

# Insekticidno djelovanje sekundarnih metabolita iz majčine dušice

---

Rimac, Hrvoje

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:737997>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologije

Hrvoje Rimac

**Insekticidno djelovanje sekundarnih metabolita iz majčine  
dušice**

Završni rad

Osijek, 2019.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Preddiplomski sveučilišni studij **Biologija**  
Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

**Završni rad**

## **INSEKTICIDNO DJELOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA IZ MAJČINE DUŠICE**

**Hrvoje Rimac**

**Rad je izrađen u:** Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** Dr. sc. Janja Horvatić, izv. prof.

**Komentor:** Dr. sc. Martina Varga

### **Kratak sažetak završnog rada:**

Zbog sve veće potrebe za povećanjem poljoprivredne proizvodnje te zbog uočenog štetnog djelovanja sintetičkih pesticida na tlo, ljude i neciljne organizme prisutna je intenzivna potraga za ekološki prihvatljivijim, ali podjednako učinkovitim pesticidima. Biljna eterična ulja i njihove glavne komponente imaju značajno antibakterijsko, antiviralno i insekticidno djelovanje te služe kao obrambeni mehanizam biljaka u uvjetima biotičkog i abiotičkog stresa. Eterična ulja majčine dušice (*Thymus vulgaris* L) pokazuju učinkovito insekticidno djelovanje pri čemu se komponente timol i karvakrol ističu svojim utjecajem na središnji živčani sustav kukaca, posebno na GABA, kolinergički i oktopaminergički sustav. Unatoč velikom insekticidnom potencijalu sekundarnih metabolita u sastavu eteričnog ulja majčine dušice mehanizmi djelovanja na kukce i međudjelovanja pojedinih komponenti ulja još nisu u potpunosti razjašnjeni. Zamjena štetnih kemijskih pesticida ekološki prihvatljivijim botaničkim pesticidima pridonijela bi očuvanju kvalitete tla, mikroorganizama, biljaka i životinja te na posljepku zdravlja ljudske populacije.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** sekundarni metaboliti, *Thymus vulgaris* L., timol, karvakrol, bioinsekticidi

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**  
**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Biology**  
**Undergraduate university study programme in Biology**  
**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Biology

**Bachelor Thesis**

## **INSECTICIDAL EFFECTS OF SECONDARY METABOLITES FROM THYME**

**Hrvoje Rimalc**

**Thesis performed at:** Laboratory of Plant Ecophysiology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Janja Horvatić, PhD, Assoc. Prof.

**Cosupervisor:** Martina Varga, PhD

### **Short abstract:**

Due to the growing need to increase agricultural production and the perceived harmful effects of synthetic pesticides on soil, humans and non-target organisms, there is an intense search for more environmentally friendly but equally effective pesticides. Herbal essential oils and their main components possess significant antibacterial, antiviral and insecticidal activity and serve as a defence mechanism of plants under the conditions of biotic and abiotic stress. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils show effective insecticidal activity, whereby the components of thymol and carvacrol stand out with their influence on the central nervous system of insects, particularly GABA, cholinergic and octopaminergic system. Despite the strong insecticidal activity shown, mechanisms of action in insects and interactions of individual components of the oil have not yet been fully clarified. The use of botanical pesticides would contribute to the preservation of soil quality, microorganisms, plants and animals and ultimately the health of the human population.

**Original in:** Croatian

**Keywords:** secondary metabolites, *Thymus vulgaris* L., thymol, carvacrol, bioinsecticides

**Thesis deposited:** on the web site of the Department of Biology and in Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library.

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. OSNOVNI DIO.....	5
2.1. Sekundarni biljni metaboliti.....	5
2.1.1. Sekundarni metaboliti u sastavu eteričnog ulja majčine dušice.....	8
2.1.2. Sinteza monoterpena kao glavne komponente eteričnog ulja majčine dušice.....	10
2.2. Bioinsekticidi .....	11
2.2.1. Potencijal eteričnog ulja majčine dušice kao ekološki prihvatljivog insekticida .....	12
2.2.2. Poznati mehanizam insekticidnog djelovanja sekundarnih metabolita majčine dušice.....	14
3. ZAKLJUČAK .....	17
4. LITERATURA.....	18

## 1. UVOD

Ljudska populacija raste zabrinjavajućom brzinom s povećanjem od gotovo 70 milijuna ljudi godišnje. Ukoliko se trend povećanja populacije nastavi do kraja stoljeća na Zemlji će živjeti oko 10 milijardi ljudi (Gerland i sur., 2014). Kako bi se zadovoljile prehrambene potrebe tolikog broja ljudi u narednim desetljećima će biti potrebno udvostručiti ili čak utrostručiti poljoprivrednu proizvodnju. S obzirom da je većina obradivih površina već u upotrebi, povećanje proizvodnje moguće je ostvariti većim prinosima na već postojećim poljoprivrednim površinama (Archana Singh, 2014). Od sredine 20-og stoljeća pa sve do danas u svrhu povećanja poljoprivredne proizvodnje u tijeku je tzv. „zelena revolucija“ koja obuhvaća upotrebu tehnoloških inovacija, sustave navodnjavanja i mehanizacije u kombinaciji s primjenom agrokemikalija u koje ubrajamo kemijska gnojiva, sredstva za ubrzavanje rasta i zaštitu biljaka (Campos i sur., 2018).

Porodica insekata obuhvaća gotovo 80% svih poznatih životinjskih vrsta, a desetine tisuća vrsta ove porodice predstavljaju rizične vrste za čovjeka. Insekti su patogeni uzročnici i prenosioci bolesti ljudi i domaćih životinja pa predstavljaju medicinski rizik, a osim toga, veliki broj vrsta ima značajan utjecaj na poljoprivrednu proizvodnju uništavajući usjeve (Regnault, 1997). Plemenske i tradicionalne kulture širom svijeta već stoljećima za zaštitu usjeva od insekata koriste sirove biljne ekstrakte, dijelove biljke ili čitave biljke (Weinzierl, 1998). Prvi poznati zapisi vezani za primjenu biljnih spojeva protiv štetnika datiraju otprilike 400 godina pr. Kr. (Dayan i sur., 2009). Prema tim zapisima biljke su se u drevnom Rimu koristile za zaštitu uskladištenih roba i ljudskih naselja od različitih štetnika (Isman i Machial, 2006). Ovakva primjena biljnih pripravaka u poljoprivredi smanjuje se od 1940. godine kada započinje razvoj sintetičkih insekticida. Sintetički insekticidi su zahvaljujući svojoj visokoj učinkovitosti, brzom djelovanju, jednostavnom korištenju i niskoj cijeni proizvoda bili veliki tržišni uspjeh te su postali neizostavna komponenta već spomenute tzv. „zelene revolucije“ (Grdiša i Gršić, 2013). Iako su agrokemikalije pridonijele razvoju poljoprivredne proizvodnje, nakon 20-tak godina njihove intenzivne i široko rasprostranjene uporabe, primijećene su brojne negativne posljedice sintetičkih insekticida u modernim poljoprivrednim sustavima - zagađenje vode, zraka i tla, toksičnost prema neciljnim organizmima, pojava otpornosti štetnika na primijenjene agrokemikalije, bioakumulacija u hranidbenim mrežama i štetno djelovanje na ljudsko zdravlje (Aktar i sur., 2009). Nabrojane negativne posljedice agrokemikalija potaknule su znanstvenu zajednicu na pronalazak

