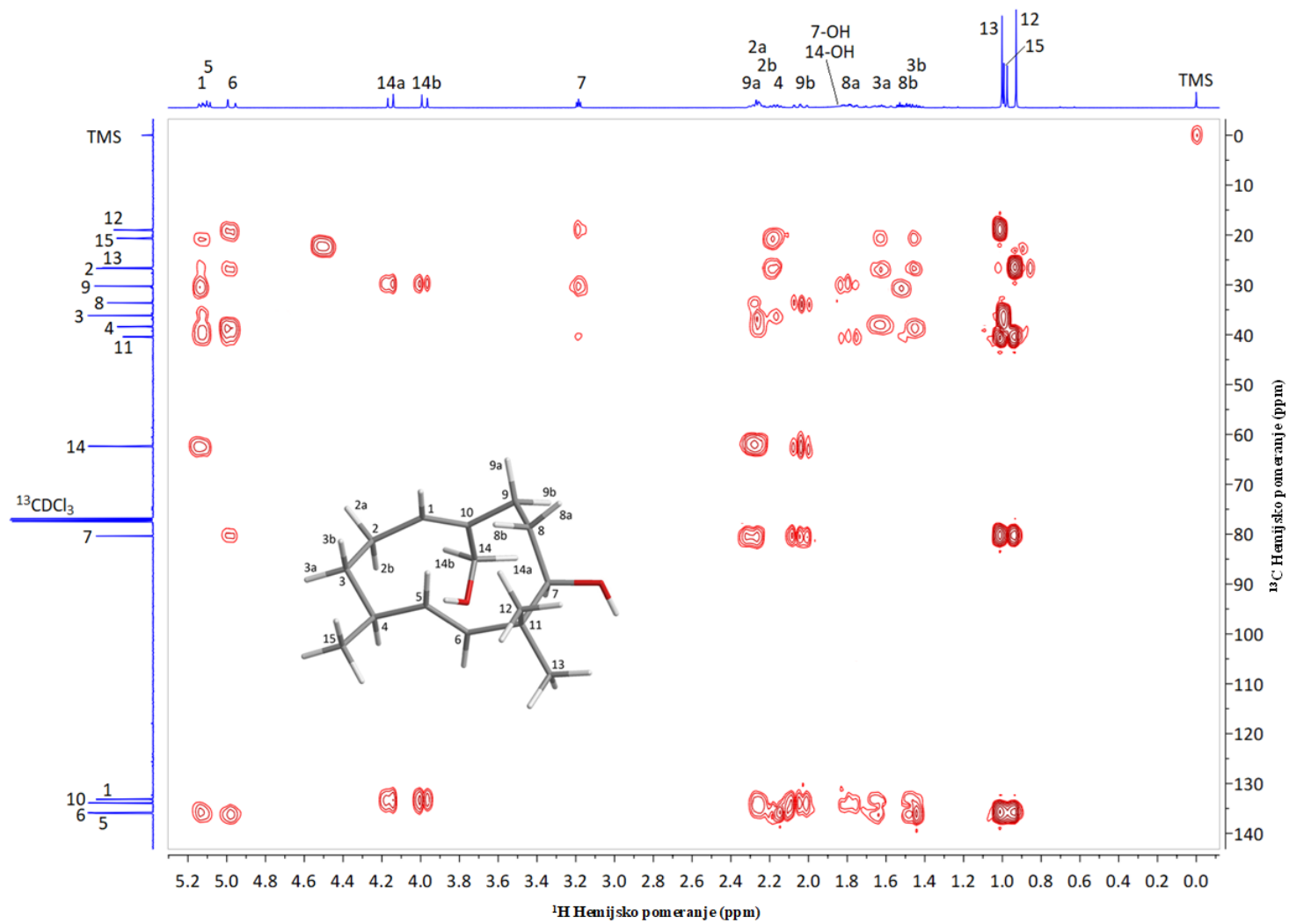
PRILOG 55. MASENI SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA



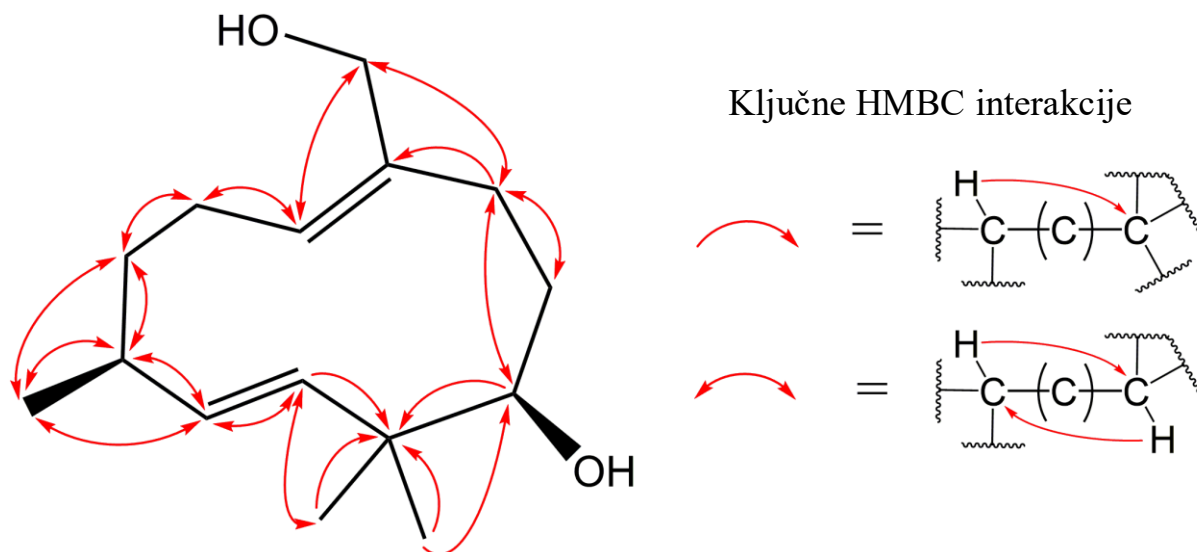
PRILOG 56. TIC HROMATOGRAM ETARSKOG ULJA *C. CONICUM* (GORNJA STRANA) SA OBELEŽENIM PIKOM GEOZMINA; POREĐENJE MASENOG SKENA PIKA I MASENOG SPEKTRA GEOZMINA IZ LITERATURE (DONJA STRANA)



PRILOG 57. gHMBC SPEKTAR *rel*-(1(10)*Z*,4*S*,5*E*,7*R*)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA



PRILOG 58. KLJUČNE gHMBC INTERAKCIJE *rel*-(1(10)Z,4S,5E,7R)-HUMULA-1(10),5-DIEN-7,14-DIOLA



PRILOG 59. DETALJI OPTIMIZACIJE GEOMETRIJE

izolepidozen-14-ol

Job type: Geometry optimization.
 Method: RB3LYP
 Basis set: 6-311++G(2DF,2P)
 Number of shells: 272
 Number of basis functions: 784
 Multiplicity: 1
 Parallel Job: 8 threads

SCF model:
 A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:
 Step Energy Max Grad. Max Dist.
 1 -661.411272 0.011226 0.042353
 2 -661.412375 0.003508 0.053228
 3 -661.412388 0.002247 0.034053
 4 -661.412466 0.000684 0.013919
 5 -661.412472 0.000339 0.008775
 6 -661.412474 0.000112 0.003577
 7 **-661.412474** 0.000066 0.001484

Reason for exit: Successful completion
 Quantum Calculation CPU Time: 4:42:50.55
 Quantum Calculation Wall Time: 5:44:51.86

