

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”
FACOLTA' DI FARMACIA



Dottorato di Ricerca in
"Scienza del Farmaco"
XXI CICLO 2005-2008

“Analisi fitochimica e citotossicità di piante tipiche
della flora mediterranea”

Tutor

Ch.mo Prof.
Felice Senatore

Coordinatore

Ch. ma Prof.ssa
Maria Valeria D'Auria

Dott.ssa Carmen Formisano

INTRODUZIONE	4
Capitolo 1 Prodotti naturali di origine vegetale utilizzati nella terapia antitumorale	7
1.1 La tubulina come target per l'azione di farmaci antitumorali	7
1.1.1 Inibitori della depolimerizzazione della tubulina	9
1.1.1.a <i>Taxani</i>	9
1.1.2 Inibitori della polimerizzazione della tubulina	13
1.1.2.a <i>Agenti che si legano sul sito della colchicina</i>	13
1.1.2.b <i>Podofilottossine</i>	15
1.1.2.c <i>Agenti che si legano al sito degli alcaloidi della Vinca</i>	18
1.1.2.d <i>Le camptotecine</i>	22
Bibliografia	25
Capitolo 2 Terpeni: chimica, biosintesi e proprietà biologiche	28
2.1 Terpenoidi: la via dell'acido mevalonico (MVA)	29
2.2 Monoterpeni	32
2.2.1 Monoterpeni negli oli essenziali	35
2.2.1.a <i>Monoterpeni aciclici</i>	35
2.2.1.b <i>Monoterpeni monociclici e biciclici</i>	36
2.2.1.c <i>Eteri e lattoni monoterpenici</i>	38
2.2.2 Monoterpeni: proprietà biologiche	39
2.3 Sesquiterpeni	40
2.3.1 Ipotesi biogenetiche di scheletri sesquiterpenici a partire da TCFPP	42
2.3.2 Biogenesi di composti sesquiterpenici con un anello α -metilen- γ -lattonico	45
2.3.3 Sesquiterpeni: proprietà biologiche	46
2.4 Diterpeni	48
2.4.1 Diterpeni attività biologica	52
Bibliografia	53
Capitolo 3 Materiali e Metodi	54
3.1 Tecniche estrattive	54
3.1.1 Apparecchiatura Soxhlet	54
3.1.2 Macerazione con solventi a polarità crescente	54
3.1.3 Distillazione in corrente di vapore	54
3.2 Tecniche cromatografiche	56
3.2.1 TLC	56
3.2.2 Colonne cromatografiche	56
3.2.2.a <i>Gel filtrazione</i>	56
3.2.2.b <i>Flash cromatografia</i>	56
3.2.2.c <i>HPLC</i>	57
3.2.3 Gas cromatografia	57
3.2.3.a <i>Gas cromatografia-spettrometria di massa</i>	57
3.4 Tecniche spettroscopiche	59
3.4.1 Spettrometria di massa	59
3.4.2 Risonanza magnetica nucleare	59
3.5 Linee cellulari	59
3.5.1 Scongelo della linea cellulare	60
3.5.2 Mantenimento in coltura e crescita cellulare	60
3.6 Analisi della vitalità cellulare	62
3.6.1 Test MTT	62

3.6.2 Test dell'LDH	62
3.6.3 Test Comet	63
Bibliografia	64
Capitolo 4 <i>Onopordum cynarocephalum</i> Boiss. et Blanche	65
4.1 Famiglia Asteraceae	65
4.1.1 Caratteristiche morfologiche delle Asteraceae	66
4.1.2 Sistematica delle Asteraceae	66
4.1.3 Distribuzione geografica ed interesse economico delle Asteraceae	68
4.2 Descrizione botanica del genere <i>Onopordum</i>	69
4.2.1 Interesse del genere <i>Onopordum</i>	70
4.2.2 <i>Onopordum cynarocephalum</i> Boiss. et Blanche	71
4.2.3 Precedenti studi fitochimici sul genere <i>Onopordum</i>	72
4.2.3.a Flavonoidi	73
4.2.3.b Sesuiterpeni	75
4.2.4 Proprietà biologiche del genere <i>Onopordum</i>	81
4.3 Materiali e metodi	82
4.3.1 Il metodo di estrazione	82
4.3.2 Valutazione dell'attività degli estratti di <i>O. cynarocephalum</i> sulla vitalità cellulare	83
4.3.3 Frazionamento del residuo cloroformico RC	85
4.3.4 Caratterizzazione dei composti	88
4.3.5 Frazionamento del residuo acetico RA	100
4.3.6 Caratterizzazione dei composti	103
Bibliografia	111
Capitolo 5 <i>Elaeoselinum asclepium</i> (L.) Bertol. subsp. <i>meoides</i> (Desf.) Fiori	114
5.1 Famiglia delle Apiaceae	114
5.1.1 Sistematica delle Apiaceae	115
5.1.2 Distribuzione geografica ed interesse	115
5.2 Genere <i>Elaeoselinum</i>	116
5.2.1 Precedenti studi fitochimici	118
5.2.2 Proprietà biologiche del genere <i>Elaeoselinum</i>	123
5.3 Materiali e metodi	125
5.3.1 Il metodo di estrazione	125
5.3.2 Caratterizzazione dei composti	127
5.3.3 Attività biologica	130
Bibliografia	131
Capitolo 6 Oli essenziali	134
6.1 Oli essenziali e chemioprevenzione	134
6.1.1 Oli essenziali e carcinogenesi	135
6.2 Famiglia delle Lamiaceae	136
6.2.1 Sistematica delle Lamiaceae	137
6.2.2 Distribuzione geografica, habitat ed interesse	137
6.3 Genere <i>Teucrium</i>	139
6.3.1 Sistematica del genere <i>Teucrium</i>	141
6.3.2 Distribuzione geografica e varietà del <i>Teucrium</i>	142
6.3.3 Proprietà farmacologiche ed impiego terapeutico	144
6.3.4 Metaboliti isolati e oli essenziali da varie specie di <i>Teucrium</i>	144

6.3.5 Materiali e metodi.....	146
6.3.5.a Caratteristiche dei campioni	146
6.3.5.b Isolamento dell'olio essenziale.....	146
6.3.5.c Risultati dell'analisi GC-MS.....	146
6.3.5.d Analisi della vitalità cellulare degli oli essenziali.....	153
6.4 Genere <i>Salvia</i>	155
6.4.1 Le principali specie del genere <i>Salvia</i>	158
6.4.2 Proprietà farmacologiche ed impiego terapeutico.....	160
6.4.3 Principali metaboliti e oli essenziali del genere <i>Salvia</i>	161
6.4.4 Materiali e metodi.....	163
6.4.4.a Caratteristiche dei campioni	163
6.4.4.b Isolamento dell'olio essenziale.....	163
6.4.4.c Risultati dell'analisi GC-MS.....	163
6.4.4.d Analisi della vitalità cellulare.....	169
Bibliografia	172

INTRODUZIONE

Le piante medicinali occupano, ancora oggi, un posto fondamentale tra i rimedi di origine naturale; molti farmaci contengono molecole di natura vegetale e molti principi attivi di sintesi sono modellati sulla struttura di ben note molecole vegetali. Negli ultimi venti anni la chimica delle sostanze naturali è stata oggetto di un'intensa attività di ricerca, infatti sebbene la maggior parte dei farmaci di ultima generazione sul mercato sia di origine sintetica, le sostanze naturali ed in particolare i metaboliti secondari di origine vegetale, isolati e caratterizzati da un grande e vario numero di specie, hanno un ruolo fondamentale nella ricerca e nello sviluppo di nuovi farmaci. Le piante possiedono la caratteristica di essere molto più ricche degli animali nella loro diversità biochimica: nonostante anche gli animali producano metaboliti secondari, almeno i quattro quinti dei metaboliti secondari oggi conosciuti sono di origine vegetale. La spiegazione di questo fenomeno risiede probabilmente nel fatto che le piante sono vincolate al suolo e devono evolvere una molteplicità di meccanismi di adattamento più di quanto sia necessario agli animali, i quali hanno a disposizione altri strumenti per la loro sopravvivenza (per esempio, lo spostamento per la ricerca del cibo o la fuga per la difesa). Tra i metaboliti secondari delle piante, ovvero i prodotti del metabolismo che non sono essenziali per la semplice crescita, sviluppo o riproduzione della pianta, quali mucillagini, gomme, glicosidi, tannini, alcaloidi, saponine, antrachinoni, flavonoidi, oli essenziali ed altri ancora, sono da ricercarsi i principi farmacologicamente attivi.

I metaboliti secondari non sono necessariamente prodotti in tutte le condizioni, e nella maggioranza dei casi, non sono ancora noti né la funzione di questi composti, né i vantaggi che apportano all'organismo che li produce. Alcuni sono indubbiamente biosintetizzati per ragioni facilmente comprensibili, per esempio composti tossici che forniscono protezione contro la predazione o composti che fungono da coloranti, ma è logico assumere che tutti i metaboliti secondari hanno qualche ruolo vitale per il benessere dell'organismo che li produce. Molti terpeni o composti derivati sono tossici per le cellule dell'organismo stesso che li produce; tale tossicità costituisce un vero e proprio schermo biochimico contro l'attacco di agenti patogeni. E' proprio l'area del metabolismo secondario che fornisce la maggior parte delle sostanze naturali farmacologicamente attive. Attualmente, nonostante la crescente introduzione di farmaci di sintesi, circa il 45% degli agenti terapeutici monomolecolari riportati nelle farmacopee, sono di origine naturale o derivano direttamente da molecole naturali; basti

pensare, a titolo di esempio, ad alcune molecole ad attività antitumorale come il paclitaxel, l'acido betulinico, il resveratrolo e gli alcaloidi della vinca, all'attività lassativa, purgante e colagoga dei glicosidi antrachinonici quali reina, aloina, crisofanelina e glucofrangulina, isolati dal rizoma di alcune specie di rabarbaro e all'attività analgesico-ipnotica di alcaloidi come la morfina, papaverina, noscapina e antitussiva della codeina estratti dal *Papaverum somniferum*.

La diversità chimica che caratterizza le molecole naturali rende l'esplorazione delle loro caratteristiche biologiche, non solo una delle principali fonti di nuovi composti potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di nuovi farmaci, ma anche uno strumento utile per la scoperta di nuovi meccanismi d'azione. È per questo che gli studi fitochimici rappresentano un campo in continua evoluzione ed in continuo progresso, grazie soprattutto a nuove tecniche che hanno permesso di raggiungere con maggiore facilità e in minor tempo gli scopi desiderati; di pari passo anche gli studi di botanica, di etnobotanica, di farmacologia e di medicina hanno subito un incremento e ad oggi grazie a questa interdisciplinarietà è possibile avere molte più informazioni sulle piante medicinali e sul loro impiego razionale in campo medico.

In questo ambito si inserisce il progetto svolto durante il mio periodo di dottorato di ricerca in "Scienza del Farmaco", che ha avuto come obiettivo principale l'isolamento, la determinazione strutturale e la valutazione dell'attività biologica di metaboliti secondari da matrici vegetali. Gli argomenti trattati durante il corso di dottorato, sono stati suddivisi in tre capitoli:

-nel capitolo 4 è descritta l'analisi fitochimica di una pianta appartenente alla famiglia delle Asteraceae, l'*Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche, raccolta in Libano. Questo argomento si inserisce in un progetto iniziato già da tempo dal mio gruppo di ricerca sull'analisi fitochimica di piante libanesi, grazie alla collaborazione con la Prof.ssa Nelly Apostolides Arnold della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Saint Esprit, Kaslik (Beirut, Libano). Gli estratti che hanno mostrato un'azione citotossica sulle cellule HeLa sono stati frazionati e purificati. Sono stati caratterizzati finora 13 sesquiterpeni e due lignani, sui quali sono ancora in corso saggi di valutazione dell'attività citotossica.

- nel capitolo 5 è riportata l'indagine fitochimica condotta sull'estratto acetone, ottenuto dalle parti aeree di *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. subsp. *meoides* (Desf.) Fiori una pianta tipica della regione siciliana. Sono stati isolati cinque diterpenoidi di cui uno mai ritrovato prima in natura, che sono stati saggiati per valutare la loro

potenziale azione citotossica su cellule di glioma C6.

- nel capitolo 6 è invece riportato lo studio fitochimico di oli essenziali ottenuti da piante originarie del bacino del Mediterraneo. In questo capitolo è descritta l'analisi GC-MS e la valutazione dell'attività citotossica di due generi appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae: il *Teucrium* sp e la *Salvia* sp..

Capitolo 1 Prodotti naturali di origine vegetale utilizzati nella terapia antitumorale

Le piante hanno una lunga storia nel trattamento antitumorale svolgendo un ruolo significativo come sorgente diretta o indiretta di farmaci¹. Più del 60% dei farmaci antineoplastici infatti, hanno origine naturale, derivando da piante, organismi marini e microrganismi²⁻³. Il successo della ricerca di agenti antitumorali da organismi vegetali è iniziato a metà del XX secolo con la scoperta degli alcaloidi della *Vinca* e l'isolamento delle podofillotossine. In seguito a queste evidenze, il National Cancer Institute (NCI) ha avviato nei primi anni '60 un intenso programma di raccolta e screening di piante, focalizzando l'attenzione su quelle utilizzate nella medicina popolare, per la cura di numerose patologie. La realizzazione di questo programma ha permesso di individuare molti nuovi composti ad alto potenziale citotossico, fra cui le camptotecine e i taxani. Tale ricerca si è conclusa negli anni '90, portando diverse nuove molecole in fase clinica di studio e molte altre in fase pre-clinica avanzata². Questo successo è legato all'incredibile biodiversità presente nel regno vegetale che ha dimostrato e continua a dimostrare di essere una preziosa fonte di nuovi farmaci in campo antitumorale ma non solo⁴⁻⁵. Di seguito viene riportata una breve rassegna di alcune tra le principali piante medicinali da cui sono derivati importanti farmaci utilizzati nella terapia antitumorale, da *Taxus baccata* e *T. brevifolia* al più antico *Colchicum autumnale*, al *Podophyllum peltatum*, alla *Camptotheca acuminata* e al *Catharanthus roseus*.

1.1 La tubulina come target per l'azione di farmaci antitumorali

Scopo dei farmaci antitumorali è la distruzione selettiva delle cellule tumorali. Tra i composti naturali più importanti ad azione antineoplastica sono da annoverarsi quelli che interagiscono con la tubulina (alcaloidi della vinca e derivati del taxano). La tubulina è una proteina globulare che costituisce l'unità fondamentale delle strutture del citoscheletro, il microtubulo. Essa è implicata in numerose funzioni essenziali per la sopravvivenza cellulare, quali la mitosi, il trasporto, la mobilità cellulare, il movimento ciliare e dei flagelli.

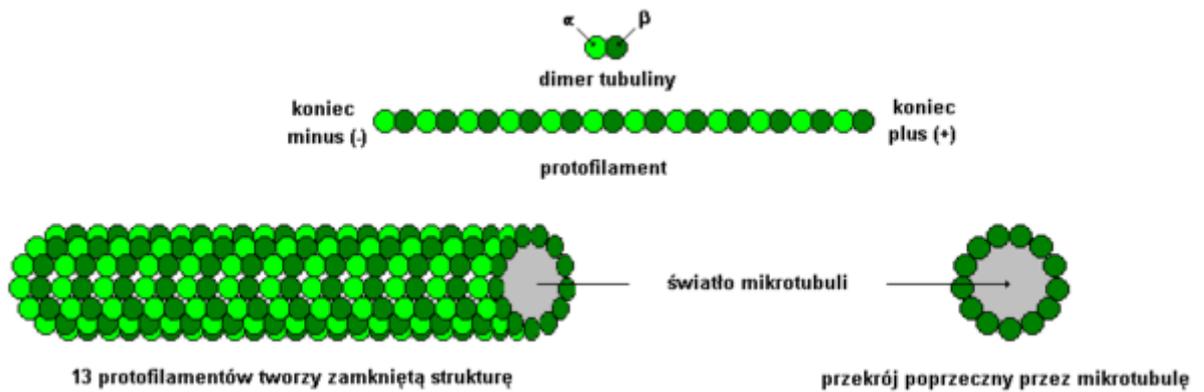


Fig 1.- struttura della tubulina

Nel citoplasma la tubulina si trova sotto forma di dimero α/β . Sia la tubulina α sia la tubulina β sono in grado di riconoscere e legare GTP e, almeno la subunità β , di idrolizzarlo. Quindi la tubulina è presente in due forme: la tubulina GTP e la tubulina GDP. La tubulina, quando lega il GTP presenta un'elevata affinità per altre tubuline, e risulta allora essere polarizzata, dal momento che questa affinità è maggiore nella subunità β . Nel momento in cui varie tubuline si aggregano (*in vitro*, sensibili alla concentrazione di GTP presente e a particolari ioni come il Ca^{++}) hanno luogo 5 distinti fenomeni:

- Nucleazione: processo per il quale varie tubuline si aggregano a formare un protofilamento, unità costitutiva dei microtubuli.
- Aggregazione: processo di aggregazione dei protofilamenti in abbondanza di GTP.
- Disaggregazione: processo di disaggregazione dei microtubuli in scarsità di GTP.
- Stabilizzazione: processo che avviene nel momento in cui la velocità di liberazione di tubuline dal terminale (-) del microtubulo eguaglia l'aggiunta di tubuline al terminale (+) per nucleazione.

I microtubuli sono un target privilegiato per numerosi agenti antitumorali. I composti appartenenti a questa famiglia possono essere classificati in due categorie:

- composti che inibiscono la depolimerizzazione e stabilizzano i microtubuli;

- composti che inibiscono la polimerizzazione della tubulina e impediscono la formazione dei microtubuli.

1.1.1 Inibitori della depolimerizzazione della tubulina

1.1.1.a Taxani

I componenti di questa classe sono alcaloidi di origine naturale come il paclitaxel (Taxol[®]), estratto per la prima volta da Wall e Wan⁶ dalla corteccia di alcuni alberi di *Taxus brevifolia* del Pacifico.

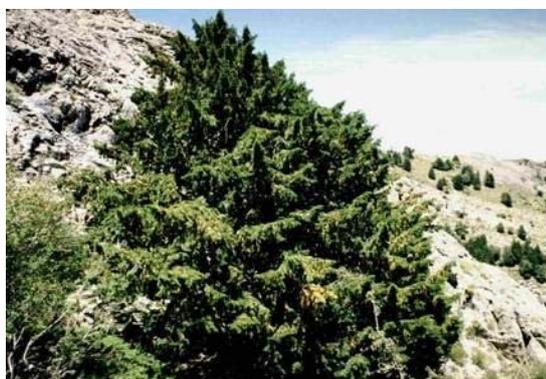
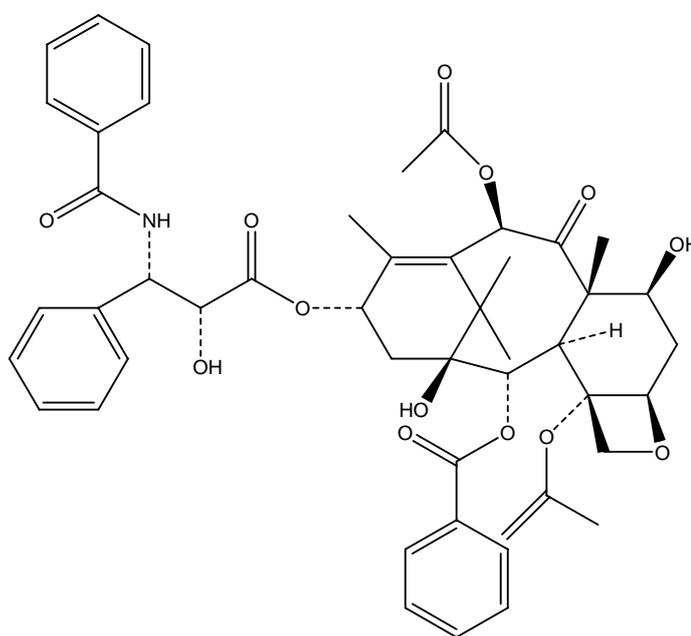


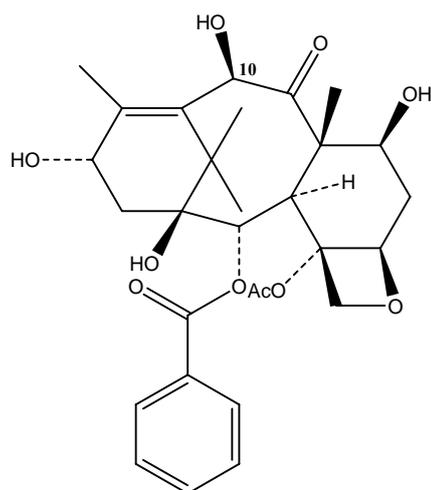
Fig. 2- albero di *Taxus brevifolia*

Il Paclitaxel **1** fa parte della classe dei diterpeni ed è composto da due strutture principali: un sistema taxanico, riscontrabile in tutti i taxani e una catena laterale derivante dalla esterificazione del gruppo ossidrilico posto sul carbonio-13 del sistema taxanico. La peculiarità del paclitaxel, che lo distingue dagli antimitotici inibitori della polimerizzazione della tubulina, tipo la colchicina, sta nel suo particolare meccanismo d'azione⁷. Questa molecola, infatti, si lega alla subunità β dell'eterodimero della tubulina, accelerando la polimerizzazione della tubulina stessa ed allo stesso tempo stabilizzando i microtubuli formati, inibendone la depolimerizzazione. L'inibizione della depolimerizzazione dei microtubuli tra la profase e l'anafase della mitosi porta all'arresto del ciclo di divisione cellulare, con la conseguente morte delle cellule cancerose. Attualmente il paclitaxel è approvato dalla FDA (Food & Drug Administration) per il trattamento del cancro alle ovaie in stato avanzato e del cancro metastatico al seno. Il primo problema che si è dovuto affrontare, riguardo all'estrazione del paclitaxel dalla corteccia del tasso, è stato quello dell'approvvigionamento del

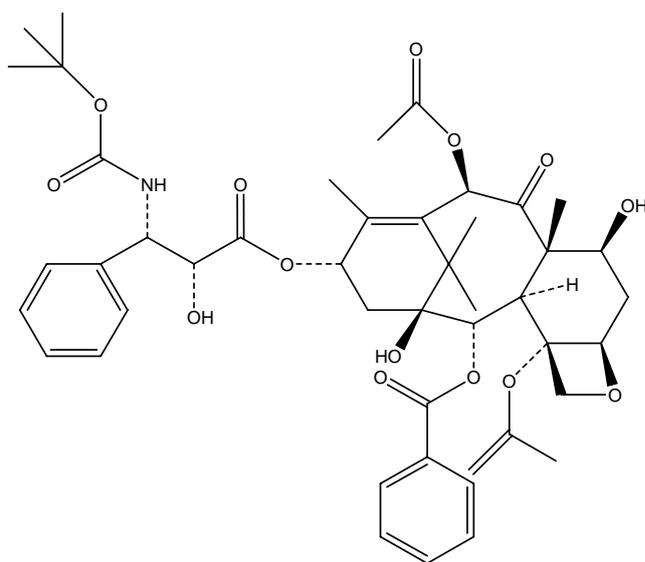
principio attivo, in quanto l'estrazione avrebbe comportato alti costi e basse rese, oltre alla rapida estinzione della specie. Tale ostacolo è stato superato con la scoperta della 10- deacetilbaccatina III **2** (DAB)⁸, un diterpenoide che include il complesso sistema tetraciclico del paclitaxel e che viene isolato con buone rese da diverse parti della pianta del tasso europeo (*Taxus baccata*). In questo modo la semisintesi del paclitaxel a partire dal composto **2** consente un migliore approvvigionamento del farmaco, oltre a favorire lo sviluppo di nuovi tassoidi con migliori proprietà farmacologiche, come lo stesso docetaxel **3**, che presenta più elevata citotossicità del paclitaxel⁹ verso alcune linee tumorali. Il derivato semisintetico docetaxel (Taxotere®), è utilizzato nella terapia del tumore polmonare non a piccole cellule. Malgrado la loro grande efficacia, l'utilizzo in terapia di tali composti è limitato dalla loro bassa disponibilità per via orale, dalla loro tossicità e dalla comparsa di fenomeni di resistenza. Attualmente è in fase II di studio clinico la molecola ortataxel **4**, che risulta attiva sia per via orale sia intravenosa anche su modelli tumorali resistenti ai taxani¹⁰.



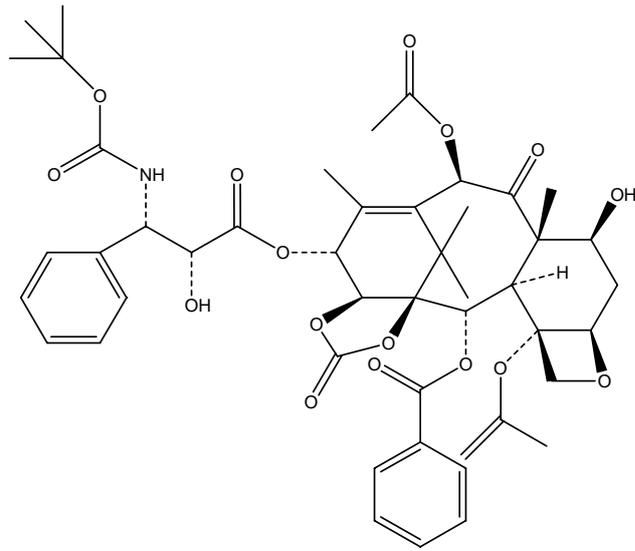
1 Paclitaxel (Taxol®)



2 10- deacetyl baccatina III



3 Docetaxel



4 Ortaxel

1.1.2 Inibitori della polimerizzazione della tubulina

Gli inibitori della polimerizzazione della tubulina possono essere divisi in due sottocategorie in funzione dei loro siti di legame alla tubulina stessa. Si possono infatti legare sia a livello del sito di legame della colchicina, che si trova sul lato degli eterodimeri rivolto verso il lume del microtubulo tra i due monomeri $\alpha\beta$, sia a livello del sito di legame degli alcaloidi della *Vinca*, che si trova su o vicino al sito di contatto longitudinale tra due dimeri di tubulina, sul monomero β .

1.1.2.a Agenti che si legano sul sito della colchicina

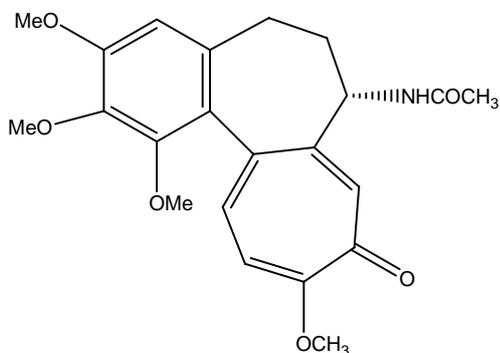
La colchicina **5** è un alcaloide originariamente estratta dalle piante del genere *Colchicum*, in particolare il *Colchicum autumnale* L. Questa pianta appartenente alla famiglia delle Colchicaceae, contiene alcaloidi bioattivi come la colchicina ed il suo analogo naturale tiocolchicina che inibiscono la polimerizzazione della tubulina e di conseguenza bloccano la mitosi¹¹.



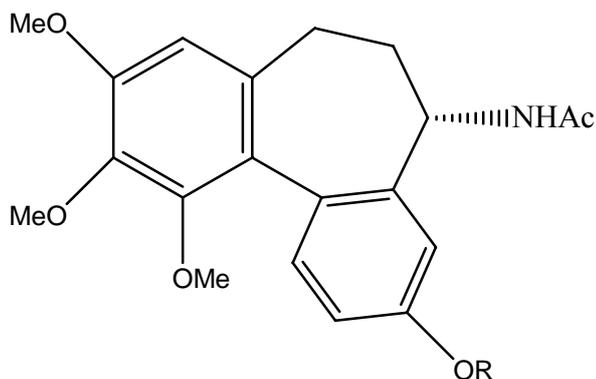
Fig. 3- fiori di *Colchicum autumnale* L.

L'attività antimitotica della colchicina è stata scoperta da 60 anni, ma la molecola non può essere utilizzata in terapia per la sua elevata tossicità. È utilizzata in clinica nel trattamento di crisi di gotta e per la cura della Febbre Mediterranea Familiare. Nel quadro della ricerca di nuovi agenti tumorali, la scoperta della colchicina ha reso possibile la sintesi di numerosi derivati, tra i quali i più attivi sono ZD6126 **6**, profarmaco fosfato dell'alcolcolchinolo o *N*-actilcolchinolo, i colchicinoidi¹² **7** che mostrano una buona attività sulle linee cellulari KB. Inoltre è stato evidenziato che la rimozione dei tre metossili dalle colchicine e dalla tiocolchicine¹³ per ottenere le

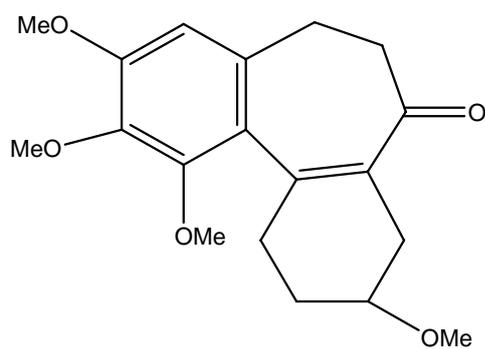
molecole **8, 9, 10**, non determina una interazione più lunga con la tubulina ma porta alla formazione di composti che inibiscono la topoisomerasi II, risultando attivi *in vitro* sul tumore osseo ed il tumore al seno¹⁴.



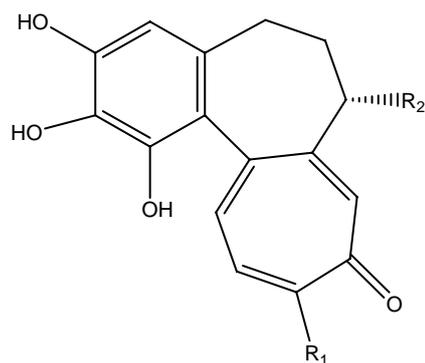
5 Colchicina



6 ZD6126; R=PO₃H₂



7 Colchinoide



- 8** R₁=SCH₃, R₂=NHCOCH₃
9 R₁=NHCH₃, R₂=NHCOCH₃
10 R₁=NHCOC₆H₅Cl, R₂=NHCOCH₃

1.1.2 b Podofillotossine

Le podofillotossine sono composti estratti principalmente dal *Podophyllum peltatum* L. (*Podofillo* o *mandragola*), una pianta erbacea perenne della famiglia delle Berberidaceae.



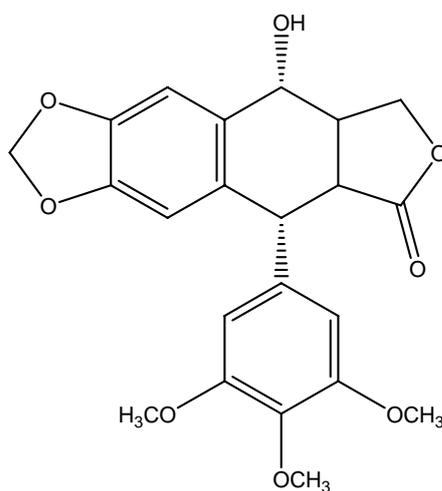
Fig. 4- fiore del *Podophyllum peltatum*

La podofillina, una resina ottenuta dall'estratto alcolico dei rizomi di *Podophyllum* era usata per il trattamento delle verruche ed è stata inclusa nella Farmacopea americana dal 1820 al 1942, ma poi fu rimossa per la sua elevata tossicità¹⁵. Nel 1880 la podofillotossina **11**, che presenta il motivo strutturale trimetossifenile della colchicina, fu isolata dai rizomi del *Podophyllum peltatum*. La podofillotossina compete con la colchicina per il blocco dei microtubuli, inoltre rispetto alla colchicina si lega a questo sito più rapidamente e con maggiore affinità. Sebbene avesse una buona azione antineoplastica, gli studi clinici sono falliti nel 1970 a causa della sua elevata tossicità; è servita però da modello per la sintesi di numerosi derivati. I derivati semisintetici

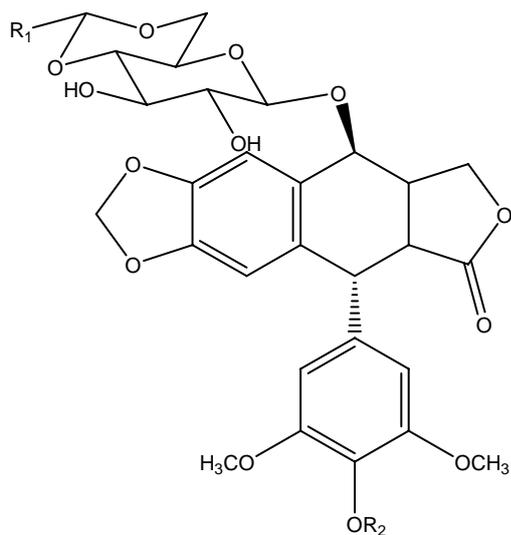
etoposide e teniposide **12** e **13**, rappresentano un classe di farmaci attivi contro una varietà di linfomi (tra cui il linfoma di Hodgkin) e contro il cancro del testicolo, il cancro del polmone (in particolare a piccole cellule) e la leucemia acuta¹⁶⁻¹⁸. Il loro meccanismo d'azione consiste nel bloccare le cellule nell'ultima parte della fase S e G2 del ciclo cellulare, inibendo la topoisomerasi II e, quindi, bloccando la sintesi del DNA¹⁹. Le caratteristiche strutturali essenziali delle più importanti podofillotossine sono:

- un gruppo tetraciclico ABCD quasi planare;
- un anello aromatico E posto in posizione 1;
- quattro centri di asimmetria adiacenti;
- proprietà stereochimiche legate al carbonio 4, che fanno sì che una determinata classe di composti abbia o meno affinità per la tubulina.

Questi composti sono però poco solubili in acqua, pertanto si potrebbe avere la precipitazione di questi farmaci durante una somministrazione intravenosa²⁰. Per ovviare a questo problema sono stati sintetizzati²¹ l'etoposide fosfato **14**, diversi analoghi 4-alchilammino e 4-arilammino dell'epipodofillotossina²²⁻²³, che mostrano una maggiore inibizione della topoisomerasi II.



11 Podofillotossina



12 Etoposide, $R_1 = \text{Me}$ $R_2 = \text{H}$

13 Teniposide, $R_1 =$  $R_2 = \text{H}$

14 Etopofos, $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{PO}_3\text{H}_2$

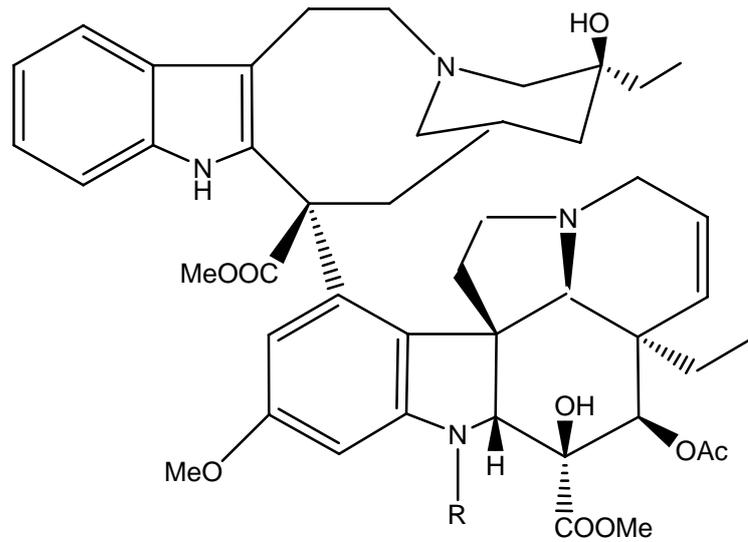
1.1.2.c Agenti che si legano al sito degli alcaloidi della Vinca

La pervinca del Madagascar (*Catharanthus roseus* G. Don o *Vinca rosea* L.) della famiglia delle Apocinaceae, è una pianta usata in passato nella medicina popolare per bloccare la secrezione del latte e per la cura del diabete.



