

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Љубодраг В. Вујисић

Идентификација одбрамбених супстанци  
одабраних врста стонога из класа  
Diplopoda и Chilopoda  
(Arthropoda, Myriapoda)

Докторска дисертација

Београд, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET



Ljubodrag V. Vujisić

Identifikacija odbrambenih supstanci  
odabranih vrsta stonoga iz klasa Diplopoda  
i Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda)

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Ljubodrag V. Vujisić

Identification of defensive substances from  
selected species of myriapod classes  
Diplopoda and Chilopoda  
(Arthropoda, Myriapoda)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

**Ментори:**

Др Веле Тешевић, ванредни професор  
Хемијског факултета, ментор

Др Слободан Макаров, ванредни професор  
Биолошког факултета, ментор

**Чланови комисије:**

Др Влатка Вајс, научни саветник  
ИХТМ–Центра за хемију

Др Владимир Павловић, редовни професор  
Хемијског факултета

Др Слободан Милосављевић,  
професор емеритус Хемијског факултета  
и дописни члан САНУ

**Датум одбране докторске дисертације:**

*Поштовани публикуме,*

*Пре него што наставимо, подсетићемо се дешавања из прошле епизоде. У прошлој епизоди наш јунак, трагајући за тајном названом „Три стране дневно“, успео је да пребороди све проблеме и препреке, али још није био стављен на коначни тест.*

*У епизоди која следи, присуствоваћете узбуђењима из најраније прошлости живог света на земљи, одвешћемо Вас у време пре 400 милиона година. То путовање су омогућили и финансијски помогли Министарство науке, кроз пројекте 172053 и 173038.*

*Овом приликом бих истакао своје менторе др Велета Тешевића и др Слободана Макарова и посебно им се захвалио на великој и несебичној помоћи коју су ми пружали током целокупног рада. Професорка Влатка Вајс и проф. др Слободан Милосављевић су својим искуством, знањем и добротом добринели да ни највећи изазови не буду тежки и несавладиви. Квалитету ове дисертације, у многоме је допринео проф. др Владимир Павловић, са својим стрпљивим и прецизним коментарима, на чему сам му захвалан. Бројне идеје и дилеме пристизале су од др Ивана–Кума Вучковића и постале саставни део ове дисертације. Без колега са одељења за инструменталну анализу: др Нине Тодоровић, Данице Бајић, Бобана Аранђеловића, др Дејана Гођевића, Дејана Вучетића, др Ирис Ђорђевић, мр Бориса Мандића, др Бориса Пејина, др Нене Баји, мр Мирослава Новаковића, др Снежке Трифуновић, Драгице Павличевић, Неде Ђорђевић, Маријане Живковић, а посебно без мр Милке Јадранин и Марине Тодосијевић, не би било могуће остваривање оваквог једног дугорочног циља. Електрофорезе, шац методе потврде протеинске природе секрета урадио је др Ненад Милосавић, на чему му се овом приликом захваљујем. Такође, захваљујем се свим колегама са факултета, на сарадњи и размевању. Сервисерима из ДСП-а и Драгољубу – Шелету Шестићу овом приликом изражавам велику захвалност на одличној сарадњи током дугог низа година.*

*С друге стране (парка), вредно су радиле и помагале колеге са Института за Зоологију Биолошког факултета: млади доцент – др Бојан Митић и студенти докторских студија, који су помогли у прикупљању и идентификацији материјала, фотографисању, дисекцијама: Драган Антић, Бојан Илић и Татјана Секулић. Свима њима се овом приликом захваљујем.*

*Разредној – Ружици Никодијевић, овом приликом се захваљујем на развијању љубави према хемији као експерименталној науци.*

*С друге стране (Дунава), безграничну љубав, радост до суза, срећу и подршку прижили су ми моји најмилији, деца и супруга. Такође, у нади да ћемо сви дочекати његове године, посебно бих се захвалио свом деди, Миодрагу - Цакану Б. Гачићу, који ми је у животу служио и служи као велики подстрек и инспирација.*

*На крају, поменућу и ЉУДЕ које смо изгубили, а од којих сам много научио: професора др Рада Марковића и асистента мр Дејана Ђоковића, наравно и ћалета, Веселина Радула Вујисића, човека без кога би се „Љубав“ писала тако обично, док је с њим све било тако необично. Поштење, доброту, ведар дух и љубав према животу наследио сам од њега.*

*Аутор*

## Идентификација одбрамбених супстанци одабраних врста стонога из класа *Diplopoda* и *Chilopoda* (*Arthropoda*, *Myriapoda*)

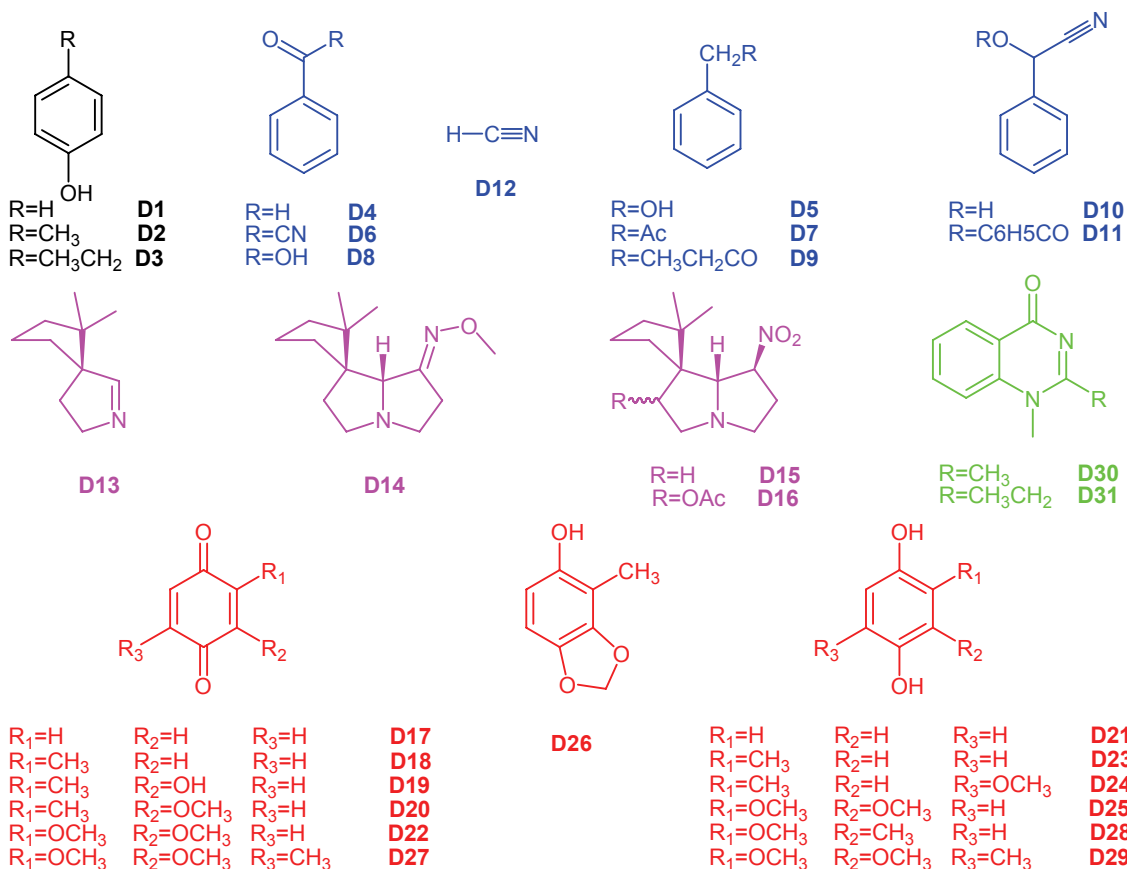
### Резиме:

Субфилум *Myriapoda* представља веома значајну групу земљишних зглавкара која се састоји од четири класе: *Chilopoda*, *Diplopoda*, *Paupoda* и *Symphyla*. Досадашња испитивања одбрамбених супстанци код стонога поглавито су била везана са представнике класе *Diplopoda*, као најбројнијих стонога, док су подаци за остале класе *Myriapoda* веома оскудни. Генерално, досадашњи резултати су показали велику разноврсност одбрамбених једињења која могу бити гасовите супстанце, попут цијановодоника, али и ароматична једињења, алкалоиди, па чак и протеини.

У оквиру ове дисертације испитиван је састав одбрамбених секрета петнаест врста *Diplopoda* и шест врста *Chilopoda* уз помоћ савремених инструменталних метода, међу којима су GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS и NMR ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, NOESY, DOSY, HSQC, HMBC,  $^{15}\text{N}$  HSQC и  $^{15}\text{N}$  HMBC). Протеински део секрета је анализиран електрофорезом.

Анализиране диплоподне врсте припадају редовима *Callipodida*, *Polydesmida*, *Polyzoniida*, *Julida* и *Glomerida*. Из реда *Callipodida* анализиране су две врсте *Apfelbeckia insculpta* и *Callipodella fasciata*. Обе врсте припадају фамилији *Schizopetalidae* и у одбрамбеном секрету садрже *napa*-крезол (**D2**) као главно одбрамбено једињење, а фенол (**D1**) и *napa*-етил фенол (**D3**) у траговима. Из реда *Polydesmida* анализиран је одбрамбени секрет четири врсте: *Polydesmus complanatus*, *Brachydesmus avalae*, *B. dadayii* и *B. troglobius* и идентификовано је 9 одбрамбених једињења (**D4–D12**). Све четири врсте припадају фамилији *Polydesmidae*. Из реда *Polyzoniida* анализирани је одбрамбени секрет врсте *Polyzonium germanicum* чији ареал обухвата и простор Балканског полуострва. Са хемоеколошког аспекта ова врста је интересантна јер као одбрамбена једињења производи неколико алкалоида. Главно одбрамбено једињење је полизонимин (**D13**), док су у секрету регистровани и спирополизидин *O*-метилоксим (**D14**), нитрополисонамин (**D15**), као и ново једињење, 7-ацетокси-нитрополисонамин (**D16**). Из реда *Julida* испитивано је укупно шест врста које припадају фамилији *Julidae*: *Julus terrestris*, *Cylindroiulus boleti*, *Leptoiulus trilineatus*, *Megaphyllum bosniense*, *M. austriacum* и *M. unilineatum*. Укупно је идентификовано тринаест бензохинонских деривата **D17–29**. Поред хинонских деривата у одбрамбеним

секретима испитиваних врста јулида пронађене су и нехинонске компоненте као што су бутил- и хексил-естри масних киселина.



Идентификоване одбрамбене супстанце код *Diploroda* из редова:

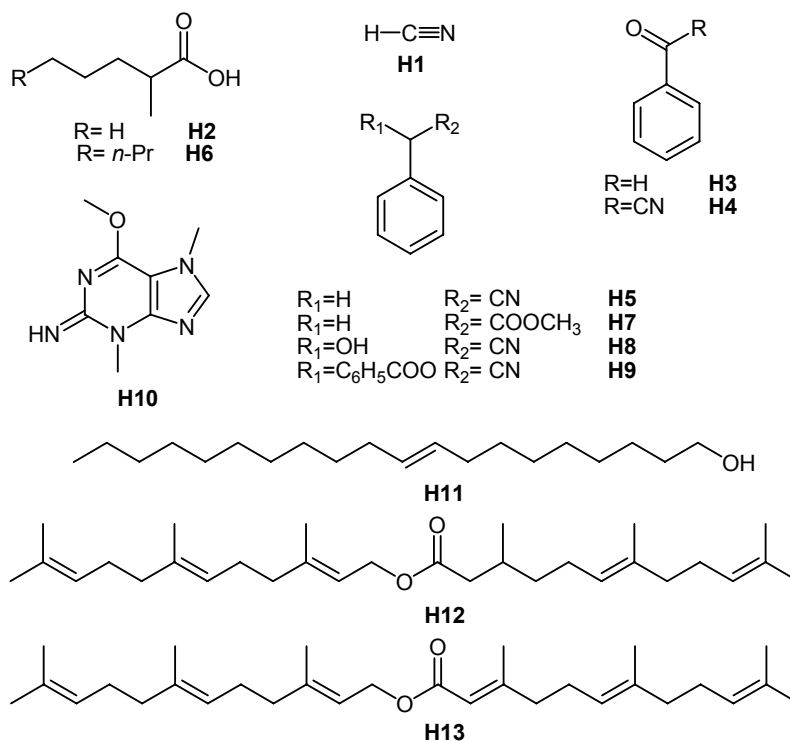
*Callipodida*, *Polydesmida*, *Polyzoniida*, *Julida* u *Glomerida*.

Из реда *Glomerida* испитиване су две врсте и то: *Glomeris klugii* и *Onychoglomeris herzegowinensis*. Замимљиво је поменути да је *O. herzegowinensis* једина врста која је анализирана из Збирке Института за зоологију Биолошког факултета Универзитета у Београду, зато што нисмо могли да дођемо до живог материјала. Из одбрамбеног секрета *G. klugii* идентификовани су алкалоиди гломерин (**D30**) и хомогломерин (**D31**), док су анализом протеинског дела секрета уз помоћ електрофорезе раздвојена два протеина са молекулским масама од око 20 kDa и око 116 kDa. Дисекцијом одбрамбених жлезда из *O. herzegowinensis* у прелиминарним бојеним тестовима потврђено је присуство протеинске компоненте, док је количина растворених протеина била недовољна за добијање квалитетног електрофореграма.

На основу резултата ове дисертације потврђено је постојање цијаногенезе код Polydesmida. Такође је потврђено да се калиподиде могу сврстати у крезолну кладу стонога, јулиде у хинонску кладу, а полизониде и гломериде у алкалоидну кладу стонога.

Анализиране хилоподне врсте припадају редовима Lithobiomorpha, Scolopendromorpha и Geophilomorpha. Наши резултати потврдили су одсуство одбрамбених супстанци код две анализиране врсте *Eupolybothrus transsylvanicus* (Lithobiomorpha, Lithobiidae) и *Cryptops parisi* (Scolopendromorpha, Cryptopidae).

У одбрамбеним секретима три врсте стонога које припадају реду Geophilomorpha (*Strigamia crassipes*, *Clinopodes flavidus* и *Himantarium gabrielis*) идентификовано је укупно 13 једињења: цијановодоник (**H1**), 2–метилпентанска киселина (**H2**), бензалдехид (**H3**), бензоил–нитрил (**H4**), бензил–нитрил (**H5**), 2–метилоктанска киселина (**H6**), метил–2–фенил–ацетат (**H7**), манделонитрил (**H8**), манделонитрил–бензоат (**H9**), 3,7,6*O*–триметилгуанин (**H10**), (9*Z*)–еикозен–1–ол (**H11**), фарнезил 2,3–дихидрофарнезоат (**H12**) и фарнезил–фарнезоат (**H13**). Врста *H. gabrielis* поред испарљивог дела производи и протеински део секрета налик лепку, са доминантним протеином молекулске масе око 55 kDa.



Идентификоване одбрамбене супстанце код *Chilopoda* из реда *Geophilomorpha*.



Четврта испитивана врста из овог реда је *Henia illyrica*, (Geophilomorpha, Dignathodontidae). Код ове врсте нису пронађена лако испарљива једињења, већ протеински део секрета налик лепку. Резултати електрофорезе разликовали су се од раније добијених података за сестринску врсту *H. vesuviana*, а такође су примећене интерпопулационе разлике у протеинским профилима узорка са различитих локалитета.

У нашим радовима потврђено је ослобађање гасовитог цијановодоника, пост–секретском реакцијом између манделонитрила и бензоил–нитрила, при чему настаје манделонитрил–бензоат. Један од потенцијално занимљивих резултата може бити и доказивање цијановодоника NMR–ом ( $\delta$   $^1\text{H}$  3,71,  $\delta$   $^{13}\text{C}$  108 и  $\delta$   $^{15}\text{N}$  на 258,7 ppm) који се ослободио у овој реакцији и растварао у хладном деутерохлороформу у NMR кивети.

Овом комплексном студијом је анализирано петнаест диплоподних и шест хилоподних таксона. У циљу добијања што репрезентативнијих резултата анализом је обухваћен значајан број врста стонога из различитих родова и фамилија, али и више врста из истих родова, у циљу утврђивања интерспецијске разлике у саставу секрета. Такође су анализирани и протеински делови секрета код свих врста које су имале ту врсту заштите. Добијени резултати су пионирски кораци у хемијској екологији животиња на подручју Балкана, али су такође допринели и актуелизацији тематике која је била у стагнацији читавих неколико деценија, пре свега, код хилопода. Неопходно би било да се у будућности настави са екстензивним и интензивним студијама у овој области, пре свега у циљу дефинисања улоге нових једињења у сложеним интеракцијама између организама и њихове потенцијалне примене, као и расветљавања биосинтичког порекла и веза између једињења код стонога и других група зглавкара.

**Кључне речи:** стоноге, Diplopoda, Chilopoda, одбрамбена једињења, NMR, GC–MS и LC–ESI–MS, цијановодоник, хинони, алкалоиди, протеини

**Научна област:** Хемија

**Ужа научна област:** Органска хемија

**УДК:** 547

## **Identification of defensive substances from selected species of myriapod classes Diplopoda and Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda)**

### **Abstract:**

The aims of this dissertation were to identify the chemical composition of the defensive fluids in some representatives of the classes Diplopoda and Chilopoda (Myriapoda); to compare the results with those of previously analyzed relatives; to test possibly interspecific and intergeneric differences in composition of defensive secretion in millipedes and centipedes; and to analyze protein part of secretions.

This dissertation contains eight additional chapters: *Uvod* (Introduction), *Opšti deo* (General part), *Naši radovi* (Results and Discussion), *Eksperimentalni deo* (Experimental Part), *Zaključak* (Conclusions), *Literatura* (References), *Indeks pojmova* (Index), and *Biografija* (Biography). The dissertation is written in Serbian with exception of this chapter, but with quite a few of chemical formulas, spectra, and *Latin names* that could be also understandable for non Balkan chemists and ecologists.

General part includes the most important defensive chemicals in phylum Arthropoda sorted by functional groups and classes (cyanogenetic compounds, organic acids and related compounds, quinones and hydroquinones, terpenes and steroids, alkaloids and related compounds).

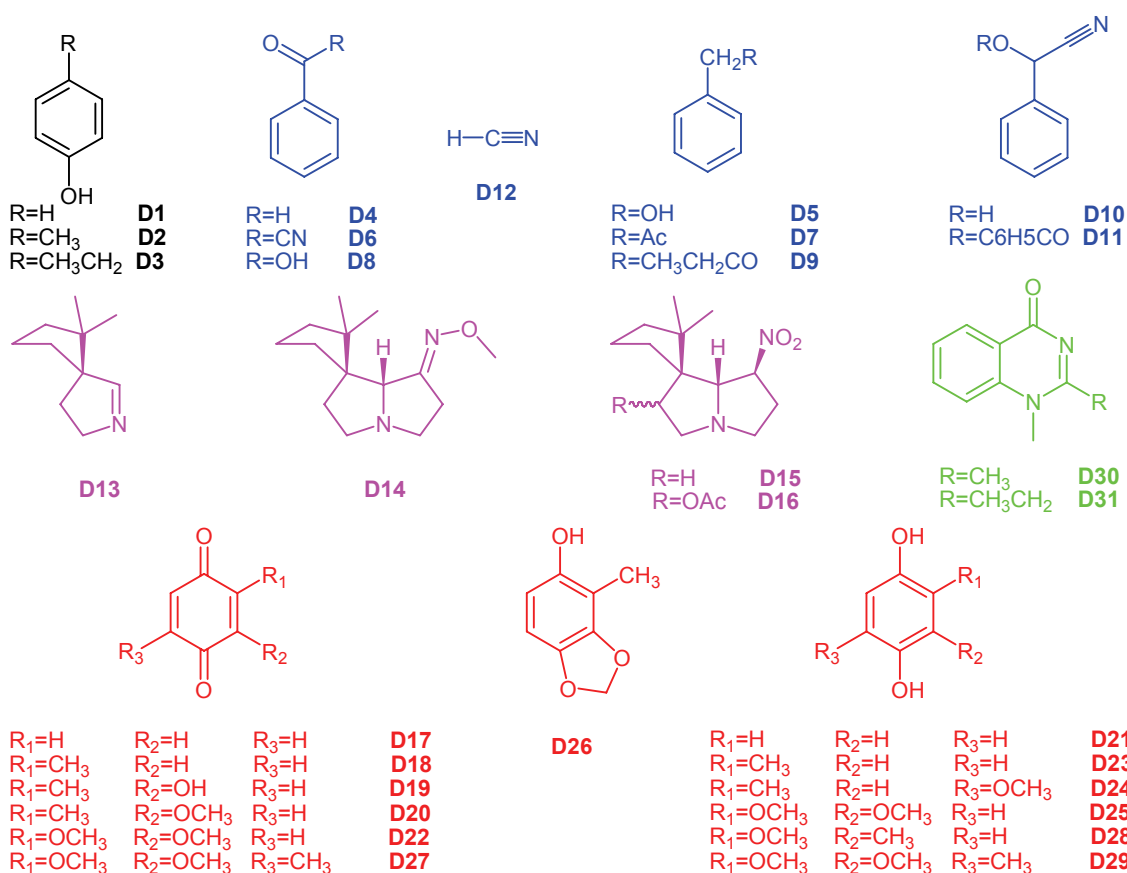
Modern instrumental methods such as GC–MS, LC–MS, LC–MS–MS and NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, NOESY, DOSY, HSQC, HMBC,  $^{15}\text{N}$  HSQC and  $^{15}\text{N}$  HMBC) were used to identify defensive compounds from 15 millipedes and 6 centipedes species. Protein part of secretions was analysed by electrophoresis.

The analysed Diplopoda species belong to orders Callipodida, Polydesmida, Polyzoniida, Julida, and Glomerida.

Defensive secretions from two Callipodida species (*Apfelbeckia insculpta* and *Callipodella fasciata*) were analysed. Both species belong to family Schizopetalidae and contain *p*-cresol (**D2**) as main defensive compound, phenol (**D1**) and *p*-ethylphenol (**D3**) in traces.

Defensive secretions from four Polydesmida species (*Polydesmus complanatus*, *Brachydesmus avalae*, *B. dadayi*, and *B. troglobius*) were analysed. All species belong to family Polydesmidae and contain cyanogenic compounds as defence, i. e. hydrogen cyanide (**D12**), benzaldehyde (**D4**), benzyl alcohol (**D5**), benzoyl nitrile (**D6**), benzoic

acid (**D8**), mandelonitrile (**D10**), and mandelonitrile benzoate (**D11**). Besides these compounds there were two aromatic ketones **D7** and **D9**.



*Defensive compounds identified from Diplopoda species belong to orders:*

*Callipodida, Polydesmida, Polyzoniida, Julida and Glomerida.*

*Polyzonium germanicum* belongs to the order Polyzoniida and family Polyzoniidae, inhabiting vast area in Europe, as well as in the Balkan Peninsula. Defensive secretion contains very interesting alkaloids. The main compound was polyzonimine (**D13**) and the minor compounds were spiropyrrrolizidine *O*-methyloxime (**D14**), nitropolyzonamine (**D5**), and new tentatively identified 7-acetoxy-nitropolyzonamine (**D16**).

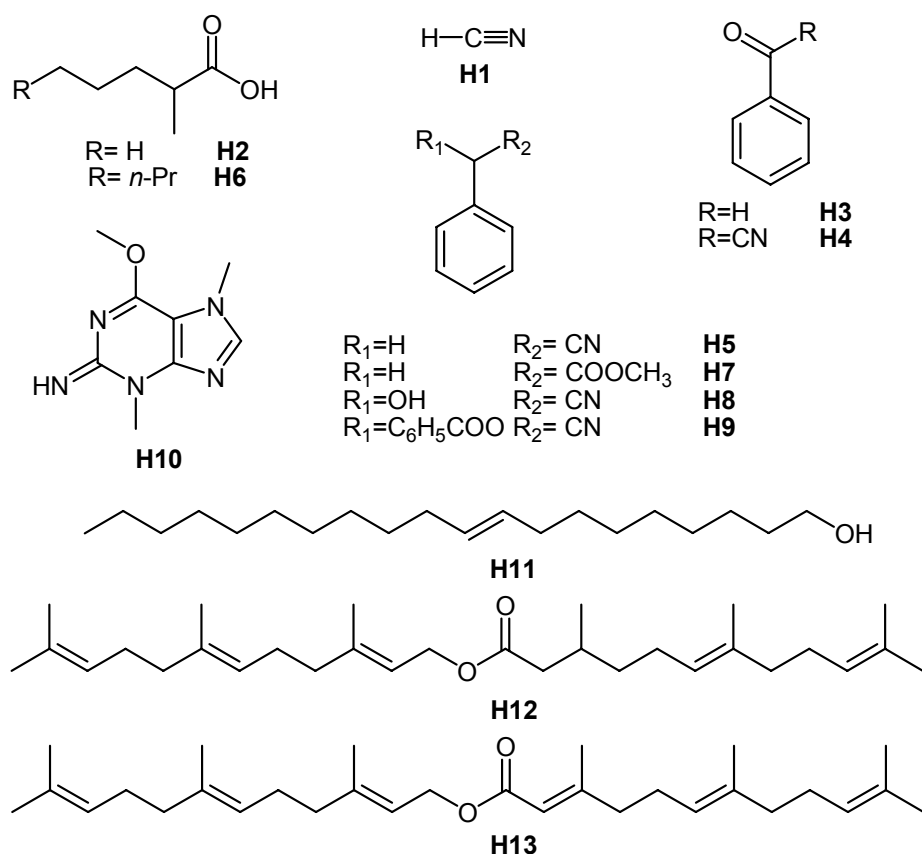
Defensive secretions from six species of family Julidae and order Julida (*Julus terrestris*, *Cylindroiulus boleti*, *Leptoiulus trilineatus*, *Megaphyllum bosniense*, *M. austriacum*, and *M. unilineatum*) was chemically analysed. In total 13 quinone derivatives were identified: 1,4-benzoquinone (**D17**), 2-methyl-1,4-benzoquinone (**D18**), 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone (**D19**), 2-methoxy-3-methyl-1,4-

benzoquinone (**D20**), hydroquinone (**D21**), 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**D22**), 2-methylhydroquinone (**D23**), 2-methoxy-5-methylhydroquinone (**D24**), 2,3-methoxyhydroquinone (**D25**), 2-methyl-3,4-methylenedioxyphenol (**D26**), 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (**D27**), 2-methoxy-3-methylhydroquinone (**D28**), and 2,3-dimethoxy-5-methylhydroquinone (**D29**). In addition, non quinone derivatives were identified as butyl and hexyl esters of fatty acids.

The analysis of two species from the order Glomerida (*Glomeris klugii* and *Onychoglomeris herzegowinensis*) revealed glomerin (**D30**) and homoglomerin (**D31**) in the volatile part of defensive secretion of *G. klugii*. In the protein part of secretion, two proteins with molecular weight around 20 kDa and one with molecular weight of 116 kDa were identified. Proteins were also detected in defensive glands of *O. herzegowinensis* by the preliminary colour test, but there was not enough material for electrophoresis.

The analysed Chilopoda species belong to orders Lithobiomorpha, Scolopendromorpha, and Geophilomorpha. Defensive compounds from *Eupolybothrus transsylvanicus* (Lithobiomorpha, Lithobiidae) and *Cryptops parisi* (Scolopendromorpha, Cryptopidae) could not be detected.

Four species from order Geophilomorpha were also analysed. Defensive secretion of *Strigamia crassipes* (family Linotaeniidae) afforded three cyanogenic compounds: hydrogen cyanide (**H1**), benzaldehyde (**H3**), and benzoyl nitrile (**H4**), and non cyanogenic eicosenol (**H11**) and four cholesterol derivatives. Defensive secretion of *Henia illyrica* (family Dignathodontidae) contained protein part. Glue-like secretions from two different sites were analysed by electrophoresis. The results show differences in protein composition, and were different in comparison with those of secretion from *H. vesuviana* described in literature. Defensive secretion of *Clinopodes flavidus* (Geophilomorpha, Geophilidae) contains three cyanogenic compounds (**H1**, **H3** and **H4**) and three non cyanogenic compounds: 2-methylpentanoic acid (**H2**), 2-methyloctanoic acid (**H6**), and aromatic ester methyl-2-phenylacetate (**H7**).



*Defensive compounds identified from Chilopoda species belong to order Geophilomorpha.*

In defensive secretion of *Himantarium gabrielis* (Geophilomorpha, Himantariidae) were identified nine cyanogenic and non cyanogenic compounds: hydrogen cyanide (**H1**), benzaldehyde (**H3**), benzoyl-nitrile (**H4**), benzyl-nitrile (**H5**), mandelonitrile (**H8**), mandelonitrile-benzoate (**H9**), 3,7,6O-trimethylguanine (**H10**), farnesyl 2,3-dihydrofarnesoate (**H12**), and farnesyl-farnesoate (**H13**). Post secretion release of cyanide by reaction of mandelonitrile and benzoyl-nitrile was observed by the NMR. The NMR signals of all three atoms from hydrogen cyanide were identified ( $\delta$  <sup>1</sup>H 3.71 ppm,  $\delta$  <sup>13</sup>C 108 ppm, and  $\delta$  <sup>15</sup>N 258.7 ppm) in the *in situ* experiments carried out in the NMR tube in cold deuteriochloroform. In addition, there was protein part of secretion with major 55 kDa protein.

**Keywords:** Myriadods, Diplopoda, Chilopoda, defensive compounds, NMR, GC-MS and LC-ESI-MS, hydrogen cyanide, quinones, alkaloids, proteins

**Academic Expertise:** Chemistry

**Field of Academic Expertise:** Organic chemistry

**UDK:** 547

Identifikacija odbrambenih supstanci odabranih  
vrsta stonoga iz klasa Diplopoda i Chilopoda  
(Arthropoda, Myriapoda)

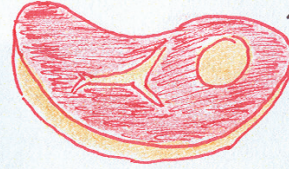
Grafički apstrakt:

2/3



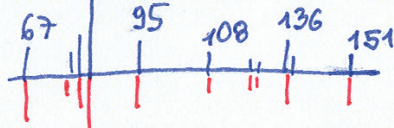
STONOGE MYRIAPODA → DIPLOPODE

HILOPODE

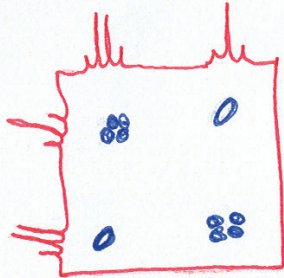


VIŠE OD 1 000 000 VRSTA  
ZGLAVKARI  
ARTHROPODA

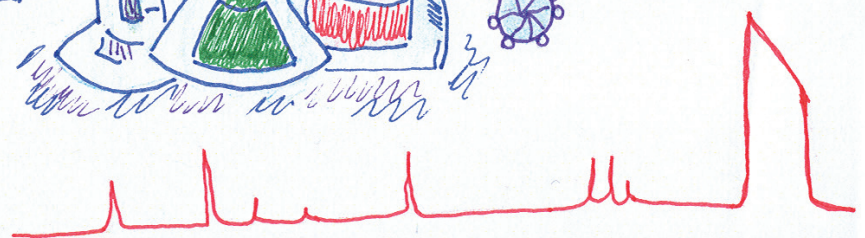
DOKTORAT  
DVA MIN  
82



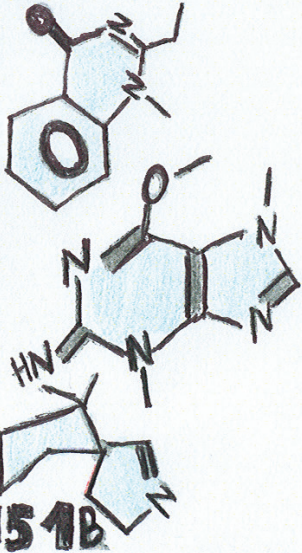
189, 10220



Hemijska odbrana



HCN



236

151B

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
-------------------	----------

<b>1. OPŠTI DEO</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

<b>1.1. HEMIJSKA ODBRANA KOD ARTHROPODA</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ARTHROPODA .....	3
1.1.2. TIPOVI ODBRANA KOD ZGLAVKARA .....	5
1.1.3. ODBRAMBENE SUPSTANCE ZGLAVKARA .....	10
1.1.3.1. Cijanovodonik i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara .....	11
1.1.3.2. Karboksilne kiseline u odbrambenim sekretima zglavkara .....	13
1.1.3.3. Alkoholi, aldehidi, ketoni i estri u odbrambenim sekretima zglavkara .....	16
1.1.3.4. Hinoni i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara.....	19
1.1.3.5. Terpeni, steroidi i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara.....	22
1.1.3.6. Alkaloidi, amini, amidi i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara.....	29
<b>1.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ANALIZIRANIH VRSTA STONOGA (ARTHROPODA, MYRIAPODA)</b> .....	<b>36</b>
1.2.1. STONOGE IZ KLASSE DIPLOPODA.....	37
1.2.2. STONOGE IZ KLASSE CHILOPODA .....	41

<b>2. NAŠI RADOVI</b> .....	<b>43</b>
-----------------------------	-----------

<b>2.1. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA KLASSE DIPLOPODA – REZULTATI</b> .....	<b>44</b>
2.1.1. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE SCHIZOPETALIDAE (DIPLOPODA, CALLIPODIDA) .....	45
2.1.2. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE POLYDESMIDAE (DIPLOPODA, POLYDESMIDA).....	48
2.1.3. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE POLYZONIIDAE (DIPLOPODA, POLYZONIIDA) .....	55
2.1.4. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE JULIDAE (DIPLOPODA, JULIDA) .	58
2.1.5. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE GLOMERIDAE (DIPLOPODA, GLOMERIDA) .....	75
<b>2.2. ODBRAMBENE SUPSTANCE KLASSE DIPLOPODA – DISKUSIJA</b> .....	<b>86</b>
<b>2.3. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA KLASSE CHILOPODA – REZULTATI</b> .....	<b>99</b>
2.3.1. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE LITHOBIIDAE (CHILOPODA, LITHOBIOMORPHA).....	100
2.3.2. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE CRYPTOPIIDAE (CHILOPODA, SCOLOPENDROMORPHA) .....	100
2.3.3. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE LINOTAENIIDAE (CHILOPODA, GEOPHILOMORPHA).....	100
2.3.4. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE DIGNATHODONTIDAE (CHILOPODA, GEOPHILOMORPHA) .....	102
2.3.5. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE GEOPHILIDAE (CHILOPODA, GEOPHILOMORPHA).....	103
2.3.6. ODBRAMBENE SUPSTANCE PREDSTAVNIKA FAMILIJE HIMANTARIIDAE (CHILOPODA, GEOPHILOMORPHA).....	109



<b>2.4. ODBRAMBENE SUPSTANCE KLASSE CHILOPODA – DISKUSIJA .....</b>	<b>130</b>
<b><u>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</u></b>	<b><u>136</u></b>
<b>3.1. APARATI I RASTVARAČI .....</b>	<b>137</b>
<b>3.2. SAKUPLJANJE I ČUVANJE MATERIJALA .....</b>	<b>140</b>
3.2.1. KLASA DIPLOPODA .....	140
3.2.1.1. Familija Schizopetalidae (Diplopoda, Callipodida) .....	140
3.2.1.2. Familija Polydesmidae (Diplopoda, Polydesmida) .....	140
3.2.1.3. Familija Polyzoniidae (Diplopoda, Polyzoniida) .....	141
3.2.1.4. Familija Julidae (Diplopoda, Julida) .....	141
3.2.1.5. Familija Glomeridae (Diplopoda, Glomerida) .....	141
3.2.2. KLASA CHILOPODA .....	142
3.2.2.1. Familija Lithobiidae (Chilopoda, Lithobiomorpha) .....	142
3.2.2.2. Familija Cryptopidae (Chilopoda, Scolopendromorpha) .....	142
3.2.2.3. Familija Linotaeniidae (Chilopoda, Geophilomorpha) .....	142
3.2.2.4. Familija Dignathodontidae (Chilopoda, Geophilomorpha) .....	143
3.2.2.5. Familija Geophilidae (Chilopoda, Geophilomorpha) .....	143
3.2.2.6. Familija Himantariidae (Chilopoda, Geophilomorpha) .....	143
<b>3.3. PRIPREMA UZORAKA .....</b>	<b>144</b>
3.3.1. PRIPREMA UZORAKA UZ POMOĆ VAKUUM CEVČICA SA AKTIVNIM UGLJEM .....	144
3.3.2. PRIPREMA UZORAKA UZ POMOĆ FILTER PAPIRA .....	144
3.3.3. EKSTRAKCIJA ORGANSKIM RASTVARAČIMA .....	144
3.3.4. DERIVATIZACIJA JEDINJENJA IZ ODBRAMBENOG SEKRETA–REAKCIJA SILANIZOVANJA .....	145
3.3.5. DISEKOVANJE VEZIKULA I EKSTRAKCIJA ORGANSKIM RASTVARAČIMA .....	145
3.3.6. DETEKTOVANJE CIJANOVODONIKA .....	146
3.3.6.1. Pikrinski test .....	146
3.3.6.2. Detektovanje cijanovodonika GC–MS tehnikom .....	146
3.3.7. DETEKTOVANJE PROTEINSKOG DELA ODBRAMBENIH SEKRETA .....	146
3.3.7.1. Bradford–ov test .....	146
3.3.7.2. Bojeni test na nitroceluloznoj membrani .....	147
3.3.7.3. SDS elektroforeza .....	147
<b>3.4. PRAVLJENJE BIBLIOTEKE MASENIH SPEKTARA IDENTIFIKOVANIH JEDINJENJA .....</b>	<b>149</b>
<b>3.5. SPEKTRALNI PODACI IDENTIFIKOVANIH JEDINJENJA .....</b>	<b>150</b>
<b><u>4. ZAKLJUČAK .....</u></b>	<b><u>156</u></b>
<b><u>5. LITERATURA .....</u></b>	<b><u>158</u></b>
<b><u>6. BIOGRAFIJA .....</u></b>	<b><u>170</u></b>

## UVOD

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje obrambenih supstanci kod izabranih predstavnika klasa Diplopoda i Chilopoda koje naseljavaju teritoriju Balkanskog poluostrva. Ovo su prvi rezultati saradnje Centra za instrumentalnu analizu IHTM-a i Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sa jedne strane (grupa profesora Milosavljevića), i Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sa druge strane (grupa profesora Makarova).

Opšti deo ovog rada obuhvata pregled odbrambenih supstanci kod zglavkara (filum Arthropoda) razvrstanih po klasama hemijskih jedinjenja. Takođe, opšti deo sadrži i kratke opise osnovnih obeležja filuma Arthropoda, subfiluma Myriapoda, odnosno klasa Diplopoda i Chilopoda, kao i prikaz analiziranih vrsta stonoga.

U poglavlju Naši radovi opisana je identifikacija odbrambenih supstanci kod 21 vrste stonoga koje pripadaju klasama Diplopoda i Chilopoda. Pored najčešće korišćene kombinovane GC-MS tehnike za identifikaciju nepoznatih jedinjenja upotrebljene su najsavremenije strukturne metode među kojima su važno mesto zauzele NMR tehnike kao što su  $^{15}\text{N}$  HSQC i HMBC, ali i DOSY. Svi dobijeni rezultati su upoređeni sa dosadašnjim dostignućima i prodiskutovani.

Eksperimentalni deo obuhvata detaljne opise načina čuvanja jedinki, pripreme uzoraka za različite analize, ali i parametre instrumentalnih tehnika korišćenih u eksperimentalnom radu. U ovom poglavlju prikazani su spektralni podaci jedinjenja i postupak pravljenja biblioteke masenih spektara elektronske jonizacije koja je nastala na osnovu identifikacije odbrambenih jedinjenja i njihovih TMS-derivata.

Na kraju disertacije nalazi se poglavlje Zaključak u kome je dat prikaz najvažnijih dostignuća ove disertacije.

Za lakše praćenje elektronske verzije teze korišćeni su mnogobrojni linkovi (koji se pojavljuju uz kombinaciju tastera CTRL i levog klika) ka danas najznačajnijim slobodnim internet enciklopedijama, dok je za papirnu verziju značajno postojanje poglavlja Indeks pojmova.

## 1. OPŠTI DEO

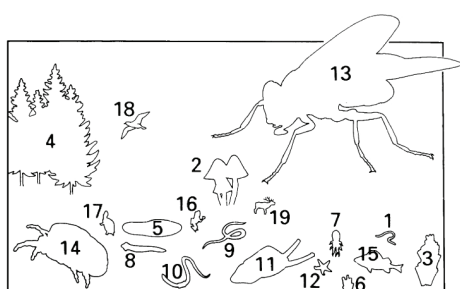
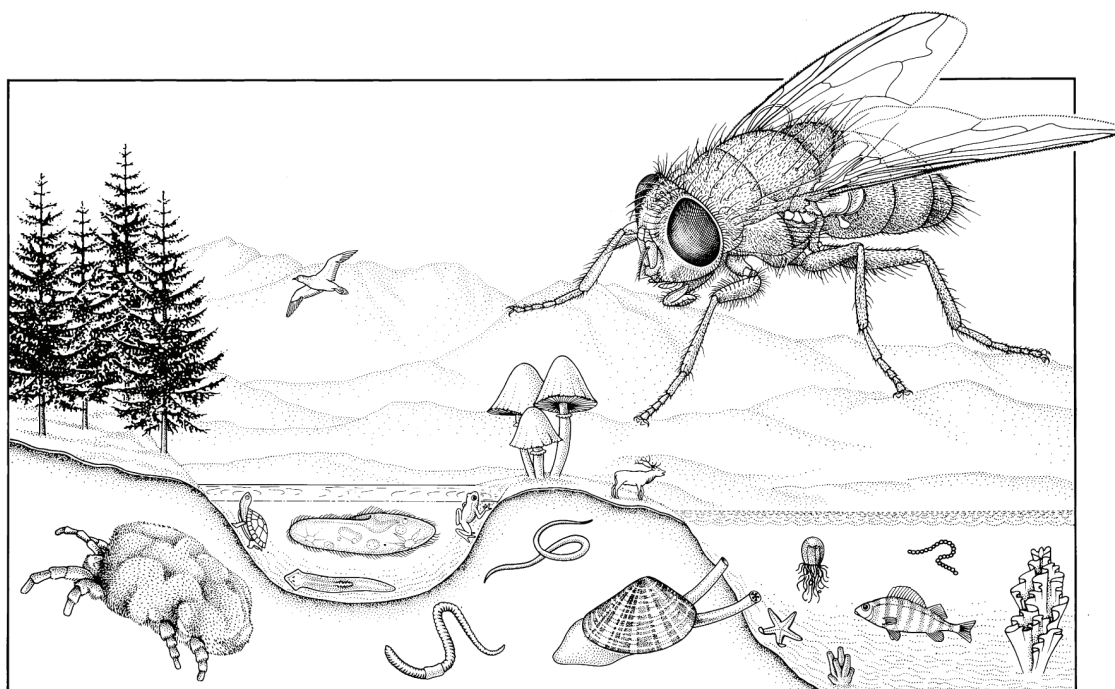
*„What we know already about insect chemistry is tantalizing, but there can be no question that the best is yet to come. Only a tiny percentage of insects have so far been subject to even the most cursory chemical study. There is no telling what, in the line of molecular novelty and chemical-ecological ingenuity, the remainder might have to offer.“*

*JERROLD MEINWALD i THOMAS EISNER*

## 1.1. Hemijska odbrana kod Arthropoda

### 1.1.1. Opšte karakteristike Arthropoda

Zglavkari (Arthropoda, od grčkih reči ἄρθρον (artron), što znači članak i ποδός (podos), što znači noga) su filum životinjskog carstva koji poseduje egzoskelet i segmentisano telo<sup>1</sup>.



- 1 Prokaryotes
- 2 Fungi
- 3 Algae
- 4 Plantae (multicellular plants)

- 5 Protozoa
- 6 Porifera (sponges)
- 7 Cnidaria (jellyfish, corals, etc.)
- 8 Platyhelminthes (flatworms)
- 9 Nematoda (roundworms)
- 10 Annelida (earthworms, leeches, etc.)
- 11 Mollusca (snails, bivalves, octopus, etc.)
- 12 Echinodermata (starfish, sea urchins, etc.)
- 13 Insecta
- 14 Non-insect Arthropoda
- 15 Pisces (fish)
- 16 Amphibia (frogs, salamanders, etc.)
- 17 Reptilia (snakes, lizards, turtles)
- 18 Aves (birds)
- 19 Mammalia (mammals)

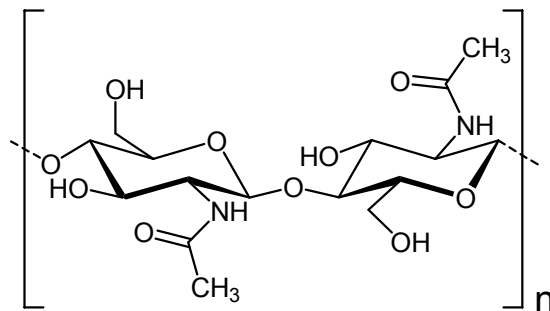
**Slika 1.1.** Brojnost vrsta na svetu. Diverzitet vrsta određuje veličinu jedinke. Reprodukovano iz rada After Wheeler *Annals of the Entomological Society of America* 1990 (83) 91–97.

Zglavkari, prema trenutno raspoloživim podacima, uključuju preko milion opisanih vrsta, što predstavlja oko 80% svih opisanih životinjskih vrsta, odnosno po nekim procenama više od dve trećine svih vrsta životinja na Zemlji<sup>2,3</sup>. Veličina pojedinačnih jedinki prikazanih na sl. 1.1. proporcionalna je broju opisanih taksona koje te jedinke predstavljaju. Artropode su prikazane kao insekti (13) i kao ostale artropode (14).

Zglavkari su svrstani u nekoliko subfiluma: Chelicerata, Myriapoda, Crustacea i Hexapoda<sup>1</sup>. Predstavnici subfiluma Chelicerata uključuju veći broj redova, kao što su Opiliones, Pseudoscorpiones, Scorpiones, Solifugae, Amblypygi, Araneae, Palpigradi, Uropygi, kao i infraklasu Acari. Myriapoda se dele u četiri klase: Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda i Symphyla. Crustacea uključuju klase Branchiopoda, Malacostraca, Maxillopoda i Ostracoda. Najraznovrsnija grupa zglavkara je svrstana u subfilum Hexapoda koji uključuje klase Entognatha i Insecta.

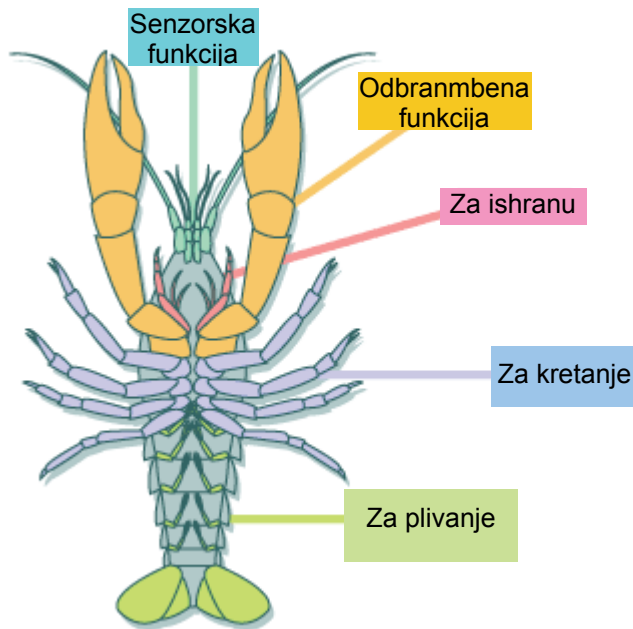
Najznačajnije karakteristike zglavkara su bilateralna simetrija, segmentiranost tela, tvrdi egzoskelet, člankovitost ekstremiteta i veći broj nogu za hodanje. Bilateralna simetrija se najčešće svodi na uzdužnu simetriju gde su leva i desna strana tela identične, odnosno ponašaju se kao predmet i lik u ogledalu. Telo svih zglavkara je, makar u nekom stupnju razvoja, sastavljeno iz segmenata. Najčešće su segmenti grupisani u veće celine, kao na primer abdomen ili cefalotoraks.

Važna karakteristika zglavkara je i tvrdi egzoskelet, koji daje potporu telu umesto kostiju. Egzoskelet je sastavljen od hitina, koji je u stvari dugolančani polimer *N*-acetilglukozamina (sl. 1.2.). Neživa kutikula se kod artropoda ponaša kao oklop „šiven po meri“, jer nastaje kao proizvod „kože“ koji kasnije očvrstne u „zaštitno odelo“. Egzoskelet ima nekoliko svojih funkcija među kojima su najznačajnije zaštitna uloga i sprečavanje dehidracije. Sa druge strane, kruta struktura hitinske kutikule ne dozvoljava joj da raste zajedno sa jedinkom, tako da je jedinka odbacuje i pravi novu „za broj veću“.



**Slika 1.2.** Struktura hitina prikazana uz pomoć dve *N*-acetilglukozaminske jedinice povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom, koje se ponavljaju u nizu.

Postojanje egzoskeleta može da predstavlja problem artropodama, pre svega kako sa tako krutim oklopom pokretati noge? Evolutivno ovaj problem je rešen postojanjem člankovityh ekstremiteta. Ovakvi ekstremiteti se ponašaju kao mehaničke



**Slika 1.3.** Pogled sa ventralne strane na ekstremitete rečnog raka i prikaz njihovih različityh funkcija.

šarke, dok ih pokreću mišići koji su povezani egzoskeletom sa obe strane članka.

Prve artropode su imale mnogo segmenata sa po jednim parom nogu na svakom od njih. Današnje artropode su generalno zadržale veći broj segmenata, ali je značajan broj artropoda kompletno izgubio noge na nekim segmentima. Takođe, neki ekstremiteti su evoluirali u nove strukture; rečni rak, na

primer, ima specijalizovane ekstremitete za pojedine funkcije (sl. 1.3.).

### 1.1.2. Tipovi odbrana kod zglavkara

Različite vrste zglavkara razvile su mnogo različityh načina kako bi izbegle potencijalne predatore. Velika brzina kretanja za mnoge artropode je prvi način zaštite, bilo da lete ili da trče. Bubašvabe, na primer, imaju neverovatnu brzinu reagovanja na opasnost. One su u stanju da uz pomoć senzitivnih seta, koje predstavljaju mehaničke receptore, detektuju promenu vazdušnog pritiska koju proizvode predmeti koji se brzo kreću. Nervni impulsi ovih receptora se prenose kroz neurone brzinom od tri metra u sekundi i stižu sve do grudne ganglije koja izaziva reakciju pokretanja nogu u roku od neverovatnih 50 milisekundi od nadražaja.

Neke vrste moljaca iz familije Arctiidae mogu da detektuju ultrazvučnu aktivnost slepih miševa i tako im odrede položaj. Ako je ultrazvuk koji slepi miševi

proizvode veoma slab, moljci se polako udaljavaju, međutim, čim se ultrazvučna aktivnost pojača, moljci prave manevar propadanja u stilu pilota borbenih aviona i tako se spašavaju. Dalje, bubašvabe sa Madagaskara imaju sposobnost da šište kada su napadnute. Neki taksoni se sakrivaju od predatora čvrsto se držeći za stablo ili list, potpuno prkoseći gravitaciji. Mnoge vrste zglavkara se prilikom napada sklupčaju u loptu i štite se sopstvenim tvrdim egzoskeletom i/ili hemijskom zaštitom. Tvrdi egzoskelet predstavlja značajnu mehaničku zaštitu od predatora i parazita kod većine zglavkara. Bodlje, čekinje i dlake takođe su odlične u mehaničkoj zaštiti od grabljivaca i parazita, jer usta puna dlaka i bodlji mogu predstavljati veoma neprijatno iskustvo za predatora.

U situaciji kada su uhvaćene za ekstremitete, neke vrste insekata u stanju su da polome nogu između dva članka i na taj način se oslobode predatora\*. Gubitak jednog dela ekstremiteta obično ne predstavlja veliki hendikep za ove vrste, pre svega zbog većeg broja ekstremiteta, ali i zbog toga što se nedostajući deo regeneriše u narednim presvlačenjima.

Neke vrste zglavkara žive u velikim kolonijama odakle izlaze veoma retko, dok su neki članovi kolonije evoluirali u pravcu formiranja masivnih mandibula koje služe u odbrani drugih članova kolonije (recimo kod termita).



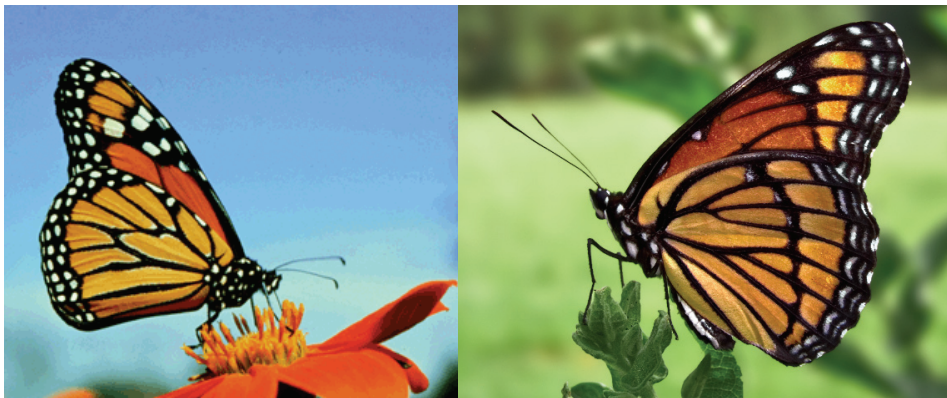
**Slika 1.4.** Kriptična zaštita: jedinka kamufliranog moljca u gomili opalog lišća (levo) i ista fotografija nakon računarskog uklanjanja svih listova (desno).

Pored navedenih načina odbrane, postoje i razni oblici skrivanja kako jedinka ne bi bila uočljiva predatorima. Ovi vidovi zaštite podrazumevaju specifičan oblik i boju

\* Ovaj fenomen se naziva autotomija.

tela i možemo ih podeliti u nekoliko grupa: kriptična zaštita, aposematska zaštita i mimikrija.

Kriptični način života predstavlja prilagođavanje taksona na život u određenom staništu, ne samo po boji nego i po obliku tela (sl. 1.4.). Adaptacija na specifična staništa je često korelisana i sa smanjenom vagilnošću, jer su kriptične forme pri eventualnoj migraciji iz staništa veoma osetljive na napad predatora.



**Slika 1.5.** Aposematska zaštita i mimikrija: jedinke monarh leptira (levo) i mimikrične vrste *Limenitis archippus* (desno).

Aposematska obojenost (sl. 1.5.) podrazumeva prisustvo jarkih boja na telu životinje koje najčešće ukazuju da takva jedinka poseduje neki od hemijskih mehanizama zaštite, pa jarke boje služe da predatori dobro zapamte eventualni susret sa plenom kako ih ponovo ne bi napadali.

Mimikrija predstavlja način imitiranja neke druge vrste zarad lične zaštite od predatora. Tako, na primer, jedinke monarh leptira su jarko obojene i veoma neukusne<sup>4</sup>, dok jedinke vrste *Limenitis archippus* (Cramer 1776), iako ukusne, izbegavaju predatore tako što veoma liče na neukusne rođake (sl. 1.5.). Ovakav vid mimikrije je dobio naziv Bejtsova\* mimikrija, po naučniku koji je otkrio navedeni fenomen. U mimikriju bi spadali i različiti vidovi pretvaranja. Recimo, jedinke u nekom od svojih stadijuma koriste pigmentaciju na telu da bi imitirale izgled drugih životinja kako bi uplašile napadače.

Na sl. 1.6. prikazana je vrsta leptira iz Severne Amerike *Automeris io* (Fabricius 1775) koja koristi izgled sovinog lica i krupnih očiju koji pri naglom otvaranju krila plaše potencijalne napadače.





**Slika 1.6.** Mimikrija: jedinka *Automeris io* pre uznemiravanja (levo). Tokom uznemiravanja jedinka širi krila i imitira razrogačene sovine oči koje u trenutku plaše predatora (desno). Reprodukivano iz knjige: Eisner T., Eisner M., Siegler M., (2005) Secret weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many-legged creatures.

Slično se ponašaju i larve leptira *Papilio troilus* (Linnaeus 1758) koje imaju lažne oči i izgled koji podseća na glavu zmije. Postoje i drugi vidovi mimikrije, kao na primer, Milerova<sup>†</sup> mimikrija, kod koje veći broj vrsta deli sličnu obojenost, tako da predatori izbegavaju sve vrste, a korist je veća što je veći broj vrsta koji se „predstavlja“ na taj način.

Zglavkari poseduju veliki arsenal hemijskog oružja protiv njihovih neprijatelja. U nekim slučajevima, jedinke same proizvode supstance koje mogu biti i neprijatnog ukusa i veoma otrovne. U drugim slučajevima, otrovne supstance se unose u organizam pretežno putem ishrane, uglavnom iz biljaka. Neka od tih jedinjenja se naknadno modifikuju, dok se druga direktno šalju u limfu ili u odgovarajuća tkiva. Kada su napadnute ili uznemirene jedinke emituju odbrambene supstance tako što ih ispuštaju na površinu tela kroz odbrambene žlezde u vazduh kao isparljivi sekret ili kao otrovan sprej kojeg direktno ispaljuju u pravcu napadača. Odbrambene supstance deluju na jedan od četiri načina: repelentno, iritantno, lepljivo i neprijatno (prouzrokuju bol). Neprijatan miris ili ukus su najčešće dovoljni da obeshrabre, odnosno odbiju predatore. Jedinke koje poseduju sposobnost lučenja odbrambenih supstanci najčešće imaju egzokrine žlezde duž toraksa ili abdomena.

Supstance koje imaju iritantno dejstvo primoravaju predatore da se momentalno brišu i sklanjaju sekret sa delova tela, što žrtvama daje vremena za bekstvo. Jedan od

---

\* Henry Walter Bates

† Johann Friedrich Theodor Müller

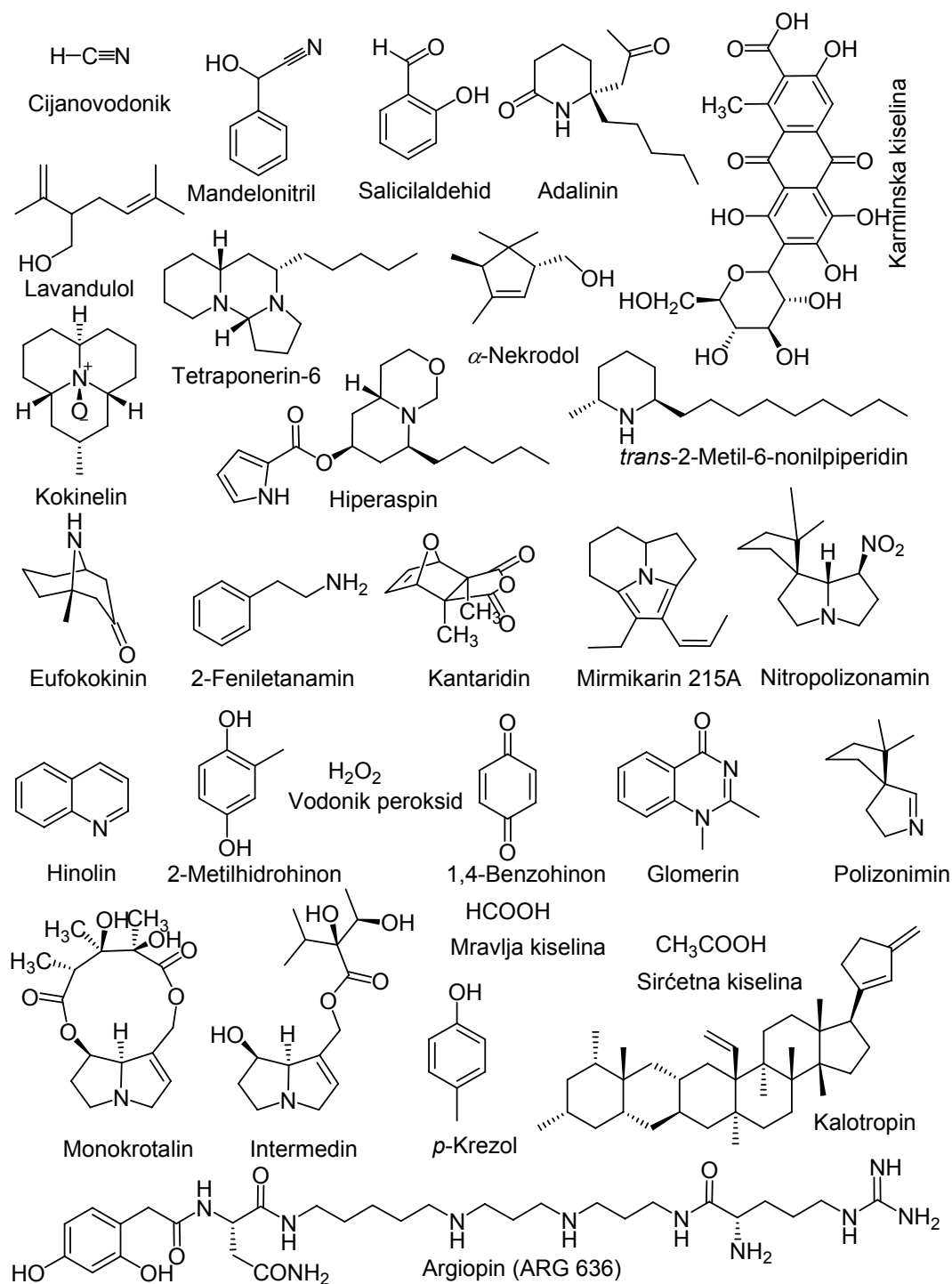
načina oslobađanja ovakvih jedinjenja je da one prvo dospevaju u krv i da se izlučuju u procesu krvarenja.

Razne vrste sekreta su prilično lepljive supstance, koje služe da fizički zadrže neprijatelja na odstojanju. Najčešće se ovakvi sekreti sastoje od proteina.

Larve moljca *Automeris io* (odrasla jedinka prikazana na **sl. 1.6.**) u stanju su da proizvedu veoma bolnu i neprijatnu reakciju. Ove jedinke poseduju čekinje koje ispuštaju odbrambene supstance direktno na kožu predatora. U takvim slučajevima opekotine i iritacije na koži traju i po nekoliko časova. Pčele i ose ispuštaju otrov uz pomoć žaoke. Ovi otrovi su višekomponentne smeše proteina i amino kiselina, koje ne služe samo da proizvedu bol kod napadača, već su ujedno i okidači alergijskih reakcija.

### 1.1.3. Odbrambene supstance zglavkara

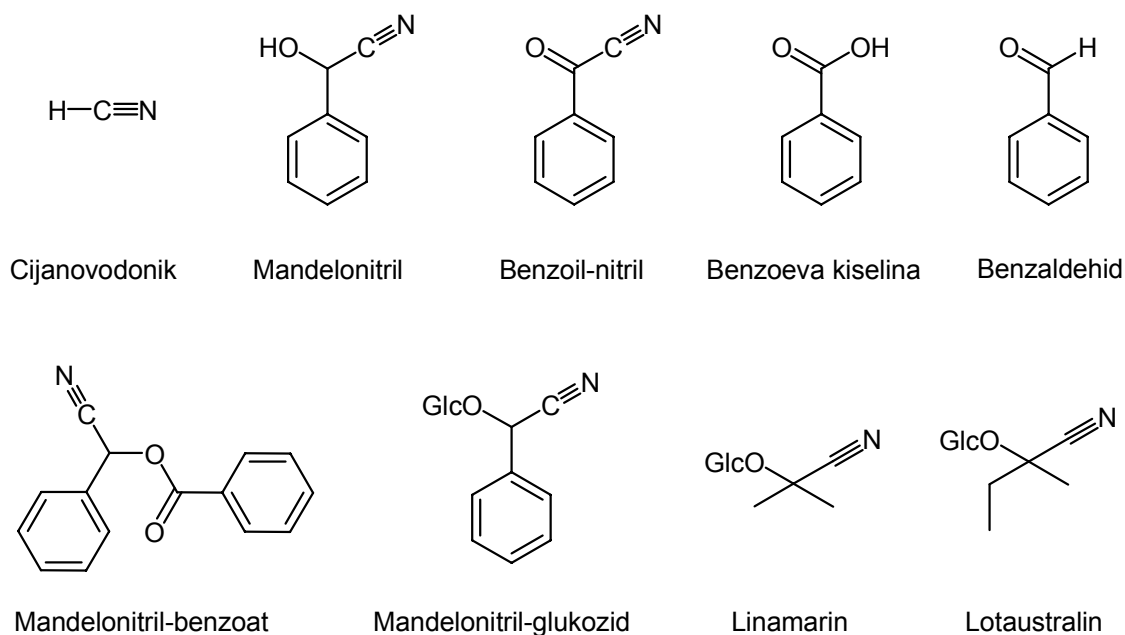
Kao što je istaknuto u prethodnom odeljku, najbrojniji filum na svetu ima očekivano i veoma raznoliku hemijsku zaštitu. Ovo su neki od primera hemijskog oružja kod zglavkara (sl. 1.7.):



Slika 1.7. Izabrane strukture odbrambenih jedinjenja zglavkara

### 1.1.3.1. Cijanovodonik i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara

Cijanogeneza je proces nastanka cijanovodonika (HCN) u živim sistemima. Ovaj proces se javlja kod različitih zglavkara, između ostalih kod hilopodnih i diplopodnih stonoga, koleoptera (Coleoptera), stenica (Hemiptera) i leptira (Lepidoptera). Cijanovodonik je izuzetno otrovan gas i kao takav je odlična odbrambena supstanca. Njegova toksičnost ga svrstava među hemijsko oružje u grupu krvnih otrova i kao takav podleže konvenciji o zabrani hemijskog oružja koju sprovodi Organizacija za zabranu hemijskog oružja (OPCW). Pri koncentraciji u vazduhu od 300 mg/m<sup>3</sup> biće letalan za čoveka u roku od deset minuta, dok će pri koncentraciji 3500 ppm (oko 3200 mg/m<sup>3</sup>) za to biti potrebno manje od jednog minuta. Cijanovodonik je gas koji se još uvek koristi u nekim zemljama za izvršenje smrtne kazne i to tako što se sumporna kiselina dodaje u grumen kalijum cijanida veličine jajeta.

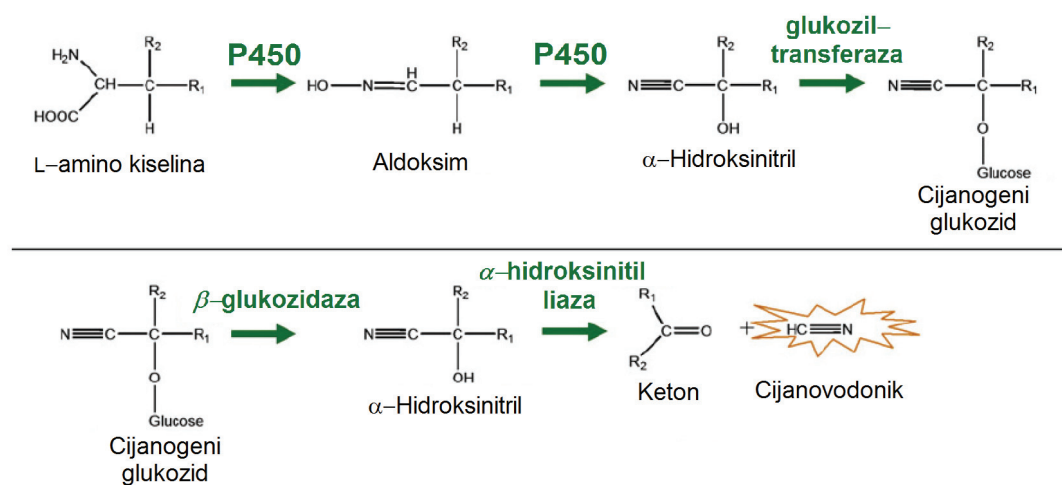


Slika 1.8. Cijanovodonik i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara.

Kod taksona iz reda Lepidoptera cijanogeneza je dokazana kod moljaca iz familije Zygaenidae i njihovih srodnika iz familije Thyrididae, ali i kod nekih leptira iz

familije Nymphalidae. Kod moljaca iz familije Zygaenidae cijanogeneza je potvrđena u svim stadijumima, od jaja do adulta<sup>5,6</sup>.

Do sada se u najvećem broju slučajeva odbrambeni sekret analizirao uz pomoć GC–MS tehnike i kako rezultat se dobijao sastav sekreta koji se ispušta u spreju, pri čemu se najčešće nije vodilo računa o poreklu cijanovodonika i njegovih isparljivih srodnih jedinjenja. Tako je zaključeno da se mandelonitril i benzoil–nitril oksiduju do benzaldehida i benzoeeve kiseline, uz ispuštanje gasovitog cijanovodonika<sup>4</sup>. Kasnije je pokazano da se cijanovodonik može osloboditi i u reakciji mandelonitrila i benzoil–nitrila, pri čemu nastaje mandelonitril–benzoat (sl. 1.8.)<sup>7</sup>.

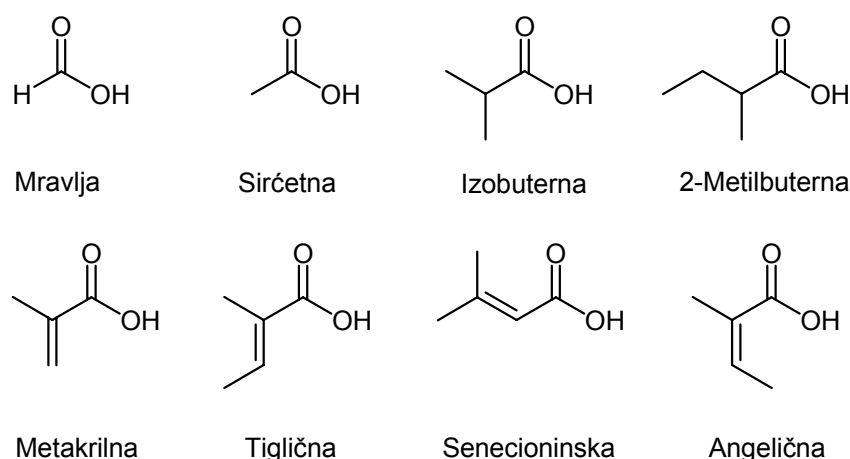


**Shema 1.9.** Anabolizam cijanogenih glukozida (gore) i katabolizam (dole). Reprodukivano iz rada Zagrobelny i sar., Cyanogenesis in plants and arthropods, *Phytochemistry* 2008, 69, 1457–1468.