Cartesian Coordinates (Angstroms)
 Atom X Y Z

```
-----
1 C C 1.9878053 2.2584755 -0.5935634
2 C C 0.8453276 1.9734344 0.3489075
```

```

3 C C -0.3367346 1.6197001 -0.1763037
4 C C -1.2320215 0.5857084 0.3707105
5 C C 1.7982782 -0.1853447 -1.2917464
6 C C 2.7478606 0.9134543 -0.8901732
7 C C -1.5459468 -0.5278265 -0.6312371
8 C C -1.0601931 -1.9471874 -0.4336212
9 C C 0.3125907 -2.1781999 -1.1359965
10 C C 1.4689298 -1.3171271 -0.6536557
11 C C -2.6696900 0.2333651 0.0304074
12 C C -3.4766892 -0.4290833 1.1296609
13 C C -3.4900620 1.1679935 -0.8362302
14 C C 1.2125079 1.8009171 1.7973262
15 C C 2.1945560 -1.8147867 0.5720903
16 O O 1.3900553 -1.8401007 1.7597214
17 H H 2.7051925 2.9799096 -0.1940119
18 H H 1.6072332 2.6619139 -1.5338942
19 H H -0.4896541 1.8465148 -1.2268167
20 H H -0.9420640 0.2141243 1.3451909
21 H H 1.2376940 0.0388543 -2.1964679
22 H H 3.4668433 1.1037455 -1.6918571
23 H H 3.3301695 0.6363207 -0.0128056
24 H H -1.3970789 -0.1983884 -1.6554136
25 H H -1.7689875 -2.6563576 -0.8735479
26 H H -0.9786897 -2.1941666 0.6234510
27 H H 0.1685908 -2.0083343 -2.2058522
28 H H 0.5735355 -3.2335328 -1.0198033
29 H H -2.8682678 -1.0919852 1.7442429
30 H H -4.2912638 -1.0230652 0.7082587
31 H H -3.9229254 0.3192324 1.7887144
32 H H -4.3098765 0.6299393 -1.3182080
33 H H -2.8929154 1.6311814 -1.6207792
34 H H -3.9261719 1.9682335 -0.2341221
35 H H 1.6082287 2.7398993 2.1944831
36 H H 0.3614857 1.5246363 2.4171773
37 H H 2.0067241 1.0607312 1.9472045
38 H H 3.1125522 -1.2511147 0.7499886
39 H H 2.4846803 -2.8557474 0.4176637
40 H H 1.1584073 -0.9340218 1.9829075

```

Protonovan izolepidozen-14-ol

Job type: Geometry optimization.
Method: RB3LYP
Basis set: 6-311++G(2DF,2P)
Number of shells: 278
Number of basis functions: 794
Charge: +1
Multiplicity: 1
Parallel Job: 8 threads

SCF model:
A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step	Energy	Max Grad.	Max Dist.
1	-661.780549	0.008484	0.137650
2	-661.782238	0.001344	0.029477
3	-661.782287	0.001254	0.032237
4	-661.782336	0.001096	0.207226
5	-661.782589	0.000500	0.213475
6	-661.782658	0.000688	0.037399
7	-661.782676	0.000411	0.012021
8	-661.782678	0.000239	0.035442
9	-661.782686	0.000242	0.086265
10	-661.782699	0.000444	0.178360
11	-661.782752	0.000738	0.202994
12	-661.782866	0.000931	0.205563
13	-661.783118	0.000811	0.216515
14	-661.783497	0.001028	0.201759
15	-661.783854	0.001594	0.218436
16	-661.784325	0.002172	0.210756
17	-661.784898	0.001673	0.204673
18	-661.785316	0.001421	0.181503

```

19 -661.785655 0.000935 0.152742
20 -661.785845 0.001367 0.124474
21 -661.785986 0.000722 0.136070
22 -661.786074 0.000922 0.122771
23 -661.786201 0.001277 0.114680
24 -661.786319 0.001587 0.123804
25 -661.786410 0.000965 0.079746
26 -661.786425 0.000863 0.043935
27 -661.786446 0.000354 0.017679
28 -661.786450 0.000286 0.036161
29 -661.786458 0.000234 0.079461
30 -661.786478 0.000270 0.106896 1
31 -661.786202 0.003058 0.097979
32 -661.786578 0.000443 0.128713
33 -661.786703 0.000914 0.114967 1
34 -661.784375 0.017178 0.090286
35 -661.786793 0.000679 0.123355
36 -661.786998 0.000822 0.126662 1
37 -661.787377 0.001480 0.105720 1
38 -661.786900 0.007338 0.110928
39 -661.788052 0.004677 0.122186
40 -661.788948 0.003221 0.125527
41 -661.789850 0.002123 0.126855
42 -661.790704 0.001566 0.126805
43 -661.791399 0.002778 0.127945
44 -661.791968 0.003360 0.106240
45 -661.792340 0.005311 0.112435
46 -661.792578 0.004092 0.069091
47 -661.792893 0.003564 0.049396
48 -661.793220 0.001900 0.053350
49 -661.793347 0.002117 0.059582
50 -661.793459 0.001379 0.016939
51 -661.793488 0.000391 0.017382
52 -661.793499 0.000217 0.011241
53 -661.793502 0.000154 0.002267
54 -661.793501 0.000065 0.001947

```

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time: 40:37:53.22
Quantum Calculation Wall Time: 42:36:31.91

Cartesian Coordinates (Angstroms)

Atom X Y Z

```

-----
1 C C1 1.3306241 2.6511438 -0.6764010
2 C C2 0.1483771 2.4230262 0.3261715
3 C C3 -0.8370381 1.4511823 -0.2060092
4 H H1 -1.3025724 1.7410937 -1.1429465
5 C C4 -1.2263238 0.2762708 0.3673584
6 C C5 1.7261194 0.2370693 -1.2590860
7 C C6 2.3557059 1.5033652 -0.7672479
8 C C7 -1.5068163 -0.9456750 -0.7589445
9 C C8 -0.6415454 -2.1587946 -0.5884181
10 C C9 0.7602696 -2.0365817 -1.2421755
11 C C10 1.6251848 -0.9489799 -0.6490206
12 C C11 -2.6058142 -0.5041740 0.0618762
13 C C12 -3.0437338 -1.3029311 1.2734942
14 C C13 -3.7185696 0.2972994 -0.5843468
15 C C14 0.6014227 2.1844979 1.7662232
16 C C15 2.3176419 -1.2765689 0.6477488
17 O O1 1.3342595 -1.4050999 1.6934654
18 H H2 1.8385150 3.5618938 -0.3592988
19 H H3 0.9224378 2.8557241 -1.6690477
20 H H4 -0.7203096 -0.0764501 1.2515553
21 H H5 1.2469044 0.3327731 -2.2322658
22 H H6 3.1321060 1.8274400 -1.4660232
23 H H7 2.8470675 1.3668861 0.1936487
24 H H8 -1.4932219 -0.5298497 -1.7601998
25 H H9 -1.1741136 -2.9704131 -1.0976468
26 H H10 -0.5523608 -2.4444629 0.4555122
27 H H11 0.6324331 -1.8581234 -2.3114063
28 H H12 1.2502502 -3.0067946 -1.1427676
29 H H13 -2.2180138 -1.8031440 1.7720691
30 H H14 -3.7596077 -2.0633888 0.9572678
31 H H15 -3.5408948 -0.6552117 1.9937350