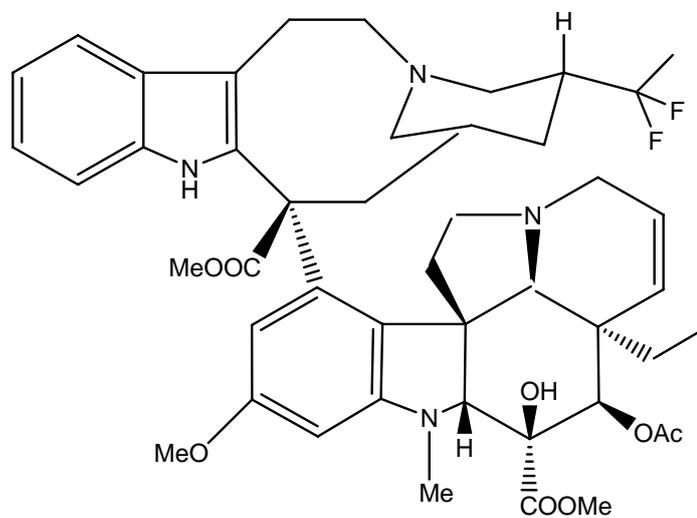
Fig. 5- fiore della *Vinca*

Sottoposta a dettagliati studi per la determinazione dell'attività ipoglicemizzante, non ha però rivelato negli animali alcuna azione sulla glicemia, mentre ha aumentato la suscettibilità degli animali stessi nei confronti delle infezioni batteriche. Tale osservazione ha indotto i ricercatori a identificare eventuali composti presenti nella droga ad azione immunosoppressiva; sono stati così isolati e caratterizzati alcuni alcaloidi dimerici indolici, provvisti di attività antileucemica, tra cui la vincristina e la vinblastina o vincalécoblastina (**15** e **16**), oggi farmaci di elezione nel trattamento delle leucemie.



15 Vincristina R= CHO

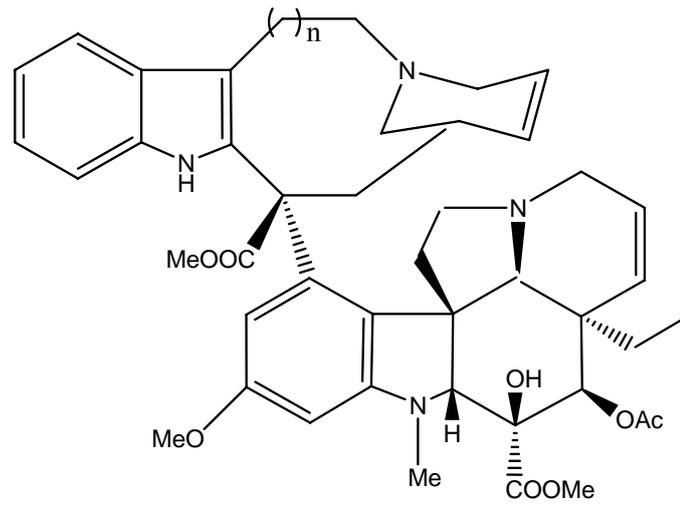
16 Vinblastina R= CH₃



17 Vinflunina

Gli alcaloidi della vinca sono farmaci ciclo-specifici e, come altri farmaci quali la colchicina e la podofillotossina, bloccano la mitosi con arresto in metafase. Altri derivati più recenti, la vinflunina **17** e l'anidrovindblastina **18** presentano profili di tossicità migliorati e sono attualmente in fase di sperimentazione clinica. L'incubazione

delle cellule con vinblastina, determina dissoluzione dei microtubuli e formazione di cristalli molto regolari. A causa della disgregazione dell'apparato mitotico, la divisione cellulare si arresta in metafase. In assenza di un fuso mitotico intatto, i cromosomi possono disperdersi nel citoplasma o aggregarsi in strani raggruppamenti, come sfere o stelle. Chiaramente l'incapacità a segregare i cromosomi in maniera corretta durante la mitosi, porta, infine, alla morte cellulare. La vinblastina **16** è impiegata principalmente nel trattamento del morbo di Hodgkin, una neoplasia che colpisce il sistema linfatico, la milza ed il fegato, ma anche in altre forme maligne, quali carcinoma mammario, carcinoma della vescica, melanoma e carcinoma testicolare²⁴. La vincristina **15**, invece, molto più usata della vinblastina, è particolarmente utile nella cura delle leucemie dell'infanzia²⁵, ed è anche impiegata in molte associazioni tra farmaci antitumorali nel trattamento di sarcomi dei tessuti molli, sarcoma osteogenico e tumori cerebrali. Derivato semisintetico della vinblastina, che sta acquistando sempre maggiore interesse, è la vinorelbina **19**; le modificazioni strutturali che la caratterizzano ne consentono una somministrazione per via orale²⁶, a differenza della vinblastina e della vincristina, disponibili solo per via endovenosa. Il meccanismo di azione della vinorelbina è identico a quello degli altri alcaloidi della vinca, ma la più bassa affinità per i microtubuli neuronali rispetto a quelli mitotici, ne spiega la diminuita incidenza di neurotossicità paragonata a quella della vincristina. L'alcaloide è stato studiato nel trattamento di pazienti affetti da cancro al polmone, sia come singolo agente terapeutico, in grado di migliorare la qualità di vita e la sopravvivenza dei pazienti, sia in combinazione con il cisplatino, portando ad un significativo aumento della risposta ed un'augmentata sopravvivenza, se paragonata al solo cisplatino. Attualmente è oggetto di studio come trattamento per il tumore al seno resistente alle antracicline, per il morbo di Hodgkin e per il cancro alle ovaie²⁷.



18 Anidrovinblastina $n=2$

19 Vinorelbina $n=1$

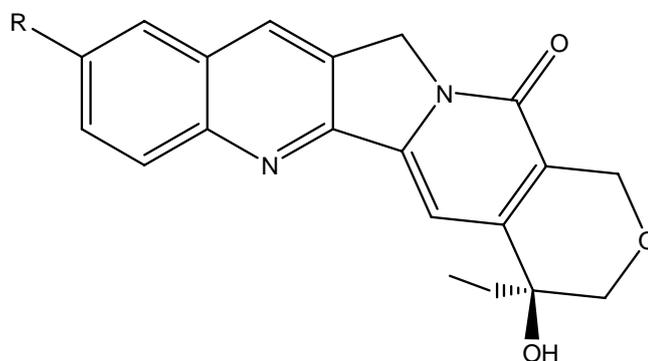
1.1.2.d Le camptotecine

La *Camptotecha acuminata* Decne è un albero della famiglia delle Nyssaceae, originaria di Cina e Tibet²⁸.



Fig. 6- pianta di *Camptotecha acuminata* Decne

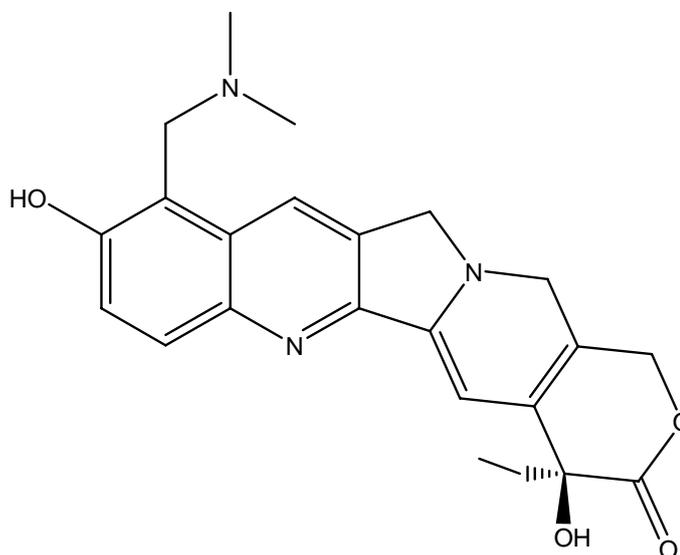
La camptotecina **20** è un alcaloide pentaciclico naturale estratto da tale pianta, la cui principale attività citotossica dipende dall'interazione con l'enzima topoisomerasi I, che è responsabile della riduzione della tensione torsionale nel DNA superavvolto. Le camptotecine, infatti, si legano e stabilizzano il legame tra topoisomerasi I e DNA²⁹, consentendo il taglio dell'acido nucleico da parte della topoisomerasi, ma inibendo la successiva richiusura dell'elica e determinando l'accumulo di filamenti singoli di DNA e conseguente morte cellulare³⁰. In Cina, il prodotto naturale 10-idrossicamptotecina **21**, è usato per il trattamento di diversi tumori, in quanto presenta un migliore indice terapeutico rispetto all'analogo naturale non idrossilato.



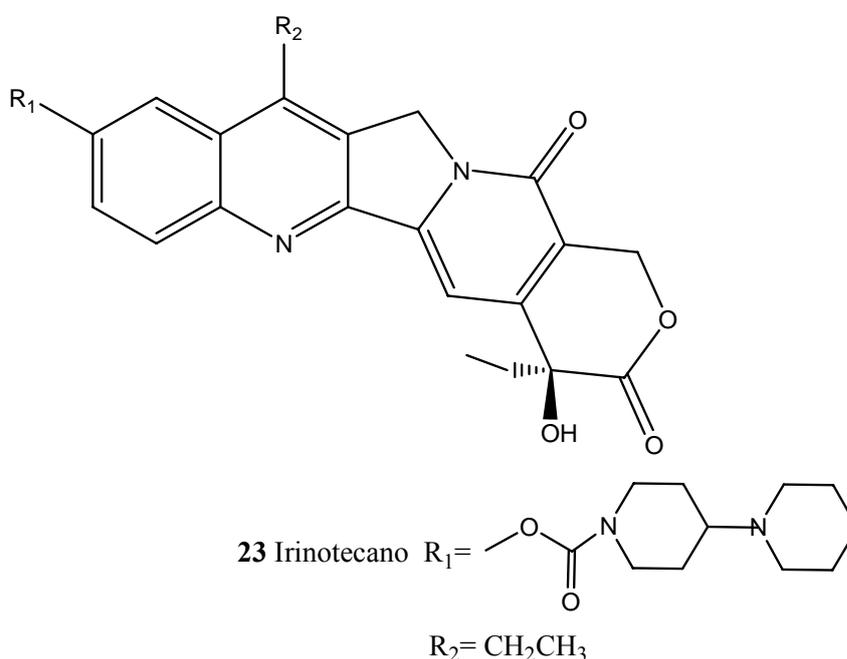
20 Camptotecina R= H

21 10- idrossicamptotecina R= OH

Dal momento che entrambi i composti hanno scarsa solubilità in acqua ed elevata tossicità, analoghi semisintetici come il topotecano **22** e l'irinotecano **23** (pro-farmaco) sono stati recentemente sperimentati³¹⁻³².

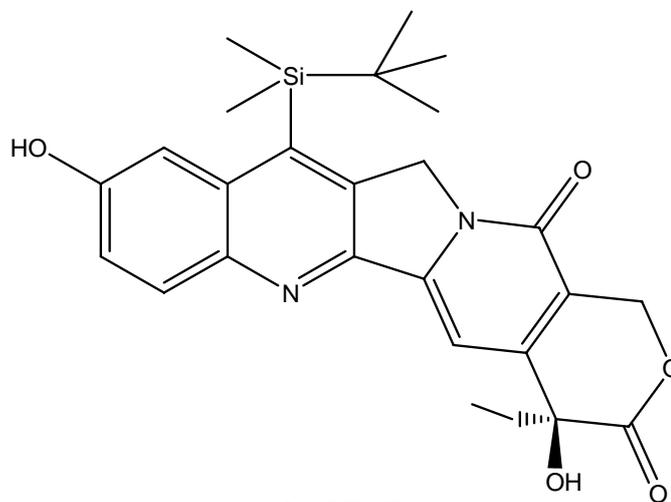


22 Topotecano

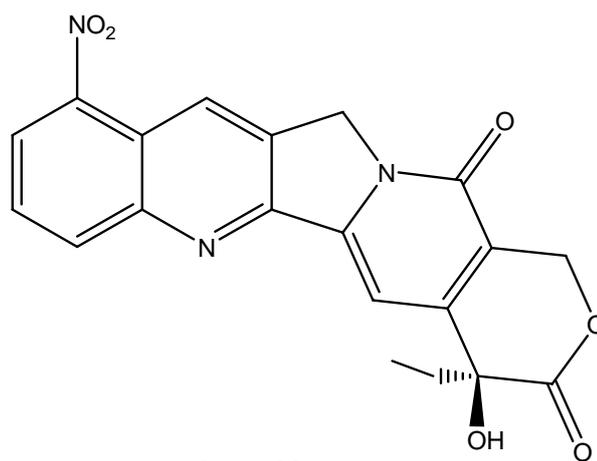


Sono stati ottenuti buoni risultati nel trattamento di neoplasie ovariche metastatizzate, comprese quelle resistenti al cisplatino, del carcinoma del colon e del retto, compresi quelli non responsivi al 5-fluorouracile e del carcinoma del polmone e del pancreas¹⁹. Studi successivi hanno portato alla sintesi di camptotecine coniugate come le camptotecine coniugate con le epipodofillotossine³³ che inibiscono sia la topoisomerasi I che la topoisomerasi II. DB-67 (**24**, un 7-sililcamptotecano)³⁴ e

rubitecano (**25**, 9-nitrocamptotecina)³⁵, sono i nuovi analoghi del capostipite, utilizzati nei trials clinici della terapia antitumorale.



24 DB-67



25 Rubitecano

Bibliografia

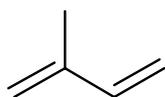
1. Harwell WB (1982). Unusual presentation of North American blastomycosis. *J Tenn Med Assoc* 75(1), 20-1.
2. Cragg GM and Newman DJ (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100(1-2), 72-9.
3. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66(7), 1022-37.
4. Cragg GM and Newman DJ (1999). Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest* 17, 153-63.
5. Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR (1984). Plant-derived natural products in drug discovery and development: an overview. In Human Medicinal Agents from Plants. Edited by Beck WT. Alkaloids. In Antitumor drug resistance. Berlin Springer-verlag; 589.
6. Wani MC, Taylor HI, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol a novel antileukemia and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93, 2325-27
7. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentration. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9552.
8. Kingston DG, Hawkins DR, Ovington L (1982). New taxanes from *Taxus brevifolia*. *J Nat Prod* 45(4), 466-70.
9. Cheson BD, Arbuck SG, Phillips PH (1993). Clinical trials referral resource. Clinical trials with ocetaxel (Taxotere). *Oncology* 7(9), 51-2.
10. Geney R, Chen J, Ojima I (2005). Recent advances in the new generation taxane anticancer agents. *Med Chem* 1, 125-39
11. Brossi A (ed) (1984). The alkaloids. Academic, New York, Ch 23
12. Shi Q, Brossi A, Verdier-Pinard P, Hamel E, McPhail AT, Lee KH (1998). Antitumor agents 184. Synthesis and antitubulin activity of compounds derived from reaction of thiocolchicone with amines, lactams, alcohols, and ester analogs of allothiocolchinoids. *Helv Chim Acta* 81, 1023-37
13. Guan J, Zhu XK, Tachibana Y, Bastow KF, Brossi A, Hamel E, Lee KH (1998). Antitumor agents. 185. Synthesis and biological evaluation of tridemethylthiocolchicine analogues as novel topoisomerase II inhibitors. *J Med Chem* 41, 1956-61

14. Bastow KF, Tatematsu H, Bori ID, Fukushima Y, Sun L, Goz G, Lee KH (1993). Introduction of reversible protein-linked DNA breaks in human osteogenic sarcoma cells by novel cytotoxic colchicine derivatives which inhibit DNA topoisomerase II in vitro absence of cross-resistance in a colchicine-resistant subclone. *Bioorg Med Chem Lett* 3, 1045–50
15. Imbert TF (1998). Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 80, 207–22
16. Lee KH, Imamura Y, Haruna M, Beers SA, Thurston LS, Dai HJ, Chen CH, Liu SY, Chan YC (1989). New cytotoxic 4-alkylamino analogs of 4'-demethyl-epipodophyllotoxin as inhibitors of human DNA topoisomerase II. *J Nat Prod* 52, 606–13
17. Wu WL, Chang WL, Chen CF (1991). Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines. *Am J Chin Med* 14, 207–16
18. Chang JY, Han FS, Liu SY, Wang HK, Lee KH, Cheng YC (1991). Effect of 4- β -arylamino derivatives of 4'-O-demethylpodophyllotoxin on human DNA topoisomerase II, tubulin polymerization, KB cells, and their resistant variants. *Cancer Res* 51, 1755–59
19. *Farmacologia generale e clinica* di Bertram G. Katzung, Piccin editore.
20. Cho SJ, Trosha A, Suffness M, Chen YC, Lee KH (1996). Three dimensional quantitative structure–activity relationship study of 4'-O-demethylepipodophyllotoxin analogs using the modified CoMF/q2-GRS approach. *J Med Chem* 39, 1383–85
21. Zheng J, Wang HK, Bastow KF, Zhu XX, Cho SJ, Cheng YC, Lee KH (1997). Antitumor agents. Design, synthesis, and biological evaluation of novel etoposide analogs bearing pyrrololecarboxamidino group as DNA topoisomerase II inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 7, 607–12.
22. Zhu XK, Guan J, Tachibana Y, Bastow KF, Cho SJ, Chen HH, Cheng YC, Gurwith M, Lee KH (1999). Antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of 4 β -mono-, di-, and trisubstituted aniline-4'-O-demethylpodophyllotoxin and related compounds with improved pharmacological profiles. *J Med Chem* 42, 2441–46.
23. Xiao Z, Xiao YD, Feng J, Golbraikh A, Tropsha A, Lee KH (2002). Modeling of epipodophyllotoxin derivative using variable selection k nearest neighbor QSAR method. *J Med Chem* 45, 2294–09.

24. Porter P (1989). The synthesis of navelbine prototype of a new series of vinblastine derivatives. *Sem Oncol* 16, 2–4.
25. Jenks S, Smigel K (1996). Updates: cancer drug approved, new leukemia treatment. *J Natl Cancer Inst* 87, 167–70.
26. Vlahov IR, Santhapuram HKR, Kleindl PJ, Howard SJ, Stanford KM, Leamon CP (2005). Design and regioselective synthesis of a new generation of desacetylvinblastine monohydrazide. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 5093–6.
27. Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA (2003). The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Mol Cancer Ther* 2, 427–36.
28. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA (1966). Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc* 88, 3888–90.
29. Hsiang Y, Hertzberg R, Hecth S, Liu LF RP (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260, 14873–8.
30. Covey JM, Jaxel C, Konn KW, Pommer Y (1989). Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res* 49, 5016–22
31. Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM (2001). Irinotecan in treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol* 19, 1501–18.
32. Wang HK, Liu SY, Hwang KM, Taylor G, Lee KH (1994). Synthesis of novel water soluble 7-(aminoacylhydrazone)-formyl camptothecins with potent inhibition of DNA topoisomerase I. *Bioorg Med Chem* 2, 1397–1402.
33. Bastow KF, Wang HK, Cheng YC, Lee KH (1997). Antitumor agents 173. Synthesis and evaluation of camptothecin-4 β amino-4'-O-demethyl epipodophyllotoxin conjugates as inhibitors of mammalian DNA topoisomerases and as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem* 5, 1481–88.
34. Du W, Kaskar B, Blumbergs P, Subramanian PK, Curran DP (2003). Semisynthesis of DB-67 and other silatecans from camptothecin by thiol-promoted addition of silyl radicals. *Bioorg Med Chem* 11, 451–8.
35. Clark JW (2006). Rubitecan. *Expert Opin Investig Drugs* 15, 71–79.

Capitolo 2 Terpeni: chimica, biosintesi e proprietà biologiche

I terpeni sono una grande classe di composti presenti in natura come metaboliti secondari di piante e animali. Il termine *terpene*, inizialmente usato per definire isomeri idrocarburici di formula generale $C_{10}H_{16}$ contenuti nell'olio di trementina, fu coniato da Kekulé nel 1866. Una definizione biogenetica di questi composti è stata data verso il 1953 e Ruzicka ha avuto una parte fondamentale nel gettare le basi di quella che ancora oggi viene chiamata **regola isoprenica**.



La regola dell'isoprene stabilisce che i terpeni sono prodotti naturali costituiti da unità di isoprene legate insieme testa-coda¹.

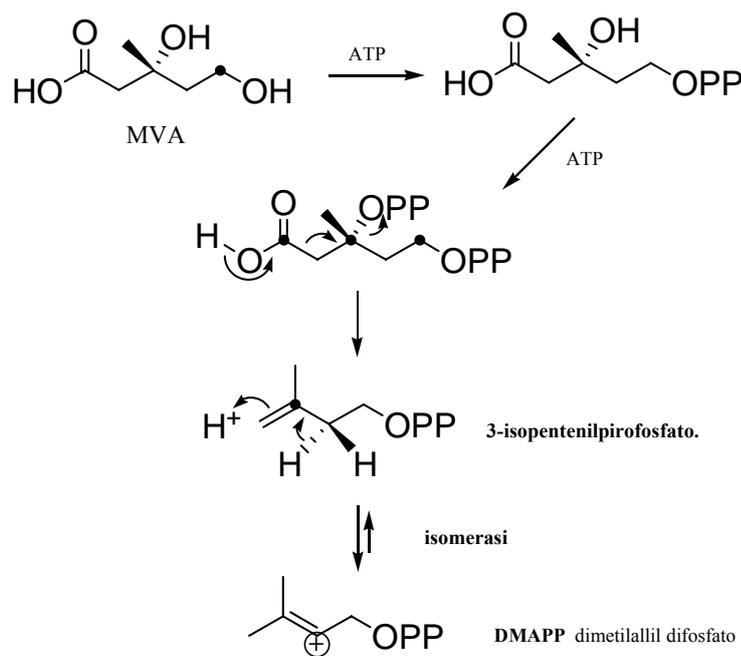
Ulteriori sviluppi nella chimica dei terpenoidi si ebbero quando si capì che alcuni sesquiterpeni potevano essere ottenuti per ciclizzazione acida del nerolidolo o del farnesolo, aprendo la strada alla comprensione della biogenesi del colesterolo. Questi sviluppi, insieme alla scoperta di composti che non seguono la classica regola dell'isoprene, portarono ad una formulazione più generale, secondo cui: "Terpeni sono quei composti formati dalla combinazione di unità isopreniche per dare composti alifatici come il geraniolo, farnesolo, geranilgeraniolo, squalene e altri dello stesso tipo che possono derivare da questi per ciclizzazione ed in alcuni casi tramite meccanismi di riarrangiamento".

Questa considerazione costituisce una importante teoria unificatrice, ma non permetteva di identificare i precursori biogenetici. I precursori degli isoprenoidi sono rimasti ambigui fino a quando, per puro caso, è stato dimostrato che l'acido mevalonico poteva essere un fattore che sostituiva l'acetato di sodio per lo sviluppo di alcuni batteri². Dopo questa scoperta c'è stata una rapida convergenza di studi chimici, biochimici ed enzimatici particolarmente legati al lavoro di Cornforth e Lynen. Nel discutere la biogenesi degli isoprenoidi verrà considerata per prima l'origine dell'unità isoprenica, la sua polimerizzazione e poi le altre reazioni della catena isoprenica.

La sintesi degli isoprenoidi si realizza in tre fasi successive:

- 1) *sintesi dell'acido mevalonico a partire da esteri tiolici*
- 2) *formazione delle catene poliisopreniche via derivati fosforilati*
- 3) *ciclizzazione*

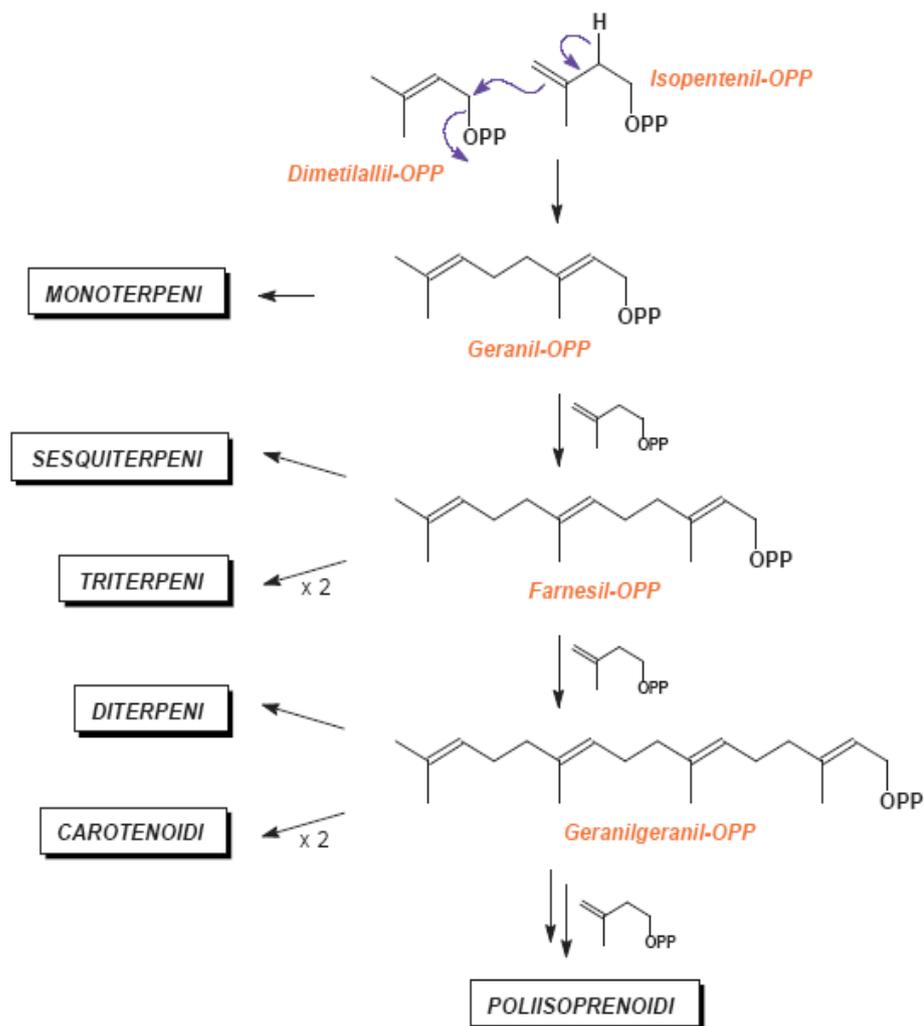
Una volta ottenuto, l'acido mevalonico è fosforilato tramite ATP a 5-difosfomevalonato, e poi disidratato e decarbossilato tramite l'intermedio 3-fosfo-5-difosfomevalonato per dare l'isopentenildifosfato (IDP), formando così il mevaloil pirofosfato². Uno dei passaggi chiave in questo processo biosintetico è la reazione di eliminazione e decarbossilazione concertata che subisce il mevaloil pirofosfato, per arrivare al Δ^3 -isopentenilpirofosfato (schema 2)⁴.



Schema 2

Il Δ^3 -isopentenilpirofosfato è l'unità isoprenoidica che per trasposizione protonica si trasforma nel 3,3-dimetilallilpirofosfato, il quale è l'effettivo agente alchilante nella biosintesi degli isoprenoidi e la forma biologica dell'unità isoprenica. La stereochimica di queste reazioni è logicamente sotto controllo enzimatico. Va ricordato ad esempio come il C(2) dell'acido mevalonico fornisca il gruppo metilenico dell'isopentenilpirofosfato ed il gruppo metile *trans* del dimetilallilpirofosfato⁵.

L'acido mevalonico marcato in C(2) è spesso usato come tracciante negli esperimenti e questo permette di effettuare alcune considerazioni sulla possibilità di distinguere il C(2) dal C(6) dell'acido mevalonico in alcuni casi incerti. L'alchilazione del dimetilallilpirofosfato è il mezzo attraverso il quale vengono costruite le unità poliisoprenoidiche (schema 3).

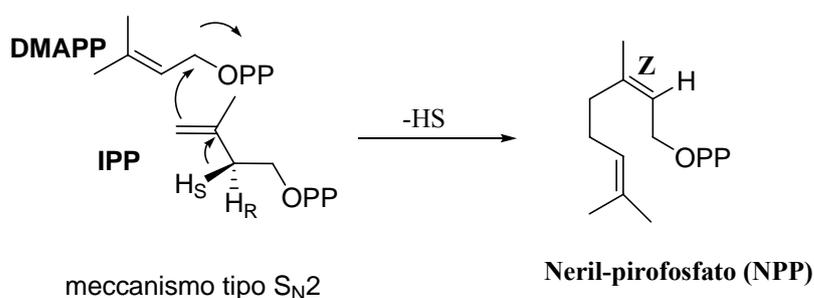
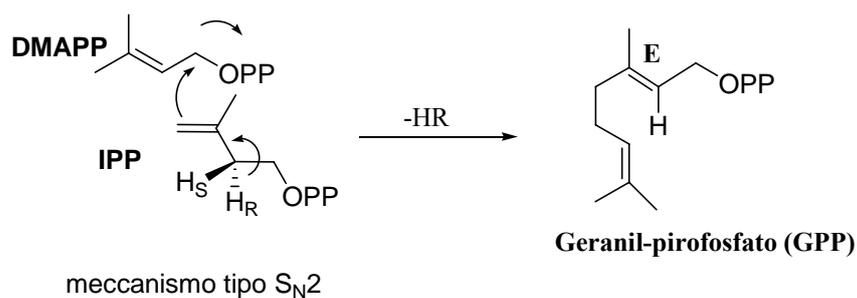


Schema 3

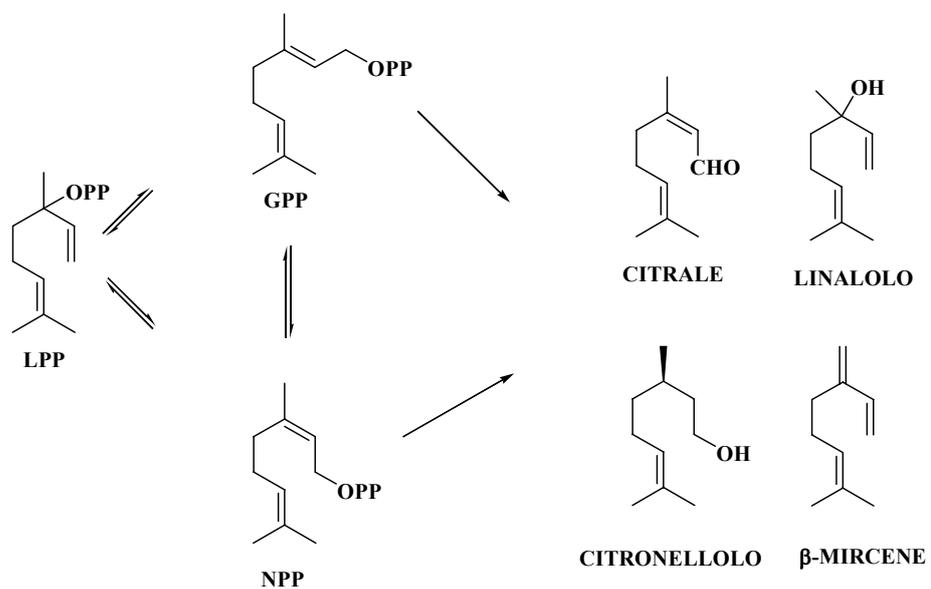
Nello schema sopra riportato è possibile vedere come i terpeni che contengono dieci atomi di carbonio, i *monoterpeni*, provengono per alchilazione del precursore dimetilallilpirofosfato. Il meccanismo di tale reazione prevede che il doppio legame della seconda unità a cinque atomi di carbonio (isopentenilpirofosfato) migri come mostrato, probabilmente con l'assistenza del vicino gruppo pirofosforico che risulta essere un buon gruppo uscente, formando così il **geraniilpirofosfato**³. Dato che questo è ancora un estere allilico, il processo può essere ripetuto con formazione di un'unità a quindici atomi di carbonio, ovvero il **farnesilpirofosfato**, da cui derivano i *sesquiterpeni*, ed a venti atomi di carbonio, il **geraniilgeraniilpirofosfato**, da cui derivano i *diterpeni*. Nella formazione delle gomme (*poliisoprenoidi*) il processo prosegue indefinitamente, ma per la formazione di unità a trenta atomi di carbonio, i *triterpeni*, concorrono due unità a quindici atomi di carbonio^{1,2}.

2.2 Monoterpeni

Tutti i monoterpeni naturali derivano biogeneticamente da un precursore comune, il geranilpirofosfato; devono quindi contenere dieci atomi di carbonio e possedere uno scheletro carbonioso in accordo alla regola isoprenica. Fino ad ora sono stati isolati ed identificati oltre 500 monoterpeni che differiscono tra loro per lo scheletro carbonioso e per il grado di funzionalizzazione. Sono presenti scheletri aciclici e ciclici (mono-, bi-, e triciclici) con anelli da tre a sette termini. Come riportato nello schema seguente, il processo biosintetico dei monoterpeni prevede l'interazione tra l'isopentenilpirofosfato (IPP) e il dimetilallilpirofosfato (DMAPP) con formazione di due isomeri geometrici quali il geranilpirofosfato (GPP) ed il nerilpirofosfato (NPP)^{1,6}.