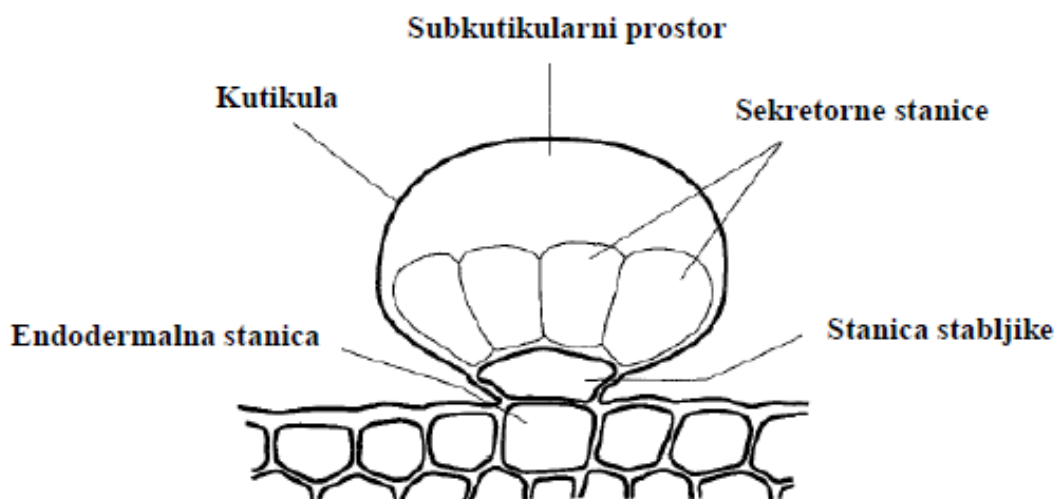
prirodno prisutnih i ekološki prihvatljivijih tvari za borbu protiv insekata koji onemogućavaju povećanje poljoprivredne proizvodnje (Grdiša i Gršić, 2013). Brojna su istraživanja pokazala da mnogi biljni sekundarni metaboliti posjeduju insekticidno, odbijajuće i hranjivo odbojno djelovanje (engl. *antifeedant*) te mogu uzrokovati poremećaje razmnožavanja i rasta insekata (Isman, 2000; Rice i Coats, 1994).

Biljke imaju sposobnost sinteze raznolikih sekundarnih metabolita, koji za razliku od primarnih ne sudjeluju u procesima fotosinteze, disanja, primanja hranjivih tvari, prijenosa otopljenih tvari i diferencijacije (Pevalek-Kozlina, 2003). Ipak, sekundarni metaboliti imaju vrlo važnu ulogu u interakciji biljke s drugim organizmima te zaštiti biljke od predatora i patogenih mikroorganizama (Schafer i Wink, 2009). Sekundarni metaboliti glavne su komponente biljnih eteričnih ulja te su mnoge biljne vrste i njihova esencijalna ulja istraživana u svrhu pronalaska odgovarajućih spojeva s insekticidnim, larvicidnim i odbijajućim djelovanjem (Dargahi i sur., 2014). Takvi pripravci nazivaju se botanički insekticidi i u usporedbi sa sintetičkim agrokemikalijama imaju brojne prednosti: ne zadržavaju se dugo u okolišu, relativno su netoksični prema sisavcima te predstavljaju nizak rizik prema korisnim parazitskim i predatorskim vrstama (Scott i sur., 2003; Weinzerl, 1998).

Majčina dušica aromatična je i ljekovita biljka sa širokim spektrom upotrebe u narodnoj medicini, farmaceutskim pripravcima te proizvodnji konzervirane hrane (Ghasemi i sur., 2015). *Thymus vulgaris* L. (prava majčina dušica; slika 1.) pripada rodu *Thymus* koji obuhvaća oko 215 vrsta zeljastih trajnica i malih grmova rasprostranjenih širom svijeta, a mediteransko područje smatra se centralnim staništem ovog roda. Vrste roda *Thymus* heliofitne su i vole sunce, nastanjuju kamenje i stijene odnosno isušena tla (Stahl-Biskup i Saez, 2002). Ove biljke naseljavaju i područja s ekstremnim klimatskim uvjetima zahvaljujući svojoj otpornosti na nedostatak vode i ekstremne temperature. Svojstvo koje često karakterizira biljke ovog roda su mnogobrojne žljezdane dlake različitih oblika koje sadrže hlapljiva eterična ulja (slika 2). Eterična ulja isparavaju kada su žlijezde oštećene pri čemu hlapljivi sastojci ulja zasićuju atmosferu oko same biljke i time sprječavaju gubitak vode pa se pretpostavlja da je visoka produkcija ulja prilagodba na suhe klime u kojima žive ove vrste (Stahl-Biskup i Saez, 2002).



**Slika 1** Prava majčina dušica ili timijan (*T. vulgaris* L, [web 1](#)).



**Slika 2** Anatomija štitaste žljezdane dlake *T. vulgaris* L. Preuzeto i prilagođeno prema Stahl-Biskup i Saez (2002).



Eterična ulja majčine dušice i njihove glavne komponente pokazuju značajno antibakterijsko, antiviralno i insekticidno djelovanje te služe kao obrambeni mehanizam biljke. Sve više se prepoznaje i njihov veliki potencijal kao ekološki prihvatljivih pesticida. Međutim, uporaba sintetiziranih pesticida i dalje je osnovna metoda za suzbijanje štetočina i bolesti u konvencionalnoj poljoprivredi. Mnoga istraživanja pokazala su da intenzivna uporaba sintetičkih kemikalija vodi prema ireverzibilnim promjenama strukture i ekologije tla (Dabrowski i sur., 2014) s negativnim posljedicama na mikroorganizme u tlu (Asad i sur., 2017). Prema tome, poljoprivredna je proizvodnja ozbiljno ugrožena i potrebno je razviti i usavršiti održive tehnike uzgoja. Stoga je cilj ovog rada pokazati važnost sekundarnih biljnih metabolita majčine dušice za samu biljku, put njihove sinteze, sastav i ulogu u eteričnim uljima te mehanizme djelovanja na insekte. Sva navedena svojstva pridonijeti će razumijevanju velikog potencijala sekundarnih metabolita majčine dušice kao ekološki prihvatljivijih bioinsekticida.

## 2. OSNOVNI DIO

### 2.1. Sekundarni biljni metaboliti

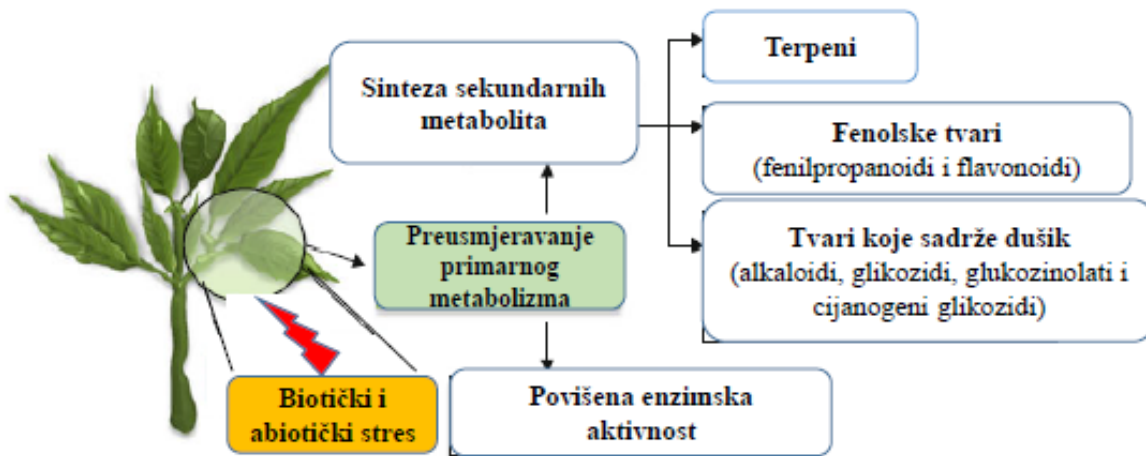
Tvari u biljkama mogu biti podijeljene u dvije velike skupine: primarni i sekundarni metaboliti. Međutim, ponekad je teško odvojiti primarne od sekundarnih metabolita s obzirom da jedna tvar može imati ulogu i u primarnom i u sekundarnom metabolizmu.