```

```

32 H H16 -4.5018298 -0.3898016 -0.9079672
33 H H17 -3.3929468 0.8508084 -1.4633567
34 H H18 -4.1598167 0.9943255 0.1263278
35 H H19 -0.2485611 2.1798570 2.4486204
36 H H20 1.1287389 1.2404172 1.8877495
37 H H21 1.2674632 2.9870395 2.0798256
38 H H22 3.0492145 -0.5141312 0.9143867
39 H H23 2.8539013 -2.2231519 0.5288876
40 H H24 1.7531378 -1.7885496 2.4702486
41 H H25 -0.4035364 3.3746852 0.2871759

```

rel-(1(10)Z,4S,5E,7R)-Germakra-1(10),5-dien-11,14-diol, konformer 1

Job type: Geometry optimization.
Method: RB3LYP
Basis set: 6-311++G(2DF,2P)
Number of shells: 292
Number of basis functions: 838
Multiplicity: 1
Parallel Job: 8 threads

SCF model:
A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:
Step Energy Max Grad. Max Dist.
1 -737.904631 0.009725 0.038350
2 -737.905686 0.001066 0.005138
3 -737.905691 0.000959 0.004822
4 -737.905697 0.000862 0.085019
5 -737.905725 0.000269 0.062654
6 -737.905724 0.000520 0.029364
7 -737.905725 0.000068 0.006591
8 -737.905727 0.000068 0.002221
9 **-737.905728** 0.000044 0.002294

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time: 7:02:34.03
Quantum Calculation Wall Time: 7:48:26.34

Cartesian Coordinates (Angstroms)
Atom X Y Z

1 C C 2.8423374 1.6940517 -0.8308744
2 C C1 1.6770558 2.2242942 0.0565012
3 C C2 0.3704755 1.6435520 -0.4268100
4 C C3 -0.3871872 0.7485539 0.1999436
5 C C4 2.0171592 -0.6671379 -1.2084032
6 C C5 3.1722464 0.1814412 -0.7592945
7 C C6 -1.4735807 -0.0642670 -0.4620958
8 C C7 -1.1908834 -1.5781380 -0.2994772
9 C C8 0.0457163 -2.1420250 -1.0556620
10 C C9 1.4002315 -1.6657363 -0.5720439
11 C C10 -2.9017992 0.3574997 0.0183515
12 C C11 -3.1370319 0.0919514 1.5107015
13 C C12 -3.9985926 -0.3000842 -0.8175284
14 C C13 1.9507012 2.0286644 1.5482751
15 C C14 1.9684057 -2.3097849 0.6689433
16 O O 1.3638557 -1.8903203 1.9061020
17 H H 3.7448510 2.2493873 -0.5639141
18 H H1 2.6251089 1.9498722 -1.8721344
19 H H2 -0.1325637 0.4611319 1.2141330
20 H H3 0.1294275 1.8825033 -1.4607910
21 H H4 1.5532482 -0.3168316 -2.1274542
22 H H5 4.0387992 0.0162706 -1.4086935
23 H H6 3.4886223 -0.0824660 0.2492951
24 H H7 -1.4574086 0.1670967 -1.5318272
25 H H8 -2.0558387 -2.1316815 -0.6663508
26 H H9 -1.1126480 -1.8114435 0.7638475
27 H H10 -0.0615112 -1.8910995 -2.1134733
28 H H11 -0.0078412 -3.2340147 -0.9909875
29 H H12 -4.1124975 0.4856980 1.7946457


```

30 H H13 -2.3856542 0.5896993 2.1240929
31 H H14 -3.1206530 -0.9732220 1.7469795
32 H H15 -3.8225927 -0.1362204 -1.8809506
33 H H16 -4.9590246 0.1479999 -0.5639059
34 H H17 -4.0683589 -1.3708015 -0.6327567
35 H H18 2.8974245 2.4963047 1.8226626
36 H H19 1.1671049 2.4869866 2.1526559
37 H H20 2.0065490 0.9763916 1.8255602
38 H H21 3.0236694 -2.0718199 0.7740549
39 H H22 1.8945475 -3.3989637 0.5765219
40 H H23 0.5489064 -2.3782242 2.0434471
41 H H25 1.6481147 3.3035633 -0.1345053
42 O O1 -3.0554889 1.7622821 -0.2343991
43 H H24 -2.2573120 2.2117082 0.0688969

```

rel-(1(10)Z,4S,5E,7R)-Germakra-1(10),5-dien-11,14-diol, konformer 2

Job type: Geometry optimization.
Method: RB3LYP
Basis set: 6-311++G(2DF,2P)
Number of shells: 292
Number of basis functions: 838
Multiplicity: 1
Parallel Job: 8 threads

SCF model:
A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:
Step Energy Max Grad. Max Dist.
1 -737.902016 0.009468 0.038169
2 -737.903069 0.002080 0.051471
3 -737.903122 0.001006 0.010235
4 -737.903136 0.000489 0.030608
5 -737.903150 0.000216 0.013484
6 **-737.903149** 0.000114 0.012041

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time: 5:07:23.13
Quantum Calculation Wall Time: 9:25:08.19

Cartesian Coordinates (Angstroms)
Atom X Y Z

```

-----
1 C C 3.2833069 0.8190103 -0.7330323
2 C C1 2.2774670 1.8491244 -0.1368692
3 C C2 0.9019374 1.6714738 -0.7427256
4 C C3 -0.1248920 1.0642284 -0.1607664
5 C C4 1.8231506 -1.2417080 -0.8987271
6 C C5 3.1081218 -0.6774757 -0.3642775
7 C C6 -1.3706774 0.5778923 -0.8673900
8 C C7 -1.0958328 -0.7463413 -1.6478186
9 C C8 -0.5492372 -1.9885920 -0.9056581
10 C C9 0.8189023 -1.8275867 -0.2470524
11 C C10 -2.6064738 0.5559829 0.0722672
12 C C11 -3.8769826 0.0900986 -0.6449342
13 C C12 -2.8353835 1.9452754 0.6756715
14 C C13 2.3025650 1.8535952 1.3946094
15 C C14 0.9121473 -2.2857478 1.1871768
16 O O 0.2384833 -1.4417232 2.1239141
17 H H 4.2864018 1.1228946 -0.4210619
18 H H1 3.2665038 0.9098100 -1.8232788
19 H H2 -0.0185512 0.7458596 0.8671182
20 H H3 0.8264337 1.9507284 -1.7930162
21 H H4 1.6547083 -0.9921343 -1.9435908
22 H H5 3.9643401 -1.2086460 -0.7943472
23 H H6 3.1790757 -0.8038888 0.7149755
24 H H7 -1.6275494 1.3052121 -1.6438802
25 H H8 -0.3959834 -0.4808906 -2.4416325
26 H H9 -2.0129146 -1.0420339 -2.1599927
27 H H10 -0.5165832 -2.8071799 -1.6324272
28 H H11 -1.2707034 -2.3005333 -0.1502968
29 H H12 -4.7343655 0.1618241 0.0274256
30 H H13 -3.7955835 -0.9450091 -0.9685844

```

```

31 H H14 -4.0908093 0.7108831 -1.5164617
32 H H15 -1.9610589 2.2800609 1.2296341
33 H H16 -3.6915223 1.9302034 1.3544551
34 H H17 -3.0452429 2.6776272 -0.1045075
35 H H18 3.3174256 2.0367021 1.7522201
36 H H19 1.6624947 2.6432733 1.7897072
37 H H20 1.9650382 0.9123096 1.8266693
38 H H21 1.9466799 -2.3287571 1.5200987
39 H H22 0.5119625 -3.3067883 1.2557663
40 H H23 -0.6428105 -1.2176351 1.7921022
41 H H25 2.6501330 2.8257060 -0.4667353
42 O O1 -2.3141588 -0.3790278 1.1426725
43 H H24 -2.9973461 -0.3043988 1.8157781