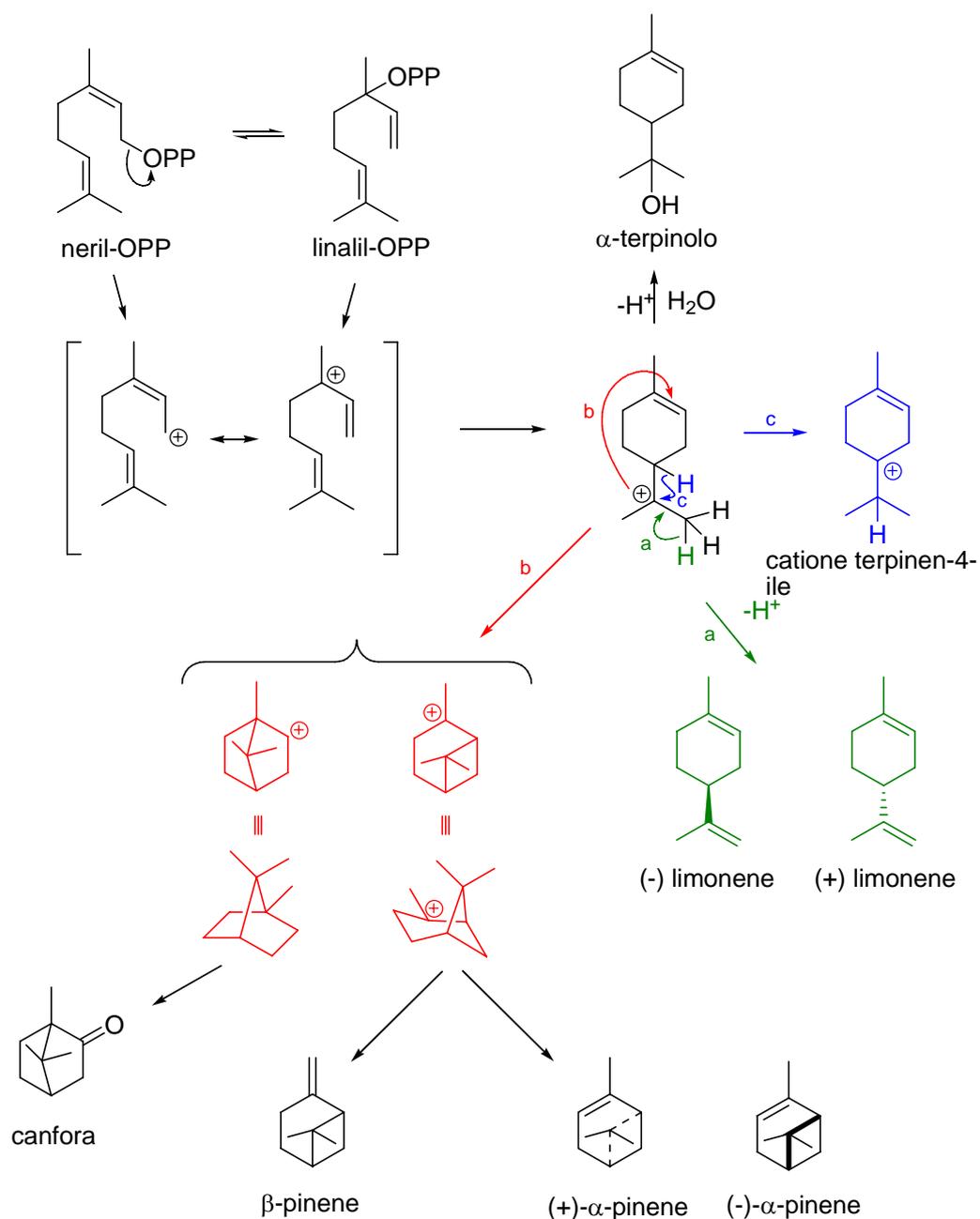


Esiste inoltre un ulteriore isomero (non geometrico) lineare: il linalilpirofosfato (LPP), il quale potrebbe essere un precursore alternativo al NPP e GPP per la biosintesi di altri monoterpeni. Il **GPP**, il **NPP** ed il **LPP** sono interconvertibili fra di loro e possono dar luogo alla formazione di un potenziale carbocatione in seguito alla fuoriuscita del gruppo pirofosfato (OPP), che è un buon gruppo uscente, conducendo a tutta una serie di monoterpeni sia lineari che ciclici (schema 4)⁷.



Schema 4: *Interconversione tra GPP, NPP e LPP e trasformazione in monoterpeni lineari.*

Parallelamente si possono avere processi di propagazione che coinvolgono scheletri monoterpenici chiave, i quali a loro volta sono coinvolti contemporaneamente nella formazione di diversi altri monoterpeni apparentemente anche molto diversi tra di loro⁷ (schema 5).



Schema 5

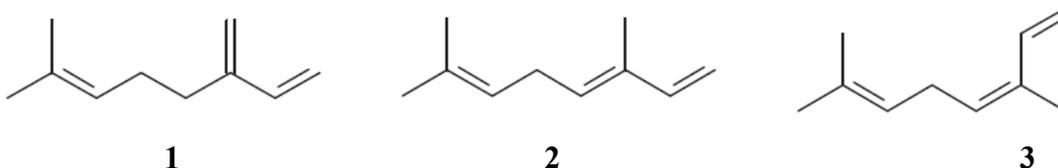
2.2.1 Monoterpeni negli oli essenziali

I componenti dell'aroma sono nella maggior parte dei casi metaboliti secondari prodotti da organismi vegetali ed animali; qualità e quantità di aroma dipendono da fattori genetici e possono essere influenzati da problemi di maturazione e di conservazione. L'aroma degli alimenti può essere anche prodotto da processi extracellulari quali ad esempio la fermentazione o trasformazioni chimiche delle sostanze alimentari durante la lavorazione, per degradazione di precursori ad elevato peso molecolare. Le proteine, gli zuccheri ed i grassi presenti negli alimenti sono le tre principali fonti di aromi degli alimenti anche se qualche volta altri precursori quali polifenoli, nucleotidi, pigmenti, vitamine o politerpeni, possono contribuire in certa misura all'aroma totale⁸.

Le vie attraverso le quali vengono formate le sostanze che producono aroma sono caratterizzate da normali reazioni chimiche quali ossidazioni, trasposizioni, frammentazioni e reazioni di condensazione. Il profumo non viene mai attribuito ad un singolo componente, ma alla presenza di più sostanze odorifere che possono essere presenti anche solo in tracce. Fino ad ora sono stati isolati ed identificati altri 2600 singoli componenti che possiedono un aroma, ma questo numero è soggetto a grandi variazioni.

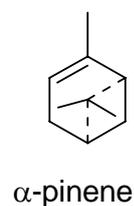
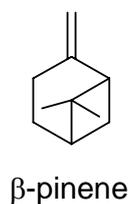
2.2.1.a Monoterpeni aciclici

Il mircene (**1**) come pure i due ocimene isomeri *trans* (**2**) e *cis* (**3**) sono presenti in più di 200 differenti profumi e fragranze e sono particolarmente abbondanti negli oli essenziali di molte specie appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae e delle Asteraceae.

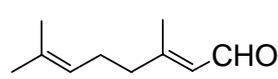
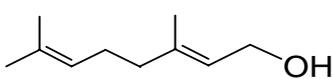
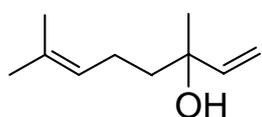


Il mircene (**1**) ed il *trans*-ocimene (**2**) sono stati identificati quali componenti dell'olio essenziale presente nell'*Ocimum basilicum*. Il *cis*-ocimene (**3**) è il componente principale presente nell'olio essenziale estratto dalla *Salvia officinalis* L. A scopi

industriali il mircene ed il cis-ocimene vengono rispettivamente preparati per pirolisi del β -pinene e dell' α -pinene⁹.



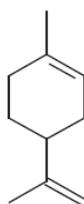
Il linalolo (**4**), il geraniolo (**5**), il nerolo e il citronello sono i derivati ossigenati della serie dei monoterpeni che si ritrovano più frequentemente in natura.



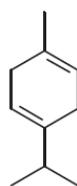
In natura sono anche presenti gli esteri del geraniolo come pure le corrispondenti aldeidi come il citrale.

2.2.1.b Monoterpeni monociclici e biciclici

Il più rappresentativo tra i monoterpeni monociclici è senza dubbio il limonene (**6**) che è presente quale componente di molti aromi. Negli oli essenziali di molte specie di *Citrus* il limonene è presente nella sua forma destrogira ed in alcuni casi raggiunge la concentrazione del 90%¹⁰.

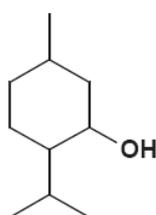


La sua forma enantiomera (levogira) è più comune nelle specie *Mentha* e *Pinus*. In natura sono stati ritrovati molti isomeri del limonene a livello delle insaturazioni, come ad esempio il composto (**7**), che è presente nella *Majorana hortensis* (*Origanum majorana* L.)

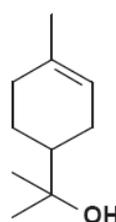


7

La presenza e l'importanza dei derivati ossigenati dei monoterpeni ciclici in natura è nota da tempo. Tra questi il mentolo(8) e l' α -terpineolo (9) sono ad esempio iscritti nella Farmacopea Ufficiale.

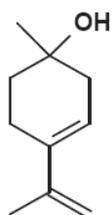


8

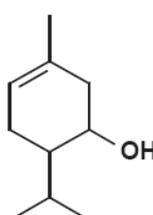


9

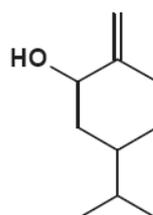
Sono stati isolati ed identificati una serie di monoterpeni monociclici ossigenati isomeri di (9). I composti (10), (11), (12) e (13) sono presenti negli oli essenziali del pepe nero (*Piper nigrum* L.) anche se i veri responsabili dell'aroma del pepe non sono ancora stati identificati.



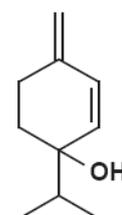
10



11

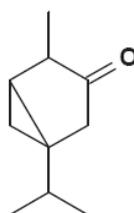


12



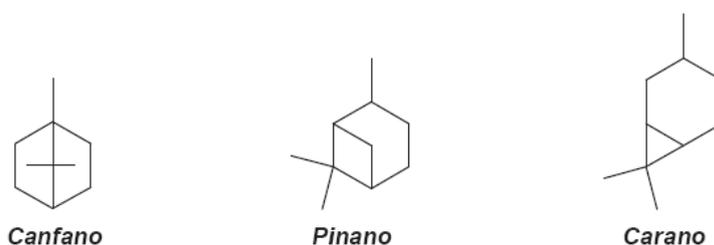
13

Quando la funzione alcolica è primaria sono spesso presenti in natura i corrispondenti composti di natura aldeidica. In natura sono presenti molti composti monoterpenici con uno scheletro biciclico riferibile al tuano. Molti di questi sono presenti nella *Salvia officinalis* L. (es. 14).



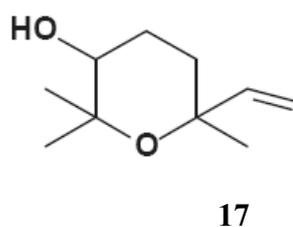
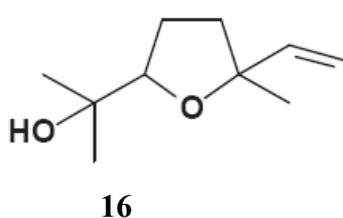
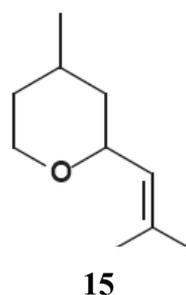
14

Esistono molti altri composti monoterprenici biciclici con scheletri riferibile al pinano, al canfano ed al carano. Molti di questi scheletri possono essere ossigenati, dando origine a composti di estremo interesse commerciale e biologico⁹. A tale proposito basta ricordare la canfora che è iscritta nella nostra Farmacopea Ufficiale.

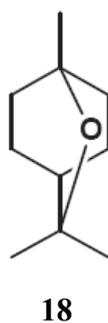


2.2.1.c Eteri e lattoni monoterprenici:

L'importanza degli eteri monoterprenici ciclici come composti che contribuiscono all'aroma, è stata riconosciuta solo durante l'ultima decade ed in particolare dopo la scoperta e l'identificazione del "rose oxide" (**15**) e dei linaloli ossidi (**16**) e (**17**).



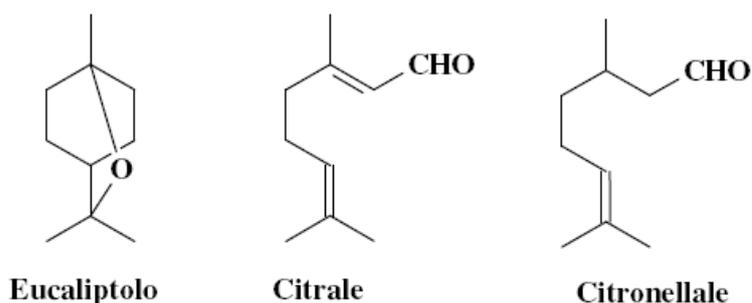
L'etere biciclico (**18**), (1,8-cineolo), noto come eucaliptolo, è presente in molti oli essenziali di varie specie botaniche.



I monoterpeni **(16)** e **(17)** vengono spesso ritrovati accanto al linalolo da cui si originano attraverso un processo iniziale di epossidazione (enzimatica o autossidazione). Questi due terpeni vengono anche trovati in molti oli essenziali delle piante appartenenti al genere *Citrus* e contribuiscono all'aroma di frutta come ad esempio: albicocche, ananas e uva.

2.2.2 Monoterpeni: proprietà biologiche

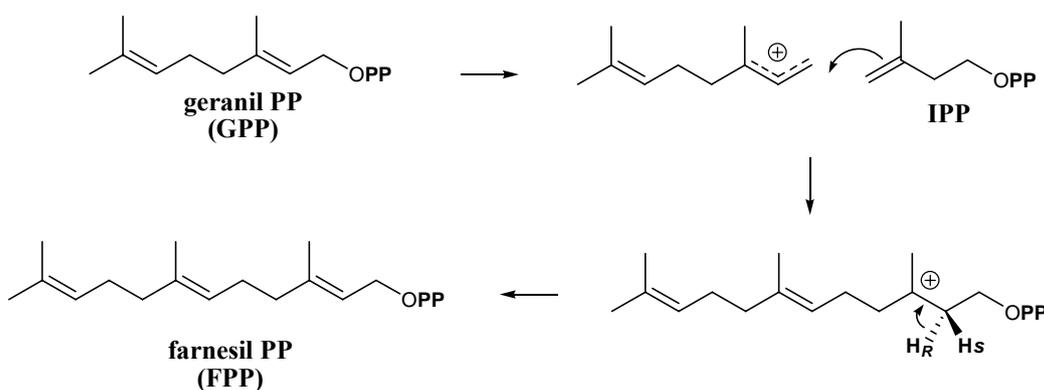
Negli ultimi anni i monoterpeni hanno trovato un largo impiego per le loro proprietà antibatteriche, antifungine e antivirali. Prende sempre più piede l'ipotesi che i monoterpeni vengano prodotti dalle piante come difesa chimica contro insetti, batteri e funghi. Questa affermazione è legata all'osservazione che molti monoterpenoidi hanno una attività insetticida⁹.



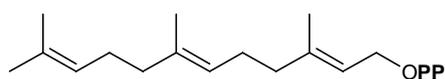
Molti di questi composti sono già stati commercializzati. Un esempio è dato dalla *Citronella*, il componente principale è il citronellale con cui vengono preparate delle candele repellenti per le zanzare. Una classe di insetticidi molto potenti è quella denominata come “piretro”. Il fiore di piretro è il *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae) che è una pianta originaria dell'Est e che viene estratta con solventi, quali il kerosene, e commercializzata proprio come estratto. I principi attivi sono chiamate piretrine e sono innocui per le piante e i mammiferi, ma sono tossici per gli insetti in cui provocano, agendo sul SNC, paralisi. Le piretrine sono derivati in cui è presente una porzione riconducibile ad un crisantemile, monoterpene contenente un anello ciclopropanico e proveniente da una biosintesi coda-coda:

2.3 Sesquiterpeni

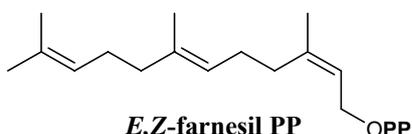
I sesquiterpeni sono metaboliti secondari di piante e funghi che incorporano uno scheletro a quindici atomi di carbonio¹. Il precursore di questi composti è il farnesilpirofosfato, che si origina per condensazione del geranilpirofosfato e dell'isopentenilpirofosfato con meccanismo identico a quello già osservato per i monoterpeni. Caratteristica dei sesquiterpeni è il fatto che essi possono incorporare scheletri molto diversi (a catena aperta, monociclici, biciclici e triciclici) che portano numerose funzioni ossigenate (alcooli, aldeidi, chetoni, acidi etc.) e legami multipli carbonio- carbonio, dando origine a composti con strutture particolarmente complesse³. Il doppio legame vicino al gruppo difosfato può adottare una configurazione *cis* o *trans* (in seguito a ionizzazione)



La diversa configurazione del doppio legame consente diverse possibilità di ripiegamento della catena carboniosa, per la ciclizzazione; evidentemente tutto in funzione dell'enzima coinvolto. Come per i monoterpeni, anche per i sesquiterpeni i carbocationi forniscono una spiegazione razionale di tutti i possibili scheletri che si possono formare⁵.

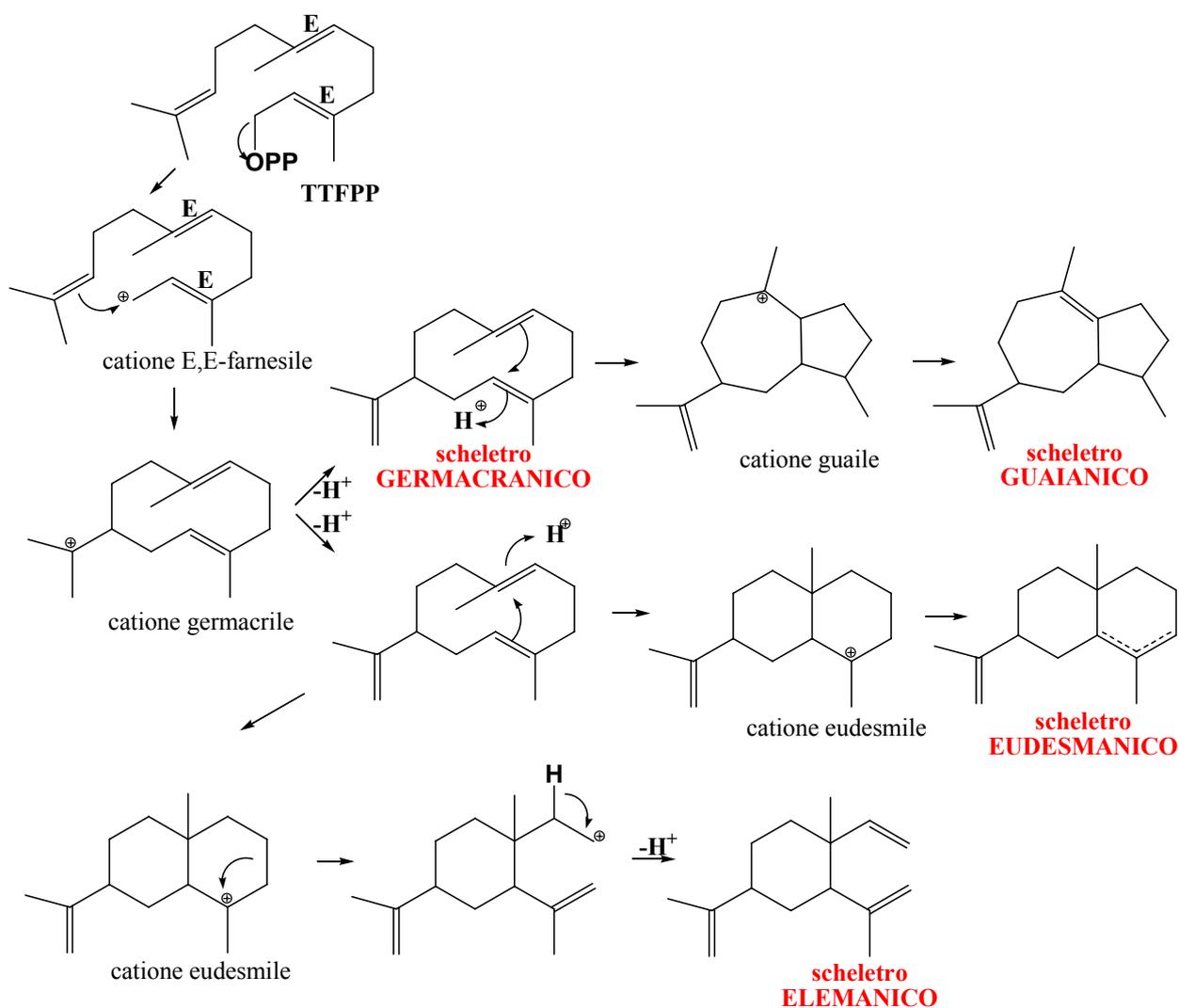


E,E-farnesil PP



E,Z-farnesil PP

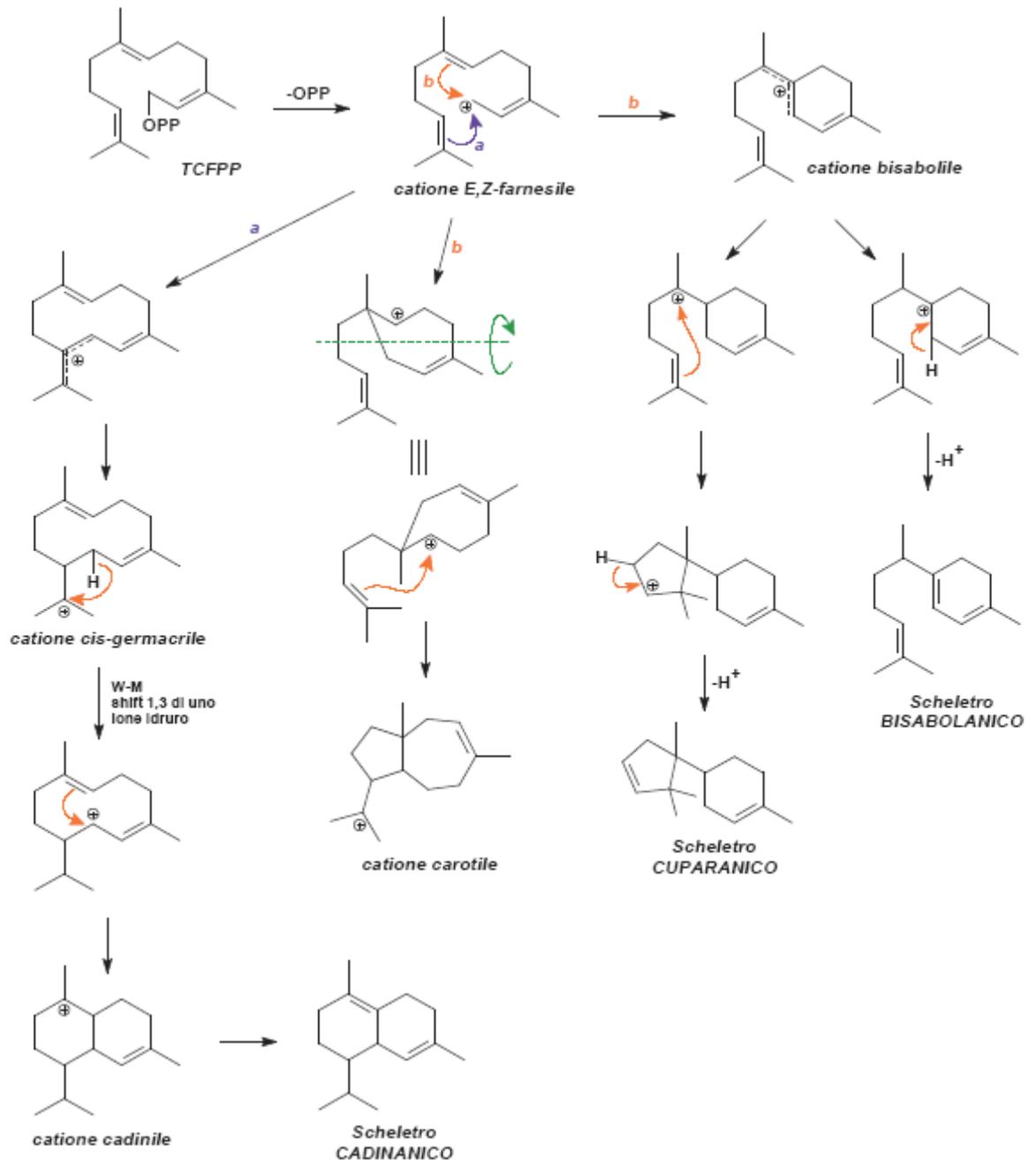
La geometria delle insaturazioni dei due farnesili è responsabile di profonde differenze conformazionali da cui si generano due classi distinte di composti con scheletri carbociclici totalmente differenti come riportato più avanti (schema 6 e 7). Allo stesso modo degli altri composti terpenici, i due farnesil pirofosfati, dopo aver perso il gruppo $-OPP$, possono dare origine a processi di propagazione e di terminazione. Nel caso dei sesquiterpeni i processi di propagazione sono largamente diffusi dando origine a composti che incorporano oltre cento scheletri carbociclici differenti¹. Le vie biosintetiche che compaiono negli schemi sono state nella maggior parte dei casi dimostrate attraverso l'impiego di precursori marcati; altre purtroppo, fino ad oggi, sono frutto di ragionevoli ipotesi biogenetiche.



Schema 6

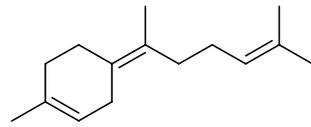
2.3.1 Ipotesi biogenetiche di scheletri sesquiterpenici a partire da TCFPP

Dalla ciclizzazione del catione *trans-cis*-farnesilpirofosfato, si ottiene il catione bisabolile simile a un monoterpene sostituito. Sull'anello a sei termini possono avvenire ulteriori reazioni che danno luogo a tutta una serie di derivati.

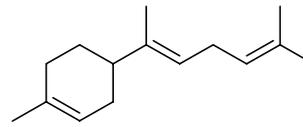


Schema 7

Per perdita di un protone dell'anello si ha la formazione del γ -bisabolene che è il responsabile dell'aroma dello zenzero (*Zingiber officinale* Roscoe).

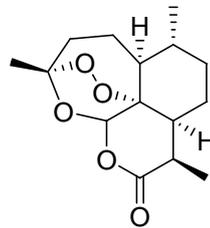


γ -bisabolene

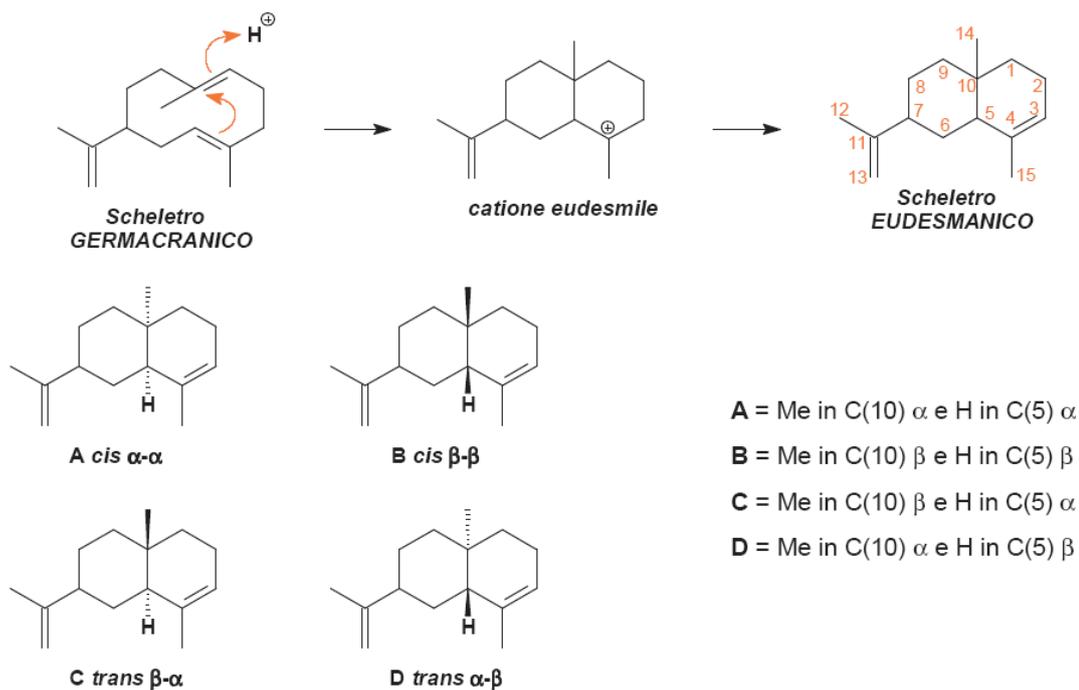


α -bisabolene

Per semplice addizione di una molecola d'acqua di forma l' α -bisabololo che è uno dei componenti principali della camomilla. Un semplice esempio di sesquiterpene cadinamico è l' α -cadinene ritrovato nelle bacche di ginepro, utilizzato per produrre il gin. Lo scheletro del cadinene è il punto di partenza per ulteriori trasformazioni che portano all'artemisinina, un importante antimalarico.



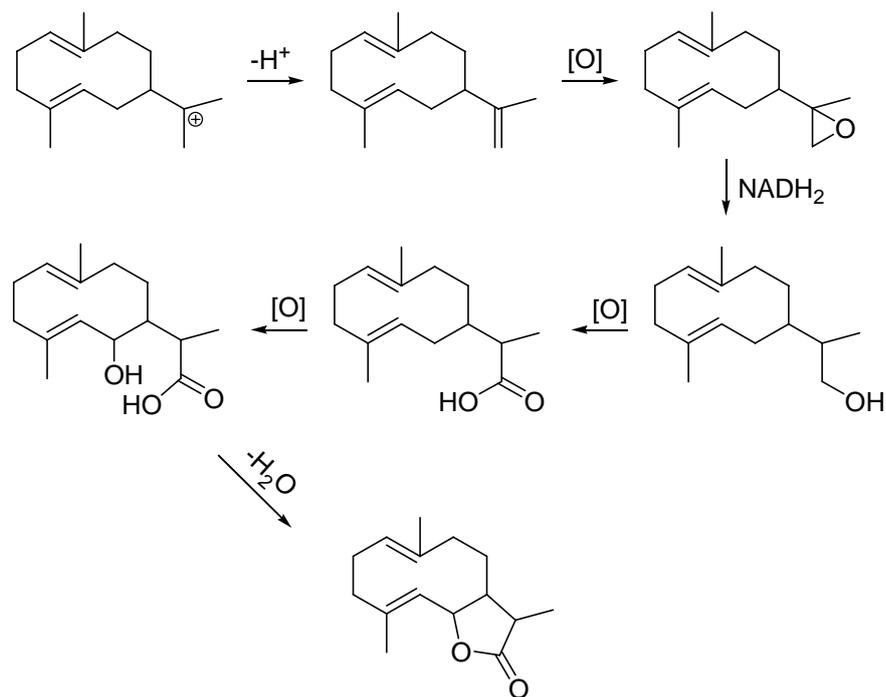
Un'osservazione particolarmente importante riguarda la stereospecificità nei processi di ciclizzazione, la quale è una caratteristica fondamentale nella biosintesi dei metaboliti secondari. Nonostante per ogni ciclizzazione ci sia la possibilità di formare più stereoisomeri, tutte le reazioni di ciclizzazione sono altamente stereospecifiche. Per esempio la ciclizzazione dello scheletro *germacranico* (generato dal catione *germacrile*) a scheletro *eudesmanico*, potenzialmente potrebbe portare a quattro diversi stereoisomeri:



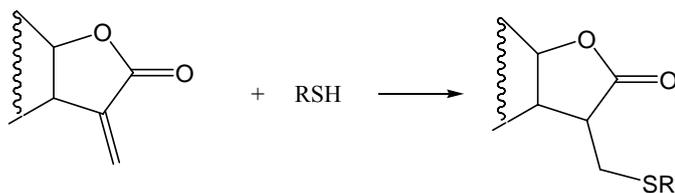
In realtà il prodotto di ciclizzazione D corrisponde allo scheletro eudesmanico più ricorrente nei composti naturali. Ciò implica che il governo stereospecifico, in questo passaggio biosintetico, favorisce una conformazione dello scheletro *germacranico* che conduce preferenzialmente alla molecola con struttura di tipo **D**.

2.3.2 Biogenesi di composti sesquiterpenici con un anello α -metilen- γ -lattonico

La classe di sesquiterpeni più studiata, sia per la sua relativa abbondanza in natura, sia per le attività biologiche espresse, è quella dei sesquiterpeni lattonici. Il suffisso -olide si riferisce alla presenza di un gruppo lattonico per cui possiamo distinguere germacranolidi, eudesmanolidi, elemanolidi e guaianolidi. Anche se non si conoscono i dettagli del processo biosintetico che è responsabile della formazione dell'anello lattonico, è chiaro che si debba sviluppare attraverso una serie di processi ossidativi schematizzati sotto

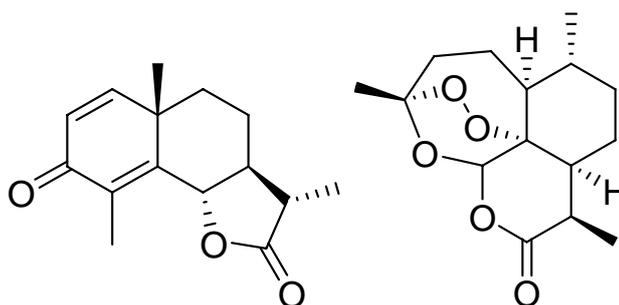


La presenza di un anello α -metilen- γ -lattonico sembra essere responsabile delle numerose attività biologiche di questi composti: citotossica, antitumorale, battericida. Sembra ormai accertato infatti che questi composti siano dei veri e propri agenti alchilanti e che danno luogo ad una reazione di Michael con nucleofili biologici così come L-cisteina o enzimi contenenti gruppi amminici e tiolici.



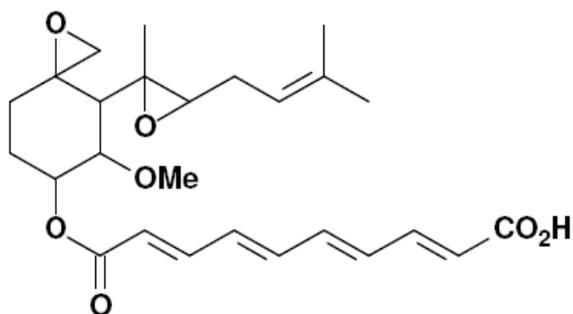
2.3.3 Sesquiterpeni: proprietà biologiche

I sesquiterpeni sono, fra i composti terpenoidici quelli dotati di maggiori e più interessanti attività biologiche e farmacologiche. Oltre all'attività antitumorale di composti quali la vernolepina, ci sono composti dotati di attività antimicrobiche e antisettiche. Due esempi di composti sesquiterpenici utilizzati in terapia, sono la santonina e la artemisinina¹¹. La prima è un sesquiterpene lattonico a scheletro eudesmanico usata come antielmintico, la cui biosintesi parte dal costunolide.

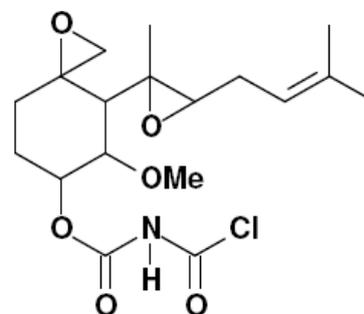


L'artemisinina, è stata isolata nel 1972 dall'*Artemisia annua*, pianta usata da più di 2000 anni in Cina per il trattamento della malaria ed è entrata in commercio nel 1979 come farmaco antimalarico.

Solo per pochi derivati semisintetici, tra i molteplici sesquiterpeni dotati *in vitro* di attività citotossica, si è arrivati alla sperimentazione clinica. Nella maggior parte dei casi si tratta di sesquiterpenolidi o di epossidi che sono in grado di interagire con i gruppi tiolici degli enzimi. Un derivato sesquiterpenico che è in fase III di sperimentazione clinica è il TNP-470, che è un derivato della fumagillina (dall'*Aspergillus fumigatus*).