Ako se pogleda sa biosintetičke strane, može se uočiti da se mandelonitril i benzoil–nitril skladište u rezervoarima, a da se nakon nadražaja uz pomoć enzima vrši ispuštanje gasovitog cijanovodonika. Ovaj proces je katabolički, dok anabolički procesi obuhvataju sinteze cijanogenih glukozida iz odgovarajućih aminokiselina. Na primer, linamarin nastaje iz L–valina, dok lotaustralin nastaje iz L–izoleucina (**shema 1.9.**). Ovi procesi su detaljno analizirani u radovima autora Zagrobelny i saradnika<sup>5,6</sup> gde je zaključeno da više pažnje treba posvetiti ispitivanju cijanogenih glikozida u odbrambenim sekretima zglavkara, ali i biljaka i drugih životinja sa kojima su u vezi.

### 1.1.3.2. Karboksilne kiseline u odbrambenim sekretima zglavkara

Karboksilne kiseline koje se pojavljuju u odbrambenim sekretima artropoda možemo podeliti na niže organske kiseline do šest ugljenikovih atoma, na zasićene i nezasićene masne kiseline (sa dvostrukim i/ili trostrukim vezama) i na kiseline koje pripadaju drugim klasama prirodnih proizvoda.



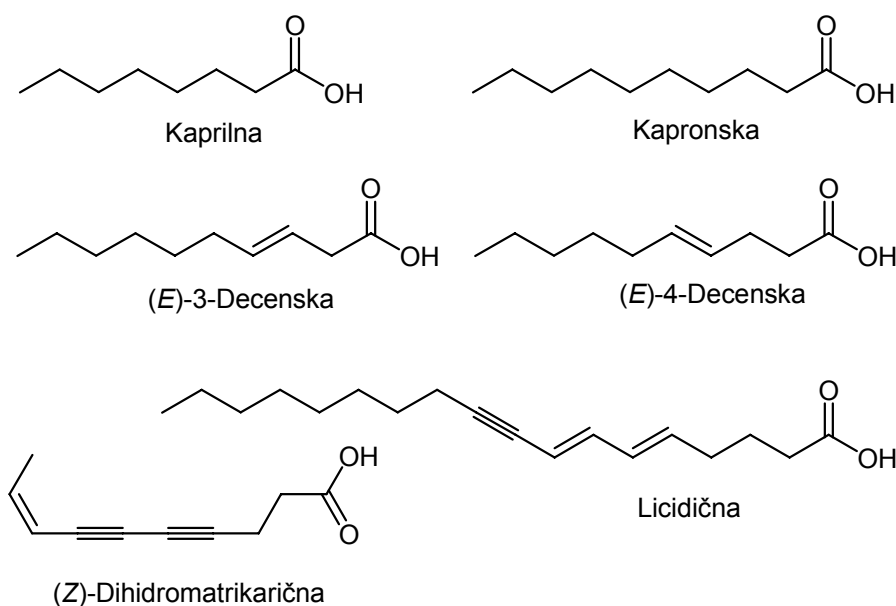
**Slika 1.10.** Izabrane strukture nižih karboksilnih kiselina koje zglavkari najčešće koriste kao odbrambene supstance.

Mravlja kiselina (**sl. 1.10.**) prva je karboksilna kiselina. Ime je dobila po tome što su prva izolovanja bila zasnovana na destilaciji mrava\*. Sam odbrambeni sekret mrava izbačen u vidu spreja može da sadrži i više od 80 % mravlje kiseline. Veoma je zanimljivo kako je moguće da tako koncentrovani rastvor mravlje kiseline može da se čuva u rezervoaru bilo koje žive jedinke. Pored toga, sama količina sekreta koji jedinka nosi je po zapremini veoma slična celom abdomenu. Ovo se objašnjava time što mravlje kaste radnika ili vojnika nemaju razvijene reproduktivne organe, tako da se u abdomenu nalazi više mesta za rezervoare sa mravljom kiselinom. Ovako koncentrovana mravlja kiselina je odličan repelent. U slučaju raspršivanja i kada je napadač jedinka koja ima voštanu kutikulu, uspešnost ovakve odbrane nije efikasna koliko bi se očekivalo. Iz tog razloga su mravi koji pripadaju rodu *Camponotus* usavršili tehniku kojom ujedaju protivnika, dok istovremeno podešavaju abdomen tako da sprej koji ispuštaju pada

\* Naziv formic acid (engleski) potiče od latinske reči *formica* što znači mrav.

direktno na mesto ujeda. Ovako se stvara strahovit protivnapad, a mravi bivaju zaštićeni i od drugih zglavkara i kičmenjaka.

Takođe je zanimljiv i primer vrste *Mastigoproctus giganteus* (Lucas, 1835)\* Odbrambeni sekret ove vrste se sastoji od sirćetne i kaprilne kiseline (sl. 1.10 i 1.11.). Neverovatno je podatak da koncentracija sirćetne kiseline u sekretu ove vrste iznosi 84 %, što je nesumnjivo najviša koncentracija sirćetne kiseline pronađena u prirodi<sup>8,9</sup>. Kaprilna kiselina u sekretu služi da poveća širenje i prodiranje sekreta kroz zaštitni omotač predatora, jer sama sirćetna kiselina ne bi imala tako brzo i iritantno dejstvo koje je neophodno za preživljavanje.

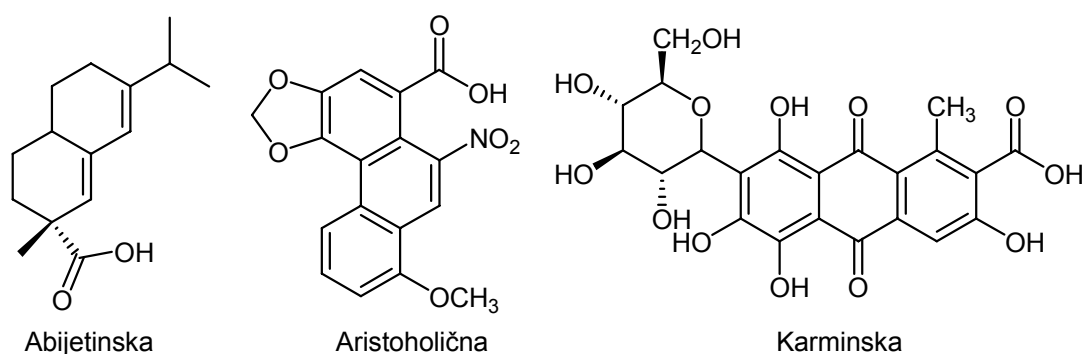


**Slika 1.11.** Izabrane strukture zasićenih i nezasićenih masnih kiselina koje zglavkari koriste kao odbrambene supstance.

Tvrdokrilci (Coleoptera) predstavljaju insekte koji u svom arsenalu imaju najraznovrsnije karboksilne kiseline. Tako, na primer, jedinke iz roda *Trachypachus* sadrže metakrilnu, etakrilnu, 2-metilbuternu, tigličnu, kaprilnu, pelarginsku (nonansku) kiselinu<sup>10</sup>. Senecioninska kiselina je pored ostalih kiselina sastavni deo odbrambenog sekreta vrste *Pasimachus subsulcatus* (Say 1823)<sup>11</sup>. Pored karboksilnih kiselina sa malim brojem ugljenikovih atoma, kod ovih artropoda se u odbrambenom sekretu nalaze zasićene i nezasićene kiseline dugog niza. Jedinke *Necrodes surinamensis* (Fabricius 1775) pored cikličnih alkohola u odbrambenom sekretu sadrže 3- i 4-*trans*-decenske kiseline (sl. 1.11.), ali i zasićene palmitinsku i stearinsku kiselinu<sup>12</sup>.

Dihidromatrikarična kiselina je sastavni deo sekreta tvrdokrilaca koje pripadaju rodu *Chauliognathus*<sup>13</sup>, dok je licidična kiselina sastavni deo odbrambenog sekreta jedinki iz familije Lycidae (sl. 1.11.)<sup>14</sup>.

Na osnovu različite ishrane kod zglavkara se mogu pojaviti i različite odbrambene supstance. Takvi su slučajevi kod larvi leptira iz familije Papilionidae gde se u odbrambenom sekretu mogu naći aristoholične kiseline<sup>15</sup>, dok se abijetinska kiselina može naći kod larvi opnokrilca *Neodiprion sertifer* (Geoffroy 1785) koja je ne sintetiše sama već je koristi iz smole bora kojim se hrani (sl. 1.12.)<sup>4</sup>.



**Slika 1.12.** Abijetinska, aristoholična i karminska kiselina kao predstavnici karboksilnih kiselina koje pripadaju drugim klasama jedinjenja.

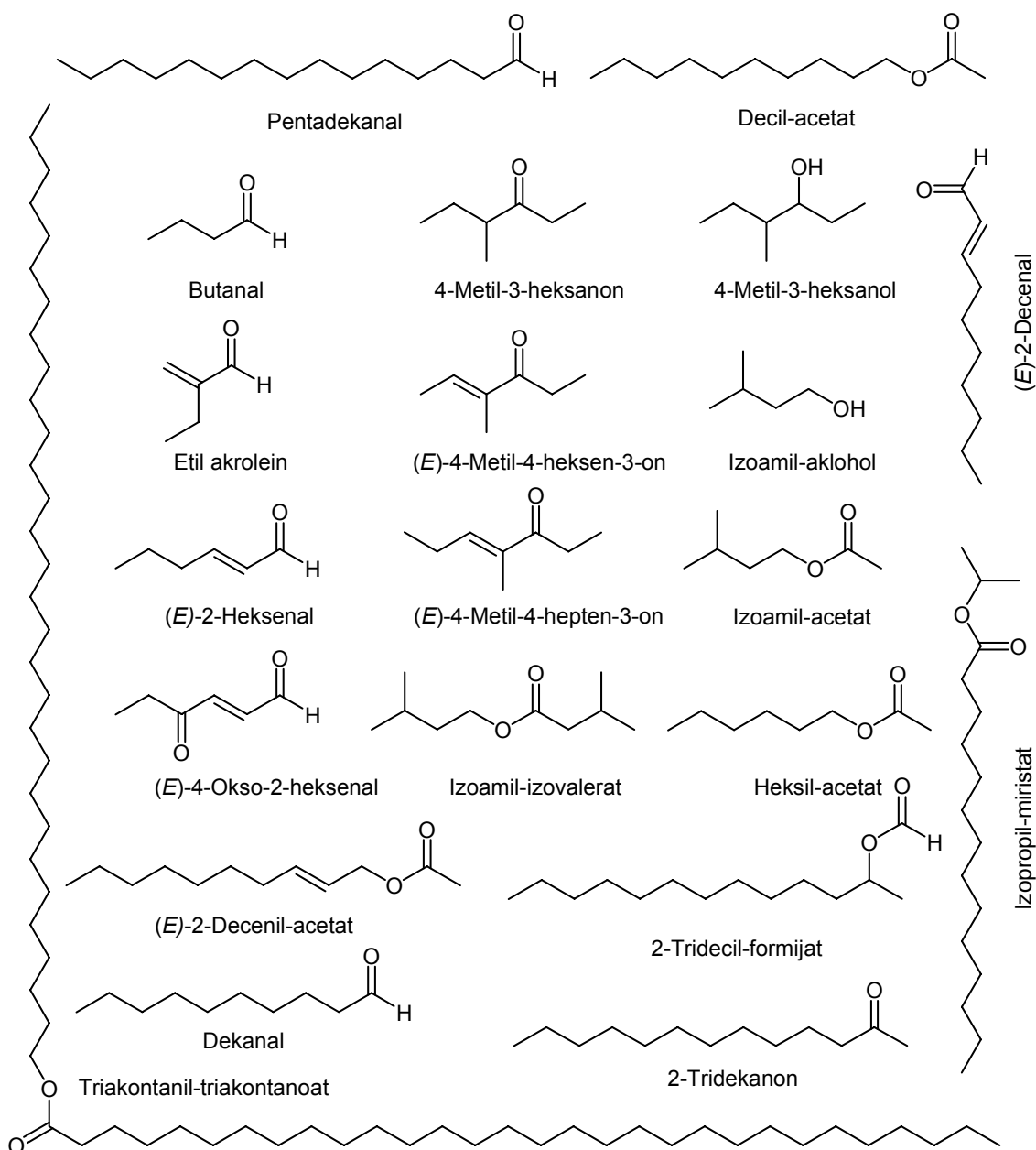
Zanimljiv primer predstavlja karminska kiselina (sl. 1.12.) koja je vekovima u prošlosti korišćena kao crveni pigment za tekstilnu industriju, dok su za sve to vreme kao jedini izvor upotrebljavane odrasle ženke kocinelide *Dactylopius conflusus* (Cockerell 1867)<sup>4</sup>. Ova kiselina, pored karboksilne grupe, sadrži antrahinonski skelet kao aglikonski deo i glukozu kao šećer. Bez obzira na to što je jedinjenje bilo poznato veoma dugo, njegova uloga je tek nedavno potvrđena u eksperimentima Eisnera i sar. kada je dokazano njeno repelentno dejstvo na mrave<sup>16</sup>.

\* Engleski naziv ove vrste je Giant Vinegaroon.



### 1.1.3.3. Alkoholi, aldehidi, ketoni i estri u odbrambenim sekretima zglavkara

Pored karboksilnih kiselina veliku grupu odbrambenih jedinjenja čine i alkoholi, aldehidi, ketoni i estri (sl. 1.13 i 1.14).

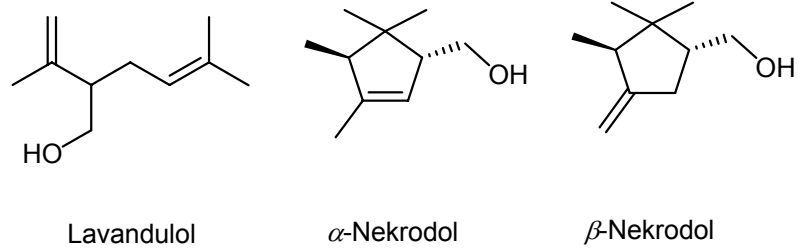


**Slika 1.13.** Izabrane strukture acikličnih aldehida, ketona i estara prisutnih u odbrambenim sekretima zglavkara.

Tako, kod opiliona *Leiobunum nigripalpi* (Wood 1868) glavne komponente odbrambenog sekreta su (*E*)-4-metil-4-heksen-3-on, 4-metilheksan-3-on, 4-metilheksan-3-ol, (*E*)-4-metil-4-hepten-3-on i (*E,E*)-2,4-dimetilheksa-2,4-dienal (sl. 1.13). U odbrambenom sekretu bubašvabe *Eurycotis floridiana* (Walker 1845) okarakterisano je 40 jedinjenja, od kojih (*E*)-2-heksenal, 2-heksanal i heksanska kiselina čine 98% sekreta, dok srodna vrsta iz roda *Platyzosteria* koristi 90% etil-akrolein za odbranu od predatora.

Hemiptera kao jedan od najraznovrsnijih redova insekata sa oko 50 000 opisanih vrsta iz preko 100 familija<sup>4</sup> dele raznovrsnost i odbrambenog sekreta. Pored steroidnih molekula, terpena, značajno mesto zauzimaju aciklični aldehidi, ketoni i estri. Tako su kod vrste *Nezara viridula* (Linnaeus 1758) pored (*E*)-2-heksenala i (*E*)-2-dekanala identifikovani (*E*)-2-decenil-acetat i (*E*)-4-okso-2-heksenal. Zanimljiva je uloga estra dugog niza triakontanil-triakantanoata, koji se nalazi u sastavu voska kod vrste *Metaleurodicus griseus* (Back 1912). Ova vrsta stenica koristi estar dugog niza, ali ne tako što njime prska neprijatelja kao većina drugih artropoda, već im voštani sloj služi za izbegavanje neprijateljskih zamki. Ove jedinke su među najuspešnijim kada su u pitanju izvlačenja iz paukovih mreža, a voštani sloj kojim se prekrivaju, u tome im mnogo pomaže. Prilikom kontakta sa mrežom, praškasti deo voštanog pokrivača otpadne i jedinka umesto da se upeca, samo odleti dalje ponekad i tako da je pauk ne primeti.

Neuroptera takođe poseduju hemijsku odbranu. Odbrambeni sekret nekih vrsta *Caraeochrysa smithi* (Navas 1914) sastoji se iz više masnih kiselina među kojima je najzastupljenija oleinska, ali i od butanala, dekanala, pentadekanala, kao i izopropil-miristata. Zanimljivo kod ove vrste je to da ženka polaže jaja na stabljici i da pri tome duž stabljike mestimično ostavi kapi odbrambenog sekreta, kako bi jaje zaštitila od napada mrava. Kada se jedinka izleže ona prvo mora da savlada odbrambeni sekret i to tako što usisava jednu po jednu kap, sve dok na kraju to ne iskoristi za svoju kasniju odbranu, ali i napad, pošto je i ona jedna vrsta predatora<sup>17</sup>.



**Slika 1.14.** Terpenoidni alkoholi u odbrambenom sekretu tvrdokrilca *Necrodes surinamensis*.

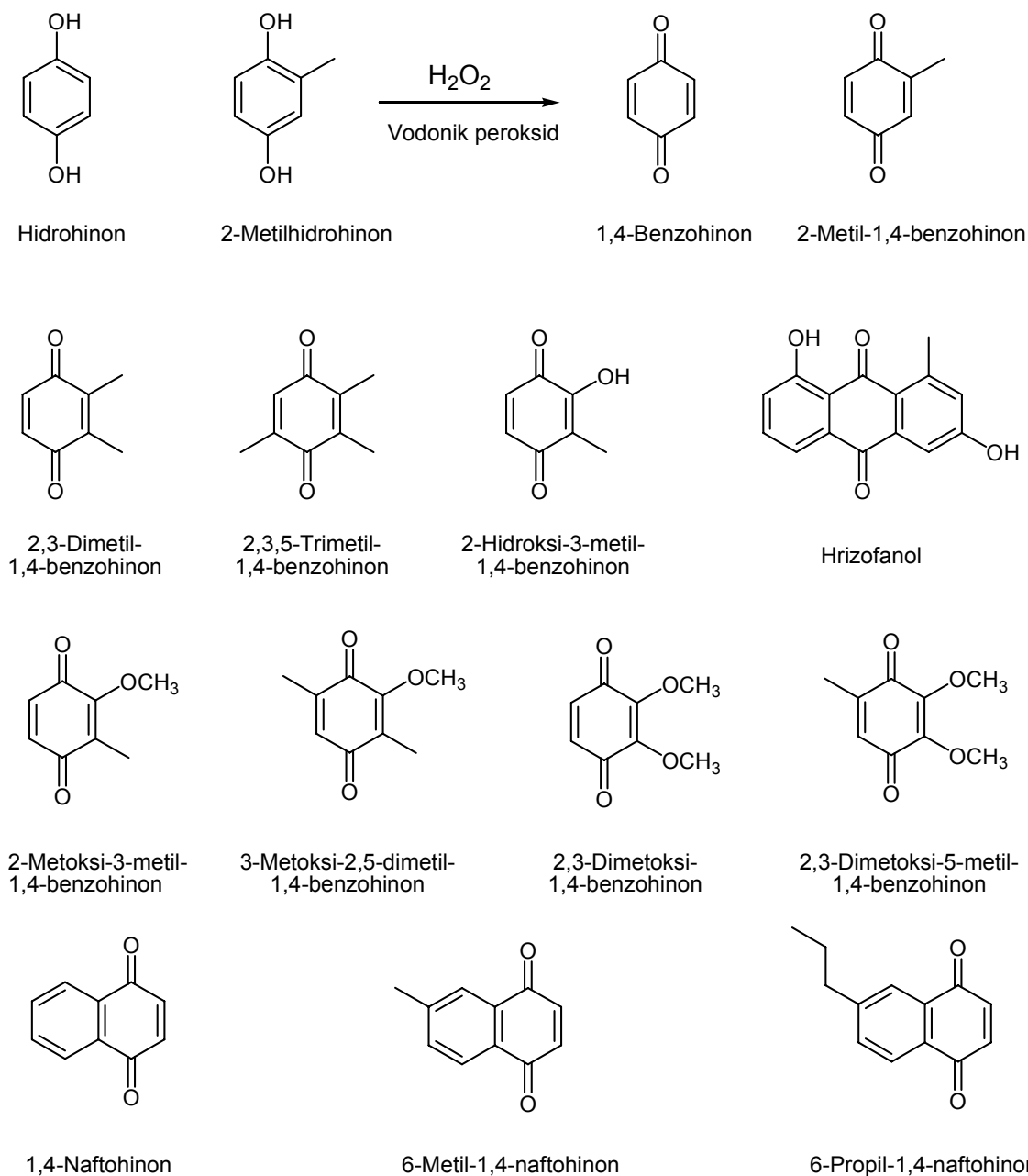
Ranije pomenuti tvrdokrilac *Necrodes surinamensis*, pored karboksilnih kiselina, u odbrambenom sekretu (videti poglavlje 1.1.3.2. i sl. 1.11.) sadrži i monoterpenoidne alkohole lavandulol,  $\alpha$ -nekrodol i  $\beta$ -nekrodol (sl. 1.14.).

Zanimljivo je da su lavandulol i  $\alpha$ -nekrodol pronađeni u ulju lavande (*Lavandula luisieri*), koja je od davnina poznata po svom repelentnom dejstvu prema insektima.

#### 1.1.3.4. Hinoni i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara

Posebno rasprostranjenu klasu ketona koji se mogu naći u odbrambenom sekretu zglavkara predstavljaju benzohinoni, naftohinoni i antrahinoni (sl. 1.15.). Najčešće se sreću kod insekata, opiliona i stonoga iz klase Diplopoda. Navedena jedinjenja su prisutna kod velikog broja vrsta iz familije Carabidae. Njihov odbrambeni mehanizam je jedan od najinteresantnijih u živom svetu. Odbrambene supstance kao što su 1,4-benzohinon, 2-metil-1,4-benzohinon i drugi srodni hinoni (sl. 1.15.) glavne su komponente odbrambenog sekreta. Ove karabide ne čuvaju benzohinone kao takve već ih sintetizuju iz odgovarajućih hidrohina i vodonik peroksida neposredno nakon nadražaja.

Eksplzivna enzimaska sinteza se dešava kada se hidrohini i vodonik-peroksid skladišteni u istom rezervoaru pomešaju sa enzimima (katalazama i peroksidazama) iz drugog (manjeg) rezervoara, koji tada postaje reakciona komora. Ova komora poseduje još jedan „nepovratni ventil“ sa otvorom ka spoljašnjoj sredini. U toku ove reakcije iz vodonik-peroksida se pomoću enzima oslobađa kiseonik, koji zatim oksiduje hidrohine, stvarajući dovoljan pritisak da sekret napusti reakcionu komoru ispuštajući pritom zvuk sličan prasku. Sam ovaj zvuk je nekad dovoljan da omete predatora, međutim, ono što je još ubojitije, jeste činjenica da temperatura sekreta prilikom ispuštanja iznosi neverovatnih 100–ak °C, što dodatno utiče na efikasnost ovakvog oružja. Na usporenim snimcima se pokazalo da ovi insekti ispuštaju sekret u naletima i to brzinom od oko 500 – 1000 štrcaja u minuti, što potvrđuje da se reakcije u komori ne dešavaju u kontinuitetu, već da se radi o mnogo mikroeksplozija. Jedan od razloga za to bi mogao da bude i sprečavanje pregrevanja reakcione komore. Ključali sekret nije jedini zaslužan za dobru zaštitu ovih tvrdokrilaca. Oni su u stanju da pomeraju zadnji deo tela na kome se nalaze otvori odbrambenih žlezda skoro u svim pravcima i tako precizno pogađaju protivnika sa što manjom potrošnjom „municije“. Na preciznost ovog oružja utiče i senzorno tkivo na svakom od ekstremiteta koje šalje informaciju gde se napad dešava i precizno locira napadača, koji će ubrzo zatim biti pogođen ključalim rastvorom hinona.



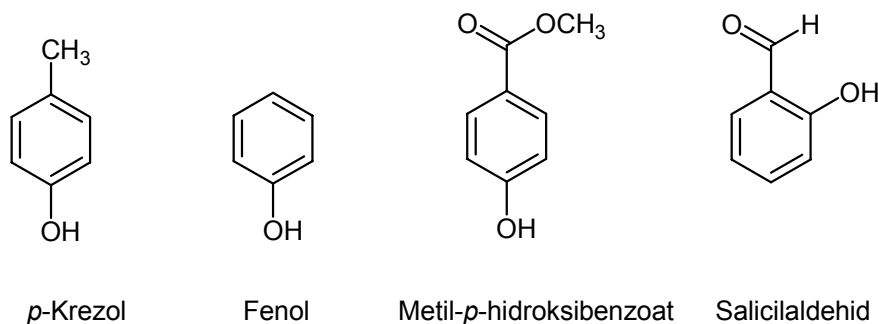
**Slika 1.15.** Izabrane strukture hinona i srodnih jedinjenja koji su pronađeni u odbrambenim sekretima zglavkara.

Na primeru opiliona *Vonones sayi* (Simon 1879) i juliformne stonoge *Floridobolus penneri* (Causey 1957) vidi se raznovrsnost hinona koji se nalaze u odbrambenom sekretu zglavkara. Ovi opilioni poseduju odbrambeni sekret u vidu paste, koja se sastoji uglavnom od 2,3-dimetil-1,4-benzohinona i 2,3,5-trimetil-1,4-benzohinona<sup>18</sup>, dok se stonoga brani uz pomoć 2-metil-1,4-benzohinona, 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinona, 2-metoksi-3-metil-1,4-

benzohinona, 3–metoksi–2,5–dimetil–1,4–benzohinona, 2,3–dimetoksi–1,4–benzohinona i 2,3–dimetoksi–5–metil–1,4–benzohinona<sup>19</sup> (sl. 1.15.).

Sve artropode proizvode benzohinone u vreme kada se presvlače, jer ih koriste kao sredstvo za „štavljenje“, to jest, ova jedinjenja služe im da njihov egzoskelet što pre potamni i očvrstne, tako da su ta jedinjenja, zapravo, fundamentalna za njihov opstanak. Tako se postojanje hinonske odbrane može objasniti u evolutivnom smislu kao ekonomičan način sinteze odbrambenih supstanci.

Pored hidrohina i benzohinona, naftohinoni i antrahinoni takođe su deo arsenala koji poseduju zglavkari. Vrsta opiliona *Phalangium opilio* (Linnaeus 1761) poseduje naftohinon i 6–metilnaftohinon<sup>20</sup>, dok vrsta *Argoporus alutacea* sadrži smešu 6–alkil–1,4–naftohinona<sup>21</sup> kao što su, na primer, 6–metil– i 6–propil–naftohinoni. Antrahinonski derivat hrizofanol zadužen je za hemijsku odbranu vrste *Galeruca tanacetii* (Linnaeus 1758), kod koje je sintetizovan *de novo* poliketidnom biosintezom (sl. 1.15.)<sup>22</sup>. Ranije je pomenut primer karminske kiseline koja je glavna komponenta odbrambenog sekreta vrste *Dactylopius confusus* (sl. 1.12.).



**Slika 1.16.** Izabrane strukture najkarakterističnijih aromatičnih alkohola, aldehida i estara koji su pronađeni u odbrambenim sekretima zglavkara.

Pored do sada pomenutih jedinjenja, odbrambeni sekreti zglavkara sadrže i aromatična jedinjenja (sl. 1.16.). Najrasprostranjenije aromatično jedinjenje iz ove klase je svakako *p*–krezol koji se javlja kod stonoga iz klase Diplopoda, skakavaca iz roda *Romalea*, bubašvaba iz rodova *Periplaneta*, *Blatta*, *Blaberus*, *Therea* i *Archiblatta*, leptira i mnogih drugih vrsta. Takođe je poznato da se *p*–krezol koristi u svetu zglavkara i kao feromon i kao atraktant. Čest pratilac *p*–krezola u odbrambenim sekretima je i fenol, koji se javlja u znatno manjoj meri.

Metil-*p*–hidroksibenzoat često se sreće kod tvrdokrilaca i to kod rodova *Agabus*, *Acilius* i *Hydaciulus*, dok ga opnokrilci i dvokrilci uglavnom koriste kao feromon.

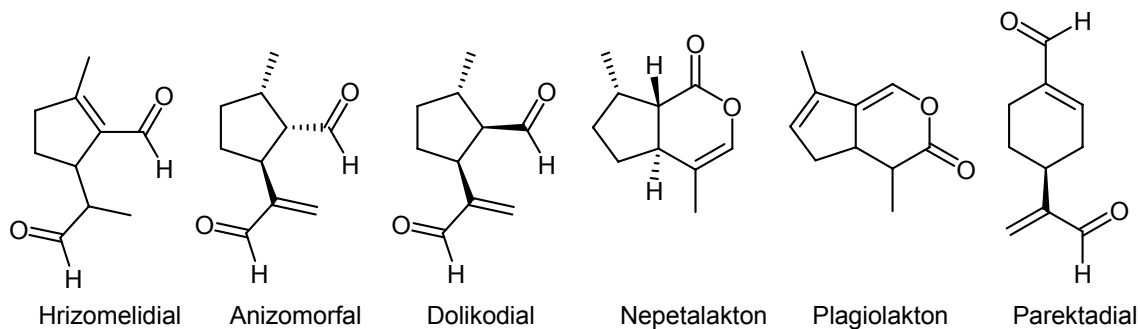
Salicilaldehid se javlja uglavnom kod tvrdokrilaca gde se često nalazi u smeši sa nižim karboksilnim kiselinama, kao što su, na primer, metakrilna i angelična kiselina. Takođe je odbrambena supstanca kod opnokrilaca iz roda *Exoneura*, zatim indijske pčele *Pithitis smaragdula* (Fabricius 1787), dok je kod leptirova poznat kao atraktant.

### 1.1.3.5. Terpeni, steroidi i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara

Terpenoidi su široko rasprostranjeni u biljnom, ali i životinjskom svetu. Kod zglavkara terpenoidi mogu imati različite uloge, pre svega kao feromoni i kao odbrambene supstance. Poznata je i njihova uloga kao juvenilnih hormona i hormona koji utiču na proces presvlačenja. Zglavkari mogu da terpenoide, kao i druge sekundarne metabolite, prikupe putem ishrane i zatim ih hemijski modifikuju u potrebne odbrambene sekrete (parcijalna sinteza) ili da ih sintetizuju *de novo*. Biosintetički putevi kod artropoda uglavnom nisu detaljno ispitivani, ali i kada su rađene detaljnije biosintetičke studije na osnovu izotopskog obeležavanja, uvek bi neki od delova biosinteze ostao pod znakom pitanja. Ovo se dešava zbog toga što biljke (bilo da su hrana ili domaćini) sintetizuju obilje različitih prirodnih proizvoda, tako da nije jednostavno dobiti reproduktivne rezultate. Ipak je primećeno da se triterpeni i terpeni sa još većim brojem ugljenikovih atoma ne sintetizuju *de novo*. Razlikovanje biosintetičkih puteva mono i diterpena od triterpena jedna je od važnih karakteristika metabolizma zglavkara<sup>2</sup>.

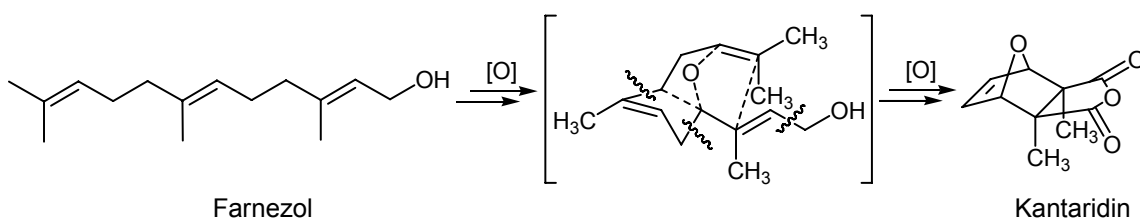
**Monoterpeni** su veoma rasprostranjena jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara. Tako se, na primer, iridoidni monoterpeni nalaze (sl. 1.17.) u sekretima mrava, koleoptera i muva<sup>4</sup>. Prvi dokaz o postojanju iridoidnih terpena kao odbrambenih supstanci zglavkara utvrdio je Meinwald sa saradnicima 1962. godine kada je po prvi put okarakterisan anizomorfal iz fazmidskih insekata<sup>23</sup>. Srodno jedinjenje anizomorfala je i nepetalakton, nađen u odbrambenom sekretu vrste *Graeffea crovonii* (Le Guillou 1841)<sup>4</sup>. Zanimljivost vezana za nepetalakton je ta da je on ujedno i mačji atraktant. Pored dejstva na mačke, ovo jedinjenje ima i repelentno dejstvo na insekte, kod biljaka koje ga sintetizuju. Pored pomenutih monoterpena, uz pomoć NMR–tehnik i osetljive mikro NMR–probe okarakterisan je monoterpen parektadial, takođe iz sekreta

fazmidskih insekata (sl. 1.17.)<sup>2</sup>. Zanimljivo je da su Gronquist i Schroeder dokazali prisustvo ovog laktona iz samo 10  $\mu$ l dobijenog sekreta. Dolikodial, dijastereoizomer anizomorfala, između ostalog je pronađen u sekretu tvrdokrilaca iz familije Staphylinidae i opnokrilaca iz podfamilije Dolichoderinae.



**Slika 1.17.** Izabrane strukture monoterpena koje se nalaze u odbrambenim sekretima zglavkara, gde značajno mesto pripada iridoidima.

Terpenoidni anhidrid kantaridin (sl. 1.18.) zanimljiv je kao jedno od medicinski najznačajnijih jedinjenja izolovanih iz odbrambenih sekreta tvrdokrilaca iz familija Meloidae i Oedemeridae. Iako je po strukturi monoterpen, biosintetičke studije su pokazale da je u pitanju degradacioni proizvod seskviterpenskog alkohola farnezola (sl. 1.18.)<sup>24</sup>. Kantaridin je, istorijski gledano, bio veoma popularan zbog njegovog navodnog afrodizijačkog dejstva. Preparati na bazi ekstrakata vrsta iz familije Meloidae poznati su kao „španska mušica“. Istina je, međutim, da je kantaridin otrovan za ljude i da je bilo slučajeva trovanja baš zbog njegove popularnosti kao afrodizijaka. Bez obzira na to, on je ipak našao primenu u medicini kao vezikant<sup>25</sup>.

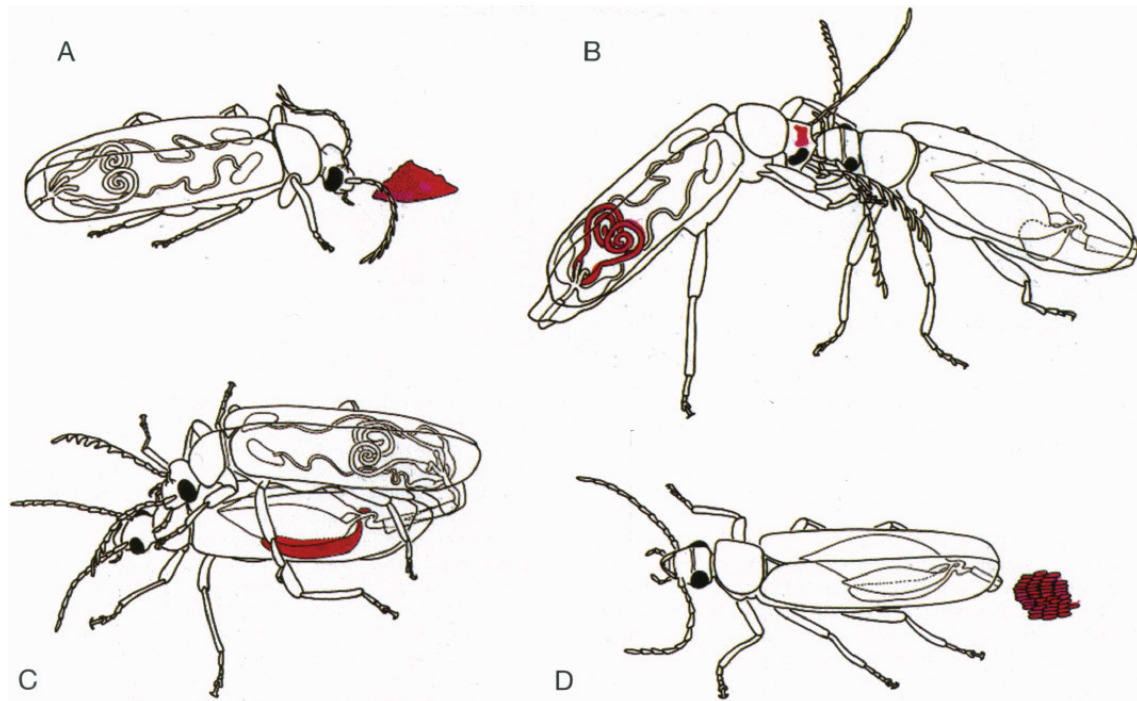


**Slika 1.18.** Reakcija nastanka monoterpenoidnog anhidrida kantaridina razgradnjom seskviterpenskog alkohola farnezola.

Sa ekološke tačke gledano, primer kantaridina veoma je zanimljiv jer može da posluži za razumevanje značajnog dela hemijske zaštite kod zglavkara. U radovima Eisnera i saradnika<sup>26,27</sup> detaljno se ispituje biološki put ovog jedinjenja, gde se vidi da kantaridin u stvari privlači mužjake tvrdokrilca *Neopyrochroa flabellata* (Fabricius 1787)



koji onda ishranom unose ovo jedinjenje (sl. 1.19. A.). Kantaridin se smešta u otvorene žlezde iz kojih ženka uzima ovo jedinjenje tokom procesa udvaranja (sl. 1.19. B.). U mnogo većoj količini mužjak skladišti kantaridin u semenim kesicama i tokom parenja prenosi ovo jedinjenje ženki (sl. 1.19. C.). Nakon parenja, ženka koristi kantaridin kako bi zaštitila jaja od potencijalnih predatora (sl. 1.19. D.). U slučaju vrste *N. flabellata* to su larve tvrdokrilaca *Coleomegilla maculata* (De Geer 1775).



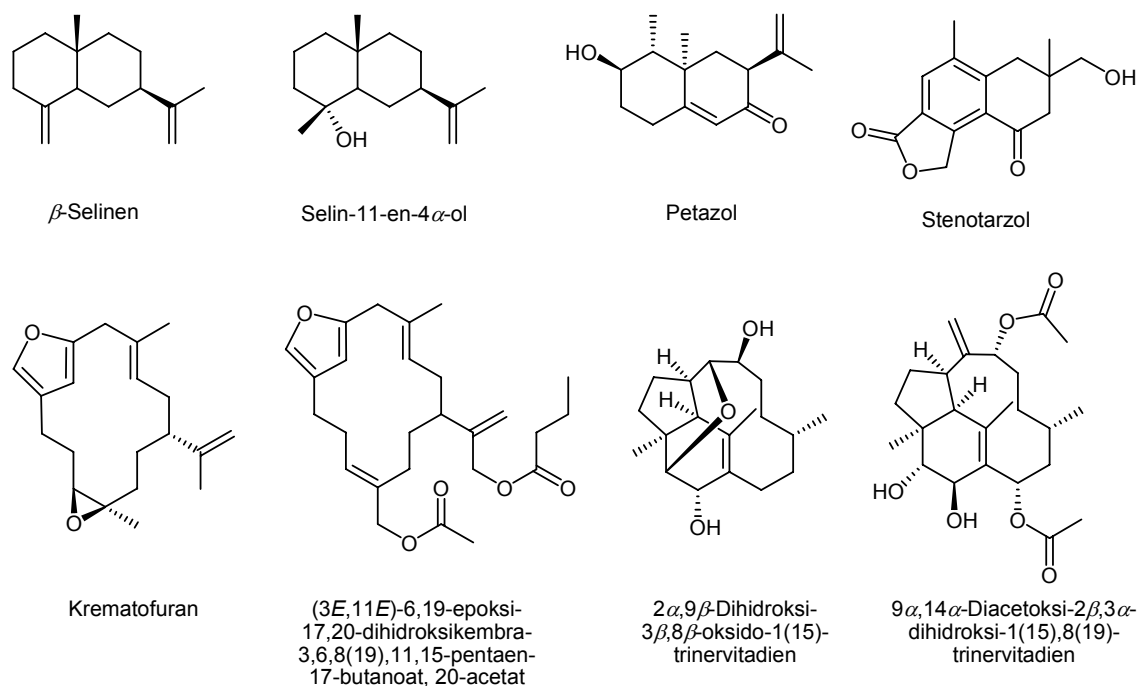
**Slika 1.19.** Upotreba kantaridina kod tvrdokrilaca *Neopyrochroa flabellatai* u ekperimentima profesora Eisnera i saradnika: (A) mužjak unosi ovo jedinjenje ishranom, (B) ženka u procesu udvaranja uzima kantaridin iz njegovih žlezdi, (C) mužjak tokom parenja prenosi ovo jedinjenje u organizam ženke i (D) ženka prenosi kantaridin na jaja. Reprodukivano iz rada Eisner i sar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Ecology* 1996 (93) 6499–6503.

U ovim eksperimentima je potvrđeno da je kantaridin jedinjenje koje se ponaša i kao atraktant i kao odbrambena supstanca. Mužjaci kojima je veštački dodavan kantaridin u žlezde bili su „zanimljiviji“ ženkama, dok su, sa druge strane, mužjaci prvenstveno uzimali hranu kojoj je dodat kantaridin, a ne onu bez njega. Ovaj oblik ponašanja čest je u životinjskom svetu i poznat je kao svadbeni poklon\*.

**Seskviterpeni i diterpeni** su česte odbrambene supstance kod zglavkara. Dva seskviterpena  $\beta$ -selinen i selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (sl. 1.20.) izolovana su iz sekreta leptira *Battus polydamas* (Linnaeus 1758)<sup>28</sup>, dok je za razliku od ostalih srodnih vrsta leptira

\* Engleski naziv je nuptial gift.

primećeno odsustvo organskih kiselina, kao što su buterna i 2–metilbuterna. Dalje, seskviterpenski lakton stenzarzol po prvi put je izolovan iz odbrambenog sekreta tvrdokrilaca *Stenotarsus subtilis* (Arrow 1920) (sl. 1.20.).



**Slika 1.20.** Izabrane strukture seskviterpenskih i diterpenskih odbrambenih jedinjenja prisutnih u sekretima zglavkara.

Odbrambeni sekret larvi moljaca *Tyria jacobaeae* (Linnaeus 1758) veoma je zanimljiv, jer kao i kod drugih vrsta iz familije Actiidae ove jedinice koriste pirolizidinske alkaloide iz biljaka domaćina (najčešće koriste biljke iz roda *Senecio*)<sup>29</sup>. Međutim, pronađena je populacija *T. jacobaeae* koja živi na biljkama iz roda *Petasites*, tako da se kao odbrambene supstance pojavljuju seskviterpen petazol i njemu srodna jedinjenja (sl. 1.20.).

Mravi su već pomenuti kao grupa koja ima interesantnu zaštitu u vidu koncentrovane mravlje kiseline, ali to nije sve što ovi insekti mogu da ponude. Alkaloidi su jedna značajna grupa odbrambenih supstanci koja se može naći kod ovih životinja, ali će o tome biti više reči u sledećem poglavlju. Dugo vremena se znalo da pored alkaloida, mravi iz roda *Crematogaster* u odbrambenim žlezdama sadrže neidentifikovanu grupu odbrambenih jedinjenja – furanokembranoide. Leclercq i saradnici su okarakterisali sedam novih jedinjenja iz dve podvrste mrava *Crematogaster*

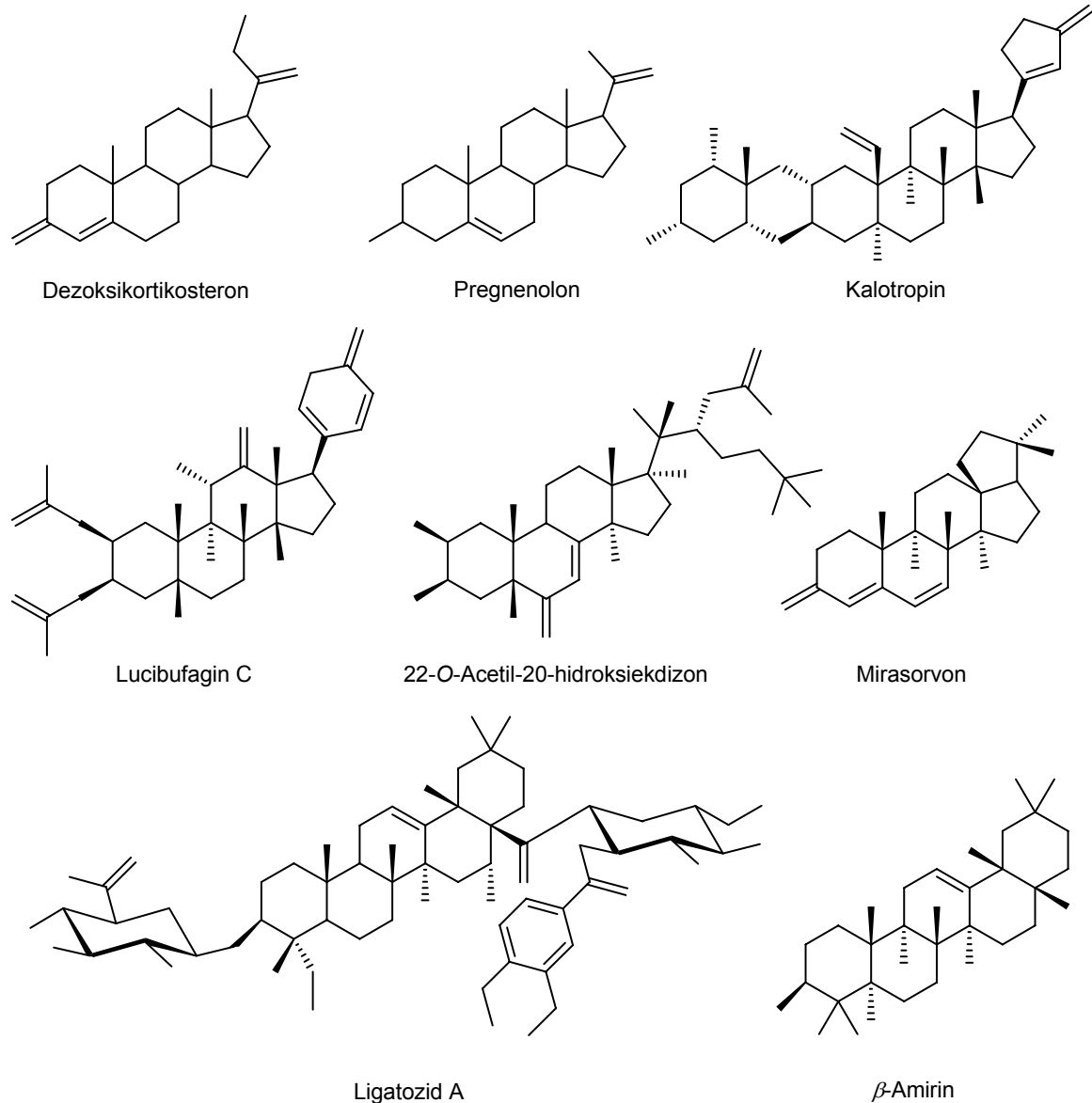
*brevispinosa* (Mayr 1870)<sup>30,31</sup>. Na **sl. 1.20.** prikazane su strukture dva predstavnika ove klase odbrambenih jedinjenja.

Termiti predstavljaju vrste koje proizvode različita odbrambena jedinjenja među kojima važnu ulogu zauzimaju terpenoidi. Nekoliko je zanimljivih terpenoidnih skeleta koji se pojavljuju kod termita, među kojima se nalazi i trinervan. Iz sekreta dve vrste termita *Nasutitermes guayanae* (Holmgren 1910) i *N. surinamensi* (Holmgren 1910) okarakterisano je šest novih trinervanskih derivata, dok su na **sl. 1.20.** prikazane strukture dva najznačajnija predstavnika ove klase jedinjenja.

**Steroidi i triterpeni** predstavljaju važnu grupu odbrambenih jedinjenja kod zglavkara. Kao što je ranije pomenuto, zglavkari nisu u stanju da u potpunosti sintetizuju steroidne molekule, već koriste fitosterole kao prekursore. Tako se na početku metaboličkog puta fitosteroli sa C<sub>28</sub> i C<sub>29</sub> atoma transformišu u holesterol sa C<sub>27</sub> atoma, koji onda postaje polazna tačka za dalje transformacije.

Recimo, vrste iz familije Belostomatidae u odbrambenom sekretu sadrže pregnanske steroide. Vrsta *Abedus herberti* (Hidalgo 1935) koja pripada ovoj familiji koristi dezoksikortikosteron i pregnenolon (**sl. 1.21.**), ali i progesteron i 3–epipregnenolon kao hemijsku zaštitu pre svega od riba<sup>32</sup>. Pregnani su poznati kao biljni hormoni, ali je zanimljivo to da se kod *A. herberti* nalaze u znatno višoj koncentraciji nego što su fiziološke koncentracije kod samih biljaka. Tako jedna jedinka ovog insekta može da sadrži i do 1 mg dezoksikortikosterona (glavne komponente sekreta). Ta količina je dovoljna da trenutno parališe ribu predatora, što insektu omogućava da slobodno izađe iz usta nemoćne ribe.

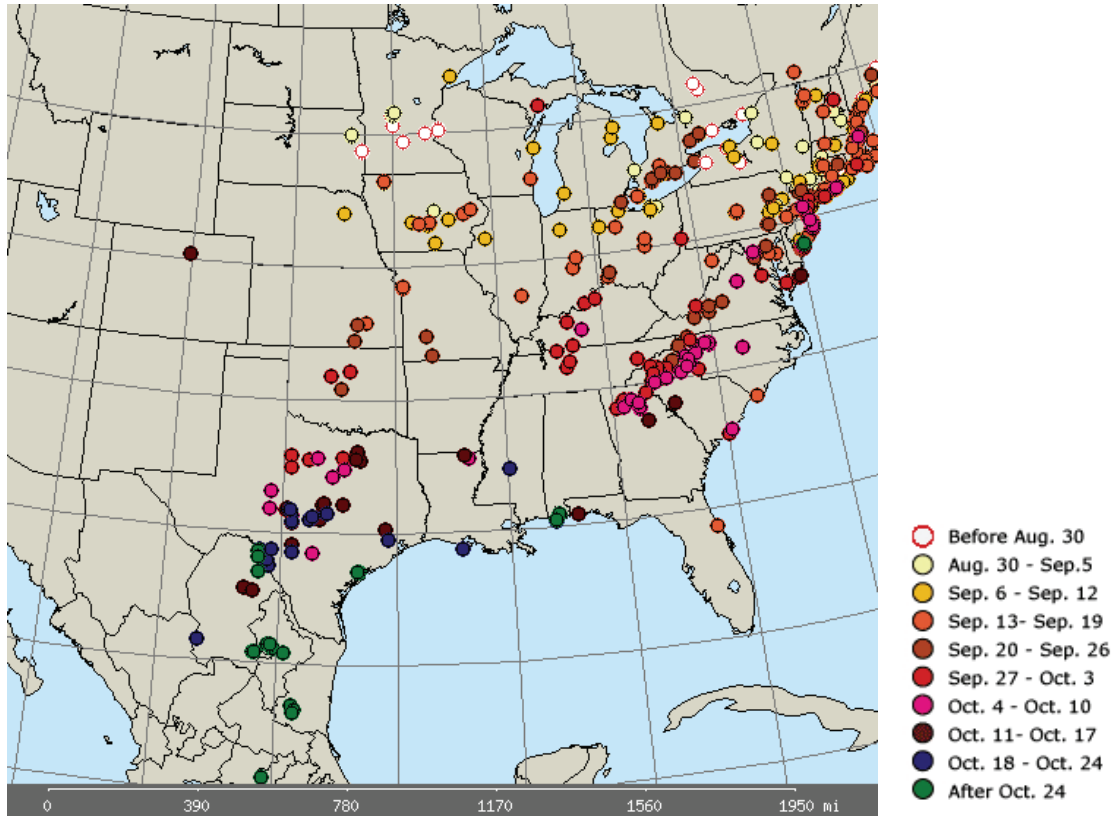
Sa ekološke strane kalotropin je verovatno najviše proučavan steroidni molekul zbog toga što se javlja u odbrambenom sekretu monarh leptira (**sl. 1.5.** i **1.21.**). Ovo



Slika 1.21. Izabrane strukture triterpena i steroida identifikovanih u odbrambenim sekretima zglavkara.

jedinjenje pripada grupi kardenolida, ili kardijačnih glikozida. U odbrambeni sekret leptira stiže iz mlečika koje pripadaju porodici Asclepiadaceae, a koje su glavna hrana larvama ovog leptira. Zanimljivo je svakako posmatrati put koji prelaze monarh leptiri tokom svog života (sl. 1.22.) i kakvu ulogu u tome ima hemijska odbrana (sl. 1.21.). Kada se izlegu iz jaja, ovi leptiri žive u centralnoj Americi, sve do preobražaja, nakon čega kreću na sever. Put traje nekoliko meseci i nekoliko hiljada kilometara. Krajem avgusta jedinke kreću nazad do centralne Amerike, gde završavaju svoj put polažući jaja na istim mestima i biljkama na kojima su i sami rasli. Ove seobe su među najvećim i najbrojnijim u životinjskom svetu, a zbog lepote i nežnosti ovih leptira, one su

svakako najzanimljivije. Da bi monarh leptiri preživeli napade grabljivica tokom ovih migracija zaslužni su kardijačni glikozidi na čelu sa kalotropinom.



**Slika 1.22.** Migracija monarh leptira kroz severnu Ameriku: Bela boja prikazuje mesta gde leptiri provode proleće i leto, a zatim od početka septembra do kraja oktobra osam boja prikazuje nedeljno napredovanje leptira prema krajevima na jugu gde provode zimu (zelena boja).

Još jedan zanimljiv primer u svetu insekata su i svici (familija Lampyridae), ne samo zbog njihove popularnosti koja proističe iz bioluminiscencije\* već i zbog neobične hemijske odbrane koju imaju. Svicu koji se mogu videti u vreme letnjih žetvi su uglavnom mužjaci koji na taj način privlače ženke. Ženke onda odgovaraju na te signale i privlače mužjake svoje vrste u cilju parenja. To je jedan šifrovan svet svetlećih poruka. Ženke iz roda *Photuris* namerno koriste signale drugih vrsta kako bi privuče njihove mužjake i iskoristile ih za ishranu. Ove ženke su poznate kao „fatalne ženke“ i do skoro se pretpostavljalo da je jedini razlog ovakvog ponašanja lako pribavljanje ukusnih obroka, međutim, utvrđeno je da se ženke vrste *Photuris versicolor* (Fabricius 1798) hrane mužjacima iz roda *Photinus* kako bi za sebe pribavile hemijsku odbranu<sup>33</sup>. Do

\* Bioluminiscencija kod svitaca je proces koji se zasniva na transformaciji luciferina u oksiluciferin uz pomoć ATP i enzima luciferaze, pri čemu se oslobađa energija u vidu svetlosti.

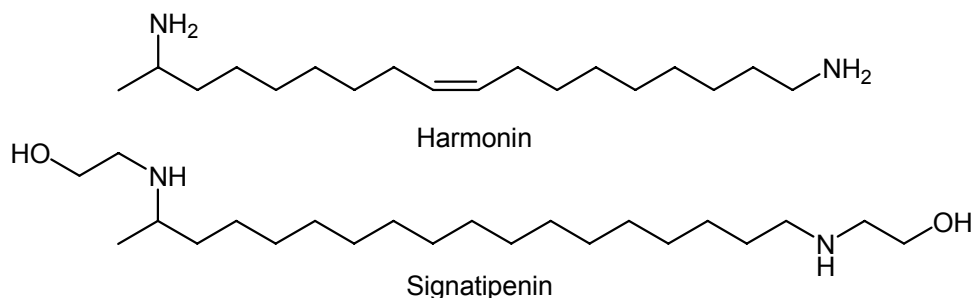
sada je iz roda *Photinus* identifikovano oko 20 različitih steroidnih jedinjenja iz klase lucibufagina, među kojima je najzastupljeniji lucibufagin C (sl. 1.21.).

Pojava ekološke ekonomičnosti se može posmatrati na primeru jedinjenja 22-O-acetil-20-hidroksiekdizona (sl. 1.21.), koji je i univerzalni hormon presvlačenja kod zglavkara i najzastupljenije odbrambeno jedinjenje vrste pauka *Pycnogonum litorale* (Strom 1762). Ovaj ekdizonski derivat je takođe pronađen u odbrambenom sekretu hrizomelidne vrste (Coleoptera) *Chrysolina carnifex* (Fabricius 1792)<sup>34</sup>. Mirasorvon (sl. 1.21.) je još jedan primer oksidovanih pregnanskih derivata koji se nalazi u sekretima koleoptere *Thermonectus marmoratus* (LeConte 1854).

Triterpenoidni saponini se takođe pojavljuju u odbrambenim sekretima hrizomelida (Coleoptera) iz rodova *Platyphora*, *Desmogramma*, *Leptinotarsa* i *Labidomera*. U odbrambenom sekretu vrste *Platyphora ligata* (Stal 1858) pored hlorogenske kiseline i smeše fosfatidilholina, identifikovani su i oleanski terpenoidi ligatozid A (sl. 1.21.) i B. U studiji Ghostin-a i saradnika<sup>35</sup> potvrđeno je da oleanski terpenoidi potiču od  $\beta$ -amirina (sl. 1.21.) kojeg jedinke unose putem ishrane i onda koriste u odbrambene svrhe.

#### **1.1.3.6. Alkaloidi, amini, amidi i srodna jedinjenja u odbrambenim sekretima zglavkara**

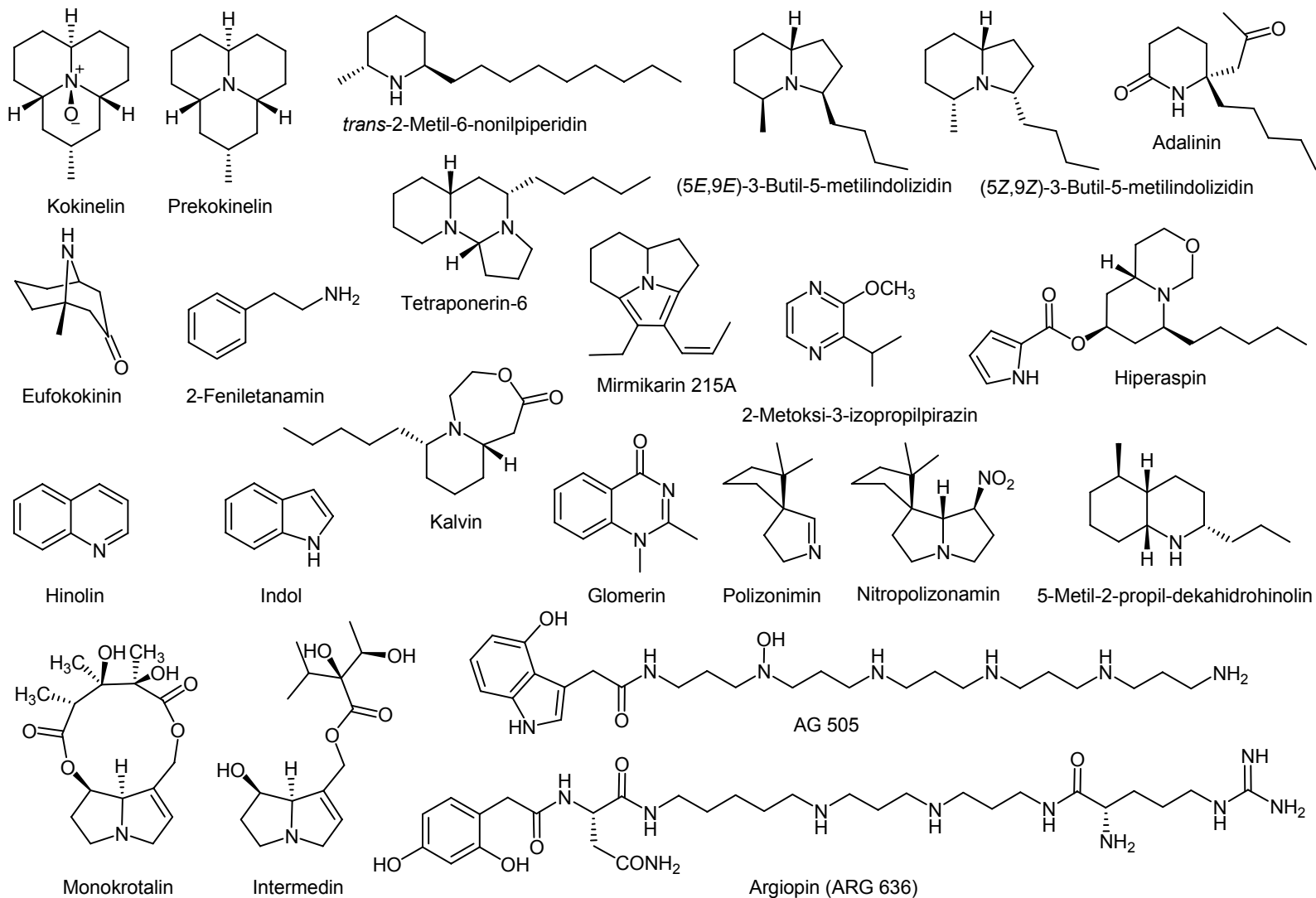
Alkaloidi su među najsloženijim jedinjenjima koja su izolovana iz sekreta zglavkara i zaslužni su za njihovu popularnost kao izvor novih prirodnih proizvoda mnogo decenija unazad. Među odbrambenim alkaloidima kod zglavkara se mogu naći jednostavni alkilamini, pirolidini i piperidini, ali i dosta složeni steroidni, makrolidni i oligociklični alkaloidi. Mnogi odbrambeni alkaloidi zglavkara ne postoje drugde u prirodi, dok se neki alkaloidi pojavljuju kod predatora koji ih dobijaju od zglavkara putem ishrane.



**Slika 1.23.** Odbrambeni aciklički amini identifikovani iz različitih vrsta bubamara.

Aciklični amini se najčešće sreću kao odbrambene supstance kod bubamara. Najpre je diaminooktadecen (**sl. 1.23.**) pronađen kod vrste *Harmonia conformis* (Boisduval 1835) i nazvan harmonin<sup>36</sup>, dok je kasnije identifikovan i kod mnogih drugih bubamara. Zatim je još jedan aciklični amin identifikovan iz novogvinejske vrste bubamare iz roda *Epilachna* i nazvan signatipenin (**sl. 1.23.**)<sup>37</sup>. Što se biosinteze tiče, signatipenin nastaje iz stearinske kiseline i dva molekula serina.

Veliku grupu alkaloida predstavljaju ciklični alkaloidi. Tako su monociklični, biciklični, triciklični, ali i makrociklični i spiroalkaloidi identifikovani kod različitih vrsta zglavkara, na primer, kod opiliona, mrava, koleoptera, paukova, stonoga ili rakova. Pored acikličnih amina, kod bubamara se kao odbrambene supstance pojavljuju i različiti ciklični alkaloidi, kao na primer, kokinelin i prekokinelin (**sl. 1.24.**), koji predstavljaju prvi identifikovani par azafenalenska baza i *N*-oksid<sup>38</sup>. Kasnije su identifikovani i drugi zasićeni, ali i nezasićeni parovi azafenalenskih alkaloida. Pored acikličnih amina i azafenalenskih alkaloida kod od ove grupe insekata pronađeno je još mnogo različitih tipova alkaloida. Nekoliko 2–metoksi–alkil pirazinskih derivata, među kojima je i 2–metoksi–3–izopropilpirazin (**sl. 1.24.**) identifikovano je kod predstavnika familije Coccidae<sup>39</sup>. Ova jedinjenja su veoma neprijatnog mirisa što predstavlja veoma dobru zaštitu od predatora. Iz hemolimfe dve vrste bubamara *Adalia bipunctata* (Linnaeus 1758) i *A. decapunctata* (Linnaeus 1758) identifikovano je nekoliko jedinjenja među kojima je adalinin (**sl. 1.24.**) i njemu srodno biciklično jedinjenje adalin. Ove jedinje koriste refleksno „krvarenje“ kao jedan od načina zaštite, dok jarke boje služe da predatori dobro zapamte žrtvu i kasnije se klone takvih jedinki.



**Slika 1.24.** Izabrane strukture monokličnih, bicikličnih, tricikličnih i spiroalkaloida identifikovanih kao odbrambena jedinjenja zglavkara.



Iz vrste *Hyperaspis campestris* (Herbst 1783) identifikovan je alkaloid hiperaspin koji je u stvari derivat 2-pirolkarboksilne kiseline i 3-oksahinolizidina (sl. 1.24.). Piperidinski lakton kalvin (sl. 1.24.) i njegov epimer 2-epikalvin su identifikovani iz *Calvia quatuordecimguttata* (Linnaeus 1758) i *C. decamguttata* (Linnaeus 1758). Tako je desetak 2,6-dialkilpiperidina i pirolizidina identifikovano iz vrsta roda *Epilachna*. Pored ovih jedinjenja identifikovani su 2-feniletanamin i eufokokinin (sl. 1.24.).

Pored bubamara dosta su proučavane odbrambene supstance kod mrava. Alkaloidi ovih vrsta insekata su u mnogome slični. Tako je, na primer, kod bubamara i mrava poznato više desetina azotovih jedinjenja od kojih su zajednički neki od 2,6-dialkilpiperidinskih derivata (sl. 1.24.), kao i biciklični alkaloid adalin. Primer mrava vrste *Solenopsis maboia* (Snelling 2001) može poslužiti da se razume raznolikost alkaloidnih supstanci. Tako su kod radilica ove vrste okarakterisani (5*E*,9*E*)-3-butil-5-metilindolizidin i njegov (5*Z*,9*Z*)-dijastereoizomer, ali i *trans*-2-metil-6-nonilpiperidin (sl. 1.24.), dok je kod matice identifikovano samo jedno jedinjenje *cis*-2-heptil-6-metilpiperidin.

Nekoliko tricikličnih alkaloida izolovano je iz otrova afričkih mrava iz roda *Myrmecaria*. Na sl. 1.24. prikazan je alkaloid mirmikarin 215A izolovan iz otrova mrava *M. opaciventris* Emery, 1893. Pored ovog alkaloida identifikovan je i *trans*-izomer mirmikarin 215B i zasićeni analog mirmikarin 217. Otrov mrava iz roda *Tetraponera* karakterističan je po prisustvu veoma zanimljive vrste tricikličnih alkaloida nazvanih tetraponerini. Na sl. 1.24. kao primer ovih jedinjenja prikazan je tetraponerin-6. Pored do sada pomenutih alkaloida iz otrova mrava postoji grupa dekahidrohinolinskih derivata koja je identifikovana kod mrava iz roda *Solenopsis*<sup>40</sup>. Kao primer ovih alkaloida na sl. 1.24. prikazan je 5-metil-2-propil-dekahidrohinol.

Pored bubamara i mrava postoji mnogo drugih artropoda koje takođe poseduju zanimljivu alkaloidnu zaštitu. Jedinke opiliona *Oreophoetes peruana* (Saussure 1868) iz reda Phasmatodea poseduju sekret koji predstavlja suspenziju hinolina u vodi (sl. 1.24.). Ovo je jedinstven primer pojavljivanja hinolina u životinjskom svetu, dok se njemu srodno jedinjenje indol (sl. 1.24.) sreće kod nekih vrsta mrava i koleoptera.

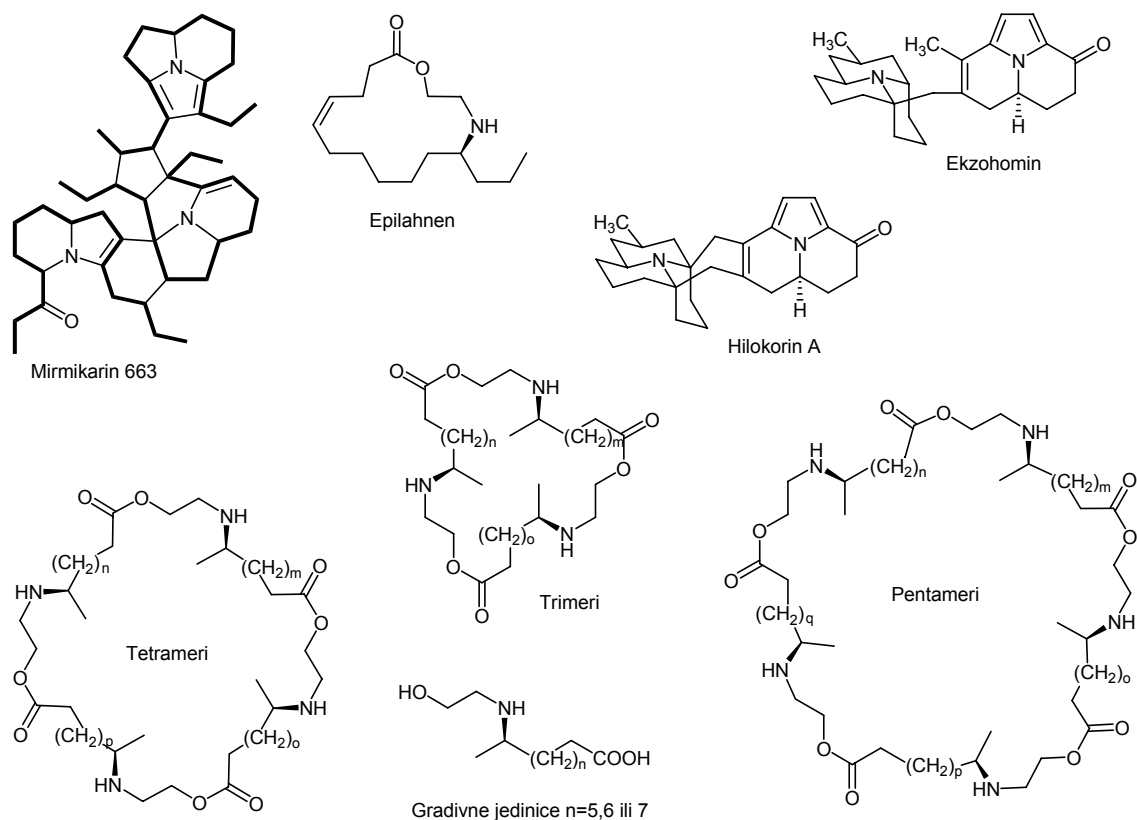
Značajnu alkaloidnu kladu zglavkara predstavljaju stonoge. Tako je kod stonoga reda Glomerida identifikovan alkaloid glomerin i njegov viši homolog homoglomerin,

dok su kod stonoga koje pripadaju redu Polyzoniida nađeni veoma specifični spiroalkaloidi polizonimin i nitropolizonamin (sl. 1.24.).