```

rel-(1(10)Z,4S,5E,7R)-Humula-1(10),5-dien-7,14-diol, konformer 1

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-311++G(2DF,2P)

Number of shells: 292

Number of basis functions: 838

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

```

Step Energy Max Grad. Max Dist.
1 -737.905275 0.009528 0.041760
2 -737.906146 0.002837 0.054045
3 -737.906279 0.001773 0.012905
4 -737.906303 0.000589 0.010253
5 -737.906307 0.000423 0.004686
6 -737.906309 0.000131 0.003997
7 -737.906312 0.000091 0.002814
8 -737.906312 0.000101 0.001247

```

Reason for exit: Successful completion

Quantum Calculation CPU Time: 6:36:11.52

Quantum Calculation Wall Time: 7:26:31.56

Cartesian Coordinates (Angstroms)

Atom X Y Z

```

-----
1 C C 3.1587983 0.3579402 0.5273177
2 C C 2.3644539 1.3555740 -0.3474319
3 C C 0.9509921 1.5630090 0.1367381
4 C C -0.1432039 1.2800844 -0.5607992
5 C C 1.3986450 -1.4329249 0.9264962
6 C C 2.7760364 -1.1317846 0.4087136
7 C C -2.1235887 -0.0813710 0.0629339
8 C C -1.5767330 -0.8100034 1.3038010
9 C C -0.9642318 -2.1965387 1.0238573
10 C C 0.4212668 -2.1665073 0.3886375
11 C C 0.5931841 -2.9698785 -0.8727758
12 O O -0.1994268 -2.4801210 -1.9657646
13 C C -1.5944708 1.3854698 -0.1485402
14 C C -2.3643871 2.0169447 -1.3280354
15 C C -1.8215287 2.2476111 1.0986981
16 H H -3.9505173 0.0380034 -0.6751019
17 H H 2.3185587 0.9495748 -1.3636666
18 H H 4.2160744 0.4508350 0.2670379
19 H H 3.0791285 0.6653257 1.5754770
20 C C 3.1042007 2.7028207 -0.4045034
21 H H 0.8604579 1.9788718 1.1371295
22 H H -1.8453861 -0.6463443 -0.8320087
23 H H 1.1724368 -0.9205668 1.8589463
24 H H 2.8912912 -1.4558050 -0.6269195
25 H H 3.5147490 -1.6991611 0.9860917

```

```

26 O O -3.5539110 -0.1166938 0.1856730
27 H H -0.8426285 -0.1961410 1.8193836
28 H H -2.4156839 -0.9261565 1.9906457
29 H H -1.6432089 -2.7607947 0.3823373
30 H H -0.9109613 -2.7465030 1.9677869
31 H H 1.6419277 -3.0351691 -1.1683607
32 H H 0.2389833 -3.9895302 -0.7115665
33 H H 0.0907338 -1.5853434 -2.1644208
34 H H -3.4180511 2.1545250 -1.0846705
35 H H -2.2932356 1.3988747 -2.2267400
36 H H -1.9525044 2.9967831 -1.5699815
37 H H -1.5297764 3.2815225 0.9092539
38 H H -1.2556974 1.9006228 1.9619158
39 H H -2.8767335 2.2348442 1.3697631
40 H H -0.0022687 0.8671264 -1.5593278
41 H H 2.5804614 3.4096055 -1.0480988
42 H H 4.1190082 2.5795223 -0.7860703
43 H H 3.1741091 3.1492355 0.5901131

```

rel-(1(10)Z,4S,5E,7R)-Humula-1(10),5-dien-7,14-diol, konformer 2

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-311++G(2DF,2P)

Number of shells: 292

Number of basis functions: 838

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

```

1 -737.904127 0.009053 0.056478
2 -737.905289 0.001688 0.044838
3 -737.905384 0.000904 0.015251
4 -737.905401 0.000593 0.038419
5 -737.905411 0.000241 0.031234
6 -737.905413 0.000140 0.012871
7 -737.905414 0.000074 0.002199
8 -737.905415 0.000027 0.001427

```

Reason for exit: Successful completion

Quantum Calculation CPU Time: 6:24:02.25

Quantum Calculation Wall Time: 6:34:33.51

Cartesian Coordinates (Angstroms)

Atom X Y Z

```

-----
1 C C -2.1149232 -2.0651150 0.6664467
2 C C1 -1.0678277 -2.3439733 -0.4381439
3 C C2 0.2954592 -1.8089855 -0.0806941
4 C C3 0.9229164 -0.8132530 -0.6999293
5 C C4 -1.7605231 0.4452806 1.0199900
6 C C5 -2.7286442 -0.6491844 0.6743877
7 C C6 2.0086435 1.0021903 0.6761115
8 C C7 1.1620213 2.2071171 0.1544207
9 C C8 -0.2465979 2.4044701 0.7628663
10 C C9 -1.3093834 1.4500865 0.2628032
11 C C10 -1.8057819 1.7219099 -1.1349028
12 O O -2.5400284 2.9505013 -1.2177035
13 C C11 2.2485240 -0.1841882 -0.3308858
14 C C12 2.9426977 0.3384098 -1.6013751
15 C C13 3.1990802 -1.1888834 0.3444177
16 H H 0.7165501 0.0288497 1.7492885
17 H H1 -1.4016349 -1.8461794 -1.3536652
18 H H2 -2.9385962 -2.7738932 0.5485928
19 H H3 -1.6724523 -2.2811861 1.6442915
20 C C14 -0.9805862 -3.8532425 -0.7164413
21 H H4 0.7744847 -2.3136569 0.7557026
22 H H5 3.0049117 1.3839286 0.9079840
23 H H6 -1.3605005 0.3733451 2.0303668
24 H H7 -3.2069394 -0.4694776 -0.2889550

```

```

25 H H8 -3.5326319 -0.6472644 1.4177326
26 O O1 1.5295656 0.5167151 1.9231236
27 H H9 1.7237929 3.1167840 0.3739354
28 H H10 1.0883239 2.1719829 -0.9322121
29 H H11 -0.5572298 3.4220006 0.5159007
30 H H12 -0.1745228 2.3490043 1.8478444
31 H H13 -0.9690723 1.8590324 -1.8214459
32 H H14 -2.4073014 0.8978860 -1.5208126
33 H H15 -3.2513172 2.9206732 -0.5709317
34 H H16 3.8643552 0.8674122 -1.3516169
35 H H17 2.3123732 1.0166125 -2.1759819
36 H H18 3.2038608 -0.4946051 -2.2553338
37 H H19 3.3817744 -2.0402161 -0.3116844
38 H H20 2.8069137 -1.5562835 1.2889313
39 H H21 4.1579473 -0.7122932 0.5553506
40 H H22 0.4115190 -0.3438651 -1.5375034
41 H H23 -0.2480605 -4.0674350 -1.4946022
42 H H24 -1.9450397 -4.2505806 -1.0364815
43 H H25 -0.6791529 -4.3959803 0.1824109

```

Izolepidozen-14-al

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-311++G(2DF,2P)

Number of shells: 260

Number of basis functions: 764

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

```

Step Energy Max Grad. Max Dist.
1 -660.207574 0.010308 0.109583
2 -660.204999 0.033811 0.115843
3 -660.207001 0.010234 0.070956
4 -660.206921 0.011795 0.045471
5 -660.208551 0.001761 0.140846
6 -660.208203 0.012268 0.092564
7 -660.208562 0.000351 0.030772
8 -660.208565 0.000418 0.006707
9 -660.208566 0.000148 0.004043