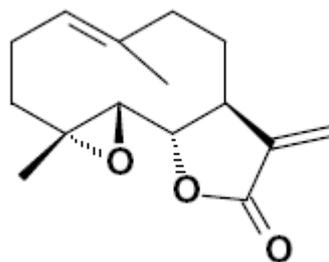


Fumagillina



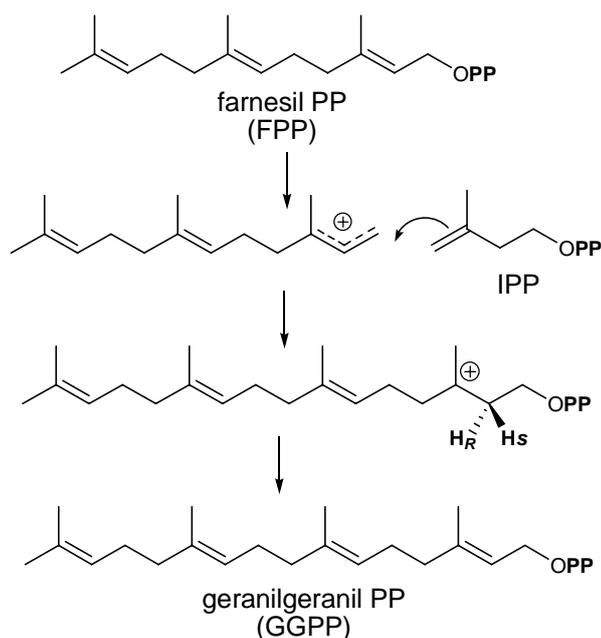
TNP-470

Oltre a questi esempi di molecole farmacologicamente attive utilizzate in terapia (vernolepina, santonina e artemisinina), le erbe e le preparazioni fitoterapiche che contengono sesquiterpeni quali metaboliti attivi sono numerose e ne è un esempio la Camomilla. Le specie che vengono generalmente usate sono la Camomilla romana (*Anthemis nobilis*) e la Camomilla tedesca (*Matricaria chamomilla*), entrambe della famiglia delle Asteraceae. La camomilla romana viene generalmente usata per aiutare la digestione e ha blande proprietà antisettiche e antiinfiammatorie; i principi attivi sono localizzati nell'olio essenziale costituito da esteri alifatici di acidi a basso peso molecolare quali l'ac. angelico, tiglico, isovalerico e isobutirrico, e piccole quantità di mono- e sesquiterpeni. L'olio essenziale contiene α -bisabololo, bisabololi ossidi, matricina e camazulene. Il camazulene in realtà è un prodotto di degradazione termica della matricina che si forma durante l'estrazione. Molte specie appartenenti al genere *Tanacetum* (Asteraceae) sono piante medicinali usate da tempo; sono ricche di lattoni sesquiterpenici¹² che esplicano attività citotossica, antitumorale e antimicrobica¹³. Le foglie di *Tanacetum parthenium*, sono utilizzate per curare l'emicrania, il componente attivo è il partenolide, un composto germacranolidico.

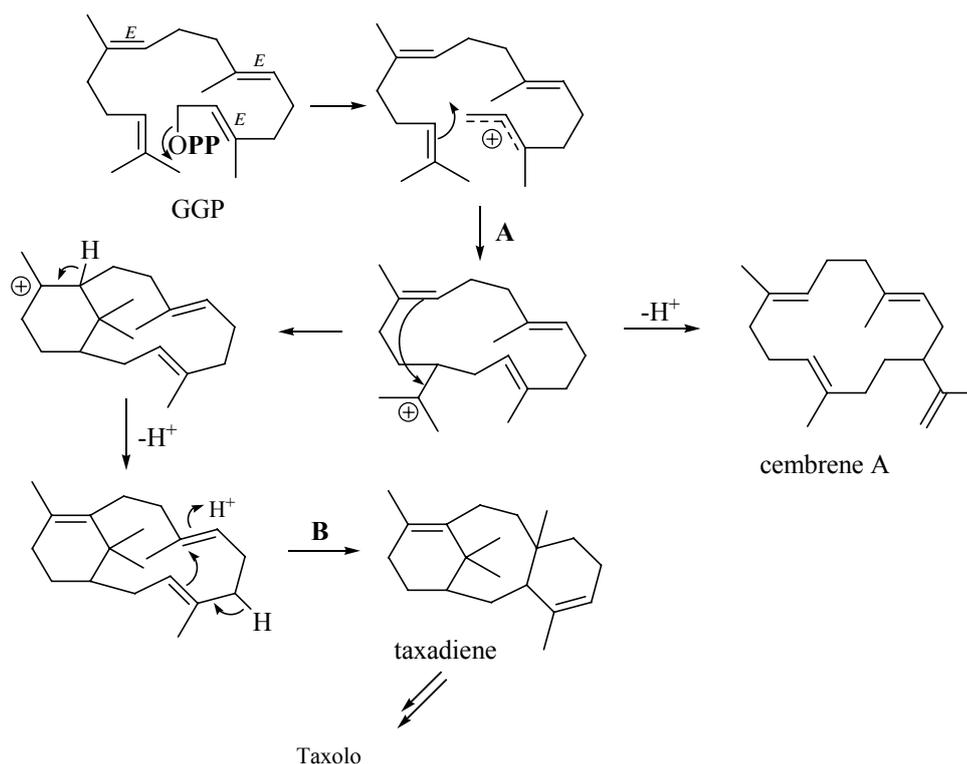


2.4 Diterpeni

Tutti i diterpeni naturali provengono da un precursore comune: il geranylgeranilpirofosfato (GGPP)¹. Il geranylgeranilpirofosfato è un'unità a venti atomi di carbonio che a sua volta viene biosintetizzato a partire da quattro unità isopreniche unite tra loro testa-coda con un meccanismo identico a quello già descritto per la sintesi del geranylpirofosfato precursore dei monoterpeni. Le ciclizzazioni del geranylgeranil difosfato (GGGP) per dare diterpeni sono classificate in due tipi.

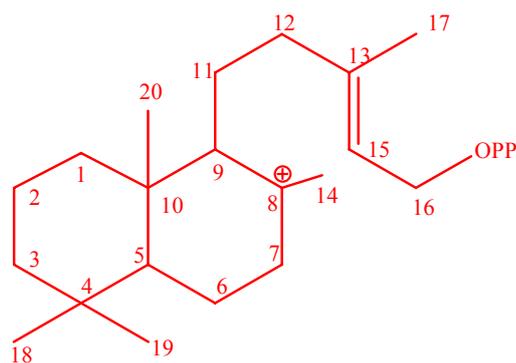


Le ciclizzazioni del primo tipo (A) hanno inizio con dissociazione del gruppo pirofosfato e l'attacco del conseguente carbocatione ad un doppio legame vicino. La protonazione di un doppio legame per generare un carbocatione per l'attacco di un altro doppio legame rappresenta la ciclizzazione del secondo tipo (B)¹. Il Cembrene A è un diterpene con un carbociclo di 14 atomi generato da una ciclizzazione di tipo A seguita da deprotonazione. I labdani e le famiglie di clerodani sono formate spesso da una ciclizzazione di tipo B del GGPP, che porta ad un intermedio decalinico. Entrambi i tipi di ciclizzazione possono avvenire nella stessa molecola e potrebbero essere effettuate dallo stesso enzima. Un esempio ben studiato di questa combinazione è la ciclizzazione dei tassani¹³ (schema 8).

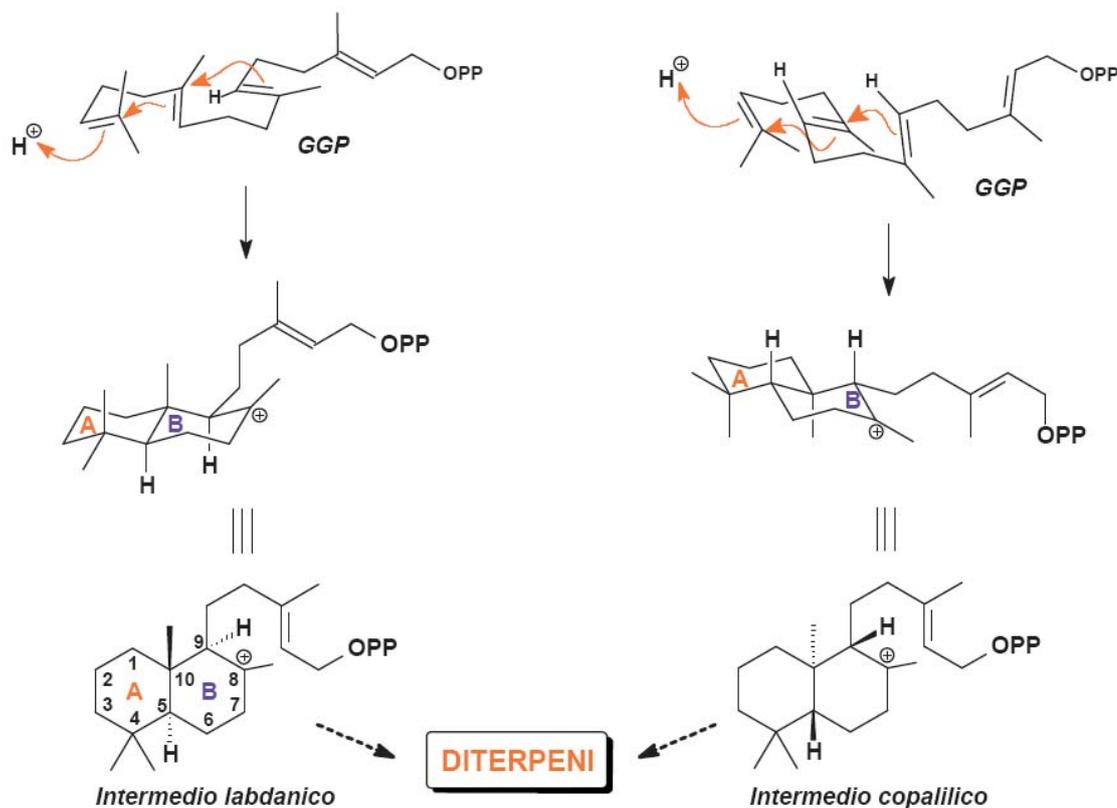


Schema 8

Il geranylgeranylpirofosfato può dare origine a tre differenti classi di scheletri diterpenici: aciclici, policiclici e macrociclici. I composti che possiedono uno scheletro carbonioso aciclico sono poco frequenti; uno dei più diffusi è il geranylgeraniolo che ovviamente viene prodotto per semplice defosforilazione del geranylgeranylpirofosfato. I composti che possiedono uno scheletro policiclico sono largamente distribuiti in natura. Sono stati isolati ed identificati composti con solo due anelli e composti che contengono da tre a cinque anelli. Meno frequenti sono i composti di natura macrociclica ed in questi casi l'anello è spesso formato da ben quattordici atomi di carbonio. Tra i composti che possiedono un nucleo carbonioso policiclico gioca un ruolo fondamentale l'intermedio labdanico che incorpora un centro positivo in C(8) ed un pirofosfato allilico che può generare un carbocatione delocalizzato su tre centri: C(13), C(15) e C(16).



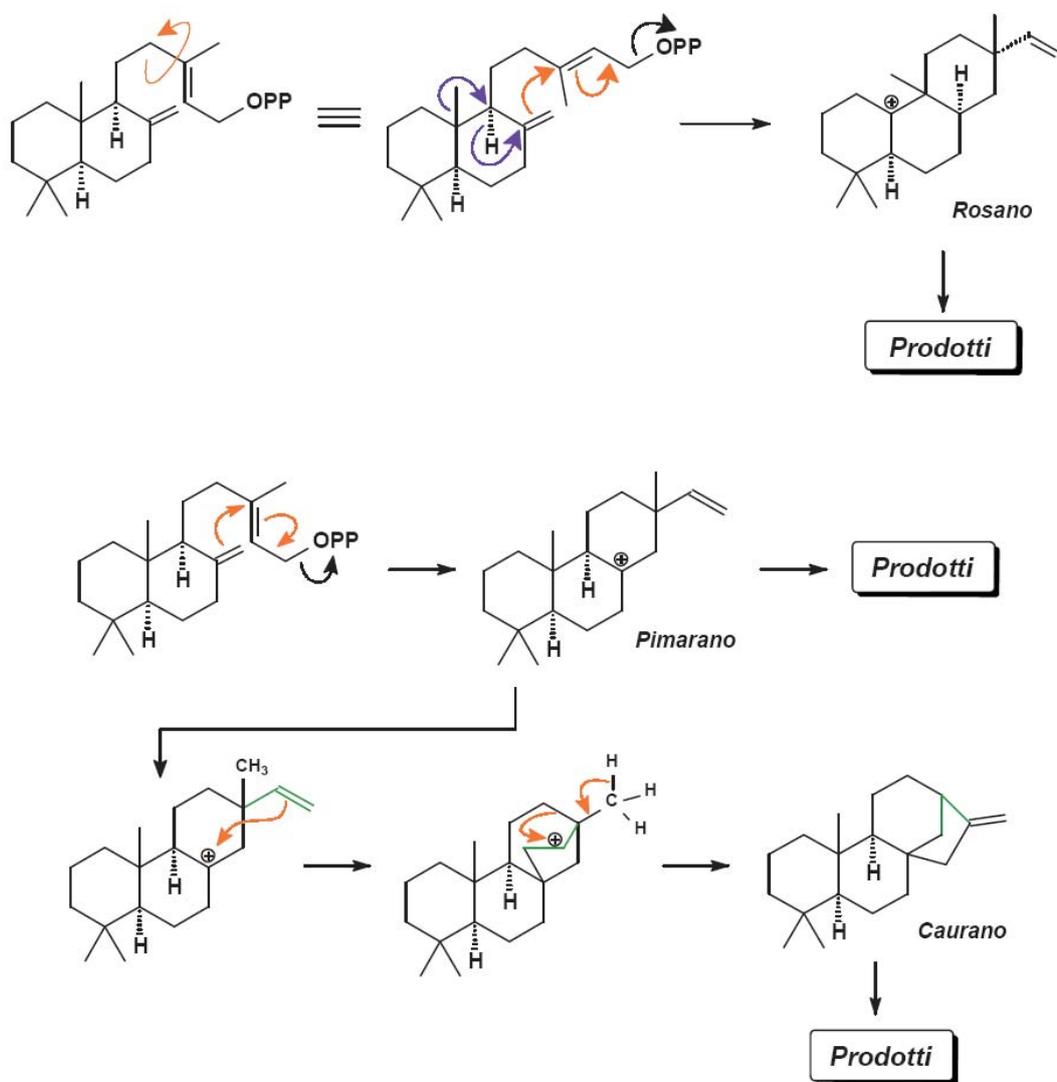
Questo intermedio può dunque dare origine sia a prodotti di terminazione che a prodotti di propagazione, con formazione di composti derivanti da processi di semplice ciclizzazione o ciclizzazione con trasposizioni¹. La maggior parte degli scheletri diterpenici policiclici biogeneticamente proviene dall'intermedio labdanico³⁻⁵. Lo scheletro carbonioso del labdano viene generato a partire dal geranylgeranylpirofosfato, tramite due processi di ciclizzazione dienica che portano rispettivamente alla formazione degli anelli A e B di tale sistema, come riportato nello schema 9 seguente:



Schema 9

L'intermedio labdanico e l'intermedio copalilico sono enantiomeri. I processi di ciclizzazione che conducono alla formazione dell'intermedio labdanico possono condurre sia alla formazione di isomeri 5α , 10β (più comuni in natura) che di isomeri 5β , 10α , a livello della giunzione degli anelli A-B¹. In generale, i processi di trasformazione dell'intermedio labdanico possono essere schematizzati nel modo seguente e prevedono:

- a) trasposizione di gruppi posizionati nell'anello A (es. rosano),
- b) ciclizzazione che coinvolge i gruppi che andranno a concorrere alla formazione del nuovo anello (es. pimarano) o dei nuovi anelli (es. caurano).



2.4.1 Diterpeni: proprietà biologiche

Fra i composti diterpenici dotati di attività farmacologica c'è il tassolo che oggi giorno è uno dei più interessanti composti antitumorali disponibili. Per quanto riguarda l'isolamento e la valutazione dell'attività biologica, è possibile ritrovare dati bibliografici che risalgono alla fine dell'800, ma gli effetti tossici del Tasso sono stati riportati addirittura nel "De Bello Gallico".

L'attività biologica dei tassani, (vedi capi 1), si esplica soprattutto a livello della formazione dei microtubuli, importanti per la formazione del fuso mitotico e quindi della duplicazione cellulare. Un altro gruppo di diterpeni particolarmente interessante nel mondo vegetale è quello delle **gibberelline**. Queste sono una serie di composti che esplicano importanti attività ormonali nelle piante e derivano dall'*ent*-caurene attraverso un processo di contrazione d'anello. Un altro gruppo di sostanze particolarmente complesse strutturalmente, sempre di origine diterpenica, che oggi giorno destano grande interesse, è quello dei ginkolidi. Questi composti sono fra i maggiori costituenti del *Ginkgo biloba* una gimnosperma molto primitiva unico rappresentante delle Ginkgoaceae. Normalmente viene commercializzato l'estratto che contiene appunto i ginkgolidi e flavonoidi. Il Ginkgo usato per migliorare la circolazione periferica e cerebrovascolare, le sue preparazioni vengono quindi usate per prevenire e diminuire l'invecchiamento cerebrale¹⁵.

Bibliografia

1. Dewick P. M., *Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*, Piccin; Padova 2001.
2. Dev S., Misra R., *CRC Handbook of Terpenoids*, CRC PRESS 1996.
3. Humphrey AJ, Beale M H (2006). Terpenes. *Plant Second Metab* 47-101.
4. Liao ZH, Chen M, Gong YF, Miao ZQ, Sun XF, Tang KX (2006). Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, genes, regulation and metabolic engineering. *J Biol Sci* 6(1), 209-219.
5. Lichtenthaler HK, Zeidler JG (2002). Isoprene and terpene biosynthesis. *Tree Physiol* 3 79-99.
6. McGarvey DJ, Croteau R (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant cell* 7(7), 1015-26.
7. Grayson DH (1994). Monoterpenoids. *Nat Prod Rep* 11(2), 225-47.
8. Croteau RB (1988). Metabolism of plant monoterpenes. *Biochem* 1(2), 182-8.
9. Williamson EM (2007). The medicinal use of essential oils and their components for treating lice and mite infestations. *Nat Prod Comm* 2(12), 1303-1310.
10. Erasto P, Viljoen AM (2008). Limonene - a review: biosynthetic, ecological and pharmacological relevance. *Nat Prod Comm* 3(7), 1193-1202.
11. Ryden AM, Kayser O (2007). Chemistry, biosynthesis and biological activity of artemisinin and related natural peroxides. *Topics in Heterocyclic Chemistry* 9 (Bioactive Heterocycles III), 1-31.
12. Goren N, Arda N, Caliskan Z (2002). Chemical characterization and biological activities of the genus *Tanacetum* (Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry* 27 (Bioactive Natural Products (Part H)), 547-658
13. Abad MJ, Guerra JA, Bermejo P (2008). Phytochemistry and pharmacology of *Tanacetum* : recent developments. *Recent Progress in Medicinal Plants* 20 301-351.
14. Appendino G (1995). Naturally occurring taxoids. *Pharmacochemistry Library* 22 7-53.
15. Hanson JR (2007), Diterpenoids. *Nat Prod Rep* 24(6), 1332-1341.

Capitolo 3 Materiali e Metodi

3.1 Tecniche estrattive

3.1.1 Apparecchiatura Soxhlet

E' stato utilizzato un apparecchio Soxhlet in vetro convenzionale con camera di estrazione avente diametro 8 cm ed altezza 30 cm, corredato da un pallone della capacità di 2 L.

3.1.2 Macerazione con solventi a polarità crescente

E' stata utilizzata la macerazione a temperatura ambiente con solventi a polarità crescente, trattando il materiale vegetale prima con *n*-esano, poi con cloroformio ed infine con metanolo.

3.1.3 Distillazione in corrente di vapore

La distillazione degli oli essenziali è stata effettuata con apparecchio Clevenger secondo il metodo riportato nella F.U.I. XI Ed.

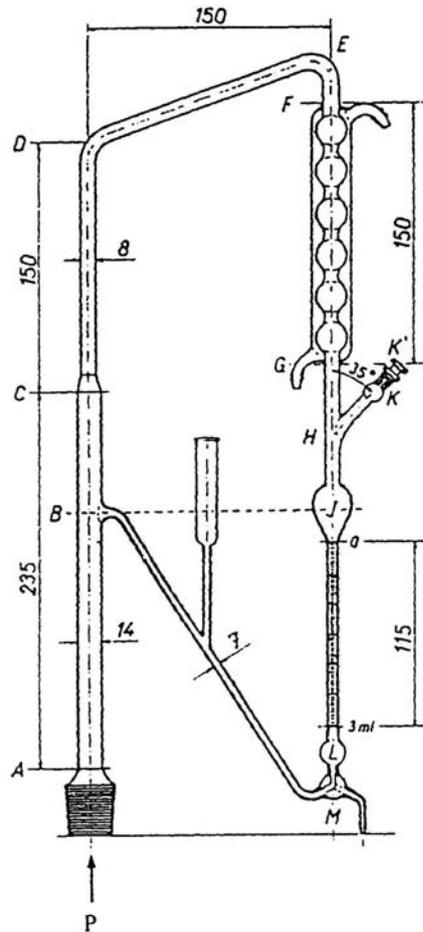


Fig. 1- Schema di un apparecchio per idrodistillazione

P = pallone di estrazione; ACDE = colonna di condensazione; FG = refrigerante a bolle; K' = tappo smerigliato; K = Diramazione laterale a 35° dal tubo principale; GH = Tubo di collegamento tra il refrigerante ed il tubo graduato:

J = Apertura a forma di pera; JL = Tubo graduato; L = Bolla di apertura; M = Rubinetto a tre vie; BM = tubo di collegamento tra la colonna di condensazione ed il tubo graduato.

3.2 Tecniche cromatografiche

3.2.1 TLC

Le TLC (Thin Layer Chromatography) sono state eseguite su lastre di gel di silice 60 F254 (Merck) di 0.25 mm di spessore e su lastre in fase inversa di silice derivatizzata RP.18 F254 (Merck). Per la rivelazione dei prodotti ci siamo avvalsi sia della luce UV a 254 e 366 nm, sia dei seguenti reattivi spray:

- 1 $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$: una soluzione satura di cerio solfato in acido solforico al 65%, nebulizzata sulla lastra che è poi riscaldata a 120 °C per 5 minuti. Il reattivo è piuttosto generale ed usato per rivelare tutti i composti presenti in una miscela, ma in alcuni casi può comunque fornire informazioni specifiche, per esempio per i composti triterpenoidici conferisce una peculiare colorazione violetta alle macchie.
- 2 NTS/PEG: utilizzato comunemente per composti fenolici così come per flavonoidi o cumarine. Reattivo Naturstoffe (NTS) = estere β -etilamminico dell'acido difenilborico in soluzione metanolica all'1% e polietilen glicol 4000 (PEG) in soluzione etanolica al 5%.

Come eluenti per le analisi delle TLC, sono stati usati principalmente:

CHCl_3 -MeOH- H_2O (40:9:1) per miscele apolari

n-BuOH-AcOH- H_2O (60:15:25) per miscele polari.

3.2.2 Colonne cromatografiche

3.2.2.a Gel filtrazione

Per la cromatografia ad esclusione molecolare è stato impiegato come supporto gel di Sephadex LH20 (25-100 μm , Pharmacia Fine Chemicals), utilizzando colonne di 100 cm x 3 cm per 2-4 g di estratto e 100 cm x 5 cm, per 5-10 g di materiale vegetale. L'eluente principalmente utilizzato è stato il metanolo.

3.2.2.b Flash cromatografia

Per la cromatografia flash è stato utilizzato gel di silice 60 (230-410 μm , Merck), L'eluizione è stata effettuata a gradiente iniziando con il 100% di *n*-esano ed incrementando gradualmente la polarità mediante l'utilizzo di AcOEt fino a giungere al 100% di AcOEt.

3.2.2.c HPLC

Le separazioni in HPLC (High Performance Liquid Chromatography) sono state effettuate utilizzando un apparecchio costituito da una pompa TSP SpectraSeries P100, equipaggiata con un iniettore Rheodyne, un rivelatore ad indice di rifrazione Waters R 401, una colonna a fase diretta Hypersil silica (Thermo, 250 x 4.6 mm i.d, particle size 5 μm , flusso 1.5 ml/min) ed un registratore della Recorder Company. Per la cromatografia a fase inversa è stato utilizzato lo stesso tipo di apparecchiatura, montando una colonna C18 μ -Bondapak (30 cm x 7.8 mm) e utilizzando come fase mobile una miscela MeOH-H₂O, eluendo ad un flusso di 2.0-2.5 mL/min.

3.2.3 Gas cromatografia

Le analisi GC sono state effettuate con uno strumento Perkin-Elmer Sigma 115 montando con due colonne capillari HP-5MS (30 m x 0.25 mm) eHP Innowax (50 m x 0.20 mm) con spessore del film di fase stazionaria 0.25 μm , usando le seguenti condizioni analitiche:

- temperatura iniettore e detector: 260°C;
- programma di temperatura del forno da 40°C (5 min) a 250°C a 2°C/min;
- gas di trasporto: N₂ a 2 ml/min;
- detector FID;
- volume di iniezione: 0.5 μl di una soluzione in *n*-esano al 5%.

L'identificazione dei componenti dei campioni di oli essenziali è stata effettuata su entrambe le colonne, confrontando i tempi di ritenzione dei singoli componenti con quelli di campioni puri autentici e dei loro indici di ritenzione relativi alla serie di *n*-alcani C₈-C₂₄.

3.2.3.a Gas cromatografia-spettrometria di massa

Le analisi GC-MS sono state effettuate con un gascromatografo Agilent 6850 Ser. II equipaggiato con una colonna capillare HP-5MS (30 m x 0.25 mm; spessore del film di fase stazionaria 0.33 μm) ed un detector di massa a trappola ionica Agilent Mass Selective MSD 5973. Le condizioni analitiche utilizzate sono state le seguenti:

- temperatura iniettore: 260°C;
- programma di temperatura del forno da 40°C (5 min) a 250 °C a 2 °C/min;
- gas di trasporto: He ad un flusso costante (1.0 ml/min);

-la transfer line è stata mantenuta a 290°C. Gli spettri MS sono stati ottenuti impostando un range di massa 29-350 m/z un EI con voltaggio di ionizzazione di 70 eV, electron multiplier energy 2000V ed un tempo di scansione di un 1s.

L'identificazione dei componenti degli oli essenziali è avvenuta mediante analisi computerizzata degli spettri di massa, confrontati con i dati presenti sia nella libreria elaborata dal nostro gruppo di ricerca attraverso campioni di riferimento ed oli essenziali noti, sia nelle librerie di spettri di massa NIST 02 e Wiley 275. Tutti i dati ottenuti sono stati inoltre confrontati anche con letteratura specifica¹⁻⁴.

3.3 Tecniche chimico-fisiche

3.3.1 Spettri UV e indice di rifrazione

Gli spettri ultravioletti sono stati ottenuti e registrati in metanolo con uno spettrofotometro JASCO 7800 UV-vis. Il potere ottico rotatorio è stato registrato con l'utilizzo di un polarimetro digitale JASCO P-1010.

3.4 Tecniche spettroscopiche

3.4.1 Spettrometria di massa

Le analisi MS e MS_n (modo positivo e negativo) sono state effettuate utilizzando uno spettrometro API 2000 (Applied Biosystem) usato in modalità positiva equipaggiato con un analizzatore a quadrupolo. Tutte le molecole analizzate sono state solubilizzate in MeOH e successivamente diluite. I campioni sono stati iniettati nello spettrofotometro ad un flusso di 0.5 mL/min usando una syringe pump esterna

3.4.2 Risonanza magnetica nucleare

Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian Mercury 400 VX (¹H a 400.436 MHz, ¹³C a 100.699 MHz), software Solaris 9.1, δ (ppm), J in Hz, il solvente residuo è stato utilizzato come riferimento ($\delta = 7.27$ nel ¹H e $\delta = 77.0$ nel ¹³C). Le attribuzioni del ¹³C sono state effettuate mediante gli spettri DEPT. Gli spettri mono- e bi-dimensionali sono stati misurati in CD₃OD e CDCl₃. I chemical shifts sono riportati in δ (ppm) rispetto al TMS (0 δ) impiegato come standard interno nel caso del CDCl₃, oppure utilizzando il segnale del solvente (3.31 δ per il CD₃OD); le costanti d'accoppiamento (J) sono misurate in Hertz. Per gli spettri ¹³C NMR è stato sempre usato come riferimento il segnale del solvente, rispettivamente a 77.0 δ e 49.0 δ . Gli esperimenti DEPT, COSY-90, NOESY, ed HETCOR diretto, sono stati eseguiti utilizzando il software di microprogrammi commerciali Bruker forniti a corredo dello strumento.

3.5 Linee cellulari

Nel saggi riportati, i cui risultati sono evidenziati trattazione della tesi, sono state utilizzate diverse linee cellulari tumorali umane. Per gli oli essenziali di *Teucrium* sono state usate le linee cellulari: di carcinoma del polmone COR-L23 (ECACC No.: 92031919), di adenocarcinoma del colon Caco-2 (ATCC No.: HTB-37), di melanoma amelanotico C32 (ATCC No.: CRL-1585), mentre per gli oli essenziali di *Salvia* è stata utilizzata la linea M14 di melanoma umano.

Le linee cellulari COR-L23, C32 e M14 sono state mantenute in coltura con mezzo base RPMI-1640, in presenza di L-glutamina 2mM con il 10% di siero fetale bovino, 50 IU/ml penicillina e 50 μ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, Milano). Entrambe le linee

cellulari sono state mantenute a 37 °C in incubatore con il 5% di CO₂. Le cellule di adenocarcinoma del colon Caco-2 sono state mantenute in coltura nel terreno costituito dal mezzo base Dulbecco's modified Medium (DMEM) (Euroclone, Milano) ad alta percentuale di glucosio, in presenza dell'aminoacido L-glutamina (2 mM) con il 10% di siero fetale bovino (fetal bovine serum, FBS) (Euroclone, Milano), il 2,5% di siero di cavallo (horse serum, HS) (Sigma-Aldrich, Milano) e 1.1% della miscela 1:1 degli antibiotici penicillina (50 UI/ml) e streptomina (50µg/ml) (Euroclone, Milano).

Per gli estratti, le frazioni ed i composti puri ottenuti dall'*Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche e dall'*Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. subsp. *meoides* (Desf.) sono state utilizzate le cellule di carcinoma squamoso HeLa e le cellule di glioma C6.

3.5.1 Scongellamento della linea cellulare

Questa procedura è necessaria per riportare le cellule in uno stato metabolico attivo dopo che sono state conservate congelate in azoto liquido, per un certo periodo di tempo. In particolare, il criotubo contenente le cellule viene posto in bagnomaria a 37 °C ed agitato con moto rotatorio continuo; il contenuto del criotubo viene aspirato ed introdotto in una provetta sterile da 15 mL. Successivamente si aggiungono goccia a goccia 5-6 mL di mezzo di coltura estemporaneo, preventivamente stemperato per 10-15 minuti a 37 °C; il pellet cellulare viene poi delicatamente risospeso nel mezzo di coltura e lasciato a temperatura ambiente per qualche minuto in modo che le cellule si equilibrino con il mezzo stesso. Le cellule vengono successivamente sedimentate a 800 g per 5 minuti a temperatura ambiente, il sovrantante eliminato ed il pellet risospeso delicatamente in 3-4 mL di mezzo. La sospensione cellulare viene poi trasferita in una fiasca per coltura in presenza di 10-12 mL di mezzo e posta nell'incubatore.

3.5.2 Mantenimento in coltura e crescita cellulare

Le linee tumorali sono mantenute in crescita esponenziale in fiasche per colture cellulari T75 (Sarstedt, Verona) in un'atmosfera controllata al 5% di CO₂ e 95% di aria a 37 °C. Le cellule sono controllate quotidianamente; il mezzo di coltura consumato, che si è arricchito di sostanze di scarto del metabolismo cellulare portando al viraggio dell'indicatore acido-base dal rosso intenso al giallo, viene regolarmente sostituito con mezzo fresco. Quando le cellule raggiungono il 75-80% di confluenza, in assenza di inibizione da contatto, potrebbe svilupparsi una crescita multistrato che deve essere

evitata. A tale riguardo, tutto il mezzo di coltura è aspirato dalla fiasca e dopo aver eseguito un lavaggio con 5-6 mL di tampone fosfato (Sigma- Aldrich, Milano), si aggiunge circa 0,5 mL di tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, Milano) per staccare le cellule dalla superficie di crescita lasciando la fiasca nell'incubatore per qualche minuto. Dopo aver verificato al microscopio che le cellule si siano staccate, si aggiungono 5-6 mL di mezzo di coltura, la sospensione cellulare è trasferita in una provetta da 15 mL e posta in centrifuga a 800 g per 5 minuti a temperatura ambiente. Il sovrinatante viene poi decantato e le cellule possono essere utilizzate per gli esperimenti, seminate nuovamente nella stessa fiasca per il mantenimento in coltura, oppure congelate.

3.6 Analisi della vitalità cellulare

3.6.1 Test MTT

Il saggio MTT si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriali, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT, tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrasolium bromide, di colore giallo, in un composto, il formazano, di colore blu. La concentrazione di tale prodotto è misurata spettrofotometricamente ed è proporzionale al numero delle cellule vitali. Il test deve essere eseguito al buio perché l'MTT è fotosensibile.

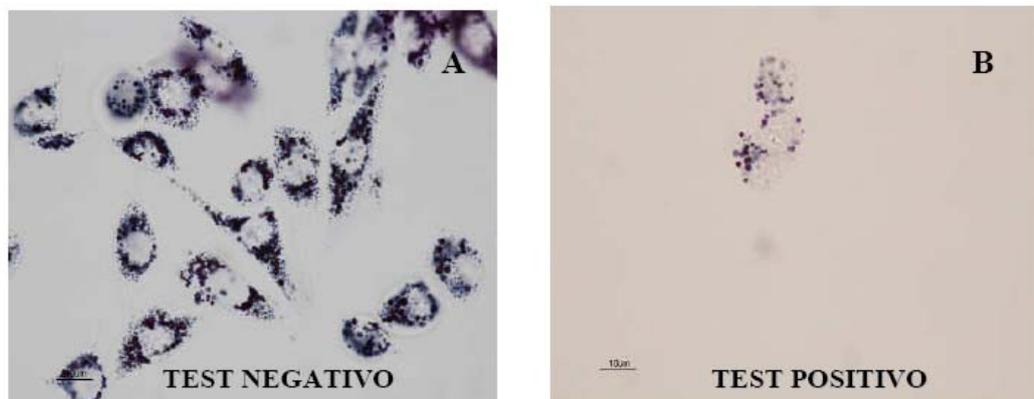
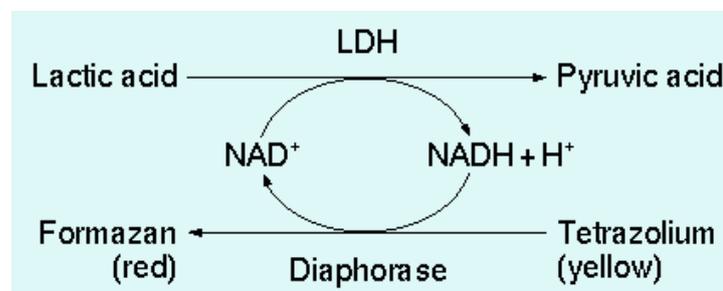


Fig. 2- cellule HeLa vitali contenenti il sale di formazano (A) e dopo trattamento con agente citotossico (B).

3.6.2 Test dell'LDH

Il test dell'LDH (detto anche test di citotossicità) è un saggio colorimetrico per la quantificazione della mortalità e della lisi cellulare, basato sulla misurazione dell'attività appunto della lattico deidrogenasi (LDH) rilasciata nel supernatante dal citosol di una cellula danneggiata.