Primarni biljni metaboliti prisutni su u svim biljkama i važne su komponente primarnih metaboličkih procesa poput respiracije i fotosinteze (Croteau i sur., 2000; Seigler, 1998). U primarne metabolite ubrajamo tvari koje su identične u svim organizmima poput malih sveprisutnih molekula jednostavnih ugljikohidrata, aminokiselina, trikarboksilnih kiselina, intermedijara Krebsovog ciklusa, univerzalnih građevnih jedinica, ali i tvari koje se strukturno razlikuju među organizmima poput proteina, nukleinskih kiselina i polisaharida (Seigler, 1998). Sekundarni metaboliti izvedeni su iz primarnog metabolizma, brojni su i široko rasprostranjeni, osobito u višim biljkama. Više od 20 000 sekundarnih metabolita bilo je poznato još 1985. godine, a svake godine opiše se najmanje 1000 novih spojeva (Seigler, 1998). Sekundarni metaboliti nisu neophodni biljci za preživljavanje, ali imaju važnu ulogu u interakciji organizma s okolinom i tako omogućavaju preživljavanje biljke u ekosustavu (Pagare i sur., 2015).

Sinteza sekundarnih metabolita specifičan je proces na razini stanica, tkiva i organa, a količina i vrsta sekundarnih metabolita često je prilično varijabilna i među jedinkama iste populacije. Sekundarni metaboliti čine širok spektar tvari iz različitih porodica metabolita koje mogu biti visoko inducirane u stresnim uvjetima kao što su napadi patogena (biotički stres), visoke temperature i vlaga, zasjenjivanje, mehanička ozljeda ili prisutnost toksičnih tvari (Pagare i sur., 2015; slika 3). Osim zaštitne uloge, smatra se da sekundarni metaboliti imaju ulogu i u razmnožavanju biljaka. Na primjer, karotenoidi i flavonoidi su uključeni u staničnu pigmentaciju cvijeta i sjemena, što privlači oprašivače i rasprostranjivače sjemena (Winkel-Shirley, 2001).

Sekundarni biljni metaboliti dijele se u tri kemijski odvojene skupine (slika 3):

- i) terpeni
- ii) fenoli
- iii) tvari koje sadrže dušik (N)



**Slika 3.** Biotički i/ili abiotički stres preusmjerava primarni metabolizam biljaka što rezultira povišenom enzimskom aktivnošću i sintezom sekundarnih metabolita. Preuzeto i prilagođeno prema Borges i sur. (2017).

- i) Terpeni čine najveću skupinu sekundarnih metabolita i potječu od zajedničkog biosintetskog izvora, acetyl-CoA ili glikolitičkih međuprodukata (Pagare i sur., 2015). Terpeni se, prema broju  $C_5$  jedinica koje sadrže, dijele na monoterpeni ( $C_{10}$ ), seskviterpeni ( $C_{15}$ ), diterpeni ( $C_{20}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ) i politerpeni većeg broja  $C$  jedinica ( $n > 20$ ). Sinteza terpena započinje pomoću zajedničkog  $C_5$  prekursora, univerzalne građevne jedinice izopentil difosfata (engl. *isopentenyl diphosphate*, IPP) i izomera dimetilalil difosfata (engl. *dimethylallyl diphosphate*, DMAPP) (Tholl, 2006). Biosinteza terpena slijedi izoprensko pravilo temeljeno na dodatku izoprenskih jedinica  $(C_5)_n$ , koje tvore ugljičnu osnovu terpena. Izoprenske jedinice mogu se povezivati u reakcijama produljivanja lanca kako bi se dobili duži poliizoprenoidni difosfati koji se zatim mogu ciklizirati dajući produkte s jednim ili više prstenova (Christianson, 2008). Sinteza terpena može se odvijati kroz dva puta: citosolnim mevalonskim putem (engl. *mevalonate pathway*, MVA) i u plastodima putem metileritritola (engl. *methylerythritol pathway*, MEP). U citosolnom MVA putu IPP nastaje kondenzacijom dva ostatka acetyl-CoA. Plastidni MEP put započinje pomoću gliceraldehid-3-fosfata i piruvata dajući DMAPP. Citosolni MVA put osigurava prekursore za hlapljive seskviterpeni i triterpeni, dok prekursori hlapljivih monoterpena i diterpeni nastaju MEP putem (Dudareva i sur., 2004). Osim važne ekološke uloge, terpeni imaju i komercijalnu važnost. Upotrebljavaju se

kao mirisna sredstva i začini, farmaceutska sredstva i insekticidi tako da ukupno gledajući posjeduju veliki tržišni potencijal i vrijednost (Trindade i sur., 2018).

- ii) Fenolne tvari obuhvaćaju skupinu raznolikih spojeva s hidroksilnom funkcionalnom skupinom na aromatskom prstenu (Pagare i sur., 2015). Smatra se da imaju važnu ulogu u zaštiti biljke od bolesti i štetočina kao što su parazitski oblici (Wuyts i sur., 2006). Neki od poznatih primjera fenolnih tvari su kumarini, lignin i flavonoidi. Kumarini su jednostavne fenolne tvari široko rasprostranjene u vaskularnim biljkama i čini se da sudjeluju u različitim mehanizama zaštite biljke od herbivornih insekata i parazitskih gljiva. Nastaju iz šikiminskog kiselinskog puta sinteze koji je prisutan kod bakterija, gljiva i biljaka, ali ne i kod životinja (Brooker i sur., 2008). Lignin je visoko razgranati polimer fenil-propanoidnih skupina koji može nastati oksidacijom tri različita alkohola: koniferilnog, kumarilnog i sinapilnog pomoću biljnih peroksidaza (Pagare i sur., 2015). Njegova čvrstoća otežava hranjenje herbivornim životinjama, dok ga njegova kemijska izdržljivost čini relativno neprobavljivim za herbivore i patogene insekte. Lignifikacija je čest odgovor na infekcije ili ranjavanje (Pagare i sur., 2015). Flavonoidi obavljaju prilično različite funkcije u biljkama, uključujući pigmentaciju i obranu. Na primjer, dvije velike skupine flavonoida, flavanoni i flavanoli raspoređeni u epidermalnim slojevima listova i stabljike, štite biljku od štetnog UV-B zračenja tako što ga apsorbiraju dok neometano propuštaju valne duljine vidljivog dijela spektra (Lake i sur., 2009).
- iii) Tvari koje sadrže dušik uključuju alkaloidne, cijanogene glukozide i neproteinske aminokiseline i uglavnom se sintetiziraju iz uobičajenih zajedničkih aminokiselina triptofana, tirozina, fenilalanina, lizina ili arginina (Croteau i sur., 2000). S obzirom da su ovi spojevi većinom toksični smatra se da im je primarna uloga obrana biljke od mikrobne infekcije i herbivornih napada (Pagare i sur., 2015).