Važnu grupu jedinjenja koju svrstavamo u grupu „hemijskog oružja“ zglavkara, predstavljaju pirolizidinski alkaloidi čije poreko vodi iz biljaka. Najčešći slučajevi pirolizidinskih alkaloida se sreću kod predstavnika reda Lepidoptera. Tako, kod moljca *Cosmosoma myrodora* (Dyar 1907) sekret se sastoji od pirolizidinskih alkaloida intermedina (sl. 1.24.) i likopsamina čiji izvor predstavljaju biljne vrste kao što je *Eupatorium capillifolium*. Nije redak slučaj u svetu sklonom ekonomičnosti, da se jedna supstanca, uz male izmene, koristi za nekoliko različitih stvari. Tako je monokrotalin odbrambeni alkaloid (sl. 1.24.), dok raskidanjem estarskih veza i jednostavnim biosintetičkim modifikacijama alkaloidne baze od ovog jedinjenja nastaju danaidon i hidroksidanaidal koji imaju funkciju feromona kod ovih vrsta insekata.

Zanimljiva grupa odbrambenih jedinjenja svakako su poliamini identifikovani uglavnom iz otrova paukova i nekih vrsta osa iz roda *Philanthus*. Ova jedinjenja najčešće poseduju linearni  $\alpha,\omega$ -diamino-poliazaalkanski lanac koji je na jednom kraju često modifikovan aromatičnom acil-grupom. Tako su iz familija paukova Araneidae i Agelenidae identifikovani acilpoliamini argiopin (nazvan još i ARG 636) i AG 505 (nazvan još i HO 505 ili AGEL 505) (sl. 1.24.). Argiopin je pronađen kod paukova koji pripadaju rodu *Argiope* (Araneidae), dok je AG 505 pronađen kod rodova *Agelenopsis* i *Hololena* (Agelenidae).

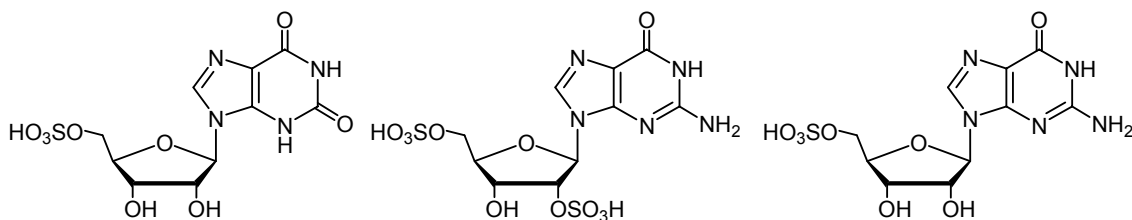
Lutke dve vrste bubamara iz roda *Epilachna* imaju veoma interesantnu hemijsku odbranu koja se sastoji iz makrolidnih laktona i poliazamakrolidnih struktura. Iz odbrambenog sekreta vrste *E. varivestis* (Mulsant 1850) identifikovano je pet makrolidnih laktona sa četrnaestočlanim i petnaestočlanim prstenovima, među kojima je i epilahnen (sl. 1.25.). Ova jedinjenja nastaju laktonizacijom masnih kiselina koje poseduju hidroksietilamino grupu. Druga vrsta bubamara *E. borealis* (Fabricius 1775) proizvodi nekoliko stotina različitih poliazamakrolida, koji nastaju kao proizvod slučajnih polimerizacija tri osnovne gradivne jedinice (2-hidroksietilamino zasićenih masna kiselina sa 9, 10 i 11 C atoma) (sl. 1.25.).



**Slika 1.25.** Izabrane strukture dimernih kokinelinskih derivata, makrocikličnih laktona, poliazamakrolida zajedno sa strukturama gradivnih jedinica identifikovanih u sekretima bubamara i otrovima mrava. Struktura mirmikarina 663 ne predstavlja raspored hemijskih veza u prostoru već prikazuje tri C15 lanca od kojih je ovo jedinjenje izgrađeno.

Polimerizacijom dva različita triciklična alkaloida bubamare iz rodova *Exochomus* i *Chilocorus* su biosintetizovale jedinstvene prirodne proizvode. Timmermans i saradnici su prvo izolovali heksaciklični alkaloid egzohomin iz vrste *E. quadripustulatus* (Linnaeus 1758)<sup>41</sup>, dok su kasnije iz *C. cacti* (Linnaeus 1767) i *C. renipustulatus* (L.G.Scriba 1791) identifikovana još četiri srodna jedinjenja nazvana hilokorini A–D<sup>42</sup>. Na **sl. 1.25.** prikazani su egzohomin i hilokorin A, kao primeri heksa- i heptacikličnih alkaloida.

Ranije pomenuti afrički mravi koji pripadaju rodu *Myrmecaria* u svom otrovu imaju ne samo monomerne alkaloidne nazvane mirmikarini (**sl. 1.24.**), već i dimerne i trimerne oblike, koji zadržavaju istu nomenklaturu, odnosno dobijaju imena na osnovu molekulske mase. Na **sl. 1.25.** prikazana je struktura mirmikarina 663 gde je umesto prostornog rasporeda zadebljanim linijama prikazano postojanje tri niza od po 15 ugljenikovih atoma, tako da je ova komplikovana struktura značajno pojednostavljena.



**Slika 1.26.** Izabrani sulfatni nukleozidi identifikovani u otrovu paukova iz rodova *Hololena*, *Tegenaria* i *Loxosceles*.

Pored do sada pomenutih azotovih jedinjenja (acilpoliamina) u otrovu paukova nalaze se još i slobodne amino kiseline, njihovi derivati, oligopeptidi i na kraju proteini. Iz otrova paukova koji pripadaju rodovima *Hololena*, *Tegenaria* i *Loxosceles* identifikovano je nekoliko sulfatnih nukleozida<sup>43</sup>, od kojih su tri prikazana na **sl. 1.26**. Ova jedinjenja do sada nisu poznata iz nekog drugog izvora, ali se pretpostavlja da je njihova rasprostranjenost veća zbog toga što većina ranije korišćenih tehnika nisu bile odgovarajuće za analizu ovakvih jedinjenja. Tek je upotrebom NMR tehnika direktno u otrovu dokazano prisustvo ove klase jedinjenja.

## 1.2. Osnovne karakteristike analiziranih vrsta stonoga (Arthropoda, Myriapoda)

Stonoge ili Myriapoda predstavljaju subfilum zglavkara (Arthropoda) koji obuhvata četiri klase: Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda i Symphyla. Myriapoda su dobile ime od starogrčkih reči μύριος, μυριάδες (mirios, miriades<sup>\*</sup>), što znači bezbroj, beskonačno, beskrajno (dok u modernom grčkom jeziku označava broj 10 000) i ποδός (podós), što znači noga. U našem jeziku postoji samo jedan termin, *stonoge* i on podrazumeva sve Myriapoda *sensu lato*. Radi preciznosti uvek se mora naglasiti o kojim taksonima stonoga se radi, tako da se govori (i piše) stonoge iz klase diplopoda ili stonoge iz klase hilopoda. Anglosaksonski termin za diplopode je „millipedes“ (bukvalni prevod hiljadunoge), dok je za hilopode „centipedes“ (bukvalni prevod stonoge). Ovde je zanimljivo napomenuti da do sada ne postoje stonoge koje imaju hiljadu nogu i da je vrsta sa najvećim brojem nogu sifonorinidna vrsta diplopoda *Illacme plenipes* (Cook & Loomis 1928), kod koje je izbrojano „samo“ 750 nogu. Bez obzira na to što je ova vrsta duga svega par centimetara, ona je svakako Ginisov rekorder po broju nogu. Još jedan podatak za Ginisovu knjigu je i činjenica da je na osnovu fosilnih ostataka stonoga zaključeno da su predačke forme stonoga živele u periodu kasnog Silura<sup>†</sup> i da su verovatno bile prve životinje koje su „ispuzale“ iz praokeana i nastanile terestrična staništa, mnogo godina pre pojave dinosaurus. Arthropleura je na osnovu do sada pronađenih fosilnih ostataka proglašena za najvećeg beskičmenjaka svih vremena, jer je mogla da naraste i do 2,6 m. Stonoge i drugi zemljišni zglavkari iz tog vremena bile su značajno veće nego njihovi potomci koji danas žive na zemlji. Razlog leži u količini kiseonika u tadašnjoj atmosferi, odnosno u njegovom velikom parcijalnom pritisku. Kako se njegova koncentracija smanjivala tokom vremena tako se smanjivala i veličina jedinki. Recentne diplopode mogu da žive od jedne do deset godina.

---

\* Preuzet engleski naziv je „myriad“ i označava neodređenu ali veliku količinu.

† Silur je period od pre 443,7–416,0 miliona godina.

### 1.2.1. Stonoge iz klase Diplopoda

Diplopode su raznovrsna grupa zemljišnih zglavkara sa preko 12 000 opisanih vrsta i sa pretpostavljenim diverzitetom od oko 80 000 vrsta<sup>44</sup>. Do sada je opisano 16 redova recentnih i osam redova izumrlih diplopoda.

Značajna karakteristika diplopoda po kojoj su i dobile ime je postojanje dva para nogu na većini pleurotergita\*. Tačnije, telo kod diplopoda je sastavljeno od glave i trupa. Prvi pleurotergit (kolum) ne poseduje noge za hodanje, sledećih nekoliko pleurotergita poseduju po jedan par nogu, a nakon toga pleurotergiti poseduju po dva para nogu za hodanje. Poslednji somit ne poseduje noge za hodanje. Na pleurotergitima (od šestog do poslednjeg pleurotergita sa nogama za hodanje) se kod juliformnih stonoga nalazi po par odbrambenih žlezda (ozadena), koje se ozoporama na lateralnoj strani somita otvaraju u spoljašnju sredinu. Kod navedene grupe diplopoda ozadene su jasno uočljive, međutim, kod polidezmidnih diplopoda ove strukture nisu tako jasno izražene i otvaraju se na lateralnim stranama paranotuma (izraštaji na somitima), najčešće na V, VII, IX, X, XII, XIII i XV–XIX pleurotergitu.

Diplopode su široko rasprostranjene na zemlji i najčešće žive na skrovitim mestima, ispod kamenja, oborenih stabala, u zemljištu, često i u pećinama. Dužina tela se kreće od nekoliko milimetara pa do 30 cm. Ove stonoge su poznate i po svojoj hemijskoj odbrani na osnovu koje se mogu rasporediti u odgovarajuće klade, o čemu će više reči biti u poglavlju Naši radovi.

Najznačajnija uloga diplopoda u terestričnim staništima je u razgradnji organske materije, pre svega uginulog biljnog materijala. U borealnim četinarskim šumama†, stonoge koje pripadaju klasi diplopoda, prema istraživanjima Carcamo–a i saradnika<sup>45</sup>, u stanju su da prerade i do 36 procenata godišnjeg četinarskog otpada. Zanimljivo je da neke od vrsta diplopoda mogu da se hrane živim biljkama i samim tim da se ponašaju kao štetočine. Tako, na primer, neke vrste Polyzoniida i Siphonophorida imaju prilagođen usni aparat za sisanje biljnih sokova (naročito iz korena) i, kako je ranije napomenuto, mogu da koriste sekundarne metabolite iz biljaka za svoju odbranu. Stonoge iz reda Platydesmida se hrane gljivama, vrste iz reda Penicillata se često hrane

\* Pleurotergit je termin koji označava segmentisan deo tela kod stonoga iz klase Diplopoda.

† Boreal je područje koje se prostire južno od Arktičkog kruga.

algama iz kore, dok postoje i neke vrste koje žive na drveću kao na primer *Zoosphaerium arboREALIS* (Cook 1875)<sup>44</sup>. Prema raspoloživim literaturnim podacima jedino su predstavnici reda Callipodida karnivori i hrane se sitnim insektima i glistama.

U našim radovima ispitivane su odbrambene supstance kod 15 vrsta diplopoda, iz pet redova.

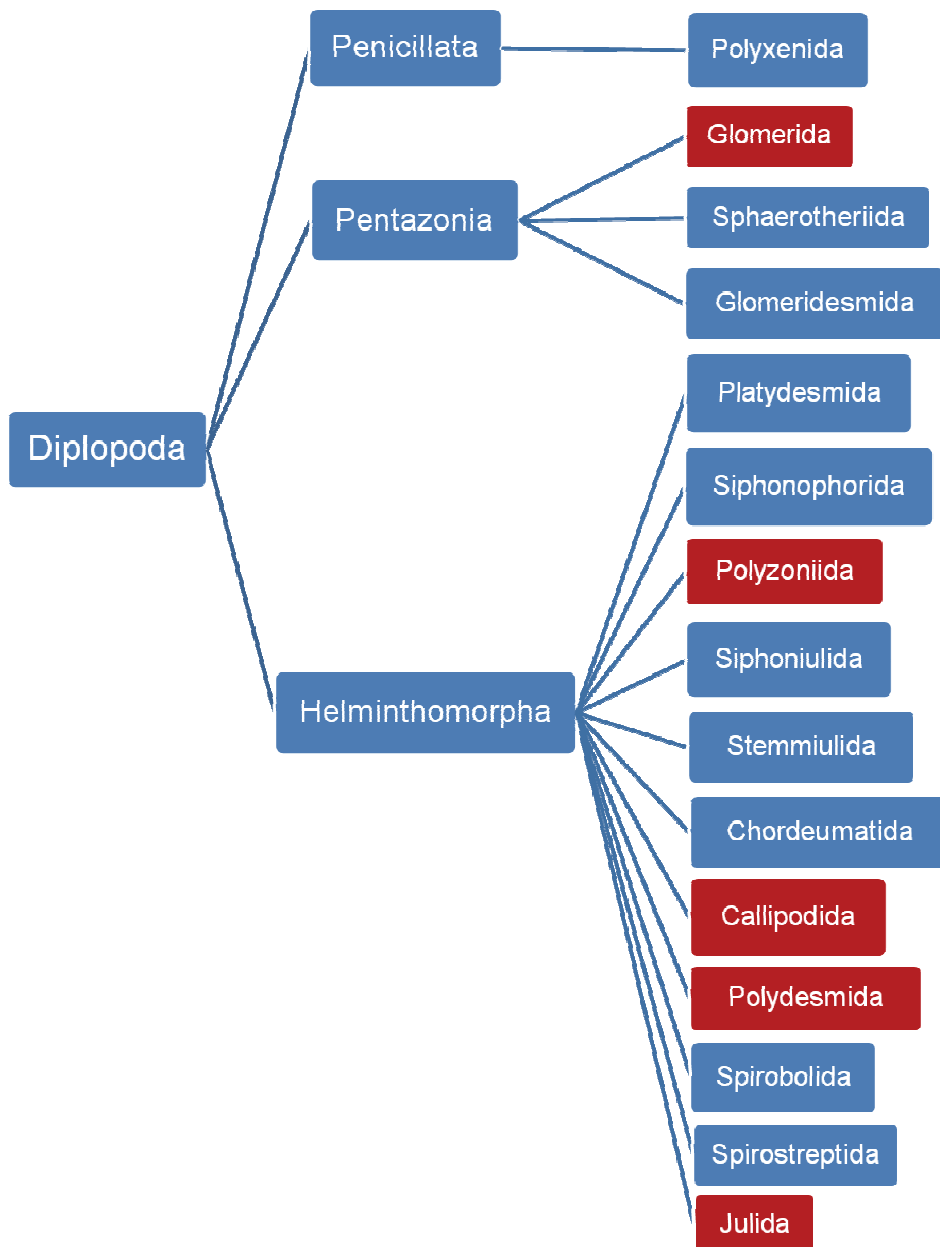
Iz reda Callipodida ispitivane su dve vrste: *Apfelbeckia insculpta* (C. L. Koch 1867) i *Callipodella fasciata* (Latzel 1882). Obe vrste pripadaju familiji Schizopetalidae. Ovaj red broji više od 200 opisanih vrsta, koje se mogu naći u Severnoj Americi, Evropi, zapadnoj i jugoistočnoj Aziji odnosno u južnoj Kini<sup>44</sup>.

Iz reda Polydesmida ispitivane su ukupno četiri vrste koje pripadaju familiji Polydesmidae i to: *Polydesmus complanatus* (Linnaeus 1761), *Brachydesmus avalae* (Ćurčić & Makarov 1997), *Brachydesmus dadayi* (Verhoeff 1898) i *Brachydesmus troglobius* (Daday 1889). Ovaj red broji više od 5 000 vrsta široko distribuiranih vrsta<sup>44</sup>.

Iz reda Polyzoniida ispitivana je vrsta *Polyzonium germanicum* (Brandt 1837), koja pripada familiji Polyzoniidae. Ovaj red broji više od 120 vrsta rasprostranjenih u Severnoj Americi, Evropi, južnoj Africi, jugoistočnoj Aziji, Novom Zelandu, ostrvima u Indijskom okeanu<sup>44</sup>, na Balkanskom poluostrvu je najčešća vrsta *P. germanicum*<sup>46</sup>.

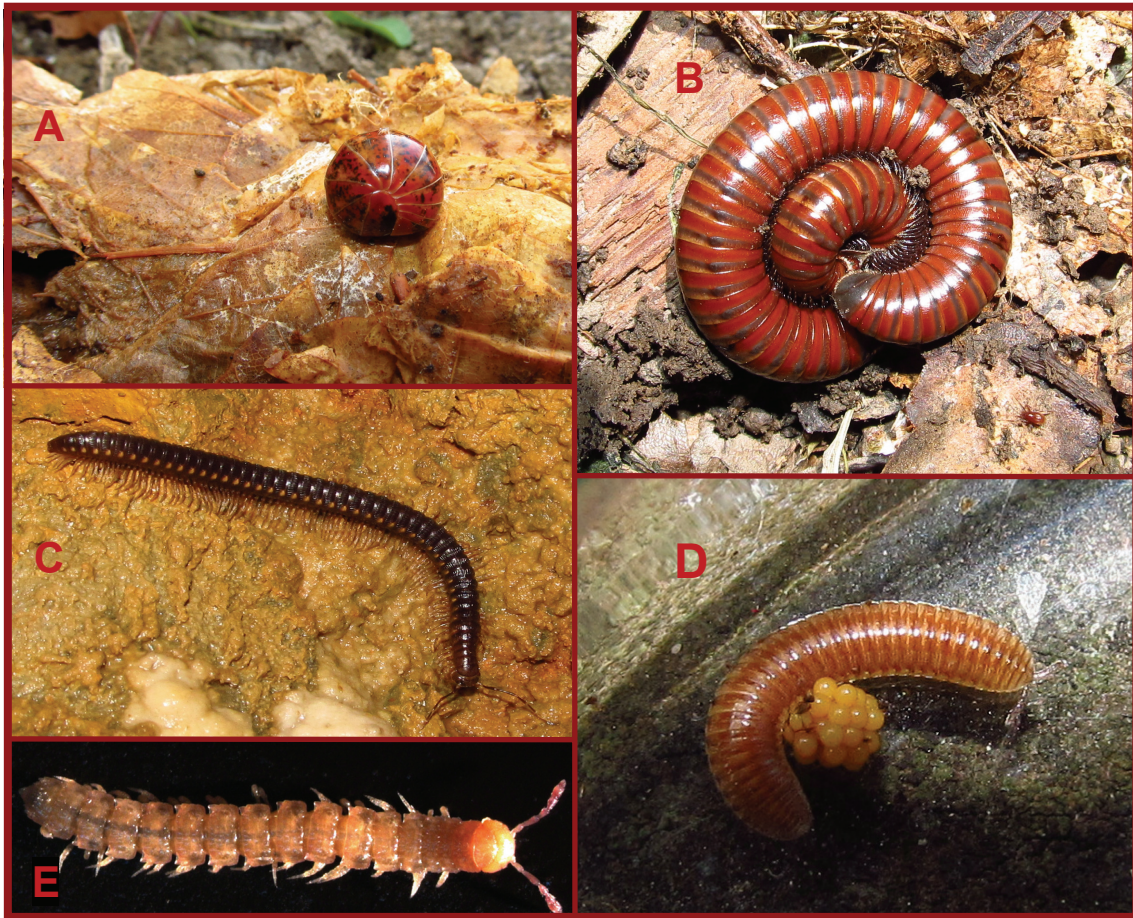
U okviru reda Julida ispitivano je ukupno šest vrsta: *Julus terrestris* (Berlese 1884), *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch 1847), *Leptoiulus trilineatus* (C. L. Koch 1847), *Megaphyllum bosniense* (Verhoeff 1897), *Megaphyllum austriacum* (Latzel 1884) i *Megaphyllum unilineatum* (C. L. Koch 1838). Ovaj red broji više od 1 300 opisanih vrsta, poglavito sa holarktičkom distribucijom<sup>44</sup>. Zajedno sa redovima Spirostreptida i Spirobolida čine Juliformnu grupu stonoga.

Iz reda Glomerida ispitivane su dve vrste: *Glomeris klugii* (Brandt 1833) i *Onychoglomeris herzegowinensis* (Verhoeff 1898). Red Glomeris sadrži 30 rodova i više od 450 opisanih vrsta raspoređenih na severnoj hemisferi i u jugoistočnoj Aziji<sup>47</sup>.



**Slika 1.27.** Filogenetsko stablo stonoga iz klase Diplopoda (Hoffman, 1980); redovi kojima pripadaju analizirane vrste označeni su crvenom bojom.





Slika 1.28. Slike izabranih vrsta diplopoda:

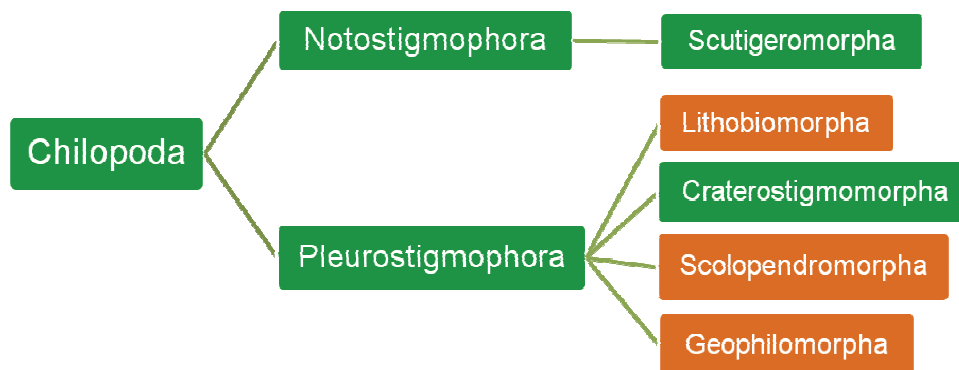
**A:** *Glomeris klugii* (Brandt 1833), **B:** *Julus terrestris* (Berlese 1884), **C:** *Apfelbeckia insculpta* (C. L. Koch 1867), **D:** *Polyzonium germanicum* (Brandt 1837) i **E:** *Brachydesmus troglobius* (Daday 1889).

### 1.2.2. Stonoge iz klase Chilopoda

Stonoge iz klase Chilopoda predstavljaju veoma važnu klasu predatorskih zglavkara sa oko 3 300 opisanih vrsta klasifikovanih u pet recentnih redova i jednom koji pripada izumrlim hilopodama<sup>48</sup>. Ove stonoge su raspoređene na svim kontinentima osim Antartika.

Kao i kod stonoga iz klase Diplopoda glavnu karakteristiku stonoga iz klase Chilopoda predstavlja telo sastavljeno iz segmenata, dok je razlika u tome što se kod hilopoda na svakom segmentu nalazi po jedan a ne po dva para nogu. Prvi par nogu im je modifikovan u mandibule, organe slične žaokama, koje služe za ubrizgavanje otrova u žrtve kojima se hilopode hrane. Posle „prvog para“ nogu sledi niz segmenata od 15–191, koliko ih je maksimalno pronađeno do sada. Zanimljivo je da se kod nekih vrsta hilopoda iz redova Scolopendromorpha i Geophilomorpha jedinke rađaju sa istim brojem segmenata koje imaju i odrasle jedinke (epimorfoza). Nasuprot tome, postoje jedinke koje se rađaju sa značajno manjim brojem segmenata nego odrasle jedinke i onda dolazi do povećanja broja segmenata sa svakim novim presvlačenjem do kraja života (eunamorfoza) ili se broj segmenata povećava do konačnog broja nakon čega se jedinka više ne presvlači (teloanamorfoza), kao u slučaju polidezmidnih diplopoda.

Pored otrova iz mandibula ove životinje poseduju hemijsku odbranu u kojoj koriste cijanovodonik i njemu srodna jedinjenja za izbegavanje neprijatelja ili za zaštitu legla. O hemijskoj odbrani kod hilopoda biće više reči u poglavlju Naši radovi u kojima su ispitivane odbrambene supstance kod šest vrsta hilopoda, iz tri reda.



**Slika 1.29.** Filogenetsko stablo stonoga iz klase Chilopoda (Edgecombe i Giribet 2007); redovi kojima pripadaju analizirane vrste označeni su narandžastom bojom.

Iz reda Lithobiomorpha ispitivana je vrsta *Eupolybothrus transsylvanicus* (Latzel 1882) koja pripada familiji Lithobiidae.

Iz reda Scolopendromorpha ispitivana je vrsta *Cryptops parisi* Brolemann 1920, koja pripada familiji Cryptopidae.

U okviru reda Geophilomorpha ispitivane su četiri vrste: *Strigamia crassipes* (C. L. Koch 1835), koja pripada familiji Linotaeniidae, *Henia illyrica* (Meinert 1870) koja pripada familiji Dignathodontidae, *Clinopodes flavidus* (C. L. Koch 1847), koji pripada familiji Geophilidae i *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767), koji pripada familiji Himantariidae.



**Slika 1.28.** Slike izabranih vrsta hilopoda:

**Gore:** *Eupolybothrus transsylvanicus* (Latzel 1882), **u sredini levo** *Henia illyrica* (Meinert 1870), **u sredini desno** *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767) i **dole** *Clinopodes flavidus* (C. L. Koch 1847).

## 2. NAŠI RADOVI

Cilj ovog rada bio je ispitivanje odbrambenih supstanci stonoga iz klasa Diplopoda i Chilopoda. Ukupno je analizirana 21 vrsta, 15 Diplopoda i 6 Chilopoda. Vrsta *Apfelbeckia insculpta* poslužila je kao inicijalni model–sistem za ispitivanje najboljeg načina za pripremu uzoraka, prvenstveno zbog svoje veličine i dostupnosti, kao i zbog jednostavnosti sekreta koje su imale do tada ispitivane kalipodidne vrste. Uzorci navedene vrste su pripremani iritiranjem jedinki uz pomoć vakuum cevčica sa aktivnim ugljem, filter–papirom i ekstrakcijom organskim rastvaračima različitih polarnosti, kao i disekovanjem odbrambenih vezikula. Kao najbolji način za pripremu uzoraka i kasniju identifikaciju odbrambenih supstanci pokazala se ekstrakcija organskim rastvaračima većeg broja jedinki. Broj jedinki prvenstveno zavisi od njihove veličine, tako da je za ekstrakciju vrste *Julus terrestris* korišćena samo jedna jedinka, dok je za ekstrakciju vrste *Brachydesmus avalae* bilo neophodno i nekoliko desetina jedinki.

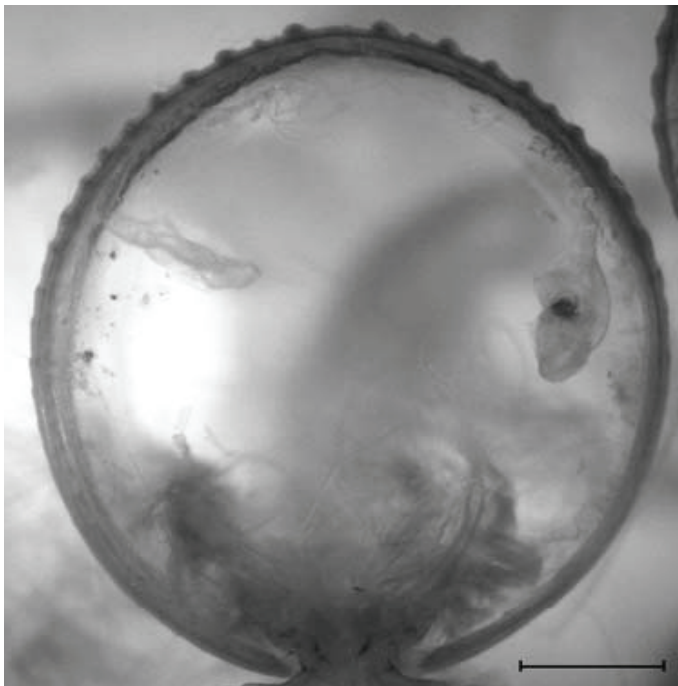
U zavisnosti od identifikovanih jedinjenja i izgleda sekreta, neke vrste su testirane na prisustvo cijanovodonika (pikrinski test) i na prisustvo odbrambenih supstanci proteinske prirode (Bradford–ov test i elektroforeza).

Najznačajnija hibridna tehnika za identifikaciju odbrambenih supstanci bila je gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC–MS) i to u uslovima elektronske i hemijske jonizacije. Pored toga, korišćena je i tečna hromatografija/masena spektrometrija (LC–MS) u uslovima pozitivne i negativne elektosprej jonizacije (ESI).

Za određivanje strukture najzastupljenijih komponenti odbrambenih sekreta korišćene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija, zajedno i sa višepulsnim tehnikama kao što su, COSY, NOESY, DOSY, DEPT HSQC i HMBC. U pojedinim eksperimentima korišćene su i  $^{15}\text{N}$  HSQC i  $^{15}\text{N}$  HMBC tehnike.

## 2.1. Odbrambene supstance predstavnika klase Diplopoda – Rezultati

Stonoge iz klase Diplopoda\* proizvode različite odbrambene sekrete iz specijalizovanih žlezda, koje su najčešće raspoređene tako da se po jedan par žlezda nalazi na svakom pleurotergitu. Na **sl. 2.1.** prikazan je poprečni presek jedne takve žlezde kod vrste koja pripada redu Callipodida. Jedinke koje pripadaju ovom redu



**Slika 2.1.** Odbrambena žlezda jednog središnjeg pleurotergita kod mužjaka vrste *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch 1867). Pogled sa prednje strane. Skala je 2 mm.

vrste koje pripadaju redovima Chordeumatida, Sphaeriotheriida i Siphoniulida uopšte nemaju odbrambene žlezde.

proizvode *p*-krezol i njemu srodna jedinjenja, dok one iz redova Julida, Spirostreptida i Spirobolida, proizvode hinonska jedinjenja.

Alkaloidi su odbrambene supstance registrovane kod redova Polyzoniida i Glomerida, dok je kod Glomerida uočeno i prisustvo proteinskih struktura u odbrambenom sekretu.

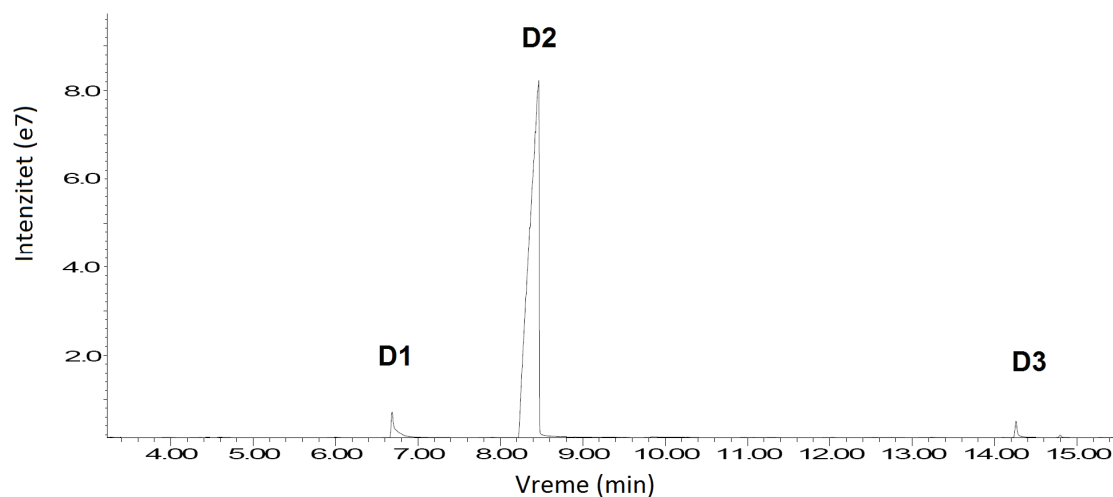
Cijanogeneza je registrovana kod pet familija u okviru reda Polydesmida.

Odbrambeni sekreti nisu poznati kod redova Siphonophorida, Stemmiulida i Platydesmida, dok

\* Engleski jezik poznaje naziv Millipedes, za stonoge iz klase Diplopoda, a takođe i naziv Centipedes, za stonoge klase Chilolopoda, dok naš jezik poznaje samo naziv stonoge za obe klase.

### 2.1.1. Odbrambene supstance predstavnika familije Schizopetalidae (Diplopoda, Callipodida)

Iz familije Schizopetalidae ispitivane su dve vrste: *Apfelbeckia insculpta* i *Callipodella fasciata*. Kao što je ranije napomenuto, vrsta *A. insculpta* poslužila je za pronalaženje najoptimalnijeg načina za pripremu uzoraka, kao i najboljih parametara instrumentalnih tehnika koje će se kasnije koristiti. Kao što je istaknuto ranije, izabrana je navedena vrsta zbog krupne veličine tela, relativno lakog prikupljanja, kao i niza primitivnih karakterata koji ukazuju na njen endemo–reliktni status. Najbolje rezultate je pokazalo ekstrahovanje organskim rastvaračem većeg broja jedinki u što manjoj zapremini rastvarača. Najbolji rezultati su se dobijali u metilen–hloridu i *n*–heksanu (priprema za GC–MS) i deuterohloroformu (priprema za NMR). Gasni i gasno–maseni hromatogrami ukupnog metilen–hloridnog ekstrakta *A. insculpta* (sl. 2.2.) pokazali su prisustvo krezola kao glavne komponente sekreta dobijenog ekstrakcijom metilen–hloridom. Pošto se maseni spektri i retencionna vremena *o*–, *m*– i *p*–izomera neznatno razlikuju, snimljen je <sup>1</sup>H NMR spektar (sl. 2.3.), na osnovu čega je potvrđeno da je glavna komponenta odbrambenog sekreta *p*–krezol.

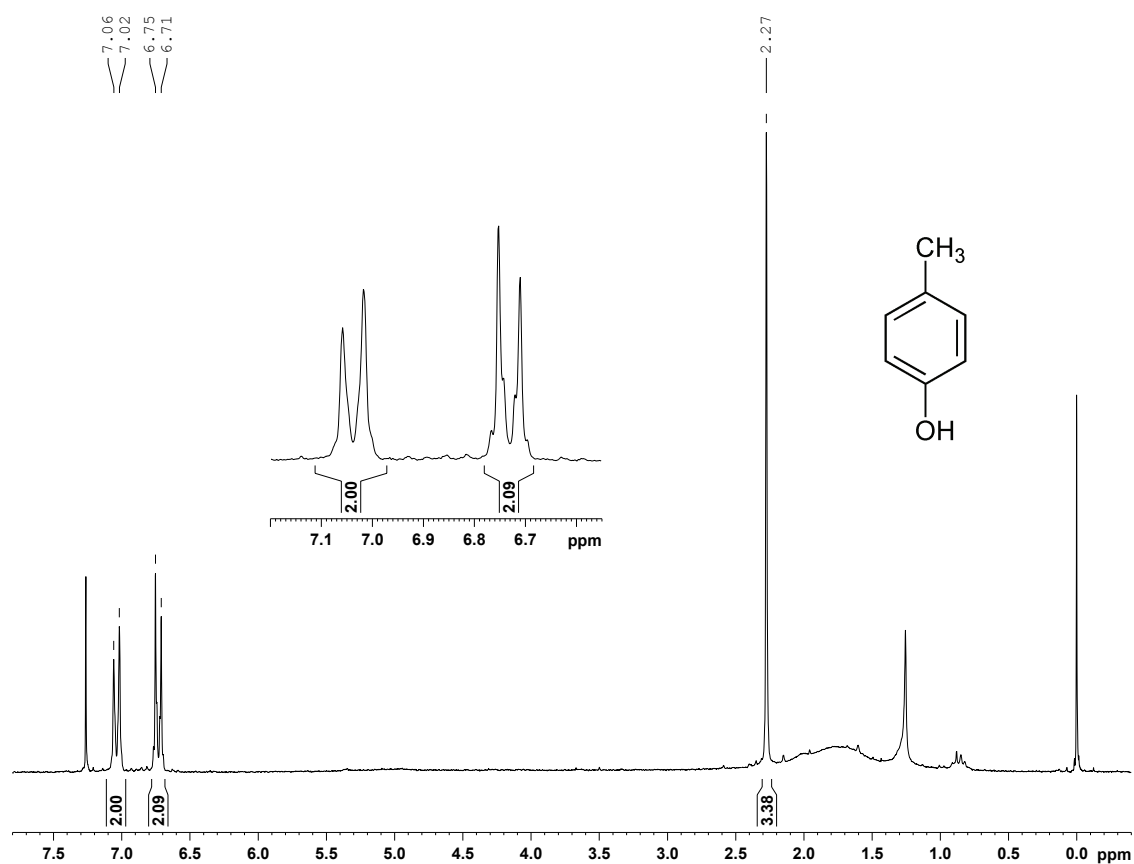


Slika 2.2. GC–FID hromatogram metilen–hloridnog ekstrakta vrste *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch 1867).

U <sup>1</sup>H NMR spektru deuterohloroformskog ekstrakta uočeni su signali metil grupe na hemijskom pomeranju od 2,27 ppm i signali aromatičnih protona AA' BB'

spinskog sistema (2H;  $\delta$  6,73 ppm;  $J$  8Hz i 2H  $\delta$  7,04 ppm;  $J$  8Hz) koji odgovaraju *p*-krezolu.

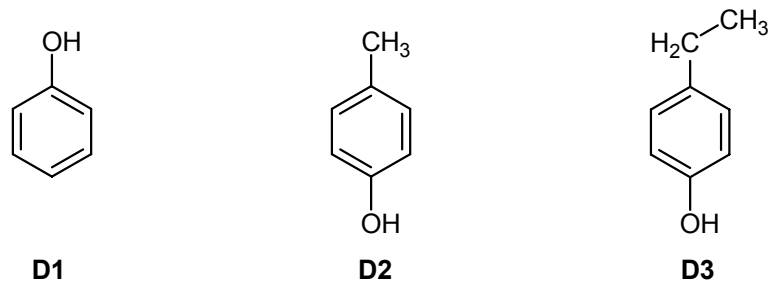
Pored GC–FID i GC–MS spektara snimljenih tehnikom elektronske jonizacije (GC–EI–MS) za identifikaciju nepoznatih jedinjenja korišćeni su i GC–MS spektri snimljeni tehnikom hemijske jonizacije (GC–CI–MS) uz metan i izobutan kao gasove za jonizaciju. Ovako dobijeni hromatogrami (snimljeni pod istim uslovima) poslužili su za određivanje molekulskih masa svih jedinjenja, odnosno za identifikaciju svih pikova.



**Slika 2.3.** <sup>1</sup>H NMR–Spektar (200 MHz) CDCl<sub>3</sub> ekstrakta vrste *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch 1867).

Na osnovu svih pomenutih rezultata identifikovana su tri jedinjenja (sl. 2.4.) i to: fenol (**D1**), *p*-krezol (**D2**) i *p*-etilfenol (**D3**)\*.

\* Spektralni podaci ovih jedinjenja su prikazani u **Ekspeimentalnom delu** u pasusu *Spektralni podaci identifikovanih jedinjenja*.



**Slika 2.4.** Identifikovana jedinjenja u metilen–hloridnom ekstraktu sekreta jedinki iz familije Schizopetalidae

Na isti način kao i *A. insculpta* ispitivana je i vrta *C. fasciata*. Uporedna analiza ovih vrsta pokazala je veliku sličnost odbrambenih sekreta u okviru familije Schizopetalidae (**tabela 2.1.**).

**Tabela 2.1.** Sastav odbrambenih sekreta kod *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch 1867) i *Callipodella fasciata* (Latzel 1882) analiziranih GC–FID i GC–MS tehnikama

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Procentni sastav	
			<i>A. insculpta</i>	<i>C. fasciata</i>
6,7	978	<b>D1</b> fenol	2,9	3,5
8,4	1082	<b>D2</b> krezol	97,0	96,5
14,3	1475	<b>D3</b> <i>p</i> -etilfenol	0,1	u tragu

Kod obe vrste sekret je kao glavno odbrambeno jedinjenje sadržavao *p*-krezol. Relativni odnos komponenti dobijen je na osnovu odnosa površina pikova u GC–FID hromatogramima. Između ove dve vrste nisu pronađene značajnije razlike u odbrambenom sekretu, dok njihov sastav potvrđuje rezultate dosadašnjih ispitivanja<sup>49</sup> prema kojima su *p*-krezol (kao glavna komponenta) i fenol (u tragu), glavne karakteristike sekreta vrsta koje pripadaju redu Callipodida.



### 2.1.2. Odbrambene supstance predstavnika familije Polydesmidae (Diplopoda, Polydesmida)

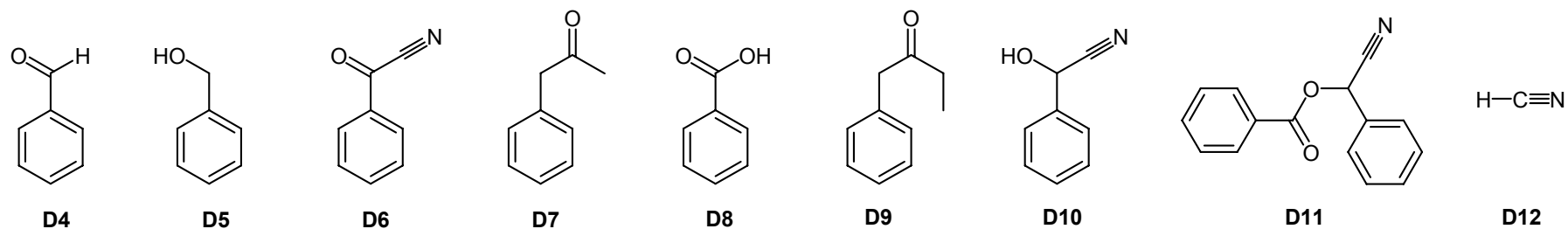
Iz familije Polydesmidae ispitivane su ukupno četiri vrste koje pripadaju rodovima *Polydesmus* i *Brachydesmus* i to: *P. complanatus*, *B. avalae*, *B. dadayi* i *B. troglobius*. Metilen–hloridni i *n*–heksanski ekstrakti analizirani su GC–FID, GC–EI–MS i GC–CI–MS tehnikama na nepolarnoj HP5–MSI koloni tako da je identifikovano osam jedinjenja i to: benzaldehid **D4**, benzil–alkohol **D5**, benzoil–nitril **D6**, benzil–metil–keton **D7**, benzoeva kiselina **D8**, benzil–etil–keton **D9**, mandelonitril **D10** i mandelonitril–benzoat **D11** (tabela 2.2., sl. 2.5. i 2.6.).

Pojava cijanogenih jedinjenja **D6** i **D10**, znači i pojavu cijanovodonika u gasovitom delu sekreta, koji nastaje hidrolizom ovih jedinjenja. Kako bi se dokazala ova pretpostavka iskorišćen je pikrinski test\* (sl. 2.7.). Pojava narandžaste boje u ovim testovima nedvosmisleno potvrđuje činjenicu da odbrambeni sekret svih ispitivanih polidezmidnih vrsta sadrži HCN.

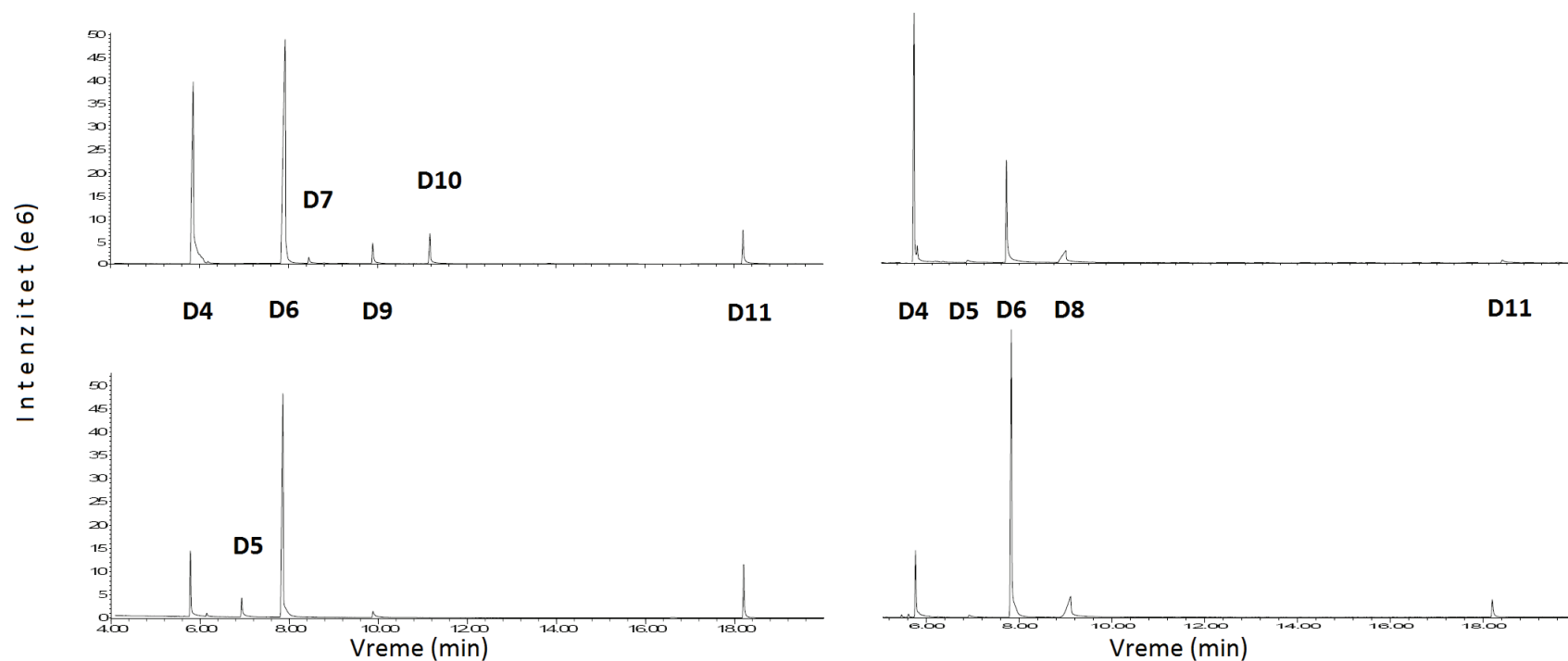
**Tabela 2.2.** Sastav metilen–hloridnih ekstrakata četiri vrste diplopoda koje pripadaju familiji Polydesmidae analiziranih GC–FID i GC–MS tehnikama

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Relativni procentni sastav			
			<i>Polydesmus complanatus</i>	<i>Brachydesmus dadayi</i>	<i>Brachydesmus avalae</i>	<i>Brachydesmus troglobius</i>
5,9	969	<b>D4</b> benzaldehid	41,6	15,0	12,9	54,7
6,9	1038	<b>D5</b> benzil–alkohol	–	5,9	1,2	1,7
7,9	1103	<b>D6</b> benzoil–nitril	48,4	66,7	64,1	30,7
8,5	1138	<b>D7</b> benzil–metil–keton	0,9	–	–	–
9,1	1180	<b>D8</b> benzoeva kiselina	–	–	18,3	10,9
9,9	1235	<b>D9</b> benzil–etil–keton	3,1	2,3	u tragu	–
11,2	1330	<b>D10</b> mandelonitril	3,2	–	–	–
18,2	1951	<b>D11</b> mandelonitril–benzoat	2,8	10,1	3,5	2,0

\* Bojena reakcija kojom se dokazuje prisustvo gasovitog cijanovodonika. Način izvođenja je prikazan u **Ekperimentalnom delu** u pasusu Detektovanje cijanovodonika.

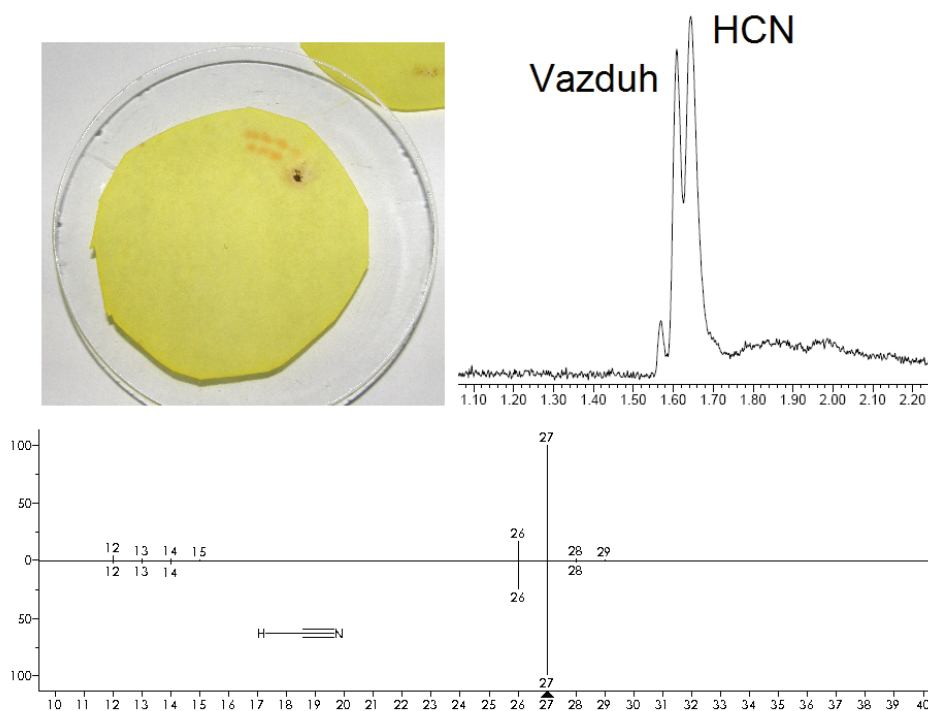


Slika 2.5. Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu četiri vrste diplopoda koje pripadaju familiji Polydesmidae.



Slika 2.6. Ukupni GC-FID jonski hromatogrami metilen-hloridnih ekstrakata odraslih jedinki: *Polydesmus complanatus* (gore levo), *Brachydesmus troglobius* (gore desno), *Brachydesmus dadayi* (dole levo) i *Brachydesmus avalae* (dole desno).

Cijanovodonik (**D12**), pored bojene reakcije, dokazan je i headspace GC–MS tehnikom (sl. 2.7).<sup>\*</sup> Zbog različite pripreme uzorka hromatogram dobijen na ovaj način se dosta razlikuje od hromatograma dobijenog ekstrakcijom organskim rastvaračem. Relativni odnosi pikova iz tih hromatograma nisu uporedivi, tako da su u tabeli 2.2. prikazani relativni odnosi jedinjenja u metilen–hloridnom ekstraktu, ali ne i u celom odbrambenom sekretu.



**Slika 2.7.** Identifikacija cijanovodonika (**D12**). Gore levo: Rezultat pikrinskog testa kod vrste *Polydesmus complanatus* – pojava narandžaste boje dokazuje prisustvo cijanovodonika. Gore desno: Headspace GC–MS hromatogram i dole: EI–MS–spektar pika na  $R_t=1,65$  min upoređen sa spektrom cijanovodonika iz OCAD 9 biblioteke masenih spektara.

S druge strane, identifikacija većeg broja nepoznatih jedinjenja uvek predstavlja izazov. Prilikom identifikacije jedinjenja **D4–D12** uz pomoć GC–FID i GC–MS tehnika korišćeno je nekoliko različitih načina određivanja strukture.

Pre svega, bilo je neophodno je uporediti EI–MS spektre sa što boljim bibliotekama spektara. U slučaju jedinjenja **D4–D12** korišćene su komercijalne biblioteke (NIST 11, Wiley 07, Adams, Flavor i OCAD 09<sup>†</sup>) i naša biblioteka COMB 7<sup>‡</sup>. Iako se u ovim bibliotekama nalazi više od pola miliona snimljenih spektara, to jest,

<sup>\*</sup> Način izvođenja je prikazan u **Eksperimentalnom delu** u pasusu Detektovanje cijanovodonika.

<sup>†</sup> OCAD – The OPCW (Organizacija za zabranu hemijskog oružja) Central Analytical Database

<sup>‡</sup> Ovom prilikom posthumno se zahvaljujem Dejanu Đokoviću za prikupljanje velikog broja masenih spektara i nesebično deljenje znanja iz oblasti masene spektrometrije, posebno tokom radnih subota.

nekoliko stotina hiljada jedinjenja, identifikacija se mora uraditi veoma pažljivo. Najpre se mora voditi računa o tome da se prilikom identifikacije nepoznatog jedinjenja koristi reprezentativan maseni spektar, tačnije maseni spektar hromatografskog pika mora se prečistiti od pozadinskih jona, ili od jona drugog jedinjenja u slučaju da nije moguće postići dobro hromatografsko razdvajanje. Zatim, koeficijent sličnosti\* između tako dobijenog masenog spektra i spektra iz biblioteke mora da bude izrazito visok (više od 900 od maksimalnih 1000 u programu NIST MS Search ili više od 90 od maksimalnih 100 u programu AMDIS). Pored visokog koeficijenta sličnosti, maseni spektri moraju i vizuelno da liče, što znači da ne smeju imati višak, ali ni manjak pikova.

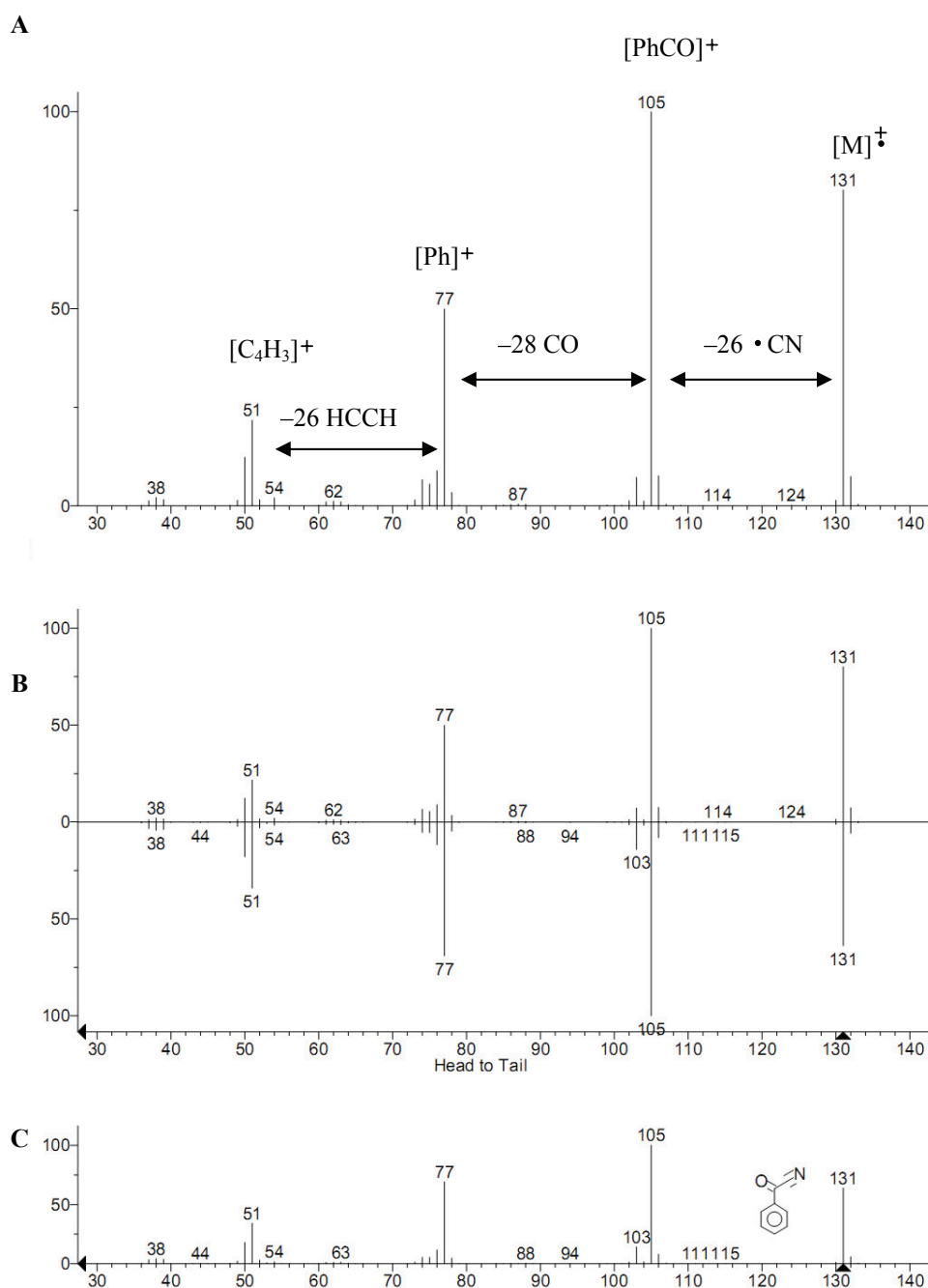
Zatim je potrebno, ako postoje literaturni podaci, uporediti jedinjenja i na osnovu retencionih indeksa (RI)<sup>†</sup>. Neke biblioteke spektara već sadrže RI podatke i/ili podatke o retencionom vremenu<sup>‡</sup>, dok je za druge neophodno konsultovati literaturu. Dobro poznat kriterijum za identifikaciju jedinjenja na osnovu RI podataka jeste taj da se RI nepoznatog jedinjenja i biblioteke (literature) ne sme razlikovati za više od 20 RI jedinica. U našem slučaju jedinjenja **D4**, **D5**, **D8** i **D10** imaju odlična slaganja sa podacima iz biblioteka i u literaturi<sup>50,51,52i53</sup>. Za jedinjenje **D7** nema RI podataka snimljenih pod istim GC uslovima, ali **D7** ima RI (1138) koji se nalazi između onih pronađenih u literaturi<sup>54,55</sup> (1116 i 1170) snimljenih na drugačijem tipu kolone, ili na koloni drugačijih dimenzija. Jedinjenje **D9** pokazuje odlično slaganje, ali su RI podaci snimljeni na staroj, pakovanoj koloni slične polarnosti. Jedinjenja **D7** i **D9** su homologna jedinjenja koja se razlikuju za jednu CH<sub>2</sub> grupu, što u „RI rečniku“ predstavlja razliku od oko 100 RI jedinica (slično kao razlika između dva susedna *n*-alkana). Za jedinjenja **D6** i **D11** ne postoje literaturni podaci, dok je za jedinjenje **D12** gotovo nemoguće odrediti RI pošto se radi o gasovitoj supstanci, za taj eksperiment trebalo bi koristiti gasoviti metan, etan i propan kao standardnu seriju *n*-alkana. Zato što je struktura jedinjenja **D12** veoma jednostavna, za kompletnu identifikaciju, dovoljno je uporediti njegov maseni spektar sa bibliotekom.

\* Engleski termin je match factor.

<sup>†</sup> RI (retencioni indeks) predstavlja karakteristiku jedinjenja pod određenim GC uslovima. Određuje se u odnosu na retencionna vremena (Rt) dva susedna *n*-alkana između kojih se nalazi. Standardna serija *n*-alkana se mora snimiti pod istim GC uslovima. Indeksi *n*-alkana imaju vrednosti N\*100, pa će na primer jedinjenje sa RI 900 imati isti RI i Rt kao i *n*-nonan.

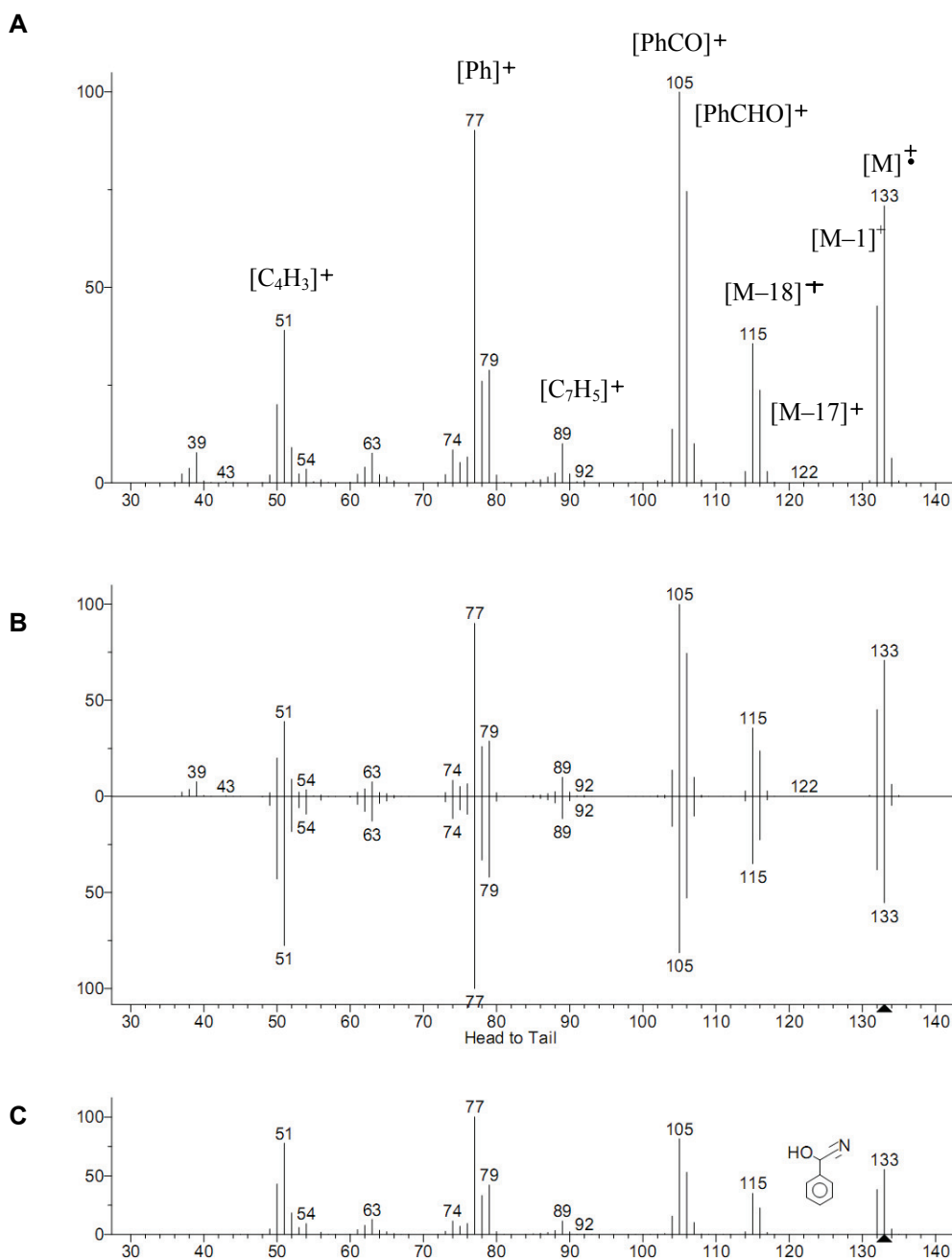
<sup>‡</sup> Retenciono vreme je karakteristično samo pod istim GC uslovima, tako da je prilikom snimanja neophodno prilagoditi GC uslove, na čije se podatke pozivate prilikom identifikacije.

I na kraju, u slučajevima kada nema dovoljno literaturnih podataka, neophodno je obratiti više pažnje na interpretaciju masenih spektara i uporediti ih sa spektrima sličih jedinjenja. Tako smo uporedili EI-MS podatke jedinjenja **D6** i **D11** sa hemijski bliskim jedinjenjem **D10**.



**Slika 2.8.** Identifikacija jedinjenja **D6**:

- EI MS spektar jedinjenja **D6** sa predloženom fragmentacijom.
- EI MS spektar jedinjenja **D6** upoređen sa spektrom iz biblioteke NIST 11.
- EI MS spektar iz biblioteke NIST 11 sa strukturom jedinjenja **D6**.



**Slika 2.9.** Identifikacija jedinjenja **D10**:

- EI MS spektar jedinjenja **D10** sa predloženom fragmentacijom.
- EI MS spektar jedinjenja **D10** upoređen sa spektrom iz biblioteke NIST 11.
- EI MS spektar iz biblioteke NIST 11 sa strukturom jedinjenja **D10**.

Jedinjenja **D4–D11** su aromatična jedinjenja i daju intenzivne molekulske jone, tako da im se odmah može i odrediti molekulska masa. Jedinjenje **D6** ima molekulska masu 131, što ukazuje na prisustvo neparnog broja N atoma. Fragmentacija jedinjenja **D6** prikazana na **sl. 2.8.** snažno potvrđuje činjenicu da je pretpostavljena struktura ispravna i da su sve druge izomerne strukture (*o*-, *m*-, *p*-, ili neke druge)

neodgovarajuće, jer bi se u tim slučajevima pojavili neki novi pikovi ili bi neki od postojećih nestali.

Jedinjenje **D10** ima molekularni jon na  $m/z$  133 (**sl. 2.9.**), što ukazuje na neparan broj atoma azota. U poređenju sa jedinjenjem **D6**, jedinjenje **D10** ima dva atoma vodonika više, što odgovara prisustvu hidroksilne umesto keto-grupe. Takođe, indikatori alkoholne funkcionalne grupe su i joni  $M-1$ ,  $M-17$  i  $M-18$  joni, koji su dodatno stabilizovani rezonancijom. Osnovni jon  $m/z$  105, kao i joni  $m/z$  77 i 51 tipični su za aromatična jedinjenja slične strukture kao i jedinjenje **D6** (**sl. 2.8.**).

Molekularni jon jedinjenja **D11** je na vrednosti  $m/z$  237, što ukazuje na neparni broj azota. Joni  $m/z$  105 (osnovni jon) i 116 nastaju direktno iz molekularnog jona prostim fragmentacijama obe C–O veze, uz gubitke neutralnih čestica masa 132 i 121. Treći jon po obilnosti je jon  $m/z$  77, koji je u stvari poslednji jon značajnog intenziteta i odgovara fenil-grupi, odnosno jonu  $[C_6H_5]^+$ .

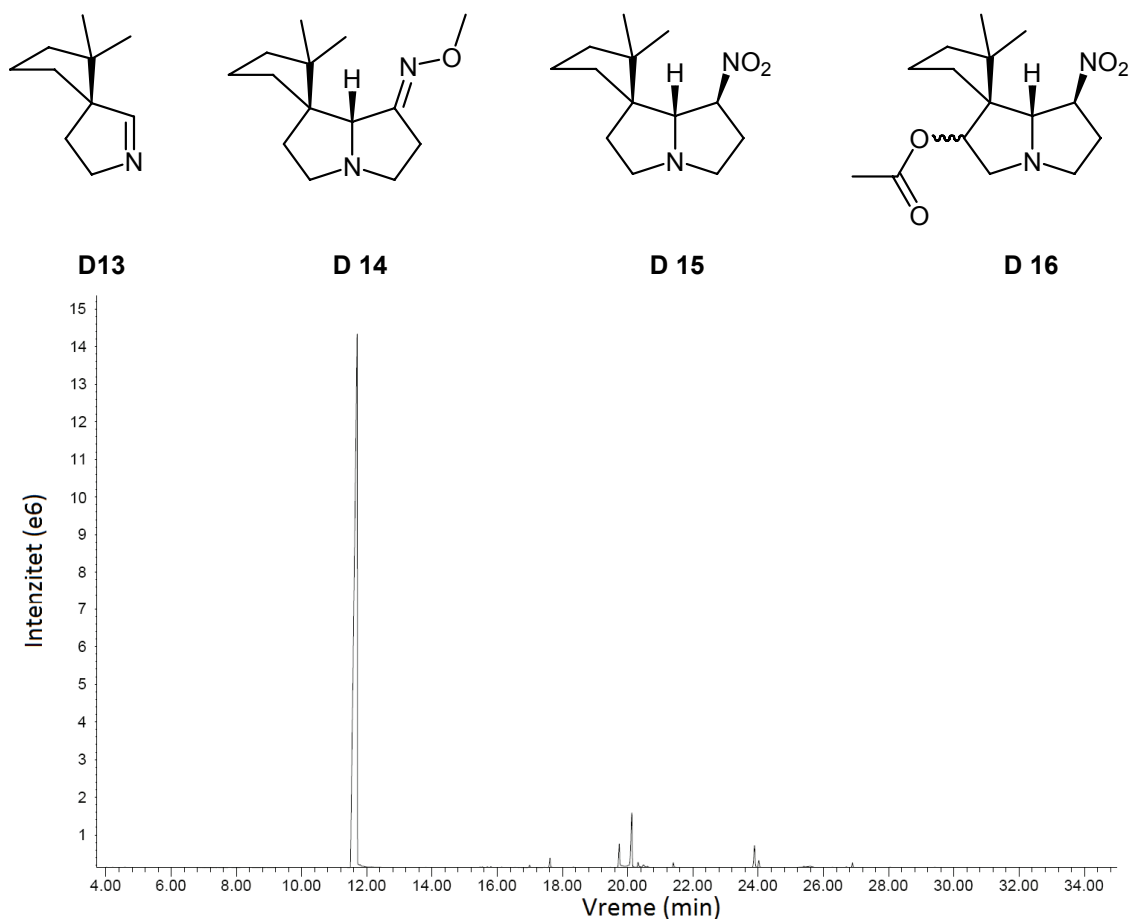
EI–MS Spektri\* jedinjenja **D7** i **D9** odgovaraju spektrima iz biblioteke. Oba jedinjenja daju odgovarajuće molekulske jone ( $m/z$  134 i 148), zatim jon  $m/z$  91 (benzil–katjon, odnosno tropilijum–katjon) koji nastaje prostom fragmentacijom  $\alpha$ -C, C veze. Istim tipom fragmentacije nastaju i joni  $m/z$  43 i 57 koji odgovaraju  $CH_3CO^+$  i  $CH_3CH_2CO^+$  jonima.