```

Reason for exit: Successful completion

Quantum Calculation CPU Time: 6:41:27.42

Quantum Calculation Wall Time: 8:02:24.53

Cartesian Coordinates (Angstroms)

Atom X Y Z

```

-----
1 C C 1.9776361 2.3145043 -0.5071608
2 C C1 0.8200693 1.9983831 0.4076728
3 C C2 -0.3476740 1.6381704 -0.1449028
4 C C3 -1.2346244 0.5926894 0.3933917
5 C C4 1.8432029 -0.1201818 -1.1972405
6 C C5 2.7734122 0.9872260 -0.7809560
7 C C6 -1.5186762 -0.5322023 -0.6061715
8 C C7 -1.0082183 -1.9389483 -0.3845753
9 C C8 0.3733816 -2.1506015 -1.0678036
10 C C9 1.4867170 -1.2549157 -0.5614566
11 C C10 -2.6614818 0.2164669 0.0351293
12 C C11 -3.4763702 -0.4537498 1.1239308
13 C C12 -3.4826907 1.1313569 -0.8519182
14 C C13 1.1623323 1.7897316 1.8576043
15 H H 2.6699315 3.0489331 -0.0885263
16 H H1 1.6123097 2.7096934 -1.4568184
17 H H2 -0.4926094 1.8760051 -1.1942318
18 H H3 -0.9447161 0.2281379 1.3705754

```

```

19 H H4 1.3234498 0.0865868 -2.1297499
20 H H5 3.4937395 1.1778321 -1.5810850
21 H H6 3.3494508 0.7285803 0.1037689
22 H H7 -1.3638579 -0.2108409 -1.6324507
23 H H8 -1.6970503 -2.6715398 -0.8163986
24 H H9 -0.9301198 -2.1710277 0.6770181
25 H H10 0.2523586 -1.9889769 -2.1413194
26 H H11 0.6640308 -3.1916958 -0.9256749
27 H H12 -2.8652851 -1.0911603 1.7623421
28 H H13 -4.2634392 -1.0750695 0.6899614
29 H H14 -3.9584079 0.2908880 1.7613081
30 H H15 -4.2882235 0.5770038 -1.3394858
31 H H16 -2.8817749 1.5954385 -1.6333468
32 H H17 -3.9384079 1.9311656 -0.2639945
33 H H18 1.7067594 2.6568871 2.2400971
34 H H19 0.2789103 1.6574969 2.4774057
35 H H20 1.8133223 0.9240756 2.0169468
36 C C14 2.1441960 -1.6725760 0.6874155
37 H H22 2.9900386 -1.0517387 1.0291282
38 O O1 1.8253275 -2.6545235 1.3274051

```

Konocefalenol, konformer 1

```

Job type: Geometry optimization.
Method: RB3LYP
Basis set: 6-311++G(2DF,2P)
Number of shells: 284
Number of basis functions: 804
Multiplicity: 1
Parallel Job: 8 threads

```

```

SCF model:
A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

```

```

Optimization:
Step Energy Max Grad. Max Dist.
1 -662.698916 0.010579 0.088288
2 -662.695027 0.022376 0.064597
3 -662.699529 0.003420 0.010636
4 -662.699608 0.003328 0.012019
5 -662.699685 0.002613 0.005214
6 -662.699718 0.002140 0.004328
7 -662.699725 0.001577 0.003094
8 -662.699739 0.001236 0.002728
9 -662.699749 0.000938 0.002662
10 -662.699757 0.000749 0.002541
11 -662.699764 0.000630 0.002631
12 -662.699768 0.000593 0.002005
13 -662.699770 0.000573 0.002008
14 -662.699772 0.000538 0.002765
15 -662.699774 0.000467 0.004192
16 -662.699777 0.000362 0.005294
17 -662.699780 0.000417 0.005553
18 -662.699783 0.000417 0.005299
19 -662.699786 0.000343 0.004839
20 -662.699788 0.000353 0.003958
21 -662.699789 0.000350 0.002813
22 -662.699790 0.000337 0.001978
23 -662.699790 0.000316 0.001734
24 -662.699790 0.000288 0.001820

```

```

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time: 17:10:25.36
Quantum Calculation Wall Time: 20:14:29.41

```

```

Cartesian Coordinates (Angstroms)
Atom X Y Z
-----
1 C C1 0.4763966 -2.1536897 -0.0277059
2 C C2 -0.9009762 -1.4907449 0.1880241

```

```

3 C C3 -0.9855637 0.0071536 -0.0571662
4 C C4 0.1225789 0.7406635 -0.2303844
5 C C5 1.5199971 0.1442230 -0.1960173
6 C C6 1.5701205 -1.2090733 0.4962218
7 C C7 0.2719759 2.2564994 -0.3421584
8 C C8 1.7878386 2.5222402 -0.2366581
9 C C9 2.3737284 1.2668032 0.4244867
10 C C10 -2.3976581 0.6158033 0.0623037
11 C C11 -3.5089998 -0.3372705 -0.4058912
12 C C12 -2.6602307 1.0288762 1.5157059
13 O O13 -2.5229487 1.8298708 -0.6965903
14 C C14 3.8792365 1.1111196 0.2475836
15 C C15 0.5251916 -3.4759152 0.7490427
16 C C16 0.6824553 -2.4523971 -1.5242065
17 H H17 1.8729712 0.0260855 -1.2301840
18 H H18 -1.2311599 -1.6843768 1.2163403
19 H H19 -1.6230991 -2.0123133 -0.4425967
20 H H20 1.4249446 -1.0625014 1.5717253
21 H H21 2.5515224 -1.6748882 0.3715827
22 H H22 -0.1427304 2.6509151 -1.2681822
23 H H23 -0.2754144 2.7573206 0.4556434
24 H H24 2.0163151 3.4350864 0.3142286
25 H H25 2.2266767 2.6354554 -1.2322153
26 H H26 2.1454710 1.3005230 1.4967572
27 H H27 -4.4570700 0.1971772 -0.3713235
28 H H28 -3.3416733 -0.6677078 -1.4332689
29 H H29 -3.5911472 -1.2217988 0.2236922
30 H H30 -3.6609295 1.4510160 1.6128418
31 H H31 -1.9382551 1.7770877 1.8363320
32 H H32 -2.5816742 0.1685076 2.1794924
33 H H33 -2.3338343 1.6298194 -1.6183712
34 H H34 4.2561308 0.2064997 0.7269652
35 H H35 4.4146595 1.9577630 0.6811466
36 H H36 4.1433852 1.0623321 -0.8119005
37 H H37 0.4254561 -3.3037869 1.8222228
38 H H38 -0.2803981 -4.1462830 0.4417173
39 H H39 1.4708559 -3.9956161 0.5810612
40 H H40 -0.0294142 -3.2078530 -1.8623909
41 H H41 0.5412476 -1.5675106 -2.1444571
42 H H42 1.6873456 -2.8362999 -1.7125728

```

Konocefalenol, konformer 2

Job type: Geometry optimization.
Method: RB3LYP
Basis set: 6-311++G(2DF,2P)
Number of shells: 284
Number of basis functions: 804
Multiplicity: 1
Parallel Job: 8 threads