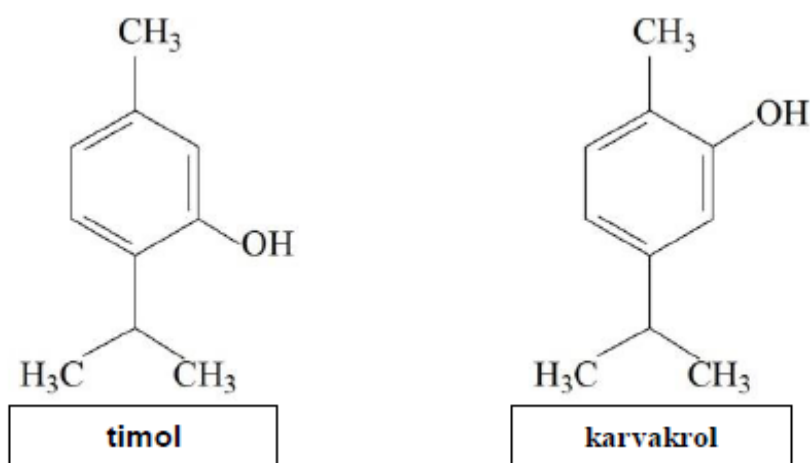
Dodano, u sekundarne metabolite možemo svrstati i tvari koje sadrže sumpor u koje ubrajamo glutatione, glikosfingolipide, fitoaleksine, tionine, defenzine i alinin. Ove tvari su direktno ili indirektno uključene u obranu biljke od patogenih mikroorganizama (Grubb i Abel, 2006; Saito, 2004).

### 2.1.1. Sekundarni metaboliti u sastavu eteričnog ulja majčine dušice

Eterična ulja su vrlo kompleksne smjese koje sadrže oko 20 do 60 komponenti prisutnih u različitim koncentracijama. Obično su dvije ili tri glavne komponente prisutne u visokim koncentracijama (20-70%) dok su ostali spojevi prisutni u tragovima. Glavne komponente imaju i najveći utjecaj na svojstva samog eteričnog ulja (Szcepanik i sur., 2012).

Kemijska istraživanja provedena na eteričnim uljima biljaka roda *Thymus* pokazale su prisutnost aromatskih terpena i terpenoida, flavonoida i fenolskih kiselina (Ghasemi i sur., 2015). Najzastupljeniji spojevi pripadaju u skupinu terpena. Monoterpeni, timol i karvakrol (slika 4) predstavljaju glavnu komponentu uz linalool i p-cimen. Osim toga, esencijalna ulja ovih vrsta sadrže polifenolne kiseline kao što su ružmarinska i kavena, te druge komponente poput borneola, gerniola, 1-8 cineola, limonina i drugih (Ghasemi i sur., 2015).

Varijabilnost komponenti eteričnih ulja kod različitih vrsta unutar roda *Thymus*, posljedica su hibridizacije i poliploidizacije unatoč rijetkom samooprašivanju (Ghasemi i sur., 2015). Općenito, intraspecijske hibridne vrste roda *Thymus* posjeduju posrednički sastav eteričnih ulja s glavnim karakteristikama roditeljskih biljaka (Loziene i sur., 2002).



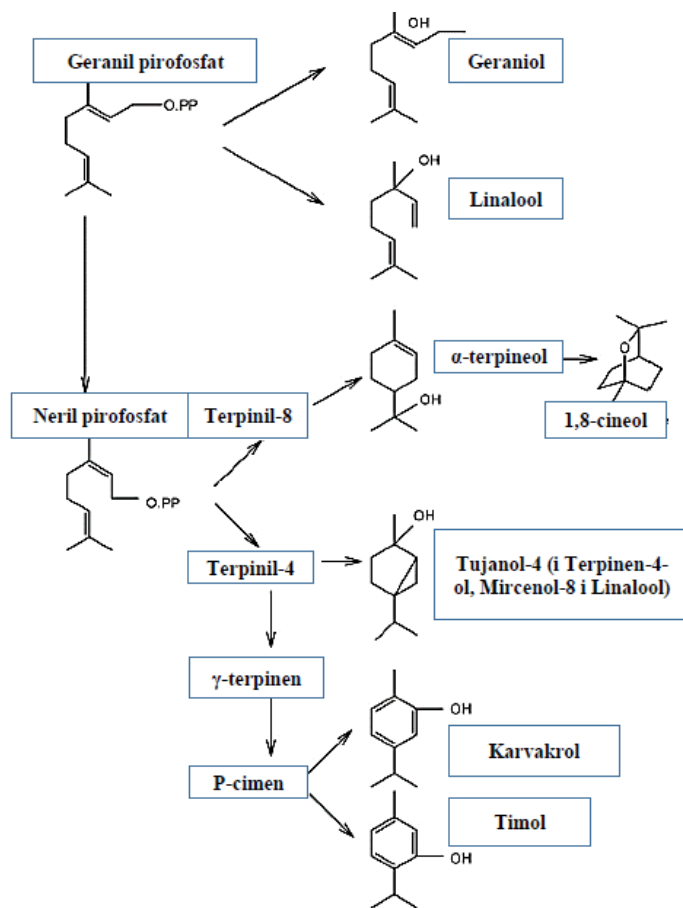
**Slika 4** Strukturne formule karvakrola i timola (preuzeto iz Kaurinović i Popović, 2012).

Zbog velike kemijske raznolikosti česta je pojava kemotipova kod aromatičnih biljaka. Definiciju kemotipa kao „kemijski karakteristične dijelove populacije jedinki koje se morfološki ne razlikuju“ postavio je Santesson 1968. godine. Ovaj pojam označava morfološki identične jedinke koje se razlikuju po kemijskom sastavu ili kvantitativnom omjeru sastavnica eteričnog ulja (Keefover-Ring i sur., 2009). Razlikujemo čiste i mješovite

kemotipove. Čisti kemotipovi su obično određeni dominantnom komponentnom koja zauzima više od 50% sastava eteričnog ulja. Kod mješovitih kemotipova postoje dvije, tri ili više glavnih komponenti (Chizzola i sur., 2008). Otkriveno je 7 različitih kemotipova vrste *T. vulgaris* L., a to su timol, karvakrol, linalool, geraniol, tujanol-4, terpineol i 1,8-cineol kemotip (Torras i sur., 2007; Adzet i sur., 1977). Timol kemotip je najučestaliji kod vrste *T. vulgaris*. Osim glavne komponente koja određuje kemotip, također je karakteristična i predvidiva prisutnost određenih sastavnica koje su metabolički povezane s glavnom komponentom. Prema tome je za kemotipove timol i karvakrol očekivana prisutnost p-cimena i  $\gamma$ -terpinena u značajnim količinama (Trindade i sur., 2018; slika 5). Međutim, u nekim slučajevima nije takva situacija, na primjer, kod 1,8-cineol kemotipa glavna komponenta nastaje ciklizacijom  $\alpha$ -terpineola (Degenhardt i sur., 2009; slika 5) i ta zadnja komponenta nije prisutna u značajnim količinama u eteričnom ulju 1,8-cineol kemotipa.

## 2.1.2. Sinteza monoterpena kao glavne komponente eteričnog ulja majčine dušice

Sintezu monoterpena kataliziraju enzimi monoterpen sintaze iz metal ovisne porodice terpen sintaza. Nalazimo ih u biljkama, ali nedavna istraživanja otkrila su njihovo postojanje i u nekim bakterijama (Yamada i sur., 2015). Ovi enzimi kataliziraju ciklizaciju geranil difosfata putem  $\alpha$ -terpinila, kationskog međuprodukta ili koristeći linearni geranil kao kationski međuprodukt kroz reakcije adicije i eliminacije, što rezultira raznovrsnim monoterpenskim produktima (Trindade i sur., 2018). Biosinteza monoterpena započinje sintezom geranil pirofosfata (engl. *geranyl pyrophosphate*, GPP), prekuzora svih monoterpena, koji dalje prelazi u  $\alpha$ -kationski međuprodukt. Taj visoko nestabilni međuprodukt kasnije može biti preveden u specifične monoterpene.