---

\* Spektralni podaci ovih jedinjenja prikazani su u **Eksploimentalnom delu** u pasusu Spektralni podaci identifikovanih jedinjenja.

### 2.1.3. Odbrambene supstance predstavnika familije Polyzoniidae (Diplopoda, Polyzoniida)

Jedini takson iz familije Polyzoniidae koji je ispitivan bila je vrsta *Polyzonium germanicum*. Navedena vrsta je jedini član familije Polyzoniidae koja naseljava prostor Balkanskog poluostrva. Za identifikaciju sastojaka odbrambenog sekreta koristili smo LC–MS i GC–MS tehnike. Za pripremu uzoraka za LC–MS koristili smo metanol kao rastvarač, dok je metilen–hlorid korišćen prilikom pripreme uzoraka za GC–MS. Identifikovana su četiri odbrambena jedinjenja i to: polizonimin **D13**, spiropirolizin *O*–metil–oksim **D14**, nitropolizonamin **D15** i novi alkaloid **296** (7–acetoksi–nitropolizonamin **D16**) (sl. 2.10.).



**Slika 2.10.** (Gore): Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu vrste *Polyzonium germanicum* (Brandt 1837), (dole): Ukupni GC–FID jonski hromatogram metilen–hloridnog ekstrakta odraslih jedinki *P. germanicum*.



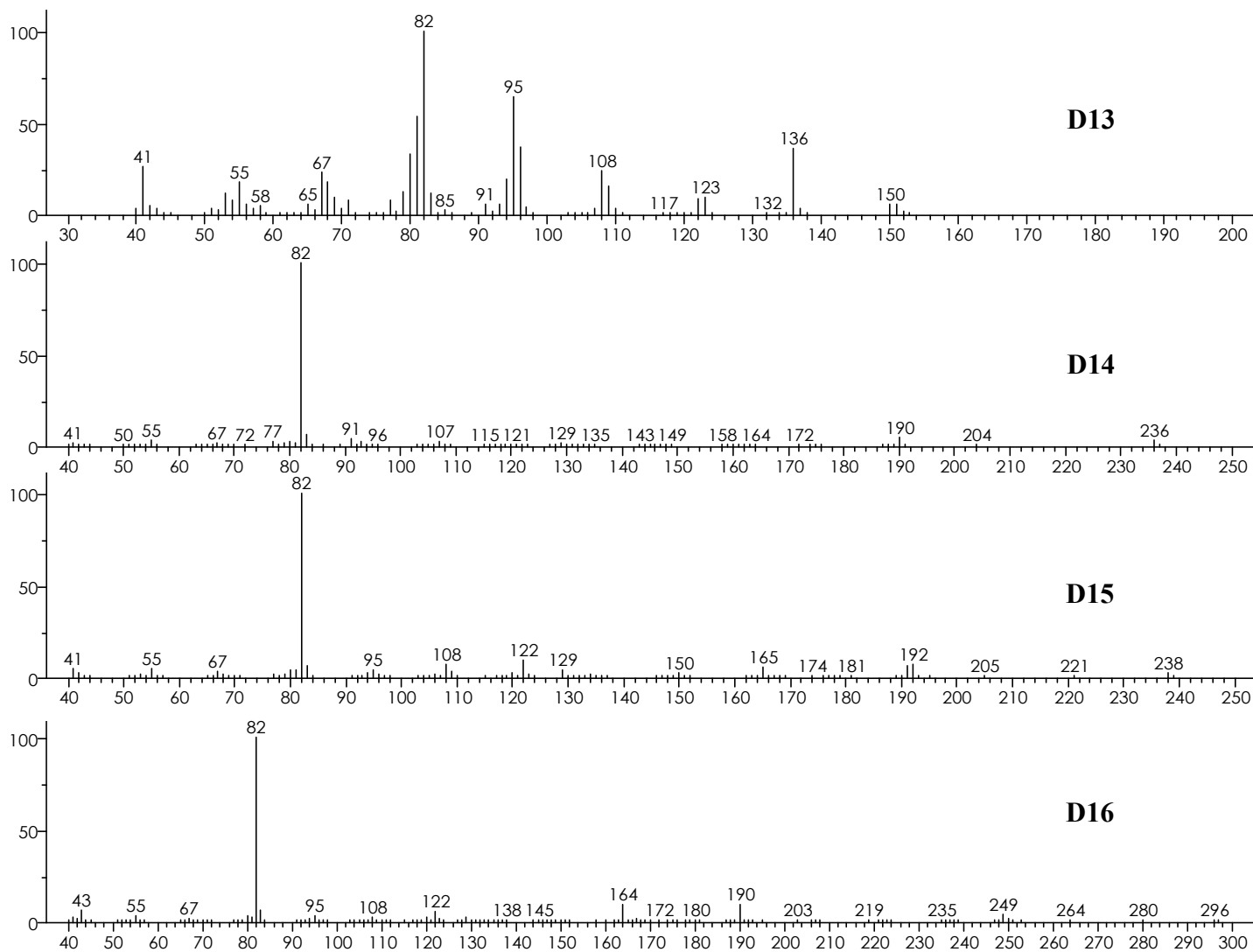
Prilikom analize GC–FID i GC–MS hromatograma uočeno je da različiti pikovi imaju identične masene spektre (sl. 2.11. i tabela 2.3.). Ova činjenica nije iznenađujuća, pošto jedinjenja **D13–16** imaju hiralne C atome, a to dalje znači postojanje većeg broja diastereomera koji se mogu razdvojiti GC kapilarnim kolonama, i samim tim se uočava veći broj pikova sa identičnim masenim spektrima. U tabeli 2.3. dat je relativni odnos jedinjenja na osnovu površina pikova u GC–FID hromatogramu, s tim što su u tabeli za Rt i RI upisane vrednosti dva najzastupljenija izomera jedinjenja **D14**. Površina pikova svih izomera sabira se da bi se dobio relativni odnos ovih jedinjenja. Na osnovu GC–MS spektara nije moguće odrediti apsolutne konfiguracije pomenutih stereocentara.

**Tabela 2.3.** Sastav metilen–hloridnog ekstrakta vrste *Polyzonium germanicum* (Brandt 1837) analiziran GC–FID i GC–MS tehnikama.

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Procentni sastav
11,6	1290	<b>D13</b> polizonimin	92,6
19,7; 20,1	1928; 1965	<b>D14</b> spiropirolizin <i>O</i> –metil–oksim	6,0
20,3	1982	<b>D15</b> nitropolizonamin	0,3
23,9	2355	<b>D16</b> 7–acetoksi–nitropolizonamin	1,1

Rezultati LC–ESI–TOF–MS analize potvrđuju prisustvo jedinjenja **D13–D16**, to jest, njihovih molekulskih formula (poglavlje 3.5 Spektralni podaci identifikovanih jedinjenja). U pozitivnim ESI masenim spektrima dobijeni su protonovani molekuli  $[MH]^+$  za sva jedinjenja, dok su greške merenja u svim slučajevima manje od 5 ppm.

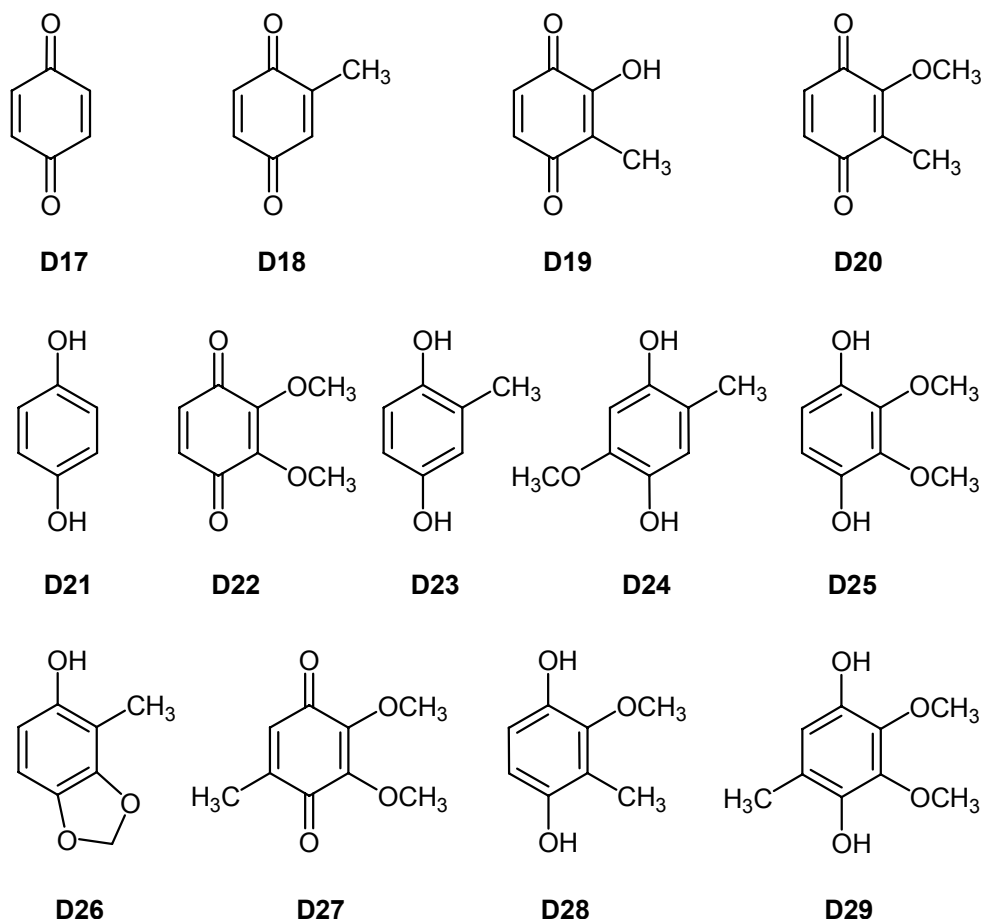
Pošto smo imali ograničenu količinu materijala, nismo bili u mogućnosti da dobijemo rezultate NMR analize i dodatno potvrdimo strukture ovih spiroalkaloida. Jedinjenja **D13** i **D15** identifikovana su na osnovu poređenja EI–MS spektara sa NIST 11 bibliotekom spektara i slaganjem HR–MS spektara sa molekulskom formulom, dok je **D14** identifikovan na osnovu podataka iz literature<sup>56</sup> i slaganjem HR–MS spektara sa molekulskom formulom, dok se identifikacija novog alkaloida **D16** ipak mora posmatrati tentativno. Za potpunu identifikaciju ovog alkaloida neophodno je izvršiti njegovu sintezu i podatke uporediti sa postojećim, odnosno bilo bi poželjno obezbediti nove (veće) količine materijala i identifikaciju novog jedinjenja potvrditi uz pomoć NMR tehnika.



Slika 2.11. EI-MS-Spektri jedinjenja D13-D16

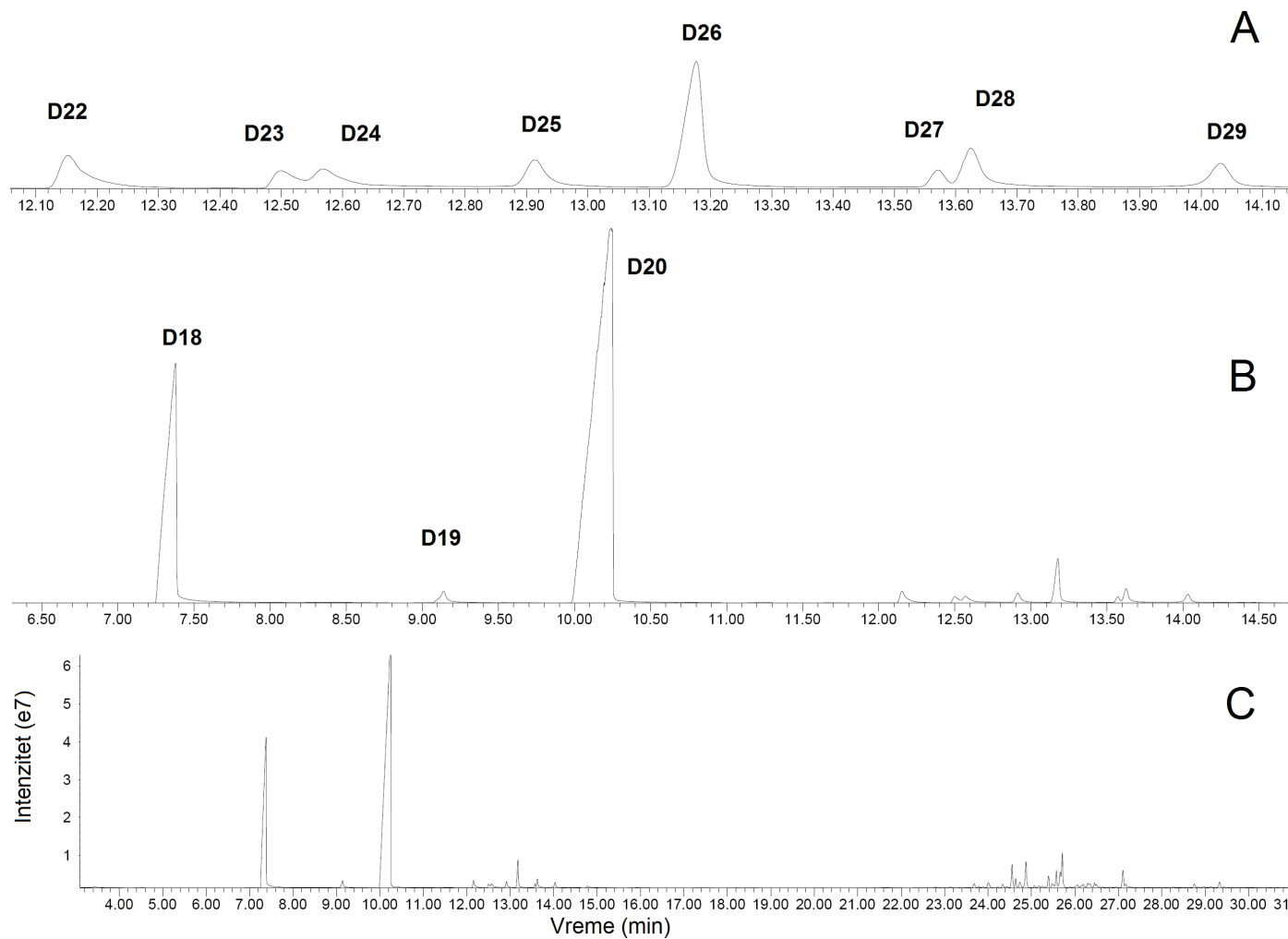
### 2.1.4. Odbrambene supstance predstavnika familije Julidae (Diplopoda, Julida)

U okviru familije Julidae ispitivano je ukupno šest vrsta: *Julus terrestris*, *Cylindroiulus boleti*, *Leptoiulus trilineatus*, *Megaphyllum bosniense*, *M. austriacum* i *M. unilineatum*.



**Slika 2.12.** Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu vrsta *Julus terrestris*, *Cylindroiulus boleti*, *Leptoiulus trilineatus*, *Megaphyllum bosniense*, *M. austriacum* i *M. unilineatum*.

Iz metilen-hloridnih ekstrakata (odbrambenih sekreta) ovih vrsta uz pomoć GC-FID, GC-MS i NMR tehnika okarakterisano je trinaest benzohinonskih derivata: 1,4-benzohinon **D17**, 2-metil-1,4-benzohinon **D18**, 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon **D19**, 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon **D20**, hidrohinon **D21**, 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon **D22**, 2-metilhidrohinon **D23**, 2-metoksihidrohinon **D24**, 2,3-dimetoksihidrohinon **D25**, 2-metil-3,4-metilenedioksifenol **D26**, 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon **D27**, 2-metoksi-3-metilhidrohinon **D28**, 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon **D29** (sl. 2.12. i 2.13. i tabela 2.4.).



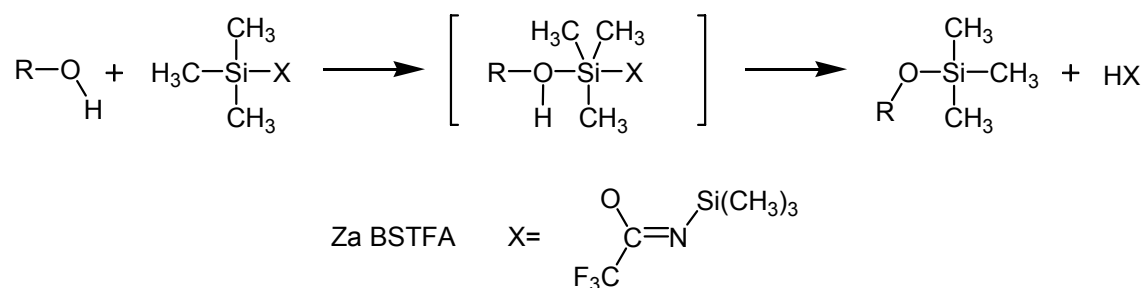
**Slika 2.13.** Gasnohromatografski profili metilen–hlordnih ekstrakata odraslih jedinki *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch 1847): (A) Uvećan deo GC-FID hromatograma koji prikazuje pikove hinona **D22–29**; (B) uvećan deo GC-FID hromatograma koji prikazuje karakterističan hinonski profil julida; (C) Ukupni GC-FID jonski hromatogram.

**Tabela 2.4.** Sastav odbrambenih sekreta šest vrsta diplopoda iz familije Julidae analiziranih GC–FID i GC–MS tehnikama.

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Procentni sastav					
			<i>Julus terrestris</i>	<i>Cylindroiulus boleti</i>	<i>Leptoiulus trilineatus</i>	<i>Megaphyllum bosniense</i>	<i>Megaphyllum austriacum</i>	<i>Megaphyllum unilineatum</i>
5,7	917	<b>D17</b> 1,4-benzohinon	2,2	–	–	0,3	–	0,1
7,4	1022	<b>D18</b> 2-metil-1,4-benzohinon	40,0	23,9	29,0	38,1	43,6	3,5
9,1	1127	<b>D19</b> 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	0,4	0,8	4,8	0,4	8,4	–
10,2	1191	<b>D20</b> 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	48,4	70,0	48,8	56,0	11,1	86,2
10,8	1232	<b>D21</b> hidrohionon	2,0	–	–	–	–	–
12,1	1322	<b>D22</b> 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon	–	0,8	1,6	1,0	0,7	5,7
12,5	1344	<b>D23</b> 2-metilhidrohionon	3,9	0,3	0,7	0,3	–	0,9
12,6	1350	<b>D24</b> 2-metoksi-5-metilhidrohionon	–	0,4	0,6	0,4	–	–
12,9	1373	<b>D25</b> 2,3-dimetoksihidrohionon	0,1	0,5	1,1	0,4	1,6	2,0
13,2	1390	<b>D26</b> 2-metil-3,4-metilenedioksifenol	0,9	2,0	11,2	0,9	33,6	0,3
13,5	1420	<b>D27</b> 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon	–	0,2	0,6	0,9	–	0,8
13,6	1425	<b>D28</b> 2-metoksi-3-metilhidrohionon	2,1	0,7	0,6	0,2	–	0,4
14,0	1455	<b>D29</b> 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohionon	–	0,4	1,0	1,1	1,0	0,1

Potrebno je napomenuti da većina masenih spektara ovih jedinjenja nije dala dobro slaganje sa spektrima iz dostupnih biblioteka, a takođe, nije bilo jednostavno doći do literaturnih podataka. Stoga se identifikacija jedinjenja **D17–D29** zasnivala na razmatranju mehanizama fragmentacije i analizi NMR spektara.

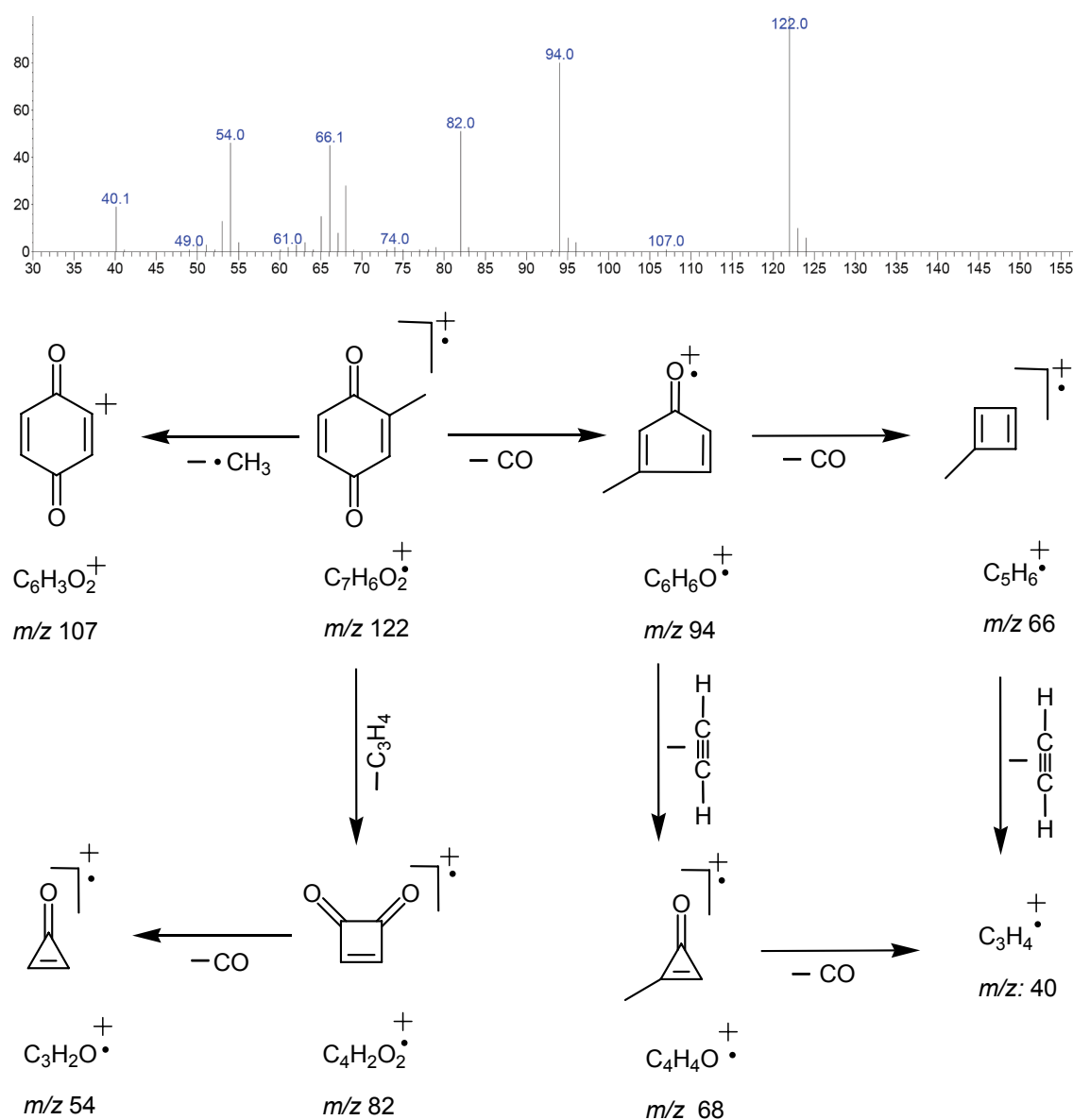
Na osnovu GC–FID, GC–EI–MS i GC–CI–MS spektara metilen–hloridnih ekstrakata identifikovane su odbrambene supstance koje pripadaju hinonskim i hidrohinonskim jedinjenjima. Ove dve grupe jedinjenja možemo razlikovati i preko reakcije sa reagensima za silanizovanje, kao što je *N,O*–bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA) (**shema 2.14.**). Tako, na primer, razlike između hromatograma metilen–hloridnih ekstrakata pre i posle ove derivatizacije mogu pokazati prisustvo ili odsustvo hidroksilne funkcionalne grupe. Ako posle reakcije silanizovanja pik nepoznatog jedinjenja ostaje na istom retencionom vremenu, on nema hidroksilnu funkcionalnu grupu, to jest, on potiče od hinona, a ukoliko pik nepoznatog jedinjenja nestane nakon derivatizacije, a pojavi se pik trimetil–silil–derivata, onda se tu radi o hidrohinonu ili hinonu sa dodatnom hidroksilnom grupom. Hemijska jonizacija silanizovanih i nesilanizovanih uzoraka omogućava nam da pojavom protonovanih molekula  $[M+H]^+$ , utvrdimo razliku u masama tih jona. Razlika od 72 jedinice mase ( $C_3H_8Si$ ) javlja se kod jedinjenja sa jednom hidroksilnom grupom (monohidroksihinon), a razlika od 144 ( $2 \times C_3H_8Si$ ), kod jedinjenja sa dve hidroksilne grupe (hidrohinon) i tako dalje.



**Shema 2.14.** Reakcija silanizovanja kod jedinjenja koja sadrže hidroksilnu funkcionalnu grupu.

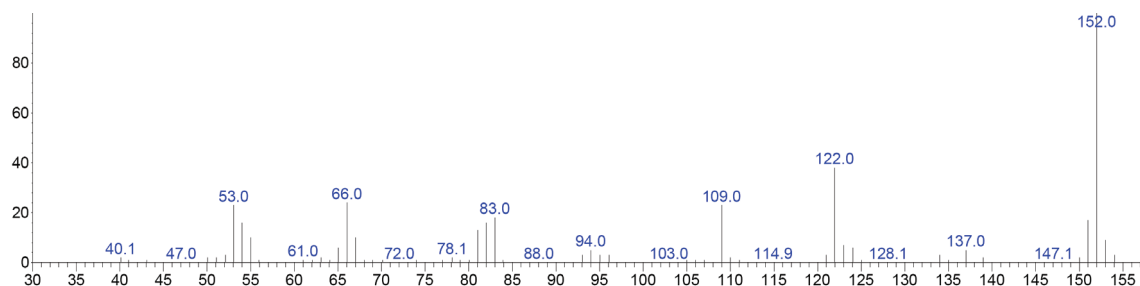
Identifikacija ovog tipa jedinjenja prikazana je na primeru toluhinona (**D18**), koja obuhvata poređenje masenih spektara hemijske i elektronske jonizacije derivatizovanog i nederivatizovanog ekstrakta snimljenih pod istim uslovima. U slučaju jedinjenja **D18**, CI–MS spektar metilen–hloridnog ekstrakta daje protonovani molekul  $[M+H]^+$  na vrednosti  $m/z$  123, što odgovara molekulskoj masi od 122 u. Zatim,

fragmentacija toluhinona je dosta karakteristična i može poslužiti kao primer za interpretaciju ostalih jedinjenja ovog tipa. Molekulski jon na  $m/z$  122, ujedno je i osnovni, dok joni na  $m/z$  94, 66, 68, 54 i 40 predstavljaju karakteristične fragmentacione jonske vrste sa neparnim brojem elektrona (sl. 2.15.). Svi oni nastaju gubitkom jednog ili više molekula  $C\equiv O$  ili  $HC\equiv CH$  ( $122-28=94$ ,  $122-28-28=66$ ,  $122-28-26=68$  i tako dalje), ali ukazuju i na to da je jon na vrednosti  $m/z$  82 nastao gubitkom neutralnog fragmenta  $C_3H_4$ , najverovatnije ciklopropena. Dodatna potvrda da se radi o jedinjenju hinonskog tipa bez hidroksilne grupe je što ovo jedinjenje ne reaguje sa BSTFA u reakciji silanizovanja.



Slika 2.15. Identifikacija jedinjenja D18: EI-MS spektar jedinjenja D18 (gore) i pretpostavljena fragmentacija jedinjenja D18 (dole).

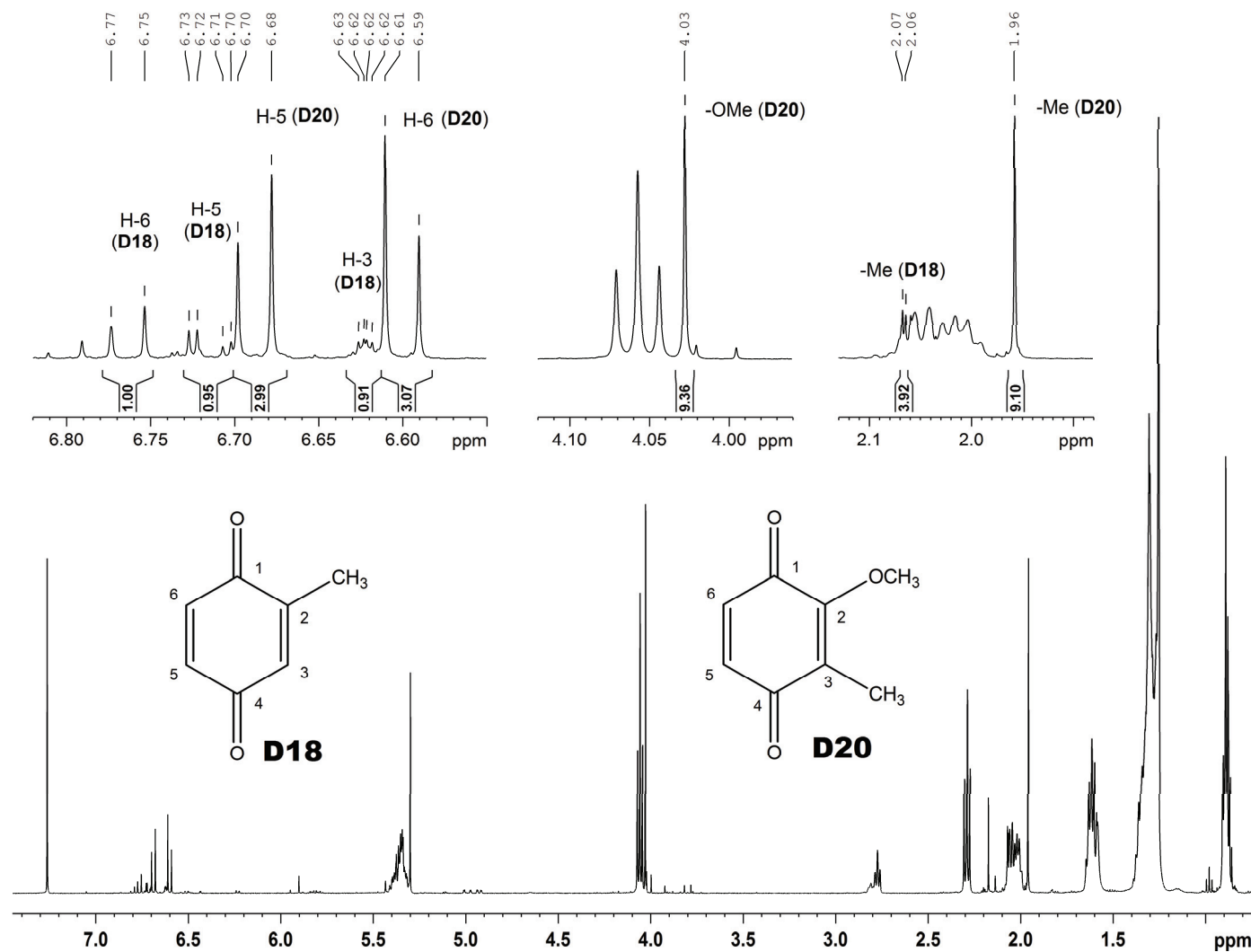
Slična situacija je i sa najzastupljenijim jedinjenjem u skoro svim ekstraktima, hinonom **D20**, koji takođe ne reaguje sa silanizacionim reagensom. U CI-MS spektru se pojavljuje protonovani molekul  $m/z$  153, dok je u EI-MS spektru molekularni jon ujedno i osnovni jon (sl. 2.16.).



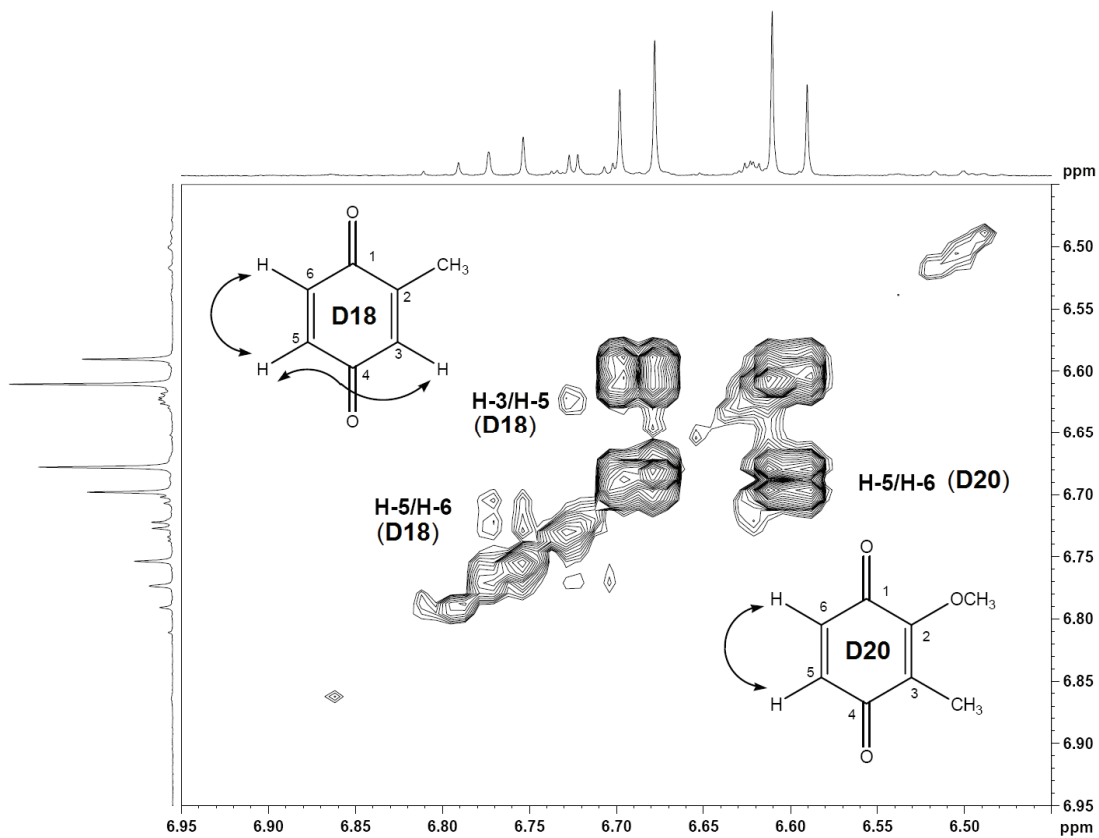
Slika 2.16. EI-MS-Spektar jedinjenja **D20** na  $R_t=10,2$  min.

Strukture najzastupljenijih hinona u svim ispitivanim odbrambenim sekretima jedinjenja **D18** i **D20** kod Julida dodatno su potvrđene snimanjem 1D i 2D NMR (COSY, HSQC i HMBC) spektara deuterohloroformskog ekstrakta *M. bosniense* (sl. 2.17–2.22.). Tako je uočena *orto*-konstanta sprezanja između protona identifikovanih kao H-5 i H-6 kod jedinjenja **D20**,  $^3J=10$  Hz. Isto kuplovanje je uočeno i kod jedinjenja **D18**, uz još dva dodatna sprezanja protona H-3: prvo je *meta*-sprezanje sa H-5,  $^4J=2,5$  Hz, a drugo sprezanje je takođe preko četiri hemijske veze sa protonima iz metil-grupe,  $^4J=1,6$  Hz (videti COSY spektar sl. 2.18 i 2.19). Zanimljivo je to što kuplovanje metil-grupe nije do sada opisano u literaturi iako je bilo primera gde se navode literaturni podaci za toluhinon (jedinjenje **D18**), s tim da je metil uvek okarakterisan kao singlet<sup>57,58</sup>. Asignacija  $^{13}C$  signala utvrđena je pomoću HSQC i HMBC spektara (sl. 2.20–2.22. i tabela 2.5.).

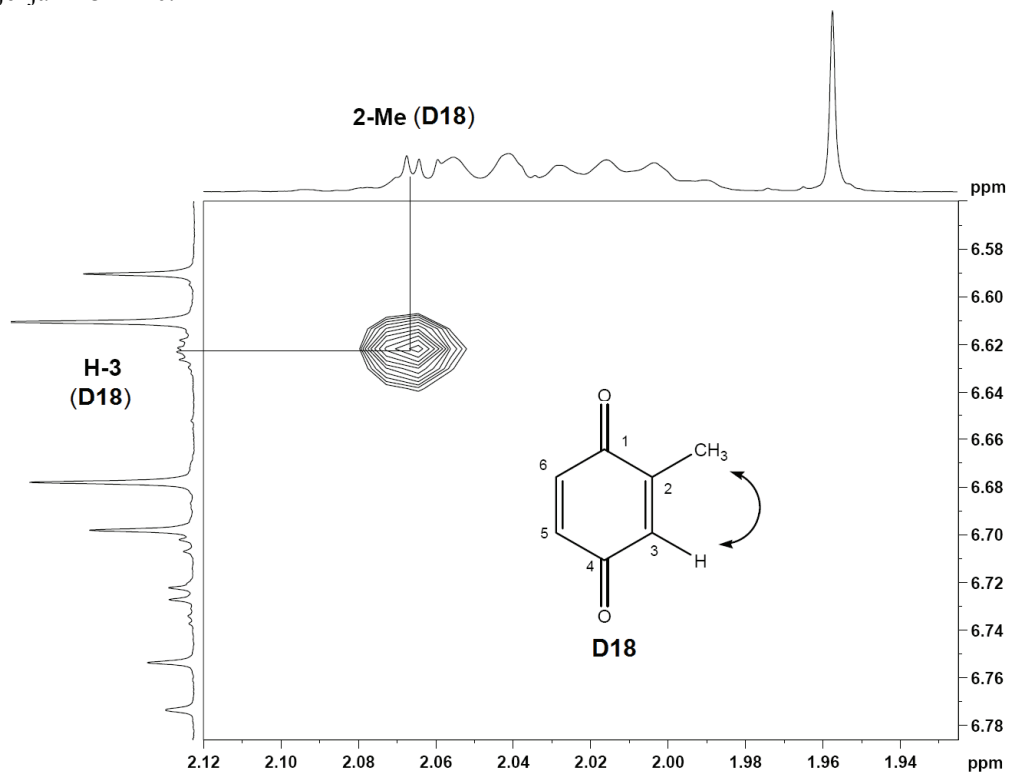




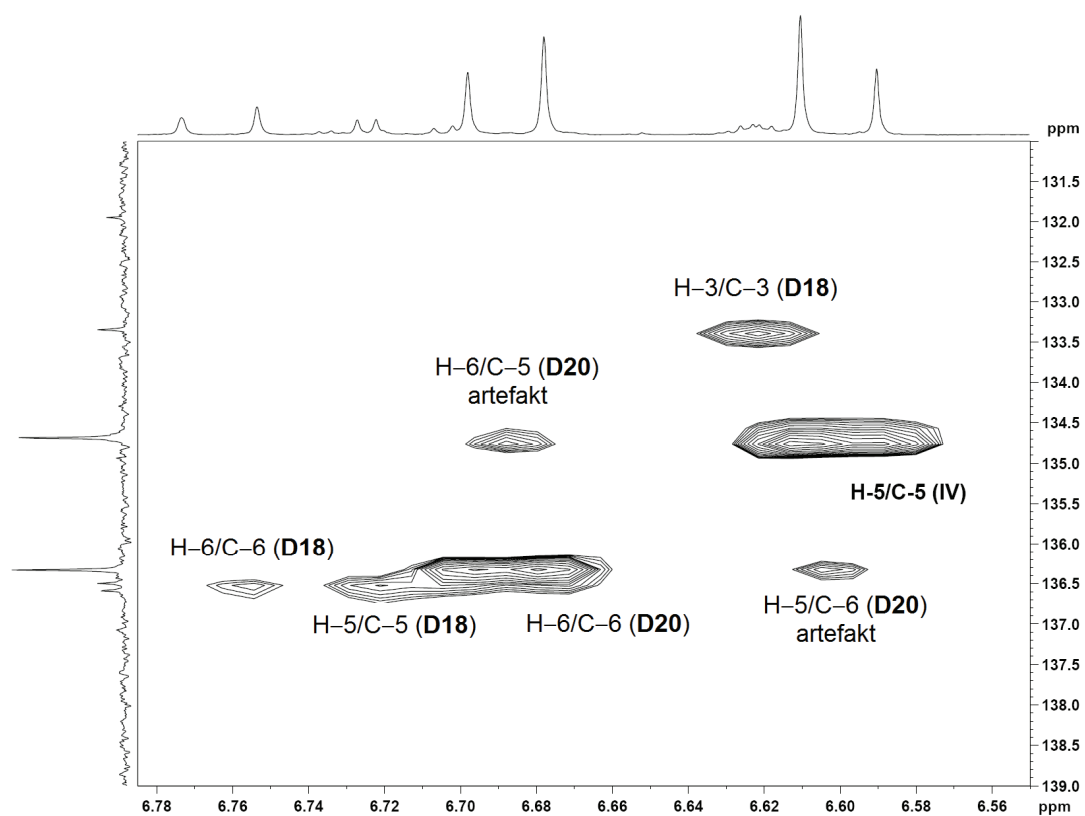
Slika 2.17. <sup>1</sup>H NMR–Spektar (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) CDCl<sub>3</sub> ekstrakta *Megaphyllum bosniense*; uvećanja pokazuju signale jedinjenja **D18** i **D20**.



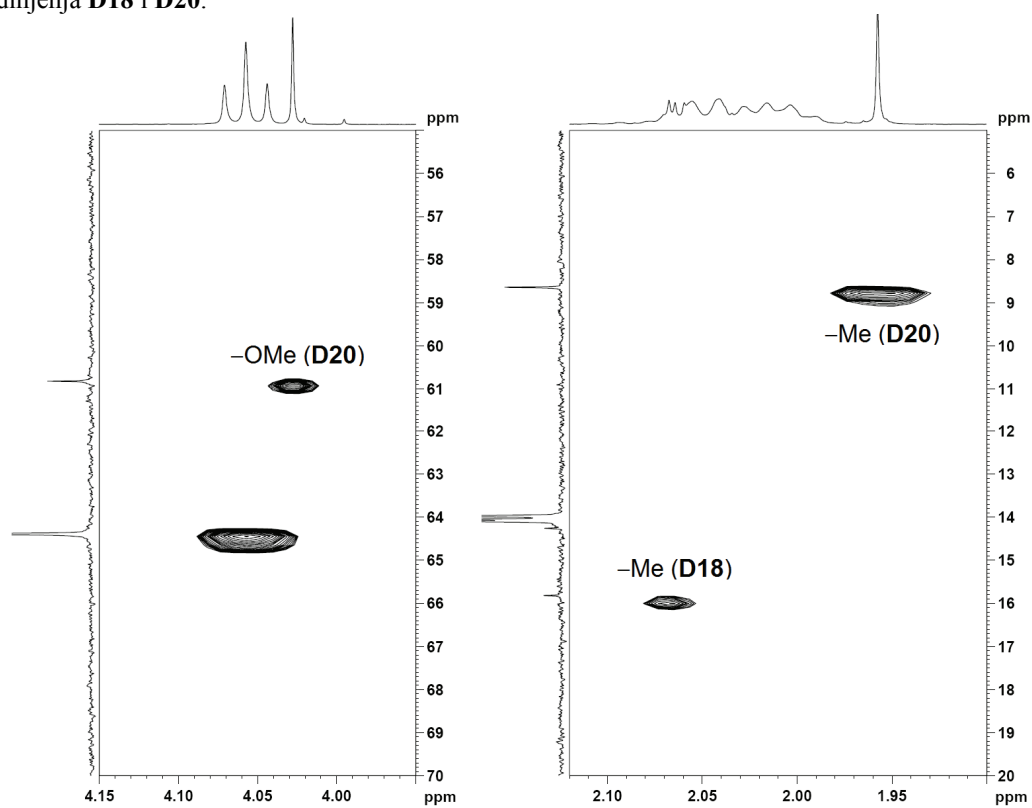
Slika 2.18. Deo COSY spektra  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Megaphyllum bosniense*: korelacije aromatičnih protona jedinjenja **D18** i **D20**.



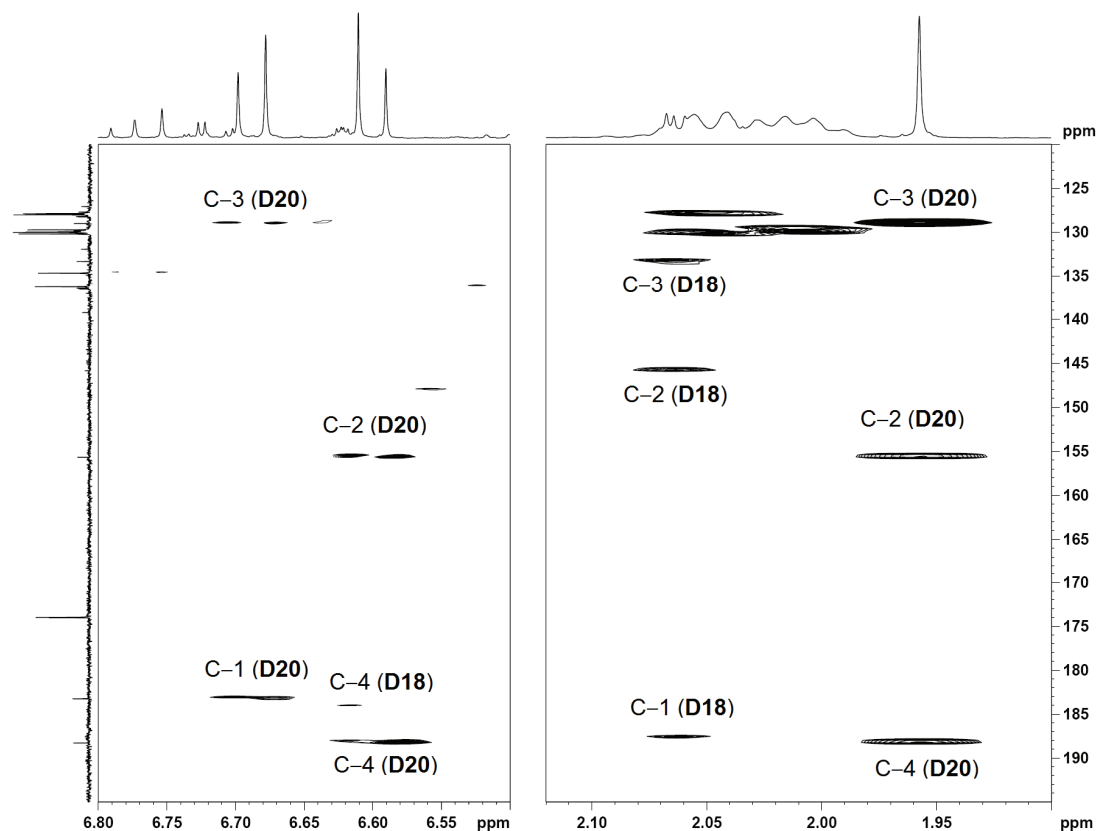
Slika 2.19. Deo COSY spektra  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Megaphyllum bosniense*: korelacije  $-\text{CH}_3$  i H-3 protona jedinjenja **D18**.



Slika 2.20. Deo HSQC spektra  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Megaphyllum bosniense*: aromatične H/C korelacije jedinjenja D18 i D20.



Slika 2.21. Deo HSQC spektra  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Megaphyllum bosniense*:  $-\text{OCH}_3$  i  $-\text{CH}_3$  korelacije jedinjenja D18 i D20.

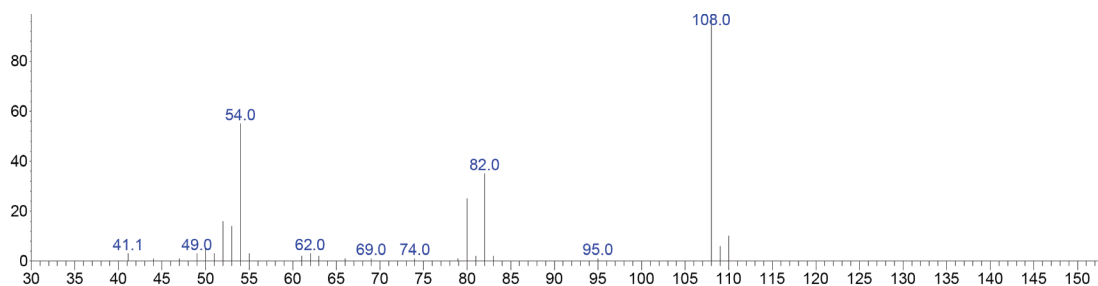


Slika 2.22. Deo HMBC spektra  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Megaphyllum bosniense*: daljinske H/C korelacije jedinjenja D18 i D20.

Tabela 2.5.  $^1\text{H}$  NMR–Spektralni podaci jedinjenja D18 i D20 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

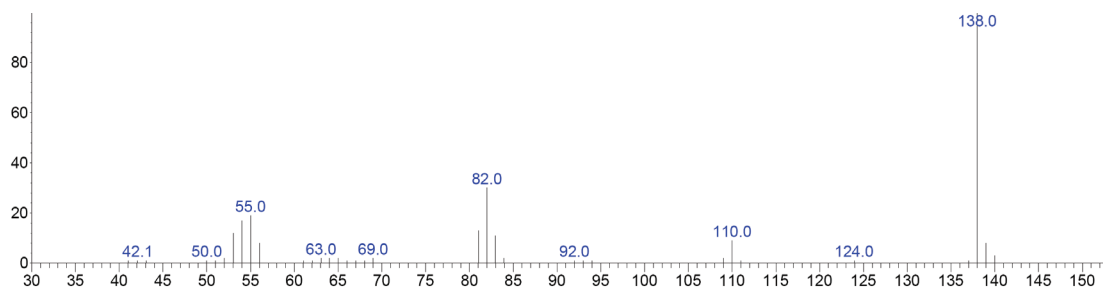
Pozicija	D18		D20	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	–	187,6	–	183,3
2	–	145,9	–	155,7
3	6,62 <i>dq</i> (2,5; 1,6)	133,3	–	129,0
4	–	183,9	–	188,3
5	6,71 <i>dd</i> (10; 2,5)	136,6	6,69 <i>d</i> (10)	136,3
6	6,76 <i>d</i> (10)	136,5	6,60 <i>d</i> (10)	134,7
Me–2	2,07 <i>d</i> (1,6)	15,8	–	–
Me–3	–	–	1,95 <i>s</i>	8,6
OMe–2	–	–	4,03 <i>s</i>	60,8

Identifikacija jedinjenja **D17**, **D19** i **D21–26** zasnivala se jedino na GC i GC–MS podacima pre i posle silanizovanja. Jedinjenje **D17** je identifikovano na  $R_t=5,7$  min kao 1,4–benzohinon. Ovo jedinjenje nije pokazalo reaktivnost prema BSTFA u reakciji silanizovanja, dok je u CI–MS spektru uočen protonovani molekul  $[M+H]^+$  na vrednosti  $m/z$  107.



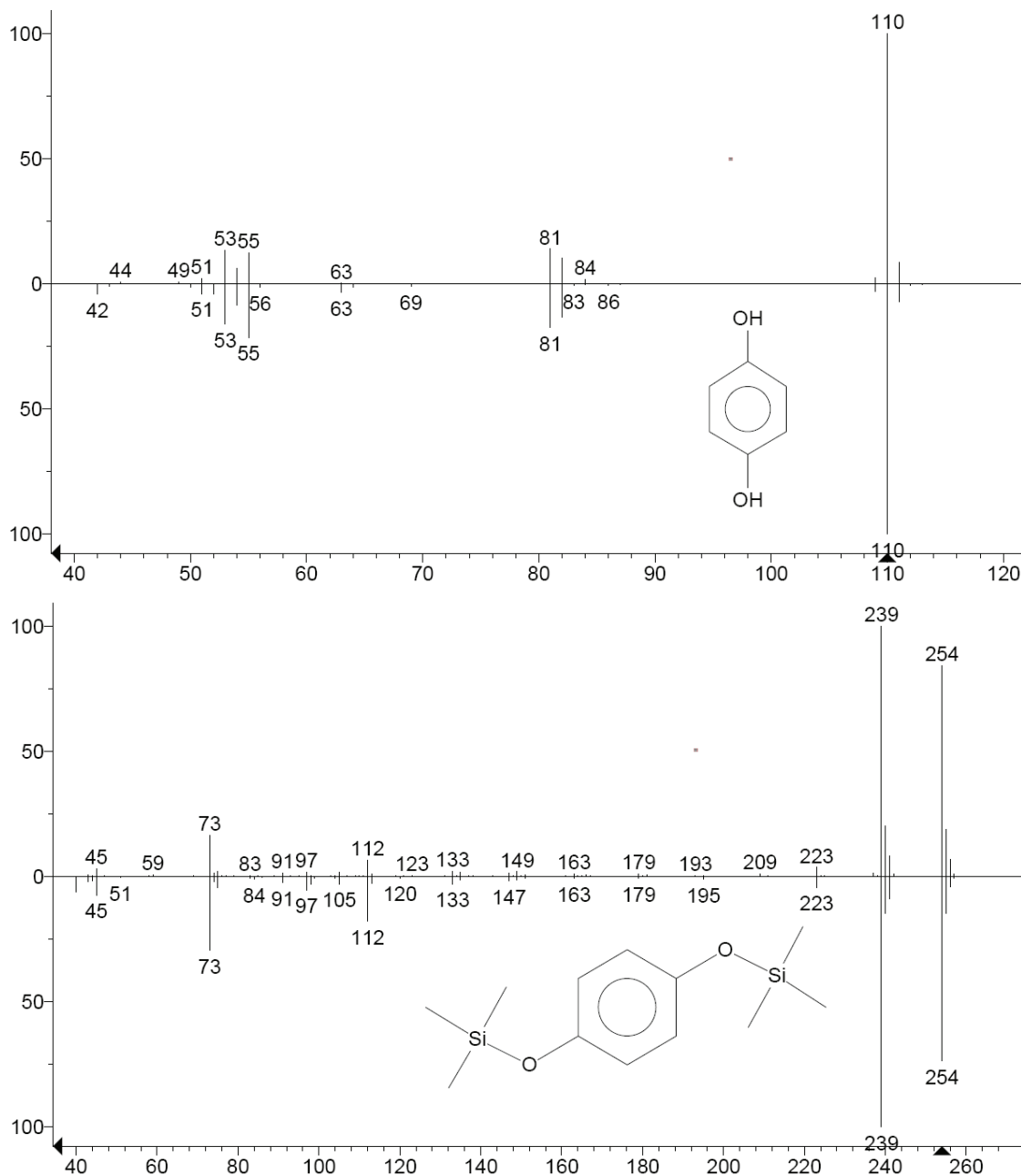
Slika 2.23. EI–MS–Spektar jedinjenja **D17** na  $R_t=5,7$  min.

Na  $R_t=9,1$  min identifikovan je 2–hidroksi–3–metil–1,4–benzohinon (**D19**). U reakciji silanizovanja pik ovog jedinjenja potpuno nestaje i pojavljuje se novi pik koji odgovara mono–TMS derivatu, što ukazuje na činjenicu da se radi o hinonu sa jednom hidroksilnom grupom. U CI–MS spektru jedinjenja **D19** uočen je protonovani molekul  $[M+H]^+$  na vrednosti  $m/z$  139, dok se kod TMS–derivata on javlja na očekivanih  $m/z$  211.



Slika 2.24. EI–MS–Spektar jedinjenja **D19** na  $R_t= 9,1$  min.

Na primeru jedinjenja **D21**, koje se pojavljuje jedino kod vrste *J. terrestris*, biće prikazana identifikacija jedinjenja uz pomoć GC i GC–MS podataka pre i posle reakcije silanizovanja (sl. 2.25. A i B).



**Slika 2.25.** Identifikacija jedinjenja **D21**:

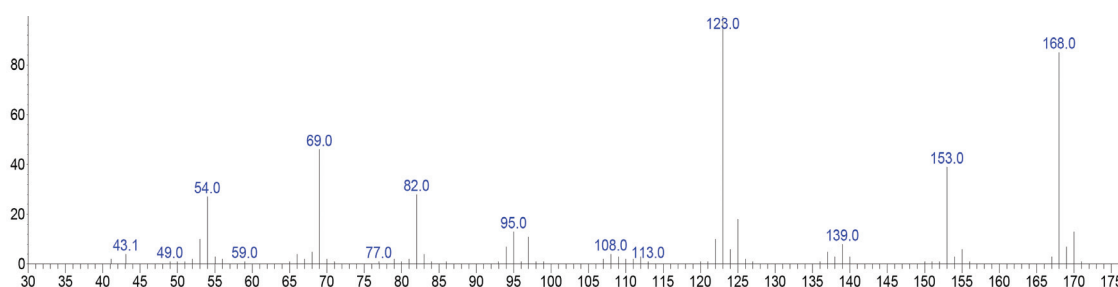
- A. EI MS spektar jedinjenja **D21** upoređen sa spektrom iz biblioteke NIST 11  
 B. EI MS spektar di-TMS derivata jedinjenja **D21** upoređen sa spektrom iz biblioteke NIST 11.

U hromatogramu metilen-hloridnog ekstrakta na  $R_t=10,8$  min (relevantniji podatak je  $RI=1232$ ) pojavljuje se pik čiji EI-MS spektar, na osnovu dostupnih biblioteka EI-MS spektara, pokazuje odlično slaganje sa hidrohinonom (sl. 2.25. A.). Takođe, dobro je i slaganje retencionog indeksa sa podacima iz literature<sup>59</sup>. U CI-MS ukupnom jonskom hromatogramu istog uzorka, na istom retencionom vremenu, može se

uočiti pik u kome je protonovani molekul  $[MH]^+$  na vrednosti  $m/z$  111 osnovni jon. Nakon reakcije silanizovanja pik na  $R_t=10,8$  min nestaje, a pojavljuje se novi pik ( $RI=1415$ ), čija masa odgovara di-TMS derivatu. Takođe, upoređivanjem EI-MS spektara iz dostupnih MS-biblioteka uočeno je odlično slaganje sa spekrom di-TMS derivata hidrohinona (**sl. 2.25. B.**). U GC-CI-MS hromatogramu silanizovanog uzorka, na istom retencionom vremenu (kao u GC-EI-MS hromatogramu), na vrednosti  $m/z$  255 uočava se protonovani molekul, koji odgovara razlici  $m/z$  od 144 ( $2 \times 72$ ) u odnosu na protonovani molekul  $[M+H]^+$ , koji se javlja kod hidrohinona. Tako, možemo da sumiramo identifikaciju hidrohinona **D21** kao primer za sva jedinjenja ovog tipa:

- slaganje retencionih indeksa originalnog jedinjenja i TMS derivata sa literaturom
- slaganje EI-MS spektara originalnog jedinjenja i TMS derivata sa bibliotekom spektara
- potvrda molekulske masa originalnog jedinjenja i TMS derivata, na osnovu CI-MS spektara snimljenih od istih uzoraka, pod istim hromatografskim uslovima i dobijenih na istim retencionim vremenima

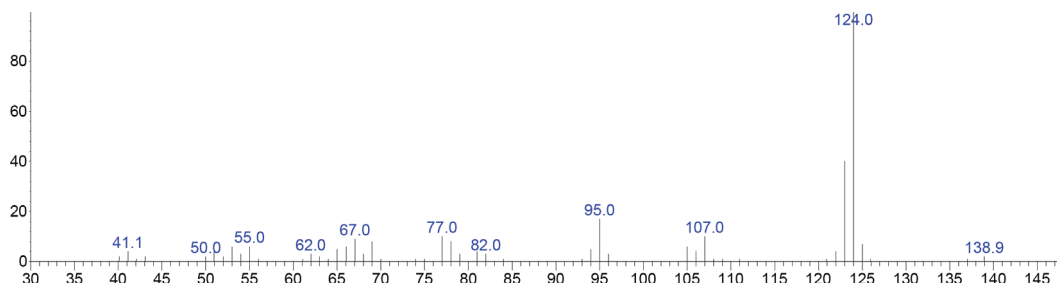
Na sličan način identifikovano je i jedinjenje **D22** (2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon,  $R_t=12,1$  min i  $RI=1322$ ). Pošto je u pitanju 1,4-benzohinon bez hidroksilne grupe u silanizovanom uzorku pik je ostao na istom retencionom vremenu i sa istim EI (**sl. 2.26.**) i CI masenim spektrima.



**Slika 2.26.** EI-MS-Spektar jedinjenja **D22** na  $R_t=12,1$  min

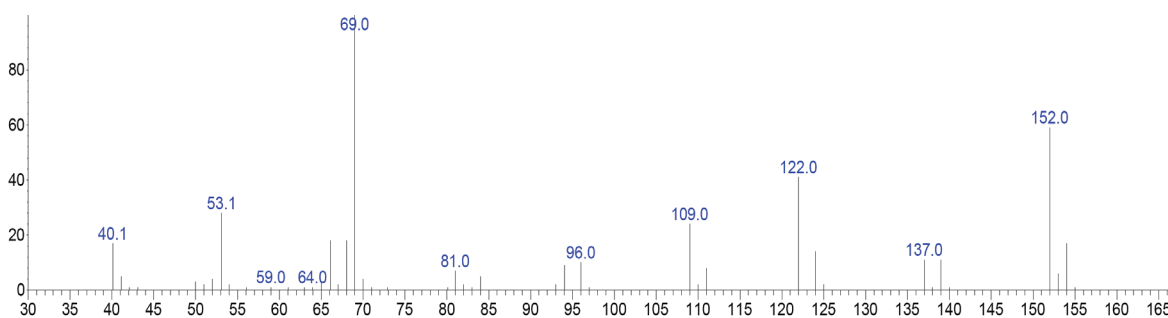
Jedinjenje **D23** (2-metilhidrohinon) identifikovano je na retencionom vremenu od 12,5 min ( $RI=1344$ ). Pošto je u pitanju homolog hidrohinona, reticioni indeks je očekivano za oko 100 veći nego kod hidrohinona (1232). Takođe, kao i drugi

hidrohinoni jedinjenje **D23** učestvuje u reakciji silanizovanja, pri tom gradeći di-TMS derivat sa retencionim indeksom 1478 i sa molekulskom masom većom za 144 jedinice u odnosu na originalno jedinjenje (potvrđeno GC-CI-MS analizom).



Slika 2.27. EI-MS-Spektar jedinjenja **D23** na  $R_t=12,5$  min

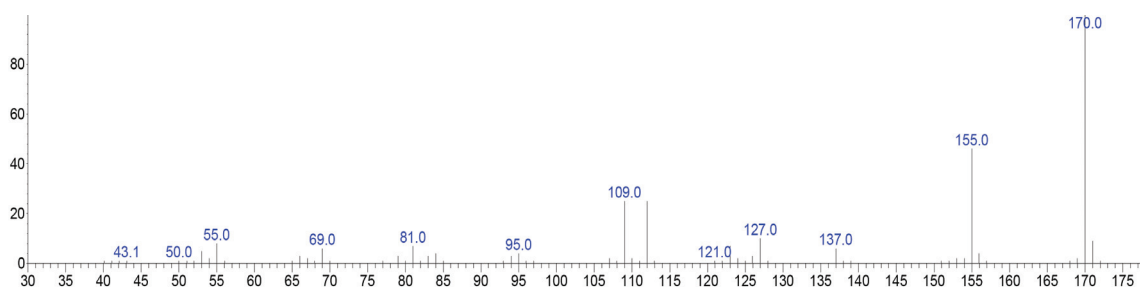
Jedinjenje **D24** (2-metoksi-5-metilhidrohinon) identifikovano je na retencionom vremenu 12,6 min (RI=1350). U CI-MS spektru uočen je protonovani molekul  $[M+H]^+$  na  $m/z$  155, dok je nakon silanizovanja uočen pik sa retencionim indeksom 1565 jedinica i protonovanim molekulom na  $m/z$  299.



Slika 2.28. EI-MS-Spektar jedinjenja **D24** na  $R_t=12,6$  min

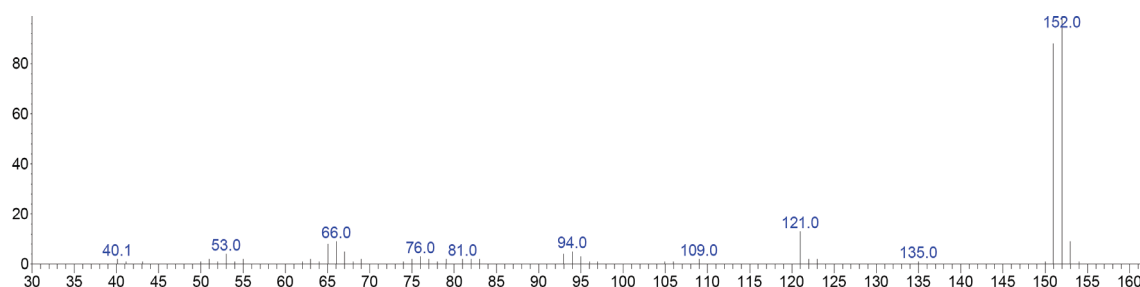
Na  $R_t=12,9$  min identifikovano je jedinjenje **D25** (2,3-dimetoksihidrohinon, RI=1373). Na osnovu CI-MS spektra određena je molekulska masa od 170 u, što u kombinaciji sa EI-MS podacima daje molekulsku formulu  $C_8H_{10}O_4$ . Nakon silanizovanja i tumačenja EI i CI-MS podataka identifikovan je di-TMS-derivat (RI=1570) molekulske mase 314 u, što odgovara molekulskoj formuli  $C_{14}H_{26}O_4Si_2$ .





Slika 2.29. EI–MS–Spektar jedinjenja **D25** na  $R_t=12,9$  min

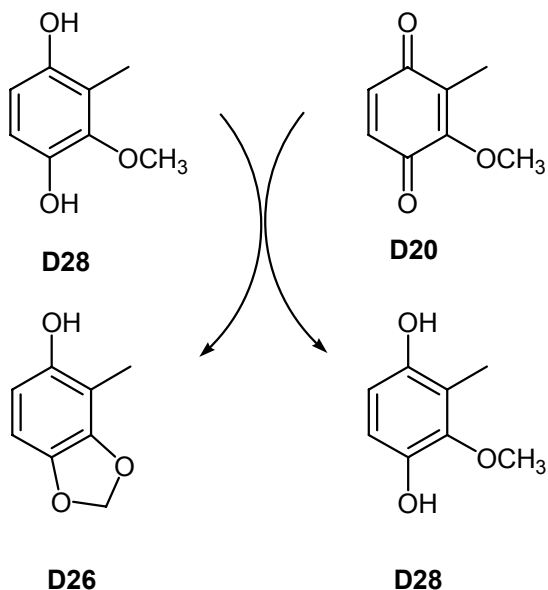
Na osnovu EI–MS spektra jedinjenja **D26** (2–metil–3,4–metilenedioksifenola) na  $R_t=13,2$  min, može se primetiti razlika u odnosu na spektre benzohinona, ali i na spektre hidrohinona (sl. 2.30.). Pored osnovnog jona  $m/z$  152, koji je ujedno i molekulski, uočava se jedini intenzivni fragmentacioni jon  $m/z$  151. S obzirom na to da je ciklodehidrogenizacijom onemogućena hinon–hidrohinon rezonancija, gubitak jednog protona je veoma favorizovan, jer tako nastaje benzilni karbokatjon koji je dodatno stabilizovan rezonancijom i slobodnim elektronskim parovima sa više atoma kiseonika.



Slika 2.30. EI–MS–Spektar jedinjenja **D26** na  $R_t=13,2$  min

U reakciji silanizovanja nastaje mono–TMS derivat molekulske mase 224 u (RI=1467). Wu i saradnici<sup>60</sup> su uočili da 2–metil–3,4–metilenedioksifenol (jedinjenje **D26**) nastaje ako se pomešaju etarski rastvori 2–metoksi–3–metil–1,4–benzohinona (jedinjenje **D20**) i 2–metoksi–3–metilhidrohinon (jedinjenje **D28**) na sobnoj temperaturi u trajanju od 1–2 dana. Predložena reakcija nastanka ovog jedinjenja prikazana je na shemi 2.31.

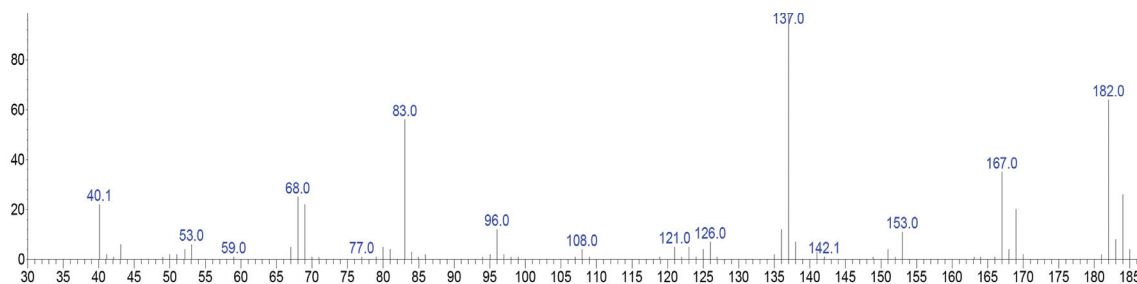
Ovaj podatak je još više naglasio koliko je važno da se uzorci analiziraju odmah nakon ekstrakcije.



**Shema 2.31.** Shema nastanka jedinjenja **D26** u reakciji ciklodehidracije jedinjenja **D28**.

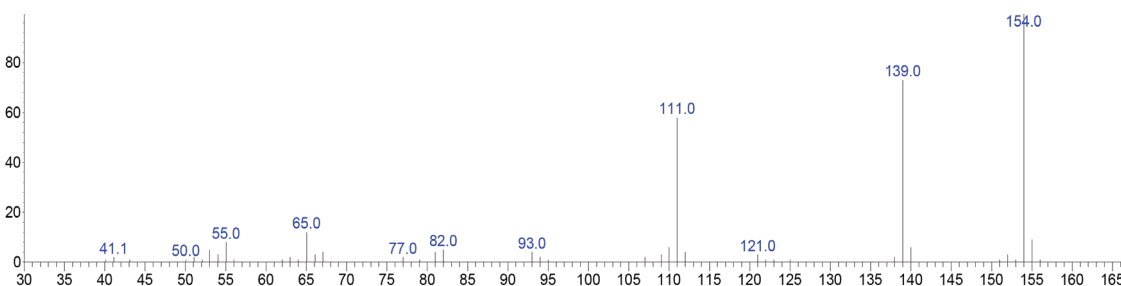
Tačnije, jedini pouzdan način je da se jedinjeke održavaju u životu do samog trenutka analiziranja.