3.6.3 Test Comet

Le cellule sono state trattate con H₂O₂ 1 mM per 30' o con DEM 1 mM per 30', quindi vengono lavate in PBS, tripsinizzate, contate e risospesenuovamente in PBS. 1x10⁵ cellule sono state combinate con LM (low melting) agarosio in un rapporto di 1:10 (cellule/agarosio) e stratificate su un vetrino portaoggetti. I vetrini sono tenuti al buio per 20-30' a 4°C e poi immersi per 60' a 4°C nel buffer di lisi (2.5M NaCl, 100mM EDTA pH 10, 10mM Tris, 1% Sodio Lauryl Sarcosinato e 1% Tryton X-100). Il DNA è stato denaturato immergendo i vetrini in una soluzione a pH >13 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) per 30-60' a temperatura ambiente al buio ed è stato sottoposto a migrazione elettroforetica (~12 V per 30') nella stessa soluzione. I vetrini sono stati fissati 5' a temperatura ambiente in etanolo 70%. In seguito alla migrazione elettroforetica il DNA tagliato migrerà fuori dal nucleo con una velocità direttamente proporzionale all'entità del danno. L'aggiunta ai vetrini di SYBR Green, colorante fluorescente che si intercala nel DNA, permetterà di visualizzare una "cometa" di DNA al microscopio a fluorescenza a 521 nm. Il rapporto tra le aree della coda e della testa della cometa fornisce una stima quantitativa del danno indotto al DNA.

Bibliografia

1. Davies N. W. (1990) *J. Chromatogr.*, 503, 1-24.
2. Jennings W. Shibamoto T. (1980) *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. Academy Press, New York.
3. Adams R P (1995) *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
4. *E.P.I.M.S.: Eight Peak Index of Mass Spectra*. 3rd edn., MSDC: Nottingham, 1983.

Capitolo 4 *Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche

In questo capitolo è descritta l'analisi fitochimica di una pianta appartenente alla famiglia delle Asteraceae, l'*Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche, raccolta in Libano. L'uso di piante medicinali in Libano risale a migliaia di anni fa e costituisce un elemento importante per il sostentamento delle comunità rurali. Le erbe sono vendute in piccoli negozi, chiamati "Dabbous", nei quali il venditore è generalmente un erborista, che suggerisce il tipo di pianta per una specifica patologia, senza alcuna prescrizione. L'*O. cynarocephalum* Boiss. et Blanche è una specie endemica del Libano, utilizzata nella medicina popolare per la cura del cancro alla pelle.¹ Nessuna indagine fitochimica è stata condotta fino ad ora su questa specie, anche se di recente un gruppo di ricercatori libanesi ha valutato l'attività chemiopreventiva dell'estratto acquoso della pianta. I risultati, che confermano l'uso tradizionale di questa pianta, hanno evidenziato che l'estratto inibisce in modo dose-dipendente la crescita delle linee cellulari, responsabili del tumore al colon, HCT-116 (IC₅₀=0.18 mg/ml) e HT-29 (IC₅₀=1.8 mg/ml)². Al fine di caratterizzare dal punto di vista fitochimico questa pianta, e individuare i composti biologici attivi, abbiamo effettuato un frazionamento bioguidato degli estratti, dai quali sono stati isolati 13 sesquiterpeni tra cui 2 metaboliti nuovi in natura.

4.1 Famiglia Asteraceae

La famiglia delle Asteraceae, o Compositae, rappresenta un raggruppamento sistematico della classe delle Dicotiledoni che comprende un elevatissimo numero di generi distribuiti largamente in quasi tutto il mondo e reperibili in ogni tipo di habitat. "Aster" è il nome del genere introdotto da Linneo, nel 1735, e deriva la sua etimologia dalla lingua greca (aster significa stella). E' la famiglia più ricca di generi e di specie, con circa 20.000 specie diffuse a tutte le latitudini. Le Compositae sono considerate le Dicotiledoni con i caratteri più evoluti; appartengono alla famiglia molte specie spontanee, medicinali e coltivate come orticole, ornamentali o per la produzione di oli³.

4.1.1 Caratteristiche morfologiche delle Asteraceae

La morfologia degli organi vegetativi delle piante appartenenti a questa famiglia è molto varia, rispecchiando la diversità di ambienti in cui vegetano le diverse specie. La famiglia raggruppa piante arbustive, piante annuali, bienni e perenni. Le foglie sono alterne, opposte o in rosetta basale, senza stipole, possono essere provviste di spine sul fusto, lungo il margine delle foglie, e spesso sono spinescenti anche le brattee delle infiorescenze. I fiori sono sempre riuniti in infiorescenze a capolino, che può essere provvisto o meno di brattee. L'infiorescenza si compone di un ricettacolo che può avere forma concava, convessa, conica o persino colonnare e che di solito è sotteso dall'involucro delle brattee. I fiori hanno calice ridotto, assente o sostituito da un *pappo*, organo piumoso per la dispersione anemocora dei frutti, corolla gamopetala di due tipi: *tubulosa*, attinomorfa (fiori tubulosi o del disco) o *ligulata*, zigomorfa (fiori ligulati o del raggio). Corolle di altra forma, come quella bilabiata, sono meno frequenti e si ritrovano per lo più in specie non autoctone⁴. I fiori sono in genere ermafroditi proterandri (le antere maturano prima degli stimmi), ma anche unisessuali o sterili: nella stessa infiorescenza possono essere presenti fiori dei diversi tipi. Sono rare le specie dioiche. Gli stami sono cinque epicorollini, con antere saldate fra loro (*sinandre*) a formare un manicotto entro cui si accresce lo stilo che porta all'apice lo stimma chiuso e non ancora recettivo che raccoglie e spinge fuori il polline e solo al termine si apre al di sopra delle antere esponendo la superficie interna recettiva. L'ovario è infero, bicarpellare sincarpico, uniloculare, contenente un solo ovulo; lo stimma è bifido. Il frutto è un achenio sormontato dal pappo oppure munito di strutture atte alla dispersione zoocora (denti, uncini) o nudo. L'achenio delle Asteraceae, che deriva da un ovario infero, viene da alcuni chiamato col nome particolare di "*cipsela*". L'impollinazione è per lo più entomofila ma non mancano specie anemofile con fiori ridotti, tra cui quelle del genere *Ambrosia*, tra le principali responsabili di allergie in America.⁴

4.1.2 Sistematica delle Asteraceae

Per il riconoscimento di generi e specie è necessario osservare i caratteri di infiorescenze, fiori e frutti (caratteristiche delle brattee dell'involucro, del ricettacolo infiorescenziale, i tipi di fiorellini presenti, le caratteristiche del pappo, ecc.). Esempari incompleti o immaturi sono di difficilissima determinazione⁴. Sulla base del tipo di fiori presenti nel capolino si distinguono nella flora italiana due principali sottofamiglie:

A- *Cichorioideae* o *Liguliflorae*

B-*Asteroideae* o *Tubiflorae*

Alla sottofamiglia *Liguliflorae* appartiene una sola tribù, quella delle *Cichorieae*, con fiori ligulati, sia quelli del disco sia quelli del raggio, e caratterizzati anche dalla presenza di vasi laticiferi anastomizzati. I generi principali della tribù sono: *Lactuca*, *Leontodon*, *Scorzonera*, *Taraxacum*, *Tragopogon*, tutte piante largamente presenti nella nostra flora.

Alla sottofamiglia delle *Tubiflorae* appartengono dodici tribù in cui sono comprese tutte le specie che presentano dei capolini con fiori tubulosi o bilabiati ed anche ligulati.

Sono presenti ghiandole con oli eteri che conferiscono a molte specie i caratteristici aromi; mancano canali laticiferi⁴.

Le dodici tribù appartenenti a questa sottofamiglia sono:

- *Anthemideae*: tribù largamente rappresentata nel bacino mediterraneo, come anche nel Sud Africa, caratterizzata da brattee involucri membranose all'apice e agli orli; manca il pappo. La tribù è largamente diffusa nella nostra flora spontanea con i generi: *Achillea*, *Anthemis*, *Artemisia*, *Chrysanthemum*, *Matricaria*, *Tanacetum*.
- *Arctotideae*: piante a fiori con stilo ingrossato o peloso sotto la ramificazione delle branche; diffuse nella flora del Sud Africa. I generi principali sono: *Arctotis*, *Gazania*; *Ursinia*.
- *Astereae*: con tutti i fiori tubulosi e gialli, antere inserite sul filamento per la base; molto diffuse al di fuori dei tropici. I generi principali sono: *Aster*, *Bellis*, *Erigeron*, *Haplopappus*, *Solidago*.
- *Calenduloideae*: i fiori del raggio sono usualmente pistilliferi, quelli del disco comunemente staminali; manca il pappo ed il ricettacolo è privo di brattee. Alla tribù appartengono i generi *Calendula* e *Dimorphotheca*.
- *Cynareae*: hanno un ricettacolo per lo più irsuto; comprendono molti generi prevalentemente diffusi nella regione mediterranea: *Carlina*, *Centaurea*, *Cirsium*, *Cynara*, *Echinops*.
- *Eupatorieae*: hanno antere che sono inserite sul filamento per la base; sono specie molto diffuse in America.

- *Helenieae*: sono specie proprie soprattutto dell'America e differiscono di poco dalle Heliantheae, essenzialmente per il ricettacolo privo di brattee. Fanno parte di tale tribù: *Gaillardia*, *Helenium*, *Tagetes*.
- *Heliantheae*: hanno lo stilo con ramificazioni che portano ciascuna una corona di peli sotto lo stimma; il ricettacolo ha brattee papiracee. Sono diffuse soprattutto in America ed i generi principali sono: *Ambrosia*, *Bidens*, *Dahlia*, *Guizotia*, *Helianthus*, *Rudbeckia*, *Xanthium*, *Zinnia*.
- *Inuleae*: simili alle Astereae ma con antere caudate. I generi principali sono: *Antennaria*, *Asteriscus*, *Bupthalmum*, *Gnaphalium*, *Helicrisum*, *Inula*, tutti generi ad ampia diffusione nel Vecchio e nel Nuovo Mondo, e molti presenti anche nella nostra flora spontanea.
- *Mutisieae*: sono le specie che hanno, usualmente, i fiori del raggio e quelli del disco bilabiati. Sono essenzialmente diffuse nella flora spontanea del Sud America e sono rappresentate principalmente dai generi: *Gerbera*, *Leuceria*, *Mutisia*.
- *Senecioideae*: a larga diffusione nel mondo, le cui specie differiscono dalle Anthemideae e dalle Helenieae per la presenza di un pappo peloso. *Arnica*, *Doronicum*, *Petasites*, *Senecio*, *Tussilago* sono alcuni dei generi che si trovano nella nostra flora.
- *Vernonieae*: con fiori tutti simili e tubulari, mai gialli, antere sagittate e caudate, inserite sul filamento assai sopra la loro base; sono specie prevalentemente tropicali⁴.

4.1.3 Distribuzione geografica ed interesse economico delle Asteraceae

L'interesse dell'uomo nei confronti di molte delle Asteraceae è elevato ed infatti molte sono le specie utili se non necessarie alla vita dell'uomo. Di molte Asteraceae si fa uso nella produzione dei liquori, altre sono utili in campo alimentare, altre sono usate come piante ornamentali, altre ancora vengono usate in ambito industriale per la produzione di oli, di coloranti, di caucciù. Poiché sono ricche in oli eteri oppure in oli fissi, in resine o in principi amari, sono state e sono ancora oggi oggetto di sfruttamento in campo medico⁴. Basti ricordare l'*Artemisia* con le sue numerose specie, per le sue proprietà toniche, antielmintiche, febbrifughe e stimolanti; la *Matricaria chamomilla* L. e l'*Anthemis nobilis* L. di cui è nota l'azione calmante; l'*Eupatorium perfoliatum* L. ad

azione tonica, diaforetica e lassativa; la *Tussilago farfara* L. diaforetica e sedativa; l'*Inula helenium* L. con effetti stimolanti sulla pelle; la *Lactuca sativa* L. dal cui succo si estrae un narcotico che sostituisce l'oppio; il *Taraxacum officinale* Weber. il cui infuso ha un effetto lassativo, depurativo e diuretico. Tra le specie utilizzate in campo alimentare ricordiamo invece il carciofo (*Cynara scolymus* L.) di cui si utilizzano soprattutto le brattee involucrali e il ricettacolo e il girasole, (*Helianthus annuus* L.) coltivato per i semi oleaginosi⁴.

4.2 Descrizione botanica del genere *Onopordum*

L' *Onopordum* già citata da Plinio con il nome "*Onopordon*" di derivazione greca è una pianta che generalmente cresce fra le macerie, sui ruderi di vecchie e cadenti costruzioni in rovina. *Onopordum* è un genere costituito da Linneo, ad esso attualmente vengono ascritte una ventina di specie, presenti in Europa, nelle regioni settentrionali dell'Africa e dell'Asia occidentale; quindi è un genere localizzato tipicamente nei territori bagnati dal mar Mediterraneo, in zone con clima temperato³. Nella nostra flora sono presenti circa sei specie a fiori purpurei oppure violacei o anche bianchi, utilizzate già dal 1640 nella orticoltura ornamentale come piante di aspetto decorativo e pittoresco, da coltivare nei giardini. Dal punto di vista botanico l'*Onopordum* è una pianta bienne, relativamente alta (può raggiungere anche i 2 metri nelle specie *arabicum* e *acanthium*); il fusto è ramificato, ma talvolta anche semplice; le foglie alterne, sinuato-dentate, o pinnatifide, con uno strato di velluto di aspetto bianco-cotonoso possono essere tanto caulinari, quanto radicali e caulinari. L'*Onopordum* è caratterizzato da grossi capolini solitari, terminali o agglomerati all' apice del caule o dei rami, avvolti da un involucri subgloboso o allargato, formato da brattee multiseriate. Le piante di questo genere possiedono un ricettacolo carnoso costituito da profondi alveoli, non setoloso e ricolmo di nettare⁴. Le corolle sono pentafide con filamenti staminali glabri, antere con appendice lanceolato-acuminata e sagittate alla base. Il frutto è un achenio obovato-compresso, coronato da un pappo, costituito da setole saldate fra di loro alla base da un anello corneo. La fioritura si ha tra aprile e agosto, a seconda della specie e della località.

4.2.1 Interesse del genere *Onopordum*

L'*Onopordum* è una pianta poco conosciuta, raramente inclusa fra le piante officinali ad uso domestico e non è molto usata in cucina. In omeopatia è apprezzata per disturbi cardiocircolatori, mentre in erboristeria è riconosciuta per le sue proprietà aperienti, antinfiammatorie e diuretiche. Può essere impiegata nelle malattie infiammatorie dello stomaco e dell'intestino, come la gastrite e la colite e può portare sollievo a certe forme infiammatorie degli organi dell'apparato urinario. In cucina si possono utilizzare i ricettacoli carnosì dei capolini e le grosse coste delle foglie, entrambi ricchi di inulina, sono edibili (cotti lessati o stufati) come i carciofi. Un ulteriore uso pratico è offerto dai suoi semi che, dopo la spremitura, forniscono olio ad uso alimentare, impiegato anche come combustibile per le lampade. In Inghilterra le fibre della pianta essicata venivano usate per riempire cuscini e materassi. Per la caratteristica molto decorativa sia delle foglie sia delle infiorescenze alcune varietà vengono coltivate come piante ornamentali nei giardini e nei parchi. Dal punto di vista farmacologico, il succo della foglia è consumato per problemi correlati al cancro e viene applicato sulle ulcere cutanee. Vi sono diverse specie del genere *Onopordum*; tra queste ricordiamo:

- l'*O. acanthium* L. o Acanzio: pianta bienne bianca grigio- tomentosa, con radice spessa e molto sviluppata e con fusto largamente alato-spinoso, cioè percorso per tutta la sua lunghezza da più espansioni alari dentato-spinose irregolari, con spine irte di quasi 1 cm, che raggiunge anche 150 -180 cm di altezza. Le foglie basali sessili pennatopartite a divisione largamente triangolare, dentato spinose e di colore grigio- azzurro. Le infiorescenze sono capolini grossi solitari o agglomerati di 3-5 cm di diametro, all'apice del fusto, circondati da un involucri globuloso-ragnateloso, rivestito da brattee strettamente lanceolate, larghe alla base al massimo 2-3 mm. La corolla è purpurea-violacea con fiori tutti tubolosi ermafroditi, impollinati dalle api. Si ritrova in luoghi incolti, lungo i cigli stradali, in luoghi sabbiosi, nelle scarpate, lungo gli argini dei fiumi, dal piano sino a 1500 metri di altitudine, in Italia è frequente nelle regioni settentrionali^{3,4};
- l'*O. illyricum* L. o Onopordo maggiore: differisce dall'*O. acanthium* L. per le brattee del capolino (3-6 cm di diametro) verdi e rossastre in alto, a spina breve e riflessa e per le foglie bianco-tomentose sulle pagine adassiali e abassiali con divisioni inciso-spinose. L' Onopordo maggiore cresce nell'Italia centrale e meridionale e nelle zone mediterranee a clima secco⁴;

- l'*O. arabicum* L. specie che cresce in Sardegna, a capolini solitari, terminali con brattee di colore rosa-porporino⁴;
- l'*O. tauricum* Willd, altra specie dell' Italia centrale e della Sicilia, a fiori rosei o porporini⁴.

4.2.2 *Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche

L' *Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche è una specie endemica in Israele, Libano e Siria¹. Dal punto di vista botanico è una specie bienne, può raggiungere anche i 2 metri di altezza, le infiorescenze sono grossi capolini solitari o agglomerati di 3-6 cm di diametro, all'apice del fusto, circondati da un involucri globuloso-ragnateloso, rivestito da brattee strettamente lanceolate, larghe alla base 2-3 mm al massimo. La corolla è purpurea-violacea con fiori tutti tubolosi, si ritrova nei luoghi incolti delle montagne del Libano dove fiorisce tra maggio e luglio.



Fig. 1- *Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche



Fig. 2- *Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche

4.2.3 Precedenti studi fitochimici sul genere *Onopordum*

Vista la sua complessa composizione chimica e le sue interessanti proprietà terapeutiche, il genere *Onopordum* è stato oggetto di numerosi studi. Presenta dal punto di vista fitochimico metaboliti che spesso si ritrovano anche in diverse specie di *Centaurea*, di *Cnicus* e *Arctium*, tutti generi appartenente alla stessa tribù delle *Cynareae*. I costituenti maggiormente rappresentati nel genere sono sesquiterpeni e flavonoidi mentre studi più recenti hanno evidenziato la presenza di diversi lignani.

4.2.3.a Flavonoidi

Nella tabella 1 sono raggruppati i flavonoidi isolati finora dal genere *Onopordum*. Tra quelli più frequentemente ritrovati ci sono i flavoni mono-, di- e trimetilati. Sono presenti anche forme glicosidiche soprattutto con glucosio e rutinosio oppure derivati dell'acido glucuronico o galatturonico in posizione 3 o 7.

Tabella 1 – Flavonoidi isolati dal genere *Onopordum* sp.

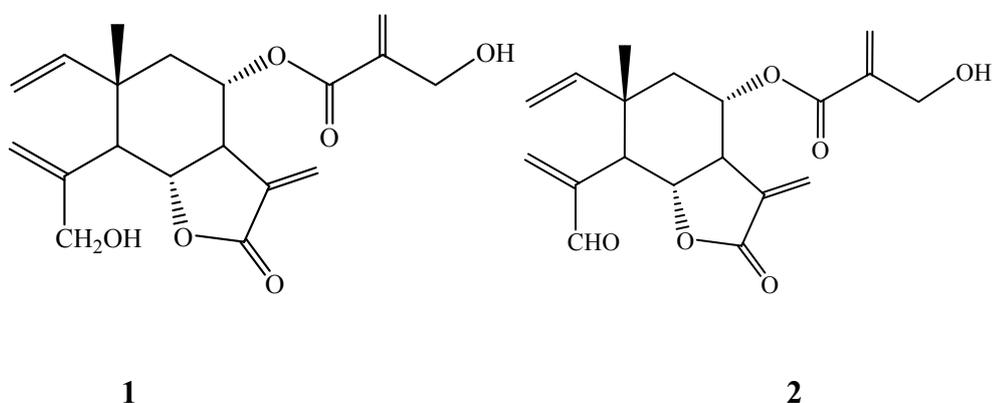
Nome della sostanza	Struttura chimica	Specie <i>Onopordum</i>
Acacetina	5,7-diidrossi-4-metossiflavone	<i>O. corymbosum</i> Willd. ⁵ <i>O. macracanthum</i> Schousboe. ⁶ <i>O. tauricum</i> Willd. ⁷ <i>O. illyricum</i> L. ⁸ <i>O. heteracanthum</i> C.A. Mey. ⁹ <i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. Ex Rouy. ¹⁰
Apigenina	4',5,7-triidrossiflavone	<i>O. acanthium</i> L. ¹¹ <i>O. corymbosum</i> Willd. ⁵ <i>O. macracanthum</i> Schousboe. ⁶ <i>O. tauricum</i> Willd. ⁷ <i>O. alexandrinum</i> Boiss. ¹² <i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³ <i>O. illyricum</i> L. ⁸ <i>O. heteracanthum</i> C.A. Mey. ⁹ <i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. Ex Rouy. ¹⁰
Crisoeriolo	4',5,7-triidrossi-3' metossiflavone	<i>O. corymbosum</i> Willd. ⁵ <i>O. macracanthum</i> Schousboe. ⁶ <i>O. tauricum</i> Willd. ⁷ <i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³ <i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. Ex Rouy. ¹⁰ <i>O. sibthorpiatum</i> Boiss.& Heldr. ¹⁰

Isoramnetina	3',4',5,7-tetraidrossiflavone	<i>O. acanthium</i> L. ¹⁴
Ispidulina	4',5,7-triidrossi-6-metossiflavone	<i>O. corymbosum</i> Willd. ⁵ <i>O. tauricum</i> Willd. ⁷ <i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³ <i>O. heteracanthum</i> C.A. Mey. ⁹ <i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. Ex Rouy. ¹⁰ <i>O. sibthorpiatum</i> Boiss.& Heldr. ¹⁰
Luteolina	3',4',5,7-tetraidrossiflavone	<i>O. acanthium</i> L. ¹⁴ <i>O. corymbosum</i> Willd. ⁵ <i>O. macracanthum</i> Schousboe ⁶ <i>O. tauricum</i> Willd. ⁷ <i>O. alexandrium</i> Boiss. ¹² <i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³ <i>O. heteracanthum</i> C.A. Mey. ⁹ <i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. Ex Rouy. ¹⁰ <i>O. sibthorpiatum</i> Boiss.& Heldr. ¹⁰
Quercetina	3',4',3,5,7-pentaidrossiflavone	<i>O. acanthium</i> L. ¹⁴ <i>O. alexandrium</i> Boiss. ¹² <i>O. ambiguum</i> Fresen. ¹⁵
Pectolinarigenina	5,7-diidrossi-4',6-dimetossiflavone	<i>O. nervosum</i> Boiss. ¹⁶
Onopordina	3',4',5,7-tetraidrossi-8-metossiflavone	<i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. ex Rouy. ¹⁰ <i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³
Sorbifolina	4',5,6-triidrossi-7-metossiflavone	<i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³ <i>O. sibthorpiatum</i> Boiss.& Heldr. ¹⁰
Vitexina	5,7,4'-triidrossiflavone	<i>O. laconicum</i> Heldr. & Sart. ex Rouy. ¹⁰ <i>O. myricanthum</i> Boiss. ¹³

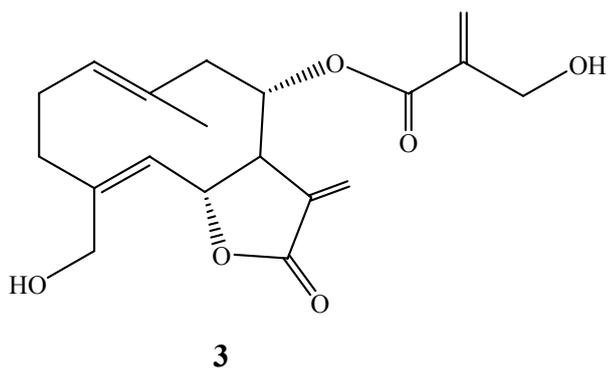
4.2.3.b Sesuiterpeni

I sesquiterpeni, metaboliti molto abbondanti in questo genere così come in tutta la famiglia delle Asteraceae, sono presenti sottoforma di elemani, germacrani, eudesmani o i rispettivi lattoni.

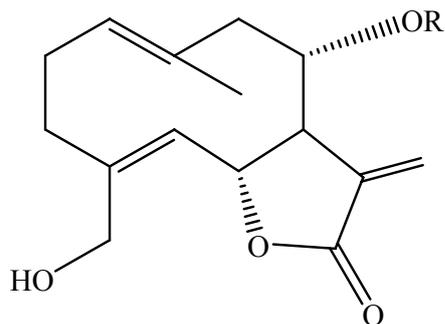
Gli elemani ed i germacrani sono stati isolati la prima volta nel 1979 dalla frazione polare delle parti aeree di *Onopordum leptolepis* DC. In questo studio Rustaiyan A. ed i suoi collaboratori isolarono due¹⁷ sesquiterpeni lattonici appartenenti alla classe degli elemanolidi. Questi composti erano stati isolati precedentemente dalla *Centaurea pullata*, appartenente alla stessa tribù dell'*Onopordum*, ma ad una differente sottotribù.



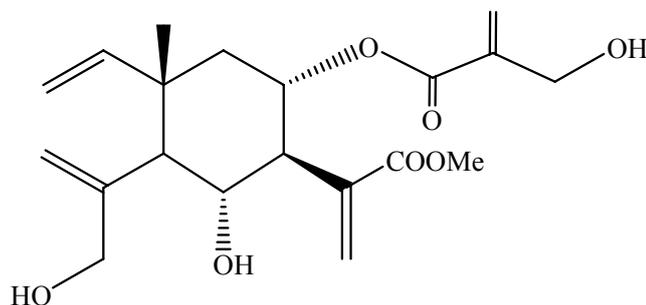
Nello stesso anno proseguendo gli studi sulla specie *leptolepis* furono isolati l'onopordopicrina (**3**) e due suoi derivati¹⁸.



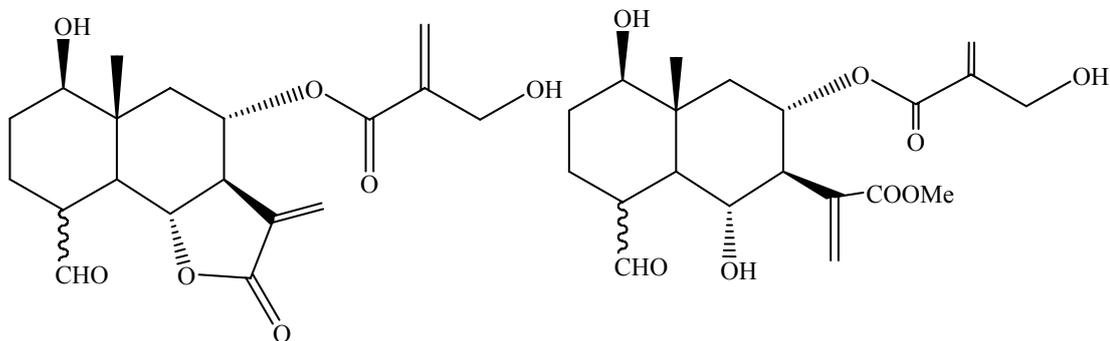
Lo stesso gruppo di ricerca, proseguendo gli studi su diverse specie del genere *Onopordum*, isolò dalle parti aeree dell'*O. carmanicum* (Bornm.) Bornm l'onopordopicrina (**3**) e due suoi esteri (**4**) e (**5**), un nuovo elemano (**6**), due eudesmanolidi (**7**) (**8**) e due eudesmani (**9**) (**10**).¹⁹ L'onopordopicrina già isolata precedentemente nell'*O. nervosum* Boiss.¹⁶ come gli eudesmani riportati di sopra, sono componenti che caratterizzano questo genere, al contrario dei guaianolidi, che pare siano assenti in questo genere nonostante tipici della tribù delle Cynareae.



4 R= iBu
 5 R= Meacr
 3 R= 4OH-Meacr



6



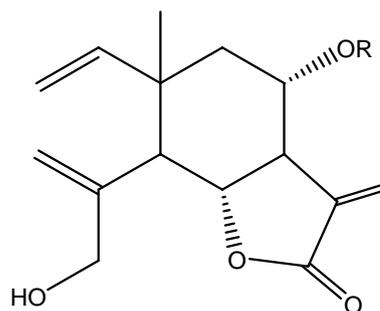
7 R= 4 α H

8 R= 4 β H

9 R= 4 α H

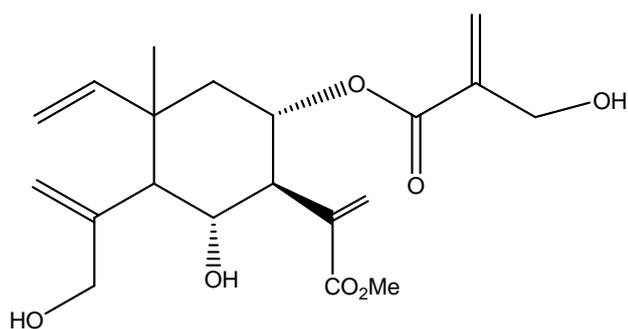
10 R= 4 β H

Successivamente un gruppo di ricercatori dell'Università di Valencia, ha apportato un importante contributo alla caratterizzazione fitochimica di questo genere, infatti dall'estratto metanolico delle parti aeree dell'*O. corybosum* Willk nel 1989 isolarono due elemanolidi (**11**), (**12**) e un elemano (**13**)²⁰.



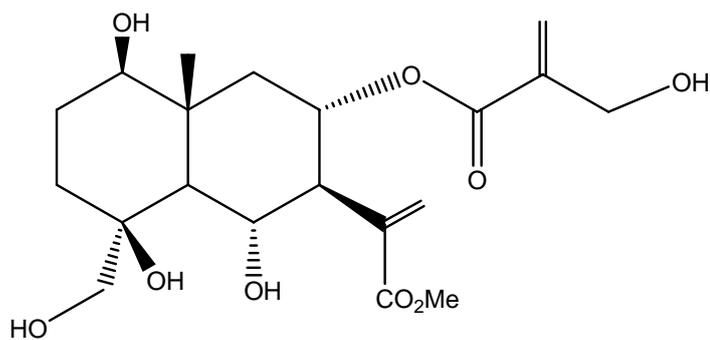
11 R= H

12 R= COC(=CH₂)CH₂OH

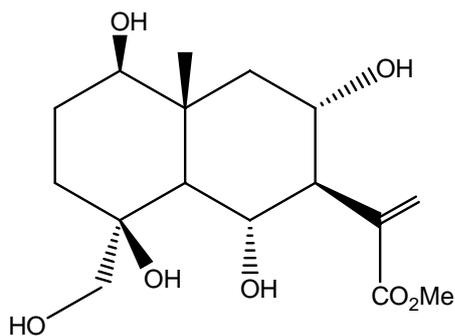


13

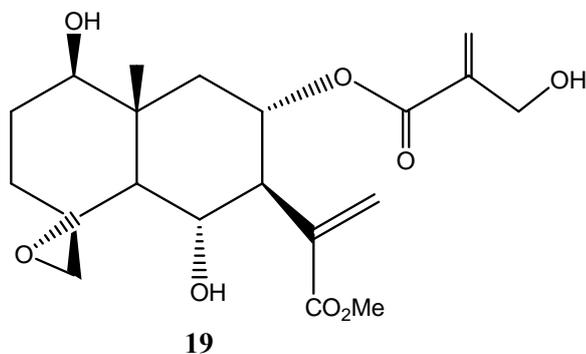
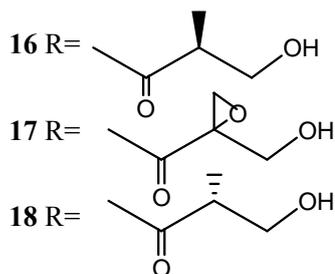
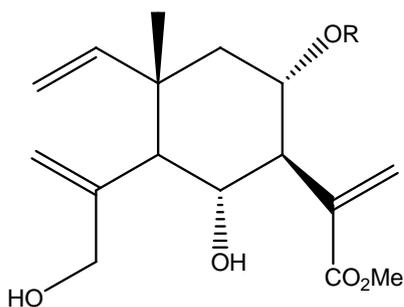
Proseguendo la loro ricerca nel 1992 dall'*O. acaulon* L isolarono due nuovi prodotti con scheletro eudesmano (**14**) e (**15**)²¹, e nel 1993 dall'estratto metanolico della stessa pianta isolarono 11 sesquiterpeni: tra cui tre elemmani (**16**), (**17**) e (**18**) e un eudesmano caratterizzato per la prima volta in natura (**19**).²²



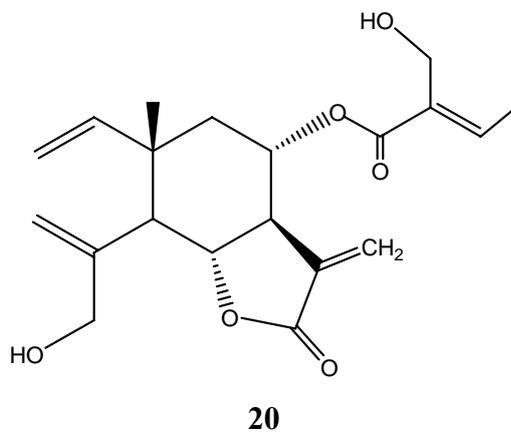
14

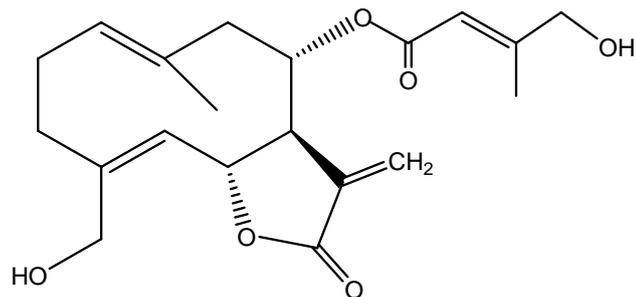


15

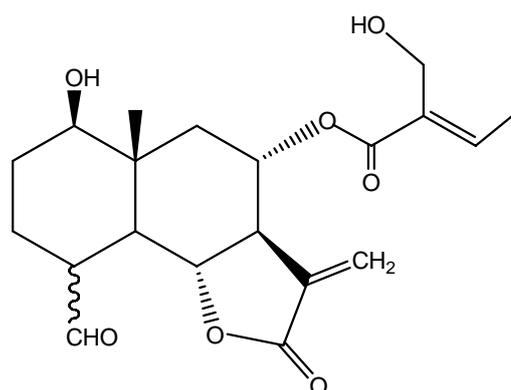


Studi sull'*O. myriacanthum* raccolto in Grecia hanno evidenziato anche in questa specie la presenza di quattro elemanolidi, cinque germacranolidi, tre eudesmanolidi e due idrossiesteri elemani. Quattro di questi metaboliti, le cui strutture sono riportate di seguito, non erano mai stati isolati in precedenza **(20)**, **(21)**, **(22)** e **(23)**¹³.