**Slika 5.** Predviđena biosinteza monoterpena u majčinoj dušici (*T. vulgaris*) iz geranil pirofosfata (GPP) putem intermedijara  $\gamma$ -terpinena. Preuzeto i prilagođeno prema Degenhardt i sur. (2009) i Thompson i sur. (2003).

## 2.2. Bioinsekticidi

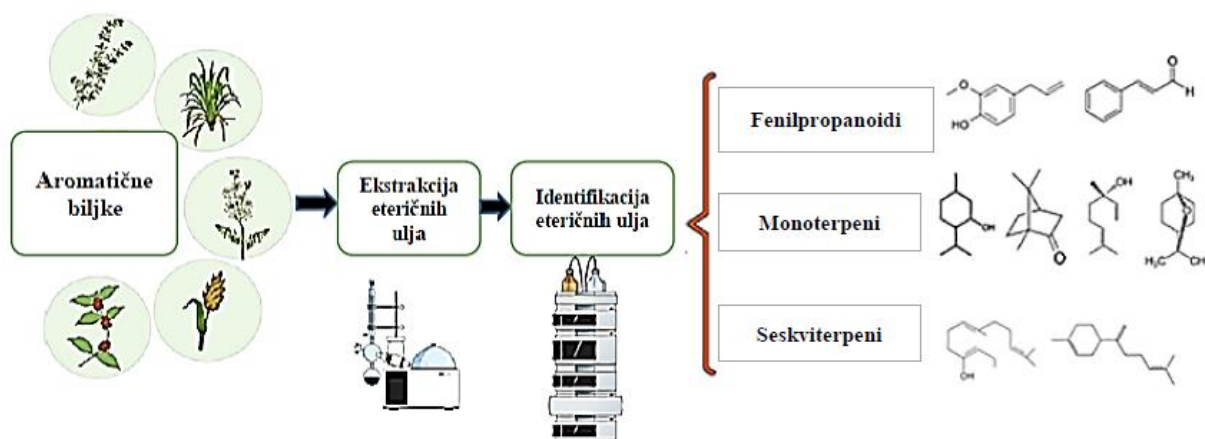
Zadnjih godina prisutan je eksponencijalni rast u broju provedenih istraživanja o botaničkim pesticidima kao potencijalnom rješenju za suzbijanje štetočina. Mnogi laboratoriji širom svijeta posvetili su pažnju istraživanju eteričnih ulja i njihovih komponenti s ciljem iskorištavanja njihovih insekticidnih svojstava (Grumezescu, 2017). Različiti koraci takvih istraživanja prikazani su na slici 6.

Botanički pesticidi u obliku izoliranih spojeva ili kompleksnih mješavina, pokazuju širok raspon bioloških aktivnosti - insekticidno djelovanje, odbijajuće djelovanje, fungicidno, nematocidno i baktericidno djelovanje (Isman, 2000). Bioinsekticidi imaju različite mehanizme djelovanja posebno na živčani sistem kukaca, uključujući djelovanje na  $\gamma$ -aminomaslačnom kiselinom (GABA) kontrolirane kloridne kanale, acetilkolinesteraze, nikotinske acetilkolininske receptore, oktopaminske i tiraminske receptore, natrijeve kanale i druge (Pavela i sur., 2016). Učinak eteričnih ulja i/ili njihovih komponenti može varirati ovisno o osjetljivosti određene vrste što znači da eterična ulja nisu učinkovita za sve vrste poljoprivrednih štetočina (Campos i sur., 2018). Također, kemijski sastav te pozicija i priroda funkcionalnih skupina prisutnih u eteričnim uljima imaju važnu ulogu u insekticidnom i/ili odbijajućem djelovanju, a željena biološka aktivnost može se potencirati modificirajući kemijske strukture monoterpenoida prisutnih u eteričnom ulju (Mossa, 2016).

Unatoč otkrivenim prednostima, i dalje je na tržištu prisutno tek nekoliko komercijalno dostupnih proizvoda temeljenih na eteričnim uljima i njihovim sastavnicama. Kao glavne faktore koji ograničavaju široku rasprostranjenost botaničkih pesticida navode se:

- izostanak primijenjenih rezultata iz mnogih objavljenih istraživanja
- slaba dostupnost kvalitetnih botaničkih pesticida po povoljnoj cijeni
- strogi propisi
- kratka prisutnost tvari u tlu zbog brze razgradnje
- ekstrakcija ulja iz biljaka koje rastu pri različitim klimatskim uvjetima rezultira različitim sastavima u smislu aktivnih tvari s potencijalno smanjenim učincima suzbijanja štetnika i visokom varijabilnosti među serijama (Isman i Grieneisen, 2014)
- proizvodnja na komercijalnoj razini zahtjeva vrlo veliku biomasu biljke, zahtijevajući tako njenu proizvodnju na poljoprivrednoj razini (Isman, 2006).





**Slika 6.** Shema ekstrakcije, identifikacije i kvantifikacije aktivnih komponenti u svrhu njihove daljnje upotrebe. Na slici su prikazani ekstrahirani, fenilpropanoidi, monoterpeni i seskviterpeni. Preuzeto i prilagođeno prema Campos i sur. (2018).

### 2.2.1. Potencijal eteričnog ulja majčine dušice kao ekološki prihvatljivog insekticida

Od 2000. godine objavljeni su rezultati preko 120 znanstvenih istraživanja koja se bave eteričnim uljima vrste *T. vulgaris* (Trindade i sur., 2018). Većina tih istraživanja temeljila se na određivanju učinkovitosti ekstrakata i eteričnih ulja, njihovim letalnim dozama te vremenu potrebnom za letalni učinak (Rattan, 2010). S obzirom da se znatno manji broj istraživanja bazirao na proučavanju mehanizma insekticidnog djelovanja ne čudi činjenica da mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni.

Szczepanik i sur. (2012) osmislili su i proveli istraživanje o insekticidnom djelovanju eteričnog ulja *T. vulgaris* i njegovih izoliranih glavnih komponenti, timola i karvakrola, protiv ličinačkih stadija kornjaša *Alphitobius diaperinus* iz porodice *Tenebrionidae*. Ovaj je kornjaš jedan od najvećih i najrasprostranjenijih nametnika u peradarskoj industriji (Rumbos i sur., 2018). Insekticidna aktivnost eteričnog ulja majčine dušice te čistih monoterpena ovisila je o primijenjenoj dozi te starosti ličinke. Istraživanje nije dokazalo insekticidnu učinkovitost samog eteričnog ulja majčine dušice, međutim postignuto je značajno smanjenje populacije kada su za tretman korištene čiste komponente. Timol i karvakrol najizraženije su djelovali protiv mlađih ličinki pri čemu većina tretiranih jedinki nije preživjela. Rezultati ovog istraživanja pokazali su potencijal timola i karvakrola kao potencijalnih ekološki prihvatljivih bioinsekticida protiv ovog nametnika (Szczepanik i sur., 2012).

Eterično ulje *T. vulgaris* imalo je značajan utjecaj i na *Pochazia shantungensis*, kukca iz porodice *Ricaniidae* (Park i sur., 2017). *P. shantungensis* je primjer novootkrivenih štetnika koji čine veliku ekonomsku štetu u Koreji na drveću jabuke, breskve te na peršinu. Insekticidno djelovanje izraženo je pomoću  $LC_{50}$  vrijednosti koja označava količinu tvari u mg/L potrebnu za smrt 50% tretirane populacije. Eterično ulje *T. vulgaris* pokazalo je najučinkovitije insekticidno djelovanje u usporedbi s djelovanjem ulja drugih vrsta kao što su *Ruta graveolens* (smrđljiva rutvica), *Citrus aurantium* (gorka naranča), *Leptospermum petersonii* i *Achillea millefolium* (stolisnik). Park i sur., (2017) istražili su i djelovanje pojedinih komponenti ulja pri čemu je timol ponovno pokazao najbolje rezultate. Ovo istraživanje pokazalo je da za insekticidnu aktivnost timola vrlo važnu ulogu ima metilna skupina čije je uklanjanje značajno smanjilo insekticidnu aktivnost ove komponente. Dakle, eterično ulje *T. vulgaris* i njegova komponenta timol pokazuju veliki potencijal i mogućnost primjene u borbi protiv egzotičnih vrsta insekata kao što je *P. shantungensis*.