Na  $R_t=13,5$  min identifikovano je jedinjenje **D27** (2,3–dimetoksi–5–metil–1,4–benzohinon,  $RI=1420$ ). U ukupnom jonskom hromatogramu dobijenom tehnikom hemijske jonizacije na istom retencionom vremenu uočavamo protonovani molekul  $m/z$  183, što bi odgovaralo molekulskoj formuli  $C_9H_{10}O_4$ , odnosno benzohinonu, koji ne reaguje sa reagensom za silanizovanje.



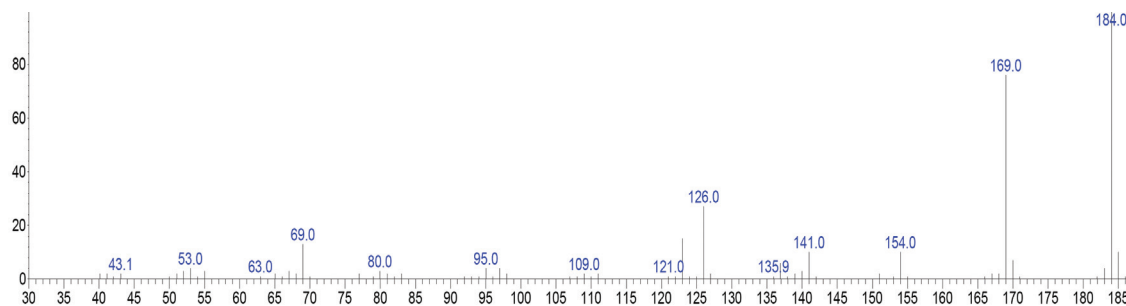
**Slika 2.32.** EI–MS–Spektar jedinjenja **D27** na  $R_t=13,5$  min.

Na  $R_t=13,6$  min identifikovano je jedinjenje **D28** (2–metoksi–3–metil–hidrohinon,  $RI= 1425$ ). U CI–MS spektru osnovni jon je na vrednosti  $m/z$  155, dok se u EI–MS spektru uočavaju tri intenzivna jona: osnovni, ujedno i molekulski na  $m/z$  154, zatim jon 139, koji nastaje gubitkom metil–radikala, i na kraju, jon 111 koji nastaje gubitkom ugljen–monoksida od fragmenta 139. Prilikom silanizovanja jedinjenje **D28** daje di–TMS derivat.

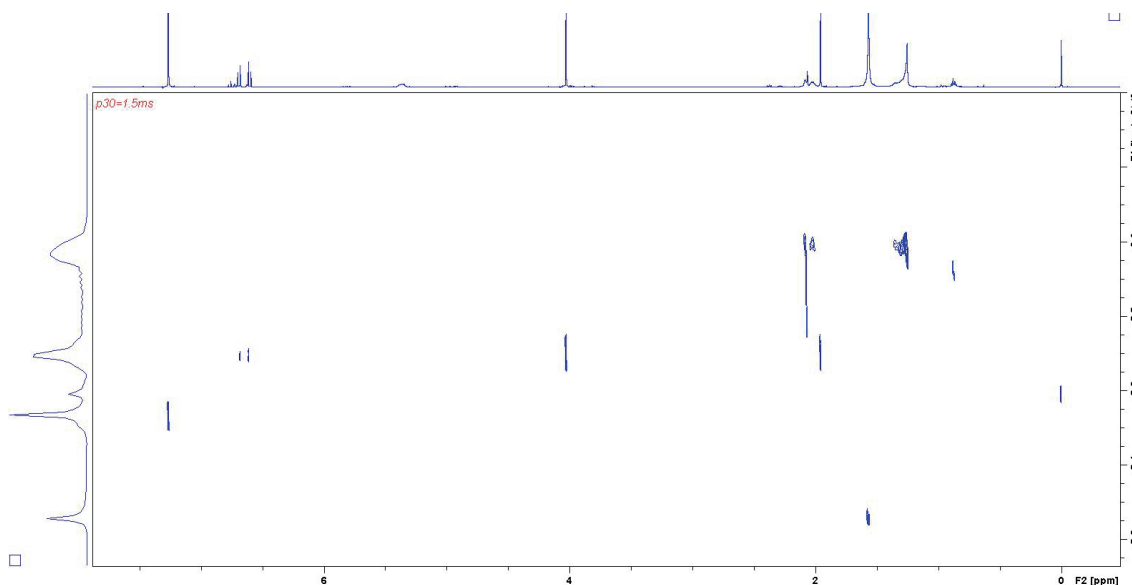


**Slika 2.33.** EI–MS–Spektar jedinjenja **D28** na  $R_t=13,6$  min

Poslednje identifikovano jedinjenje iz ove serije je **D29** (2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon) na  $R_t=14,0$  min i  $RI=1455$ . U CI-MS spektru se uočava protonovani molekul na  $m/z$  185, što odgovara molekularnoj formuli  $C_9H_{12}O_4$ . U reakciji silanizovanja nastaje di-TMS derivat,  $RI=1730$ . U CI-MS spektru ovog derivata uočava se protonovani molekul na  $m/z$  329, što odgovara očekivanoj vrednosti za  $[M+H]$  jon di-TMS-derivata jedinjenja **D29**.



Slika 2.34. EI-MS-Spektar jedinjenja **D29** na  $R_t=14,0$  min



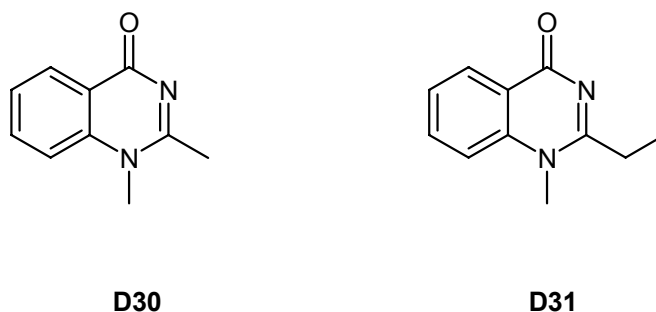
Slika 2.35. DOSY spektar  $CDCl_3$  ekstrakta *Cylindroiulus boleti*: uočene korelacije jedinjenja **D18** i **D20**, sa jedne i heksil estara sa druge strane.

Pored hinonskih derivata svih šest ispitivanih vrsta sadržavale su i nehinonske derivate koji su se mogli uočiti u GC-FID i GC-MS hromatogramima metilenhloridnih ekstrakata, kao i u deuterohloroforskim ekstraktima u NMR spektrima (sl. 2.17.). Na osnovu masenih spektara moguće je potvrditi da se radi o heksil-estrira

zasićenih i nezasićenih masnih kiselina niza od 14 – 20 C atoma. Dok se u  $^1\text{H}$  NMR spektrima pored protona koji potiču od jedinjenja **D18** i **D20** mogu uočiti signali protona iz estara masnih kiselina sa najkarakterističnijim signalom  $\text{CH}_2$ -grupe do kiseonika, koji je triplet na hemijskom pomeranju  $\delta=4,06$  ppm-a i konstantom sprezanja  $J=6,7$  Hz. Takođe se uočavaju signali  $\text{CH}_2$ -grupe vezane za  $\text{C}=\text{O}$  grupu na hemijskom pomeranju  $\delta$  2,3 sa konstantom sprezanja  $J=7,6$  Hz i signali alifatičnih  $\text{CH}_2$ -grupa iz dugog niza na  $\delta$  1,2, kao i signali terminalnih metil-grupa na  $\delta$  0,9 (sl. 2.17.). Pošto su odbrambeni sekretari dobijeni ekstrakcijom (potapanjem) živih jedinki u različite vrste rastvarača nije sigurno da li su identifikovani estri zaista i deo sekreta Julida. Na osnovu strukture, ova jedinjenja se ne mogu svrstati u grupu alomona\*.

### 2.1.5. Odbrambene supstance predstavnika familije Glomeridae (Diplopoda, Glomerida)

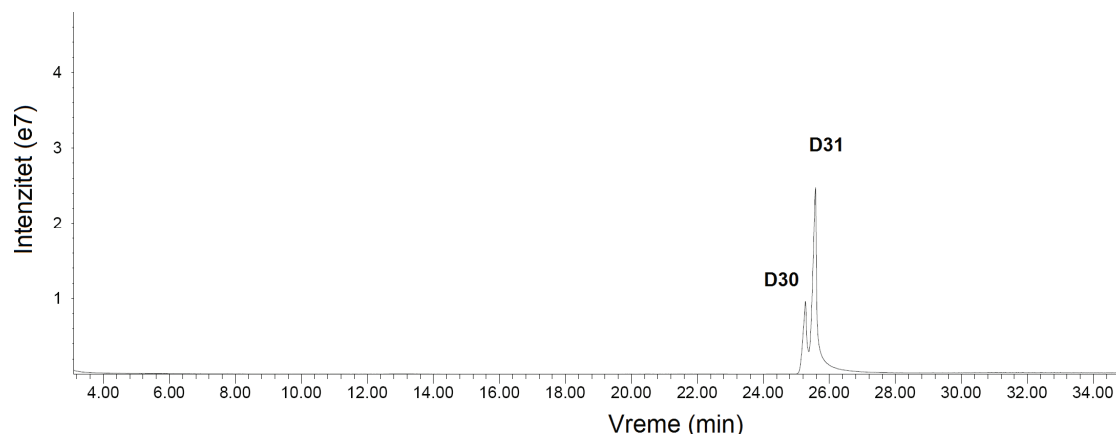
U okviru familije Glomeridae ispitivane su dve vrste *Glomeris klugii* i *Onychoglomeris herzegowinensis*. Metilen-hloridni ekstrakt vrste *G. klugii* pokazao je neuobičajenu pojavu: pored rastvornog dela ekstrakta postojao i je nerastvorni deo, koji nije bio rastvoran, ne samo u metilen-hloridu i hloroformu, nego i etanolu, dimetil sulfoksidu, pa čak ni i u vodi. Rastvorni deo metilen-hloridnog ekstrakta analiziran je GC-FID, GC-MS, LC-MS i NMR tehnikama. Iz odbrambenog sekreta okarakterisana su dva hinazolinska alkaloida: glomerin **D30** i homoglomerin **D31** (sl. 2.36.).



Slika 2.36. Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu vrste *Glomeris klugii*.

\* Alomoni su odbrambene supstance

Na osnovu GC–FID hromatograma utvrđen je relativni odnos približno 2:1 u korist homoglomerina (**sl. 2.36** i **tabela 2.6.**). Identifikacija jedinjenja **D30** i **D31** nije bila moguća na osnovu komercijalnih biblioteka, pošto ni jedan maseni spektar nije u potpunosti odgovarao masenim spektrima snimljenim tehnikom elektronske jonizacije.

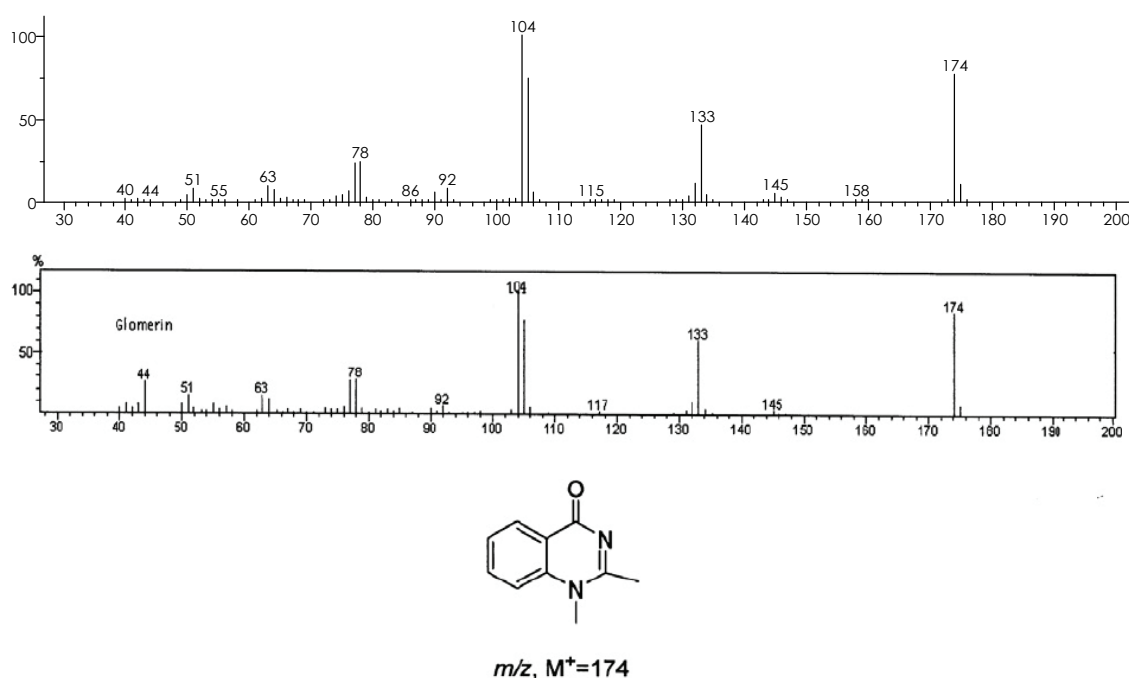


**Slika 2.37.** Ukupni GC–FID jonski hromatogram metilen–hloridnih ekstrakata odraslih jedinki *Glomeris klugii* (Brandt 1833).

**Tabela 2.6.** Sastav metilen–hloridnog ekstrakata vrste *Glomeris klugii* (Brandt 1833) analiziran GC–FID i GC–MS tehnikama.

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Procentni sastav
25,3	2509	<b>D30</b> Glomerin	35,2
25,6	2542	<b>D31</b> Homoglomerin	64,8

Na  $R_t=25,3$  min ( $RI=2509$ ) uočen je EI–MS spektar (**sl. 2.38.**) koji ima nekoliko karakterističnih jona: osnovni jon  $m/z$  104, zatim jone međusobno sličnih intenziteta na  $m/z$  105, 133 i 174. Prepostavili smo da je jon na najvećoj  $m/z$  vrednosti ( $m/z$  174) ujedno i molekularni jon. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka do sada analiziranih vrsta iz familije Glomeridae<sup>61,62</sup> pronašli smo maseni spektar glomerina, koji je u potpunosti odgovarao snimljenim podacima (**sl. 2.38.**), gde osnovni jon 104 nastaje retrociklizacijom pri čemu dolazi do odlaska neutralnog  $C_3H_6N_2$  fragmenta. Jon 133 nastaje, takođe, odlaskom neutralnog fragmenta  $C_2H_3N$  ( $M - 41$ ).



**Slika 2.38.** EI–MS–Spektar jedinjenja **D30** na  $R_t=25,3$  min (gore) i literaturni EI–MS spektar glomerina (dole).<sup>62</sup>

Nakon ove pretpostavke, snimljen je tečno maseni hromatogram dobijen tehnikom elektrosprej jonizacije (ESI) sa masenim analizatorom na osnovu vremena preleta\* (TOF) u kome je uočen pik na  $R_t=1,30$  min u čijem se masenom spektru visoke rezolucije† uočavaju protonovani molekuli  $[M+H]^+$  i  $[2M+H]^+$  na vrednostima  $m/z$  175,08663 i 349,16556. Nakon obrade rezultata u programu Molecular Feature Extractor (MFE) i naknadnom analizom‡ u programu Mass Hunter potvrđena je molekulska formula  $C_{10}H_{10}N_2O$  sa greškom manjom od 1 ppm (**tabela 2.7.**).

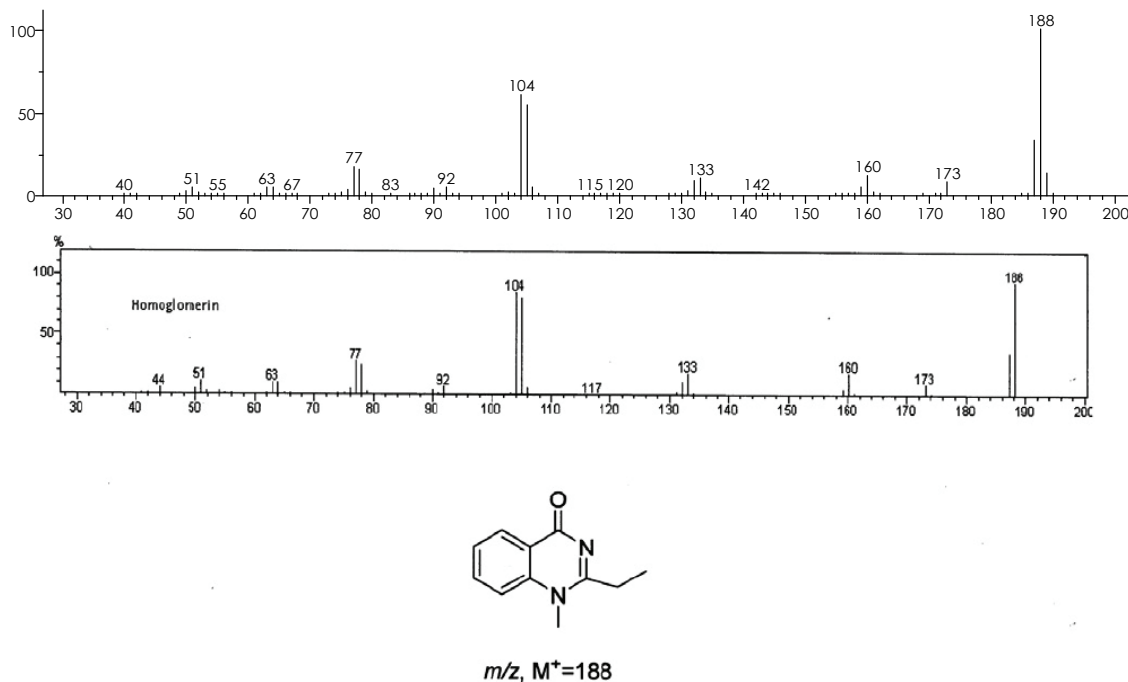
**Tabela 2.7.** Podaci jedinjenja **D30** dobijeni LC–HRMS analizom metanolnog ekstrakta vrste *Glomeris klugii* (Brandt 1833).

Molekulska formula	Jedinjenje	Izotopska masa	Pik (min)	Površina pika	
$C_{10}H_{10}N_2O$	Glomerin <b>D30</b>	174.07931	1,30	4,50181 E7	
Jonska vrsta	Intenzitet	Masa jona	Izmerena masa	Greška (mDa)	Greška (ppm)
$[M+H]^+$	1286734,87	175,08659	175,08663	0,03583	0,20
$[2M+H]^+$	31953,89	349,16590	349,16556	-0,34211	-0,98

\* Time of flight

† HRMS – High Resolution Mass Spectrum

‡ Offline data analysis (primedba autora)



**Slika 2.39.** EI–MS–Spektar jedinjenja **D31** na  $R_t=25,6$  min (gore) i literaturni EI–MS spektar homoglomerina<sup>62</sup>

U GC–MS hromatogramu na  $R_t=25,6$  min ( $RI=2542$ ) uočen je maseni spektar (sl. 2.39.) koji ima nekoliko karakterističnih jona sličnih kao kod glomerina **D30**: molekularni jon na  $m/z$  188 (veći za 14), osnovni jon na vrednosti  $m/z$  104, zatim fragmentacioni joni  $m/z$  187 ( $M - 1$ ), 105 (osnovni jon plus jedan proton), 133 (gubitak neutralnog fragmenta  $C_3H_5N$ ), 160 ( $M - 28$ ) gubitak etilena. Slično kao i kod glomerina nismo dobili dobro slaganje EI–MS spektra sa dostupnim bibliotekama masenih spektara, međutim, upoređujući rezultate sa literaturom<sup>62</sup>, pronašli smo maseni spektar homoglomerina, koji je u potpunosti odgovarao snimljenom spektru jedinjenja **D31** (sl. 2.39.).

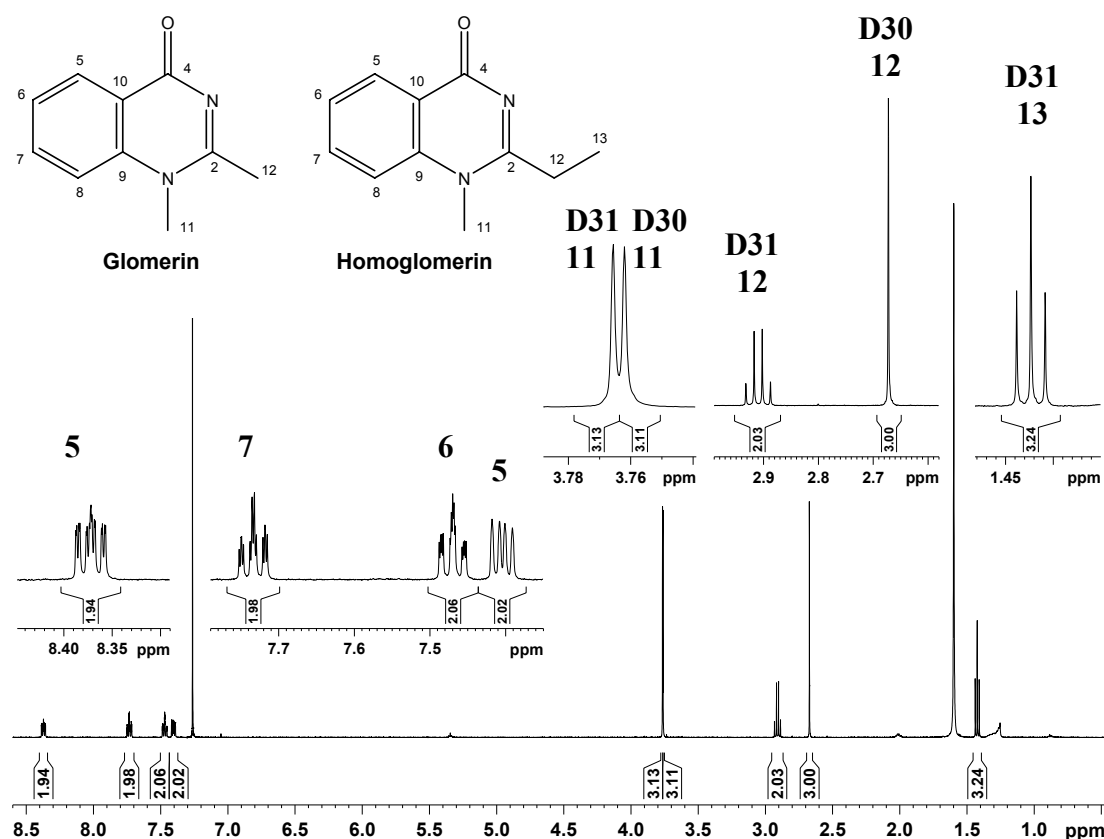
Iz tačno masenog hromatograma dobijenog tehnikom pozitivne ESI jonizacije sa TOF masenim analizatorom uočen je pik na  $R_t=2,41$  min čiji maseni spektar visoke rezolucije odgovara jedinjenju molekulske formule  $C_{11}H_{12}N_2O$ . Tačnije, dobijen je protonovani molekul  $[M+H]^+$  na vrednosti  $m/z$  189,10224 sa greškom merenja manjom od 1 ppm (tabela 2.8.). Veoma malo retenciono vreme jedinjenja **D30** i **D31** je u prvom trenutku bio neočekivan rezultat, međutim, kada se pogledaju uslovi snimanja može se uočiti da mobilna faza sadrži razblaženu mravlju kiselinu, kao reagens za jonizaciju i da se pri takvim uslovima oba jedinjenja nalaze u obliku kvaternernih amonijumovih soli, a

samim tim su dosta polarnija u odnosu na neprotonovana jedinjenja. U našem slučaju malo lošije razdvajanje nadoknađeno je poboljšanom jonizabilnošću, odnosno osetljivošću.

**Tabela 2.8.** Podaci jedinjenja **D31** dobijeni LC–HRMS analizom metanolnog ekstrakta vrste *Glomeris klugii* (Brandt 1833).

Molekulska formula	Jedinjenje	Izotopska masa	Pik (min)	Površina pika	
$C_{11}H_{12}N_2O$	Homoglomerin <b>D31</b>	188,09496	2,41	1,64372 E7	
Jonska vrsta	Intenzitet	Masa jona	Izmerena masa	Greška (mDa)	Greška (ppm)
$[M+H]^+$	757264,76	189,10224	189,10220	-0,04434	-0,23

Da bi smo potvrdili strukture jedinjenja **D30** i **D31** snimljeni su 1D NMR spektri ( $^1H$  i  $^{13}C$ ) i 2D NMR spektri (COSY, editovani HSQC i HMBC) deuterohloroformskog ekstrakta (sl. 2.40–2.44.).



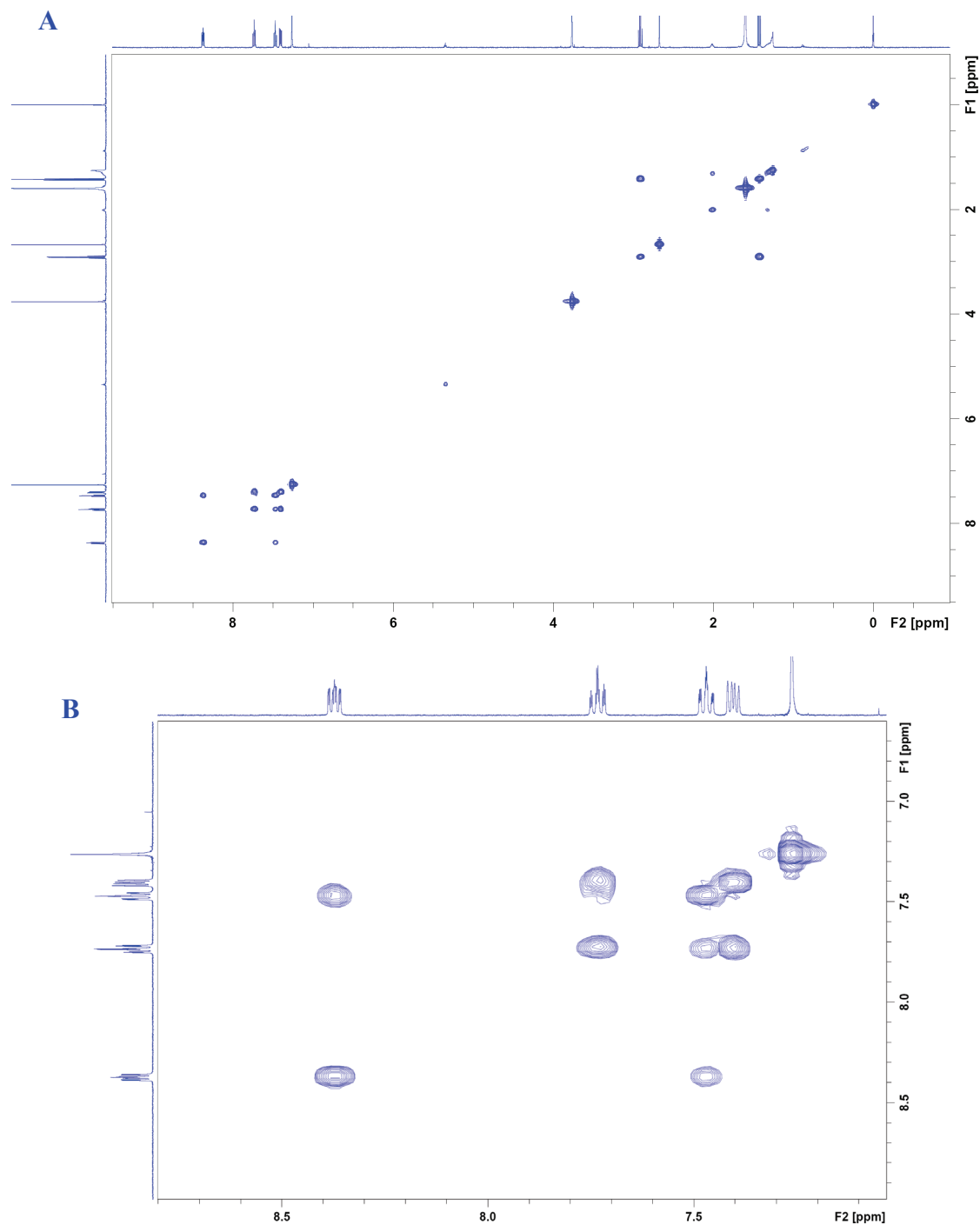
**Slika 2.40.**  $^1H$  NMR–Spektar (500 MHz)  $CDCl_3$  ekstrakta vrste *Glomeris klugii* (Brandt 1833) sa asignacijom svih protona (tabela 2.9.) glomerina (**D30**) i homoglomerina (**D31**) i njihovim strukturama.



U protonskom spektru uočavaju se signali aromatičnih protona ( $\delta$  7,4 – 8,4), sa jedne strane i signali alifatičnih protona sa druge strane ( $\delta$  1,4 – 3,8). Najveće razlike se uočavaju kod spinskog sistema etil-grupe homoglomerina **D31** ( $A_2X_3$ ) u odnosu na singlet metil-grupe kog glomerina **D30**. Iako se aromatični protoni jedinjenja **D30** i **D31** ne razlikuju značajno, uz pomoć  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR, COSY, HSQC i HMBC spektara može se sa velikom sigurnošću doći do identifikacije svakog signala (**tabela 2.9.**). Negde je i samo razlika u koncentraciji jedinjenja **D30** i **D31** bila dovoljna da se signali na bliskim hemijskim pomeranjima razlikuju na osnovu intenziteta, gde intenzivniji signali pripadaju homoglomerinu (**D31**), a manje intenzivni, potiču od glomerina (**D30**), dok je, sa druge strane, nesimetrični izgled korelacionih signala u HSQC i HMBC spektrima bio ključan za identifikaciju signala čija se hemijska pomeranja razlikuju i za manje od 0,005 ppm.

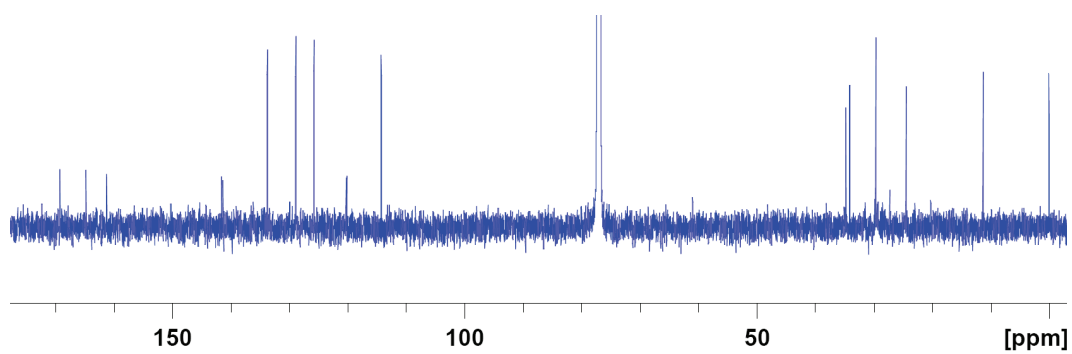
**Tabela 2.9.** NMR–Podaci ( $^1H$  NMR 500 MHz) za glomerin (**D30**) i homoglomerin (**D31**) dobijeni iz  $CDCl_3$  ekstrakta vrste *Glomeris klugii* (Brandt 1833).

Pozicija	Glomerin			Homoglomerin		
	$^1H$ $\delta$ (ppm), mult., J (Hz)	$^{13}C$ $\delta$ (ppm)	HMBC H→C	$^1H$ $\delta$ (ppm), mult., J (Hz)	$^{13}C$ $\delta$ (ppm)	HMBC H→C
2	–	161,2	–	–	164,7	–
4	–	169,2	–	–	169,2	–
5	8,36 <i>ddd</i> (8,0; 1,6; 0,5)	128,81	7, 9	8,38 <i>ddd</i> (8,0; 1,6; 0,5)	128,83	7, 9
6	7,472 <i>dt</i> (7,2; 1,8)	125,8	8, 10	7,468 <i>dt</i> (7,2; 1,8)	125,7	8, 10
7	7,74 <i>dt</i> (7,2; 1,6)	133,74	5, 9	7,73 <i>dt</i> (7,2; 1,6)	133,68	5, 9
8	7,40 <i>br d</i> (8,5)	114,16	6, 10	7,41 <i>br d</i> (8,5)	114,23	6, 10
9	–	141,3	–	–	141,5	–
10	–	120,2	–	–	120,1	–
11	3,76 <i>s</i>	34,7	2, 9	3,77 <i>s</i>	34,1	2, 9
12	2,67 <i>s</i>	24,4	2	2,91 <i>q</i> (7,5)	29,6	2, 13
13	–	–	–	1,42 <i>t</i> (7,5)	11,3	2, 12

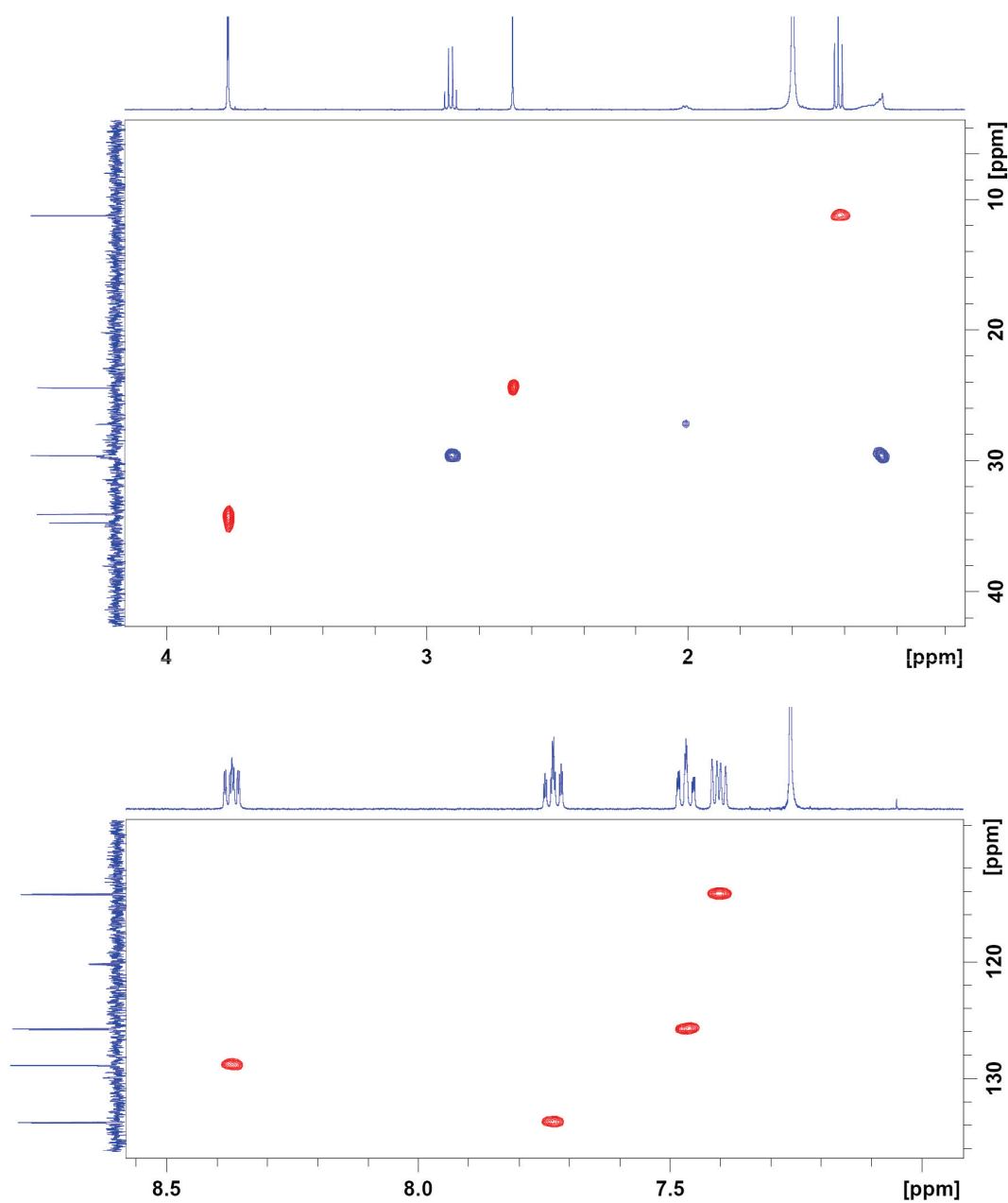


**Slika 2.41.** COSY–Spektar  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta ( $^1\text{H}$  NMR 500 MHz) *Glomeris klugii* (Brandt 1833) (A) i uvećane korelacije aromatičnih protona jedinjenja **D30** i **D31** (B).

U COSY spektru se uočavaju korelacije između četiri hemijski neekvivalentna aromatična protona glomerina i homoglomerina. Signali alifatičnih protona nalaze se na različitom hemijskom pomeranju ali samo homoglomerin ima korelacije (spinski sistem  $\text{A}_2\text{X}_3$ ) koje se uočavaju u COSY spektru (sl. 2.41).



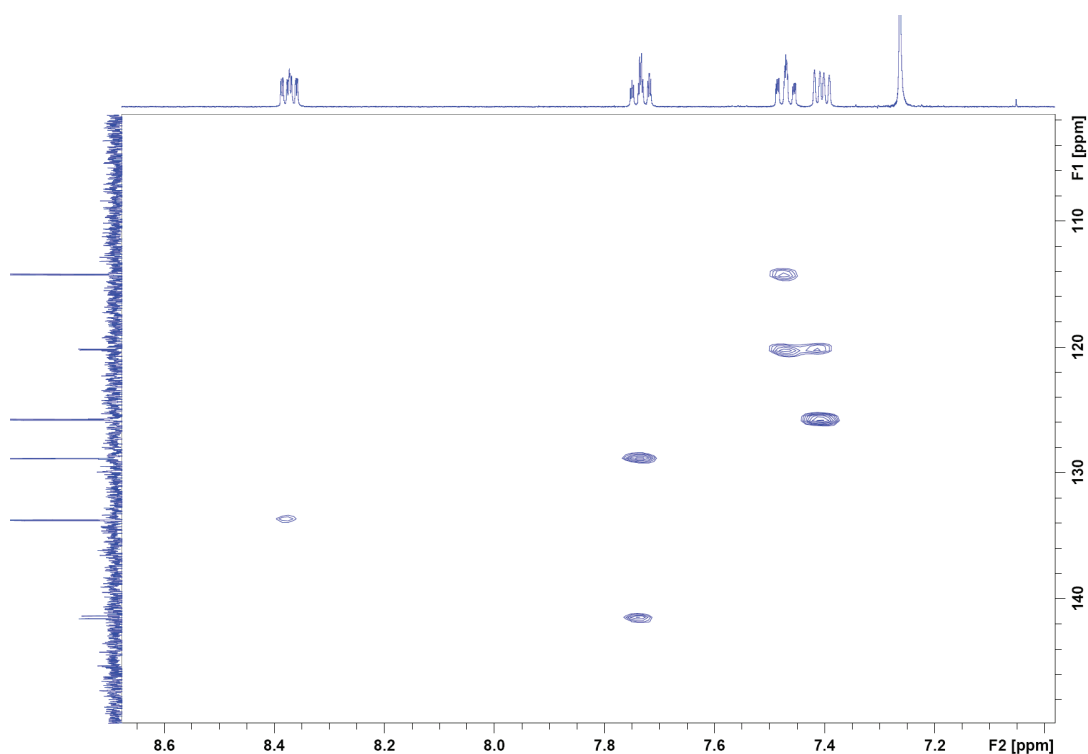
Slika 2.42.  $^{13}\text{C}$  NMR–Spektar (125 MHz)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Glomeris klugii* (Brandt 1833).



Slika 2.43. Editovani HSQC spektar  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Glomeris klugii* (Brandt 1833): alifatične (gore) i aromatične H/C korelacije jedinjenja **D30** i **D31** (dole).

U editovanom HSQC spektru uočavaju se direktne  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  korelacije, ali u odnosu na needitovani spektar uočavaju se i pozitivni i negativni signali (crveni i plavi), tako da se dobijaju i informacije o protonizovanosti ugljenikovih atoma: protoni  $-\text{CH}$  i  $-\text{CH}_3$  grupa su pozitivni (crveni), dok su signali  $-\text{CH}_2$  grupa negativni, to jest plavi (sl. 2.43.).

Odsustvo drugih jedinjenja, kao što su masne kiseline, estri dugog niza, holesterolski derivati, i tako dalje, omogućilo je da se jedinjenja **D30** i **D31** mogu okarakterisati iz deuterohloroformskog ekstrakta odbrambenog sekreta pomoću NMR spektara.



**Slika 2.44.** HMBC–Spektar  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta *Glomeris klugii* (Brandt 1833): aromatične i alifatične H/C korelacije jedinjenja **D30** i **D31**.

Pored rastvornog dela metilen–hloridnog ekstrakta vrste *G. klugii* jasno se mogao uočiti beli, sluzavi nerastvorni deo. Rastvorljivost je isprobana i u polarnim organskim rastvaračima (metanol, acetonitril i DMSO) i u vodi, ali bez uspeha. Pošto je pretpostavka da se u ovom slučaju radi o proteinskim strukturama, ostalo je da se rastvorljivost isproba sa 1 ml Bradford–ovog rastvora. Nakon mešanja i zagrevanja od 15 minuta na  $50\text{ }^\circ\text{C}$  počelo je rastvaranje uzorka i pojava intenzivnije plave boje rastvora u odnosu na Bradford–ov rastvor (koji je takođe zagrevan pod istim uslovima).

Ovaj rezultat je preliminarni dokaz da se radi o uzorku koji sadrži proteinske strukture. Da bi se delimično okarakterisale proteinske strukture, bilo je neophodno da se uradi SDS gel elektroforeza\*. Na 12% akrilamidnom gelu u jednu od pozicija se nanose molekularni markeri a u drugu uzorak (sl. 2.45.). Na osnovu broja proteinskih traka i njihovih intenziteta može se približno odrediti sastav proteinskih struktura, a na osnovu pokretljivosti proteinskih traka u odnosu na molekulske markere, mogu se odrediti molekulske mase tih proteinskih struktura.



**Slika 2.45.** Levo: Odbrambeni sekret *Glomeris klugii* dobijen ekstrakcijom metilen-hloridom; Desno: SDS elektroforeza (A) uzorak odbrambenog sekreta *G. klugii*; (B) molekularni markeri (14,4 kDa lizozim, 185,4 kDa  $\beta$ -laktoglobulin, 25 kDa RNK-aza (Rease) Bsp 98I, 35 kDa laktat dehidrogenaza, 45 kDa ovalbumin, 66,2 kDa BSA i 116 kDa  $\beta$ -galaktozidaza).

Na osnovu izgleda elektroforegrama možemo reći da se tri najintenzivnije proteinske trake u odbrambenom sekretu vrste *G. klugii* nalaze na vrednostima oko 17, 22 i 116 kDa. Proteinski profil odbrambenog sekreta vrste *G. klugii*, pored navedenih intenzivnih proteinskih traka, sadrži i veći broj manje zastupljenih proteina sa rasponom molekularskih masa od 22 do 116 kDa. Pored ovih traka uočavamo i trake aglomerata, koji su jasno primetni na ulazu u gel i trake malih molekularskih masa, koje putuju zajedno sa frontom.

\* Uslovi dati u poglavlju EKSPERIMENTALNI DEO pasus SDS elektroforeza

Nakon analize proteinskog dela odbrambenog sekreta vrste *G. klugii*, došli smo na ideju da analiziramo i vrstu *Onychoglomeris herzegowinensis*. S obzirom na to da živi materijal nismo mogli da sakupimo, analizirali smo materijal koji se već nalazio u Zbirci Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tako smo disekovanjem nekoliko jedinki oba pola izdvojili vezikule i izolovali sekret koji je tako bio sačuvan od propadanja, a zatim uradili Bradford–ov test i dokazali proteinsku prirodu sekreta. Zatim je urađena elektroforeza, ali nije bilo moguće detaljno analizirati proteinske trake, čak i nakon bojenja gela srebrom. Razlog tome ipak leži u maloj količini disekovanog materijala. Ipak, ove analize su značajne jer otvaraju nov način za analizu postojećih uzoraka.

## 2.2. Odbrambene supstance klase Diplopoda – Diskusija

Diplopode zauzimaju važnu ulogu u terestričnim ekosistemima, pre svega zato što učestvuju u razgradnji organske materije. Navedena klasa stonoga poseduje nekoliko mehanizama zaštite od predatora: ponašajne, mehaničke i hemijske. Ponašajni mehanizmi podrazumevaju sposobnost spiralnog ili loptastog uvijanja, dok mehanički podrazumevaju prisustvo čvrste kalcificirane egzokutikule ili posedovanje dugih protektivnih seta ili bodlji. Hemijska odbrana podrazumeva prisustvo raznovrsnih odbrambenih supstanci u sekretu koji se izlučuje iz specijalizovanih žlezda, kada su ove artropode iz bilo kog razlog uznemirene. Odbrambene žlezde su najčešće raspoređene tako da se po jedan par nalazi na svakom pleurotergitu, a prisutne su kod svih diplopoda osim kod rodova Siphoniulida, Sphaerotheriida i Chordeumatida, dok za rodove Siphonophorida, Stemmiulida i Platydesmida nema literaturnih podataka<sup>63,64</sup>.

Smatra se da sastav odbrambenih sekreta kod diplopoda može poslužiti i kao jedan od parametara za rasvetljavanje filogenetskih odnosa između viših taksonomskih kategorija ovih zglavkara. Na osnovu dosadašnjih podataka, stonoge iz reda Callipodida možemo svrstati u grupu (kladu) „krezolskih stonoga“, dok je kod pet familija iz reda Polydesmida utvrđeno prisustvo cijanovodonika i njegovih prekursora u sekretu, što ih svrstava u „cijanidnu“ grupu diplopoda (**tabele 2.10 i 2.11.**). Vrste stonoga koje pripadaju redovima Polyzoniida i Glomerida u odbrambenom sekretu sadrže alkaloidne („alkaloidna“ klada diplopoda), dok stonoge koje pripadaju redovima Julida, Spirostreptida i Spirobolida, kao hemijsku odbranu koriste benzohinon i njegove derivate, te čine „hinonsku“ kladu diplopoda (**tabele 2.12–2.14**). Od interesa je napomenuti da je prema dosadašnjim istraživanjima kod diplopoda, jedino kod članova reda Glomerida registrovano prisustvo proteinske komponente u odbrambenom sekretu (**tabela 2.14.**).

**Red Callipodida** uključuje forme koje imaju veoma disjunktну distribuciju (Severna Amerika, Balkansko poluostrvo, Azija), što uz primitivna morfološka obeležja, ukazuje na njihov reliktni status. Ovaj red obuhvata tri podreda (Sinocallipodidea; Callipodidea i Schizopetalidea), sedam familija, 35 rodova i 133 podvrste<sup>65,66</sup>. Do sada (pre naših radova), prisustvo odbrambenog sekreta

dokumentovano je samo kod tri vrste Callipodida iz familije Abacionidae (iz Severne Amerike) (**tabela 2.10.**), gde je kao jedina komponenta registrovan *p*-krezol. Zbog toga, analiza odbrambenog sekreta dve vrste iz familije Schizopetalidae predstavlja dragocen podatak za naučnu javnost. Želja nam je bila da po prvi put ispitamo odbrambene supstance kod dve evropske kalipodidne vrste: *Apfelbeckia insculpta* i *Callipodella fasciata*, da poredimo rezultate sa severnoameričkim analiziranim taksonima, kao i da saznamo da li eventualno postoje intergenerične razlike u odbrambenom sekretu. Ove dve vrste, iako pripadaju istoj familiji, poseduju niz morfoloških različitosti, posebno u polnom aparatu, ali i naseljavaju potpuno različita staništa. *A. insculpta* je troglofilna vrsta koja naseljava pećine i pećinske sisteme, dok je *C. fasciata* tipična epigejska vrsta (naseljava stelju i površinske slojeve zemljišta). Pored toga, istraživanja na navedenim vrstama su imala za cilj i potvrdu prisustva *p*-krezola, to jest, potvrdu ideje o konzistentnosti odbrambenih supstanci kod diplopoda i postojanju „krezolske“ grupe diplopoda.

**Tabela 2.10.** Identifikovane supstance iz odbrambenih sekreta stonoga reda Callipodida i prisustvo *p*-krezola kod drugih redova koji pripadaju klasi Diplopoda.

Red	Familija	Odbrambene supstance	Ref
	<i>Ispitivana vrsta</i>		
Callipodida			
	Abacionidae		
	<i>Abacion magnum</i> (Loomis 1943)	<i>p</i> -krezol, neidentifikovane supstance u tragovima	49
	<i>Tetracion jonesi</i> (Hoffman 1956)	<i>p</i> -krezol	64
	<i>Delophon georgianum</i> (Chamberlin 1943)	<i>p</i> -krezol	64
	Schizopetalidae		
	<i>Apfelbeckia insculpta</i> (L. Koch 1867)	<i>p</i> -krezol, fenol, <i>p</i> -etilfenol (tragovi)	67*
	<i>Callipodella fasciata</i> (Latzel 1882)	<i>p</i> -krezol, fenol, <i>p</i> -etilfenol (tragovi)	68*
Julida			
	Parajulidae		
	<i>Oriulus venustus</i> (Wood 1864)	<i>p</i> -krezol, hidrohion, 3-metoksi-2-metil-1,4-benzohion	19
Polydesmida			
	Paradoxosomatidae		
	<i>Nedyopus patrioticus patrioticus</i> (Attems 1898)	<i>p</i> -krezol, benzaldehid, fenol, mandelonitril, HCN	69
	<i>Chamberlinius hualienensis</i> (Wang 1956)	<i>p</i> -krezol, gvajakol, kreosol, metil benzoat, fenol, benzaldehid dimetil acetal	70,71
	<i>Oxidus gracilis</i> (C. L. Koch 1847)	benzaldehyd, fenol, <i>p</i> -krezol, kreosol, benzaldehid dimetil acetal	71, 72
	Nearctodesmidae		
	<i>Leonardesmus injucundus</i> (Shelley & Shear 2006)	<i>p</i> -krezol, fenol (tragovi)	73

\* Rezultati ove disertacije



Na osnovu naših rezultata potvrđeno je prisustvo *p*-krezola kao glavnog odbrambenog jedinjenja kod dve ispitivane vrste iz familije Schizopetalidae. Takođe je uočeno prisustvo fenola u mnogo manjoj količini i *p*-etilfenola u tragovima, kod obe ispitivane vrste (*A. insculpta* i *C. fasciata*). Naši rezultati su pokazali da se identifikacija odbrambenih supstanci mora izvesti veoma pažljivo, jer u slučaju manje količine materijala, neka od supstanci može ostati neidentifikovana. Naša pretpostavka je bila da se to najverovatnije i desilo prilikom identifikacije odbrambenih jedinjenja objavljenih sredinom prošlog veka, pre svega zbog manje osetljivosti tadašnjih instrumentalnih tehnika.

Smatramo da se relativno jednostavan hemijski arsenal odbrambenog sekreta kod analiziranih kalipodida može objasniti njihovom velikom starošću, to jest, reliktnim statusom. Poznato je da je čitav niz morfoloških karakteristika kod diplopoda evoluirao od veoma jednostavnih do dosta složenih struktura. Stoga je realno pretpostaviti da je arsenal „hemijskog oružja“ koji se javljao kod diplopoda na početku filogenetskog razvića bio dosta siromašan i jednostavan.

S druge strane, *p*-krezol je registrovan u odbrambenim sekretima drugih vrsta diplopoda. U **tabeli 2.10.** sumirano je kod kojih je taksona diplopoda, osim kalipodida, pronađen *p*-krezol, tačnije kod Julida i Polydesmida. Smatramo da nalaz *p*-krezola kod parajulidne vrste *Oriulus venustus* treba prihvatiti sa rezervom, prvenstveno zbog metodološko-tehnoloških nedostataka u analizama koje su rađene u ranijim periodima. Prisustvo krezola u tragovima kod nekoliko polidezmidnih taksona podržava ranije iznete pretpostavke, bazirane na uporedno-morfološkim i molekularnim analizama, o njihovoj bliskoj filogenetskoj vezi sa kalipodidama. Ističemo da se *p*-krezol kod „nekalipodidnih“ diplopoda ne javlja kao glavna komponenta sekreta, već da se sekret sastoji od derivata hinona (slučaj kod Julida) ili prekursora cijanovodonika (slučaj kod Polydesmida). Jedini izuzetak je prisustvo *p*-krezola i fenola u tragu kod polidezmidne *L. injucundus* gde nisu identifikovna cijanogena jedinjenja (**tabela 2.10.**). Dobro je poznato da je *p*-krezol jedinjenje koje uspešno odbija insekte, posebno mrave<sup>19</sup>, ali i guštere, ptice i miševe<sup>49</sup>. Takođe, zemljište i stelju, odnosno stanište ispitivanih vrsta diplopoda, naseljavaju guste populacije bakterija, gljiva i drugih mikroorganizama koji mogu biti patogeni. Roncadori i saradnici<sup>74</sup> su pokazali da *p*-krezol i fenol pokazuju antifungalnu aktivnost, tako što suzbijaju rast micelija i klijanje spora. Stoga možemo

zaključiti da odbrambeni sekret kod ispitivanih kalipodida ima ne samo repelentnu, već i antibakterijsku i antimikrobnu zaštitnu funkciju.

Naši rezultati predstavljaju prvo ispitivanje odbrambenih supstanci kod epigejskih i hipogejskih evropskih kalipodida. Takođe, po prvi put je utvrđeno prisustvo fenola i *p*-etilfenola u odbrambenom sekretu kalipodidnih diplopoda, a ujedno je potvrđeno da je *p*-krezol glavno odbrambeno jedinjenje kod svih do sada ispitivanih diplopoda iz reda Callipodida.

**Red Polydesmida** jedan je od najbrojnijih redova Diplopoda, koji uključuje 4 podreda sa 27 familija; najbrojnija je familija Polydesmidae, koja sadrži 22 roda i preko 200 opisanih vrsta<sup>65</sup>. Članovi reda Polydesmida se karakterišu proizvodnjom cijanovodonika kao alomona. Još pre otkrivanja prirode gasovitog sekreta kod polidezmidna, naučnici su primetili njegove smrtonosne efekte na razne organizme koji su zatvarani zajedno sa ovim vrstama diplopoda. Zanimljivo je napomenuti da podaci o tome da je ovaj otrovni gas prisutan kod Polydesmida datiraju još iz davne 1882. godine<sup>75</sup>. Odbrambene žlezde su kod Polydesmida raspoređene na lateralnim nastavcima pleurotergita, takozvanim paranotumima (lateralni nastavci na metazonitima), a njihov raspored ima generičku vrednost (recimo kod predstavnika roda *Brachydesmus* raspoređeni su na V, VII, IX, X, XII, XIII, XV, XVI, XVII i XVIII pleurotergitu). Polidezmidne, naravno, ne skladište cijanovodonik kao gas, već on nastaje u reakciji mandelonitrila i/ili benzoil-nitrila sa odgovarajućim enzimima. Zbog toga se u rezervoaru svake odbrambene žlezde skladišti benzoil-nitril, mandelonitril odnosno mandelonitril-glukozid, a tek tokom nadražaja ova jedinjenja idu put reakcione komore gde zajedno sa enzimima dolazi do oksidacije ovih jedinjenja u benzaldehid i benzoevu kiselinu, pri čemu nastaje cijanovodonik, koji se onda ispušta u spoljašnju sredinu zajedno sa ostalim isparljivim jedinjenjima.

U našim radovima ispitivane su četiri vrste polidezmidna, s ciljem da se odredi sastav njihovih odbrambenih sekreta, ispituju sličnosti i razlike u okviru roda *Brachydesmus*, odnosno u okviru familije Polydesmidae i da se tako dobijeni rezultati uporede sa dosadašnjim rezultatima u okviru reda Polydesmida (**tabela 2.11.**), kako bi se potvrdilo ili negiralo dosadašnje mišljenje da su ovo „cijanogene diplopode“. Pošto smo ispitivali tri vrste stonoga iz roda *Brachydesmus* značajno je bilo da se upoređi sastav odbrambenog sekreta pećinske vrste *B. troglobius* (troglobiona) sa dve epigejske vrste *B.*

*avalae* i *B. Dadayi*. Ćurčić i Makarov (1998) su pokazali da je *B. troglobius* pravi troglobiont, jer pored niza troglomorfnih karaktera (gubitak pigmenta, izdužene antene i noge za hodanje), kompletira svoje razviće u kavernikolnom okruženju (registrovani su svi postembrionalni stadijumi unutar jednog pećinskog sistema). Poznato je da adaptacija na podzemni način života može dovesti do promena u ponašanju, gubitka pigmentata, gubitka organa vida, kao i niza drugih promena. Zbog toga smo pretpostavili da će pećinska vrsta *B. troglobius* imati sekret koji je pretrpeo značajnije promene u odnosu na sekret drugih epigejskih vrsta.

Međutim, ova pretpostavka nije potvrđena na osnovu naših rezultata. Tačnije, *B. troglobius* imao je skelet vrlo sličnog sastava kao i do tada ispitivane vrste iz reda Polydesmida (**tabela 2.11.**). Razlike su pronađene u prisustvu tri nova odbrambena jedinjenja, po prvi put registrovanih kod stonoga: benzil–alkohol (**D5**), koji se javlja kod svih ispitivanih vrsta roda *Brachydesmus*, ali ne i kod vrste iz roda *Polydesmus*, dok se benzil–metil–keton (**D7**) javlja samo kod vrste *P. complanatus*, ali ne i kod ostale tri vrste roda *Brachydesmus* (moguća hemotaksonomska razlika između ovih rodova) i na kraju benzil–etil–keton (**D9**), koji se javlja kod epigejskih stonoga, ali ne i kod pećinske vrste. Na osnovu činjenice da sve tri epigejske vrste poseduju benzil–etil–keton, dok ga jedina ispitivana pećinska vrsta nema, ipak se ne može sa sigurnošću tvrditi da je to potvrda konzerviranja odbrambenog sekreta kod jedinki koje nisu tokom evolucije menjale svoja staništa i gde im se broj neprijatelja drastično smanjio. Pored toga značajno je napomenuti da je prisustvo benzoeve kiseline pronađeno kod *B. avalae* i *B. troglobius*, dok se prisustvo mandelonitrila i mandelonitril–benzoata mora uzimati sa velikom rezervom, pogotovu ako su dobijeni na osnovu GC ili GC–MS analiza, pre svega zbog činjenice da se mandelonitril prilikom gasne hromatografije raspada na benzaldehid i HCN, a da dužim stajanjem organskih ekstrakata dolazi do reakcije između benzoil–nitrila (**D9**) i mandelonitrila (**D9**), pri čemu nastaje mandelonitril–benzoat (**D10**) i oslobađa se cijanovodonik (**D11**)<sup>7</sup>.

**Tabela 2.11.** Identifikovane supstance u odbrambenom sekretu stonoga iz reda Polydesmida

Red	Familija Ispitivana vrsta	Odbrambene supstance	Ref.
Polydesmida			
Polydesmidae			
	<i>Brachydesmus avalae</i> (Curcic & Makarov 1997)	benzaldehyd, benzil-alkohol, benzoil-nitril, benzoeva kiselina, mandelonitril-benzoat, HCN, benzil-etil-keton	76*
	<i>Brachydesmus dadayi</i> (Verhoeff 1898)	benzaldehyd, benzil-alkohol, benzoil-nitril, mandelonitril-benzoat, HCN, benzil-etil-keton	76*
	<i>Brachydesmus troglobius</i> (Daday 1889)	benzaldehyd, benzil-alkohol, benzoil-nitril, benzoeva kiselina, mandelonitril-benzoat, HCN	77*
	<i>Polydesmus complanatus</i> (Linnaeus 1761)	benzaldehyd, benzoil-nitril, mandelonitril-benzoat, HCN, benzil-metil-keton, benzil-etil-keton, mandelonitril	76*
	<i>Polydesmus collaris collaris</i> (C. L. Koch 1847)	benzaldehyd, HCN	
	<i>Polydesmus vicinus</i>	HCN, <i>p</i> -izopropil mandelonitril glukozid	78
	<i>Epanerchodus japonicus</i> (Carl 1902)	benzaldehyd, HCN, mandelonitril, fenol	79
	<i>Epanerchodus fulvus</i> (Haga 1956)	benzaldehyd, benzoil-nitril, mandelonitril-benzoat, HCN, mandelonitril	7
	<i>Pseudopolydesmus erasus</i> (Loomis 1943)	benzaldehyd, mandelonitril-benzoat, HCN, fenol, gvajakol	80
	<i>Pseudopolydesmus serratus</i> (Say 1821)	benzaldehyd, benzoil-nitril, benzoeva kiselina, mandelonitril-benzoat, HCN, mandelonitril, izovalerijanska kiselina, miristinska kiselina, stearinska kiselina	80
	<i>Pseudopolydesmus canadensis</i> (Newport 1844)	HCN	81
Pyrgodesmidae			
	<i>Cryptocorypha</i> sp.	benzaldehyd, mandelonitril-benzoat, mandelonitril	7
Xystodesmidae			
	<i>Parafontaria tonominea</i> (Attems 1899)	benzaldehyd, benzoil-nitril, mandelonitril-benzoat, mandelonitril	82
	<i>Parafontaria laminata armigera</i> (Verhoeff 1936)	benzaldehyd, benzoil-nitril, mandelonitril-benzoat, benzoeva kiselina	83
	<i>Riukiaria semicircularis</i> (Takakuwa 1941)	benzaldehyd	82
Paradoxosomatidae			
	<i>Nedyopus patrioticus patrioticus</i> (Attems 1898)	<i>p</i> -krezol, benzaldehyd, fenol, mandelonitril, HCN	84
	<i>Chamberlinius hualienensis</i> (Wang 1956)	benzaldehyd dimetil acetal, <i>p</i> -krezol, kreosol, metil benzoat, fenol, gvajakol,	84
	<i>Oxidus gracilis</i> (C. L. Koch 1847)	benzaldehyd, fenol, <i>p</i> -krezol, kreosol, benzaldehyd dimetil acetal	7,71,72
Nearctodesmidae			
	<i>Leonardesmus injucundus</i> (Shelley et Shear 2006)	<i>p</i> -krezol, fenol	73

\* Rezultati ove disertacije

Na osnovu naših rezultata mogli smo da zaključimo da je potvrđena pretpostavka prema kojoj diplopode iz familije Polydesmidae pripadaju grupi cijanogenih diplopoda, ali nije potvrđena pretpostavka da će se sastav odbrambenog sekreta redukovati ili promeniti kod pećinskih vrsta u odnosu na epigejske, bar ne kod ispitivane vrste *B. troglobius*. Uočene su razlike u sastavu odbrambenih sekreta između različitih rodova, tako da se odbrambene supstance mogu koristiti kao hemotaksonomski markeri kod analiziranih polidezmida.

**Red Polyzoniida** sadži dva podreda, četiri familije i oko 70 vrsta<sup>65</sup>, koje su rasprostranjene na gotovo svim kontinentima. Odbrambene supstance analiziranih predstavnika reda Polyzoniida su terpenoidni alkaloidi, koje možemo svrstati u tri grupe: spiropirolidon (polizonimin **D13**) spiropirolizidini (predstavnik nitroplizonamin **D15**) i cikloindolizidin (buzonamin). Svi identifikovani alkaloidi kod Polyzoniida su u eksperimentima pokazali odbrambeno dejstvo. U knjizi „Tajna oružja“ profesora Eisner-a i saradnika<sup>4</sup> prikazan je primer eksperimenta u kome mrav napada i ubrzo zatim odbacuje jedinku *Polyzonium rosalbum* (danas je validna vrsta *Petaserptes cryptocephalus*).

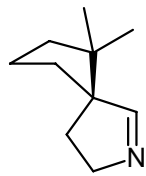
U našim radovima je ispitivana vrsta *Polyzonium germanicum* sa ciljem da se odredi sastav odbrambenog sekreta, da se uporedi sa dosašnjim rezultatima (**tabela 2.12.**), kako bi se ispitale sličnosti i razlike u okviru roda *Polyzonium*, familije Polyzoniidae, odnosno u okviru reda Polyzoniida. Takođe je trebalo potvrditi mišljenje da su ovo stonoge koje proizvode alkaloidne supstance kao odbrambene supstance.

**Tabela 2.12.** Identifikovane supstance iz odbrambenih sekreta stonoga reda Polyzoniida

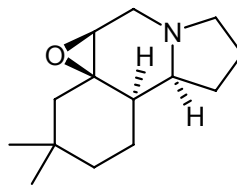
Red	Familija	Jedinjenja*	Ref.
	<i>Ispitivana vrsta</i>		
Polyzoniida			
	Polyzoniidae		
	<i>Polyzonium rosalbum</i> [sada <i>Petaserptes cryptocephalus</i> (McNeill 1887)]	<b>151B i 238</b> <b>151B, 236, iso-236, 238 i 254</b>	4
	<i>Polyzonium germanicum</i> (Brandt 1837)	<b>151B</b> <b>151B, 236, iso-236, 238 i 296</b>	95 †
	<i>Buzonium crassipes</i> (Cook & Loomis 1928)	<b>221</b> , limonen, $\beta$ -pinen	85
	Siphonotidae		
	<i>Rhinotus purpureus</i> (Pocock 1894)	<b>236, 238</b> (u tragu)	86
		<b>151B, 236, iso-236, 238 i 254</b>	87

\* Strukture i imena jedinjenja su prikazane na **Slici 2.46.**

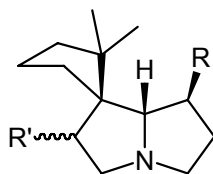
† Rezultati ove disertacije



Polizonimin 151B (D13)



Buzonamin 221

**Spiropirolizidinski alkaloidi:**236 (D14): R = =NOCH<sub>3</sub>; R' = H238 (D15): R = NO<sub>2</sub>; R' = H254 : R = NO<sub>2</sub>; R' = OH296 (D16): R = =NOCH<sub>3</sub>; R' = OAc

Slika 2.46. Strukture i nazivi alkaloida, do sada pronađenih kod stonoga reda Polyzoniida.

Sva četiri okarakterisana jedinjenja (**D13–15**) iz odbrambenog sekreta *P. germanicum* pripadaju grupi spiro alkaloida i kao takvi su među najzanimljivijim jedinjenjima koja proizvode stonoge. Jedinjenja **D13–15** su poznata naučnoj javnosti<sup>4,88</sup>, dok je ovo prvo pominjanje acetata **D16** uopšte. Jedinjenja **D13–15** od ranije su poznata po svojim repelentnim osobinama prema mravima<sup>89</sup> (koji su i najčešći neprijatelji stonoga), tako da je vrlo verovatno i **D16** odbrambeno jedinjenje. Pored alkaloida okarakterisanih u našim radovima na Slici 2.46. prikazani su i alkaloidi koji se pojavljuju u literaturi kao odbrambene supstance drugih artropoda. Na osnovu radova Dalija i saradnika<sup>56,90,91</sup> potvrđeno je da stonoge iz reda Polyzoniida predstavljaju prirodan izvor spiropirolizidin *O*-metiloksima **D14** (**236**) kod žaba koje se njima ipak hrane. Ovde treba naglasiti da se alkaloidi u literaturi često obeležavaju brojevima koji odgovaraju molekulskoj masi alkaloida, dok u slučajevima kada ima više alkaloida iste molekulske mase svaki naredni alkaloid dobija još i veliko slovo abecede. Jedinjenje **D16** bi po toj nomenklaturi dobilo ime (broj) **296** pošto do sada nije poznat alkaloid sa tom molekulskom masom. Dosadašnji rezultati ispitivanja u okviru reda Polyzoniida pokazali su da se odbrana kod ovih vrsta sastoji od terpenoidnih alkaloida i da se oni mogu koristiti kao hemotaksonomski markeri kod ovog reda diplopoda.

**Red Julida** sadrži 5 familija sa preko 160 rodova<sup>65</sup>. Najveći diverzitet pokazuje familija Julidae sa preko 500 opisanih vrsta koje imaju poglavito holarktičku distribuciju. Stonoge iz redova Julida, Spirostreptida i Spirobolida karakteristične su po

tome što se prilikom uznemiravanja sklopčaju u spiralu i ispuštaju odbrambeni sekret koji se uglavnom sastoji od hinonskih jedinjenja.

U našim radovima ispitivano je ukupno šest vrsta iz familije Julidae: *Julus terrestris*, *Cylindroiulus boleti*, *Leptoiulus trilineatus*, *Megaphyllum bosniense*, *M. austriacum* i *M. unilineatum*. Cilj nam je bio da se odredi sastav njihovih odbrambenih sekreta, ispitaju sličnosti i razlike u okviru roda *Megaphyllum*, odnosno u okviru familije Julidae i da se tako dobijeni rezultati uporede sa rezultatima do sada analiziranih vrsta iz familije Julidae, kao i sa vrstama koje pripadaju redu Julida. Ovakvi rezultati trebalo bi da potvrde da li su julide u potpunosti „hinonske diplopođe“, odnosno da nam posluže da bolje sagledamo sličnosti i razlike kod pojedinih vrsta.

Ukupno trinaest različitih hinonskih derivata okarakterisano je iz šest ispitivanih vrsta: 1,4–benzohinon **D17**, 2–metil–1,4–benzohinon **D18**, 2–hidroksi–3–metil–1,4–benzohinon **D19**, 2–metoksi–3–metil–1,4–benzohinon **D20**, hidrohinon **D21**, 2,3–dimetoksi–1,4–benzohinon **D22**, 2–metilhidrohinon **D23**, 2–metoksi–5–metilhidrohinon **D24**, 2,3–dimetoksihidrohinon **D25**, 2–metil–3,4–metilenedioksifenol **D26**, 2,3–dimetoksi–5–metil–1,4–benzohinon **D27**, 2–metoksi–3–metilhidrohinon **D28**, 2,3–dimetoksi–5–metilhidrohinon **D29**. Dosadašnja istraživanja odbrambenih hinonskih derivata kod julida prikazana su u **tabeli 2.13.** Kod najvećeg broja vrsta glavne komponente odbrambenog sekreta su 2–metil–1,4–benzohinon (**D18**) i 2–metoksi–3–metil–1,4–benzohinon (**D20**). Sa hemotaksonomske tačke gledišta može se reći da su ova dva jedinjenja karakteristična za većinu julida, ali se, takođe, ne može sa sigurnošću tvrditi da su razlike u hemijskom sastavu minornih komponenti odbrambenih sekreta dovoljne za interspecijsko i intergeneričko razlikovanje. Pored toga, razlike u sastavu odbrambenih sekreta mogu se pripisati i različitim načinima dobijanja (disekovanje odbrambenih žlezda<sup>92</sup>, nasuprot ekstrakciji živih jedinki u našim radovima) i različitoj osetljivosti današnjih tehnika korišćenih prilikom identifikacije i tehnika iz šezdesetih i sedamdestih godina prošlog veka. Tako je iz sekreta *M. unilineatum* nekada okarakterisano dva hinona (1,4–benzohinon **D17** i 2–metoksi–3–metil–1,4–benzohinon **D20**)<sup>93</sup>, dok smo iz iste vrste identifikovali najzastupljenije odbrambeno jedinjenje 1,4–benzohinon **D17** (86,2 %) ali i još devet drugih hinonskih derivata. Svi ovi podaci ukazuju na potrebu da se nastavi sa istraživanjima u okviru reda Julida i da se pokušaju sistematizovati dosadašnji i budući rezultati, jer analiza odbrambenih sekreta postaje sve aktuelnija problematika.