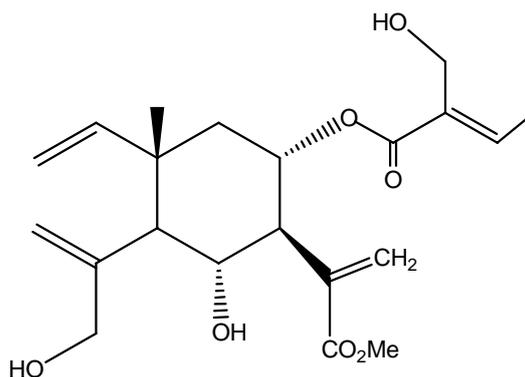




21

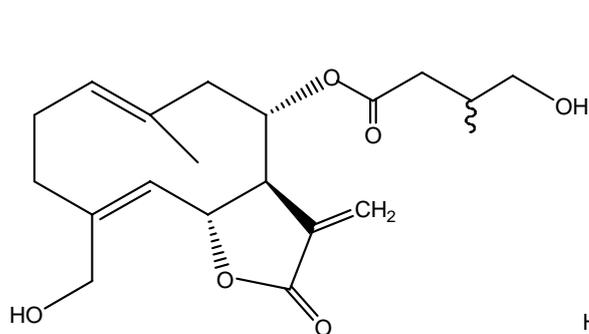


22

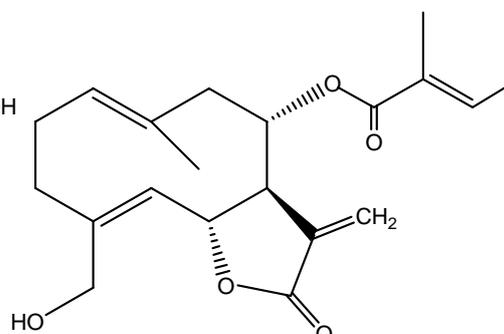


23

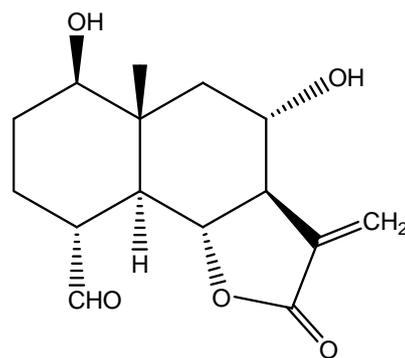
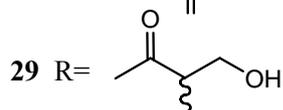
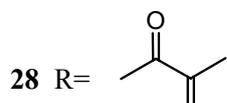
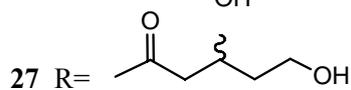
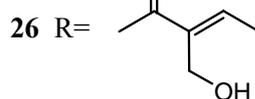
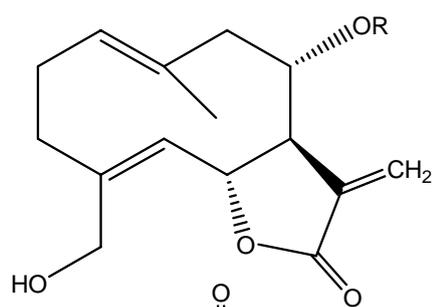
Dalle parti aeree dell'*O. laconicum* Heldr. e Sart. ex Rouy e dell'*O. sibthorpiatum* Boiss. e Heldr., specie tipiche della Grecia, sono stati isolati diciassette germacranolidi, cinque guaianolidi, quattro eudesmanolidi e due elemanolidi²³. Le strutture riportate di seguito, si riferiscono ai composti isolati per la prima volta in natura. Gli altri metaboliti presenti in queste due specie tipiche della Grecia erano componenti già isolati dal genere *Onopordum*, come il derivato 15-idrossicostunolide¹⁹, vari germacranolidi come l'onopordopicrina^{18,20} e gli eudesmanolidi¹³ e i guaianolidi. E' da sottolineare la determinazione dei guaianolidi per la prima volta nel genere *Onopordum*, sebbene tali metaboliti siano frequentemente riscontrati nella famiglia delle Asteraceae, come nel genere *Centaurea*.



24

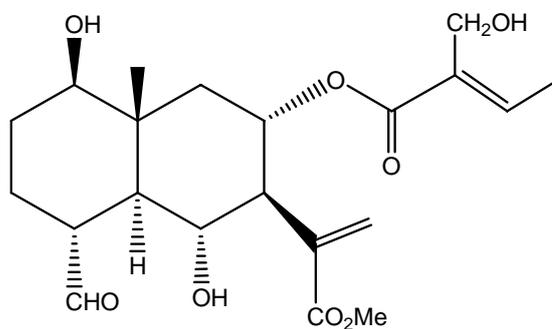


25

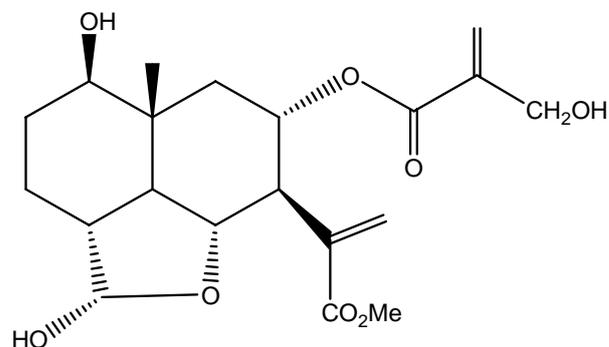


30

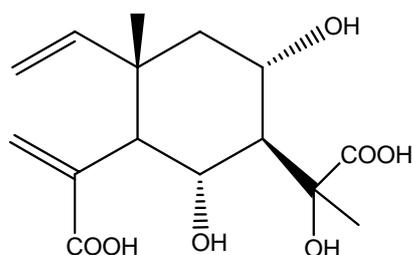
Dall'*O. illyricum* L., pianta tipica del bacino Mediterraneo raccolta in Sicilia, sono stati isolati due nuovi eudesmani e due nuovi elemanni.²⁴



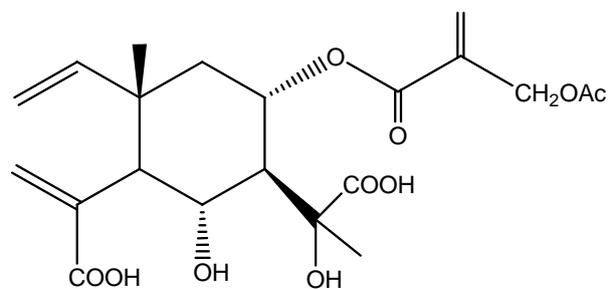
31



32

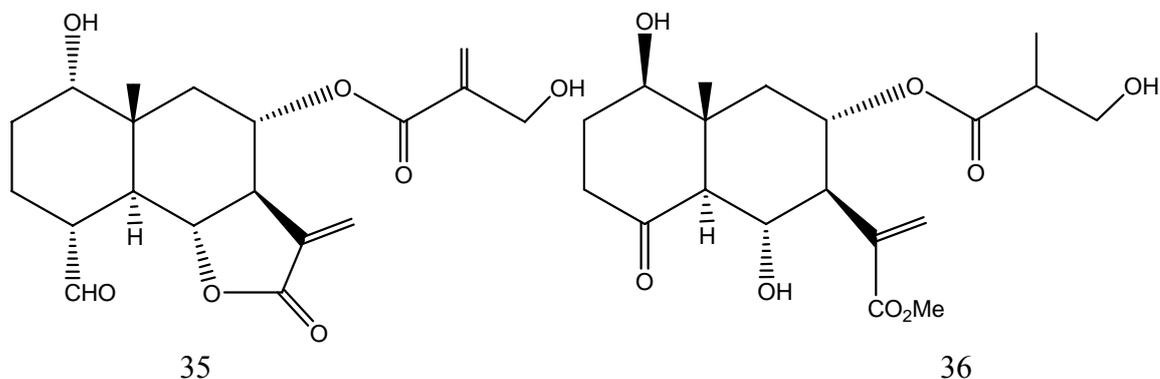


33



34

Un nuovo sesquiterpene lattone diidrossilato, 8 α -[4-idrossimetacrilossi]-1-episoncucarpolide (**35**), epimero sul C-1 di un precedente eudesmanolide isolato, insieme all'onopordopicrina sono stati ritrovati nelle parti aeree dell' *O. ambiguum* Fresen.²⁵ Dalla stessa specie è stato poi isolato nel 2002 un nuovo derivato con scheletro eudesmano (**36**) insieme ad elemanolidi a struttura già nota.²⁶



4.2.4 Proprietà biologiche del genere *Onopordum*

L'*Onopordum* è impiegato nella medicina popolare per le sue proprietà ipotensive, emostatiche e per il trattamento di alcune infiammazioni della pelle.¹ Da uno studio condotto su piante tipiche della Giordania, in grado di aumentare la funzionalità delle cellule *Natural Killer*, importanti nel riconoscimento e distruzione delle cellule tumorali, è emerso che l'estratto acquoso dell'*O. acanthium* L., è attivo nel trattamento del linfoma, andando ad aumentare sia *in vitro* che *in vivo*, la funzione citotossica delle cellule NK contro le cellule tumorali YAC^{27,28}. Nonostante il genere *Onopordum* sia stato abbastanza studiato dal punto di vista chimico, poche informazioni sono presenti in letteratura sull'attività dei suoi metaboliti. Uno dei metaboliti che caratterizza il genere è certamente l'onopordopicrina (**3**), metabolita che si ritrova spesso anche nel genere *Centaurea*. L'onopordopicrina (**3**), isolata dalle parti aeree della *C. sonchifolia* L. è responsabile di alcune azioni farmacologiche: è citotossico sulla linea cellulare KB di carcinoma umano epidermoide (ED₅₀ = 0.85 μ g/mL) ed esplica un'azione antimicrobica sui batteri Gram-positivi, in particolare sullo *S. aureus*²⁹. In uno studio condotto nel 2005 per valutare l'attività antifungina di ventidue sesquiterpeni isolati dal genere *Centaurea* è emerso che i germacranolidi (**25**) e (**26**), presenti anche nel genere *Onopordum*, esplicano una maggiore azione antifungina rispetto agli elemanolidi ed eudesmanolidi³⁰. Il composto (**3**) isolato anche dal genere *Dimerostemma* (Asteraceae)

ha mostrato *in vitro* un'azione antiinfiammatoria inibendo il legame del DNA con i fattori di trascrizione NF- κ B nelle cellule Jurkat T e Raw 264.7. Composti contenenti lo scheletro soncucarpolide **(7)**, **(8)**, **(22)**, **(30)** e **(35)**, ma con diversa catena laterale sul C-8, da diverse specie di *Centaurea* sono stati isolati e saggiati. I risultati dell'attività antibatterica evidenziano che i metaboliti presentano un moderato effetto inibitorio sui batteri Gram positivi, in particolare sullo *S. aureus*, mentre al contrario i batteri Gram-negativi non risultano sensibili a tali composti³¹. Inoltre in questo lavoro è evidenziato l'effetto citotossico degli elemanolidi sulle cellule OVCAR3, l'analisi dello studio SAR ha mostrato come l'effetto antiproliferativo sia incrementato dalla funzione aldeidica in posizione 4.

4.3 Materiali e metodi

Le parti aeree di *Onopordum cynarocephalum* Boiss. et Blanche sono state raccolte dalle piante in fioritura nell'Agosto 2002 a Col de Cèdres (Libano). Un campione è depositato nel "Herbarium del giardino botanico di Palermo" (PAL 10-600). Si è proceduto ad estrazione esaustiva con solventi a polarità crescente dopo aver essiccato e quindi polverizzato il campione.

4.3.1 Il metodo di estrazione

La droga secca, una volta macinata, è stata divisa in due parti: 291 g sono stati estratti in Soxhlet con solventi a polarità crescente (*n*-esano, cloroformio) e poi sottoposti a macerazione in metanolo, mentre 396.4 g sono stati sottoposti direttamente a macerazione a temperatura ambiente con acetone, cambiando cinque volte il solvente. In questo modo sono stati ottenuti quattro diversi residui: **RE** (residuo *n*-esanico), **RC** (residuo cloroformico), **RM** (residuo metanolico) e **RA** (residuo acetone).

4.3.2 Valutazione dell'attività degli estratti di *O. cynarocephalum* sulla vitalità cellulare

Una parte degli estratti ottenuti, è stata sottoposta a screening biologici preliminari allo scopo di valutare il loro potenziale effetto antitumorale *in vitro*, su colture cellulari tumorali umane di carcinoma epidermoide squamoso mediante il test MTT (vedi paragrafo 3.6.1), al fine di effettuare successivamente un frazionamento bioguidato della pianta. Tutti gli estratti (cloroformico, metanolico e acetone) ottenuti dalla pianta, sono stati saggiati a due livelli di concentrazione (1000 e 100 µg/ml) per tempi di esposizione di 24 e 48 ore. I risultati si sono dimostrati molto interessanti, evidenziando per alcune condizioni saggate, un forte effetto antiproliferativo tempo e concentrazione dipendente sulle cellule HeLa. In particolare è stata osservata una stretta relazione tra la polarità del solvente utilizzato per l'estrazione e l'effetto citotossico, in quanto aumentando la polarità si osservava una diminuzione dell'effetto citotossico e, per alcune condizioni, addirittura un lieve incremento della vitalità cellulare. Come mostrato in figura 3 l'estratto cloroformico ha mostrato maggiore citotossicità in tutte le condizioni di tempo e concentrazione saggate, seguito dall'estratto acetone, mentre l'estratto metanolico non ha indotto riduzione della vitalità cellulare in nessuna delle condizioni sperimentali esaminate. Questi risultati preliminari ci hanno indotto ad effettuare una purificazione degli estratti più attivi, al fine di evidenziare i composti responsabili dell'azione citotossica sulle cellule HeLa, che potrebbe giustificare l'uso nella medicina tradizionale della pianta per la cura di ulcere cancerose della pelle.

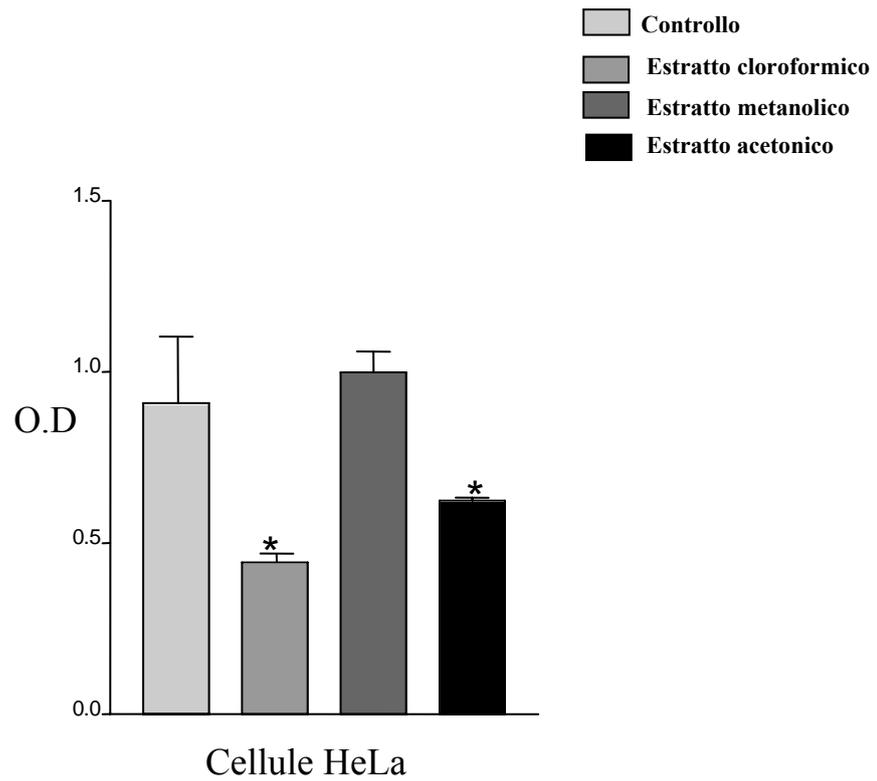


Fig. 3- Analisi della vitalità a 48 h delle cellule tumorali HeLa dopo trattamento con i diversi estratti di *O. cynarocephalum* alla concentrazione di 100 µg/ml.

4.3.3 Frazionamento del residuo cloroformico RC

5.3 g di estratto cloroformico sono stati solubilizzati in 15 ml di una miscela *n*-esano/AcOEt 9:1 e sottoposti a cromatografia su una colonna impaccata con gel di silice disattivata con H₂O (15%). L'eluizione è stata effettuata con solventi a polarità crescente iniziando con il 100% di *n*-esano ed aumentando gradualmente la polarità del solvente di eluizione mediante incrementi successivi di AcOEt. Sono state raccolte in totale 600 frazioni di 20 ml ciascuna. Di seguito sono riportati il solvente di eluizione utilizzato e le frazioni raccolte:

<i>n</i> -Esano: AcOEt	N° frazioni
<i>n</i> -esano	1-16
9:1	17-30
8:2	31-132
7:3	133-180
6:4	181-300
5:5	301-345
4:6	346-400
3:7	401-460
2:8	461-515
1:9	516-550
AcOEt	551-600

L'analisi cromatografica su strato sottile utilizzando come eluente le miscele (*n*-esano-AcOEt) e (CHCl₃- MeOH) e la successiva rivelazione dei componenti con solfato di cerio (vedi paragrafo 3.2.1), ha consentito di raggruppare le 600 frazioni così come riportato nella tabella seguente, in base alla loro omogeneità cromatografica:

Riunioni	Peso (mg)	Riunioni	Peso (mg)
A=16-20	111.9	M=172-177	11.7
B=20-27	64.2	N=178-201	113.4
C=28-39	120.8	O=202-237	148.9
D=40-46	47.5	P=238-300	401.2
E=47-66	58.1	Q=300-390	398.9
F=67-108	46.4	R=391-430	20.5
G=109-126	31.7	S=431-490	119.6
H=127-136	19.7	T=491-520	127
I=137-147	60.4	U=521-570	71.5
L=148-171	80.6	V=570-600	17.1

Le riunioni **N,O,P** e **T** che nei saggi di citotossicità preliminari mostravano una maggiore attività, sono state ulteriormente frazionate mediante cromatografia HPLC a fase inversa (vedi paragrafo 3.2.2.c). L'eluente, CH₃OH-H₂O, è stato utilizzato secondo rapporti variabili in funzione delle condizioni ottimali di separazione che sono state identificate con prove preliminari per ogni riunione da esaminare: riunione **N** (CH₃OH-H₂O 55:45), riunione **O** (CH₃OH-H₂O 55:45), riunione **P** (CH₃OH-H₂O 50:50) e riunione **T** (CH₃OH-H₂O 50:50).

Dalla separazione della riunione **N** abbiamo ottenuto i composti puri:

- arctigenina²¹ (**1**, 9.0 mg; Rt 6 min);
- 14.1 mg di una sub frazione che sembrava avere segnali caratteristici degli elemanni ma con qualche impurezza, dalla sua ulteriore purificazione mediante HPLC eluente CH₃OH-H₂O 60:40 è stato ottenuto il metabolita (**2**, 2.2 mg; Rt 13 min) mai isolato precedentemente in natura.

Dalla separazione di **O** è stato ottenuto:

- 8α -O-(4-idrossimetacrilato) deidromelitensina^{18,20} (**3**, 12.5 mg; Rt 6 min);

La purificazione della frazione **P** e successivamente delle sue sub frazioni ha permesso di ottenere:

- un estere metilico dell'idrossiacido acido corrispondente alla deidromelitensina^{22,23} (**4**, 1.5 mg; Rt 8 min);
- elemacarmanina^{19,20} (**5**, 19 mg; Rt 16 min);

- estere metilico 8 α -O-(2'-idrossimetil-2'-butenolossi) dell'idrossiacido acido corrispondente alla deidrometiltensina¹³ (**6**, 13.7 mg; Rt 19 min); un

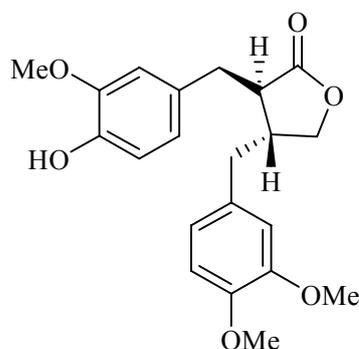
L'analisi HPLC della frazione **T** e di una sua sub frazione ha evidenziato la presenza del:

- carmanina¹⁹ (**7**, 18.4 mg; Rt 6 min);
- metabolita mai isolato precedentemente in natura (**8**, 2.5 mg; Rt 12 min);
- metil estere dell'acido 8 α -O-(2'-idrossimetil-2'-butenoilossi)-1 β ,6 α -diidrossi-15-osso-11(13)-eudesmen-12-oico²⁴ (**9**, 2.0 mg; Rt 7 min);.

Per confronto degli spettri NMR 1 D, 2 D ed ESI-MS con quelli riportati in letteratura è stato possibile identificare i 9 composti descritti di seguito.

4.3.4 Caratterizzazione dei composti

Composto 1



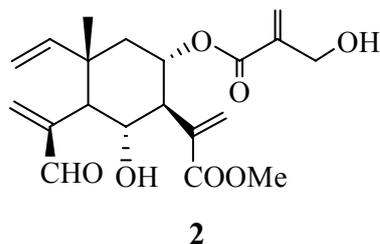
1

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 372 $[M]^+$, formula molecolare $C_{21}H_{24}O_6$. Lo spettro 1H -NMR registrato in CD_3OD presenta una serie di segnali parzialmente sovrapposti nella zona compresa fra 6.50 e 7.00 δ_H . Grazie allo spettro COSY è però possibile identificare questi segnali come due sistemi ABM situati su due diversi anelli aromatici trisostituiti. A δ 3.85, 3.83 e 3.81 ppm troviamo tre singoletti integranti rispettivamente per 3 protoni corrispondenti a tre metossili. Infine sono presenti i multipletti non risolti di 8 protoni alifatici fra 2.51 e 4.14 δ_H formanti un sistema di spin indipendente. Nello spettro ^{13}C -NMR, registrato sono presenti 20 segnali che tramite esperimenti DEPT, sono stati suddivisi in 8 gruppi CH, 3 CH_2 , 5 CH_3 e 7 C quaternari. Il confronto di queste informazioni con i dati presenti in letteratura, hanno permesso di ricostruire la struttura di un lignano avente una porzione lattonica.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 6.82 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.64 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2'), 6.61 (1H, dd, $J=7.8-1.9$ Hz, H-6'), 6.54 (1H, dd, $J=8.1-1.9$ Hz, H-6), 6.46 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 4.21 (2H, dd, $J=9.3, 6.8$, H-9a), 3.97 (2H, dd, $J=9.3, 6.8$, H-9b), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.92 (2H, dd, $J=5.3-1.7$, H-7'), 2.54 (4H, m H-7,8,8').

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 178.8 (C-9'), 149.0 (C-3'), 147.8 (C-3), 146.7 (C-4), 144.5 (C-4'), 130.4 (C-1'), 129.5 (C-1), 122.1 (C-6'), 120.6 (C-6), 114.1 (C-5'), 112.0 (C-2), 111.6 (C-2'), 111.3 (C-5), 71.3 (C-9), 55.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 46.6 (C-8'), 40.9 (C-8), 38.2 (C-7), 34.5 (C-7').

Composto 2



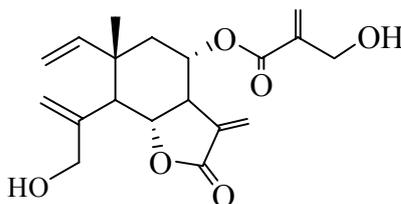
Lo spettro di massa del composto **2** unitamente all'analisi degli spettri ^{13}C NMR e ^{13}C NMR-DEPT ha indicato la formula bruta $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_7$. Gli spettri ^{13}C NMR e ^{13}C NMR-DEPT hanno mostrato la presenza di due metili, quattro doppi legami esociclici di cui tre coniugati, di un idrossimetilene, di due metini ossigenati, di due gruppi carbonilici esterei, di un altro metilene, di altri due metini, di un carbonio quaternario sp^3 e di un gruppo aldeidico.

Lo studio dello spettro ^1H NMR e ^{13}C NMR ha fatto ipotizzare uno scheletro elementare ($\delta_{\text{H}} = 1.15$ s, 3H; $\delta_{\text{C}} = 11.5$; CH_3 -14; $\delta_{\text{H}} = 5.63$ dd H-1, 1H; $\delta_{\text{C}} = 145.2$ C-1; $\delta_{\text{H}} = 4.89$ d, 1H, H-2a, $\delta_{\text{H}} = 4.84$ d, 1H, H-2b; $\delta_{\text{C}} = 113.0$; C-2) recante funzioni ossigenate ai carboni, C-6, C-8 e C-15. Il tipico doppio doppietto a $\delta_{\text{H}} 4.36$ indica la presenza di un ossidrile α -orientato legato al C-6. La catena esterea 4-idrossimetacrilica, identificata dai due singoletti a $\delta_{\text{H}} 6.19$ e $\delta_{\text{H}} 5.80$, relativi ai due protoni 3' ($\delta_{\text{C}} = 126.3$) e dal singoletto (2H) a $\delta_{\text{H}} 4.20$ ($\delta_{\text{C}} = 62.8$, C-4'), è chiaramente posizionata sul C-8 con orientamento α , come risulta evidente dal segnale di H-8 β ($\delta_{\text{H}} = 5.49$ ddd, $J = 12.0, 10.0, 4.8$ Hz, 1H; $\delta_{\text{C}} = 70.6$). Un altro doppio legame esociclico ($\delta_{\text{H}} = 6.34$ s, 1 H, H-13a; $\delta_{\text{H}} = 5.78$ s, 1H, H-13b; $\delta_{\text{H}} = 128.0$, C-13; $\delta_{\text{C}} = 137.0$, C-11) è stato invece assegnato ad un sistema olefinico coniugato ad un metil estere ($\delta_{\text{H}} = 3.77$ s, 3H; $\delta_{\text{C}} = 52.0$; $\delta_{\text{C}} = 167.1$, C-12). Nel ^1H e ^{13}C NMR sono presenti, inoltre, segnali a $\delta_{\text{H}} 9.59$ s e $\delta_{\text{C}} 193.5$ attribuibili ad un gruppo aldeidico α,β -insaturo sul C-15. Correlazioni fra il protone H-9b ed H-5 ed H-7 e fra il protone H-6 ed H-8 ed il metile 14 nello spettro NOESY hanno confermato la stereochimica relativa dei vari centri chirali. Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR del nostro composto risultavano estremamente simili a quelli, riportati in letteratura, per l'elemecarmanina; l'unica differenza era la presenza in quest'ultima di un gruppo alcolico primario sul C-15 invece del gruppo aldeidico. In base a questi dati a questo composto è stata assegnata la struttura riportata di sopra. E' da notare inoltre che il composto **2** è il primo esempio in letteratura di elemmano recante un aldeide sul C-15 in cui non sia presente un anello lattonico fra il C-6 ed il C-7.

Tabella 2 - Dati NMR relativi al composto **2**

posizione	¹ H	¹³ C	HMBC
1	5.63 dd (16.5, 10.5)	145.2	H-14
2a	4.89d (10.5)	113.0	
2b	4.84 dn(16.5)		
3a	6.33 s	136.7	H-5
3b	6.27 s		
4		147.1	H-15, H-4, H-5
5	2.93 d (11.0)	49.0	H-3a, H-3b, H-9a, H-14
6	4.36 dd (11.0, 10.0)	70.2	H-5
7	2.76 t (10.0)	55.0	H-13a, H-13b, H-9a
8	5.49 ddd (12.0, 10.0, 4.8)	70.6	H-7, H-9a, H-9b
9 β eq	1.93 dd (12.6, 4.8)	43.5	H-14
9 α ax	1.69 dd (12.6, 12.0)		
10		40.2	H-2b, H-5, H-9a, H-14
11		137.0	H-13a
12		167.1	H-13a, H-13b, OCH ₃
13a	6.34 s	128.0	
13b	5.78 s		
14	1.15 (3H)	17.3	H-9b
15	9.59 s	193.5	H-3b
1'		165.2	H-3'a, H-8, H-4'
2'		139.0	H-3'a, H-4'
3'a	6.19 s	126.3	H-4'
3'b	5.80 s		
4'	4.20 s (2H)	62.8	H-3'a, H-3'b
OCH ₃ (12)	3.77 s (3H)	52.0	

Composto 3



3

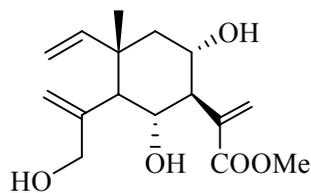
Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 348 $[M]^+$, formula molecolare C₁₉ H₂₄ O₆. Nello spettro ¹H NMR i segnali a δ_H 5.78 dd, 5.07 d, 5.03 d, 5.44 br s e 4.99 br s sono stati assegnati rispettivamente al H-1, H-2a, H-2b, H-3a e H-3b. La presenza di due doppietti, con J di 14.2 Hz, a δ_H 4.11 e 4.04 indica la presenza di un gruppo idrossimetilenico in posizione 4, ed i due valori sono stati assegnati ai protoni H-15a e H-15b. Un tipico doppietto a δ_H 2.59 (J = 11.6 Hz) per il H-5 ed un segnale dddd a δ_H 2.98 (J = 11.2, 10.8, 3.2 e 2.8 Hz) per il protone H-7 indica una *trans* disposizione dei protoni H-5/H-6, H-6/H-7 e H-7/H-8 cosicchè le funzioni ossigenate sul C-6 e sul C-8 sono α -orientate. La funzione ossigenata sul C-6, si deduce dalla presenza del dd a δ_H 4.26 di H-6, tipico segnale di un protone in un anello γ -lattone. L'anello lattonico presenta una funzione metilenica in posizione 11 i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come doppietti a δ_H 6.31 e 5.60 ppm. Il doppio tripletto a δ_H 5.29 corrisponde al protone H-8 e indica la presenza di un estere 8α -idrossi derivato. La presenza del 4-idrossimetacriloil sul C-8 è evidenziato dalla presenza dei segnali a δ_H 6.17 br s, 5.96 br s e 4.38 br s per i protoni H-3'a, H-3'b e H-4'. Il confronto dei dati ottenuti con quelli riportati in letteratura, conferma che il composto è un elemanolide 1'8 α -O-(4-idrossimetacrilato) derivato della deidrometiltensina, ritrovato per la prima volta nel 1979 nella specie *O. leptolepis* DC.

◆ ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 6.31 (1H, d, J=3.6 Hz, H-13a), 6.17 (1H, *br s* H-3'a), 5.96 (1H, *br s* H-3'b), 5.68 (1H, dd, J= 17.3-10.7 Hz, H-1), 5.60 (1H, d, J=2.8 Hz, H-13b), 5.44 (1H, *br s* Hz, H-3a), 5.29 (1H, dt, J=4.0 e 10.8 Hz, H-8), 5.07 (1H, d, J=10.5 Hz, H-2a), 5.03 (1H, d, J=17 Hz, H-2b), 4.99 (1H, *br s* Hz, H-3b), 4.26 (1H, dd, J=11.2, 11.6 Hz, H-6), 4.38 (2H, *br s* H-4'), 4.11(1H, d, J=14.2 Hz, H-15a), 4.04 (1H, d, J=14.2 Hz, H-15b), 2.59 (1H, d, J=11.5 Hz, H-5), 2.98 (1H, dddd, J=11.2, 10.8, 3.2 e 2.8 Hz, H-7), 2.07 (1H, dd, J=13,4.1 Hz, H-9a), 1.80 (1H, dd, J=13-4.1 Hz, H-9b), 1.19 (3H, s, CH₃-14).

◆ ¹³C-NMR (CDCl₃): ppm 169.3 (C-12), 167.0 (C-1'), 145.6 (C-1), 143.6 (C-4), 140.2 (C-2'), 136.6 (C-11), 128.3 (C-3'), 120.3 (C-13), 115.1 (C-3), 113.1 (C-2), 78.7 (C-6),

69.1 (C-8), 67.3 (C-15), 60.7 (C-4'), 52.4 (C-7), 50.6 (C-5), 45.0 (C-9), 41.9 (C-10),
18.7 (C-14).