SCF model:
A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be
performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step	Energy	Max Grad.	Max Dist.
1	-662.698492	0.010545	0.097653
2	-662.697158	0.016245	0.078215
3	-662.698769	0.004341	0.031996
4	-662.698797	0.006278	0.020853
5	-662.699165	0.003310	0.008632
6	-662.699188	0.002866	0.022326
7	-662.699245	0.001673	0.004868
8	-662.699260	0.001493	0.004766
9	-662.699271	0.001323	0.004622
10	-662.699278	0.001182	0.004455
11	-662.699284	0.000970	0.001942
12	-662.699288	0.000756	0.002611
13	-662.699291	0.000548	0.003135
14	-662.699293	0.000519	0.002396
15	-662.699295	0.000523	0.002197
16	-662.699297	0.000518	0.002171
17	-662.699298	0.000494	0.002141
18	-662.699300	0.000454	0.001637

```

19 -662.699301 0.000404 0.001386
20 -662.699302 0.000352 0.002171
21 -662.699303 0.000309 0.002339
22 -662.699304 0.000283 0.002189

```

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time: 15:19:27.22
Quantum Calculation Wall Time: 18:24:11.91

Cartesian Coordinates (Angstroms)
Atom X Y Z

```

-----
1 C C1 0.4234454 -2.1411865 -0.0235400
2 C C2 -0.9287272 -1.4515879 0.2535697
3 C C3 -0.9806815 0.0587819 0.0794606
4 C C4 0.1431690 0.7705173 -0.0749217
5 C C5 1.5189305 0.1268236 -0.1269260
6 C C6 1.5545233 -1.2471646 0.5193999
7 C C7 0.3481840 2.2803257 -0.1791218
8 C C8 1.8771518 2.4761027 -0.2370434
9 C C9 2.4605054 1.2147777 0.4190637
10 C C10 -2.4021522 0.6499032 0.0689898
11 C C11 -2.9588490 0.6099510 -1.3586680
12 C C12 -3.3589164 -0.0802067 1.0270296
13 O O13 -2.4210752 2.0410408 0.4242892
14 C C14 3.9415782 0.9909864 0.1394899
15 C C15 0.4519144 -3.4972485 0.6938665
16 C C16 0.5909119 -2.3821119 -1.5348415
17 H H17 1.7898071 0.0117266 -1.1865153
18 H H18 -1.2327377 -1.6813199 1.2797776
19 H H19 -1.6890980 -1.9222130 -0.3778701
20 H H20 1.4340607 -1.1401733 1.6026113
21 H H21 2.5190158 -1.7352413 0.3548989
22 H H22 -0.1688224 2.7150857 -1.0338263
23 H H23 -0.0556760 2.7867877 0.6955426
24 H H24 2.1983024 3.3965408 0.2512178
25 H H25 2.2207811 2.5273016 -1.2741747
26 H H26 2.3099688 1.2834527 1.5036291
27 H H27 -3.9731429 1.0101387 -1.3768100
28 H H28 -2.3359518 1.2120177 -2.0185705
29 H H29 -2.9825017 -0.4098156 -1.7414785
30 H H30 -4.3228386 0.4262472 1.0044371
31 H H31 -2.9828517 -0.0532839 2.0523083
32 H H32 -3.5138518 -1.1225997 0.7554657
33 H H33 -2.1230050 2.1238510 1.3348895
34 H H34 4.3158046 0.0849558 0.6182124
35 H H35 4.5415305 1.8257908 0.5058792
36 H H36 4.1234359 0.8999312 -0.9341440
37 H H37 0.3880590 -3.3697382 1.7759090
38 H H38 -0.3835902 -4.1275260 0.3814923
39 H H39 1.3746381 -4.0386832 0.4749494
40 H H40 -0.1441496 -3.1089736 -1.8859855
41 H H41 0.4532026 -1.4715277 -2.1171296
42 H H42 1.5829608 -2.

```

9. BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA

Sonja Filipović rođena je 14. oktobra 1986. godine u Kruševcu. Osnovno obrazovanje stekla je u Osnovnoj školi „Vuk Karadžić“ u Kruševcu, gde je postigla značajne rezultate na međuokružnim takmičenjima iz biologije i srpskog jezika. Takođe, nosilac je Svetosavske nagrade kao jedan od najboljih đaka škola unutar opštine Kruševac. Paralelno sa osnovnim obrazovanjem, završila je Osnovnu muzičku školu „Stevan Hristić“ u Kruševcu, u klasi profesorke Javorke Jovanović, specijalizujući se za klavir. Svoje obrazovanje nastavila je u Gimnaziji u Kruševcu, na prirodno-matematičkom smeru.

Na Farmaceutski fakultet u Beogradu upisuje se 2005/2006. školske godine, a diplomski ispit pod nazivom „Aerозagađivači, osobine i značaj“ odbranila je 25.6.2013. godine pod mentorstvom profesorke Slađane Tanasković, sa ocenom 10 (deset).

Obavezni staž za magistre farmacije u trajanju od godinu dana, tokom šest meseci obavila je u „Apoteci Kedrović“ u sklopu Apotekarske ustanove Kruševac, gde se pored prodaje lekova i pomoćnih medicinskih sredstava bavila i magistralnom izradom lekova. Takođe, obavljen je i tromesečni staž u Galenskoj laboratoriji u Kruševcu, gde je bila angažovana na izradi i kontroli kvaliteta farmaceutskih preparata. Unutar Bolničke apoteke u okviru Opšte bolnice Kruševac, provela je tri meseca, gde se upoznala sa metodologijom rada i nabavke u ovoj oblasti farmaceutske delatnosti. Stručni ispit za diplomiranog farmaceuta položila je u oktobru 2014. godine pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravlja u Beogradu.

Školske 2013/2014. upisuje doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, na Departmanu za hemiju pod mentorstvom prof. dr Nika Radulovića. Oblast njenog istraživanja obuhvata polja organske hemije, biohemije, primenjene organske hemije, i biomedicine/biofarmacije. Od 2013. godine, angažovana je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološki aktivnim agensima“ (OI 172061). Jedno od potvrda uspešnosti njenog rada predstavlja nagrada dodeljena od strane organizacionog odbora međunarodne konferencije ISEO2016 (47th International Symposium on Essential Oils; septembar 2016, Nica, Francuska; organizator: Univerzitet *Sophia Antipolis*), kada je kao jedan od najboljih mladih istraživača nagrađena stipendijom IFEAT *Registration Fellowship*.

U naučno zvanje istraživač-pripravnik izabrana je 23.10.2013. godine od strane Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, dok je u naučno zvanje istraživač-saradnik izabrana 2016. godine. Od 2016. do 2018. godine, bila je saradnik u izvođenju laboratorijskih vežbi na obaveznom predmetu „Preparativna organska hemija“ na Osnovnim akademskim studijama, studijski program Hemija, unutar iste matične ustanove.

Od 2018. godine zasnovala je radni odnos asistent, na dva obavezna predmeta: „Organska hemija“ i „Biohemija“ u okviru studijskog programa Osnovnih akademskih studija: Stočarstvo, Ratarstvo i povrtarstvo i Voćarstvo i vinogradarstvo, i na izbornom predmetu „Štetne materije u poljoprivrednim proizvodima“ u okviru Poljoprivrednog fakulteta u Kruševcu, Univerziteta u Nišu. Studentski parlament joj je 2019. godine dodelio Zahvalnicu za izuzetno zalaganje u radu, pomoć studentima i doprinosu razvoja nastave Poljoprivrednog fakulteta u Kruševcu. Tokom 2019. godine završila je školu masene spektrometrije–*Instrumental Analytical Techniques in Environmental and Food Safety Control*–koju su organizovali Prirodno-matematički fakultet u Nišu i Université Pierre et Marie Curie (Pariz).