**Tabela 2.13.** Identifikovane supstance iz odbrambenih sekreta stonoga reda Julida. I: 1,4-benzohinon, II: 2-metil-1,4-benzohinon, III: 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon, IV: 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon, V: 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon, VI: 2-metilhidrohionon, VII: 2-metoksi-5-metil-hidrohionon, VIII: 2,3-dimetoksihidrohionon, IX: 2-metil-3,4-metilendioksifenol, X: 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon, XI: 2-metoksi-3-metil hidrohionon, XII: 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohionon, XIII: 2-metoksi-1,4-benzohinon, XIV: 2-metoksi-5-metil-1,4-benzohinon, XV: 2-etil-1,4-benzohinon, XVI: 2-metoksi-6-metil-1,4-benzohinon.

\* Rezultati ove disertacije

Jedinjenja Vrste	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	Reference
<i>Allajulus nitidus</i> (Verhoeff)				+													94 i 95
<i>Cylindroiulus boleti</i> (C. L. Koch)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					96*
<i>C. caeruleocinctus</i> (Wood)= <i>C. teutonicus</i> (Pocock)	+	+		+	+	+				+	+			+	+	+	94, 92, 93 i 95
<i>C. luridus</i> (C. L. Koch)	+			+		+					+						94i 95
<i>C. meinerti</i> (Verhoeff)	+	+		+	+					+			+	+		+	92
<i>C. punctatus</i> (Leach)	+	+		+	+	+				+	+		+	+		+	92, 94 i 95
<i>Enantiulus nanus</i> (Latzel)				+	+					+				+		+	92
<i>Julus scandinavus</i> Latzel	+	+		+	+					+			+	+		+	92
<i>Leptoiulus proximus</i> (Nemec)	+	+		+	+					+			+	+		+	92
<i>L. trilineatus</i> (C. L. Koch)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					96*
<i>Megaphyllum bosniense</i> (Verhoeff)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					96*
<i>M. unilineatum</i> (C. L. Koch) = <i>Brachyiulus unilineatus</i>	+			+													93
<i>Ommatoiulus sabulosus</i> (Linnaeus)	+	+		+	+					+			+	+	+	+	92 i 97
<i>Ophiulus pilosus</i> (Newport)	+			+		+					+						94i 95
<i>Tachypodoiulus niger</i> (Leach)	+	+		+	+					+			+	+		+	92
<i>Unciger foetidus</i> (C. L. Koch)	+			+		+					+						94 i 95



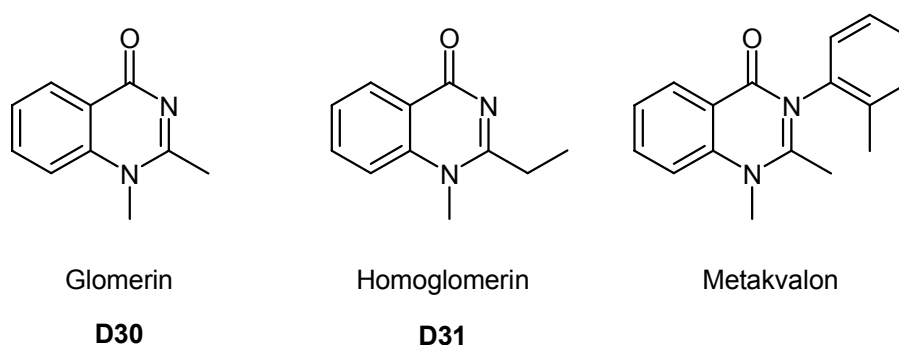
Tome u prilog ide i činjenica da se posle publikovanja dela naših rezultata<sup>96</sup> grupa naučnika iz Graca, pod rukovodstvom profesora Raspotniga, odlučila da ponovi naše eksperimente prikupivši jedinke *C. boleti* i *M. bosniense* (sa lokaliteta u Sloveniji i Bugarskoj) i iskoristi dobijene rezultate u identifikaciji odbrambenih jedinjenja vrste *Allajulus dicentrus*<sup>98</sup>.

Pored hinonskih derivata, kod svih šest ispitivanih vrsta potvrđeno je prisustvo heksil–estara zasićenih i nezasićenih C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> kiselina. Zbog načina dobijanja odbrambenih sekreta (ekstrakcija živih jedinki) nismo u mogućnosti da sa sigurnošću tvrdimo da su ova jedinjenja zaista deo sekreta. Do sada je samo u nekoliko radova primećeno prisustvo nehinonskih jedinjenja<sup>99,100,101,102</sup>. Jedan od radova je i pomenuti rad austrijskih naučnika koji su pratili odnos hinonskih i nehinonskih jedinjenja kroz ontogenetske stupnjeve, gde su za rad koristili tehniku disekovanja odbrambenih žlezda i potvrdili da su nehinonska jedinjenja zaista deo sekreta. Takođe, gotovo istovremeno kada su publikovani delovi rezultata ove teze, japanski naučnici Shimizu, Kuwahara, Yakumaru i Tanabe bavili su se identifikacijom nehinonskih derivata nedeterminisane vrste iz roda *Anaulaciulus* i detaljno opisali hemijski sastav heksil– i butil– estara zasićenih i nezasićenih kiselina sa C<sub>10</sub>–C<sub>14</sub>–atoma, odnosno derivata izokiselina sa 13–15 ugljenikovih atoma i anteizo sa 15 C atoma. Uzimajući ove rezultate u obzir može se zaključiti da i nehinonska jedinjenja, identifikovana kod ispitivanih vrsta Julida, najverovatnije predstavljaju deo sekreta, odnosno da nisu samo posledica procesa ekstrakcije. Takođe se potvrdila i pretpostavka da su julide „hinonske diplopode“, pošto svih šest ispitivanih vrsta sadrži hinonske derivate, dok uloga nehinonskih jedinjenja u sekretu nije dovoljno ispitana, tako da su nova istraživanja u tom smeru neophodna.

**Red Glomerida** sadrži 30 rodova i oko 450 vrsta<sup>47</sup>. Jedinke iz ovog reda su zbog sposobnosti da se sklupčaju u obliku pilule (lopte) u anglosaksonskoj terminologiji poznate kao „pil“ stonoge<sup>\*</sup>. Pored toga što su zaštićene od neprijatelja relativno čvrstim egzoskeletom i sposobnošću da se sklupčaju, jedino predstavnici reda Glomerida od svih Pentazonia poseduje hemijsku zaštitu. Do sada je analiziran odbrambeni sekret malog broja glomerida (**tabela 2.14.**), dok se anatomija odbrambenih žlezda gotovo isključivo svodi na vrstu *Glomeris marginata* (Villers 1789). Iz odbrambenog sekreta Glomerida do sada su okarakterisana dva hinazolinska alkaloida: glomerin (**D30**) i

\* Engleski naziv je „pill–millipedes“, dok kod nas ne postoji odgovarajući „narodni naziv“.

homoglomerin (**D31**) (sl. 2.47.) i potvrđeno je prisustvo proteinskog dela sekreta, kao mehaničke zaštite ovih stonoga. Cilj našeg rada bio je i da se identifikuju odbrambene supstance kod *G. klugii*, uporede sa dosadašnjim i proveri pretpostavka da li je u pitanju „alkaloidska klada“ diplopoda. Pored isparljivog dela sekreta, cilj je bio da se analizira i proteinski deo sekreta kod *G. klugii* i da se na primeru vrste *Onychoglomeris herzegowinensis* ispita mogućnost analize proteinskog sekreta disekovanjem ranije prikupljenog materijala.



**Slika 2.47.** Hinazolinski alkaloidi (glomerin i homoglomerin) do sada identifikovani u sekretu Glomerida i sintetički derivat metakvalon koji je našao primenu kao sedativ i antidepresiv.

**Tabela 2.14.** Identifikovane supstance iz odbrambenih sekreta stonoga reda Glomerida.

Vrsta	Glomerin	Homoglomerin	Proteini	Reference
<i>Glomeris marginata</i> (Villers 1789)	+	+	+	103, 61, 104, 105, 106, 108, 109
<i>Glomeris conspersa</i> (C. L. Koch 1847)	+	+	–	107
<i>Glomeris hexasticha</i> (Brandt 1833)	+	+	–	107
<i>Glomeris klugii</i> (Brandt 1833)	+	+	+	Rezultati disertacije
<i>Loboglomeris rugifera</i> (Verhoeff 1906)	+	–	–	107
<i>Onomeris sinuata</i> (Loomis 1943)	+	+	–	62
<i>Onychoglomeris herzegowinensis</i> (Verhoeff 1898)	*	*	+	Rezultati disertacije

\*nije ispitivan isparljivi deo sekreta

Odbrambeni sekret vrste *G. klugii* sadržavao je očekivane hinazolinske alkaloidne glomerin i homoglomerin, na osnovu čega je još jednom potvrđena činjenica da su glomeride „alkaloidna klada“ diplopoda. Priroda i osobine ovih alkaloida, koji nisu poznati kao sekundarni metaboliti drugih životinja, doveli su do niza istraživanja u kojima se ispitivalo dejstvo sekreta *G. marginata* na paukove, miševе, žabe i ptice<sup>108,,109</sup>. Jedno od istraživanja bilo je osmišljeno kako bi se ispitalo dejstvo sekreta ove glomeride na likozidne paukove. U tom eksperimentu, pod vođstvom profesora Eisner–a, uočeno je potpuno sedativno dejstvo u trajanju i od po nekoliko dana.

Rezultati su obrađivani i na osnovu veličine jedinki, dužine trajanja napada, zatim su ponovljeni i sa sintetizovanim standardima različitih koncentracija. Sedativni efekat je praćen nakon 12 i 24 časa od trenutka napada, odnosno jednom dnevno, sve do dvadeset prvog dana, koliko su eksperimenti i trajali. Većina jedinki je napade preživela nepovređena, dok u slučajevima dužih napada, pauk gotovo sigurno biva paralisan, satima i danima nakon toga, što bi u prirodnom okruženju značilo gotovo sigurnu smrt od drugih predatora. U testovima je korišćeno nekoliko stotina paukova i diplopoda, pri čemu je pokazano da je prosečna letalna doza za pauka otprilike jednaka jednoj osmini sekreta koji ispusti jedinka prosečne veličine. Poznato je da je odrasloj jedinki glomeride potrebno i do četiri meseca da ponovo napuni odbrambene rezervoare ako ih u potpunosti isprazni tokom napada. Zaključci pomenutog rada su svakako doprineli da se više pažnje posveti sedativnom dejstvu hinazolinskih alkaloida i da se ispita potencijalno sedativno dejstvo na čoveka. Tako je srodno jedinjenje metakvalon (sl. 2.47.) našlo primenu kao sedativ i antidepresiv.

Pored hinazolinskih alkaloida kod analiziranih glomerida pronađen je i proteinski deo sekreta. Mi smo se u našim radovima prvenstveno bavili vrstom *G. klugii*, kod koje je proteinski deo sekreta okarakterisan uz pomoć elektroforeze. Identifikovane su tri najzastupljenije proteinske strukture na osnovu njihovih molekularnih masa od približno 17, 22 i 116 kDa. Ideju da proteinski deo sekreta postoji i kod drugih vrsta iz ovog reda, probali smo da dokažemo i kod vrste iz Zbirke Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pošto je za razliku od isparljivog dela sekreta, neisparljivi proteinski deo verovatno ostao sačuvan. Tako smo analizirali vrstu *O. herzegowinensis* i na osnovu preliminarnih testova utvrdili proteinsku prirodu sekreta koji je dobijen disekovanjem. Međutim, posle elektroforeze nije bilo moguće detaljno analizirati proteinske trake, čak i nakon bojenja gela srebrom. Razlog ipak leži u maloj količini disekovanog materijala. Bez obzira na delimičan uspeh analize proteinskog dela sekreta *O. herzegowinensis*, ovim analizama otvoren je put za nova hemotaksonomska ispitivanja. Međutim, kako do sada proteinski deo sekreta nije detaljno analiziran, neophodno je posvetiti više pažnje proučavanju tog dela odbrambenog sekreta i uspostavljanju veze između vrsta koje imaju samo proteinsku, ili kombinovanu hemijsku i proteinsku odbranu.

### 2.3. Odbrambene supstance predstavnika klase Chilopoda – Rezultati

Stonoge iz klase Chilopoda\* su predatori koji se hrane različitim grupama beskičmenjaka, ali se krupnije forme mogu hraniti i nekim kičmenjacima. Verovatno je to jedan od razloga koji objašnjava izuzetnu vagilnost ovih životinja. Kod navedene klase stonoga prvi par trupnih ekstremiteta transformisan je u kandže (maksilopede), u kojima se nalaze otrovne žlezde, koje služe za ubijanje ili paralisanje plena. Nedostatak voštanog sloja u kutikuli, odnosno osetljivost na desikaciju, uslovio je da ovi organizmi



**Slika 2.48.** Odbrambeni sekret geofilomorfne vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767) dobijen ekstrakcijom metilen-hloridom.

naseljavaju uglavnom vlažna staništa. U laboratorijskim uslovima vlažnost je održavana svakodnevnim raspršivanjem manje količine vode po posudama u kojima su jedinke čuvane.

Prema raspoloživim literaturnim podacima odbrambeni sekreti kod hilopoda nisu bili predmet intenzivnih i ekstenzivnih studija. Iz tog razloga rezultati prikazani u ovoj disertaciji od većeg su značaja sa biološkog i hemijskog aspekta. Ukupno je analizirano šest vrsta hilopoda koje pripadaju različitim familijama i redovima. Kod tri vrste registrovana je hemijska odbrana, a kod

dve vrste registrovane su proteinske komponente koje imaju protektivnu funkciju. Kod mužjaka i ženki vrste *Himantarium gabrielis* uočen je veoma interesantan spoj proteinske i hemijske odbrane, sa nekoliko potpuno različitih tipova odbrambenih jedinjenja. Ovo je svakako jedan ilustrativni primer u životinjskom svetu gde jedinka može biti potencijalni predator, ali i plen.

\* Engleski jezik poznaje i naziv Centipedes, za stonoge iz klase Chilolopoda, a takođe i naziv Millipedes, za stonoge klase Diplopoda, dok naš jezik poznaje samo naziv stonoge za obe klase.

### 2.3.1. Odbrambene supstance predstavnika familije Lithobiidae (Chilopoda, Lithobiomorpha)

U okviru familije Lithobiidae ispitivana je vrsta *Eupolybothrus transsylvanicus*. Metilen–hloridni i metanolni ekstrakti analizirani su GC–FID, GC–MS i LC–MS tehnikama i pri tome nisu detektovane odbrambene supstance, pa se sa sigurnošću može reći da jedinke ove vrste ne proizvode lako isparljivi odbrambeni sekret, to jest, ne poseduju odbrambene sekretorne žlezde.

### 2.3.2. Odbrambene supstance predstavnika familije Cryptopidae (Chilopoda, Scolopendromorpha)

Iz familije Cryptopidae ispitivali smo vrstu *Cryptops parisi*. Pravljeni su metilen–hloridni i metanolni ekstrakti, koji su korišćeni za GC–FID, GC–MS i LC–MS analize. Lako isparljiva odbrambena jedinjenja nisu pronađena ni u jednom ekstraktu. Ovaj rezultat je potvrda da kod vrste *C. parisi* nema odbrambenih žlezdi.

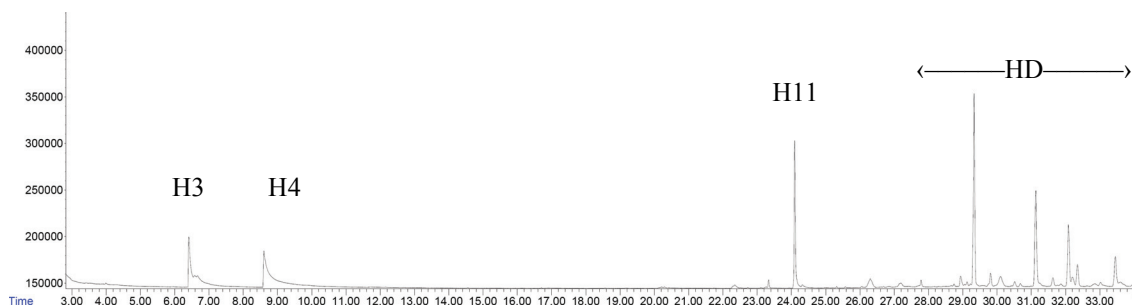
### 2.3.3. Odbrambene supstance predstavnika familije Linotaeniidae (Chilopoda, Geophilomorpha)

U okviru familije Linotaeniidae ispitivana je vrsta *Strigamia crassipes*. Pikrinski test bio prva je analiza koja je urađena, a pojava narandžaste boje je dokazala prisustvo cijanovodonika (H1) u odbrambenom sekretu. Metilen–hloridni ekstrakti su korišćeni za GC–FID i GC–MS analize (sl. 2.49.). Dva pika na retencionim vremenima od 6,4 i 8,6 min imala su identične EI–MS spektre kao i jedinjenja **D4** i **D6**. Upoređujući GC–FID i GC–MS podatke tih jedinjenja uočena je razlika u retencionim vremenima od približno pola minuta. Ovaj podatak bio je očekivan, pošto se temperaturni program razlikovao u odnosu na analize odbrambenih sekreta vrsta iz klase Diplopoda\*. Zbog toga se, pored

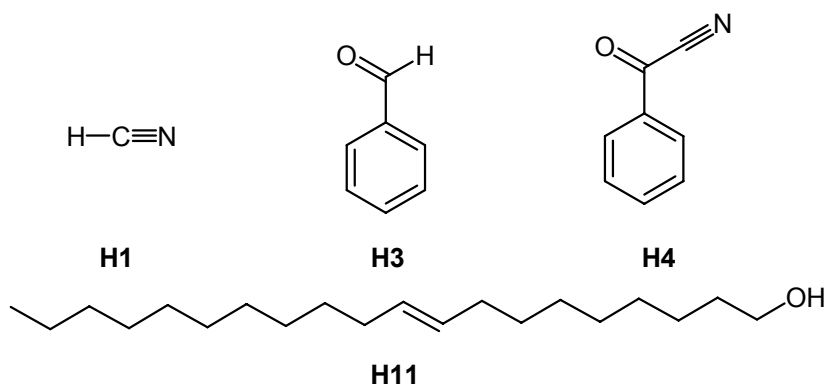
---

\* Metilen–hloridni ekstrakt vrste *S. crassipes* je analiziran QC TEST metodom, a polidezmidne vrste (Diplopoda) metodom QC TEST STONOGE (videti poglavlje EKSPERIMENTALNI DEO).

masenih spektara, jedino mogu upoređivati retencioni indeksi, gde se uočava neznatna razlika od 4, odnosno 3 retencione jedinice.



**Slika 2.49.** Ukupni GC-FID jonski hromatogrami metilen-hloridnog ekstrakata jedinki vrste *Strigamia crassipes* (C. L. Koch 1835).



**Slika 2.50.** Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu vrste *Strigamia crassipes* (C. L. Koch 1835).

Jedinjenja **H3** i **H4** identifikovana su kao benzaldehid, odnosno benzoil-nitril. Ove strukture su dodatno potvrđene i u masenim spektrima hemijske jonizacije, gde se uočavaju protonovani molekuli  $[M+H]^+$  na  $m/z$  107 i 132. Pored pikova jedinjenja **H3** i **H4** uočava se i pik na  $R_t=24,1$  min ( $RI=2380$ ) koji je identifikovan kao nezasićeni alkohol dugog niza: 9-eikozenol (**H11**), tačnije (9Z)-eikozen-1-ol ( $C_{20}H_{40}O$ ). Identifikacija ovog jedinjenja zasniva samo se na EI i CI masenim podacima, tako da se položaj i konfiguracija dvostruke veze može samo tentativno okarakterisati.

Pored ovih jedinjenja, u GC-FID i GC-MS hromatogramima mogu se uočiti i pikovi jedinjenja koja pripadaju grupi holesterolskih derivata (**HD**). Razlog zbog čega su, na osnovu GC-FID hromatograma, u procentni sastav odbrambenog sekreta uvrštena samo jedinjenja **H3**, **H4** i **H11** (sl. 2.49. i tabela 2.15.), ali ne i holesterolski derivati, nalazi se u pripremi uzoraka, jer ekstrakcijom živih jedinki nije moguće

odrediti poreklo steroidnih molekula (da li su izlučeni iz odbrambenih žlezda ili ekstrahovani sa površine tela), to jest, njihovu odbrambenu ulogu.

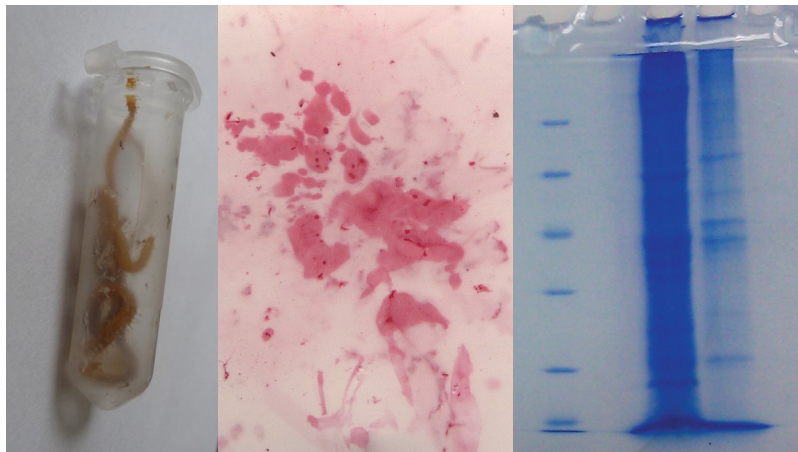
**Tabela 2.15.** Sastav metilen–hloridnog ekstrakta vrste *Strigamia crassipes* (C. L. Koch 1835) analiziran GC–FID i GC–MS tehnikama.

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Relativni procentni sastav	
6,4	965	<b>H3</b>	benzaldehyd	34,8
8,6	1100	<b>H4</b>	benzoil–nitril	30,2
24,1	2380	<b>H11</b>	(9Z)–eikozen–1–ol	35,0

#### 2.3.4. Odbrambene supstance predstavnika familije Dignathodontidae (Chilopoda, Geophilomorpha)

U okviru familije Dignathodontidae ispitivana je vrsta *Henia illyrica*. Metilen–hloridni i metanolni ekstrakti korišćeni su za GC–FID, GC–MS i LC–MS analize. U ekstraktima su identifikovane masne kiseline i derivati holesterola, ali ne i lako isparljive odbrambene supstance. Pretpostavka da vrste iz roda *Henia* poseduju proteinsku zaštitu proverena je bojenim testom na nitroceluloznoj membrani (sl. 2.51). Crvena boja je pozitivna dokazna reakcija proteinske prirode sekreta ove vrste.

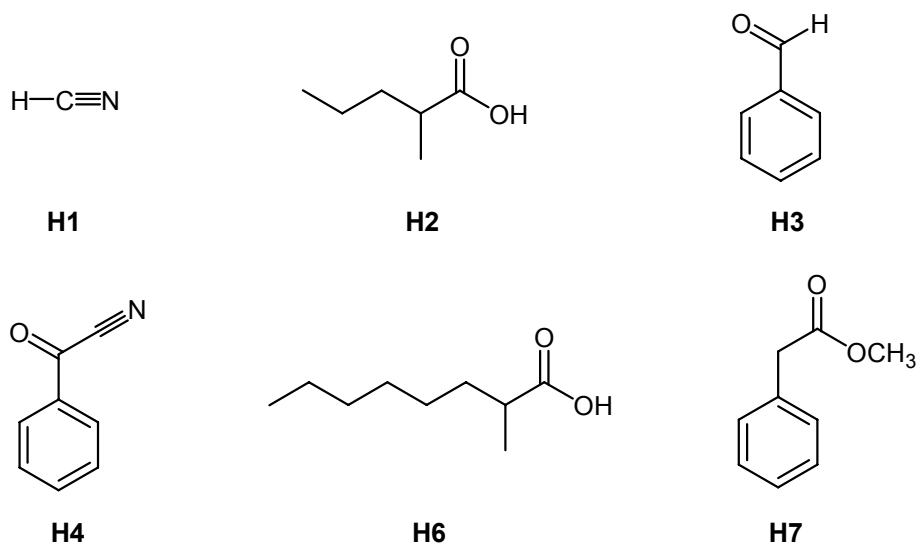
Proteinski sastav sekreta je analiziran elektroforezom, i to na materijalu sa dva lokaliteta. Prvi lokalitet je u blizini izvora Sakinac na Avali, a drugi u blizini Sokobanje. Na lokalitetu Sakinac, jedinke su skupljane u maju 2011. godine, dok su na lokalitetu u blizini Sokobanje sakupljene godinu dana kasnije. Rezultati su pokazali da se sekret kod vrste *H. illyrica* sastoji od nekoliko glavnih proteinskih struktura, ali zanimljivo je bilo konstatovati da su se sekreti sa dva lokaliteta razlikovali (sl. 2.51.).



**Slika 2.51.** Levo: odbrambeni sekret vrste *Henia illyrica* (Meinert 1870); u sredini: bojeni test odbrambenog sekreta na nitroceluloznoj membrani; crvena boja je pozitivna dokazna reakcija na proteinsku prirodu sekreta. Desno: SDS-PAGE: prva linija sa leve strane su molekularni markeri: 14,4 kDa lizozim, 185,4 kDa  $\beta$ -laktoglobulin, 25 kDa Rease Bsp 98I, 35 kDa laktat dehidrogenaza, 45 kDa ovalbumin, 66,2 kDa BSA, 116 kDa  $\beta$ -galaktozidaza; srednja traka je uzorak sekreta sa lokaliteta Sakinca i desna traka predstavlja uzorak sekreta sa lokaliteta u blizini Sokobanje.

### 2.3.5. Odbrambene supstance predstavnika familije Geophilidae (Chilopoda, Geophilomorpha)

U okviru familije Geophilidae ispitivana je vrsta *Clinopodes flavidus*. Metilen-hloridni, *n*-heksanski i metanolni ekstrakti analizirani su GC-FID, GC-EI-MS i GC-CI-MS tehnikama na nepolarnoj (HP5-MSI) i polarnoj (HP-INNOWAX) koloni.

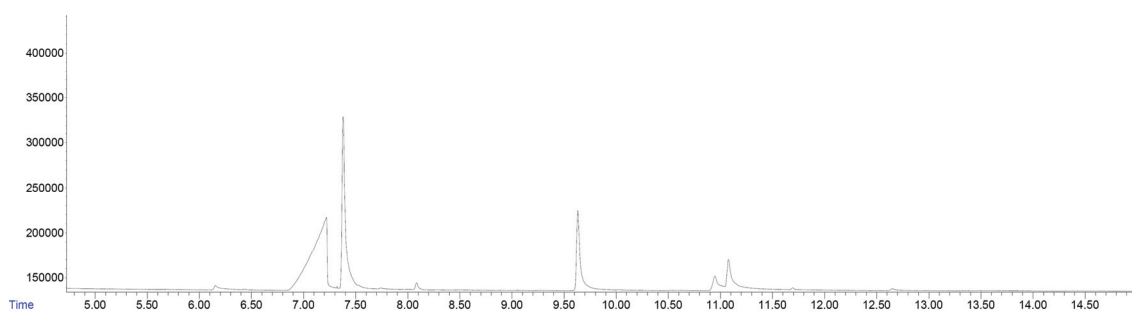


**Slika 2.52.** Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu vrste *Clinopodes flavidus*.



Identifikovano je ukupno pet jedinjenja: 2–metilpentanska kiselina (**H2**), benzaldehid (**H3**), benzoil–nitril (**H4**), 2–metiloktanska kiselina (**H6**) i metil–2–fenilacetat (**H7**). Pored jedinjenja identifikovanih GC–FID i GC–MS tehnikama, uz pomoć pikrinskog testa potvrđeno je prisustvo cijanovodonika (**H1**).

Sa analitičke tačke gledišta, metilen–hloridni ekstrakt vrste *C. flavidus* bio je najzahtevniji, pre svega zbog prisustva organskih kiselina koje nisu pogodne za GC–FID analizu. Bilo je potrebno da se uzorak derivatizuje, ali se onda postavlja pitanje relativnih odnosa koncentracija tako dobijenih derivata i ostalih komponenti smeše. Uzorci su pripremani i za polarnu HP–INNOWAX i za standardnu nepolarnu HP–5MSI kapilarnu kolonu, sa ciljem da se dobije zadovoljavajuće razdvajanje. Nekoliko pokušaja je dovelo do toga da su najbolji rezultati dobijeni modifikovanom QC TEST metodom (nazvana QC TEST CF\*) na nepolarnoj koloni.



**Slika 2.53.** GC–FID profil metilen–hloridnog ekstrakta vrste *Clinopodes flavidus*.

**Tabela 2.16.** Sastav metilen–hloridnog ekstrakta vrste *Clinopodes flavidus* analiziran GC–FID i GC–MS tehnikama na HP–5MSI koloni.

Rt (min)	RI	Jedinjenje	Relativni procentni sastav
7,2	945	<b>H2</b> 2–metilpentanska kiselina	49,7
7,4	955	<b>H3</b> benzaldehid	28,6
9,6	1100	<b>H4</b> benzoil–nitril	13,6
11,0	1178	<b>H6</b> 2–metiloktanska kiselina	3,0
11,1	1187	<b>H7</b> metil–2–fenilacetat	5,1

Nakon određivanja uslova za gasnu hromatografiju, urađena je derivatizacija sa BSTFA (reagensom za silanizovanje) i snimljeni su spektri uz hemijsku jonizaciju.

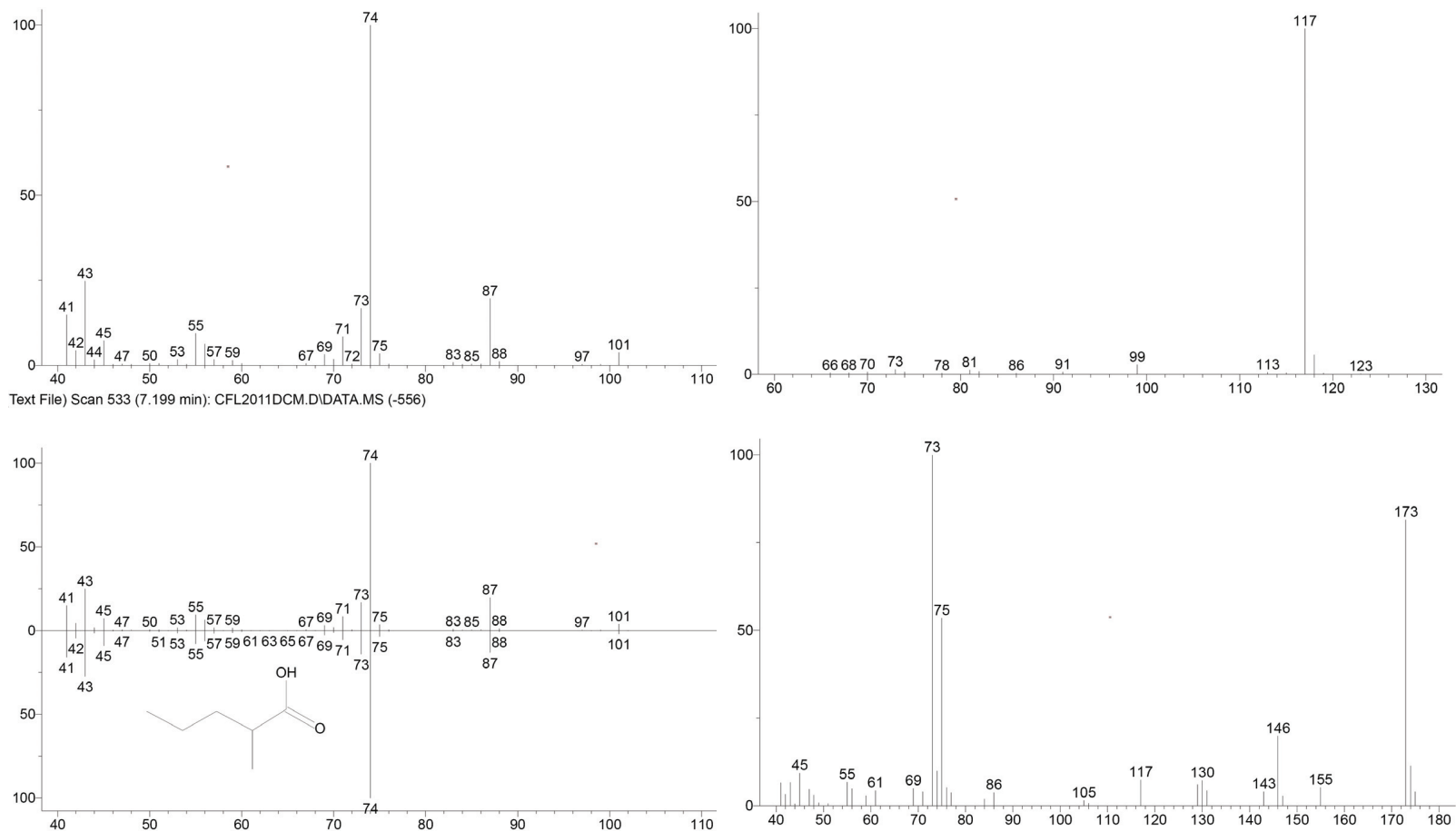
\* Uslovi dati u poglavlju EKSPERIMENTALNI DEO.

Tako je identifikovano jedinjenje **H2**, kao 2–metilpentanska kiselina. Na **sl. 2.54.** prikazani su sledeći maseni spektri: EI–MS spektar jedinjenja **H2** (A), EI–MS spektar 2–metilpentanske kiseline iz biblioteke NIST 11 (B), spektar pozitivne hemijske jonizacije sa protonovanim molekulom  $[M+H]^+$  (C), kao i EI–MS spektar mono TMS–derivata (D).

Retencioni indeks i maseni spektar elektronske jonizacije jedinjenja **H2** odlično se slažu sa literaturnim podacima iz biblioteke spektara NIST 11, dok za TMS–derivat ovog jedinjenja nema podataka. Osnovni jon u EI–MS spektru TMS–derivata (**sl. 2.54. D**) nalazi se na vrednosti  $m/z$  73 i odgovara jonu  $[O-Si(CH_3)_3]^+$ , što samo po sebi nije dovoljan dokaz, ali u postojanje fragmentacionog jona 173  $[M - CH_3]^+$  potvrđuje da je molekulska masa silanizovanog derivata za 72 veća od nesilanizovanog jedinjenja i da se radi o mono TMS–derivatu.

Podaci za jedinjenja **H3** i **H4** odlično se slažu i sa našim prethodnim rezultatima za jedinjenja **D4** i **D6** i sa literaturnim podacima<sup>50</sup>, tako da smo ova jedinjenja identifikovali kao benzaldehid (**H3**) i benzoil–nitril (**H4**).

Na  $R_t=11,0$  min (**sl. 2.55.** i **tabela 2.16.**) identifikovano je jedinjenje **H6**, kao 2–metiloktanska kiselina, na osnovu poređenja masenog spektra sa spektrom bliskog jedinjenja **H2** (2–metilpentanskom kiselinom). EI–MS–Spektar jedinjenja **H6** (**sl. 2.55.A.**) nije dao zadovoljavajuće slaganje sa spektrima iz biblioteke, tako da je identifikacija ovog jedinjenja tentativna. Upoređivanjem EI i CI masenih spektara 2–metilpentanske kiseline i jedinjenja **H6** (**sl. 2.54.C.** i **2.55. A, B i C.**) uočava se niz sličnosti. Pre svega, osnovni jon oba jedinjenja je  $m/z$  74 (nastaje Meklafertijevim premeštanjem, **sl. 2.56.**); razlika masa protonovanih molekula od 43 u odgovara  $C_3$  jedinici, dok pojava drugog fragmentacionog jona po intenzitetu na vrednosti  $m/z$  85, može da se objasni prostom fragmentacijom, pri čemu nastaje  $C_6$  zasićeni katjon.



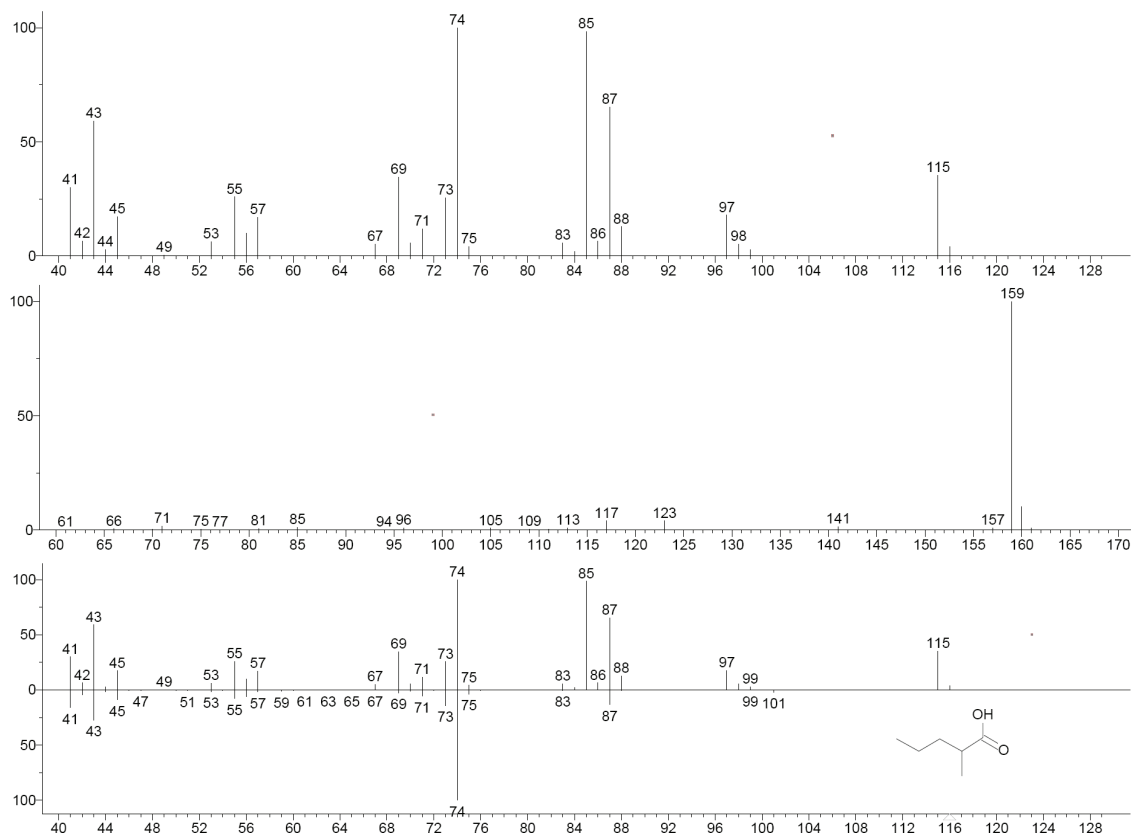
Slika 2.54. Identifikacija jedinjenja **H2** uz pomoć EI i CI-MS spektara:

A: EI-MS spektar jedinjenja **H2** na Rt=7,2 min

B: EI-MS spektar jedinjenja **H2** upoređen sa spektrom 2-metilpentanske kiseline iz biblioteke NIST11

C: CI-MS spektar jedinjenja **H2** na Rt=7,2 min

D: EI-MS spektar TMS derivata jedinjenja **H2**.

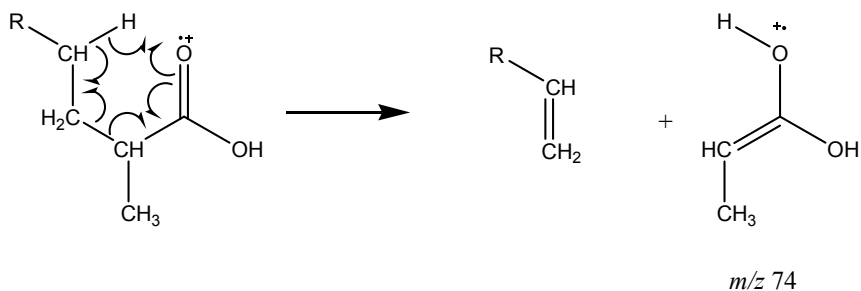


**Slika 2.55.** Identifikacija jedinjenja **H6** (2–metiloktanska kiselina):

**A:** EI–MS spektar jedinjenja **H6** na  $R_t=11,0$  min

**B:** CI–MS spektar jedinjenja **H6** na  $R_t=11,0$  min

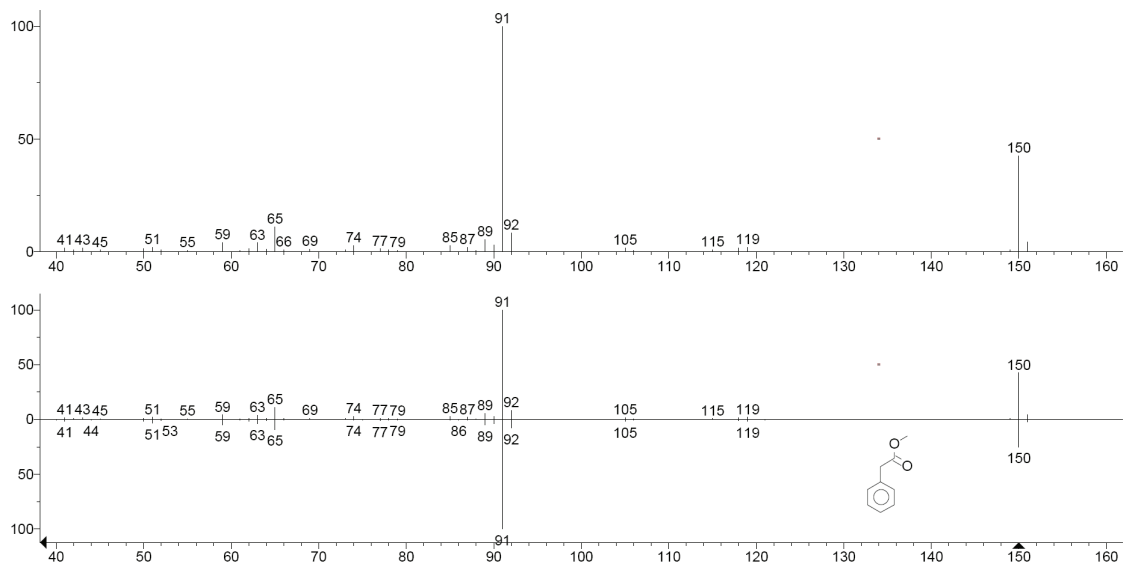
**C:** EI–MS spektri jedinjenja **H6** i srodnog jedinjenja **H2** (2–metilpentanske kiseline) iz biblioteke NIST11.



**Slika 2.56.** Mc Lafferty–jevo premeštanje kod 2–metilalkanskih kiselina pri čemu nastanje jon 74.

Na retencionom vremenu od 11,1 min na osnovu GC i GC–MS podataka (**sl. 2.57.** i **tabela 2.16.**) identifikovano je jedinjenje **H7**, kao metil–2–fenilacetat.  $RI=1187$  odlično se slaže sa literaturnim<sup>110</sup>, dok je u CI–MS spektru osnovni jon  $m/z$  151 u stvari i protonovani molekul  $[M+H]^+$ . U EI–MS spektru se mogu uočiti samo dva intenzivna

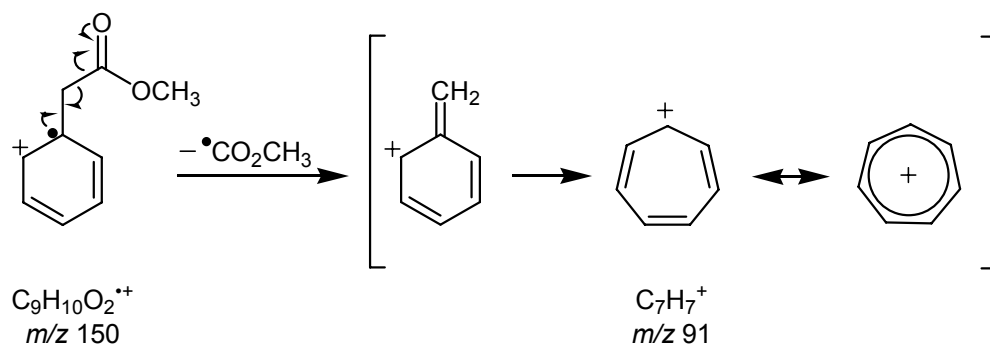
jona, i to molekularni jon  $m/z$  150 i osnovni jon  $m/z$  91 (tropilijum karbokatjon – karakterističan za monoalkil benzene **sl. 2. 58.**).



**Slika 2.57.** Identifikacija jedinjenja **H7**:

**A** EI–MS spektar jedinjenja **H7** na  $R_t=11,1$  min

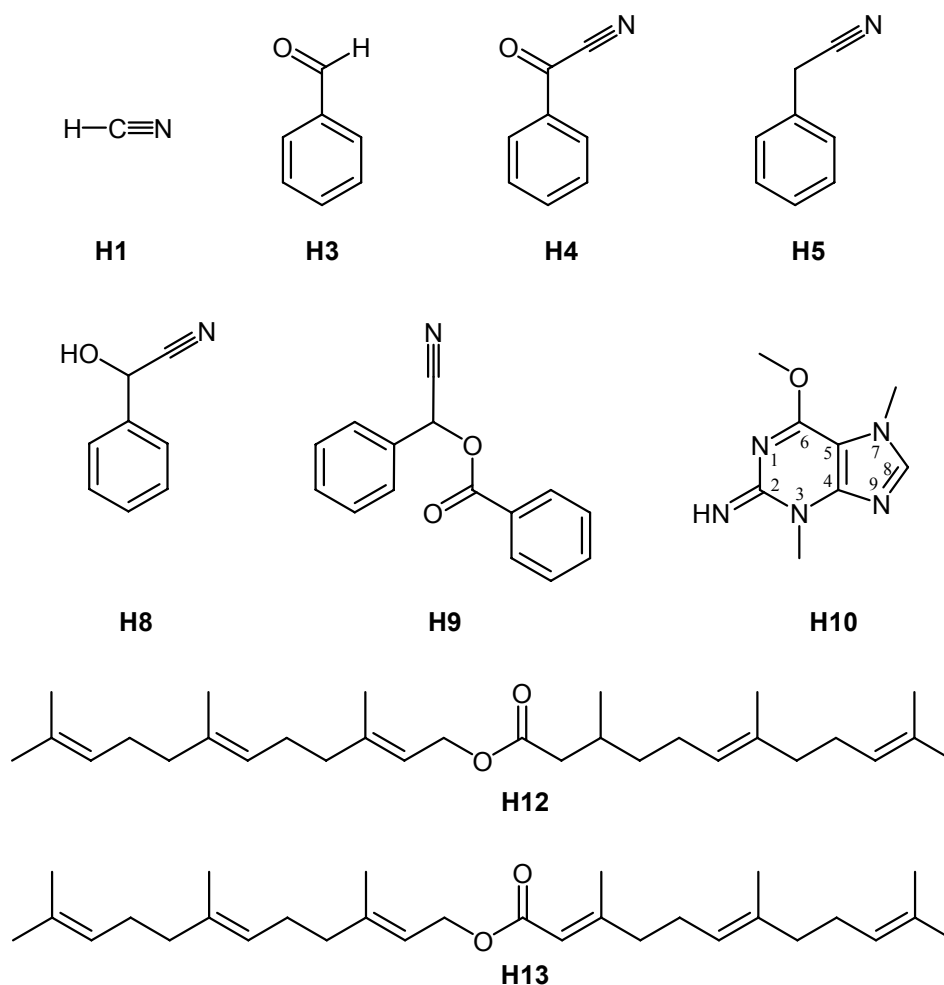
**B** EI–MS spektar jedinjenja **H7** upoređen sa spektrom metil 2–fenilacetata iz biblioteke NIST 11.



**Slika 2.58.** Fragmentacija jedinjenja **H7** u uslovima elektronske jonizacije (70 eV).

### 2.3.6. Odbrambene supstance predstavnika familije Himantariidae (Chilopoda, Geophilomorpha)

U okviru familije Himantariidae ispitivana je vrsta *Himantarium gabrielis*. Ekstrakcijom različitim organskim rastvaračima dobijeni su rastvorni i nerastvorni delovi ekstrakta (sl. 2.48.). Nerastvorni deo sekreta imao je izgled lepljive amorfne mase roze boje i bio je nerastvoran u metilen-hloridu, hloroformu, etanolu, dimetil-sulfoksidu, pa čak i u vodi. Ovaj deo sekreta je analiziran Bradford-ovim testom i elektroforezom.



**Slika 2.59.** Identifikovana jedinjenja u odbrambenom sekretu vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

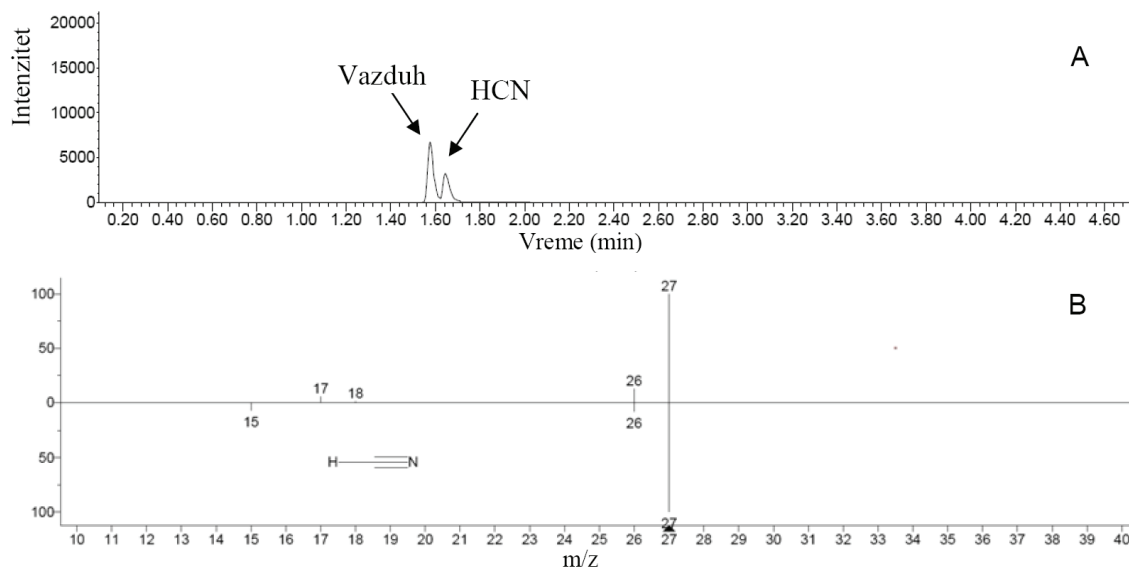
Rastvorni delovi metilen-hloridnog, metanolnog i deuterohloroformskog ekstrakta analizirani su GC-FID, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS i NMR tehnikama. Iz odbrambenog sekreta okarakterisano je devet jedinjenja: cijanovodonik (**H1**),

benzaldehyd (**H3**), benzoil–nitril (**H4**), benzil–nitril (**H5**), mandelonitril (**H8**), mandelonitril–benzoat (**H9**), 3,7,6–*O*–trimetilguanin (himantarin **H10**), farnezil–2,3–dihidrofarnesoat (**H12**) i farnezil–farnesoat (**H13**).

Jedinjenje **H1** je kao i kod polidezmidnih vrsta dokazano pikrinskim testom (sl. 2.60.) i GC–EI–MS tehnikom (sl. 2.61.)<sup>\*</sup>.



Slika 2.60. Pozitivan rezultat pikrinskog testa vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

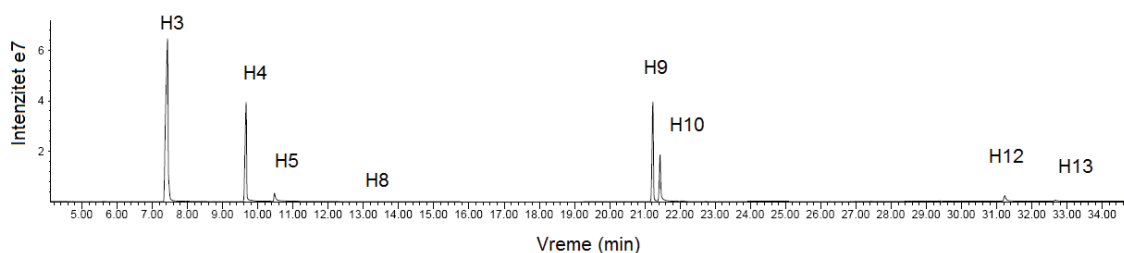


Slika 2.61. Identifikacija jedinjenja **H1** GC–MS tehnikom:

**A:** Ukupni GC–FID jonski hromatogram gasovite faze sekreta *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767)

**B:** EI–MS spektar jedinjenja **H1** upoređen sa spektrom cijanovodonika iz biblioteke NIST11.

<sup>\*</sup> GC–MS uslove i spektralne podatke videti u poglavlju EKSPERIMENTALNI DEO



**Slika 2.62.** Ukupni GC–FID jonski hromatogram metilen–hlordnog ekstrakata vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

Dva pika na retencionim vremenima 7,4 i 9,7 min (**sl. 2.62.** i **tabela 2.17.**) identifikovana su kao benzaldehid (**H3**) i benzoil–nitril (**H4**). Ova jedinjenja su pokazala odlično slaganje EI–MS spektara sa prethodnim spektrima, a i sa podacima iz literature<sup>50</sup>, dok njihovi CI–MS spektri odgovaraju protonovanim molekulima  $[M+H]^+$   $m/z$  107 i 132.

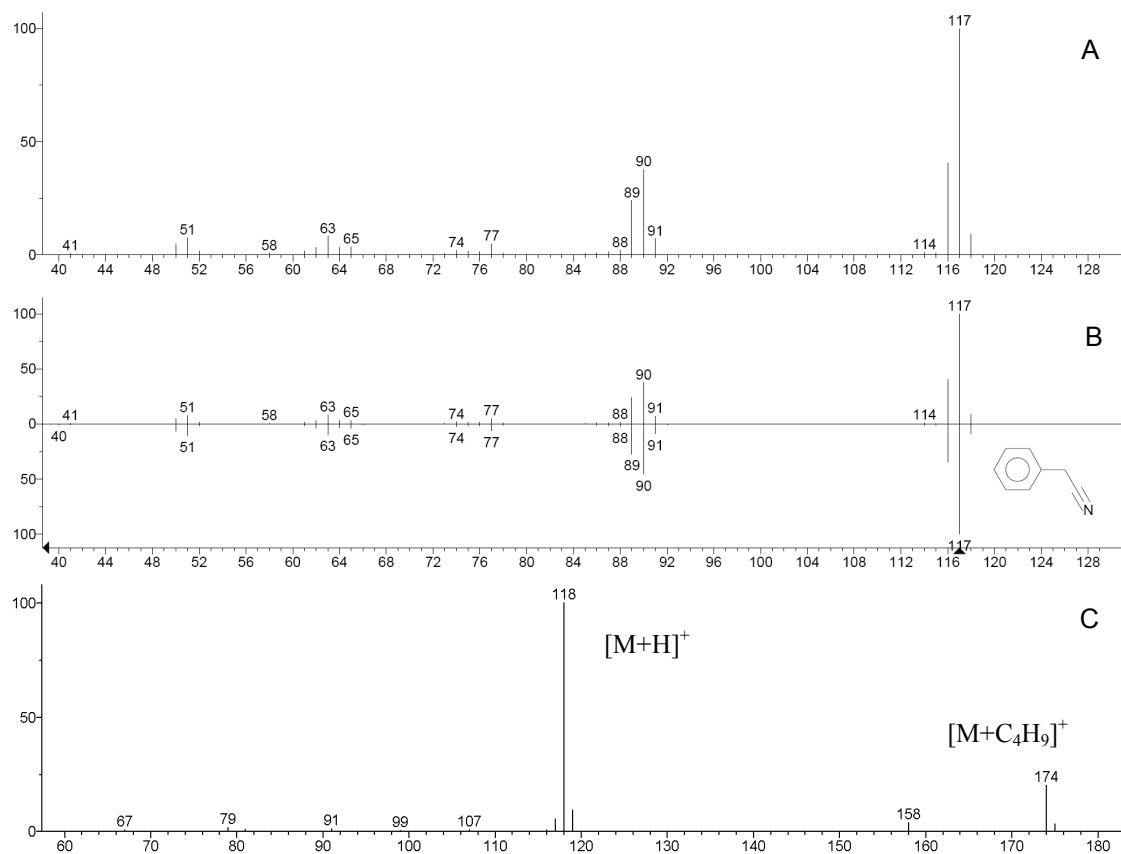
**Tabela 2.17.** Sastav metilen–hlordnog ekstrakata vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767) analiziran GC–FID, GC–MS i NMR tehnikama.

Rt (min)	Jedinjenje	Procentni sastav	
		GC–FID	NMR
7,4	<b>H3</b> benzaldehid	66,9	1,0
9,7	<b>H4</b> benzoil–nitril	18,3	16,0
10,5	<b>H5</b> benzil nitril	1,7	n. d.
13,6	<b>H8</b> mandelonitril	trag	19,2
21,2	<b>H9</b> mandelonitril–benzoat	8,3	1,5
21,4	<b>H10</b> 3,7,6– <i>O</i> –trimetilguanin	2,9	8,5
31,2	<b>H12</b> farnezil–2,3–dihidrofarnoat	1,4	29,1
32,7	<b>H13</b> farnezil–farnoat	0,5	24,7

Na retencionom vremenu od 10,5 min (**slika 2.62.** i **tabela 2.17.**) identifikovano je jedinjenje **H5** (benzil–nitril). Identifikacija ovog jedinjenja se zasnivala na poređenju EI–MS spektra sa komercijalnim bibliotekama masenih spektara (NIST 11 i Wiley 7). Fragmentacija jedinjenja **H5** može se jednostavno objasniti: osnovni jon je ujedno i molekulski ( $m/z$  117), intenzivan je i jon  $[M-H]^+$  (benzilni karbokatjon stabilizovan rezonancijom), jon  $m/z$  90 je stabilniji je od tropilijum–katjona (gubitak HCN–a je favorizovaniji od gubitka CN radikala). Takođe, molekulska masa jedinjenja se može



odrediti na osnovu protonovanog molekula  $m/z$  117  $[M+H]^+$  u CI-MS-spektru (sl. 2.63.C.) snimljenom pod istim hromatografskim uslovima, na istom retencionom vremenu.



**Slika 2.63.** Identifikacija benzil-nitrila (**H5**):

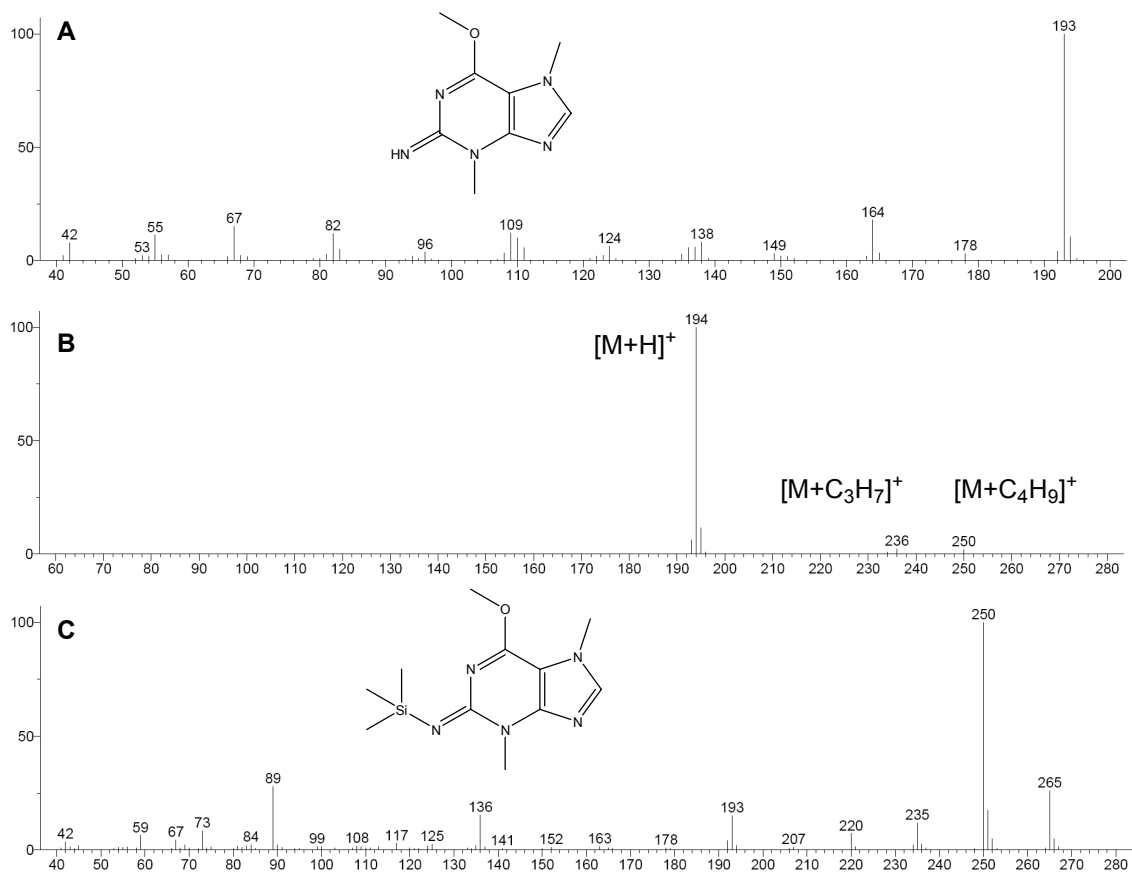
**A:** EI-MS spektar jedinjenja **H5** na  $R_t=10,5$  min

**B:** EI-MS spektar jedinjenja **H5** upoređen sa spektrom benzil-nitrila iz biblioteke NIST11

**C:** CI-MS spektar jedinjenja **H5** na  $R_t=10,5$  min.

Na  $R_t=21,2$  min identifikovano je jedinjenje **H9** kao mandelonitril-benzoat (sl. 2.59. i tabela 2.17.). Kao i u slučaju jedinjenja **H3** i **H4**, jedinjenje **H9** je pokazalo odlično slaganje EI-MS spektra sa prethodnim rezultatima i sa spektima iz biblioliteke NIST 11. Takođe, CI-MS spektar kao osnovni jon ima protonovani molekul  $[M+H]^+$  na vrednosti  $m/z$  238, što odgovara molekulskoj masi mandelonitril-benzoata. Jedinjenje **H10** identifikovano je kao 3,7,6-*O*-trimetilguanin uz pomoć GC-FID, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS, 1D i 2D NMR tehnika i nazvano himantarin. Osnovni jon u EI-MS spektru (sl. 2.64.A.) bio je jon  $m/z$  193, što je moglo da znači da je u pitanju jedinjenje

molekulske mase 193 u sa strukturom koja stabilizuje molekulski jon, ili da je u pitanju jedinjenje veće molekulske mase, koje najverovatnije ima parnu molekulsku masu i daje intenzivan fragmentacioni jon, ali uopšte ne daje molekulski jon. Upoređivanje EI-MS spektra koji sadrži samo jedan dominantan jon sa bibliotekama spektara po pravilu ne daje dobre rezultate. Zbog toga je identifikacija nastavljena snimanjem GC-CI-MS hromatograma, gde je na  $R_t=21,4$  min (isto kao i kod GC-FID i GC-EI-MS hromatograma) uočen protonovani molekul na  $m/z$  194 (**sl. 2.64.B**). To bi značilo da je molekulska masa jedinjenja **H10** neparna (193 u), to jest, da ovo jedinjenje ima neparan broj azotovih atoma. Podatak da jedinjenje sadrži azot bio je dovoljan da se DCM ekstrakt derivatizuje sa BSTFA. Rezultat je bio nestajanje pika jedinjenja **H10** u hromatogramu i pojavljivanje pika TMS-derivata u EI-MS spektrima (**sl. 2.64.C.**) kod koga je molekulski jon na  $m/z$  265, što znači da je u pitanju mono TMS-derivat, to jest, da jedinjenje **H10** sadrži jednu -OH ili -NH grupu.



**Slika 2.64.** Identifikacija jedinjenja **H10** uz pomoć GC–MS tehnika:

**A** EI–MS spektar jedinjenja **H10** na  $R_t=21,4$  min sa prikazanom strukturom

**B** CI–MS spektar jedinjenja **H10** na  $R_t=21,4$  min

**C** EI–MS spektar TMS derivata jedinjenja **H10** sa prikazanom strukturom.

Za dalju identifikaciju bili su potrebni novi podaci. Na osnovu LC–MS analize visoke preciznosti, koja je dobijena ESI tehnikom jonizacije u pozitivnom modu, uz pomoć TOF analizatora, izračunata je molekulska formula  $C_8H_{11}N_5O$ . Na osnovu dosadašnjih rezultata analiza odbrambenih jedinjenja kod stonoga, kao i na osnovu podataka iz literature, dovedeni su u sumnju rezultati LC–MS analize. Usledila je analiza koja se odnosila na proveru ispravnosti hromatografskog sistema i još jedna obrada dobijenih rezultata. Ponovljenom analizom dobijeni su identični rezultati i tako je potvrđena molekulska formula  $C_8H_{11}N_5O$ . Iako je u prvom trenutku određivanje molekulske formule delovalo kao veliki pomak u identifikaciji jedinjenja **H10**, ipak je poznato preko šest stotina jedinjenja sa ovom formulom\*. Pod sličnim hromatografskim uslovima snimljeni su LC–MS–MS spektri ESI jonizacije sa trostrukim kvadrupolom kao analizatorom. U skan modu je takođe dobijen protonovani molekul na  $m/z$  194.

\* Podaci zasnovani na pretrazi SciFinder servisa na dan 01. avgust 2012. godine

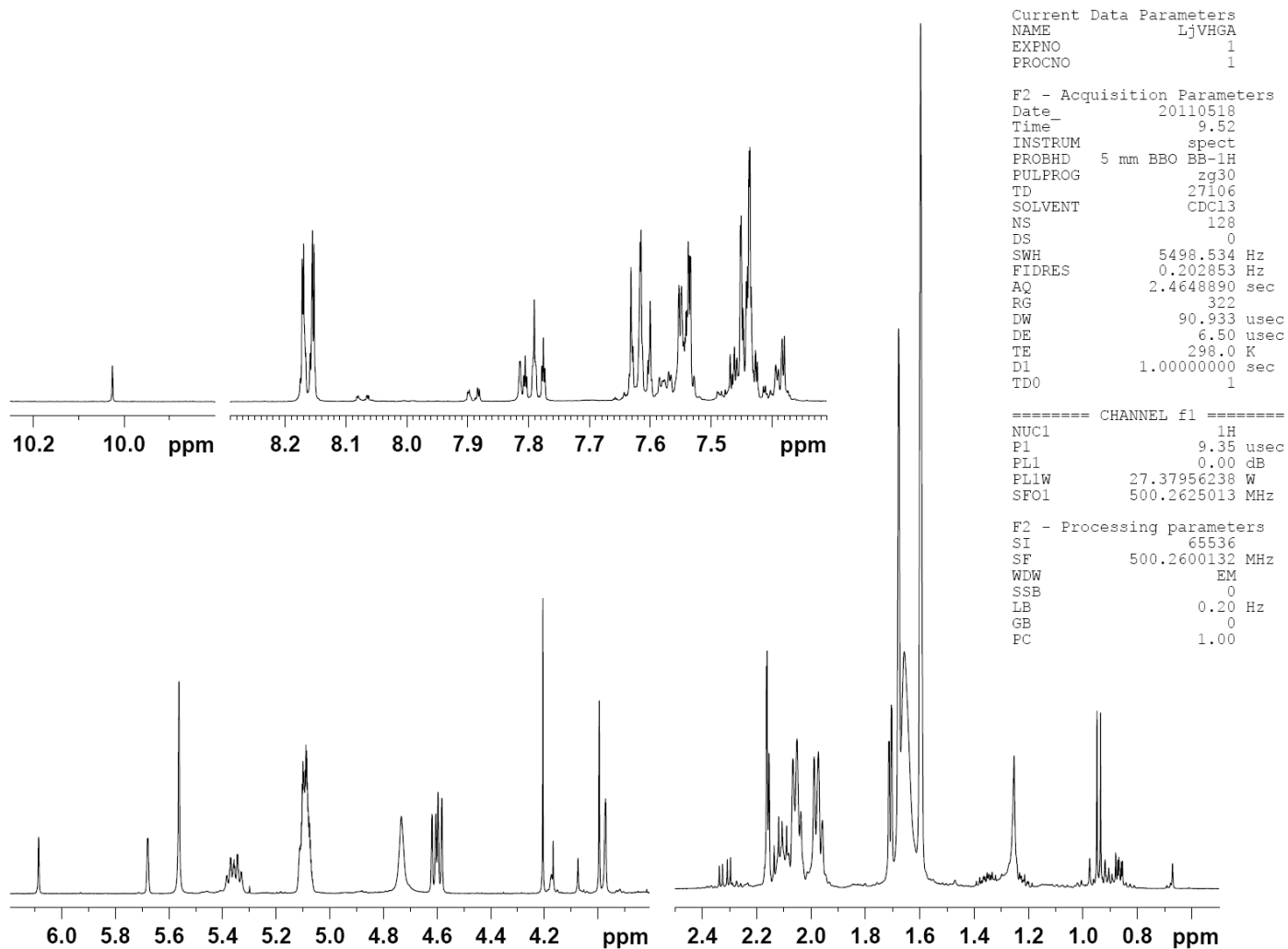
Nakon toga su parametri MS instrumenta podešeni tako da je prvi kvadrupol podešen da propušta samo jone sa  $m/z$  194, uključen je kolizioni gas (argon), a treći kvadrupol podešen da skenira u oblasti  $m/z$  od 30–194 (detekcija jona proizvoda, to jest potomaka). Daleko najintenzivniji detektovan jon je imao vrednost  $m/z$  138, što je ukazivalo da je jedinjenje derivat neke od purinskih baza, nastao gubitkom  $C_2H_4N_2$  fragmenta.