Osim na kukcima koje predstavljaju poljoprivredne pošasti, istraživani su i potencijal insekticidnog djelovanja eteričnog ulja majčine dušice na komarce. Komarci su poznati vektori brojnih bolesti poput, malarije, denga groznice, žute groznice i različitih oblika encefalitisa (Dargahi i sur., 2014). Nabrojane bolesti uzrok su značajnog postotka smrti ljudi u svijetu. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) tijekom 2002. godine malarijom je zaraženo više od 300 milijuna ljudi, a oko milijun ljudi je smrtno stradalo. Osim prijenosa bolesti komarci predstavljaju i velike štetnike u umjerenim i tropskim područjima (Park i sur., 2005). Borba protiv vektorskih komaraca otežana je sve većom otpornošću prema insekticidima (Hemingway i sur. 2002, Ranson i sur. 2002). Park i sur. (2005) proveli su istraživanje repelentnog učinka 5 monoterpena (karvakrola, p-cimena, linaloola, a-terpinena i timola) izoliranih iz eteričnog ulja *T. vulgaris* protiv komarca *Culex pipiens pallens*. Istraživanje je pokazalo dobar učinak svih 5 monoterpena pri 2%-tnoj koncentraciji. Međutim kao najuspješniji repelent se pokazao a-terpinen koji je osigurao 97.3% zaštite u usporedbi sa široko rasprostranjenim komercijalnim repelentom pod nazivom „deet“ (N,N-dietil-metilbenzamid) koji pruža 89%-tnu zaštitu od ugriza komarca. Međutim zabilježena je pojava akutne iritacije kože eksperimentalnih životinja nakon primjene monoterpena, uključujući a-terpinen u koncentracijama iznad 10% (Okabe i sur., 1990). Monoterpeni, osobito a-terpinen učinkoviti su repelenti za komarce, ali je potrebno istražiti problem toksičnosti prema ljudskoj koži i očima (Park i sur., 2005).

### 2.2.2. Poznati mehanizam insekticidnog djelovanja sekundarnih metabolita majčine dušice

Biljke su evolucijski razvile raznolike obrambene mehanizme, konstitutivne i inducibilne, kako bi smanjile napade insekata dok su istovremeno insekti razvili strategije svladavanja tih obrambenih mehanizama. Kemijska ekologija je znanost koja se bavi proučavanjem uloge organskih spojeva (alelokemikalije) u interakcijama organizama s okolinom i s drugim organizmima. Biljne alelokemikalije stupaju u interakciju s ciljanim molekulama u biljojedima i mikroorganizmima te djeluju kao kemijska zaštita biljke. S obzirom na prisutnost velikog broja kemijskih obrana u prirodi, jako malo se zna o njihovim mehanizmima na molekularnoj razini (Rattan, 2010).

Insekticidi imaju širok raspon učinaka na insekte i druge artropode. Ne postoji apsolutna metoda za pronalazak novih mehanizama djelovanja, a događaji sretnog slučajnog otkrivanja često su važniji od bioracionalnih pristupa. Postupak je olakšan ciljnim ispitivanjem enzima, ionskih kanala i membrana kao dodataka za određivanje insekticidne aktivnosti (Casida i Quistad, 1998). Najuspješnije biljke obično sintetiziraju širok spektar umjereno toksičnih obrambenih tvari ili mali broj visoko toksičnih tvari (Rattan, 2010). U ciljna mjesta tih toksičnih tvari ubrajaju se proteini (enzimi, receptori, ionski kanali, strukturni proteini), nukleinske kiseline, membrane pa čak i sekundarni metaboliti (Harborne, 1993). Botanički i sintetički insekticidi utječu na fiziologiju insekta na razne načine te djeluju na različita receptorna mjesta (Rattan, 2010). Na primjer, ekscitacija (pobuđivanje neurona) rezultira hiperaktivnošću, tremorom i krutom paralizom zbog smanjenja energije te neuromuskularnog umora, dok neuroinhibicija uzrokuje nepokretnost i paralizom zbog mogućeg nedostatka kisika i/ili smanjenog respiratornog kapaciteta koji u konačnici dovodi do smrti (Scharf i sur., 2003). U neka od glavnih ciljnih mjesta neurološkog sustava insekata ubrajamo kolinergički sustav, GABA ( $\gamma$ -aminomaslačna kiselina) sustav, mitohondrijski sustav te oktopaminergički sustav (tablica 1). Timol, kao jedna od glavnih komponenti eteričnog ulja majčine dušice, djeluje na GABA-kontrolirane kloridne kanale te na oktopaminske receptore.

Brze reakcije GABA neurotransmitera posredovane su ionotropnim GABA receptorima, pentamernim transmembranskim proteinima s integralnim, GABA-kontroliranim anionskim kanalom (Moss i Smart, 2001). Dok su GABA<sub>A</sub> receptori kod kralježnjaka ograničeni samo na živčani sustav (Sieghart, 1995), kod insekata su prisutni i u mišićnim stanicama (Sattelle, 1990). Takvi ligandima-kontrolirani kloridni kanali su dokazana ciljna mjesta insekticida koji djeluju antagonistički stabilizirajući neprovodljivu

konformaciju kloridnog kanala. Blokiranjem GABA-kontroliranog kloridnog kanala smanjuje se neuronalna inhibicija što dovodi do hiperekscitacije središnjeg živčanog sustava, konvulzija i smrti (Bloomquist, 2003). Također, GABA i srodne aminomaslačne kiseline su poznati stimulatori hranjena i izazivaju reakciju okusnih stanica kod herbivornih insekata, a takve alelokemijske tvari antagoniziraju GABA fagostimulanse, čime izazivaju odvrćanje od hranjenja (Mullin i sur., 1994; Mitchell, 1987). Smatra se da timol ima ulogu pozitivnog alosteričkog regulatora, odnosno da potencira GABA<sub>A</sub> receptore putem nedefiniranog mjesta vezanja (Priestley i sur., 2003).

**Tablica 1.** Mehanizmi djelovanja sekundarnih metabolita prisutnih u eteričnom ulju majčine dušice.

Način djelovanja	Mehanizam inhibicije	Izolirani sekundarni metabolit	Reference
GABA receptori	Tvar se veže na GABA receptore povezane sa kloridnim kanalima na membrani postsinaptičkih neurona i ometa rad sinapse	Timol iz <i>Thymus vulgaris</i>	Belzile i sur., 2000.
Oktopaminski receptori	Blokira oktopaminske receptore djelujući preko kaskade tiraminskih receptora	Timol iz <i>Thymus vulgaris</i>	Enan, 2005a; Enan, 2005b.
Modulacija oktopaminergičkog sustava	Aktivacija oktopaminskih receptora	$\alpha$ -terpineol iz <i>Pinus sylvestris</i>	Enan, 2001.
Kolinergički sustav	Vezanje na nikotinske acetilkolinske receptore	Karvakrol iz <i>Origanum vulgare</i>	Tong i sur., 2013.
Kolinergički sustav	Kompetitivna i reverzibilna inhibicija acetilkolinesterazne aktivnosti	Linalool iz <i>Aniba rosaeodora</i>	Perry i sur., 2000; Ryan i Byrne, 1988.