Composto 4



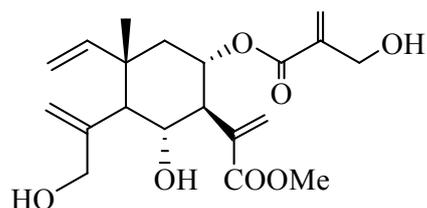
4

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 296 $[M]^+$, formula molecolare $C_{16} H_{24} O_5$. Lo spettro 1H NMR mostra tipici segnali a δ 5.64 *dd*, 4.91 *d*, 4.88 *d*, 5.33 *br s* e 4.96 *br s* assegnati rispettivamente al H-1 H-2a, H-2b, H-3a e H-3b che indicano la presenza di uno scheletro elemanico. La presenza due di doppietti, con $J = 14.2$ Hz, a δ_H 4.06 e 3.90 ppm indica la presenza di un gruppo idrossimetilenico in posizione 4, ed i due valori sono stati assegnati ai protoni H-15a e H-15b. Un tipico doppietto a δ_H 2.06 ($J = 10.8$ Hz) per il H-5 ed un tripletto a δ_H 2.36 ($J = 10.3$ Hz) per il protone H-7 indica una *trans* disposizione dei protoni H-5/H-6, H-6/H-7 e H-7/H-8 cosicchè la funzione ossigenata sul C-6 e l'OH sul C-8 sono α -orientate. L'estere carbonilico sul C-11, è da: un segnale a δ_C 167.7 ppm corrispondente al carbonile in posizione 12, un δ_C a 52.1 e a δ_H 3.72 ppm per il metossile legato al carbonile ed un segnale a δ_C 128.6 per il metilene i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come singoletti a δ_H 6.35 e 5.75 ppm. Il confronto di queste informazioni con i dati presenti in letteratura, hanno permesso di ricostruire la struttura di un elemano isolato per la prima volta dalla *Centaurea aspera* L. var *subinermic* DC., che corrisponde ad un estere metilico dell'idrossiacido acido corrispondente alla deidrometiltensina.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 6.35 (1H, s, H-13a), 5.75 (1H, s, H-13b), 5.64 (1H, *dd*, $J = 17.3$ - 10.7 Hz, H-1), 5.33 (1H, *br s* Hz, H-3a), 4.98 (1H, *br s* Hz, H-3b), 4.91 (1H, *d*, $J = 10.5$ Hz, H-2a), 4.88 (1H, *d*, $J = 17$ Hz, H-2b), 4.08 (1H, *t* H-6), 4.06 (1H, *dt*, $J = 11$ e 4.5 , H-8), 4.04 (1H, *d*, $J = 14.2$ Hz, H-15a), 3.90 (1H, *d*, $J = 14.2$ Hz, H-15b), 3.72 (3H, s, OMe), 2.36 (1H, *t*, $J = 10.3$ Hz, H-7), 2.06 (1H, *d*, $J = 10.8$ Hz, H-5), 2.01 (1H, *dd*, $J = 13$ - 4.1 Hz, H-9a), 1.80 (1H, *dd*, $J = 13$ - 4.1 Hz, H-9b), 1.05 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 167.7 (C-12), 146.9 (C-1), 146.6 (C-11), 138.4 (C-4), 128.6 (C-13), 114.7 (C-3), 111.7 (C-2), 70.7 (C-6), 67.8 (C-8), 67.7 (C-15), 58.1 (C-7), 55.5 (C-5), 47.0 (C-9), 40.1 (C-10), 18.7 (C-14),

Composto 5



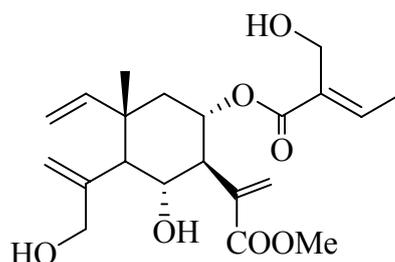
5

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 380 $[M]^+$, formula molecolare $C_{20}H_{28}O_7$. Lo spettro 1H NMR mostra tipici segnali a δ 5.68 *dd*, 4.96 *d*, 4.92 *d*, 5.41 *br s* e 5.06 *br s* assegnati rispettivamente al H-1 H-2a, H-2b, H-3a e H-3b che indicano la presenza di uno scheletro elemanico. La presenza di due doppietti, con *J* di 14.2 Hz, a δ_H 4.07 e 3.97 indica la presenza di un gruppo idrossimetilenico in posizione 4, ed i due valori sono stati assegnati ai protoni H-15a e H-15b. Un tipico doppietto a δ 2.13 (*J* = 10.8 Hz) per il H-5 ed un tripletto a δ_H 2.74 (*J* = 10.3 Hz) per il protone H-7 indica una disposizione *trans* dei protoni H-5/H-6, H-6/H-7 e H-7/H-8 cosicchè le funzioni ossigenate sul C-6 e sul C-8 sono α -orientate. L'estere carbonilico sul C-11, è evidenziato da: un segnale a δ_C 167.1 ppm corrispondente al carbonile in posizione 12, un δ_C a 52.1 e a δ_H 3.78 ppm per il metossile legato al carbonile ed con un segnale a δ_C 128.4 per il metilene i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come singoletti a δ_H 6.32 e 5.75 ppm. La presenza del 4-idrossimetacriloil sul C-8 è evidenziato dalla presenza dei segnali a δ_H 6.18 *br s*, 5.79 *br s* e 4.26 *br s* per i protoni H-3'a, H-3'b e H-4' rispettivamente. Il composto corrisponde alla struttura dell' elemacarmanina.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 6.32 (1H, s, H-13a), 6.18 (1H, *br s* H-3'a), 5.79 (1H, *br s* H-3'b), 5.75 (1H, s, H-13b), 5.68 (1H, *dd*, *J*= 17.3-10.7 Hz, H-1), 5.41 (1H, *br s* Hz, H-3a), 5.40 (1H, *dt*, *J*=11 e 4.5, H-8), 5.06 (1H, *br s* Hz, H-3b), 4.96 (1H, *d*, *J*=10.5 Hz, H-2a), 4.92 (1H, *d*, *J*=17 Hz, H-2b), 4.26 (2H, *br s* H-4'), 4.21 (1H, *t* *J*=11 Hz, H-6), 4.07 (1H, *d*, *J*=14.2 Hz, H-15a), 3.97 (1H, *d*, *J*=14.2 Hz, H-15b), 3.78 (3H, s, OMe), 2.74(1H, *t*, *J*=11 Hz, H-7), 2.13 (1H, *d*, *J*=11.5 Hz, H-5), 1.94 (1H, *dd*, *J*=13-4.1 Hz, H-9a), 1.80 (1H, *dd*, *J*=13-4.1 Hz, H-9b), 1.19 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 167.1 (C-12), 165.4 (C-1'), 146.3 (C-1), 139.3 (C-4), 138.2 (C-2'), 137.9 (C-11), 128.4 (C-13), 126.0 (C-3'), 115.0 (C-3), 112.0 (C-2), 70.9 (C-6), 69.1 (C-8), 67.8 (C-15), 62.4 (C-4'), 52.1 (OMe), 55.3 (C-5), 54.6 (C-7), 43.5 (C-9), 40.2 (C-10), 18.3 (C-14),

Composto 6



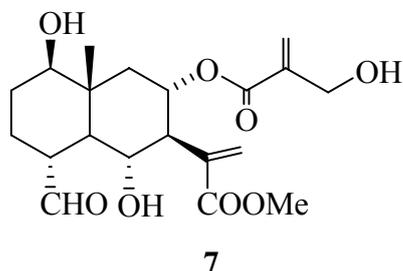
6

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 394 $[M]^+$, formula molecolare C₂₁H₃₀O₇. Lo spettro ¹H NMR mostra tipici segnali a δ_H 5.68 dd, 4.96 d, 4.92 d, 5.41 br s e 5.06 br s assegnati rispettivamente al H-1 H-2a, H-2b, H-3a e H-3b che indicano la presenza di uno scheletro elemanico. I valori NMR del nucleo elemanico di questo metabolita sono gli stessi del composto (5) descritto precedentemente, l'unica differenza è la catena laterale in posizione 8. In particolare si tratta di un 2-idrossimetil-2-butenolato (sarracinoato), evidenziato dalla presenza nello spettro ¹H NMR di: un quartetto a δ_H 7.01 di un protone olefinico, un doppietto a δ_H 1.94 del CH₃ vinilico in posizione 4' ed un brs a δ_H 4.26 corrispondente al CH₂OH in posizione 5'. Il composto è l'8 α -O-(2'-idrossimetil-2'-butenolossi) derivato della diidrometiltensina.

◆ ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7.01 (1H, q, H3'), 6.25 (1H, s, H-13a), 5.75 (1H, s, H-13b), 5.68 (1H, dd, J= 17.3-10.7 Hz, H-1), 5.41 (1H, br s Hz, H-3a), 5.40 (1H, dt, J=11 e 4.8, H-8), 5.06 (1H, br s Hz, H-3b), 4.96 (1H, d, J=10.5 Hz, H-2a), 4.92 (1H, d, J=10.5 Hz, H-2b), 4.26 (2H, br s H-5'), 4.21 (1H, t J=11 Hz, H-6), 3.98 (1H, d, J=14.2 Hz, H-15a), 3.92 (1H, d, J=14.2 Hz, H-15b), 3.72 (3H, s, OMe), 2.74 (1H, t, J=11 Hz, H-7), 2.13 (1H, d, J=11.5 Hz, H-5), 1.94 (1H, br s, H-4'), 1.90 (1H, dd, J=13-4.1 Hz, H-9a), 1.80 (1H, dd, J=13-4.1 Hz, H-9b), 1.19 (3H, s, CH₃-14).

◆ ¹³C-NMR (CDCl₃): ppm 167.1 (C-12), 166.4 (C-1'), 146.3 (C-1), 140.7 (C-3'), 139.3 (C-4), 138.0 (C-11), 131.7 (C-2'), 128.1 (C-13), 114.8 (C-3), 112.0 (C-2), 70.9 (C-6), 70.7 (C-8), 67.8 (C-15), 55.3 (C-5), 54.6 (C-7), 51.9 (OMe), 43.5 (C-9), 40.2 (C-10), 18.3 (C-14), 14.1 (C-4').

Composto 7

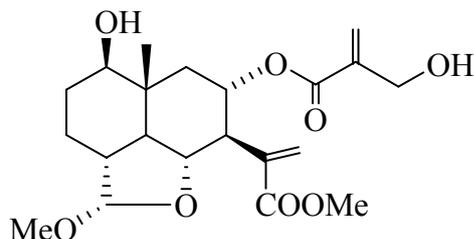


Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 396 $[M]^+$, formula molecolare $C_{20}H_{28}O_8$. Lo spettro 1H NMR mostra tipici segnali di un eudesmano, con un valore a δ_H 1.03 per il metile sul C-10, con funzioni ossigenate sul C-1, C-6, C-8 e C-15. La presenza del gruppo ossidrilico sul C-1 è evidenziata dal doppio doppietto a δ_H 3.46, mentre i tipici segnali di un idrossimetacrilato (vedi composto **5**) indica la natura del residuo estereo sul C-8. L'aldeide sul C-4 è in posizione equatoriale a δ_H 9.33 come riportato in letteratura.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 9.33 (1H, d, $J=4$ Hz, H-15), 6.26 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-13a), 6.16 (1H, *br s* H-3'a), 5.84 (1H, *br s* H-3'b), 5.72 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-13b), 5.45 (1H, *br dd*, $J=12-10$ Hz, H-8), 4.26 (2H, *br s* H-4'), 4.02 (1H, t $J=9.5$ Hz, H-6), 3.78 (3H, s, OMe), 3.46 (1H, dd, $J=11.0-5.0$ Hz, H-1), 2.57 (1H, dddd, $J=11.0-11.0-4.0-3.0$ Hz, H-4), 2.56 (1H, t, H-7), 2.47 (1H, dd, $J=13-4.1$ Hz, H-9a), 1.26 (1H, dd, $J=13-12$ Hz, H-9b), 1.79 (1H, m, H-2a), 2.41 (1H, m, H-3a), 1.45 (1H, m Hz, H-3b), 2.20 (1H, dd, $J=11.0-11.0$ Hz, H-5), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.03 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 204.0 (C-15), 169 (C-12), 167 (C-1'), 140.2 (C-2'), 138 (C-11), 128.3 (C-3'), 125 (C-13), 76.0 (C-1), 72.0 (C-8), 67.0 (C-6), 60.7 (C-4'), 58.0 (C-5'), 58.0 (C-7), 52.1 (OMe), 47.9 (C-4), 43.5 (C-9), 40.2 (C-10), 32.0 (C-5), 28.1 (C-3), 25.0 (C-2), 12.6 (C-14).

Composto 8



8

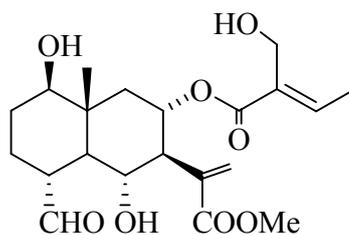
Lo spettro di massa del composto **8** unitamente alle analisi degli spettri ^{13}C NMR e ^{13}C NMR-DEPT ha indicato la formula bruta $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_8$. Gli spettri ^{13}C NMR e ^{13}C NMR-DEPT hanno mostrato la presenza di tre metili, due doppi legami esociclici coniugati, di un idrossimetilene, di quattro metini ossigenati, di due gruppi carbonilici esterei, di altri tre metileni, di altri tre metini, nonché di un carbonio quaternario sp^3 . Lo studio dello spettro ^1H NMR e ^{13}C NMR ha fatto ipotizzare uno scheletro eudesmanico ($\delta_{\text{H}} = 1.02$ s, 3H; $\delta_{\text{C}} = 11.5$; CH_3 -14) recante funzioni ossigenate ai carboni C-1, C-6, C-8 e C-15. La presenza di un ossidrile sul C-1 β -orientato fu dedotta dal doppio doppietto a $\delta_{\text{H}} 3.34$ ($J = 12$ e $J = 4.5$ Hz), mentre il tipico tripletto a $\delta_{\text{H}} 4.01$ ($J = 10.5$ Hz) ha indicato la presenza di un ossidrile α -orientato legato al C-6. La catena esterea 4-idrossimetacrilica, identificata dai due singoletti a $\delta_{\text{H}} 6.18$ e $\delta_{\text{H}} 5.87$, relativi ai due protoni 3' ($\delta_{\text{C}} = 124.9$) e dal singoletto (2H) a $\delta_{\text{H}} 4.20$ ($\delta_{\text{C}} = 61.4$, C-4'), è chiaramente posizionata sul C-8 con orientamento α , come risulta evidente dal segnale di H-8 β ($\delta_{\text{H}} = 5.32$ ddd, $J = 12.0$, 10.0, 4.8 Hz, 1H; $\delta_{\text{C}} = 74.4$). Il secondo doppio legame esociclico ($\delta_{\text{H}} = 6.27$ s, 1 H, H-13a; $\delta_{\text{H}} = 5.81$ s, 1H, H-13b; $\delta_{\text{C}} = 128.5$, C-13; $\delta_{\text{C}} = 139.4$, C-11) è stato invece assegnato ad un sistema olefinico coniugato ad un metil estere ($\delta_{\text{H}} = 3.77$ s, 3H; $\delta_{\text{C}} = 52.3$; $\delta_{\text{C}} = 168.4$, C-12). Nel ^{13}C NMR era presente un segnale a $\delta_{\text{C}} 107.2$ attribuibile ad un metino acetalico o emicetalico. Sfortunatamente il corrispondente segnale nello spettro ^1H NMR era coperto dal segnale dell'acqua ($\delta_{\text{H}} = 4.90$) e conseguentemente fu registrato lo spettro ^1H NMR del composto **8** in CDCl_3 . Da tale spettro è risultato evidente la presenza di un doppietto a $\delta_{\text{H}} = 4.89$ ($J = 4.8$ Hz). Da un esame della letteratura i dati spettroscopici del composto **8** risultavano estremamente simili a quelli di un composto emiacetalico isolato dall'*Onopordum illyricum* 24, la sola differenza era che nel nostro prodotto era presente un ulteriore metossile, eterico ($\delta_{\text{H}} = 3.32$ s, 3H; $\delta_{\text{C}} = 55.7$) che poteva essere legato ai carboni C-1, C-6, C-15 o C-4'. Dallo spettro HMBC risultò evidente una correlazione fra il carbonio di tale metossile ed il protone 15, indicando quindi la presenza di un gruppo acetalico sul C-15. Infine il valore della

costante di accoppiamento del protone H-15 con il protone H-4 ($J = 4.8$), osservato nello spettro registrato in CDCl_3 , ha permesso di assegnare un orientamento α al metossile sul C-15. In base a questi dati a questo composto fu assegnata la struttura riportata in figura.

Tabella 3 - Dati NMR relativi al composto **8**

posizione	^1H	^{13}C	HMBC
1	3.34 dd (12.0, 4.5)	79.8	H-3, H-14
2a	1.76	31.1	
2b	1.31		
3a	1.80	24.1	
3b	1.80		
4	1.92	41.4	
5	1.49 dd (11.0, 10.5)	54.4	H-14
6	4.01 t (10.5)	77.9	H-15, H-5
7	2.85 dd (10.5, 10.0)	55.5	H-13a, H-13b, H-9a, H-5, H-9b
8	5.32 ddd (12.0, 10.0, 4.8)	74.4	H-7, H-9a, H-9b
9a	2.29 dd (12.6, 4.8)	44.6	H-14
9b	1.32 dd (12.6, 12.0)		
10		37.8	H-9a, H-5, H-14
11		139.4	H-13a, H-7
12		168.4	H-13a, H-13b, OCH_3 , H-7
13a	6.27 s	128.5	
13b	5.81 s		
14	1.02 s (3H)	11.5	
15	4.87	107.2	OCH_3
1'		166.5	H-3'a, H-3'b, H-8, H-4'
2'		141.8	H-3'a, H-4'
3'a	6.18 s	124.9	H-4'
3'b	5.87 s		
4'	4.20 s (2H)	61.4	H-3'a, H-3'b
$\text{OCH}_3(12)$	3.77 s (3H)	52.3	
$\text{OCH}_3(15)$	3.32 s (3H)	55.7	H-15

Composto 9



9

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 410 $[M]^+$, formula molecolare C₂₁H₃₀O₈. Lo spettro ¹H NMR mostra tipici segnali di un eudesmano, con un valore a δ_H 1.06 per il metile sul C-10, con funzioni ossigenate sul C-1, C-6, C-8 e C-15. La presenza del gruppo ossidrilico sul C-1 è evidenziata dal doppio doppietto a δ_H 3.40, mentre i tipici segnali di un un 2-idrossimetil-2-butenato (sarracinoato) (vedi composto 6) indica la natura del residuo estereo sul C-8. L'aldeide sul C-4 è in posizione equatoriale a δ_H 9.33 come riportato in letteratura.

◆ ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 9.40 (1H, d, J=4 Hz, H-15), 6.92 (1H, q J=7 Hz, H-3'), 6.33 (1H, s, H-13a), 5.75 (1H, s, H-13b), 5.41 (1H, br dd, J=12.0-10.0 Hz, H-8), 4.29 (2H, br s H-5'), 4.04 (1H, t J=9.5 Hz, H-6), 3.79 (3H, s, OMe), 3.40 (1H, dd, J= 11.0 e 5.0 Hz, H-1), 2.65 (1H, t, H-7), 2.57 (1H, dddd, J=11.0, 11.0, 4.0 e 3.0 Hz, H-4), 2.43 (1H, dd, J=13-4.1 Hz, H-9a), 2.41 (1H, m, H-3a), 2.20 (1H, dd, J=11.0-11.0 Hz, H-5), 1.93 (2H, d, J= 7.0 Hz, H-4'), 1.76 (1H, m, H-2a), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.45 (1H, m Hz, H-3b), 1.27 (1H, dd, J=13-12 Hz, H-9b), 1.03 (3H, s, CH₃-14).

◆ ¹³C-NMR (CDCl₃): ppm 204.0 (C-15), 169 (C-12), 167 (C-1'), 142.2 (C-3'), 138 (C-11), 133.0 (C-2'), 125 (C-13), 78.0 (C-8), 76.0 (C-1), 67.0 (C-6), 58.0 (C-5'), 58.0 (C-7), 52.1 (OMe), 47.9 (C-4), 43.0 (C-9), 40.7 (C-10), 32.0 (C-5), 28.1 (C-3), 25.0 (C-2), 12.6 (C-14), 15.0 (C-4').

4.3.5 Frazionamento del residuo acetico RA

9.5 g di estratto acetico sono stati sciolti in 15 ml di una miscela *n*-esano/AcOEt 9:1 e sottoposti a cromatografia su una colonna impaccata con gel di silice disattivata con H₂O (15%). L'eluizione è stata effettuata con solventi a polarità crescente iniziando con il 100% di *n*-esano ed aumentando gradualmente la polarità del solvente di eluizione mediante incrementi successivi di AcOEt. Sono state raccolte in totale 650 frazioni di 20 ml ciascuna. Di seguito sono riportati il solvente di eluizione utilizzato e le frazioni raccolte:

<i>n</i> -Esano: AcOEt	N° frazioni
<i>n</i> -esano	1-18
9:1	19-125
8:2	126-156
7:3	157-179
6:4	180-282
5:5	283-320
4:6	321-380
3:7	381-417
2:8	418-488
1:9	489-530
AcOEt	531-650

L'analisi cromatografica su strato sottile utilizzando come eluente le miscele (*n*-esano-AcOEt) e (CHCl₃- MeOH) e la successiva rivelazione dei componenti con solfato di cerio (vedi paragrafo 3.2.1), ha consentito di raggruppare le 650 frazioni così come riportato nella tabella seguente, in base alla loro omogeneità cromatografica:

Riunioni	Peso (mg)	Riunioni	Peso (mg)
A=1-41	3.01 g	H=386-420	133.8
B=42-102	414.5	I=421-475	217.7
C=103-125	412.7	L=476-506	737.3
D=126-179	141.3	M=507-530	500.3
E=180-280	447.9	N=531-585	303.7
F=281-330	135.2	O=586-620	248.9
G=330-385	286.1	P=621-650	301.2

Le riunioni **D**, **E**, **F**, **G**, **H** e **L** che nei saggi di citotossicità preliminari mostravano una maggiore attività, sono state ulteriormente frazionate mediante cromatografia HPLC a fase diretta e fase inversa (vedi paragrafo 3.2.2.c). Gli eluenti AcOEt/*n*-esano e CH₃OH-H₂O, sono stati utilizzati secondo rapporti variabili in funzione delle condizioni ottimali di separazione che sono state identificate con prove preliminari per ogni riunione da esaminare: riunione **D** (AcOEt/*n*-esano 45:55), **E** (AcOEt/*n*-esano 55:45), riunione **F** (AcOEt/*n*-esano 65:35), riunione **G** (AcOEt/*n*-esano 70:30), riunione **H** (CH₃OH-H₂O 50:50) e riunione **L** (CH₃OH-H₂O 50:50).

Dalla separazione della riunione **D** abbiamo ottenuto:

- 8.3 mg di una sub frazione che sembrava avere segnali caratteristici degli elemani ma con qualche impurezza, dalla sua purificazione mediante HPLC usando come eluente AcOEt/*n*-esano 40:60, è stato ottenuto il derivato della deidrometiltensina^{17,20} (**10**, 2.5 mg; Rt 5 min).

La purificazione della frazione **E** e successivamente delle sue sub frazioni, ha permesso di ottenere:

- 8 α -*O*-(2'-idrossimetil-2'-butenoilossi) derivato della deidrometiltensina^{13,23} (**11**, 4.1 mg; Rt 6 min);
- 8 α -*O*-(4-idrossimetacrilossi)-4-episoncucarpolide¹⁹ (**12**, 2.5 mg; Rt 6 min).

Dalla separazione di **F** è stato ottenuto il composto presente anche nell'estratto cloroformico:

- 8 α -*O*-(4-idrossimetacrilato) deidromeliltensina (**3**, 12.5 mg; Rt 6 min);

L'analisi HPLC della frazione **G** ha evidenziato la presenza del:

- 8 α -*O*-(4-idrossimetacrilossi)-soncucarpolide¹⁹ (**13**, 4.5 mg; Rt 10 min).

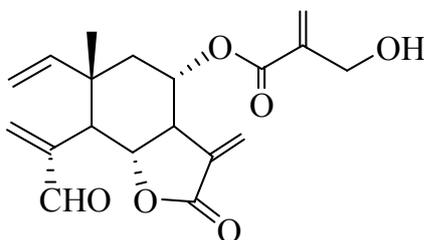
La purificazione della frazione di **L** e **H** mediante HPLC a fase inversa, utilizzando come eluente, CH₃OH-H₂O (50:50) sono stati ottenuti:

- arctina²¹ (**14**, 11 mg; Rt 8 min);
- 8 α -idrossi soncucarpolide³⁴ (**15**, 7.5 mg; Rt 7 min).

Per confronto degli spettri NMR 1 D, 2 D ed ESI-MS con quelli riportati in letteratura è stato possibile identificare i 7 composti descritti di seguito.

4.3.6 Caratterizzazione dei composti

Composto 10



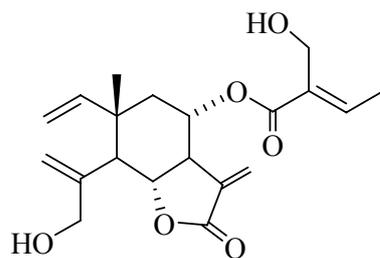
10

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 346 $[M]^+$, formula molecolare $C_{19}H_{22}O_6$. Nello spettro 1H NMR i segnali a δ_H 5.68 dd, 4.96 d, 4.87 d, 6.31 br s e 6.29 br s sono stati assegnati rispettivamente al H-1, H-2a, H-2b, H-3a e H-3b. La presenza di un doppietto a δ_H 9.49 ppm indica la presenza dell'aldeide sul C-4 è in posizione equatoriale come riportato in letteratura. Un tipico doppietto a δ_H 3.20 ($J = 11.6$ Hz) per il H-5 ed un segnale dddd a δ_H 3.02 ($J = 11.2, 10.8, 3.2$ e 2.8 Hz) per il protone H-7 indica una disposizione *trans* dei protoni H-5/H-6, H-6/H-7 e H-7/H-8 cosicché le funzioni ossigenate sul C-6 e sul C-8 sono α -orientate. La funzione ossigenata sul C-6, si deduce dalla presenza del dd a δ_H 4.40 di H-6, tipico segnale di un protone in un anello γ -lattone. L'anello lattonico presenta una funzione metilenica in posizione 11 i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come doppietti a δ_H 6.31 e 5.62 ppm. Il doppio tripletto a δ_H 5.34 corrisponde al protone H-8 e indica la presenza di un estere 8α -idrossi derivato. La presenza del 4-idrossimetacrilolo sul C-8 è evidenziato dalla presenza dei segnali a δ_H 6.19 br s, 5.97 br s e 4.39 br s per i protoni H-3'a, H-3'b e H-4'. Il confronto dei dati ottenuti con quelli riportati in letteratura, conferma che si tratta di un elemnolide l' 8α -(4-idrossimetacrilato) derivato della diidrometiltensina, ritrovato per la prima volta nel 1979 nella specie *O. leptolepis* DC.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 9.40 (1H, d, $J = 4$ Hz, H-15), 6.31 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-13a), 6.31 (1H, br s Hz, H-3a), 6.29 (1H, br s Hz, H-3b), 6.19 (1H, br s H-3'a), 5.97 (1H, br s H-3'b), 5.68 (1H, dd, $J = 17.3-10.7$ Hz, H-1), 5.62 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-13b), 5.34 (1H, dt, $J = 10.8$ e 4 Hz, H-8), 4.96 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-2a), 4.87 (1H, d, $J = 17$ Hz, H-2b), 4.40 (1H, t H-6), 4.39 (2H, br s H-4'), 3.20 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-5), 3.02 (1H, dddd, $J = 11.2, 10.8, 3.2$ e 2.8 Hz, H-7), 2.07 (1H, dd, $J = 13-4.1$ Hz, H-9a), 1.80 (1H, dd, $J = 13-4.1$ Hz, H-9b), 1.19 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR (CDCl_3): ppm 204.0 (C-15), 169.3 (C-12), 167.0 (C-1'), 145.6 (C-1), 143.6 (C-4), 140.2 (C-2'), 136.6 (C-11), 128.3 (C-3'), 120.3 (C-13), 115.1 (C-3), 113.1 (C-2), 78.7 (C-6), 69.1 (C-8), 60.7 (C-4'), 52.4 (C-7), 50.6 (C-5), 45.0 (C-9), 41.9 (C-10), 18.7 (C-14).

Composto 11



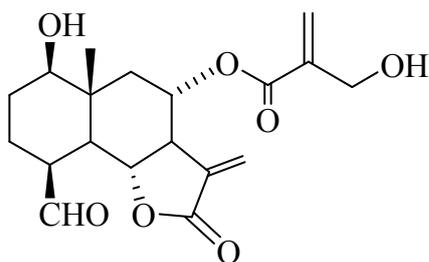
11

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 362 $[M]^+$, formula molecolare C₂₀H₂₆O₆. Nello spettro ¹H NMR i segnali a δ_H 5.78 dd, 5.07 d, 5.03 d, 5.44 br s e 4.99 br s sono stati assegnati rispettivamente al H-1, H-2a, H-2b, H-3a e H-3b. La presenza di due doppietti, con J di 14.2 Hz, a δ 4.11 e 4.04 indica la presenza di un gruppo idrossimetilenico in posizione 4, ed i due valori sono stati assegnati ai protoni H-15a e H-15b. Un tipico doppietto a δ_H 2.59 (J = 11.6 Hz) per il H-5 ed un segnale dddd a δ_H 2.98 (J = 11.2, 10.8, 3.2 e 2.8 Hz) per il protone H-7 indica una disposizione *trans* dei protoni H-5/H-6, H-6/H-7 e H-7/H-8 cosicchè le funzioni ossigenate sul C-6 e sul C-8 sono α -orientate. La funzione ossigenata sul C-6, si deduce dalla presenza del dd a δ_H 4.26 di H-6, tipico segnale di un protone in un anello γ -lattone. L'anello lattonico presenta una funzione metilenica in posizione 11 i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come doppietti a δ_H 6.17 e 5.60 ppm. Il doppio tripletto a δ_H 5.29 corrisponde al protone H-8 e indica la presenza di un estere 8α -idrossi derivato. La presenza del 2-idrossimetil-2-butenato (sarracinoato) sul C-8 è evidenziato dalla presenza di: un quartetto a δ_H 7.01 di un protone olefinico, un doppietto a δ_H 1.94 del CH₃ vinilico in posizione 4' ed un br s a δ_H 4.40 corrispondente al CH₂OH in posizione 5'. Il confronto dei dati ottenuti con quelli riportati in letteratura, conferma che il composto è un elemanolide l' 8α -(2'-idrossimetil-2'-butenoilossi) derivato della deidrometiltensina, ritrovato per la prima volta nel 1996 nella specie *O. myriacanthium* Boiss.

◆ ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7.01 (1H, q, H3'), 6.17 (1H, d, J=3.6 Hz, H-13a), 5.68 (1H, dd, J= 17.3-10.7 Hz, H-1), 5.60 (1H, d, J=2.8 Hz, H-13b), 5.44 (1H, br s Hz, H-3a), 5.29 (1H, dt, J= 4.0 e 10.8, H-8), 5.07 (1H, d, J= 10.5 Hz, H-2a), 5.03 (1H, d, J=17 Hz, H-2b), 4.99 (1H, br s Hz, H-3b), 4.40 (2H, br s H-5'), 4.26 (1H, dd, J=11.2, 11.6 Hz, H-6), 4.11(1H, d, J=14.2 Hz, H-15a), 4.04(1H, d, J=14.2 Hz, H-15b), 2.98 (1H, dddd, J=11.2, 10.8, 3.2 e 2.8 Hz, H-7), 2.59 (1H, d, J=11.5 Hz, H-5), 2.07 (1H, dd, J=13,4.1 Hz, H-9a), 1.94 (1H, br s, H4'), 1.80 (1H, dd, J=13-4.1 Hz, H-9b), 1.19 (3H, s, CH₃-14).

◆ ^{13}C -NMR (CDCl_3): ppm 169.3 (C-12), 167.0 (C-1'), 140.7 (C-3'), 145.6 (C-1), 143.6 (C-4), 136.6 (C-11), 131.7 (C-2'), 120.3 (C-13), 115.1 (C-3), 113.1 (C-2), 78.7 (C-6), 69.1 (C-8), 67.3 (C-15), 58.0 (C-5'), 52.4 (C-7), 50.6 (C-5), 45.0 (C-9), 41.9 (C-10), 18.7 (C-14), 14.1(C-4'),

Composto 12



12

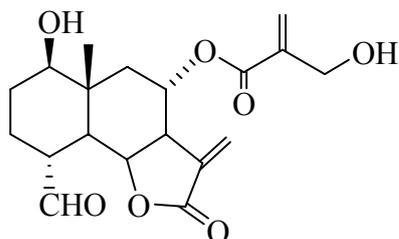
Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 364 $[M]^+$, formula molecolare $C_{19}H_{24}O_7$. Nello spettro 1H NMR il segnale a δ_H 0.94 per il metile sul C-10, i segnali a δ_H 3.41 e 5.32 ppm rispettivamente per il C-1 e C-8, un segnale a δ_H 4.55 per il C-6 tipico di un protone in un anello γ -lattone, indicano che si tratta di un eudesmanolide. L'anello lattonico presenta una funzione metilenica in posizione 11 i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come doppietti a δ_H 6.30 e 5.62 ppm. Un singoletto a campi bassi a δ_H 9.96 indica la presenza di un gruppo aldeidico.

La presenza del 4-idrossimetacriloloil sul C-8 è evidenziato dalla presenza dei segnali a δ_H 6.21 br s, 5.95 br s e 4.38 br s per i protoni H-3'a, H-3'b e H-4'. Il confronto dei dati ottenuti con quelli riportati in letteratura, conferma che si tratta di un elemanolide 8- α -(4-idrossimetacrilossi)-4-episoncucarpolide ritrovato per la prima volta nel 1986 nella specie *O. carmacanicum* (Bornm). Bornm.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 9.96 (1H, br s, H-15), 6.30 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-13a), 6.21 (1H, br s H-3'a), 5.95 (1H, br s H-3'b), 5.62 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-13b), 5.32 (1H, br dd, $J=12.0, 10.0$ Hz, H-8), 4.39 (2H, br s H-4'), 4.35 (1H, t $J=9.5$ Hz, H-6), 3.41 (1H, dd, $J=4.4$ e 10.6 Hz, H-1), 2.89 (1H, t, H-7), 2.82 (1H, br t, H-4), 2.53 (1H, dd, $J=13-4.1$ Hz, H-9a), 2.47 (1H, m, H-3a), 2.04 (1H, dd, $J=11.0, 11.0$ Hz, H-5), 1.75 (1H, m, H-2a), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.45 (1H, m, H-3b), 1.27 (1H, dd, $J=13, 12$ Hz, H-9b), 0.94 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 201.7 (C-15), 169.2 (C-12), 167 (C-1'), 140.2 (C-2'), 136.4 (C-11), 128.2 (C-3'), 120.5 (C-13), 78.1 (C-1), 76.2 (C-6), 60.7 (C-4'), 69.3 (C-8), 53.9 (C-7), 48.8 (C-5), 45.0 (C-4), 44.0 (C-9), 41.7 (C-10), 22.3 (C-3), 27.2 (C-2), 13.9 (C-14).

Composto 13



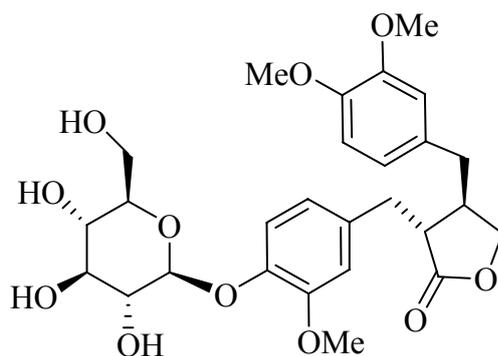
13

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 364 $[M]^+$, formula molecolare $C_{19}H_{24}O_7$. Il composto è un isomero sul C-4 del composto (12) descritto in precedenza, evidenziato da variazioni nei valori di chemical shift per la diversa stereochimica.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 9.68 (1H, d, $J=4.0$, H-15), 6.28 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-13a), 6.13 (1H, *br s* H-3'a), 5.95 (1H, *br s* H-3'b), 5.62 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-13b), 5.29 (1H, *br dd*, $J=12.0, 10.0$ Hz, H-8), 4.39 (2H, *br s* H-4'), 4.01 (1H, t $J=9.5$ Hz, H-6), 3.43 (1H, *dd*, $J=4.4$ e 10.6 Hz, H-1), 2.89 (1H, t, H-7), 2.57 (1H, *dd*, $J=13, 4.1$ Hz, H-9a), 2.45 (1H, *br t*, H-4), 2.44 (1H, m, H-3a), 1.88 (1H, *dd*, $J=11.0, 11.0$ Hz, H-5), 1.75 (1H, m, H-2a), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.45 (1H, m, H-3b), 1.27 (1H, *dd*, $J=13, 12$ Hz, H-9b), 0.94 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 204.7 (C-15), 169.2 (C-12), 167 (C-1'), 140.2 (C-2'), 136.4 (C-11), 128.2 (C-3'), 120.5 (C-13), 78.1 (C-1), 76.2 (C-6), 60.7 (C-4'), 69.3 (C-8), 53.9 (C-7), 48.8 (C-5), 45.0 (C-4), 44.0 (C-9), 41.7 (C-10), 22.3 (C-3), 27.2 (C-2), 13.9 (C-14).

Composto 14



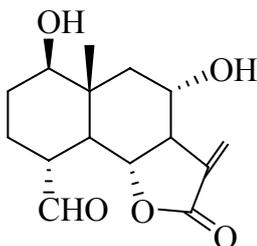
14

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 534 $[M]^+$, formula molecolare $C_{27}H_{34}O_{11}$. Lo spettro 1H -NMR registrato in CD_3OD presenta una serie di segnali parzialmente sovrapposti nella zona compresa fra δ_H 6.50 e 7.00 δ simili al composto caratterizzato nell'estratto cloroformico. La presenza di un doppietto a δ_H 4.90 ppm e di segnali intorno a 3, indica la presenza di una funzione glicosidica in posizione 4', evidenziata da esperimenti bidimensionali. Il confronto di queste informazioni con i dati presenti in letteratura, hanno permesso di ricostruire la struttura di un lignano avente una porzione lattonica.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 7.06 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-5'), 6.84 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.77 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2'), 6.66 (1H, dd, $J=7.8-1.9$ Hz, H-6'), 6.61 (1H, dd, $J=8.1-1.9$ Hz, H-6), 6.54 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 4.99 (2H, dd, $J=9.5, 9.4$ Hz, H-4''), 4.28 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-1''), 4.21 (2H, dd, $J=9.3, 6.8$, H-9a), 3.97 (2H, dd, $J=9.3, 6.8$, H-9b), 3.85 (3H, s, OCH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.81 (3H, s, OCH_3), 3.68 (1H, dd, $J=13.8, 9.8$ Hz, H-6a''), 3.50 (1H, dd, $J=13.8, 9.8$ Hz, H-6b''), 3.45 (1H, m, H-5''), 3.43 (1H, dd, $J=8.6, 8.2$ Hz, H-2''), 2.92 (2H, dd, $J=5.3, 1.7$, H-7'), 2.54 (4H, m H-7,8,8').