Za određivanje strukture jedinjenja **H10** ipak je bilo potrebno još podataka, tačnije, bili su neophodni NMR podaci. S obzirom na malu količinu uzorka, na NMR kao tehniku male osetljivosti i na činjenicu da je deuterohloroformski ekstrakt u stvari smeša jedinjenja, identifikacija jedinjenja **H10** na osnovu NMR tehnika predstavljala je pravi izazov. U protonskom NMR spektru (sl. 2.65.) javljaju se signali koji se mogu razvrstati na tri grupe: do 2,5 ppm, od 3,5 do 6,5 ppm i preko 7 ppm. Veliki broj signala u celom spektru su singleti, tako da ih je teško povezati međusobno. Mala količina ekstrakta uslovala je veoma otežano snimanje  $^{13}C$  NMR spektra, ali su lako snimljeni HSQC\* i HMBC† spektri. Korelacioni signali u ovim 2D spektrima nisu bili istih intenziteta, najpre zbog različitih koncentracija jedinjenja u smeši. Identifikacija jedinjenja **H10** zahtevala je potpunu identifikaciju i asignaciju signala svih ostalih jedinjenja u smeši kako bi se odredili signali koji potiču od jedanaest protona i osam ugljenika ovog jedinjenja. Posle identifikacije benzaldehida (**H3**), benzoil–nitrila (**H4** sl. 2.66.), mandelonitrila (**H8** sl. 2.66.) i mandelonitril–benzoata (**H9** sl. 2.67.) određeni su svi signali koji pripadaju jedinjenju **H10** (singleti metil–grupa na  $\delta$  3,97 ppm,  $\delta$  3,99 ppm i  $\delta$  4,205 ppm i singlet aromatičnog protona na  $\delta$  7,81 ppm) i ustanovljeno je da se radi o trimetil–derivatu guanina. Nakon toga su snimljeni i  $^1H$ – $^{15}N$  HSQC i  $^1H$ – $^{15}N$  HMBC NMR spektri. Iznenadujuće je bilo to što se HSQC korelacije nisu pojavile, a pojavile su se korelacije u HMBC spektru. Upoređivanjem 1D i 2D NMR podataka sa literaturom<sup>111</sup> jedinjenje **H10** je identifikovano kao himantarin (sl. 2.68–2.70. i tabela 2.18.).

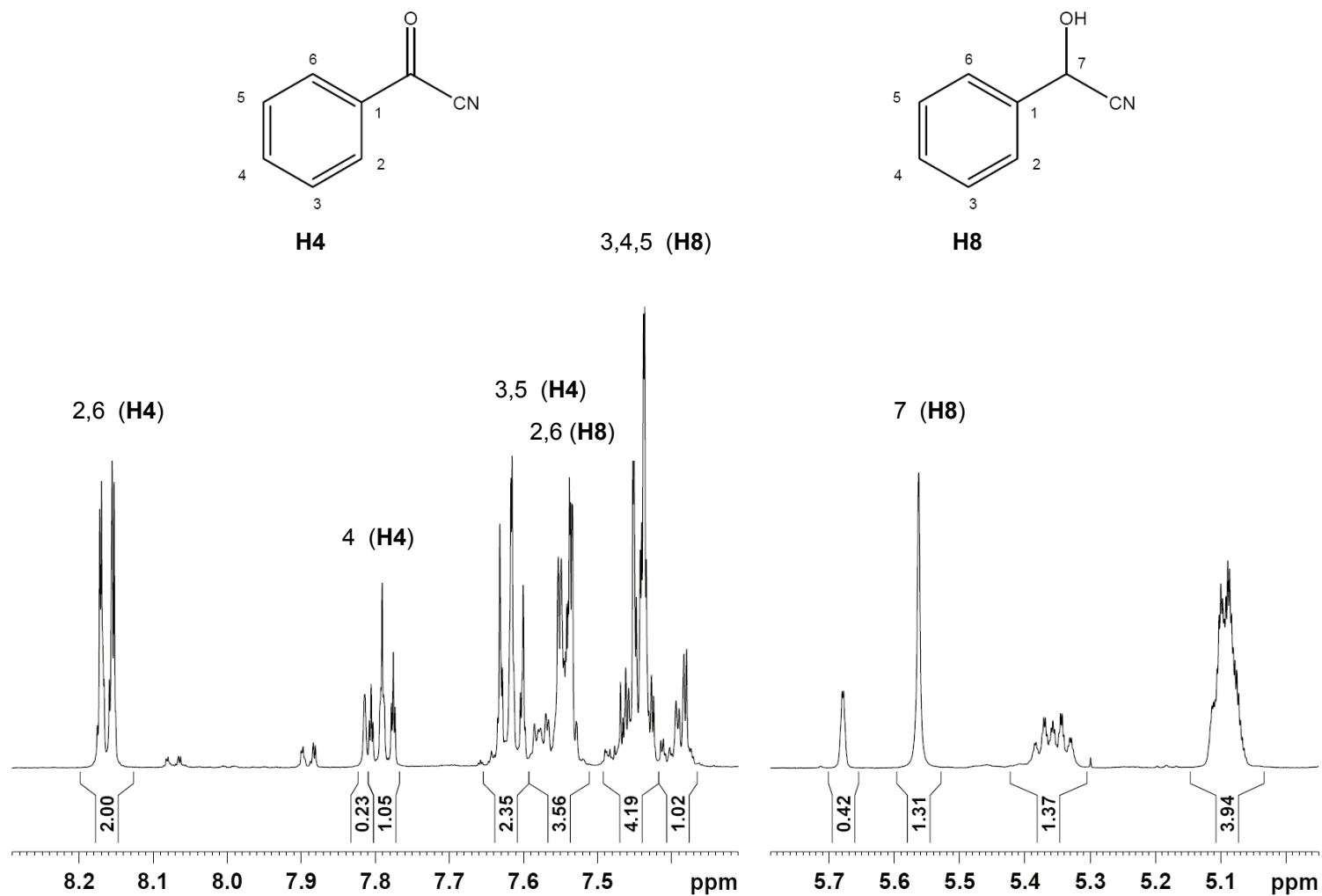
---

\* Heteronuclear single quantum coherence ili heteronuclear single quantum correlation

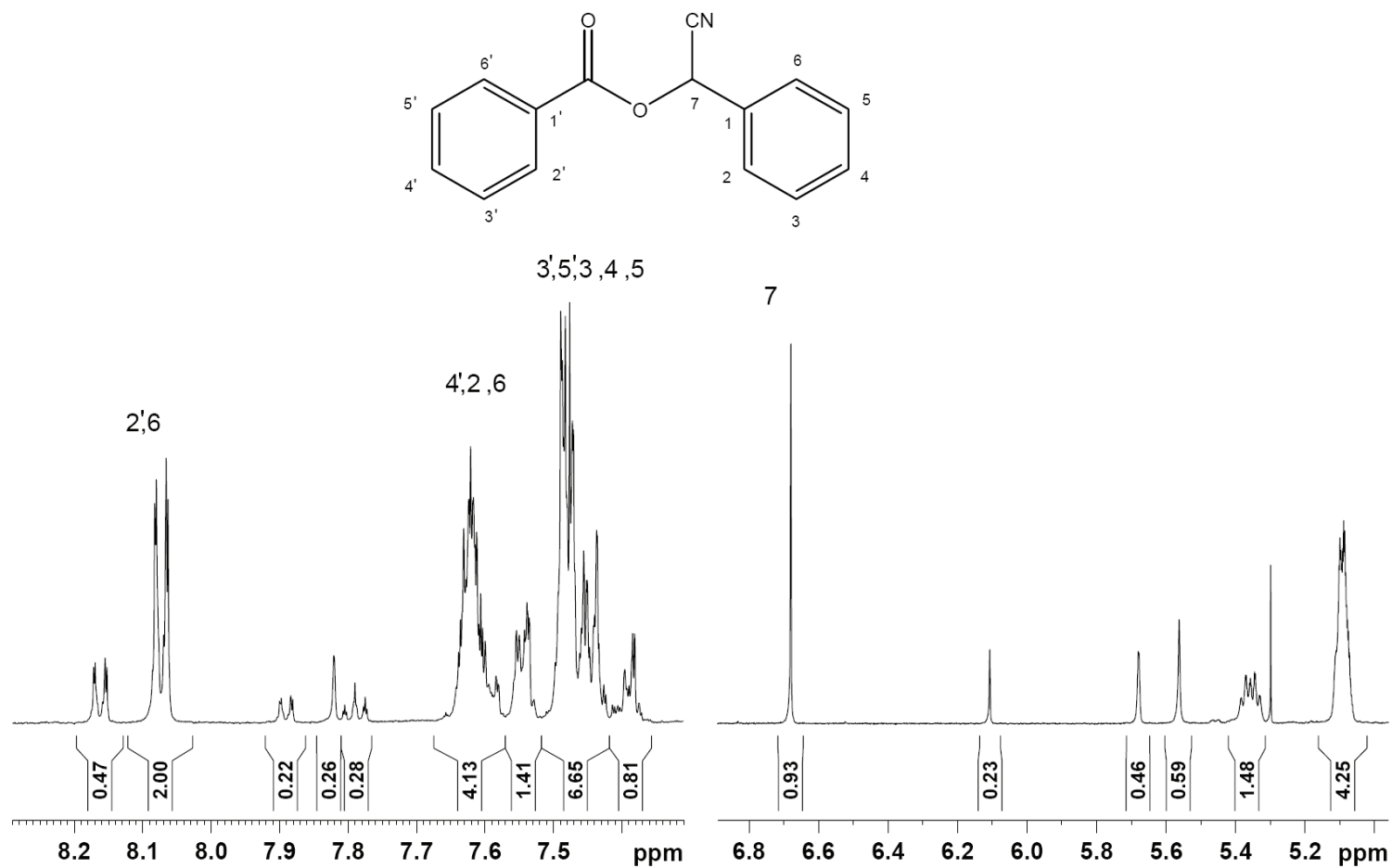
† Heteronuclear multiple–bond correlation spectroscopy



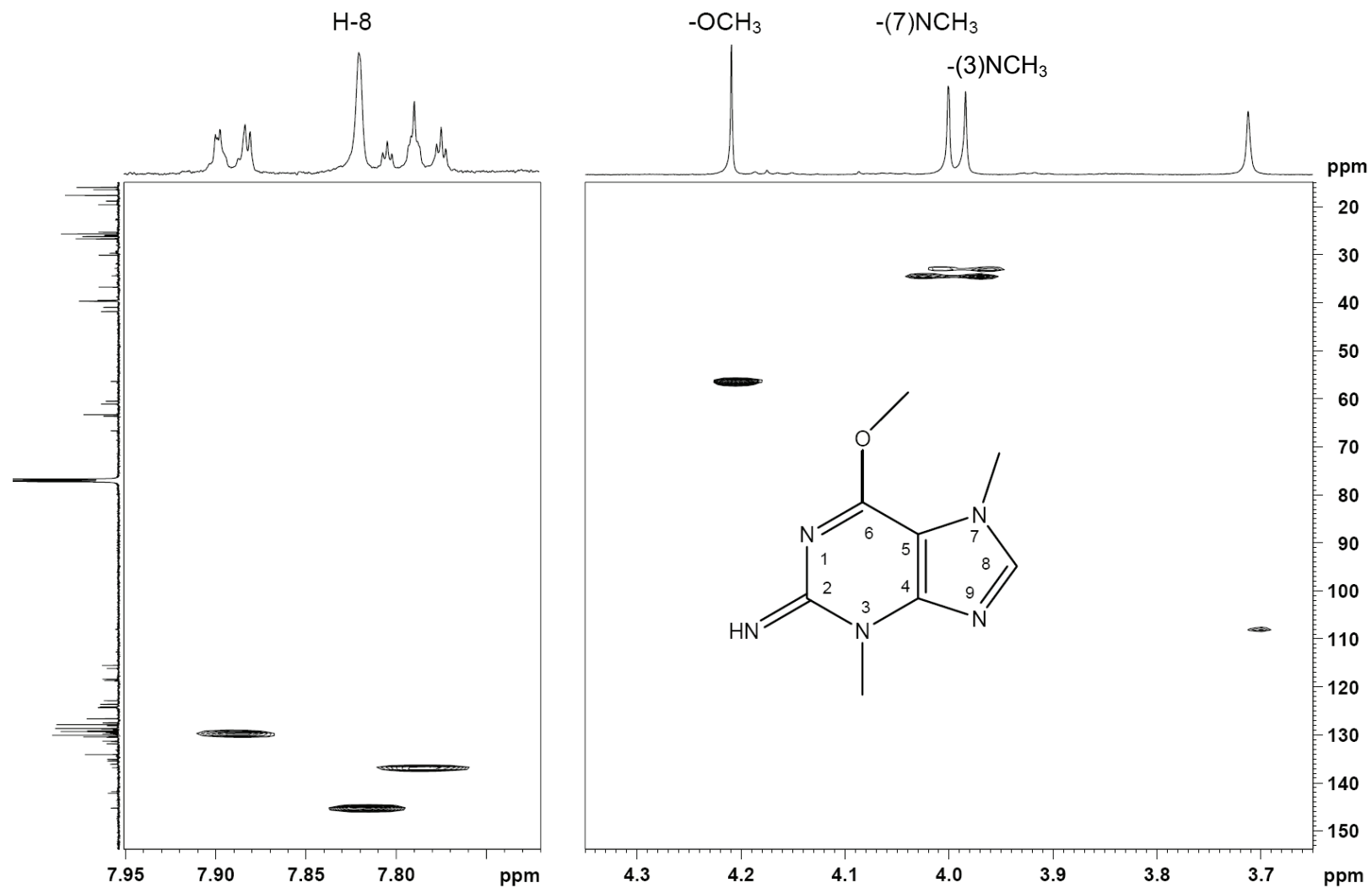
**Slika 2.65.** Uvećani delovi  $^1\text{H}$  NMR spektra (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767) prikazana zajedno sa akvizicionim i procesionim parametrima.



**Slika 2.66.** Identifikacija benzoil–nitrila (jedinjenja **H4**) i mandelonitrila (jedinjenja **H8**) uz pomoć <sup>1</sup>H NMR spektra (500 MHz) CDCl<sub>3</sub> ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

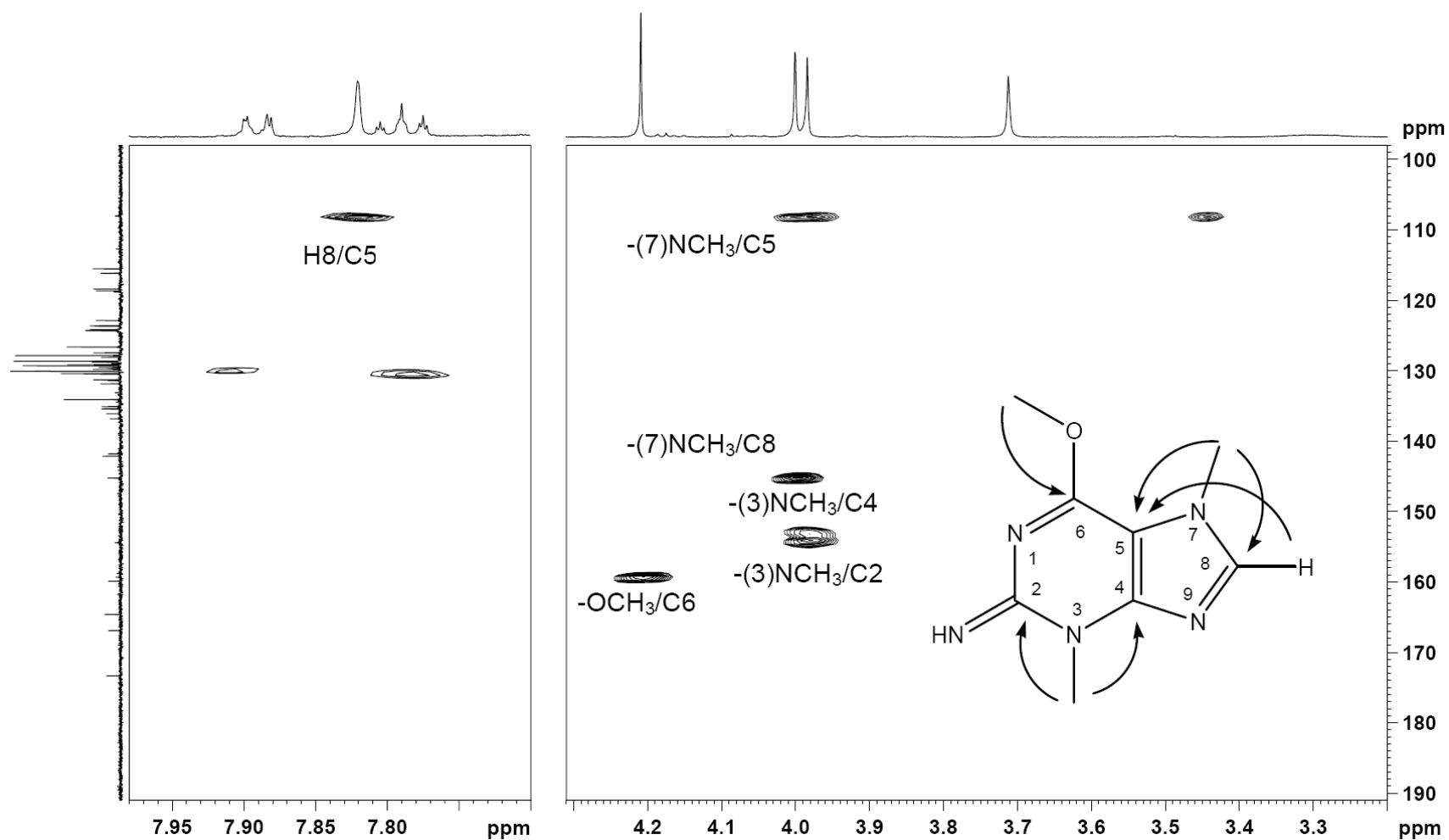


Slika 2.67. Identifikacija mandelonitril–benzoata jedinjenja **H9** uz pomoć <sup>1</sup>H NMR spektra (500 MHz) CDCl<sub>3</sub> ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

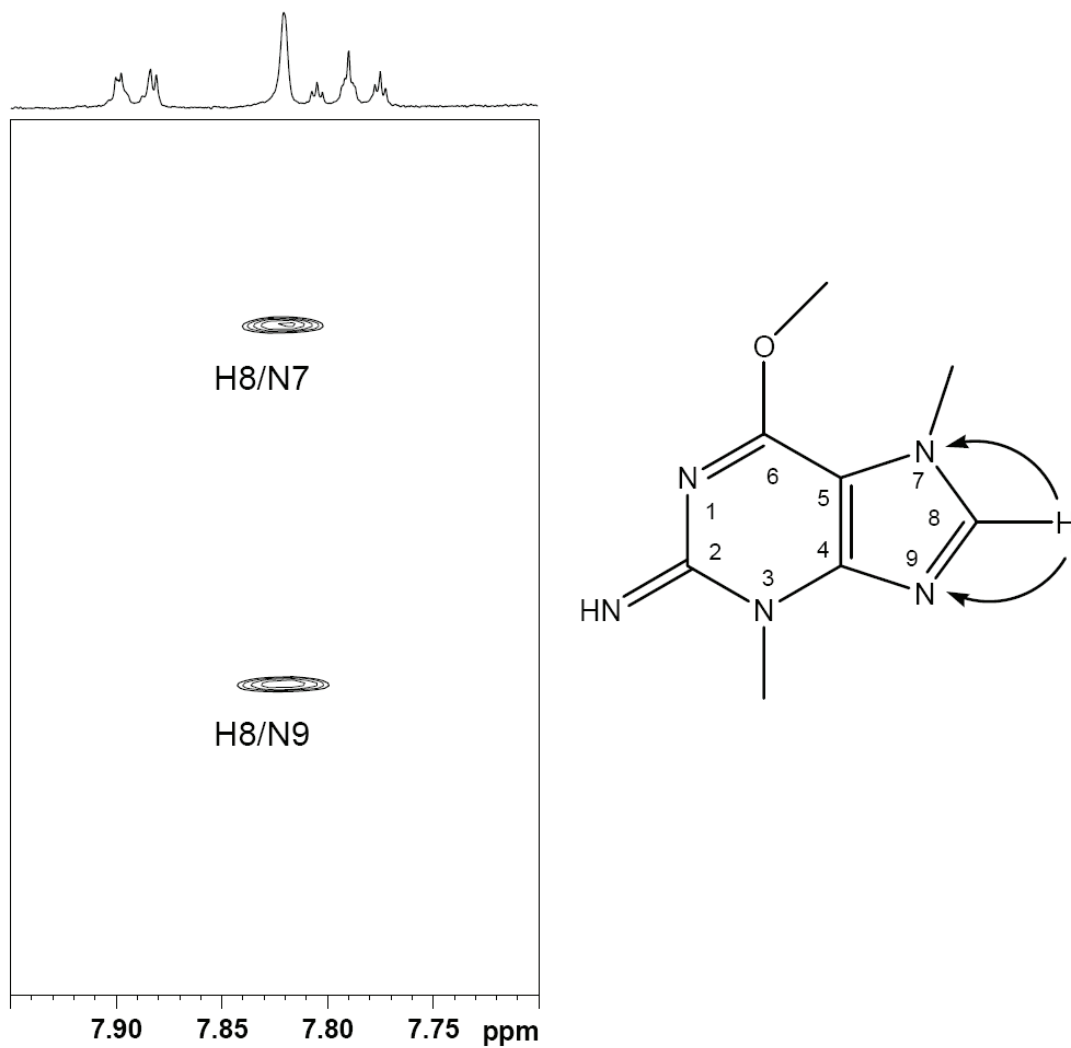


Slika 2.68. Identifikacija himantarina (jedinjenja **H10**) uz pomoć HSQC spektra ( $^1\text{H}$  500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).





Slika 2.69. Identifikacija himantarina (jedinjenja **H10**) uz pomoć HMBC spektra ( $^1\text{H}$  500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

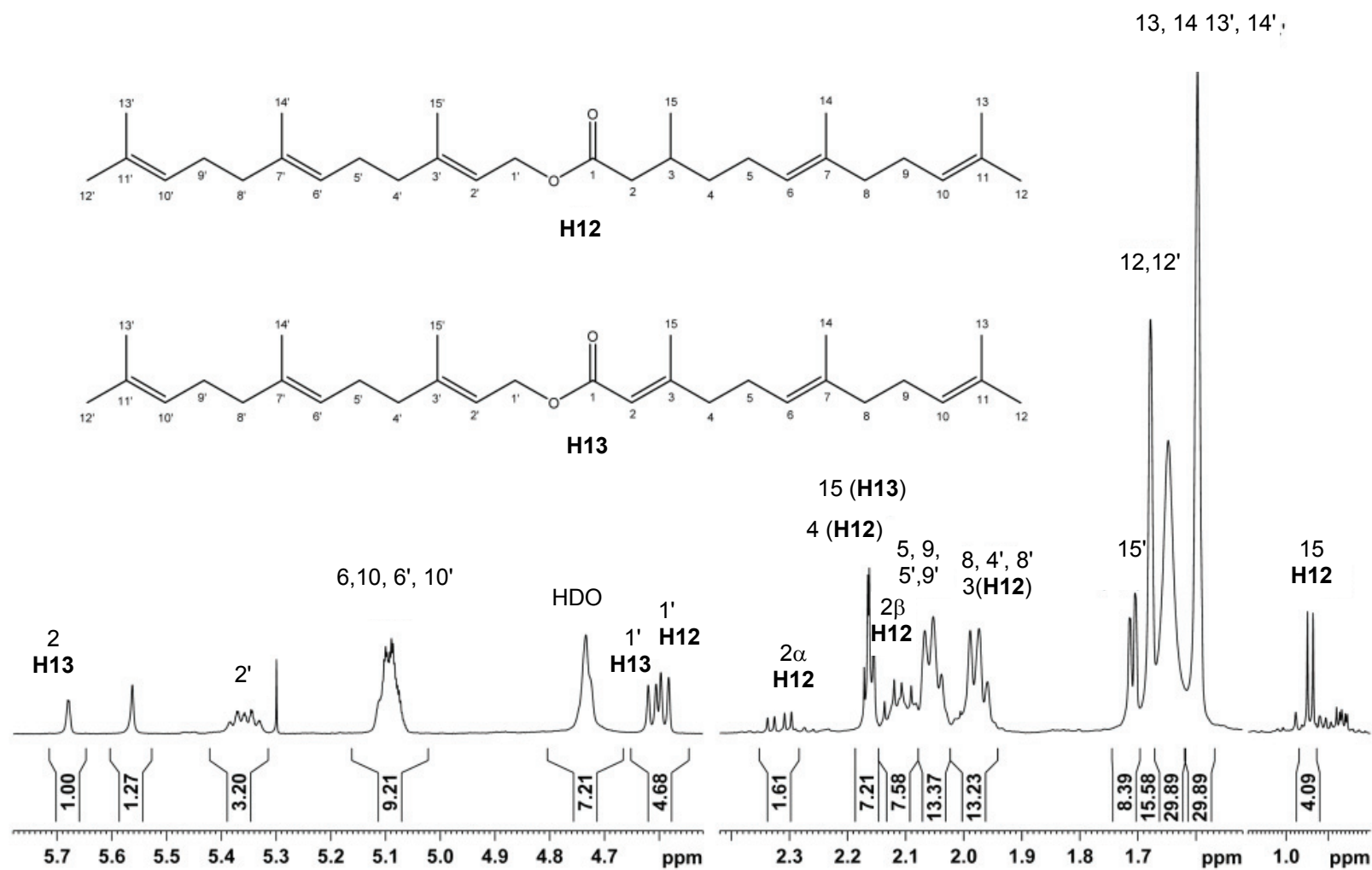


**Slika 2.70.** Identifikacija himantarina (jedinjenja **H10**) uz pomoć  $^{15}\text{N}$  HMBC spektra ( $^1\text{H}$  500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767)

**Tabela 2.18.** NMR–Spektralni podaci jedinjenja **H10** ( $^1\text{H}$  NMR 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), mult.	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (H→C)	HMBC (H→N)	$^{15}\text{N}$ $\delta$ (ppm)
1	–	–	–	–	nd
2	–	154.4	–	–	–
3	–	–	–	–	nd
4	–	153.1	–	–	–
5	–	108.0	–	–	–
6	–	159.4	–	–	–
7	–	–	–	–	151.7
8	7.81 s	145.3	C–5	N–7, N–9	–
9	–	–	–	–	234.0
–OCH <sub>3</sub>	4.205 s	56.4	C–5	–	–
(3)–NCH <sub>3</sub>	3.97 br s	32.9	C–2, C–4	–	–
(3)–NCH <sub>3</sub>	3.99 br s	34.4	C–5, C–8	–	–
NH	na	–	–	–	nd

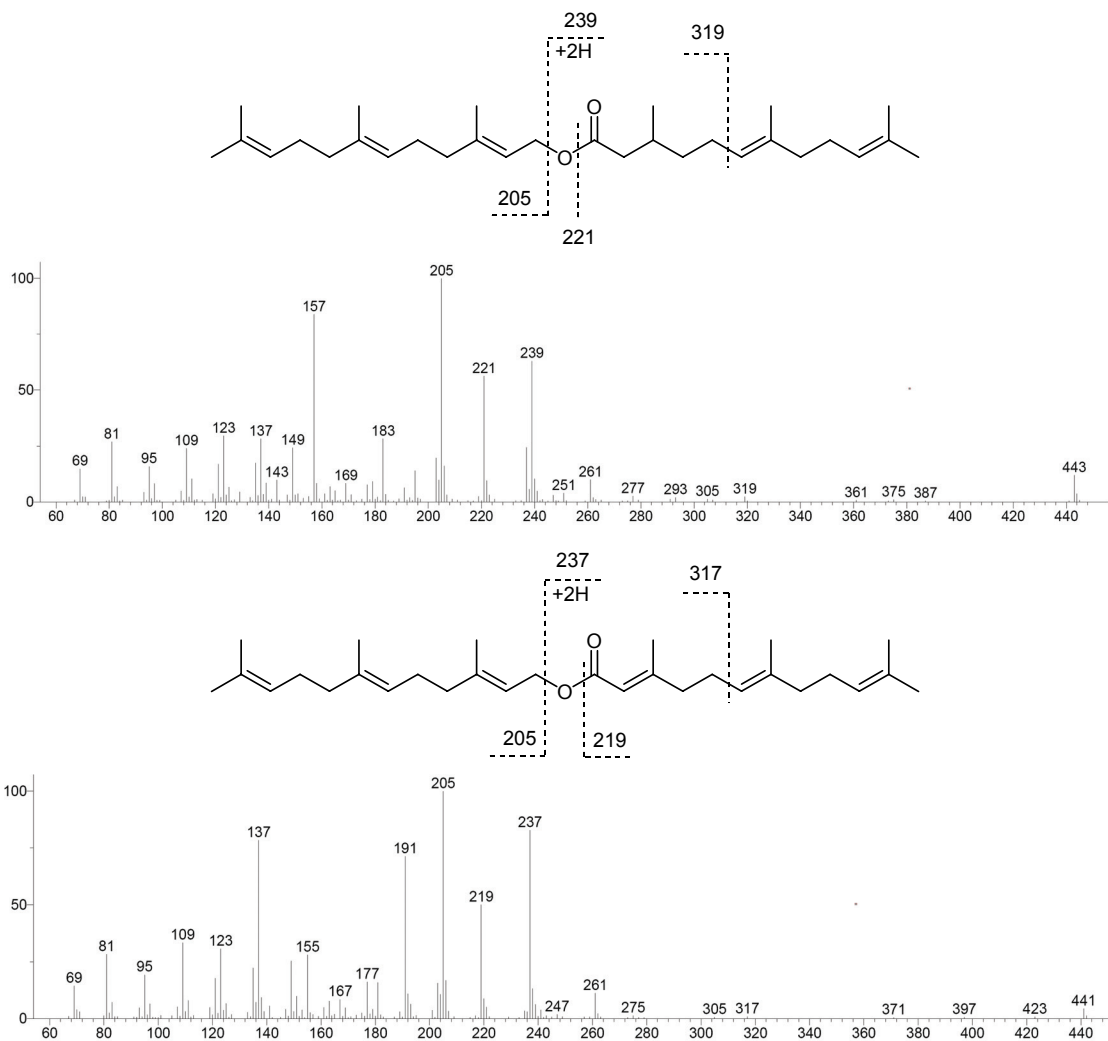
Dva srodna jedinjenja **H12** (farnesil–2,3–dihidrofarneszoat) i **H13** (farnesil–farneszoat) identifikovana su uz pomoć GC–EI–MS, GC–CI–MS i NMR tehnika. Signali ovih jedinjenja se pojavljuju u GC–FID i GC–EI–MS hromatogramima na retencionim vremenima od 31,2 i 32,7 min i ne pokazuju reaktivnost prema BSTFA. Najvažniji deo identifikacije jedinjenja **H12** i **H13** zasnivao se na interpretaciji CI–MS i 1D i 2D NMR spektara (sl. 2.72 i 2.73.)



Slika 2.71. Identifikacija jedinjenja H12 i H13 uz pomoć <sup>1</sup>H NMR spektra (500 MHz) CDCl<sub>3</sub> ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

Na osnovu NMR podataka moglo se doći do delimične potvrde strukture jedinjenja **H12** i **H13**, tačnije mogli smo da saznamo da su u pitanju estri dugog kiselinskog i alkoholnog niza, sa dosta dvostrukih veza i metil-grupa. Takođe, pošto se radi o jedinjenjima iz živog sistema pretpostavka je da su u pitanju izoprenske jedinice i u kiselinskom i u alkoholnom delu ovih estara. Glavne razlike u  $^1\text{H}$  NMR spektru su pojava dubleta metil-grupe H<sub>3</sub>-15 jedinjenja **H12** na najmanjem hemijskom pomeranju u spektru ( $\delta$  0,94 ppm) i pojava singleta protona H-2 na najvećem hemijskom pomeranju ( $\delta$  5,68 ppm). Ove identifikacije su predstavljale početak kompletne identifikacije izoprenog estera **H12** i njegovog  $\alpha,\beta$ -nezasićenog analoga **H13** na osnovu 2D NMR tehnika posebno nakon snimanja GC-CI-MS spektara.

Kod dva hromatografska pika na retencionim vremenima od 31,2 i 32,7 min u odgovarajućim CI-MS spektrima uočeni su protonovani molekuli na  $m/z$  443 i 441, što odgovara jedinjenjima **H12** i **H13**. Takođe, fragmentacioni joni CI-MS spektra jedinjenja **H12** odgovaraju pretpostavljenoj strukturi farnezil-dihidrofarnesoata (sl. 2.72.). Isto važi i za jedinjenje **H13** (farnezil-farnezoat) čija je fragmentacija prilikom hemijske jonizacije prikazana na Slici 2.72. Ako se uporede CI-MS spektri jedinjenja **H12** i **H13** može se uočiti čitav niz jona koji su za dve masene jedinice veći kod jedinjenja **H12** nego kod jedinjenja **H13** (443/441, 319/317, 277/275, 239/237, 221/219, 183/181, 157/155), što bi značilo da ti fragmenti sadrže kiselinski deo ovih estara (gde se nalazi jedina strukturna razlika). Joni 239/237 nastaju uz transfer dva protona, što nije retka pojava kod hemijske jonizacije. Takođe, postoje joni koji su prisutni kod oba jedinjenja, kao što su sledeći joni: 69, 81, 95, 109, 123, 137, 191, 205 (osnovni jon u oba spektra), 261, što znači da oni sadrže isti deo strukture, odnosno alkoholni deo ovih estara. Nekoliko jona (parova jona) ima različit intenzitet, dok je najznačajnija razlika između ovih spektara jon  $m/z$  191, koji odgovara jonu  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}^+$  nastalom prostom fragmentacijom, potpomognutom prethodnim protonovanjem karbonilne grupe jedinjenja **H13**.



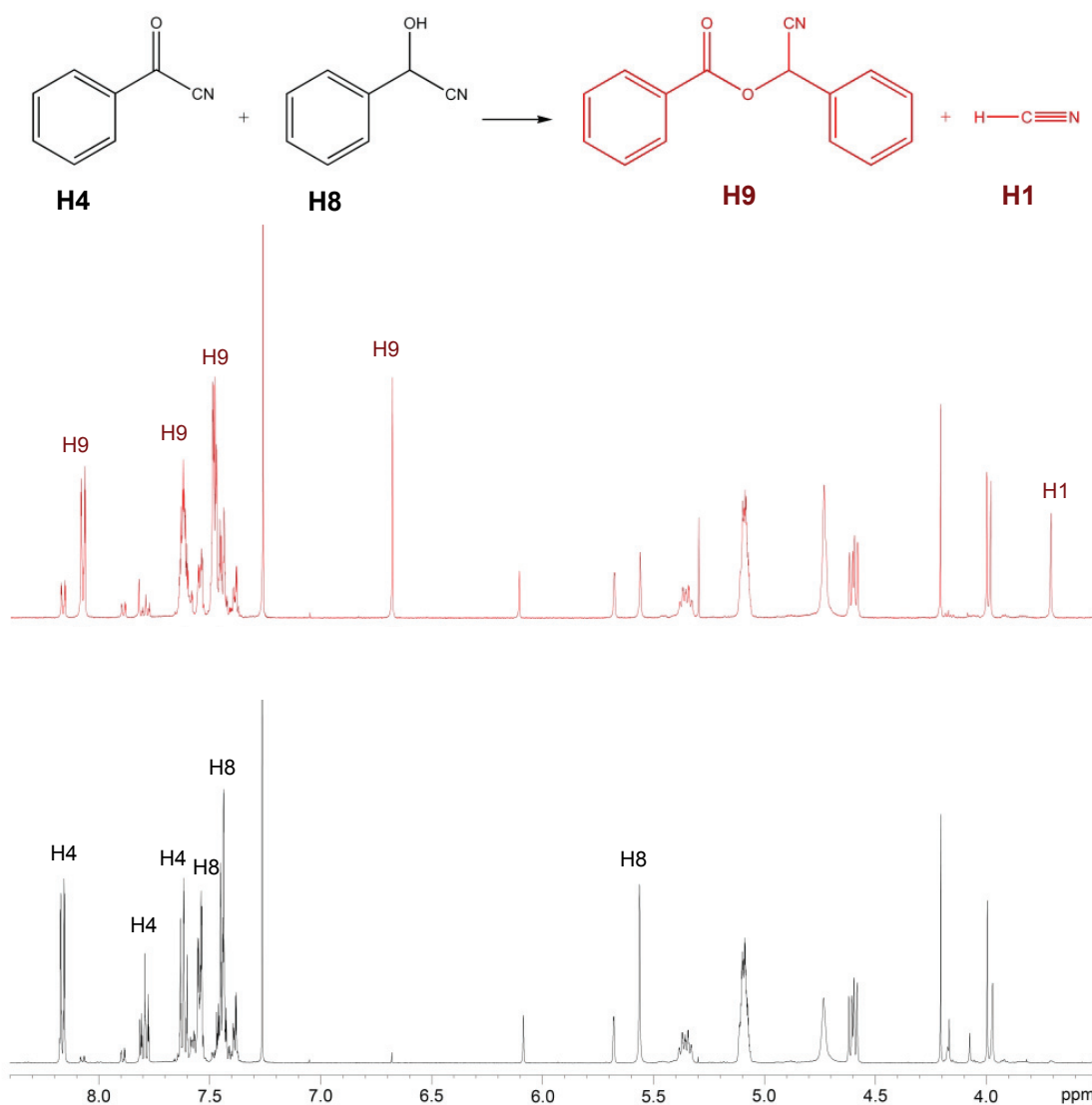
**Slika 2.72.** Identifikacija jedinjenja **H12** i **H13** uz pomoć GC–CI–MS tehnike. **Gore:** CI–MS spektar jedinjenja **H12** na  $R_t=31,2$  min sa pretpostavljanom fragmentacijom, **dole:** CI–MS spektar jedinjenja **H13** na  $R_t=32,7$  min sa pretpostavljanom fragmentacijom.

Na kraju, detaljna 2D NMR analiza je potvrdila identifikaciju estara **H12** i **H13** pri čemu je izvršena asignacija većine  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  signala. Dobro slaganje NMR podataka jedinjenja **H13** sa literaturom<sup>112</sup> poslužilo je i za indirektno dokazivanje strukture jedinjenja **H12**.

*Detekcija cijanovodonika oslobođenog Schotten–Baumann–ovom reakcijom uz pomoć NMR spektroskopije*

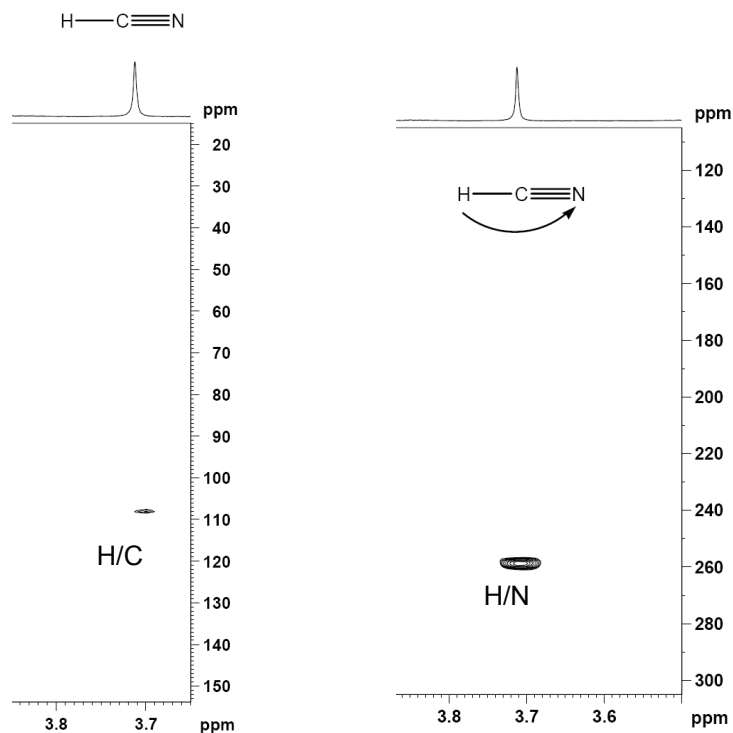
Na osnovu rada Kuwahara–e i saradnika<sup>7</sup> u kome se prati reakcija formiranja mandelonitril–benzoata i otpuštanje cijanovodonika kod različitih načina iritiranja i ekstrahovanja jedinki, a nakon identifikacije sekretornih jedinjenja kod *H. gabrielis* uz pomoć 1D i 2D NMR tehnika, započeto je praćenje postsekretske Schotten–Baumann–ove reakcije NMR spektroskopijom. Upoređeni su NMR spektri CDCl<sub>3</sub> ekstrakta *H. gabrielis* neposredno posle ekstrahovanja i nakon nekoliko meseci u zamrzivaču. Signali njihovih 1D i 2D NMR spektrara bili su vrlo slični, ali izvesne razlike su postojale u <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, NOESY, COSY, HSQC, HMBC, <sup>15</sup>N HSQC i <sup>15</sup>N HMBC spektrima. U NMR kiveti u CDCl<sub>3</sub> na temperaturi od –18 °C reagovali su mandelonitril i benzoil–nitril formirajući mandelonitril–benzoat uz otpuštanje gasovitog cijanovodonika.

Potvrda odigravanja ove postsekretske reakcije bila je moguća nakon identifikacije cijanogenih jedinjenja **H4**, **H8** i **H9**. Signali benzoil–nitrila i mandelonitrila drastično su se smanjili u <sup>1</sup>H NMR spektru, a signali mandelonitril–benzoata su se povećali (**sl. 2.73.**). Pored toga, pojavio se novi singlet na δ 3,71 ppm, koji je imao korelacije sa signalima <sup>13</sup>C na δ 108 i <sup>15</sup>N na δ 258,7 ppm (**sl. 2.74.**). Očigledno su ovo bili signali cijanovodonika koji je zbog niske temperature mogao da se rastvori u CDCl<sub>3</sub>. Na ovaj način je u potpunosti dokazano postojanje postsekretske reakcije nastanka mandelonitril–benzoata i cijanovodonika iz mandelonitrila i benzoil–nitrila (**sl. 2.73.**).



**Slika 2.73.** Nastajanje mandelonitril–benzoata (**H9**) iz benzoil–nitrila (**H4**) i mandelonitrila (**H8**) uz otpuštanje cijanovodonika (**H1**) (Schotten–Baumann–ova reakcija) praćeno je NMR spektroskopijom: <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz) CDCl<sub>3</sub> ekstrakta odbrambenog sekreta vrste *H. gabrielis* odmah nakon ekstrakcije (crna boja) i nakon nekoliko meseci u zamrzivaču (crvena boja); Signali benzoil–nitrila i mandelonitrila se smanjuju, dok se signali mandelonitril–benzoata i cijanovodonika pojavljuju.



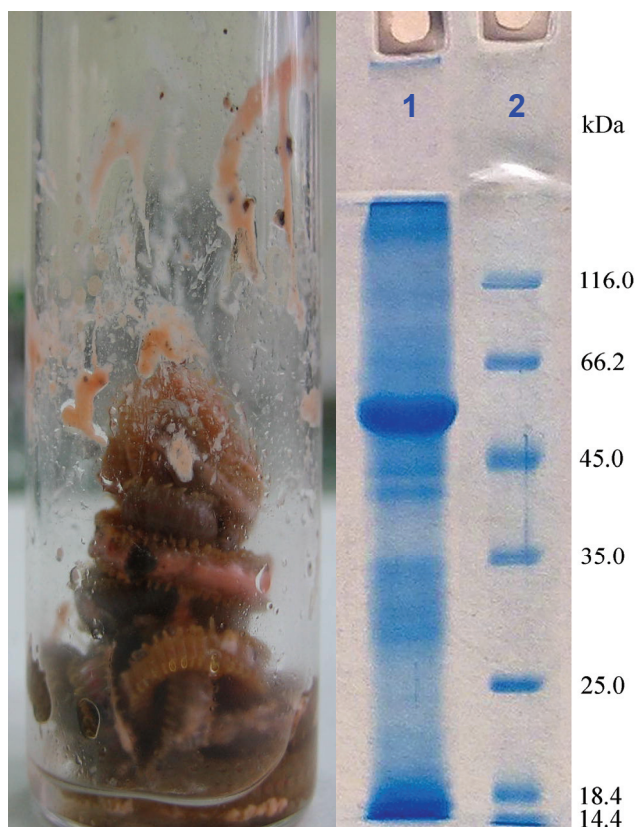


**Slika 2.74.** Identifikacija jedinjenja **H1** na osnovu HSQC (levo) i  $^{15}\text{N}$  HMBC spektara (desno) ( $^1\text{H}$  NMR 500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta vrste *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767).

Pored rastvornog dela metilen–hloridnog ekstrakta vrste *H. gabrielis*, jasno se mogao uočiti sluzavi, nerastvorni deo roze boje (sl. 2.75.). Rastvorljivost je isprobana i u polarnim organskim rastvaračima (metanol, acetonitril i DMSO), pa čak i u vodi, ali bezuspešno. Slično kao i kod *G. klugii* (vrste iz klase Diplopoda), Bradford–ov test dao je pozitivnu reakciju na proteinske strukture, nakon čega smo uradili SDS gel elektroforezu\* na 12% akrilamidnom gelu (sl. 2.75.).

Na osnovu izgleda elektroforegrama možemo reći da se najintenzivnija proteinska traka u odbrambenom sekretu vrste *H. gabrielis* nalazi na vrednosti 55 kDa, dok su trake između 25–45 kDa i 60–116 kDa značajno slabijeg intenziteta. Pored ovih traka proteinski profil sadrži mnogo aglomerata (traka na samom početku elektroforegrama) i peptida malih molekulskih masa koje putuju zajedno sa frontom.

\* Uslovi dati u poglavlju EKSPERIMENTALNI DEO, pasus SDS elektroforeza



**Slika 2.75.** **Levo** – Proteinska komponenta odbrambenog sekreta *Himantarium gabrielis* (Linnaeus 1767) dobijena ekstrakcijom metilen–hloridom. **Desno** – SDS elektroforeza: Uzorak odbrambenog sekreta *H. gabrielis* (Linija 1); Molekulski markeri (14,4 kDa lizozim, 185,4 kDa  $\beta$ -laktoglobulin, 25 kDa RNK–aza (Rease) Bsp 98I, 35 kDa laktat dehidrogenaza, 45 kDa ovalbumin, 66,2 kDa BSA i 116 kDa  $\beta$ -galaktozidaza) (Linija 2).

## 2.4. Odbrambene supstance klase Chilopoda – Diskusija

Stonoge klase Chilopoda predstavljaju važnu grupu predatora među zemljišnim zglavkarima. Postoji oko 3 300 vrsta hilopoda raspoređenih u pet redova: Scutigermorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha, Scolopendromorpha i Geophilomorpha<sup>113</sup>. Nasuprot brzim hilopodama iz redova Scutigermorpha i Lithobiomorpha, stonoge iz redova Scolopendromorpha i Geophilomorpha (slično većini diplopoda) poseduju hemijsku zaštitu.

Za razliku od diplopoda kod kojih je sastav odbrambenih sekreta analiziran kod većeg broja taksona i koji imaju i određeni filogenetski značaj, za hilopode nedostaju takva istraživanja. Dosadašnja hemijska ispitivanja hilopoda mogu se podeliti na ispitivanje odbrambenih sekreta i ispitivanje otrova koji se nalazi u mandibulama. Određivanje hemijskog sastava odbrambenih sekreta bilo je u žiži naučne javnosti šezdesetih i sedamdesetih godina dvadesetog veka, a zatim je zanemareno; intenziviranje istraživanja u ovoj oblasti se nastavlja početkom novog milenijuma analizama njihovog otrova<sup>114,115</sup>. Pored analiza otrova postoji i nekoliko novijih studija koje se bave ispitivanjem hemijskog sastava celih hilopoda. Ove studije se baziraju na upotrebi hilopoda u ishrani i u tradicionalnoj istočnjačkoj medicini, a bave se analizom masnokiselinskog profila i pronalaženjem novih prirodnih proizvoda<sup>116,117</sup>.

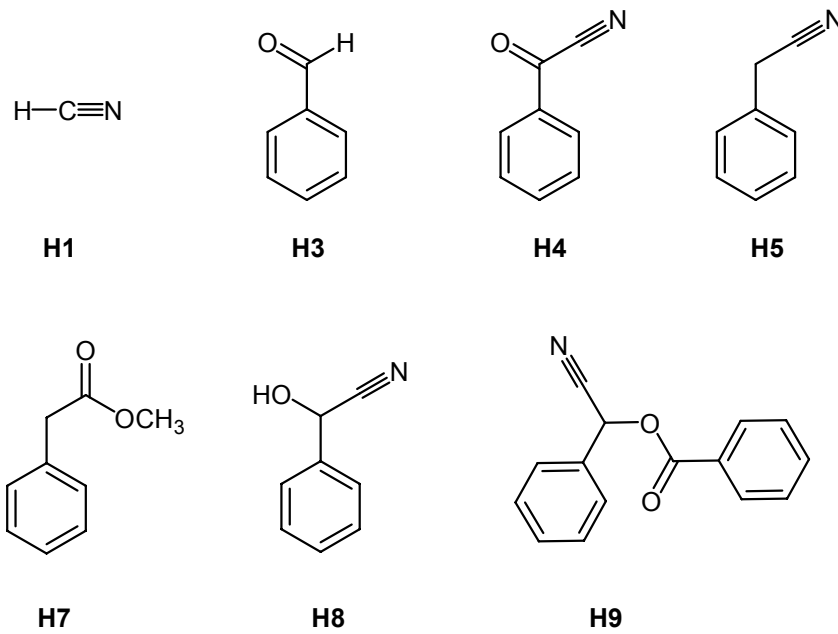
Od interesa je da se napomene da su prema dosadašnjim istraživanjima kod hilopoda odbrambeni sekreti ispitivani jedino kod osam vrsta koje pripadaju redovima Scolopendromorpha i Geophilomorpha. U odbrambenim sekretima ovih vrsta su pronađeni cijanovodonik i njegovi derivati, ali je takođe pronađena i proteinska komponenta (**tabela 2.19.**). Naši radovi obuhvataju ispitivanje odbrambenih sekreta šest vrsta hilopoda koje naseljavaju Balkansko poluostrvo i pripadaju redovima Lithobiomorpha (*Eupolybothrus transsylvanicus*), Scolopendromorpha (*Cryptops parisi*) i Geophilomorpha (*Strigamia crassipes*, *Henia illyrica*, *Clinopodes flavidus* i *Himantarium gabrielis*). Vrste *E. transsylvanicus* i *C. parisi* nisu proizvodile odbrambene sekrete, dok se sekret kod *H. illyrica* sastojao samo od proteinske komponente. Kod geofilomorfnih vrsta *S. crassipes*, *C. flavidus* i *H. gabrielis* u odbrambenom sekretu identifikovan je cijanovodonik; ovi rezultati ukazuju da bi se

hemijska odbrana kod geofilomorfih stonoga mogla prvenstveno okarakterisati kao cijanogena. Međutim, pored cijanogenih jedinjenja u sekretu analiziranih vrsta hilopoda po prvi put su pronađena i necijanogena jedinjenja (**tabela 2.19.** i **sl. 2.76.** i **2.77.**).

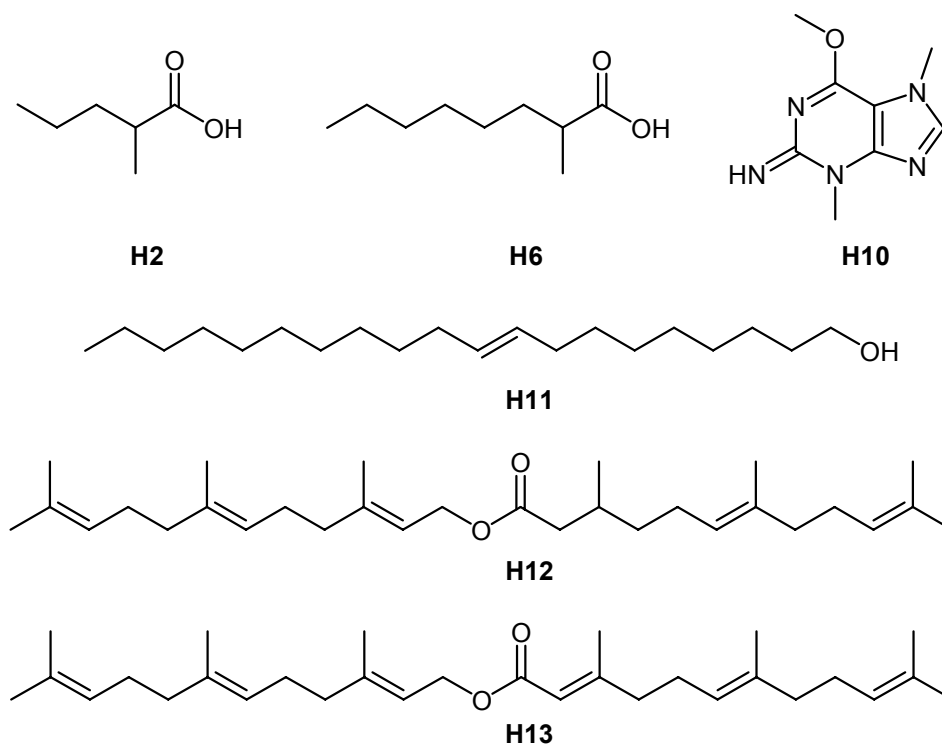
**Tabela 2.19.** Identifikovane supstance iz odbrambenih sekreta stonoga klase Chilopoda.

Red	Familija	Odbrambene supstance	Reference
	<i>Ispitivana vrsta</i>		
	Scolopendromorpha		
	Scolopendridae		
	<i>Asanada</i> sp.	HCN, proteini	118
	Geophilomorpha		
	Linotaeniidae		
	<i>Strigamia</i> sp.	HCN	119
	<i>Strigamia bothriopus</i> (Wood 1862)	HCN, benzoil–nitril, proteini	119
	<i>Strigamia chionophila</i> (Wood 1862)	HCN	119
	<i>Strigamia crassipes</i> (C. L. Koch 1835)	HCN, benzaldehid, benzoil–nitril, (9Z)–eikozen–1–ol	*
	Dignathodontidae		
	<i>Henia vesuviana</i> (Newport 1845)	proteini	120
	<i>Henia illyrica</i> (Meinert 1870)	proteini	*
	Geophilidae		
	<i>Pachymerium ferrugineum</i> (C. L. Koch 1835)	HCN, proteini	121
	<i>Clinopodes flavidus</i> (C. L. Koch 1847)	HCN, 2–metilpentanska kiselina, benzaldehid, benzoil–nitril, 2–metiloktanska kiselina, metil 2–fenilacetat	*
	<i>Geophilus cayugae</i> (Chamberlin 1904)	HCN	119
	<i>Geophilus vittatus</i> (Rafinesque 1820)	HCN, benzaldehid, benzoil–nitril, benzoeva kiselina, mandelonitril, proteini	119
	Himantariidae		
	<i>Himantarium gabrielis</i> (Linnaeus 1767)	HCN, benzaldehid, benzoil–nitril, benzil–nitril, mandelonitril, mandelonitril–benzoat, himantarin, farnezil–2,3–dihidrofarnoat, farnezil–farnoat	*

\* Rezultati ove disertacije



Slika 2.76. Identifikovane cijanogene supstance kod šest ispitivanih vrsta Chilopoda.



Slika 2.77. Identifikovane necijanogene supstance kod šest ispitivanih vrsta Chilopoda.

Podelu jedinjenja u odbrambenim sekretima hilopoda na cijanogena i necijanogena treba posmatrati uslovno. Tako, cijanogeno jedinjenje **H7** (metil-estar fenilsirćetne kiseline) ne sadrži CN grupu i ne može se sa sigurnošću reći da nastaje u

nekom od procesa biosinteze cijanovodonika, ali ipak kao i jedinjenja **H4** (benzoil–nitril), **H5** (benzil–nitril), **H8** (mandelonitril) i **H9** (mandelonitril–benzoat) pored fenil–grupe sadrži još jednu C–2 jedinicu. Hidroliza nitrilne grupe do karboksilne kiseline i kasnije njena esterifikacija jedan je od mogućih načina biosinteze ovog jedinjenja iz nekih od cijanogenih jedinjenja. Takođe, jedinjenje **H10** (trimetilguanin) je necijanogeno jedinjenje, dok su, na primer, poznate studije gde guanin nastaje u niskom prinosu polimerizacijom amonijum–cijanida<sup>122</sup>. Pored toga, treba naglasiti i to da se analiza cijanogenih jedinjenja u ranijem periodu zasnivala samo na analizi cijanovodonika, a da zbog metodologije i manje osetljivosti tadašnjih tehnika rezultate treba tumači sa oprezom.

Do sada su analizirane vrste hilopoda koje pripadaju familijama Scolopendridae, Linotaeniidae, Dignathodontidae i Geophilidae, dok je po prvi put analizirana vrsta iz familije Himantariidae (**tabela 2.19.**). U okviru familije Scolopendridae pokazano je prisustvo cijanovodonika i proteina, što se može reći i za vrste iz familije Linotaeniidae, gde je pojava proteinskog dela sekreta uočena kod jedne od ukupno četiri ispitivane vrste. Pored cijanovodonika, u familiji Linotaeniidae u isparljivom delu sekreta identifikovana su i cijanogena jedinjenja benzoil–nitril i benzaldehid, ali i necijanogeni nezasićeni alkohol dugog niza, (9Z)–eikozen–1–ol. Kao što je već ranije pomenuto, prisustvo cijanovodonika u sekretu u stvari dokaz je postojanja prekursora ili proizvoda koji dovode do njegovog otpuštanja. Na primer, pojava benzaldehida u tehnikama povezanim sa gasnom hromatografijom znači indirektni dokaz prisustva mandelonitrila. Zbog svega navedenog, ali i zbog činjenice da su rezultati koje se odnose na ranije ispitivane vrste hilopoda već zastareli, tumačenje različitosti odbrambenih sekreta će se zasnivati na postojanju odnosno odsustvu cijanovodonika, a vrste koje su tada ispitivane trebalo bi ponovo ispitati, kako bi se potvrdili rezultati cijanogeneze na savremen način sa dosta većom osetljivošću.

Takođe, značajno je bilo ispitati sastav proteinskog dela sekreta kod predstavnika familije Dignathodontidae, gde je ranije bilo dokazano postojanje proteinske odbrane. Tako je u okviru istog roda (*Henia*) pokušano da se ispita sastav proteinskog sekreta i po prvi put pokušaju da utvrde interspecijske i intraspecijske sličnosti i razlike u proteinskom sastavu odbrambenog sekreta kod stonoga *sensu lato*. U tom cilju, proteinski sekreti vrste *H. illyrica*, sa dva različita lokaliteta, analizirani su

elektroforezom i upoređeni sa ranije analiziranim proteinskim sekretom *H. vesuviana*. Rezultati su pokazali evidentnu interspecijsku razliku u proteinskom sastavu sekreta navedenih vrsta, ali i prisustvo intraspecijske razlike kod vrste *H. illyrica* sa dva različita lokaliteta. Ovi rezultati pokazuju koliko je važno detaljnije i sistematičnije ispitivanje odbrambenih sekreta kod vrsta koje poseduju proteinsku odbranu.

Istraživanja su nastavljena na predstavnicima familije Geophilidae, gde je cijanogeneza dokazana u svim do sada ispitivanim vrstama, dok je proteinska zaštita registrovana samo kod dve vrste (*Pachymerium ferrugineum* i *Geophilus vittatus*). Po prvi put su u odbrambenim sekretima hilopoda, pored cijanovodonika, detektovane organske kiseline i to 2–metilpentanska i 2–metiloktanska, ali i metil–estar 2–fenilsirćetne kiseline.

Dalje, ispitivana je vrsta *Himantarium gabrielis* koja pripada familiji Himantariidae (kod koje do sada nije ispitivan hemijski sastav odbrambenog sekreta). Rezultati su, pored prisustva većeg broja cijanogenih jedinjenja, značajni pre svega zbog pojave novih necijanogenih jedinjenja i proteina. Takođe je potvrđena i činjenica da se cijanovodonik ispušta u postsekretskoj reakciji. Na osnovu ove reakcije može se pretpostaviti da proteinski deo sekreta ima ulogu ne samo kao lepak, već i da služi za produženu zaštitu, jer se i nakon izlučivanja sekreta još neko vreme ispušta cijanovodonik svaki put kada se mehanički i termički dođe u kontakt sa ostacima sekreta. Pored toga, pojava dva farnezil–farnezoata, dovodi u pitanje svrhu takvih jedinjenja u sekretu i zahteva nov pristup ispitivanju, ne samo odbrambenih supstanci, već i supstanci koji potencijalno mogu služiti u hemijskoj komunikaciji među pripadnicima iste vrste (feromoni?). Takođe, pojava guanidnog alkaloida predstavlja njegovo prvo pronalaženje u prirodi. Veza između cijanidnih jedinjenja i ovakvih derivata do sada nije objašnjena, mada je poznata mogućnost da se u prebiotskim sintezama nukleotidne baze mogu dobiti u malom procentu iz amonijum–cijanida<sup>122</sup>.

Potrebno je istaći da su intenzivna i ekstenzivna istraživanja obuhvaćena ovom tezom rezultovala nizom relevantnih podataka vezanih za hemijsku ekologiju hilopoda. Inicirana su istraživanja, posle prekida koji je trajao gotovo trideset godina. Po prvi put su identifikovane necijanogene supstance u isparljivom delu odbrambenog sekreta hilopoda. Uz pomoć NMR tehnika u potpunosti je okarakterisan cijanovodonik ( $\delta$  <sup>1</sup>H 3,71 ppm,  $\delta$  <sup>13</sup>C 108,0 ppm i  $\delta$  <sup>15</sup>N 258,7 ppm) i potvrđeno njegovo izdvajanje u post

sekretskoj reakciji nastajanja mandelonitril–benzoata iz mandelonitrila i benzoil–nitrila. Okarakterisano je novo jedinjenje **H12** i novi sekundarni metaboliti **H10** i **H13**, kao i nekoliko novih sekretornih jedinjenja kod zglavkara *sensu lato*. Ova istraživanja su posebno zanimljiva i sa stanovišta analize proteinskog sastava sekreta, gde su primećene razlike ne samo na nivou različitih familija i rodova, već i u okviru iste vrste (*Henia illyrica*), sakupljene na različitim lokalitetima. Ispitivanje proteinske odbrane je još uvek na pionirskom nivou i mnogo novih rezultata je neophodno da bi se doneli neki zaključci, ali je zanimljiva pretpostavka da proteinski deo sekreta može poslužiti i za produženu zaštitu kod vrsta koje imaju i proteinsku i cijanogenu odbranu.

Pored činjenice da je mali broj vrsta iz klase Chilopoda analiziran, dosadašnji rezultati pokazuju izuzetnu raznovrsnost odbrambenih jedinjenja (od gasovitog cijanovodonika, preko organskih kiselina, alkohola i guaninskog alkaloida sve do proteina) i samim tim zavređuju dodatnu pažnju. Takođe, nastavak istraživanja mora se usmeriti i u smeru ispitivanja sekreta kod novih vrsta, zatim pronalaženja novih sekretornih jedinjenja i ispitivanju njihove uloge u kompleksnom svetu ovih organizama.



### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. Aparati i rastvarači

IC–Spektri su snimani na FT–IR spektrometru Thermo Scientific Nicolet 6700 tehnikama tečnog filma ili ATR tehnikom. Program za snimanje i obradu rezultata je OMNIC verzija 7.0.

NMR–Spektri snimani su na spektrometrima Varian Gemini 2000 (200 MHz za protone) i Bruker AVANCE III 500 (500 MHz za protone). Kao rastvarači korišćeni su  $\text{CDCl}_3$  i  $\text{DMSO}-d_6$  uz TMS kao interni standard. Hemijska pomeranja su izražena u  $\delta$  jedinicama a konstante sprezanja ( $J$ ) u Hz. Snimanje i obrada NMR spektara urađena je u programima VNMR verzija 5.3B i Topspin verzije 2.1 i 3.1.

Za GC i GC–MS analize korišćen je gasni hromatograf Agilent 7890A opremljen split/splitless injektorom, koji je uz pomoć tehnologije kapilarnog protoka\* povezan na dva detektora (plameno jonizacioni i maseni). Kapilarna kolona se povezuje direktno na dvodelni razdelnik, na koji se takođe povezuju po jedna kapilara (bez stacionarne faze) koje idu prema detektorima. Približno ravnomerna raspodela supstanci na oba detektora postiže se korišćenjem kapilara prečnika 0,118 mm, tako da se prema masenom spektrometru koristi kapilara dužine 144 cm, a ka plameno–jonizacionom detektoru kapilara od 53 cm. Tokom analiza korišćene su sledeće kapilarne kolone: HP–5MS i HP–5MSI dimenzija (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) i HP–INNOWAX dimezija (30 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ), noseći gas je bio helijum čistoće 5.0. Za analize su korišćene metode sa zaključavanjem retencionog vremena (RTL†) koristeći metil–stearat ili *n*–heksadekan kao standarde. Maseni detektor je takođe Agilent–ov kvadrupolni detektor 5975C inert XL EI/CI MSD, a maseni spektri su snimani tehnikama elektronske (70 eV) i pozitivne hemijske jonizacije (150 eV). Metan i izobutan korišćeni su kao gasovi za hemijsku jonizaciju.

Najčešće korišćeni GC–MS parametri pri radu sa nepolarnim HP–5MS i HP–5MSI kolonama kod elektronske i kod hemijske jonizacije bili su: rad pri konstantnom

---

\* Capillary flow technology

† Retention time lock

pritisku (1,6 ml/min na 40 °C); početna temperatura je 40 °C u trajanju od jednog minuta, linearno je povećavana do 300 °C brzinom od 10 °C u minutu i zadržana na 300 °C poslednjih 8 minuta analize\*. U slučajevima kada je bilo potrebno bolje razdvojiti komponente smeše, korišćen je duži temperaturni program sa početnom temperaturom od 60 °C i linearnim porastom od 3 °C u minutu sve do 300 °C, takođe pri konstantnom pritisku (1 ml u minutu na 220 °C)†. Temperatura izvora za elektronsku jonizaciju u svim analizama bila je 230 °C, a za hemijsku 250 °C. Kvadrupol je grejan na 150 °C. Parametri GC–MS instrumenta koji se koriste pri radu sa polarnom INNOWAX kolonom uglavnom se razlikuju samo po temperaturi gasnog hromatografa i po protoku nosećeg gasa. Analize su rađene pri konstantnom protoku (4,4 ml u minutu na 40 °C). Početna temperatura je bila 40 °C (1 min), da bi se povećavala do 255 °C brzinom od 10 °C u minutu i na toj vrednosti ostala još 7,5 minuta‡.

Za ekstrakciju su korišćeni rastvarači spektroskopske čistoće: *n*-heksan, metanol, metilen–hlorid, hloroform, acetonitril, etil–acetat, ali i cevčice aktivnog uglja za ekstrakciju na vakuumu.

Za HPLC i LC–MS analize korišćen je Agilent 1200 HPLC hromatograf sa degazerom, autosamplerom i DAD detektorom u kombinaciji sa Agilent 6210 TOF–MS§ spektrometrom. Uzorci su pripremani ekstrakcijom odgovarajućim rastvaračem (metanol ili acetonitril), dok je po potrebi, u uzorke dodavana 0,2 % mravlja kiselina (nekoliko kapi). Kao mobilna faza korišćena je smesa rastvarača A (0,2 % rastvor mravlje kiseline u vodi) i B (acetonitril) sa programiranim izokratnim i gradijentnim eluiranjem: 0–1,5 min 95 % A, 1,5–12 min 95–5 % A, 12–15 min 5 % A, 15–16 min 5–95 % A, pri protoku od 0,40 ml/min. Komponente su razdvajane na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 2,1 mm; 1,8 µm). Za detekciju signala u opsegu talasnih dužina od 190 – 450 nm korišćen je DAD detektor. Injekciona zapremina bila je 1 µl, a temperatura kolone 40 °C. Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation (verzija 1.0.0.1) i AnalystQS (verzija 1.98).

Maseni spektri su dobijeni tehnikom elektrosprej jonizacije (ESI) u pozitivnom i negativnom modu, sa sledećim parametrima: napon na kapilari, 4000 V; temperatura

---

\* Metoda nazvana QC TEST

† Metoda nazvana Adams

‡ Metoda nazvana QC TEST CW (za uslove elektronske jonizacije) i CI CW TEST (za uslove hemijske jonizacije)

§ Maseni analizator–vreme preleta (Time of Flight)

gasa, 350 °C; protok gasa za sušenje, 12 l/min; pritisak nebulajzera, 45 psi (310,26 Pa); napon na fragmentoru, 70 V (ili 140 V), a mase su merene u opsegu 50–2500 *m/z*.

Za određivanje analiziranih jedinki koristili smo istraživačku binokularnu lupu „Carl Zeiss“ (uveličanje objektiva 0,63×, 1×, 1.6×, 2.5× i 4×; uveličanje okulara 6,3× i 25×). Fotografije relevantnih struktura ili celih jedinki izvršeno je pomoću digitalnog fotoaparata „Canon PowerShot A80“, montiranog na stereo mikroskop „Carl Zeiss Stemi 2000–C“ (zum 7,7:1).

## 3.2. Sakupljanje i čuvanje materijala

### 3.2.1. Klasa Diplopoda

Ispitivane vrste stonoga iz klase Diplopoda razvrstavane su po uzrasnim stupnjevima, dok su adultne jedinke odvajane po polovima. Prikupljene jedinke su čuvane u plastičnim posudama za transport (prečnika 20 cm, visine 10 cm, sa poklopcima koji su perforirani za ulazak vazduha) zajedno sa odgovarajućom količinom prirodnog materijala sa staništa (zemlja, stelja, humus ili supstrat iz pećinskih staništa). Stonoge su čuvane u laboratorijskim uslovima nekoliko dana na 10 °C u mraku, dok je vlažnost održavana prskanjem manje količine vode jednom dnevno.