Autor je jednog, a koautor još 3 naučna rada objavljenih u međunarodnim časopisima. Takođe, autor je 2 rada i koautor još 7 radova u časopisima od nacionalnog značaja. Od 2016. godine učestvovala je na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima sa 22 saopštenja, uključujući i jedno predavanje po pozivu.

Rad objavljen u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)

- Radulović, N. S., **Filipović, S. I.**, Nešić, M. S., Stojanović, N. M., Mitić, K. V., Mladenović, M. Z., & Randelović, V. N. (2020). Immunomodulatory Constituents of *Conocephalum conicum* (Snake Liverwort) and the Relationship of Isolepidozenes to Germacrane and Humulanes. *Journal of Natural Products*, 83(12), 3554-3563
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00585>

Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

- Radulović, N. S., **Filipović, S. I.**, Zlatković, D. B., Đorđević, M. R., Stojanović, N. M., Randjelović, P. J., Mitić, K. V., Jevtović-Stoimenov, T. M. and Randelović, V. N. (2016). Immunomodulatory pinguiculate-type sesquiterpenes from the liverwort *Porella cordaeana* (Porellaceae): the “new old” furanopinguiculanol and its oxidation product exert mutually

different effects on rat splenocytes. RSC Advances, 6(48), 41847-41860
<https://doi.org/10.1039/C6RA04308A>

Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

- **Filipović, S. I.**, Stojanović, N. M., Mitić, K. V., Ranđelović, P. J., & Radulović, N. S. (2022). Revisiting the Effect of 3 Sesquiterpenoids from *Conocephalum conicum* (Snake Liverwort) on Rat Spleen Lymphocyte Viability and Membrane Functioning. *Natural Product Communications*, 17(8), 1934578X221119912. DOI: 10.1177/1934578X221119912

Rad objavljen u međunarodnom časopisu (M23)

- Djordjević, D. M., Radivojević, A. R., Pavlović, M. A., Djordjević, M. G., Stanković, M. N., Filipović, I. M., & **Filipović, S. I.** (2014). Preliminary geochemical investigation of karst barré from eastern Serbia Sokobanja basin. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(4), 771-776. ISSN:0324-1130 **(M23)**

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima nacionalnog značaja (M51)

- Vasić, T., Marković, J., Živković, S., **Filipović, S.**, & Jevremović, D. (2020). Mycopopulation of lavender in Serbia. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 23(5), 207-217. ISSN 1311-0489 (Print) ISSN 2367-8364 (Online) **(M51)**
- **Filipović, S.**, Vasić, T., Radulović, N., Stanojević, I., & Jevremović, D. (2020). Detailed GC-MS analysis of the *Salvia sclarea* L. essential oil and the first in vitro antifungal activity assessment against crop pathogen *Colletotrichum acutatum* JH Simmonds. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 23(4), 207-229. ISSN 1311-0489 (Print), ISSN 2367-8364 (Online) **(M51)**
- Živković, S., Vasić, T., Jevremović, D., & **Filipović, S.** (2020). Organic production of the pepper by using of cow manure and retort beach charcoal. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 23(1), 182-196. ISSN 1311-0489 (Print), ISSN (2367-8364) (Online) **(M51)**

Radovi objavljeni u istaknutim časopisima od nacionalnog značaja (M52)

- Stanojević, I., Glišić, B., Živković, S., **Filipović, S.**, Andjelković, S., & Vasić, T. (2020). Copper (II) compounds as effective agents against *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of strawberry. *Biologica Nyssana*, 11(2). DOI: 10.5281/zenodo.4393961 (M52)
- Vasić, T., Živković, S., Debasis, M., Stanojević, I., **Filipović, S.**, Anđelić, B., & Marković, J. (2020). Resistance to anthracnose (*Colletotrichum linicola*) on different cultivars of red clover (*Trifolium pratense*) in Serbia. *Biologica Nyssana*, 11(2). DOI: 10.5281/zenodo.4393965 (M52)
- Živković, S., Vasić, T., Mihajlović, B., Andjelković, S., Anđelić, B., Stanojević, I., & **Filipović, S.** (2020). Yield of the tomato farmed by organic principles in the greenhouse with the application of retort beach charcoal. *Biologica Nyssana*, 11(1). DOI: 10.5281/zenodo.4060302 (M52)
- **Filipović, S. I.**, Bijelić, A. B., Bogdanović, A. I., & Radulović, N. (2022). Pinguisane-type sesquiterpenoids, unique secondary metabolites of liverworts: A review. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*. DOI:/10.2298/FUPCT2201001F (M52)

Radovi objavljeni u nacionalnim časopisima (M53)

- Vasić, T., Živković, S., Marković, J., Stanojević, I., **Filipović, S.**, & Terzić, D. (2019). Phytopathogenic fungi causes fungal diseases of the faba bean (*Vicia faba* L.) in Serbia. *Biologica Nyssana*, 10(1). ISSN 2217-4478, DOI: 10.5281/zenodo.3463990
- Vasić, T., Jevremović, D., **Filipović, S.**, Marković, J., Živković, S., & Leposavić, A. (2021). Morfološka i patogena karakterizacija. *Biljni lekar*, 49(5), 585. DOI: 10.5937/BiljLek2105585V

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

- Ilić, R., Milošević, D., Stanojević, I., **Filipović, S.**, Milosavljević, M., Šljivić, M. & Vasić, T. (2019). Herbicide efficacy in controlling weeds in alfalfa. In *27th International*

Conference Ecological Truth and Environmental Research (pp. 445-449). Bor: University of Belgrade, Technical Faculty in Bor. ISBN 978-86-6305-097-6 (M33)

- **Filipović, S.**, Vasić, T., Radulović, N., Jevremović, D., & Stanojević, I. (2021). Detailed GC-MS analyses of the *Myrtus communis* L., essential oil and the antifungal activity assessment. In *Proceedings: 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, October 26-27, 2021 Kragujevac, Serbia* (pp. 276-279). Kragujevac: University of Kragujevac, Institute for Information Technologies. DOI: 10.46793/ICCBI21.276F (M33)
- **Filipović, S.**, & Radulović, N. (2021). Essential oil analysis of the *Micromeria juliana* (L.) Benth, from Luštica Montenegro. In *Proceedings: 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, October 26-27, 2021 Kragujevac, Serbia* (pp. 332-335). Kragujevac: University of Kragujevac, Institute for Information Technologies. DOI: 10.46793/ICCBI21.332F (M33)
- Vasić, T., Živković, S., Marković, J., **Filipović, S.** & Debasis, M. (2024). Phythopatogenic fungi on alfalfa in Serbia. *Book of Proceedings of XV International Scientific Agriculture Symposium »Agrosym 2024«, 10-13 October, Jahorina, Bosnia and Herzegovina* (pp. 667-672). ISBN 978-99976-816-8-3 (M33)
- Živković, S., Vasić, T., **Filipović, S.**, Vasiljević, B., Katanić, V., Jevremović, D., & Marković, J. (2024). Monitoring of germination ability of conidia of *Eutypa lata* fungus anamorphic stage isolated from grapevine in Serbia. In *Proceedings: 6th International Scientific Conference Modern Trends in Agricultural Production, Rural Development and Environmental Protection, June 27–28, Vrnjačka Banja, Serbia* (pp. 169-175). Belgrade: The Balkans Scientific Center of the Russian Academy of Natural Sciences. ISBN: 978-86-6042-005-5 (M33)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