Oktopaminergički sustav insekata također predstavlja jednu od čestih meta djelovanja biljnih eteričnih ulja. Oktopamin je prirodno prisutni, multifunkcionalni i biogeni amin koji ima ključne uloge kao neurotransmiter, neuromodulator i neurohormon u sustavu beskralježnjaka. Budući da je prisutnost oktopamina u korelaciji s aktivnim ili stresnim ponašanjem, nazvan je hormon „borba ili bijeg“ kao dio općeg sustava za uzbuđenje koji priprema insekta za snažnu aktivnost. Njegova uloga paralelna je ulozi adrenalina i noradrenalina kod kralježnjaka (Evans, 1981). Prisutan je u jako velikim količinama u živčanom sustavu vrsta iz koljena člankonožaca, uključujući razrede insekata i rakova (Enan, 2001). Fiziološka uloga oktopamina kod kukaca je regulacija miogeničkog ritma posredovana je farmakološki posebnim razredom oktopaminskih receptora. Riječ je o oktopaminskim 2A, 2B i 3 (aktivacija adenilat ciklaze) receptorima. Pripadaju porodici receptora s G-proteinima i povezani su s različitim sustavima sekundarnih glasnika (Kostyukovsky i sur., 2002; Enan, 2001; Howell i Evans, 1998; Evans i Robb, 1993; Ryan i Byrne, 1988). Farmakološka, biokemijska i fiziološka istraživanja dokazala su prisutnost podtipova oktopaminskih receptora u različitim vrstama kao što su američki žohari (Enan, 2005b, 1998) i vinska mušica (Evans i sur., 1995). Enan (2001) je pokazao da niska razina eugenola ( $10^6$  M) uzrokuje porast cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) u živčanom sustavu žohara, slično kao i učinak oktopamina ( $10^6$  M). Kasnije je pokazao da je eugenol ( $2.5 \times 10^5$  M) oponašao oktopamin ( $10^6$  M) u porastu koncentracije unutarstaničnog kalcija u kloniranim moždanim stanicama američkog žohara i vinske mušice. I taj proces također je bio posredovan oktopaminskim receptorima (Enan, 2005b). Dakle oktopaminergički sustav, osobito receptori tipa 2, meta su insekticidnog djelovanja nekih aktivnih tvari eteričnih ulja.

Insekticidno djelovanje timola i karvakrola na vinsku mušicu posredovano kaskadom tiraminskim receptora (Enan, 2005b). Tiramin je, poput oktopamina, neuroaktivni ligand koji je sveprisutan i pojavljuje se u velikim količinama u beskralježnjacima (Evans i sur., 1980). Direktni je prekursor oktopamina koji nastaje hidroksilacijom b-ugljikovog bočnog lanca (Vanden Broeck i sur., 1995; Roeder, 1994).

### 3. ZAKLJUČAK

Moderna poljoprivreda i upotreba sintetičkih insekticida rezultirala je brojnim štetnim promjenama tla, vode i zraka. Potreba za održanjem i povećanjem poljoprivredne proizvodnje uz smanjenje štetnog utjecaja na ljude i ne ciljane organizme pokrenula je intenzivnu potragu za ekološki prihvatljivijim, ali jednako učinkovitim pesticidima. Sekundarni biljni metaboliti imaju važnu ulogu u interakciji biljke sa svojom okolinom i drugim organizmima a posebno je važan njihov doprinos obrambenom mehanizam biljaka u stresnim uvjetima. Biljna eterična ulja smjese su različitih sekundarnih metabolita i pokazuju značajno antibakterijsko, antiviralno i insekticidno djelovanje. Timol i karvakrol, glavne komponente eteričnog ulja majčine dušice (*Thymus vulgaris* L), pokazuju značajno insekticidno i odbijajuće djelovanje te imaju veliki potencijal upotrebe kao ekološki prihvatljivi bioinsekticidi. Ove komponente eteričnih ulja djeluju na središnji živčani sustav kukaca, uključujući GABA, kolinergički i oktopaminergički živčani sustav iako mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni. Otkrivanje mehanizama djelovanja ovih spojeva važno je za utvrđivanje rizika za okoliš i ekonomske isplativosti upotrebe bioinsekticida u globalnoj poljoprivrednoj proizvodnji a upotreba ekološki prihvatljivijih botaničkih pesticida pridonijela bi očuvanju kvalitete poljoprivrednog tla i na posljetku zdravlja ljudske populacije.

#### 4. LITERATURA

Adzet, T., Granger, R., Passet, J., San Martin, R. (1977). Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: a signification taxonomique. *Biochemical Systematics and Ecology* 5(4): 269-272.

Aktar, M. W., Sengupta, D., Chowdhury, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1): 1–12.

Alam, M. Z., Crump, A. R., Haque, M. M., Islam, M. S., Hossain, E., Hasan, S. B., Hasan, S. B., Hossain, M. S. (2016) Effects of integrated pest management on pest damage and yield components in a rice agro-ecosystem in the Barisal Region of Bangladesh. *Frontiers in Environmental Science* 4(1): 1-1.

Archana Singh, S. K. (2014) Biopesticides for integrated crop management: environmental and regulatory aspects. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* 5(1): e121.

Asad, M. A. U., Lavoie, M., Song, H., Jin, Y., Fu, Z., Qian, H. (2017) Interaction of chiral herbicides with soil microorganisms, algae and vascular plants. *Science of The Total Environment* 580: 1287–1299.

Belzile, A.-S., Majerus, S. L., Podeszinski, C., Guillet, G., Durst, T., Arnason, J. T. (2000) Dillapiol derivatives as synergists: Structure–activity relationship analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66(1): 33–40.

Bloomquist, J. R. (2003) Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54(4): 145-156.

Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A., Lima, G. P. P. (2017) Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. *Medicinal Plants and Environmental Challenges* 1: 259-277.

Brooker, N., Windorski, J., Bluml, E. (2008) Halogenated coumarin derivatives as novel seed protectants. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 73(2): 81-9.

Campos, E. V. R., Proença, P. L. F., Oliveira, J. L., Bakshi, M., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F. (2018) Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators*.

Casida, J. E., Quistad, G. B. (1998) Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology* 43(1): 1-16.

Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, C. (2008) Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (16): 6897–6904.

Christianson, D. W. (2008) Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology* 12(2): 141–150.

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites) in Biochemistry and molecular biology of plants (ur. B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones). Rockville , American Society of Plant Physiologists 1250–1318.

Dabrowski, J. M., Shadung, J. M., Wepener, V. (2014) Prioritizing agricultural pesticides used in South Africa based on their environmental mobility and potential human health effects. *Environmental International* 62: 31–40.

Dargahi, L., Razavi-Azarkhiavi, K., Ramezani, M., Abaee, M.R., Behravan, J. (2014) Insecticidal activity of the essential oil of *Thymus transcaspicus* against *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(2): 589-591.

Dayan, F. E., Cantrell, C. L., Duke, S. O. (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17(12): 4022–4034.

Degenhardt, J., Köllner, T. G., Gershenzon, J. (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70(15-16): 1621-1637.

Dudareva, N. (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology* 135(4): 1893–1902.

Enan, E. E. (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry Physiology C Toxicology Pharmacology* 130(3): 325-337.

Enan, E. E. (2005a) Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archive in Insect Biochemistry Physiology* 59(3): 161-171.

Enan, E. E. (2005b) Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35(4): 309-321.

Evans, P. D., Gee, J. D. (1980) Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature* 287(5777): 60–62.

Evans, P. D. (1981) Multiple receptor types for octopamine in the locust. *The Journal of Physiology* 318(1): 99–122.