#### 3.2.1.1. Familija Schizopetalidae (Diplopoda, Callipodida)

Veliki broj jedinki vrste *Apfelbeckia insculpta* sakupljen je na nekoliko lokaliteta u zapadnoj Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini, od januara do avgusta 2008. godine. Lokaliteti u Srbiji bili su Hadži–Prodanova pećina u selu Rašćići kod Ivanjice i Mlađenovića megara u selu Stapani kod Užica (po pet mužjaka, ženki i juvenilnih jedinki sa svakog lokaliteta). U Crnoj Gori materijal je sakupljen u Izeta pećini (= Pećina Knezlaz), a u Hercegovini, na lokalitetu Bukovica (Kameno more). Zbog nemogućnosti održavanja jedinki u životu u dužem vremenskom periodu, priprema uzoraka iz Crne Gore urađena je na terenu, odakle su transportovani u vijalicama od 2 ml (procedura ekstrakovanja opisana u Eksperimentalnom delu).

Deset jedinki vrste *Callipodella fasciata* prikupljeno je od septembra do novembra 2010. godine u stelji Drugovačke šume u blizini Smedereva.

#### 3.2.1.2. Familija Polydesmidae (Diplopoda, Polydesmida)

U periodu od septembra do novembra 2009. godine na lokalitetu Čarapićev brest na Avali prikupljen je veći broj jedinki različitih uzrasnih stupnjeva sledećih vrsta: *Polydesmus complanatus*, *Brachydesmus (Stylobrachydesmus) avalae* i *B. dadayi*. Osim

vrsta *B. avalae* i *B. Dadayi*, iz ovog roda ispitivana je još i vrsta *B. troglobius*. Tokom maja meseca 2010. godine, u Lazarevoj pećini, u selu Zlot, kod Bora (istočna Srbija), prikupljeno je deset mužjaka i isto toliko ženki ovog troglobionta.

### **3.2.1.3. Familija Polyzoniidae (Diplopoda, Polyzoniida)**

U okviru familije Polyzoniidae ispitivana je vrsta *Polyzonium germanicum*. Veći broj adultnih i juvenilnih jedinki prikupljen je u stelji ispred Sesalačke pećine (selo Sesalac kod Sokobanje), tokom proleća i jeseni 2010. godine.

### **3.2.1.4. Familija Julidae (Diplopoda, Julida)**

U okviru familije Julidae ispitivane su vrste iz četiri roda: *Julus*, *Cylindroiulus*, *Leptoiulus* i *Megaphyllum*. U maju 2011. godine, u Čarapićevom brestu na Avali, uzorkovano je po pet mužjaka i ženki vrste *Julus terrestris*. U periodu od septembra do novembra 2010. godine, na lokalitetu Drugovačka šuma u blizini Smedereva, sakupljeno je po 15 mužjaka i ženki vrsta *Cylindroiulus boleti*, *Leptoiulus trilineatus* i *Megaphyllum bosniense*. Pored vrste *M. bosniense* iz istog roda ispitivane su i vrste *M. austriacum* i *M. unilineatum*. U park–šumi Košutnjak u Beogradu, u oktobru 2010. godine, sakupljeno je po pet mužjaka i ženki vrste *M. austriacum*, dok je u oktobru 2011. godine na Avali, prikupljena jedna ženka vrste *M. unilineatum*.

### **3.2.1.5. Familija Glomeridae (Diplopoda, Glomerida)**

Tokom oktobra 2011. godine, na lokalitetu Izbice kod Novog Pazara sakupljeno je devet jedinki *Glomeris klugii*; po tri mužjaka, ženke i juvenilne jedinke.

### 3.2.2. Klasa Chilopoda

Ispitivane vrste stonoga iz klase Chilopoda razvrstavane su po uzrastu i po polovima. Jedinke su čuvane u plastičnim posudama (prečnika 20 cm, visine 10 cm, sa poklopcima koji su perforirani za ulazak vazduha), zajedno sa odgovarajućom količinom prirodnog materijala sa staništa (zemlja, stelja i humus). Stonoge su čuvane u laboratorijskim uslovima nekoliko dana na 10 °C u mraku, dok je vlažnost održavana prskanjem manje količine vode jednom dnevno.

#### 3.2.2.1. Familija Lithobiidae (Chilopoda, Lithobiomorpha)

U okviru familije Lithobiidae ispitivana je vrsta *Eupolybothrus transsylvanicus*. Po pet mužjaka i ženki prikupljeno je 26. oktobra 2010. godine u park–šumi Košutnjak u Beogradu.

#### 3.2.2.2. Familija Cryptopidae (Chilopoda, Scolopendromorpha)

Iz familije Cryptopidae ispitivali smo vrstu *Cryptops parisi*. Ukupno deset jedinki prikupljeno je 26. oktobra 2010. godine u park–šumi Košutnjak.

#### 3.2.2.3. Familija Linotaeniidae (Chilopoda, Geophilomorpha)

U okviru familije Linotaeniidae ispitivana je vrsta *Strigamia crassipes*. Jedinke ove vrste su prikupljene 10. jula 2011. ispred ulaza u Sesalačku pećinu (selo Sesalac kod Sokobanje).

#### **3.2.2.4. Familija Dignathodontidae (Chilopoda, Geophilomorpha)**

U blizini izvora Sakinac na Avali, u periodu april–maj 2011. godine, prikupljeno je po deset mužjaka i ženki vrste *Henia illyrica*. Dve jedinke ove vrste uzorkovane su u stelji ispred Sesalačke pećine kod Sokobanje, u maju 2012. godine.

#### **3.2.2.5. Familija Geophilidae (Chilopoda, Geophilomorpha)**

Kod izvora Sakinac na Avali, u periodu od oktobra 2010. do maja 2011. godine, prikupljen je veliki broj mužjaka i ženki vrste *Clinopodes flavidus*.

#### **3.2.2.6. Familija Himantariidae (Chilopoda, Geophilomorpha)**

Jedina analizirana vrsta iz klase Chilopoda koja je prikupljena izvan Srbije bila je *Himantarium gabrielis*. Trinaestog maja 2011. godine prikupljeno je po pet mužjaka i ženki sa lokaliteta Borovik, kod Cetinja, u Crnoj Gori.



### 3.3. Priprema uzoraka

#### 3.3.1. Priprema uzoraka uz pomoć vakuum cevčica sa aktivnim ugljem

Jedna ili više jedinki (u zavisnosti od veličine tela) se postavi u vegeglas odgovarajuće zapremine i iritira pincetom. Istovremeno se na vakuum poveže cevčica napunjena aktivnim ugljem koja se nastavlja na staklenu pipetu, čiji vrh se postavlja što bliže pinceti. Ovako sinhronizovanu radnju ponavljamo nekoliko minuta, nakon čega se vrši desorpcija u metilen–hloridu (1–3 ml) u trajanju od 15 minuta na ultra–zvučnom kupatilu. Posle ceđenja metilen–hloridni rastvor je spreman za analizu. Prednost ove tehnike je u tome što nije potrebno žrtvovati jedinke.

#### 3.3.2. Priprema uzoraka uz pomoć filter papira

Ovakva priprema uzorka je veoma slična pripremi uzorka uz pomoć vakuum cevčica, s tom razlikom što u ovom slučaju jedinku (ili jedinke) stavimo u vegeglas u koji smo prethodno dodali filter–papir iseckan na kvadratiće i dobro zatvorimo. Iritiranje se postiže energičnim mućkanjem. Posle oslobađanja jedinki, u vegeglas se sipa 1–3 ml odgovarajućeg rastvarača za desorpciju sa filter–papira.

#### 3.3.3. Ekstrakcija organskim rastvaračima

U zavisnosti od veličine jedinki, ekstrakcija se vrši sa nekoliko jedinki ili sa nekoliko desetina jedinki (istog pola ili uzrasnog stupnja), koje se ubace u šlifovani balon što manje zapremine i što je moguće većeg otvora (na primer, balon od 50 ml sa šlifom 29/32). Žrtvovanje je najbolje uraditi sa najmanjom mogućom zapreminom rastvarača (1–2 ml) u trajanju od 3 do 5 minuta. Nakon ekstrakcije, uzorke treba procediti kroz parče papirnate maramice namotane na staklenu pipetu. Ako je uzorak nedovoljno koncentrovan najbolje ga je upariti u blagoj struji azota i koncentrovati

maksimalno deset puta. Korišćeni su rastvarači: *n*-heksan, metilen-hlorid, metanol, deuterohloroform, acetonitril i DMSO. Za GC i GC-MS sa nepolarnim kolonama HP-5MS i HP-5MSI najbolje je koristiti *n*-heksan i metilen-hlorid, dok je za analize na polarnim INNOWAX kolonama najbolje koristiti metanol i acetonitril. Najbolji rastvarači za reverzno-faznu hromatografiju HPLC i LC-MS (C8 i C18 kolone) takođe su metanol i acetonitril. Prilikom pripreme uzoraka za NMR analize najbolje je koristiti deuterisane rastvarače za ekstrakciju. Uzorak se može pripremiti i u nedeuterisanom rastvaraču, koji se mora upariti u struji azota, a zatim rastvoriti u odgovarajućem deuterisanom rastvaraču.

#### **3.3.4. Derivatizacija jedinjenja iz odbrambenog sekreta–reakcija silanizovanja**

Jedinjenja prisutna u odbrambenom sekretu derivatizovana su pomoću reagensa za silanizovanje (rastvor BSTFA u acetonitrilu), pri čemu se dobijaju isparljivi trimetilsilil-(TMS) derivati. Reakcija silanizovanja je u stvari kombinovana sa ekstrakcijom celih jedinki u acetonitrilu. Jedinke su prvo žrtvovane u acetonitrilu (videti poglavlje 3.3.3. Ekstrakcija organskim rastvaračima), nakon čega je u 0,5 ml ekstrakta dodato 0,5 ml reagensa za silanizovanje u vijalicu od 2 ml. Reakcija je gotova posle jednočasovnog zagrevanja na 60 °C. Ovako pripremljene uzorke treba analizirati na gasnom fromatografu sa MS detektorom što je pre moguće, a najkasnije 6 časova nakon pripremanja. Reakciju silanizovanja smo koristili i za potvrdu strukture identifikovanih jedinjenja.

#### **3.3.5. Disekovanje vezikula i ekstrakcija organskim rastvaračima**

Najteži zadatak kod ovakve tehnike predstavlja pažljivo odvajanje vezikula od ostatka tkiva. Takođe, problem predstavlja i to što jedinka obično isprazni sadržaj vezikule pri prvom kontaktu. Da bi smo omogućili nesmetan rad sa jedinkama neophodno je da im se postepeno sniziti telesna temperatura. Nakon disekovanja, vezikule spajamo u jednu vijalicu i ekstahujemo odgovarajućim rastvaračem.

### 3.3.6. Detektovanje cijanovodonika

#### 3.3.6.1. Pikrinski test

Detektovanje cijanovodonika može se potvrditi kvalitativnom bojenom (test pot) reakcijom sa pikrinskom kiselinom<sup>84</sup>. Filter–papir se impregnira potapanjem u zasićen rastvor pikrinske kiseline posle čega se suši na vazduhu. Neposredno pre testa ovako pripremljen filter–papir se popraska 5% rastvorom natrijum–bikarbonata u vidu spreja. Odgovarajući broj jedinki postavimo na filter–papir dok je još vlažan, nakon čega ih preklopimo drugom polovinom filter papira i jako zgnječimo. Ako sekret sadrži HCN, deo filter–papira postepeno prelazi iz žute u narandžastu boju.

#### 3.3.6.2. Detektovanje cijanovodonika GC–MS tehnikom

Pored pikrinskog testa HCN se može detektovati i GC–MS, ali je pre svega potrebno da se podesi opseg snimanja od  $m/z$  10, ali i da se koristi zatvoren sistem; jedinke treba staviti u hermetički zatvorenu (zakrimpovanu) GC hedspejs vijalicu. Iritiranje se postiže energičnim mućkanjem. Za ručno injektiranje se koristi mikrošpric za injektiranje gasova. Takođe je neophodno snimati u split modu, bez obzira na nisku koncentraciju uzoraka. Najmanji split bi trebalo da bude 5:1, a poželjno je da bude i više od 7:1. U slučaju otežane detekcije (na primer, preklapanjem sa pikom vazduha), iz ukupne jonske struje potrebno je ekstrahovati jon na vrednosti  $m/z$  27 i tako dobijen maseni spektar uporediti sa bibliotekom spektara.

### 3.3.7. Detektovanje proteinskog dela odbrambenih sekreta

#### 3.3.7.1. Bradford–ov test

Nerastvorni deo odbrambenog sekreta dobijen ekstrakcijom organskim rastvaračem analiziran je Bradford–ovim testom<sup>123</sup>. Talog se ispira tri puta u organskom

rastvaraču u kome je nastao, da bi se posle sušenja u struji azota ubacio u 1 ml test rastvora (60 mg CBB\* po litru 3% perhlorne kiseline). Ovako pripremljen uzorak meša se na vorteksu nakon čega se greje 15 min na 50 °C. Pojava plave boje na talogu ili plavičaste boje celog rastvora (u odnosu na 1 ml Bradford–ovog rastvora) pozitivna je reakcija na proteinsku strukturu. Ovo je preliminarni test, dok je za potpunu potvrdu potrebno uraditi dodatne testove.

### 3.3.7.2. Bojeni test na nitroceluloznoj membrani

Za razliku od pripreme uzorka za Bradford–ov test, kod ovog eksperimenta je korišćena nitrocelulozna membrana postavljena direktno na Bihnerov levak odgovarajuće veličine koji je priključen na vakuum. Jedinka ili više njih se postavi na ovu membranu i onda se pinsetom jedinke uznemiruju. U slučaju da jedinke imaju proteinsku zaštitu, sekret koji se izlučuje ostaje na nitroceluloznoj membrani. Bojenjem sekreta i nitrocelulozne membrane u crveno pomoću Poncho S reagensa dokazuje se proteinska priroda sekreta; u protivnom sekret nije proteinske prirode.

### 3.3.7.3. SDS elektroforeza<sup>†</sup>

Deo odbrambenog sekreta nerastvoran u organskom rastvaraču, analiziran je elektroforezom<sup>124</sup>. Dobijeni talog se rastvori u 1 ml PUZ–a<sup>‡</sup> (vodeni rastvor koji sadrži 0,0625 M Tris HCl, 10% glicerol, 0,002% bromfenol–plavo i 5%  $\beta$ –merkaptotanol), centrifugira i procedi. Prethodno se pripremi akrilamidni gel za razdvajanje koji se nanese u kadicu za elektroforezu, preko koga se doda rastvor za nadslojavanje (2–butanol ili *n*–butanol zasićen vodom). Nakon završetka polimerizacije rastvor za nadslojavanje se zameni dezaerisanim rastvorom za koncentrovanje (0,5 M Tris HCl pH 6,8) u koji se postavi teflonski kalup za uzorke. Nakon završetka polimerizacije uzorci se nanose u nastale proreze u gelu. Na polimerizovanom 12% akrilamidnom gelu u jedan od položaja nanose se molekularni markeri (14,4 kDa lizozim, 185,4 kDa  $\beta$ –laktoglobulin, 25 kDa Rease Bsp 98I, 35 kDa laktat dehidrogenaza, 45 kDa ovalbumin, 66,2 kDa BSA, 116 kDa  $\beta$ –galaktozidaza).

Pufer za elektroforezu (0.025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS pH 8,3) sipa se

\* Coomassie Brilliant Blue G–250

<sup>†</sup> Drugi naziv je SDS–PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyacrylAmide Gel Electrophoresis)

<sup>‡</sup> Pufer za obradu uzoraka.

u kadu i podesi se napon na 80 V, sve dok uzorci ne uđu u gel za razdvajanje, a potom se poveća na 150 V i tako se ostavi do kraja elektroforeze. Elektroforeza se prekida kada boja stigne na 1 cm od kraja gela. Gel je po završetku elektroforeze najpre ispran destilovanom vodom (1 min), zatim zasečen ispod prvog bunarića na ploči i fiksiran 20 min u vodenom rastvoru 50% metanola i 10% sirćetne kiseline. Rastvor za bojenje (0,1% CBB\*, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina) koristi se 20 min, a za obezbojavanje se koristi isti rastvor kao i za fiksiranje, takođe u trajanju od 20 min. Ovako dobijen gel se može čuvati nekoliko godina u 7% sirćetnoj kiselini u hermetički zatvorenoj posudi.

---

\* Coomassie Brilliant Blue G-250.

### 3.4. Pravljenje biblioteke masenih spektara identifikovanih jedinjenja

Biblioteka masenih spektara pravljena je u programu AMDIS 32\*. Nakon kompletne identifikacije jedinjenja, korišćenjem komercijalnih biblioteka, literature, drugih tehnika (CI-MS, LC-DAD, LC-MS i NMR) i na kraju evaluacije podataka, pristupa se unosu odgovarajućeg masenog spektra u novo-formiranu biblioteku. Željeni maseni spektar je neophodno prečistiti, kako bi se uklonili svi pozadinski joni (joni primese). Svako jedinjenje je poželjno okarakterisati sa bar tri masena spektra, po mogućstvu iz različitih analiza. U biblioteku, pored masenog spektra, treba uneti i molekulsku formulu, spisak sinonima, uslove snimanja. Svi maseni spektri koje smo sačuvali u biblioteci, snimljeni su po istom hromatogramskom programu<sup>†</sup> koristeći zaključanu RTL metodu, tako da je za svako jedinjenje u biblioteku uneto i njegovo retenciono vreme ( $R_t = \text{min}$ ). Pored retencionog vremena unete su i vrednosti retencionih indeksa (RI) dobijenih na osnovu retencionih vremena parnih *n*-alkana od C<sub>8</sub> do C<sub>26</sub>. Biblioteka sadrži preko 100 spektara i više od 50 jedinjenja. Sva jedinjenja koja se nalaze u biblioteci masenih spektara su jedinjenja koja su okarakterisana u odbrambenim sekretima analiziranih taksona ili jedinjenja koja predstavljaju njihove TMS-derivate.

---

\* AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System)

<sup>†</sup> Metoda QC test: rad pri konstantnom pritisku (1,6 ml/min na 40 °C); 40°C (1 min) – 300 °C (10 °C/min), 300 °C (8 min)

### 3.5. Spektralni podaci identifikovanih jedinjenja

Najznačajniji spektralni podaci identifikovanih jedinjenja iz klase Diplopoda: EI-MS i CI-MS podaci navode se u formatu  $m/z$  (intenzitet).

Jedinjenje **D1** fenol; EI-MS: 94 (100), 66 (39), 65 (27), 39 (24), 40 (11), 38 (9), 55 (8), 63 (7), 95 (7), 50 (6),

Jedinjenje **D2** *p*-krezol (*p*-metilfenol), EI-MS: 107, (100), 108 (88), 77 (21), 79 (18), 90 (9), 53 (8), 80 (8), 51 (8), 39 (7), 109 (7)

Jedinjenje **D3** *p*-etilfenol; EI-MS: 107 (100), 122 (25), 77 (23), 108 (7), 91 (7), 39(7), 65 (6), 51 (6), 63 (5), 78 (5)

Jedinjenje **D4** benzaldehid; EI-MS: 77 (100), 106 (94), 105 (94), 51 (38), 50 (19), 78 (14), 52 (9), 107 (7), 74 (6), 39 (6), RI (HP-5MSI) 955

Jedinjenje **D5** benzil-alkohol; EI-MS: 79 (100), 108 (89), 107 (69), 77 (55), 51 (22), 91 (19), 78 (11), 50 (10), 39 (10), 80 (9)

Jedinjenje **D6** benzoil-nitril (2-okso-2-fenilacetonitril); EI-MS: 105 (100), 77 (69), 131 (64), 51 (34), 50 (18), 103 (14), 76 (12), 106 (8), 132 (6), 74 (5), RI (HP-5MSI) 1100, CI-MS (*i*-BuH),  $[M+H]^+$  132 (32), 105 (100), 106 (11), 133 (5)

Jedinjenje **D7** benzil-metil-eton; EI-MS: 43 (100), 91(60), 134 (18), 92 (16), 65 (14), 39 (13), 63 (7), 51 (6), 89 (4), 50 (3)

Jedinjenje **D8** benzoeva kiselina; EI-MS: 105 (100), 122 (96), 77 (87), 51 (59), 50 (32), 106 (15), 78 (13), 39 (11), 74 (11), 76 (11)

Jedinjenje **D9** benzil–etil–keton; EI–MS: 57 (100), 91 (37), 29 (33), 148 (12), 65 (10), 92 (9), 39 (5), 58 (4), 27 (3), 63 (3)

Jedinjenje **D10** mandelonitril (2–hidroksi–2–fenilacetonitril); EI–MS: 105 (100), 77 (94), 106 (89), 27 (38), 51 (38), 78 (20), 50 (17), 133 (17), 132 (11), 52 (10)

Jedinjenje **D11** mandelonitril–benzoat; EI–MS: 105 (100), 77 (91), 116 (49), 89 (48), 51 (46), 63 (17), 39 (17), 115 (12), 237 (11), 90 (10); CI–MS (*i*–BuH), [M+H]<sup>+</sup> 238 (100), 105 (60), 116 (49), 239 (45), 211 (30), 188 (11)

Jedinjenje **D12** cijanovodonik; EI–MS: 27 (100), 26 (17), 12 (4), 13 (2), 14 (2), 28 (2); <sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,71 ppm (1H, s), <sup>13</sup>C NMR δ 108 i <sup>15</sup>N NMR δ 258,7 ppm

Jedinjenje **D13** polizonimin (alkaloid **151B**); EI–MS: 82 (100), 95 (64), 81 (53), 96 (37), 136 (36), 80 (33), 41 (26), 108 (24), 67 (22), 94 (19)

Jedinjenje **D14** *O*–metil–spiropirolizin oksim; EI–MS: 82 (100), 83 (6), 190 (5), 91 (4), 55(3), 236 (3), 80 (3), 107 (3), 93 (26), 77 (26)

Jedinjenje **D15** nitropolizonamin; EI–MS: 82 (100), 122 (10), 108 (7), 192 (7), 83 (7), 191 (6), 165 (6), 41 (5), 55 (5), 129 (4)

Jedinjenje **D16**; 7–acetoksi nitropolizonamin; EI–MS: 82 (100), 190 (9), 164 (9), 43 (7), 83 (6), 122 (5), 249 (4), 55 (3), 80 (3), 95 (3)

Jedinjenje **D17**; 1,4–benzohinon; EI–MS: 110 (100), 82 (34), 81 (23), 53 (22), 52 (14), 55 (11), 109 (9), 111 (7), 50 (6), 51 (4)

Jedinjenje **D18**; 2–metil–1,4–benzohinon (toluhinon); EI–MS: 122 (100), 94 (77), 82 (61), 54 (54), 66 (48), 68 (35), 40 (24), 53 (18), 65 (17), 67 (7); RI (HP–5MSI) 1022, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR podaci prikazani su u **tabeli 2.5**.



Jedinjenje **D19**; 2–hidroksi–3–metil–1,4–benzohinon; EI–MS: 138 (100), 82 (29), 55 (18), 54 (17), 81 (14), 53 (12), 83 (11), 110 (10), 139 (8), 56 (8); RI (HP–5MSI) 1127

Jedinjenje **D20**; 2–metoksi–3–metil–1,4–benzohinon; EI–MS: 152 (100), 122 (45), 66 (28), 53 (27), 109 (26), 83 (20), 54 (19), 82 (18), 81 (16), 151 (12); RI (HP–5MSI) 1191,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci prikazani su u **tabeli 2.5**.

Jedinjenje **D21** hidrohion; EI–MS: 110 (100), 82 (34), 81 (23), 53 (23), 52 (14), 55 (11), 109 (9), 111 (7), 50 (6), 51 (43); RI (HP–5MSI) 1232,

Jedinjenje **D22**; 2,3–dimetoksi–1,4–benzohinon; EI–MS: 123 (100), 168 (78), 69 (47), 153 (37) 82 (29), 54 (26), 125 (16), 95 (13), 97 (10), 53 (9); RI (HP–5MSI) 1322,

Jedinjenje **D23**; 2–metilhidrohion; EI–MS: 124 (100), 123 (43), 95 (18), 67 (10), 77 (10), 107 (95), 78 (8), 125 (8), 67 (7), 55 (6); RI (HP–5MSI) 1344,

Jedinjenje **D24**; 2–metoksi–5–metilhidrohion; EI–MS: 69 (100), 152 (60), 122 (41), 53 (27), 109 (24), 154 (19), 68 (18), 66 (17), 40 (16), 139 (11); RI (HP–5MSI) 1350,

Jedinjenje **D25**; 2,3–dimetoksihidrohion; EI–MS: 170 (100), 155 (46), 112 (25), 109 (25), 127 (10), 171 (9), 55 (8), 81 (7), 123 (7), 69 (6); RI (HP–5MSI) 1373

Jedinjenje **D26**; 2–metil–3,4–metilenedioksifenol; EI–MS: 152 (100), 151 (88), 121 (13), 66 (9), 153 (9), 65 (8), 67 (5), 94 (5), 93 (4), 53 (4); RI (HP–5MSI) 1390

Jedinjenje **D27**; 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohinon; EI-MS: 1037 (100), 182 (65), 83 (54), 167 (35), 184 (24), 68 (23), 40 (21), 69 (21), 169 (18), 96 (12); RI (HP-5MSI) 1420

Jedinjenje **D28**; 2-metoksi-3-metilhidrohinon; EI-MS,  $m/z$  (intenzitet): 154 (100), 139 (73), 111 (59), 65 (11), 155 (9), 55 (7), 140 (6), 110 (6), 53 (5), 82 (4); RI (HP-5MSI) 1425

Jedinjenje **D29**; 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohinon; EI-MS: 184 (100), 169 (76), 123 (16), 69 (13), 185 (10), 154 (10), 141 (10), 170 (7), 137 (6); RI (HP-5MSI) 1455

Jedinjenje **D30** glomerin; EI-MS: 104 (100), 174 (85), 105 (75), 133 (50), 78 (27), 77 (24), 132 (12), 63 (10), 175 (9), 64 (8), RI (HP-5MSI) 2509, HR-MS podaci su prikazani u **tabeli 2.7.**; NMR podaci su prikazani u **tabeli 2.9.**

Jedinjenje **D31** homoglomerin; EI-MS: 188 (100), 104 (65), 105 (59), 187 (32), 77 (18), 78 (17), 189 (13), 133 (12), 160 (12), 132 (9), RI (HP-5MSI) 2542, HR-MS podaci su prikazani u **tabeli 2.8.**; NMR podaci su prikazani u **tabeli 2.9.**

Jedinjenje **H1** videti *jedinjenje D12* cijanovodonik.

Jedinjenje **H2**; 2-metilpentanska kiselina; EI-MS: 74 (100), 43 (26), 87 (19), 73 (16), 41 (15), 55 (9), 71 (7), 56 (6), 42 (4), RI (HP-5MSI) 945

Jedinjenje **H3** videti *jedinjenje D4* benzaldehid.

Jedinjenje **H4** videti *jedinjenje D6* benzoil-nitril.

Jedinjenje **H5** benzil-nitril (2-fenilacetonitril); EI-MS: 117 (100), 116 (40), 90 (37), 89 (23), 118 (9), 63 (8), 51 (7), 91 (7), 77 (5), 50 (5)

Jedinjenje **H6**; 2-metiloktanska kiselina; EI-MS: 74 (100), 85 (99), 87 (60), 43 (59), 41 (35) 69 (31), 73 (31), 55 (26), 115 (26), 57 (19), RI (HP-5MSI) 1178

Jedinjenje **H7**; metil 2-fenilacetat; EI-MS: 91 (100), 150 (43), 65 (11), 92 (8), 89 (5), 151 (4), 63 (4), RI (HP-5MSI) 1187

Jedinjenje **H8** videti jedinjenje **D10** mandelonitril.

Jedinjenje **H9** videti jedinjenje **D11** mandelonitril-benzoat.

Jedinjenje **H10**; 3,7,6-*O*-trimetilguanin (himantarin); EI-MS: 193 (100), 164 (18), 67 (15), 109 (12), 82 (12), 55 (11), 194 (10), 110 (10), 138 (8), 42 (8), RI (HP-5MSI), NMR podaci su prikazani u tabeli **2.18**.

Jedinjenje **H11**; (9*Z*)-eikozen-1-ol; EI-MS: 82 (100), 96 (88), 43 (79), 55 (75), 81 (67), 67 (61), 95 (60), 69 (56), 83 (49), 68 (41), RI (HP-5MSI)

Jedinjenje **H12**; farnezil-2,3-dihidrofarnesoat; EI-MS: 69 (100), 81 (29), 41 (28), 93 (22), 237 (21), 109 (17), 95 (13), 67 (13), 123 (11), 121 (10), CI-MS (*i*-BuH): [M+H]<sup>+</sup> 443 (14), 205 (100), 157 (85), 239 (64), 221 (58), 123 (30), 183 (29), 137 (29), 81 (27), 237 (25), 149 (24), RI (HP-5MSI), <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 5.34 (tq, *J*=7.2, 1.3 Hz, 2'); 5.09 (m, 6, 10, 6', 10'); 4.59 (br d, *J*=7.2 Hz, 1'); 2.32 (dd, *J*=14.6, 5.9 Hz, 2α); 2.11 (dd, *J*=14.6, 8.3 Hz, 2β); 2.16 (dd, *J*=14.6, 5.9 Hz, 2α); 2.05 (br t, *J*=7.2 Hz, 5, 9, 5', 9'); 1.97 (br t, *J*=7.2 Hz, 3, 8, 4', 8'); 1.70 (br s, 15'); 1.68 (br s, 12,12'); 1.60 (br s, 13, 14, 13', 14'); 1.35 (m, 4α); 1.35 (m, 4β); 0.94 (d, *J*=6.7 Hz).

Jedinjenje **H13**; farnezil-farnesoat; EI-MS: 69 (100), 41 (36), 93 (35) 81 (33), 80 (20), 107 (4), 121 (13), 55 (13), 95 (3), 82 (13); CI-MS (*i*-BuH): [M+H]<sup>+</sup> 441 (4), 205 (100), 237 (83), 137 (79), 191 (72), 219 (50), 109 (33), 123 (30), 81 (28), 155 (28), 149 (25), RI (HP-5MSI), <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 5.68 (br s, 2); 5.37 (tq, *J*=7.2, 1.3 Hz, 2'); 5.10 (m, 6, 10, 6', 10'); 4.61 (br d, *J*=7.2 Hz,

1'); 2.16 (d,  $J=1.2$  Hz, 15); 2.15 (m, 4); 2.05 (br t,  $J=7.2$  Hz, 5, 9, 5', 9'); 1.97 (br t,  $J=7.2$  Hz, 8, 4', 8'); 1.71 (br s, 15'), 1.68 (br s, 12,12'); 1.60 (br s, 13, 14, 13', 14').

## 4. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bilo je ispitivanje hemijskog sastava odbrambenih sekreta odabranih stonoga koje pripadaju klasama Diplopoda i Chilopoda, koje naseljavaju prostor Balkanskog poluostrva. Ukupno je analizirano petnaest diplopodnih i šest hilopodnih epigejskih i hipogejskih (uključujući i kavrenikolne forme) vrsta. Ovom kompleksnom studijom su obuhvaćeni taksoni koji pripadaju različitim rodovima i familijama, ali su analizirani i pripadnici istog roda u cilju utvrđivanja potencijalnih intra- i interspecijskih razlika u sastavu odbrambenog sekreta. Pored toga, analizirani su i proteinski delovi sekreta kod svih vrsta koje su imale takvu vrstu zaštite.

Smatramo da su rezultati naših radova značajni iz više razloga. Na lokalnom nivou posmatrano, određen je sastav odbrambenih sekreta dvadeset i jedne vrste stonoga od preko 120 opisanih vrsta koje su do danas registrovane na teritoriji Srbije. Na osnovu ovih rezultata u ovoj multidisciplinarnoj oblasti u školskoj 2012–13. godini osnovan je i novi predmet na osnovnim akademskim studijama na Biološkom fakultetu u Beogradu, koji se upravo bavi hemijskom ekologijom životinja.

Na globalnom nivou skrenuta je pažnja na evropske vrste stonoga, koje su do sada analizirane u samo nekoliko studija, naspram većeg broja studija koje se bave analizama stonoga iz Azije i Severne Amerike. Identifikovano je nekoliko novih jedinjenja i potpuno novih prirodnih proizvoda. Rezultati ove disertacije u delu identifikacije odbrambenih jedinjenja kod stonoga, poslužili su i drugim evropskim istraživačkim grupama kao polazna osnova za njihove analize i identifikacije, tako što su ponovili analize odbrambenih sekreta vrsta koje su analizirane u našim radovima. Ovakva reproduktivnost rezultata je veoma dobar dokaz da se kroz identifikaciju odbrambenih supstanci može pratiti hemotaksonomija kod stonoga.

Posebno mesto u našim radovima zauzima analiza odbrambenih sekreta hilopoda. Prema raspoloživim literaturnim podacima odbrambene supstance su analizirane kod samo desetak vrsta ove klase stonoga. Značaj naših rezultata koji se odnose na hemiju hilopoda proističe iz činjenice da (za razliku od diplopoda) u ovoj oblasti nije bilo napretka u poslednjih nekoliko decenija. Pored toga, po prvi put su pronađena necijanogena jedinjenja u isparljivom delu sekreta. Takođe, potvrđena je

postsekretska reakcija otpuštanja cijanovodonika i izneta pretpostavka da proteinski deo sekreta može, pored mehaničke zaštite, imati i funkciju medijuma za produženo odbrambeno dejstvo sekreta. Izdvojeni cijanovodonik rastvarao se u deuterohlorofomu, u samoj NMR kiveti u zamrzivaču, nakon čega je detektovan pomoću  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  NMR tehnika, što može da posluži kao početni eksperiment za potencijalnu detekciju cijanovodonika kao lako isparljivog hemijskog oružja u deuterohloroformu na niskim temperaturama.

Proteinski sastav odbrambenih sekreta analiziran je elektroforezom. Primećene su intergeneričke, interspecijske, ali i intraspecijske razlike (kod vrste *Henia illyrica*). Smatramo da ovi rezultati zavređuju pažnju, ali i da otvaraju prostor novim opsežnijim istraživanjima, koja bi trebalo da uključe i savremenije tehnike instrumentalne analize proteinske komponente sekreta, koja je do sada bila dosta zanemarena. Takođe, nastavak ovih istraživanja treba da se bazira na ispitivanju uloge novih prirodnih proizvoda, metaboličkih puteva, ali i potencijalne primene ovih jedinjenja.

Na kraju, naši radovi predstavljaju pionirske korake u hemijskoj ekologiji životinja u Srbiji, ali su i produbili mnoge zanimljive teme kojima se do sada bavila ukupna naučna javnost i otvorili nove, kojima će se zasigurno baviti u budućnosti.

## 5. LITERATURA

1. Fauna Europaea 2011 (verzija 2.4). Internet servis dotupan na adresi <http://www.faunaeur.org> poslednji put pristupljeno stranici 02.02.2013. god.
2. Gronquist M., Schroeder F., (2010) Insect Natural Products u Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, ed. Mander L., i Liu H–W., Elsevier Science, Vol. 2., 67–108.
3. V. Novotny, S. E. Miller, J. Hulcr, R. A. Drew, Y. Basset, M. Janda, G. P. Setliff, K. Darrow, A. J. Stewart, J. Auga, B. Isua, K. Molem, M. Manumbor, E. Tamtiai, M. Mogia, G. D. Weiblen, Low beta diversity of herbivorous insects in tropical forests, *Nature* 2007, 448 (7154), 692–95.
4. Eisner T., Eisner M., Siegler M., (2005) Secret weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many–legged creatures. Harvard University Press, Cambridge,
5. Mika Zagrobelny, Soren Bak, Anne Vinther Rasmussen, Bodil Jørgensen, Clas M. Naumann, Birger Lindberg Miller, Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions, *Phytochemistry* 2004, 65, 293–306
6. Mika Zagrobelny, Soren Bak, Birger Lindberg Miller, Cyanogenesis in plants and arthropods, *Phytochemistry* 2008, 69, 1457–1468
7. Kuwahara, Y., Shimizu, N. i Tanabe, T. Release of Hydrogen Cyanide via a Post–secretion Schotten–Baumann Reaction in Defensive Fluids of Polydesmoid Millipedes. *Journal of Chemical Ecology* 2011, 37, 232–238.
8. Schmid O., Dani R., Jones R., i Morgan E., Chemistry, ontogeny, and rolr of pygidial gland secretion of the vinegaroon *Mastigoproctus giganteus* (Arachnida: Uropygi) *Journal of Insect Physiology* 2000, 46, 443–50.
9. Eisner T., Meinwald J., Montr A., i Ghent. R., Defense mechenisms of arthropods. I: The composition and function of spray of the vinegaroon *Mastigoproctus giganteus* (Lucas) (Arachnida: Pedipalpida), *Journal of Insect Physiology* 1961, 6, 272–98.

- 
10. Athula B. Attygalle, Xiaogang Wu, Josef Ruzicka, Sheetal Rao, Silvina Garcia, Kithsiri Herath, Jerrold Meinwald, David R. Maddison, I Kipling W. Will. *Journal of Chemical Ecology* 2004, 30, 3, 577-588.
  11. Davidson, B.S., Eisner, T., Witz, B., and Meinwald, J., Defensive secretion of the carabid beetle, *Pasimachus subsulcatus*. *Journal of Chemical Ecology* 1989, 15, 1689–1697.
  12. Roach B., Eisner T., i Meinwald J., Defense mechanisms of arthropods. 83. alpha- and beta-necrodol, novel terpenes from a carrion beetle (*Necrodes surinamensis*, Silphidae, Coleoptera). *J. Org. Chem.* 1990, 55, 4047–4051.
  13. Meinwald, J., Meinwald, Y.C., Chalmers, A.M. i Eisner, T., Dihydromatricaria acid: acetylenic acid secreted by soldier beetle. *Science*, 1968, 160, 890–892.
  14. Eisner T., Schroeder F., Snyder N., Grant J, Aneshansley D., Utterback D, Meinwald J., i Eisner M., Defensive chemistry of lycid beetles and of mimetic cerambycid beetles that feed on them, *Chemoecology* 2008, 18, 109-119.
  15. Miller J.J. i Feeny P.P., Interspecific differences among swallowtail larvae (Lepidoptera: Papilionidae) in susceptibility to aristolochic acids and berberine. *Ecol. Entomol.* 1989, 14, 287–296.
  16. Eisner T., Nowicki S., Goetz M., Meinwald, J., Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature, *Science* 1980, 208(4447), 1039-42,
  17. Eisner, T., Attygalle A.B., Conner W.E., Eisner M., MacLeod E., i Meinwald J., Chemical egg defense in a green lacewing (*Ceraeochrysa smithi*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Ecology* 1996, 93, 3280-83.
  18. Eisner T., D. Alsop i Meinwald J., (1978) Secretions of opilionids, whip scorpions, and pseudoscorpions, u *Arthropod venom* ed. Bettini S., Berlin: Springer-Verlag.
  19. Eisner T., Alsop D., Hicks K., i Meinwald J., (1978) Defensive secretions of millipedes, in *Arthropod venoms: Handbook of experimental pharmacology* ed. S. Bettini, Springer-Verlag, Heidelberg–Berlin 48, 41–72.
  20. Meinwald J. i Eisner T., Naphthoquinones in defensive secretion of an opilionid, *Experientia* 1978, 34, 969–970.
  21. W. R. Tschinkel, *J. Insect Physiol.* 1972, 18, 711–722.



- 
22. G. Bringmann, T. F. Noll, T. A. Gulder, M. Grune, M. Dreyer, C. Wilde, F. Pankewitz, M. Hilker, G. D. Payne, A. L. Jones, M. Goodfellow, H. P. Fiedler, *Nat. Chem. Biol.* 2006, 2, 429–433.
23. J. Meinwald, M. S. Chadha, J. J. Hurst, I. Eisner, *Tetrahedron Lett.* 1962, 3, 29–33.
24. . McCormick P., Carrel J. E., Doom J. P., Origin of oxygen atoms in cantharidin biosynthesized by beetles, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 8071–74.
25. Moed L, Shwayder TA, Chang MW, Cantharidin revisited: a blistering defense of an ancient medicine. *Arch Dermatol.* 2001, 137(10), 1357-60.
26. Eisner T., Smedley S., Young D., Eisner M., Roacht B. i Meinwald J., Chemical basis of courtship in a beetle (*Neopyrochroa flabellata*): Cantharidin as precopulatory "enticing" agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Ecology*, 1996, 93, 6494–98.
27. Eisner T., Smedley S., Young D., Eisner M., Roacht B. i Meinwald J., Chemical basis of courtship in a beetle (*Neopyrochroa flabellata*): Cantharidin as "nuptial gift" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Ecology*, 1996, 93, 6499–03.
28. Eisner, T., Kluge A.F., Ikeda M. I., Meinwald Y. C., i Meinwald J., Sesquiterpenes in the osmeterial secretion of a papilionid butterfly, I *Battus polydamas*, *Journal of Insect Physiology* 1971, 17: 245–50.
29. Hartmann T., i Ober D., Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores, *Topics in Current Chemistry* 2000, 209, 207–43.
30. Leclercq S., de Biseau J. C., Daloze D., Braekman J. C., Quinet Y. i Pasteels J. M., Five new furanocembrenoids from the venom of the ant *Crematogaster brevispinosa ampla* from Brazil, *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 633–637.
31. Leclercq S., de Biseau J. C., Braekman J. C., Daloze D., Quinet Y., Luhmer M., Sundin A. i Pasteels J. M., Furanocembranoid diterpenes as defensive compounds in the Dufour gland of the ant *Crematogaster brevispinosa rochai*, *Tetrahedron* 2000, 56, 2037–2042.
32. Lokensgard, J., Smith R., Eisner T. i Meinwald J., Pregnans from defensive glands of belostomatid bug. *Expertientia* 1993, 49, 175–176.

- 
33. Gronquist M., Schroeder F.C., Ghiradella H., Hill D. McCoy E. M., Meinwald, J. i Eisner T., Shunning the night to elude the hunter: diurnal fireflies and the “femmes fatales”, *Chemoecology* 2006, 16, 39–43.
34. Laurent P., Braekman J. C., Dalozé D. i Pasteels J., An ecdysteroid (22–acetyl–20–hydroxyecdysone) from the defense gland secretion of an insect: *Chrysolina carnifex* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Chemoecology* 2003, 13, 109–111.
35. J. Ghostin, J. L. Habib–Jiwan, R. Rozenberg, D. Dalozé, J. M. Pasteels, J. C. Braekman, *Naturwissenschaften* 2007, 94, 601–605.
36. M. F. Braconnier, J. C. Braekman, D. Dalozé, J. M. Pasteels, *Experientia* 1985, 41, 519–520. (155).
37. S. F. Wang, J. C. Braekman, D. Dalozé, J. M. Pasteels, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 1996, 105, 483–487 (157).
38. Tursch, B., Dalozé, D., Dupont, M., Pasteels, J. M., Tricot, M.C. *Experientia* 1971, 27, 1380–1381.
39. Angela King i Meinwald, *Chem. Rev.* 1996, 96, 1105–1122
40. 159. T. F. Spande, P. Jain, H.M. Garraffo, L. K. Pannell, H. J. C. Yeh, J. W. Daly, S. Fukumoto, K. Imamura, T. Tokuyama, J. A. Torres, R. R. Snelling, T. H. Jones, *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 5–21.
41. M. Timmermans, J. C. Braekman, D. Dalozé, J. M. Pasteels, J. Merlin, J. P. Declercq, *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 1281–1284.
42. 190. P. Laurent, J. C. Braekman, D. Dalozé, J. M. Pasteels, *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 7465–7467.
43. A. E. Taggi, J. Meinwald, F. C. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 10364–10369.
44. P. Sierwald i J.E. Bond. Current Status of the Myriadop Class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic Diversiti and Philogeny, *Annu. Rev. Entomol.* 2007, (52) 401–420.
45. Carcamo HA, Abe TA, Prescott CE, Holl FB, Chanway CP, Influence of millipedes on litter decomposition, N mineralization, and microbial communities in a coastal forest in British Columbia, Canada. *Can. J. For. Res.* 2000, 30(5),817–26.

- 
46. Makarov S., Čurčić B., Tomić V., Legakis A., (2004) The Diplopods of Serbia, Montenegro, and the Republic of Macedonia, Monographs IX, Institute of Zoology, University of Belgrade, Belgrade–Athens.
47. Golovatch S., i Kim D., Millipede (Diplopoda) distributions: A review, *Soil Organisms* 2009, 81, 3, 565-597.
48. Edgecombe, G. D., i Giribet, G., Evolutionary biology of centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Annual Review of Entomology* 2007, 52, 151–170.
49. Eisner, T., Hurst J. i Meinwald J., Defense mechanisms of arthropods. XI. The structure, function and phenolic secretions of the glands of chordeumoid millipede and a carabid beetle. *Psyche* 1963, **70**: 94–116.
50. Tellez M., Khan I., Kobaisy M., Schrader K., Dayan F. i Osbrink W., Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.) *Phytochemistry* 2002, 61, 149-155.
51. Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., Bello, J. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona, *Food Res. Int.* 2001, 34, 67-75.
52. Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek Paeonia taxa J. *Ethnopharmacol.* 2002, 81, 101-104.
53. Radulović N., Đorđević A., Zlatković B. i Palić R., GC-MS analyses of flower ether extracts of *Prunus domestica* L. and *Prunus padus* L. (Rosaceae). *Chemical Papers* 2009, 63, 4, 377-384.
54. Robacker, D.C. i Bartelt, R.J. Chemicals attractive to Mexican fruit fly from *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii* cultures sampled by solid-phase microextraction. *J. Chem. Ecol.* 1997, 23, 2897-2915
55. Buchin, S., Salmon, J.C., Carnat, A.P., Berger, T., Bugaud, C., Bosset, J.O., Identification de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et benzéniques dans un lait d'alpage très riche en ces substances, *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.*, 2002, 93, 199-216.
56. Daly J., Garraffo M., Jain P., Spande T., Snelling R., Jaramillo C., i Rand S., Arthropod–frog connection: decahydroquinoline and pyrrolizidine alkaloids common to microsympatric myrmicine ants and dendrobatid frogs, *Journal of Chemical Ecology* 2000, 26, 1, 73-85.

- 
57. Miyamura, H., Shiramizu, M., Matsubara, R., i Kobayashi, S., Aerobic oxidation of hydroquinone derivatives catalyzed by polymer-incarcerated platinum catalyst, *Angew. Chem. Int.Ed.* 2008, 47, 8093–8095.
58. Gonzáles, R., Gabarotti, C., Liguori, L., i Bjørsvik, H. 2006. An efficient and green telescoped process to 2-methoxy-3-methyl-[1,4]benzoquinone. *J. Organ. Chem.* 2006, 71, 1703–1706.
59. Grzybowski J., Lamparczyk H., Nasal A., i Radecki A., Relationship between the retention indices of phenols on polar and non-polar stationary phases. *Journal of Chromatography* 1980, 196, 217-223.
60. Wu X., Buden D., i Attygalle A., Hydroquinones from defensive secretion of a giant Pacific millipede, *Acladocricus setigerus* (Diplopoda: Spirobolida), *Chemoecology* 2007, 17: 131–38.
61. H. Schildknecht, U. Maschwitz i W. F. Wenneis, Neue Stoffe aus dem Wehrsekret der Diplopodengattung *Glomeris*, *Über Arthropoden-Abwehrstoffe. XXIV*, *Naturwissenschaften* 1967, 54, 196-7.
62. William A. Shear, Tappey H. Jones, Thomas Wesener *Glomerin* and homoglomerin from the North American pill millipede *Onomeris sinuata* (Loomis, 1943) (Diplopoda, Pentazonia, Glomeridae), *International Journal of Myriapodology* 2011, 4, 1–10
63. Hopkin, S. P. i H. J. Read (1992): *The Biology of Millipedes.* – Oxford University Press, Oxford.
64. W.A. Shear , T.H. Jones , H.M. Miras, A possible phylogenetic signal in milliped chemical defenses: The polydesmidan milliped *Leonardesmus injucundus* Shelley & Shear secretes *p*-cresol and lacks a cyanogenic defense (Diplopoda, Polydesmida, Nearctodesmidae), *Biochemical Systematics and Ecology* 2007, 35, str. 838–42.
65. Hoffman, R. L. 1980. *Classification of the Diplopoda.* Museum d’Histoire Naturelle, Geneve.
66. Stoev, P., Sierwald, P., i Billey, A. An annotated world catalog of the millipede order Callipodida (Arthropoda: Diplopoda), *Zootaxa* 2008, 1706, str. 1–50.

- 
67. Čurčić B., Makarov S., Tešević V., Jadranin M., Vujisić Lj., Identification of Secretory Compounds from the European Callipodidan Species *Apfelbeckia insculpta*, *Journal of Chemical Ecology* 2009, vol. 35 br. 8, str. 893-95.
68. Makarov S., Čurčić B., Vujisić Lj., Jadranin M., Tešević V., Vučković I., Sekulić T., Čurčić S., i Mitić B., Defensive Secretions in *Callipodella fasciata* (LATZEL, 1882; Diplopoda, Callipodida, Schizopetalidae), *Chemistry & Biodiversity* 2011, vol. 8 br. 7, 1284-89.
69. Noguchi, S., Mori, N., Higa, Y., and Kuwahara, Y. Identification of *Nedyopus patrioticus patrioticus* (Attems 1898) (Polydesmida: Paradoxosomatidae) secretions as possible defensive substances. *Appl. Entomol. Zool.* 1997, 32, 447-52.
70. Noguchi, S., Mori, N., Higa, H., and Kuwahara, Y. Identification of mandelonitrile as a major secretory compound from *Chamberlinius hualienensis* Wang (Polydesmida: Paradoxosomatidae). *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* 1997, 8, 208-14.
71. Taira, J., Nakamura, K., and Higa, Y. 2003. Identification of secretory compounds from the millipede, *Oxidus gracilis* C.L. Koch (Polydesmida: Paradoxosomatidae) and their variation in different habitats. *Appl. Entomol. Zool.* 38:401-4.
72. Duffey, S.S., Blum, M.S., Fales, H.M., Evans, S.L., Roncadori, R.W., Tiemann, D.L., and Nakagawa, Y. 1977. Benzoyl cyanide and mandelonitrile benzoate in the defensive secretions of millipedes. *J. Chem. Ecol.* 3:101-113.
73. Shear, W. A., T. H. Jones i H. M. Miras, A possible phylogenetic signal in milliped chemical defenses: The polydesmidan milliped *Leonardesmus injucundus* Shelley & Sher secretes *p*-cresol and lack a cyanogenic defense (Diplopoda, Polydesmida, Nearctodesmidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2007, 35, 838-42.
74. Roncadori R.W.; Duffey S.S.; Blum M.S., Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes, *Mycologia* 1985, 77, 2, 185-91.
75. Guldensteeden-Egeling C., ÜberBildung von Cyanwasserstoffsäure bei einem Myriapoden. *Pflugler's Archiv für die Gesamte Psychologie* 28: 576-79.
76. Makarov S., Čurčić B., Tešević V., Jadranin M., Vujisić Lj., Čurčić S., Mandić B., Sekulić T., Mitić B., Defensive Secretions in Three Species of Polydesmids

- 
- (Diplopoda, Polydesmida, Polydesmidae), *Journal of Chemical Ecology* 2010, 36, 9, 978-82.
77. Makarov Slobodan, Vujisić Ljubodrag, Ćurčić Božidar, Ilić Bojan, Tešević Vele, Vajs Vlatka, Vučković Ivan, Mitić Bojan, Lučić Luka i Đorđević Iris, Chemical defense in the cave-dwelling millipede *Brachydesmus troglobius* Daday, 1889 (Diplopoda, Polydesmidae), *International Journal of Speleology*, (2012), vol. 41 br. 1, str. 95-100.
78. Casnati, G., G. Nencini, A. Quilico, M. Pavan, A. Ricca, i T. Salvatori, The secretion of the myriapod *Polydesmus collaris collaris* (Koch). *Experientia* 1963, 19, 409–11.
79. Mori, N., K. Kuwahara, T. Yoshida, i R. Nishida, Identification of benzaldehyde, phenol and mandelonitrile from *Epanerchodes japonicus* Carl (Polydesmida: Polydesmidae) as possible defense substances. *Applied Entomology and Zoology* 1994, 29, 517–22.
80. Conner, W.E., Jones, T.H., Eisner, T., i Meinwald, J. 1977. Benzoyl cyanide in the defensive secretion of polydesmoid millipeds. *Cell. Mol. Life Sci.* 33:206-207.
81. Eisner, H.E., Wood, W.F., and Eisner, T. 1975. Hydrogen cyanide production in North American and African polydesmoid millipeds. *Psyche*. 82:20-23.
82. Ômura, H., Y. Kuwahara, T. Tanabe. Species-specific chemical composition of defense secretions from *Parafontaria tonominea* Attems and *Riukiaria semicircularis semicircularis* Takakuwa (Polydesmida: Xystodesmidae). *Applied Entomology and Zoology* 2002, 37, 73–78.
83. Mori N., Kuwahara K., Yoshida T., i Nishida R., Mandelonitrile: major defense cyanogen from *Parafontaria laminata armigera* Verhoeff (Xystodesmidae: Polydesmida), *Applied Entomology and Zoology* 1995, 30, 197–202.
84. Noguchi, S., N. Mori, Y. Higa, & Y. Kuwahara, Identification of *Nedyopus patrioticus patrioticus* (Attems, 1898) (Polydesmida: Paradoxosomatidae) secretions as possible defense substances. *Applied Entomology and Zoology* 1997, 32, 447–52.

- 
85. Wood, W. F., F. J. Hanke, I. Kubi, J. A. Carroll i P. Crews, Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of the millipede, *Buzonium crassipes*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2000, 28, 305–312.
86. Saporito, R.A., Donnelly, M.A., Hoffman, R.L., Garraffo, H.M., i Daly, J.W., A siphonotid millipede (*Rhinotus*) as the source of spiropyrrolizidine oximes of dendrobatid frogs. *Journal of Chemical Ecology* 2003, 29, 2781-86.
87. Clark V., Raxworth C., Rakotomalala V., Sierwald P., i Fisher B., Convergent evolution of chemical defense in poison frogs and arthropod prey between Madagascar and the Neotropics, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Chemistry*, 102, 33, 11617–122
88. Daly, J. W., Garraffo, H. M., i Spande, T. F. (1999) in *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, ed. Pelletier, S. W. (Pergamon, New York), 13, 1–161.
89. Smolanoff, J.; Kluge, A. F.; Meinwald, J.; McPhail, A., Miller, R. W., Hicks, K., Eisner, T. *Science* 1975, 188, 734-6.
90. Daly J., Garraffo, H., Spande, T., Jaramillo C., i Rand, S., Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (*Dendrobatidae*)? *Journal of Chemical Ecology* 1994, 20, 943–55.
91. Daly J., Kaneko T., Wilham J., Garraffo M., Spande T., Espinosa A., i Donnelly A., Bioactive alkaloids of frog skin: Combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Chemistry*, 99, 22, 13996–14001
92. Huth A., Defensive secretions of millipedes: more than just a product of melting point decrease? *Fragm. Faun.* 2000, 43, 191–200.
93. Schikdknecht V.H., Weis, K. H. 1961. Chinone als actives Prinzip der Abwehrstoffe von Diplopoden. *Z. Naturforschg.*, 16, 810–816.
94. Röper, H., i K. Heyns., Spurenanalytik von *p*-benzochinon- und hydrochinon-derivaten mit gaschromatographie und gaschromatographie/massenspektrometrie. Identifizierung von wehrsekret-komponenten europäischer Juliden, *Z. Naturforsch. C* 1977, 32, 61–66.
95. Röper H (1978) Ergebnisse chemisch-analytischer Untersuchungen der Wehrsekrete von Spirostreptiden, Spiroboliden und Juliden (Diplopoda), von *Peripatopsis*

- 
- (Onychophora) und von *Polyzonium* (Diplopoda, Colobognatha). Abh Verh naturwiss Ver Hamburg 21/22,353–363
96. Vujisić, Lj., Makarov S., Ćurčić B., Ilić B., Tešević V., Gođevac D., Vučković I., Ćurčić S., Mitić B., Composition of the Defensive Secretion in Three Species of European Millipedes. *Journal of Chemical Ecology* 2011, 37, 1358–64.
97. Trave R., Garanti L., i Pavan M., Ricerche sulla natura chimica del veleno del Miriapode *Archiulus (Schizophyllum) sabulosus* L. *Chim Industria* 1959, 41, 19–29
98. Bodner M., i Raspotnig G., Millipedes that smell like bugs: (*E*)–Alkenal in the defensive secretion of the Julid Diplopod *Allajulus dicentrus*. *J. Chem. Ecol.* 2012, 38: 547–556.
99. Shimzu, N., Kuwahara Y., Yakumaru R., i Tanabe T., *n*-Hexyl Laurate and Fourteen Related Fatty Acid Esters: New Secretory Compounds from the Julid Millipede, *Anaulaciulus* sp., *J Chem Ecol* 2012, 38: 23–28.
100. Weatherston J., Tyrrell D., i Percy J. E., Long chain alcohol acetates in the defensive secretion of the millipede *Blaniulus guttulatus*. *Chemical Physics Letters* 1971, 7: 98–100.
101. Kluge A.F., i Eisner T., Defense mechanisms of arthropods. XXVIII. A quinone and a phenol in the defensive secretion of a parajulid millipede. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1971, 64: 314–315.
102. Weatherston J., i Percy J. E., Studies of physiologically active arthropod secretions. III. Chemical, morphological, and histological studies of the defence mechanism of *Uroblaniulus canadensis* (Say) (Diplopoda:Julida). *Canadian Journal of Zoology* 1969, 47,6, 1389–94.
103. Schildknecht, H., Wenneis W. F., Weis K. H., i Maschwitz U., Glomerin, ein neues Arthropoden-alkaloid, *Zeitschrift für Naturforschung* 1966, 21, 121–127.
104. Meinwald, Y. C., Meinwald J. i Eisner O., 1,2-Dialkyl-4(3H)-quinazolinones in the defensive secretion of a millipede (*Glomeris marginata*), *Science* 1966, 154: 390–391.
105. Schildknecht, H. i W. F. Wenneis, Über Arthropoden-Abwehrstoffe. XX. Structuraufklärung des Glomerins. *Zeitschrift für Naturforschung* 1967, 21, 552–556.



- 
106. Schildknecht, H. i W. F. Wenneis, Über Arthropoden-Abwehrstoffe. XXV. Anthranilsäure als Precursor der Arthropoden-alkaloide Glomerin und Homoglomerin. *Tetrahedron Letters* 1967, 1815–1818.
107. Schildknecht, H., U. Maschwitz i W. F. Wenneis, Neue Stoffe aus dem Wehrsekret der diplopodengattung *Glomeris*. Über Arthropoden-Abwehrstoffe XXIV. *Naturwissenschaften* 1967, 54, 196–197.
108. Carrell J. E., Defensive secretion of the pill milliped *Glomeris marginata*. I. Fluid production and storage. *J Chem Ecol.* 1984, **10**: 41–51.
109. Carrell J. E., i Eisner O., Spider sedation induced by defensive chemicals of milliped prey, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1984, 81, 806–810.
110. Tellez M.R., Khan I.A., Kobaisy, M., Schrader, K.K., Dayan, F.E., Osbrink, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.) *Phytochemistry* 2002, 61, 2002, 149-155.
111. Jakobsen E., i Gundensen L., Synthesis of heteromine C from guanine, *Heterocycle* 2000, 53, 4, 935-40.
112. Kim S., Kim E., Shin D-S, Kang H., Oh K-B., Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and it's derivatives against *Candida albicans* dimorphism, *Bioo. Med. Lett.* 2002, 12, 895-898.
113. Lewis, J. G. E. 1981. The biology of centipedes. Cambridge University Press, strana 476.
114. Marta M. Antoniazzi, Ca' tia M. Pedroso, Irene Knysak, Rosana Martins, Samuel P.G. Guizze, Carlos Jared, Ka' tia C. Barbaro, Comparative morphological study of the venom glands of the centipede *Cryptops iheringi*, *Otostigmus pradoi* and *Scolopendra viridicornis* *Toxicon* 2009 53 (2009) 367–374
115. Eivind A.B. Undheim, Glenn F. King, On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals, *Toxicon* 2011,57, 521-24.
116. Ferlian O., Scheu S., Pollierer M., Trophic interactions in centipedes (Chilopoda, Myriapoda) as indicated by fatty acid patterns: Variations with life stage, forest age and season, *Soil Biology and Biochemistry* 2012, 52, 33–42.

- 
117. Kim S., Kim E., Prk, Cho, Structural characterization of a new antibiotic substance purified from *Scolopendrasubspinipes multilans* L.Koh, *J. Kor. Chem. Soc.* 1998, 42, 2, 236-238.
  118. Maschwitz U, Lauschke U, Würmli M (1979) Hydrogen cyanide-producing glands in a scolopender, *Asanada* n. sp. (Chilopoda, Scolopendridae). *J Chem Ecol* 5:901–907
  119. Jones TH, Conner WE, Meinwald J, Eisner HE, Eisner T (1976) Benzoyl cyanide and mandelonitrile in the cyanogenetic secretion of a centipede. *J Chem Ecol* 2:421–429
  120. Hopkin SP, Gaywood MJ, Vincent JFV, Mayes Harris ELV (1990) Defensive secretion of proteinaceous glues by *Henia (Chaetechelyne) vesuviana* Newport (Chilopoda, Geophilomorpha). In: Minelli A (ed) Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology, Vittorio Veneto, Italy, July 1987. Brill, Leiden, pp. 175–181
  121. Schildknecht H, Maschwitz U, Krauss D (1968) Blausäure im wehrsekret des erdläufers *Pachymerium ferrugineum*. *Naturwissenschaften* 55, 230
  122. LaRowe D., i Regnier P., Thermodynamic potential for the abiotic synthesis of adenine, cytosine, guanine, thymine, uracil, ribose, and deoxyribose in hydrothermal systems, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 2008, 38, 383-397.
  123. Bradford M.M., Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254,
  124. Laemmli U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 1970, 227, 680–685.

---

## 6. BIOGRAFIJA

Ljubodrag, Veselina Vujisić rođen je 28.06.1978. godine u Smederevu. Osnovnu školu je završio u selu Udovice, a Gimnaziju u Smederevu. Hemijski fakultet u Beogradu upisao je 1996. godine. Diplomirao je 5. oktobra 2001. godine sa prosečnom ocenom 8,50. Poslediplomske studije je upisao 2001. godine na Hemijskom fakultetu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu, pri Katedri za organsku hemiju. Magistrirao je 5. oktobra 2006. godine sa temom "Sekundarni metaboliti biljke *Antemis ruthenica*", pod mentorskim rukovodstvom vandrednog profesora Hemijskog fakulteta, dr Veleta Teševića.

U periodu od 2002. do 2010. godine radio je u Centru za hemiju IHTM-a kao istraživač-pripravnik i istraživač saradnik. Od 2010. godine zaposlen je na Hemijskom fakultetu kao asistent.

Autor i koautor je više od 30 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima iz kategorija M-21, M-22 i M-23 i više desetina saopštenja od nacionalnog i međunarodnog značaja. Glavne oblasti naučno-istraživačkog rada su mu hemija prirodnih proizvoda i strukturne instrumentalne metode. Oženjen je i ima dvoje dece.

## INDEKS POJMOVA

<i>Apfelbeckia insculpta</i>	38, 40, 43, 45-47, 87, 88, 140
<i>Brachydesmus avalae</i>	38, 43, 48, 49, 90, 91, 140, 141
<i>Brachydesmus dadayii</i>	38, 48, 49, 90, 91, 140, 141
<i>Brachydesmus troglobius</i>	38, 40, 48, 49, 89, 90-92, 141
<i>Callipodella fasciata</i>	38, 45, 47, 87, 88, 110
<i>Clinopodes flavidus</i>	42, 103, 107, 130, 131, 143
<i>Cryptops parisi</i>	42, 100, 130, 142
<i>Cylindroiulus boleti</i>	38, 58-60, 74, 94-96, 141
<b>D1</b> fenol	21, 46, 47, 87-89, 91, 150
<b>D2</b> <i>p</i> -krezol ( <i>p</i> -metilfenol)	21, 44, 45, 46, 47, 87, 88, 89, 91, 150,
<b>D3</b> <i>p</i> -etilfenol	46, 47, 87, 150
<b>D4</b> benzaldehid	48, 50, 51, 53, 87, 89-91, 100, 101, 102,
	104, 105, 110, 111, 112, 131, 133, 150,
	153
<b>D5</b> benzil-alkohol	48, 50, 51, 90, 91, 150
<b>D6</b> benzoil-nitril (2-okso-2-fenilacetonitril)	12, 48, 50-54, 89-91, 100, 104, 105, 110,
	111, 117, 127, 131, 133, 135, 150, 153,
<b>D7</b> benzil-metil-ke-ton	48, 50, 51, 54, 90, 91, 150
<b>D8</b> benzoeva kiselina	48, 50, 51, 91, 131, 150
<b>D9</b> benzil-etil-ke-ton	48, 50, 51, 54, 90, 151
<b>D10</b> mandelonitril (2-hidroksi-2-fenilacetonitril)	15, 48, 50-54, 87, 89, 90, 91, 110-113,
	126, 127, 131, 133, 151, 154,
<b>D11</b> mandelonitril-benzoat	12, 48, 50-54, 90, 91, 110-112, 126, 127,
	131, 135, 151, 154
<b>D12</b> cijanovodonik	11, 12, 41, 43, 50, 51, 86, 88-90, 104, 100,
	109, 110, 126, 127, 130, 133-135, 146,
	151, 153
<b>D13</b> polizonimin	33, 55, 56, 57, 92, 93, 151
<b>D14</b> <i>O</i> -metil-spiropirolizin oksim	55, 56, 93, 151
<b>D15</b> nitropolizonamin	33, 55, 56, 92, 151
<b>D16</b> 7-acetoksi-nitropolizonamin	55-57, 93
<b>D17</b> 1,4-benzohinon	58, 60, 61, 68, 94, 151
<b>D18</b> 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon)	58, 60-67, 74, 75, 94, 151
<b>D19</b> 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	50, 58, 68, 94, 152
<b>D20</b> 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	58, 60, 63-67, 72, 74, 75, 94, 152
<b>D21</b> hidrohionon	58, 60, 68, 70, 152
<b>D22</b> 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon	58-60, 70, 152
<b>D23</b> 2-metilhidrohionon	58, 60, 71, 94, 152
<b>D24</b> 2-metoksi-5-metilhidrohionon	58, 60, 71, 94, 152
<b>D25</b> 2,3-dimetoksihidrohionon	58, 60, 72, 94, 152
<b>D26</b> 2-metil-3,4-metilenedioksifenol	58, 60, 72, 94, 152
<b>D27</b> 2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzohionon	58, 60, 73, 94, 152
<b>D28</b> 2-metoksi-3-metilhidrohionon	58, 60, 72, 73, 94
<b>D29</b> 2,3-dimetoksi-5-metilhidrohionon	58, 60, 61, 74, 94, 152

<b>D30</b> glomerin	75-83, 96, 97, 152
<b>D31</b> homoglomerin	75, 76, 79, 80, 83, 97
<i>Eupolybothrus transsylvanicus</i>	42, 100, 130, 142
<i>Glomeris klugii</i>	38, 40, 75-77, 79, 80-85, 97, 98, 128, 141
<b>H1</b> cijanovodonik	<i>vidi jedinjenje D12</i>
<b>H2</b> 2-metilpentanska kiselina	104-107, 153
<b>H3</b> benzaldehid	<i>vidi jedinjenje D4</i>
<b>H4</b> benzoil-nitril (2-okso-2-fenilacetonitril)	<i>vidi jedinjenje D6</i>
<b>H5</b> benzil-nitril (2-fenilacetonitril)	110-112, 133, 153
<b>H6</b> 2-metiloktanska kiselina	104, 105, 107
<b>H7</b> metil 2-fenilacetat	104, 107, 108, 132, 154
<b>H8</b> mandelonitril (2-hidroksi-2-fenilacetonitril)	<i>vidi jedinjenje D10</i>
<b>H9</b> mandelonitril-benzoat	<i>vidi jedinjenje D11</i>
<b>H10</b> 3,7,6-O-trimetilguanin (himantarin)	110, 111, 112, 113, 114, 115, 119, 120, 121, 131, 133, 135, 154
<b>H11</b> (9Z)-eikozen-1-ol	101, 102, 131, 133, 154
<b>H12</b> farnezil-2,3-dihidrofarnazoat	110, 112, 122-126, 131, 154
<b>H13</b> farnezil-farnazoat	110, 111, 122-125, 135
<i>Himantarium gabrielis</i>	42, 99, 109, 110, 111, 117-121, 123, 126-131, 134, 143
<i>Julus terrestris</i>	38, 40, 43, 58, 60, 68, 94, 141
<i>Leptoiulus trilineatus</i>	38, 58, 60, 94, 95, 141
<i>Megaphyllum austriacum</i>	38, 58, 60, 94, 141
<i>Megaphyllum bosniense</i>	38, 58, 60, 64-67, 94-96, 141
<i>Megaphyllum unilineatum</i>	38, 58, 60, 94, 95, 141
<i>Onychoglomeris herzegowinensis</i>	38, 75, 85, 97, 98
<i>Polydesmus complanatus</i>	38, 48-50, 90, 91, 140
<i>Polyzonium germanicum</i>	38, 40, 55, 56, 92, 93, 141
proteini	9, 35, 43, 83, 84, 85, 86, 97, 98, 99, 129, 130, 131, 133, 134, 135, 146, 147, 156, 157
<i>Strigamia crassipes</i>	42, 92, 100-102, 130-102, 130, 131, 142

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Љубодраг В. Вујисић

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Идентификација одбрамбених супстанци одабраних врста стонога из класа

Diplopoda и Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda)

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

Потпис докторанта

У Београду, 07.02.2013. године \_\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Љубодраг Вујисић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Идентификација одбрамбених супстанци одабраних врста стонога  
из класа Diplopoda и Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda)

Ментори Веле Тешевић ванредни професор Хемијског факултета, Слободан  
Макаров ванредни професор Биолошког факултета

Потписани/а Љубодраг, Веселина Вујисић

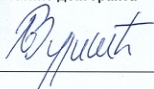
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

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

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

У Београду, 07.02.2013. године

Потпис докторанта



\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

---

Идентификација одбрамбених супстанци одабраних врста стонога из класа  
Diplopoda и Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda)

---

која је моје ауторско дело.

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

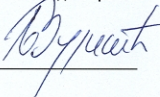
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 07.02.2013. године

Потпис докторанта



---



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.