- **Filipović, S.**, Radulović, N. S., Zlatković, D. B. Đorđević, M. & Randelović, V. (2016): The “new old” α -furanopinguisanol and its oxidation product from the essential oil of the liverwort *Porella cordaeana* (Hub.) Moore (Porellaceae), 47th International Symposium on Essential Oils (47th ISEO) (pp. 77). September 11-14, Nice, France. (M34)

- **Filipović, S.**, Radulović, N., Nešić, M. & Stevanović, M. (2016): What to do with old, auto-oxidized tetrahydrofuran? Simple, make a perfume out of it, 47th International Symposium on Essential Oils (47th ISEO) (pp. 78). September 11-14, Nice, France **(M34)**
- Stojanović, N. M. , Radulović, N. S. , **Filipović, S. I.** , Zlatković, D. B. , Đorđević, M. R., Randjelović, P. J. , Mitić, K. V., Jevtović-Stoimenov, T. M. & Randelović, V. N. (2016). Immunomodulatory activity of pinguisane-type sesquiterpenes from the essential oil of the liverwort *Porella cordaeana* (Hub.) Moore (Porellaceae), 47th International Symposium on Essential Oils (47th ISEO). Book of Abstracts, (pp. 139). September 11-14, Nice, France. **(M34)**
- Radulović, N., **Filipović, S.**, Zlatković, D., Đorđević, M., Stojanović, N., Randjelović, P., Mitić, K., Jevtović-Stoimenov T., & Randelović, V. (2016). Structural revision of α -furanopinguisanol, 18th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker User's Meeting. Book of abstracts (pp. 49). September 18-20, Sofia, Bulgaria. **(M34)**
- **Filipović, S.** & Radulović, N. (2016). Chemical composition of the leaf essential oil of *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) from Montenegro, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions. Book of Abstracts (pp. 102). June 16-19, Kopaonik, Serbia. ISBN 978-86-6875-055-61 **(M34)**
- Mladenović, M., Radulović, N., & **Filipović, S.** (2016): The essential oil of *Achillea ageratifolia* (Sm.) Boiss. subsp. *serbica* (Nyman) Heimerl (Asteraceae) revisited: structural elucidation and synthesis of (new) sabinyl esters, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions. Book of Abstracts (pp. 103). June 16-19, Kopaonik, Serbia. ISBN 978-86-6875-055-61 **(M34)**
- **Filipović, S.** & Radulović, N. (2017): The essential oil of *Myrtus communis* L. from Montenegro contains a cyclic polymethylated polyketide, 48th International Symposium on Essential Oils (ISEO2017), Book of Abstracts (pp. 78). September 10-13, Pécs, Hungary PP08, ISSN 2148-9637. **(M34)**
- **Filipović, S.** & Radulović, N. (2018): Brasilane sesquiterpenes, bioactive essential-oil constituents, 49th International Symposium on Essential Oils (49th ISEO), September 13-16, Niš, Serbia, FACTA UNIVERSITATIS Series: Physics, Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue, 2018, Book of Abstracts (pp. 117). PP53, ISSN 0354 - 4656 (Print), ISSN 2406 - 0879 (Online) . **(M34)**

- Todorovska, M. & **Filipović, S.** (2018): Endotoxin Elimination from Pharmaceutical Preparations, Inovation in Pharmacy: Advances and perspectives (IPAP18). Book of Abstracts (pp. 232). Salamanca, Spain. ISBN: 978-84-9012-976-0 (pdf) **(M34)**
- **Filipović, S.** & Todorovska, M. (2018): Information-analytical study on methods of preparing antioxidant drugs in a liposomal delivery system form, Inovation in Pharmacy: Advances and perspectives (IPAP18). Book of Abstracts (pp. 257). Salamanca, Spain. ISBN: 978-84-9012-976-0 (pdf) **(M34)**
- **Filipović, S.**, Radulović, N., & Mladenović, M. (2018): *Conocephalum conicum* (L.) Dum. biosensor of an environmental pollution with phytoremediation potential, In *8th Symposium Chemistry and Environmental Protection (with international participation)*, 30.5-01.06. 2018., Kruševac, Serbia (pp. 185-186). Srbija/Serbian Chemical Society, Karnegijeva 4/III, Belgrade, Serbia. ISBN 978-86-7132-068-9 **(M34)**
- **Filipović, S.** & Radulović, N. (2018): Liverworts as potent bioaccumulators of environmental heavy metals: A review, In *8th Symposium Chemistry and Environmental Protection (with international participation)*, 30.5-01.06. 2018., Kruševac, Serbia (pp. 183-184). Srbija/Serbian Chemical Society, Karnegijeva 4/III, Belgrade, Serbia. ISBN 978-86-7132-068-9 **(M34)**
- Vasić, T., **Filipović, S.**, Radulović, N. & Stević, M. (2019): Effect of essential oils of mountain savory, laurel and sage on growth of *Colletotrichum acutatum* mycelium originating from strawberries. VIII congres on plant protection: Integrated Plant Protection for Sustainable Crop Production and Forestry. Book of abstract (pp. 112-113). november 25-29, Zlatibor, Serbia. ISBN/MCKH: 978-86-83017-35-5 **(M34)**
- Radulović, N., **Filipović, S.**, Nešić, M., Mladenović, M. & Randelović, V. (2019). Three new sesquiterpene alcohols from the essential oil of the liverwort *Conocephalum conicum* (L.) Dum, Nat. Vol. & Essent. Oils, Volume 6 (special issue ISEO 2019), (pp. 161). ISSN 2148-9637 **(M34)**

Predavanje po pozivu sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M61)

- **Filipović, S.**, Stanojević, I., Jovanović, LJ., Vasić, T. & Živković S. (2019). Analysis of the, ethylenebis(dithiocarbamate) originated, imidazoline-2-thione toxodinamic profile:

pros and cons of pesticides, Sustainable management of chemicals (pp. 41-52). ISBN 978-86-80464-17-6.

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

- **Filipović, S.** & Radulović, N. (2016). Chemical composition of the leaf essential oil of sea fennel from Montenegro, Fourth Conference of Young Chemists of Serbia. Book of abstracts (pp.71). Belgrade, 5. november, Srbija. ISBN 978-86-7132-064-1. **(M64)**
- Radulović, N., **Filipović, S.**, Zlatković, D. & Đorđević, M., (2016). Revised stereochemistry of furanopinguisanol, Fourth Conference of Young Chemists of Serbia, Book of abstracts (pp. 31). Belgrade, 5. novembar, Srbija. ISBN 978-86-7132-064-1. **(M64)**

10. IZJAVE AUTORA

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ ВРСТА ЈЕТРЕЊАЧА РОДОВА *PORELLA* L. (*PORELLACEAE*) И *CONOCERPHALUM* HILL. (*CONOCERPHALACEAE*)

која је одбрањена на Природно-математичком факултету у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада
- да предложена дисертација, ни у целини ни у деловима није била предложена као основа за добијање било које дипломе на другим факултетима, нити универзитетима
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам користила ауторска права, нити злоупотребила 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, _____.

Потпис аутора дисертације:

Соња Филиповић

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

Наслов дисертације:

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ ВРСТА ЈЕТРЕЊАЧА РОДОВА *PORELLA* L.
(*PORELLACEAE*) И *CONOCERPHALUM* HILL. (*CONOCERPHALACEAE*)**

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

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Соња Филиповић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ ВРСТА ЈЕТРЕЊАЧА РОДОВА *PORELLA* L. (PORELLACEAE) И *CONOCERPHALUM* HILL. (CONOCERPHALACEAE)

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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, _____.

Потпис аутора дисертације:

Соња Филиповић