Evans, P. D., Robb, S. (1993) Octopamine receptor subtypes and their modes of action. *Neurochemical Research* 18(8): 869-874.

Evans, P. D., Robb, S., Cheek, T. R., Reale, V., Hannan, F. L., Swales, L. S., Hall, M., Midgley, J. M. (1995) Agonist-specific coupling of G-protein coupled receptors to second messenger systems. *Progress in Brain Research* 106: 259-268.

Gerland, P., Raftery, A.E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B.K., Chunn, J., Lalic, N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G. K., Wilmoth, J. (2014) World population stabilization unlikely this century. *Science* 346(6206): 234–237.

Ghasemi P. A., Emami B. Z., Malekpoor F. (2015) An overview on genus *Thymus*. *Journal of Herbal Drugs* 6(2):93-100.



- Grdiša, M., Gršić, K. (2013) Botanical insecticides in plant protection. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78(2): 85-93.
- Grubb, C. D., Abel, S. (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11(2): 89–100.
- Harborne, J. B. (1993) Introduction to ecological biochemistry. Fourth edition Academic Press, London.
- Hemingway J., Field L., Vontas J. (2002) An overview of insecticide resistance. *Science* 298(5591): 96–97.
- Howell, K. M., Evans, P. D. (1998) The characterization of presynaptic octopamine receptors modulating octopamine release from an identified neurone in the locust. *Journal of Experimental Biology* 201(13): 2053-2060.
- Isman, M. B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19(8-10): 603–608.
- Isman, M. B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51(1): 45–66.
- Isman, M. B., Machial, C. M. (2006) Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Naturally Occurring Bioactive Compounds* 3: 29–44.
- Isman, M. B., Grieneisen, M. L. (2014) Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in Plant Science* 19(3): 140–145.
- Kaurinović, B., Popović, M. (2012) Liposomes as a tool to study lipid peroxidation. *Lipid Peroxidation* 155-180.
- Keefover-Ring, K., Thompson, J. D., Linhart, Y. B. (2009) Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal* 24(3): 117–122.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., Shaaya, E. (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58(11): 1101-1106.
- Lake, J. A., Field, K. J., Davey, M. P., Beerling, D. J., Lomax, B. H. (2009) Metabolomic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. *Plant, Cell & Environment* 32(10): 1377–1389.
- Loziene K., Vaiciuniene J., Venskutons, P. R. (2002) Chemical composition of the essential oil of an interspecific hybrid of *Thymus* (*Thymus* × *Oblongifolius* Opiz) growing wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* 14(4): 308-311.

- Mitchell, B. K. (1987) Interaction of alkaloids with galeal chemosensory cells of Colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology* 13(10): 2009-2022.
- Moss, S. J., Smart, T. G. (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2(4): 240–250.
- Mossa, A.-T., H. (2016) Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Environmental Science and Technology* 9(5): 354–378.
- Mullin, C. A., Chyb, S., Eichenseer, H., Hollister, B., Frazier, J. L. (1994) Neuroreceptor mechanisms in insect gustation: a pharmacological approach. *Journal of Insect Physiology* 40(11): 913-931.
- Okabe H, Obata Y, Takayama K, Nagai T. (1990) Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. *Drug Design and Delivery* 6(3): 229–238.
- Pagare, S., Bhatia, D.M., Tripathi, N., Pagare, S., Bansal, Y.K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 9(3): 293-304.
- Park, J.-H., Jeon, Y.-J., Lee, C.-H., Chung, N., Lee, H.-S. (2017) Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. *Scientific Reports* 7(1).
- Pavela, R., Benelli, G. (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trend sin Plant Science* 21(12): 1000-1007.
- Perry, N. S. L., Houghton, P. J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E. K. (2000) In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 52(7):895–902.
- Pevalek-Kozlina B. (2003), *Fiziologija bilja*. Zagreb, Profil International.
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A., Satelle, D. B. (2003) Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology* 140(8): 1363-727.
- Rattan, R. S. (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* 29(9): 913–920.
- Regnault-Roger, C. (1997) *Integrated Pest Management Reviews* 2(1): 25–34.
- Rice, P. J., Coats, J. R. (1994) Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (diptera: *Muscidae*) and red flour beetle (coleoptera: *Tenebrionidae*). *Pesticide Science* 41(3): 195–202.
- Roeder, T. (1994) Biogenic amines and their receptors in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 107(1): 1–12.

- Rumbos, C. I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., Athanassiou, C. G. (2018) The lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* : a noxious pest or a promising nutrient source? Reviews in Aquaculture.
- Ryan, M. F., Byrne, O. (1988) Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholineesterase. *Journal of Chemical Ecology* 14(10): 1965-1975.
- Saito, K. (2004) Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant physiology* 136(1): 2443-50.
- Sattelle, D. B. (1990) GABA Receptors of insects. *Advances in Insect Physiology* 22: 1–113.
- Scharf, M. B., Baumann, M., Berkowitz, D. V. (2003) The effects of sodium oxybate on clinical symptoms and sleep patterns in patients with fibromyalgia. *Journal of Rheumatology* 30(5): 1070-1074.
- Schäfer, H., Wink, M. (2009) Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal* 4(12), 1684–1703.
- Scott, I. M., Jensen, H., Scott, J. G., Isman, M. B., Arnason, J. T., Philogène, B. J. R. (2003). Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: *Chrysomelidae*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54(4): 212–225.
- Seigler, D. S. (1998) Plant secondary metabolism. Boston, Kluwer Academic.
- Sieghart, W. (1995) Structure and pharmacology of gammaaminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacological Reviews* 47(2): 181– 234.
- Sola, P., Mvumi, B. M., Ogendo, J. O., Mponda, O., Kamanula, J .F., Nyirenda, S .P., Belmain, S. R., Stevenson, P. C. (2014) Botanical pesticide production, trade and regulatory mechanisms in sub-Saharan Africa: making a case for plant-based pesticidal products. *Food Security* 6(3): 369-384.
- Stahl-Biskup, E., Saez, F. (2002) Thyme: The genus *Thymus*. London i New York, Taylor & Francis.
- Szczepanik M., Zawitowska B., Szumny A. (2012) Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Allelopathy Journal* 30(1): 129-142.
- Tholl, D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9(3): 297–304.
- Thompson, J. D., Chalchat, J.-C., Michet, A., Linhart, Y. B., Ehlers, B. (2003) *Journal of Chemical Ecology* 29(4), 859–880.

- Tong, F., Gross, A. D., Dolan, M. C., Coats, J. R. (2012) The phenolic monoterpeneoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. *Pest Management Science* 69(7): 775–780.
- Torras, J., Grau, M. D., López, J. F., de las Heras, F. X. C. (2007) Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. *Science of Food and Agriculture* 87(12): 2327-2333.
- Trindade H., Pedro L. G., Figueiredo A. C., Barroso J.G. (2018) Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. *Industrial Crops & Products* 124: 530–547.
- Vanden Broeck, J., Vulsteke, V., De Loof, A., Huybrechts, R. (1995) Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed drosophila S2 cells. *Journal of neurochemistry* 64(6): 2387-95.
- Rechcigl, J. E., Rechcigl, N. A. (1998) Botanical insecticides, Soaps and Oils. U: Weinzierl, R. A. (ur.) *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*. Lewis publishers, Boca Raton, Fla, 110-130.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. *Plant Physiology* 126(2): 485-93.
- Wuyts, N., De Waele, D., Swennen, R. (2006) Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(5-6): 308–314.
- Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-Ya, K., Omura, S., Cane, D. E., Ikeda, H. (2015) Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(3): 857-862.

## Web izvori

Web 1 <https://pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Thymus+vulgaris>