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 181 (C-9'), 150.0 (C-3'), 149.8 (C-3), 149.1 (C-4), 146.8 (C-4'), 134.2 (C-1'), 132.7 (C-1), 122.9 (C-6'), 122.0 (C-6), 117.1 (C-5'), 114.3 (C-5), 113.6 (C-2'), 113.0 (C-2), 102.9 (C-1''), 78.2 (C-5''), 77.8 (C-3''), 74.9 (C-2''), 72.9 (C-9), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 55.9 (OCH_3 x2), 55.8 (OCH_3), 47.6 (C-8'), 42.4 (C-8), 38.9 (C-7), 35.3 (C-7').

Composto 15



15

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 280 $[M]^+$, formula molecolare $C_{15}H_{20}O_5$. Nello spettro 1H NMR il segnale a δ_H 0.94 per il metile sul C-10, i segnali a δ_H 3.41 e 3.98 ppm rispettivamente per il C-1 e C-8, un segnale a δ_H 4.07 per il C-6 tipico di un protone in un anello γ -lattone, indicano che si tratta di un eudesmanolide. L'anello lattonico presenta una funzione metilenica in posizione 11 i cui protoni H-13a e H-13b risuonano come doppietti a δ_H 6.18 e 5.98 ppm. Un singoletto a campi bassi a δ_H 9.96 indica la presenza di un gruppo aldeidico. L'assenza della catena laterale sul C-8 è evidente in quanto mancano i caratteristici segnali ritrovati fino ad ora per le catene esteree in questa posizione. Il confronto dei dati ottenuti con quelli riportati in letteratura, conferma che si tratta di un elemanolide 8α -idrossi soncucarpolide il cui isomero è stato ritrovato nella *Centaurea thessala* ssp. *drakiensis*.

◆ 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 9.68 (1H, d, $J=4.0$, H-15), 6.19 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-13a), 5.98 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-13b), 4.07 (1H, td, $J=10.6$ e 4.4 Hz, H-8), 4.36 (1H, t $J=9.5$ Hz, H-6), 3.41 (1H, dd, $J=4.4$ e 10.6 Hz, H-1), 2.89 (1H, t, H-7), 2.57 (1H, dd, $J=13$, 4.1 Hz, H-9a), 2.45 (1H, br t, H-4), 2.44 (1H, m, H-3a), 1.88 (1H, dd, $J=11.0$, 11.0 Hz, H-5), 1.75 (1H, m, H-2a), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.45 (1H, m, H-3b), 1.27 (1H, dd, $J=13$, 12 Hz, H-9b), 0.94 (3H, s, CH_3 -14).

◆ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): ppm 204.1 (C-15), 172.5 (C-12), 136.4 (C-11), 120.5 (C-13), 78.1 (C-1), 66.2 (C-6), 65.8 (C-8), 47.9 (C-7), 46.8 (C-5), 45.0 (C-4), 44.0 (C-9), 41.7 (C-10), 27.2 (C-2), 22.3 (C-3), 13.9 (C-14).

Bibliografia

1. Negri G. Erbario Figurato; Hoepli: Milano, (1943).
2. El-Najjar N, Saliba N, Talhouk S, Gali-Muhtasib H (2007). *Onopordum cynarocephalum* induces apoptosis and protects against 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Oncology reports* 17(6), 1517-23.
3. Maugini E. Manuale di botanica farmaceutica; Piccin: Padova, (1994); 7th ed.
4. Pignatti S. Flora d'Italia, vol I-II-III, ed Agricole, Bologna (1982).
5. Luz Cardona M, Garcia B, Pedro JR, Sinisterra JF (1990) Flavonoids, flavonolignans and a phenylpropanoid from *Onopordon corymbosum*. *Phytochemistry* 29(2), 629-31
6. Luz Cardona M, Fernandez MI, Pedro JR, Valle AA (1987). Flavonoids and others constituents from *Onopordon macracanthum*. *Planta Med* 53(5), 506-07
7. Mericli Ali H, Miski M, Korkmaz Y, Tuzlaci E (1991). Phenolic compounds of *Onopordum tauricum*. *Acta Pharmaceutica Turcica* 33(3), 83-4.
8. Montoro P, Braca A, Pizza C, De Tommasi N (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem* 92(2), 349-55.
9. Youssef, S. A. Flavonoids from *Onopordon heteracanthum* C.A. Mey. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, Assiut University (2003), 26(1), 83-89.
10. Lazari D, Skaltsa H, Harvala C (1998), Flavonoids of *Onopordum sibthorpiatum* and *Onopordum laconicum*. *Biochem Syst Ecol* 26(1), 105-7.
11. Bogs HU, Bogs U (1967). Constituents of *Onopordum acanthium*. II. Flavonoids , tannins, and betaines. *Pharmazie* 22(1), 54-8.
12. Kawashty SA, Saleh NAM, Mansour RMA (1996). The chemosystematics of Egyptian *Onopordum* species (Compositae). *Bulletin of the National Research Centre* 21(2), 173-80
13. Garcia B, Skaltsa H, Navarro FI, Pedro JR, Lazari D (1996). Sesquiterpene lactones and elemene derivatives from *Onopordon myriacanthum*. *Phytochemistry* 41(4), 1113-17.
14. Bogs HU, Bogs U (1965). Constituents of *Onopordum acanthium*. I. Coumarins and flavones *Pharmazie* 20(11), 706-9.
15. Mosharrafa SAM, Mansour RMA, Abou-Zaid M, Saleh NAM (1994). Some biologically active flavonoids from Egyptian members of the Compositae. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 8(1), 9-13.

16. Gonzalez CI, Macias FA, Massanet GM, Oliva JM, Rodriguez LF, Vergara C (1984). Chemical components of *Onopordum nervosum* Boiss. *An Quim C* 80(1), 100-1.
17. Rustaiyan A, Nazarians L, Bohlmann F (1979). Naturally occurring terpene derivatives. Part 191. Two new elemanolides from *Onopordon leptolepis*. *Phytochemistry* 18(5), 879-80.
18. Rustaiyan A, Nazarians L, Bohlmann F (1979). Naturally occurring terpene derivatives. Part 190. Two new germacranolides from *Onopordon leptolepis*. *Phytochemistry* 18(5), 883-4.
19. Rustaiyan A, Ahmadi B, Jakupovic J, Bohlmann F (1986). Sesquiterpene lactones and eudesmane derivatives from *Onopordon carmanicum*. *Phytochemistry* 25(7), 1659-62.
20. Luz Cardona M, Garcia B, Pedro JR, Sinisterra JF (1989). Sesquiterpene lactones and an elemene derivative from *Onopordon corymbosum*. *Phytochemistry* 28(4), 1264-7
21. Luz Cardona M, Aleman RA, Garcia B; Pedro JR (1992). Sesquiterpenes, flavonoids and lignans from *Onopordon acaulon*. *Phytochemistry* 31(10), 3630-2.
22. Luz Cardona M, Bardon A, Garcia B, Pedro JR (1993). Eudesmane and elemene derivatives from *Onopordon acaulon*. *Phytochemistry* 33(6), 1457-60.
23. Lazari D, Garcia B, Skaltsa H, Pedro JR, Harvala C (1997). Sesquiterpene lactones from *Onopordon laconicum* and *O. sibthorpiatum*. *Phytochemistry* 47(3), 415-422.
24. Braca A, De Tommasi N, Morelli I, Pizza C (1999). New metabolites from *Onopordum illyricum*. *J Nat Prod* 62(10), 1371-1375
25. Orabi Khaled Y, El Sayed Khalid A, Al-Said Mansour S, El-Ferally Farouk S (2000). Sesquiterpene lactones from *Onopordum ambiguum*. *Saudi Pharmaceutical Journal* 8(2-3), 101-105.
26. El-Moghazy Safaa A, Ahmed Ahmed A, Abdel-Ghani Hoda F, El-Shanawany Mohamed A (2002). A new eudesmane derivative from *Onopordon ambiguum*. *Fitoterapia* 73(1), 97-98.
27. Abuharfeil NM, Salim M, Von Kleist S (2001). Augmentation of natural killer cell activity in vivo against tumour cells by some wild plants from Jordan. *Phytotherapy research* 15(2), 109-13.

28. Abuharfeil NM, Maraqa A, Von Kleist S (2000). Augmentation of natural killer cell activity in vitro against tumor cells by wild plants from Jordan. *Journal of ethnopharmacology* 71(1-2), 55-63.
29. Lonergan G, Routsis E, Georgiadis T, Agelis G, Hondrelis J, Matsoukas J, Larsen LK, Caplan FR (1992). Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. *J Nat Prod* 55(2), 225-8.
30. Koukoulitsa C, Geromichalos G D, Skaltsa H (2005). VolSurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 19(8), 617-23.
31. Stefani R, Schorr K, Tureta JM, Vichnewski W, Merfort I, Da Costa FB (2006). Sesquiterpene lactones from *Dimerostemma* species (Asteraceae) and in vitro potential anti-inflammatory activities. *Z Naturforsch C: J Biosci* 61(9/10), 647-652.
32. Saroglou V, Karioti A, Demetzos C, Dimas K, Skaltsa H (2005). Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and Their Antibacterial and Cytotoxic Activities. *J Nat Prod* 68(9), 1404-1407.
33. Luz Cardona M, Fernandez I, Pedro JR, Vidal R (1992). Polyoxygenated terpenes and cyanogenic glucosides from *Centaurea aspera* var. *subinermis*.. *Phytochemistry* 31(10), 3507-9.
34. Skaltsa H, Lazari D, Panagouleas C, Georgiadou E, Garcia B, Sokovic M (2000). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry* 55(8), 903-908.

Capitolo 5 *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. subsp. *meoides* (Desf.) Fiori

In questo capitolo è descritta l'indagine fitochimica condotta sull'estratto acetone, ottenuto dalle parti aeree di *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. subsp. *meoides* (Desf.) Fiori una pianta appartenente alla famiglia delle Apiaceae. La separazione e purificazione dell'estratto ha evidenziato la presenza di cinque diterpenoidi di cui uno mai ritrovato prima in natura. Per effettuare una indagine fitochimica e biologica completa, l'estratto ed i suoi metaboliti sono stati saggiati per valutare la loro potenziale azione citotossica su cellule di glioma C6.¹

5.1 Famiglia delle Apiaceae

Le Apiaceae, un raggruppamento sistematico delle Dicotiledoni, comprendono circa 125 generi con un totale di 2600 specie, per la maggior parte rappresentate da piante erbacee e solo, in qualche caso, piante a portamento arbustivo o da alberelli. Il fusto, articolato in nodi ed internodi, presenta foglie quasi sempre alterne, a volte tutte basali, raramente (specie dei generi *Bupleurum* ed *Eryngium*) intere. I fiori sono quasi sempre riuniti nelle caratteristiche infiorescenze a forma ad ombrello che può essere sia semplice (se ogni peduncolo termina con un fiore) sia composta (se i raggi primari invece di un fiore portano una nuova ombrella detta ombrelletta); le brattee poste alla base dell'ombrella formano l'involucro mentre quelle alla base dell'ombrelletta costituiscono l'involucretto. Generalmente il fiore delle Apiaceae è ermafrodito ma non mancano casi di fiori unisessuati. La struttura fiorale è attinomorfa, ma spesso nei fiori posti alla periferia dell'ombrella alcuni petali si sviluppano di più facendo assumere al fiore un aspetto zigomorfo (*Heracleum* e *Coriandrum*). Gli stami sono 5 e si alternano ai petali, sono ripiegati nel bocciuolo, portando antere biloculari a due sacche polliniche la cui deiscenza avviene per fessure verticali². In ogni fiore vi è un solo pistillo, il cui ovario, infero, biloculare, è composto da due carpelli ciascuno con due ovuli di cui uno atrofizzato ed è sormontato da due stili, ingrossati alla base, che si dipartono da una struttura a cuscinetto (stilopodio) che persiste nel frutto. L'impollinazione avviene ad opera di insetti anche di piccola taglia attratti dalla vistosità delle ombrelle e dal nettare prodotto dallo stilopodio. Il frutto si trasforma a maturità in due mericarpi che possono restare congiunti oppure separarsi; questi hanno una faccia piana detta *commisurale*, corrispondente alla zona di unione dei due frutti, ed una faccia convessa dorsale arrotondata che porta delle costole longitudinali più o meno sporgenti. Ogni mericarpo

presenta cinque fasci vascolari periferici, i quali sono circondati da altro tessuto e formano le costole primarie fra le quali possono anche trovarsi quattro costole secondarie; le depressioni che si formano tra le costole sono dette *vallecole* e i canali secretori, ripieni di sostanze odorose di diversa composizione chimica e che si trovano nella parete del frutto distribuiti nell'interspazio tra l'una e l'altra costola, vengono definiti *vitte*³.

5.1.1 Sistematica delle Apiaceae

Data la grande omogeneità nella struttura florale di questa famiglia sono di notevole importanza sistematica i caratteri distintivi e costanti del frutto. Solo in questo modo si è riusciti a suddividere la famiglia delle Apiaceae in tre sottofamiglie, le quali, secondo la classificazione operata da Drude, sono contraddistinte dai caratteri dell'endosperma e dalla presenza o meno dei canali secretori nel tegumento del frutto:

1. **Hydrocotyloideae:** con endocarpo legnoso; frutto privo di canali secretori oppure con canali unicamente nelle costolature primarie. Vi appartengono il genere *Hydrocotyle*, ricco di specie, e *Azorella*, con specie caratteristiche della regione antartica e delle Ande.
2. **Saniculoideae:** con endocarpo tenero; canali secretori presenti; stili circondati da un disco a forma di anello (*Eryngium*, *Hacquetia epipactis*, *Sanicula europea*)
3. **Apioideae:** con endocarpo tenero, talvolta con strato legnoso sottoepidermico; canali secretori presenti. È la sezione più numerosa per generi e specie e si ripartisce in otto tribù.

Le difficoltà tassonomiche, tuttavia, sono a tutt'oggi rilevanti e rendono piuttosto incerta la posizione e la vastità di alcuni generi delle Apiaceae.

5.1.2 Distribuzione geografica ed interesse

Le Apiaceae sono ampiamente distribuite geograficamente, ma particolarmente rappresentate nella fascia temperata dell'emisfero settentrionale. Infatti circa 75 generi sono presenti negli Stati Uniti, circa 70 in Francia ed altrettanti in Italia. Sono spesso ricche di sostanze aromatiche (soprattutto nel frutto) e per questo rientrano nella comune alimentazione dell'uomo (*sedano*, *finocchio*, *prezzemolo*)⁴; a livello industriale *Pimpinella anisum* e *P. anisoides* trovano largo impiego per la produzione di liquori

(anice, anisetta, assenzio). Accanto alle specie succitate utilizzate come condimenti ed aromatizzanti, se ne possono enumerare altre che trovano impieghi diversi: alcune posseggono proprietà stimolanti delle funzioni gastriche (*Levisticum officinale*, *Hydrocotyle vulgaris*), altre diuretiche (*Pimpinella major*, *Eryngium campestre*); frequenti sono le velenose tra cui le cosiddette “cicute” (*Cicuta virosa*, *Conium maculatum*, *Aethusa cynapium*) una delle quali (*C. maculatum*) è quasi certamente quella che ha dato la morte al filosofo Socrate; la sua specie sorella *C. officinale*, invece, viene anche utilizzata per la presenza dei due alcaloidi “coniina” e “cicutina” che, usati in dosi appropriate, hanno efficace azione nelle affezioni cutanee e negli ingorghi ghiandolari. Forniscono inoltre coloranti, per lo più gialli, le piante di *Aethusa*, *Angelica*, *Pastinaca* e di *Scandix*; nell’industria dei profumi trovano impiego le essenze di parecchie Apiaceae; le doti decorative, invece, non sono di eccezionale risalto limitandone, pertanto, l’utilizzo a scopo ornamentale².

5.2 Genere *Elaeoselinum*

L'*Elaeoselino* ha la radice lignificata, il fusto, tipico delle Apiaceae, è glabro con riflessi giallastri e diverse ombrelle a 8-25 raggi sparse sull'apice dei rami; le foglie erbacee sono lunghe fino a 50 cm ed hanno contorno triangolare-acuminato, con lamina 3- o 5-pennata; i fiori hanno piccoli petali gialli, stami più lunghi dei petali; i frutti sono acheni doppi, ognuno dei quali con quattro ali longitudinali membranose: due dorsali sporgenti circa 1 mm e due laterali sporgenti circa 3 mm². *E. asclepium* (L.) Bertol. è l’unica varietà presente in Italia, si riconoscono due sottospecie: *Elaeoselinum asclepium* ssp. *asclepium* (L.) Bertol. e *Elaeoselinum asclepium* ssp. *meoides* (Desf.) Fiori. Il nome del genere deriva dal greco *elaion* =olio e *selinum*= specie di apio (sedano), mentre *asclepium* deriva da *Asklepion* =Esculapio, dio della medicina, per le sue proprietà medicinali. Questa pianta rappresenta l’habitat preferito del *Pleurotus eryngii*, fungo tipicamente siciliano, detto anche fungo di “Ferla” che si ritrova nei pascoli collinari e di bassa montagna, di consistenza prevalentemente argillosa.

Tabella 1 - Distribuzione dei taxa

<i>Elaeoselinum asclepium</i> (L.) Bertol. subsp. <i>asclepium</i> [<i>Thapsia asclepium</i> L.]	East Iberian Peninsula, Ibiza, Balearic Islands, Sicily, South Italy, Greece, Turkey
<i>E. asclepium</i> subsp. <i>millefolium</i> Garcia Martin & Silvestre [<i>E. millefolium</i> Boiss.]	Endemic of South Iberian Peninsula
<i>E. asclepium</i> subsp. <i>meoides</i> (Desf.) Fiori ex Tutin [<i>E. meoides</i> (Desf.) DC.]	Sicily, Sardinia, North Africa
<i>E. foetidum</i> (L.) Boiss. [<i>Thapsia foetida</i> L.]	Central and South West Iberian Peninsula, Morocco
<i>E. fontanesii</i> Boiss.	North West Africa
<i>Distichoselinum tenuifolium</i> Garcia Martin & Silvestre [<i>Elaeoselinum tenuifolium</i> (Lag.) Lange]	Endemic of South and East Iberian Peninsula
<i>Margotia gummifera</i> (Desf.) Lange [<i>Elaeoselinum gummiferum</i> (Desf.) Tutin]	Iberian Peninsula, Tunisia, Algeria, Morocco



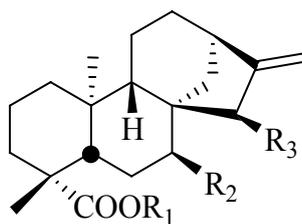
Fig. 1- *E. foetidum* (L.) Boiss



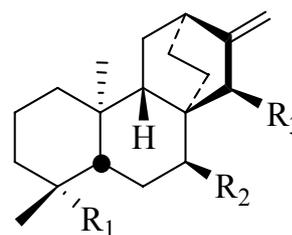
Fig. 2- *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. subsp. *asclepium*

5.2.1 Precedenti studi fitochimici

Il genere *Elaeoselinum* oggetto di numerosi studi, è ricco di diterpeni. La prima specie ad essere stata analizzata è endemica della penisola iberica l'*Elaeoselinum gummiferum* (Desf.) Tutin [syn. *Margotia gummifera* (Desf.) Lange]. Dalle radici di questa pianta furono isolati un kaurano già noto (**1**) ed il nuovo acido gummiferolico (**2**), con scheletro *ent*-atis-16-ene⁵, la cui struttura è stata determinata grazie ad esperimenti spettroscopici e a trasformazioni chimiche.

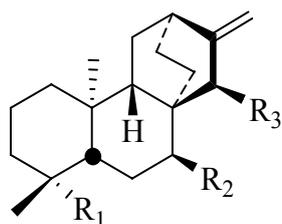


1 R₁=H R₂=H R₃=H

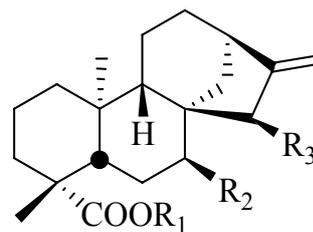


2 R₁=COOH R₂=OAng R₃=H

Due analisi fitochimiche successive sulle radici *Elaeoselinum gummiferum* (Desf.) Tutin hanno portato all'isolamento di un nuovo atisano, la margozianina (**3**)⁶, con un gruppo β-acetossi sul C-15 rispetto all'acido gummiferolico (**2**), ed un nuovo kaurano, l'acido isomargotianoico (**4**)⁷.

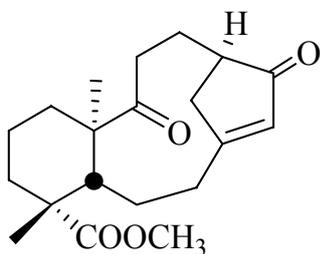


3 R₁=COOCH₃ R₂=OAng R₃=OAc

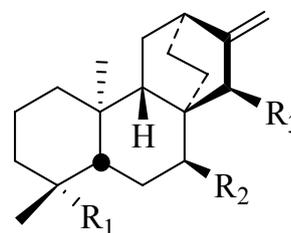


4 R₁=H R₂=OAng R₃=OAc

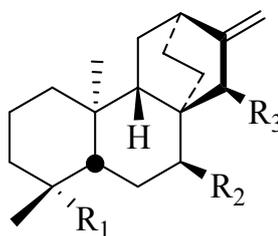
Gli stessi metaboliti l'acido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1**), l'acido gummiferolico (**2**) e la margotianina (**3**) sono stati isolati anche dalle parti aeree di un'altra specie⁶. Alcuni anni dopo, indagini fitochimiche sulle parti aeree dell'*Elaeoselinum foetidum* (L.) Boiss, hanno portato all'isolamento di diversi diterpenoidi: la nuova fetidina (**5**), un nuovo composto con scheletro 8,9-seco-17-*nor*-kaurano⁸, l'acido *ent*-15 α -idrossi-atis-16-en-19-oico nuovo atisano(**6**), il suo estere metilico (**7**) e l'acetil derivato (**8**), due kaurani, acido *ent*-7 α -angelossi-kaur-16-en-19-oico (**9**) e acido *ent*-7 α -seneciossi-kaur-16-en-19-oico (**10**)⁹, precedentemente isolati in miscela dalle radici di alcune piante⁸ in questa specie isolati come rispettivi metil esteri.



5

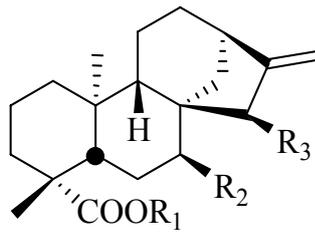


6 R₁=COOH R₂=H R₃=OH

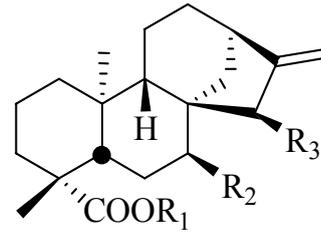


7 R₁= COOCH₃ R₂=H R₃=OH

8 R₁= COOCH₃ R₂=H R₃=Oac

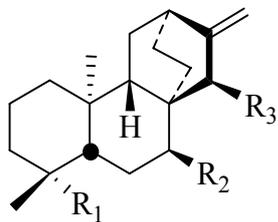


9 $R_1=H$ $R_2=OAng$ $R_3=H$

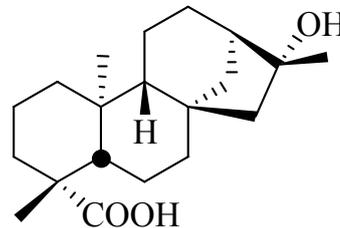


10 $R_1=H$ $R_2=OSen$ $R_3=H$

Dalle radici di *E. foetidum* (L.) Boiss furono anche isolati il nuovo acido *ent*-7 α -seneciossi-atis-16-en-19-oico (**11**), l'acido gummiferolico già noto, l'acido *ent*-16 β -idrossi-kauran-19-oico (**12**)¹⁰.

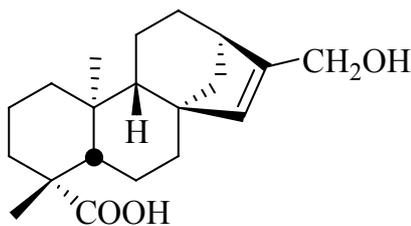


11 $R_1=COOH$ $R_2=OSen$ $R_3=H$

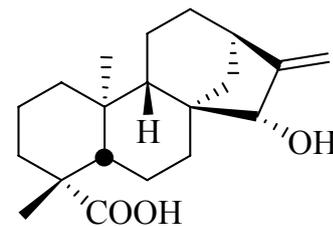


12

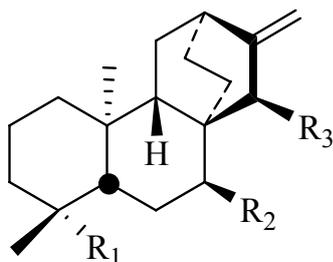
Ulteriori studi su questa specie portarono alla caratterizzazione di tre noti kaurani diterpenoidi, l'acido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1**)¹¹, l'acido *ent*-17-idrossi-kaur-15-en-19-oico (**13**)¹² e l'acido grandiflorolico (**14**)¹² e alla caratterizzazione di due nuovi atisani, l'acido *ent*-15 α -seneciossi-atis-16-en-19-oico (**15**), e l'acido *ent*-7 α -seneciossi-15 α -idrossi-atis-16-en-19-oico (**16**)¹².



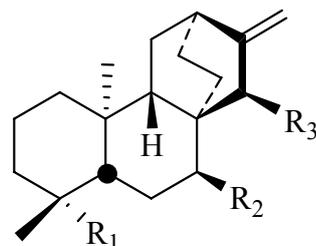
13



14

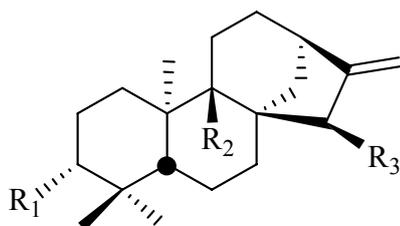


15 $R_1=COOH$ $R_2=H$ $R_3=OSen$

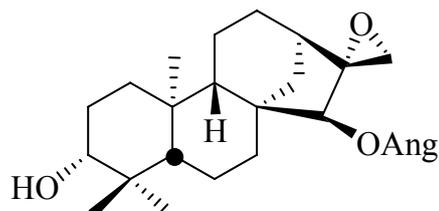


16 $R_1=COOH$ $R_2=OSen$ $R_3=OH$

Due nuovi kaurani furono isolate dalle radici di *E. tenuifolium* (Lag.) Lange, anche noto come *Elaeoselinum lagascae* Boiss. e come *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) Garcia Martin & Silvestre¹³. Il primo ad essere caratterizzato è stato l'*ent*-15 α -angelossi-kaur-16-en-3 β -olo (**17**) grazie a trasformazioni di metaboliti noti, mentre la struttura del secondo metabolita l'*ent*-15 α -angelossi-16 β ,17-epossi-kauran-3 β -olo (**18**) è stata confermata dopo aver eseguito la sua stessa sintesi.

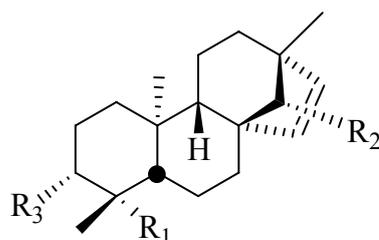


17 R₁=OH R₂=H R₃=OAng



18

L'estratto benzenico delle radici di *E. asclepium* (L.) subsp. *meoides* (Desf.) Fiori era stato separato in due subfrazioni: una acida ed una neutra. Dalla frazione neutra fu isolato il nuovo elasclepiolo (**19**) mentre dall'altra frazione il rispettivo composto acido (**20**), con una funzione carbossilica sul C-19¹⁴. L'elasclepiolo (**19**) e l'acido elasclepico (**20**) furono isolati anche dalle radici di *E. asclepium* (L.) Bertol subsp. *asclepium*¹⁵ insieme ai beierani, eritrossilolo A (**21**), l'acido *ent*-14 β -angelossi-beier-15-en-19-oico (**22**) che è l'angelato isomero dell'acido elasclepico (**20**), l'acido *ent*-beier-15-en-19-oico (**23**), l'atisano **24** ed il kaurano **25**.



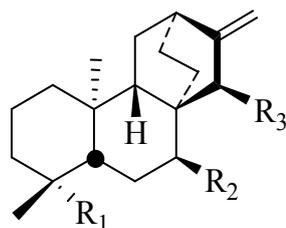
19 R₁=CH₂OH R₂=OTigl R₃=H

20 R₁=COOH R₂=OTigl R₃=H

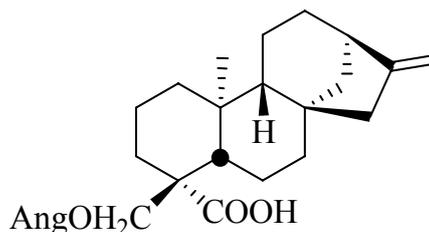
21 R₁=CH₂OH R₂=H R₃=H

22 R₁=COOH R₂=OAng R₃=H

23 R₁=COOH R₂=H R₃=H

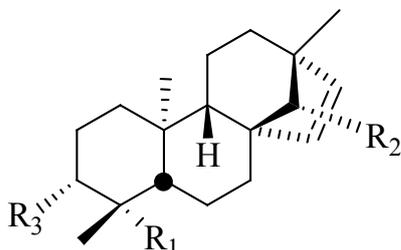


24 R₁=COOH R₂=H R₃=H



25

Dalla stessa specie furono isolati inoltre quattro nuovi beierani con una funzione aldeidica: l'*ent*-14β-tigloilossi-beier-15-en-19-ale (**26**), l'*ent*-14β-angeloilossi-beier-15-en-19-ale (**27**), l'*ent*-3β-acetossi-14β-tigloilossi-beier-15-en-19-ale (**28**) e l'*ent*-3β-idrossi-14β-tigloilossi-beier-15-en-19-ale (**29**). La presenza in questi metaboliti di un gruppo aldeidico in posizione assiale sul C-19 giustifica la labilità dei composti **26-29**, che rapidamente si decompongono nell'acido elasclepico (**20**) e nel rispettivo idroperossido.



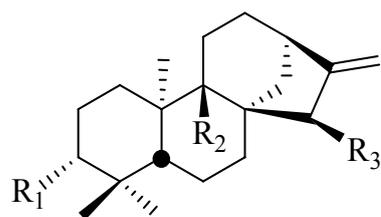
26 R₁=CHO R₂=OTigl R₃=H

27 R₁=COOH R₂=OAng R₃=H

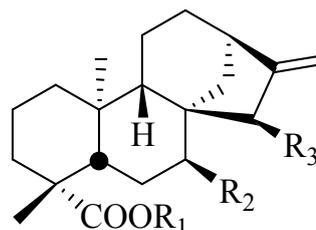
28 R₁=CHO R₂=OTigl R₃=OAc

29 R₁=CHO R₂=OTigl R₃=OH

Dalle parti aeree di *E. asclepium* (L.) Bertol subsp. *millefolium* (Desf.) Fiori sono stati isolati sei composti¹⁶: il kaurene (**30**), l'acido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1**) ed il suo metil estere (**31**), il metil *ent*-9α-idrossi-kaur-16-en-19-oato (**32**), l'*ent*-atis-16-ene (**33**) ed il nuovo atisano (**34**).

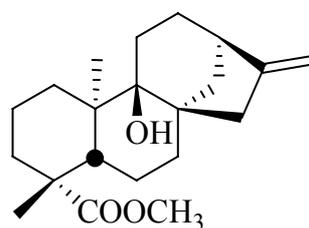


30 $R_1=H$ $R_2=H$ $R_3=H$

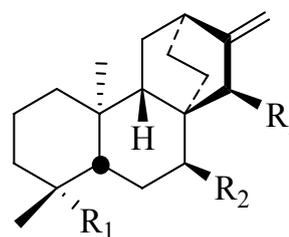


1 $R_1=H$ $R_2=H$ $R_3=H$

31 $R_1=CH_3$ $R_2=H$ $R_3=H$



32



33 $R_1=CH_3$ $R_2=H$ $R_3=H$

34 $R_1=COOCH_3$ $R_2=OTigl$ $R_3=OAc$

5.2.2 Proprietà biologiche del genere *Elaeoselinum*

L' *Elaeoselinum* è un genere impiegato tradizionalmente per le sue proprietà antinfiammatorie ed antibatteriche.¹⁷ Da uno studio condotto sulle parti aeree dell'*E. foetidum*, raccolte in un'area disabitata di Cadice (Spagna), che mostravano effetti tossici sul bestiame, è emerso che l'estratto cloroformico di questa specie è attivo nel trattamento del carcinoma oro-esofageo umano. Un frazionamento bioguidato dell'estratto ha evidenziato che il composto predominante è il Kaurene1, presente in tutte le specie di questo genere ad eccezione della specie *E. tenuifolium*. Il composto è responsabile di numerose azioni farmacologiche: è citotossico contro *Artemia salina* ($LC_{50} = 4.8 \mu\text{g/mL}$) e sulle cellule KB ($IC_{50} = 1.6 \mu\text{g/mL}$)¹⁸, esplica un'azione antimicrobica su *B. subtilis*^{19,20}, *S. aureus*^{19,21}, *M. smegmatis*^{19,21} e *C. albicans*²², ha mostrato una buona azione insetticida sulla zanzara *Aedes aegypti*²⁰ ed un effetto antifeedant su diversi insetti^{23,24}. L'estere metilico di questo kaurene (2) ha mostrato una significativa attività antifeedant su diversi coleotteri *Tribolium confusum*, *Trogoderma granarium* e *Sitophilus granaries*²⁵. L'attività antiprotozoica del composto (1), dell'atisano (28), dei corrispettivi metil esteri e dell'acido grandiflorolico (7) è stata

saggiata contro *Trypanosoma cruzi*^{26,27}. Da questo studio è emerso che gli acidi liberi **1** e **28** sono più attivi dei rispettivi esteri, mentre il composto **7** è praticamente inattivo. Il composto **1** ha presentato altre significative attività biologiche, tra cui una citotossicità selettiva sulle cellule del cancro al seno MCF-7²⁸, un'azione antiproliferativa sulle cellule del cancro al colon e della leucemia HCT-8 e CEM²⁹, un'interessante attività emolitica sugli eritrociti murini e umani con valori di EC₅₀ di 74.0 e 56.4 μM rispettivamente²⁹. Inoltre il composto **1** testato in un modello di infiammazione *in vivo*, l'edema da carragenina nella zampa di ratto, ha dimostrato buona attività antiinfiammatoria e analgesica^{30,31}.

In uno studio più recente sui diterpenoidi è stata evidenziata l'azione spasmolitica dei composti (**15**), (**1**) e (**7**), capaci di inibire le contrazioni indotte dall'acetilcolina³².

5.3 Materiali e metodi

Il materiale vegetale, costituito da parti aeree fiorite di *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. subsp. *meoides* (Desf.) Fiori, è stato raccolto nel mese di Giugno 2006 nella Piana degli Albanesi (Palermo) in Sicilia. Un campione è depositato nel “Herbarium dell’Orto Botanico di Palermo” (PAL 06–597). Si è proceduto all’analisi dopo aver essiccato e quindi polverizzato il campione.

5.3.1 Il metodo di estrazione

La matrice vegetale essiccata e finemente polverizzata (671 g) è stata posta a macerare in acetone (5 L) a temperatura ambiente, cambiando cinque volte il solvente. Gli estratti sono stati riuniti ed il solvente è stato allontanato completamente a pressione ridotta e a temperatura ambiente.

Il residuo gommoso così ottenuto (22 g) è stato solubilizzato in CHCl_3 , è stato cromatografato su una colonna impaccata con silice disattivata con H_2O (15%). L’eluizione è stata effettuata a gradiente iniziando con il 100% di *n*-esano ed incrementando gradualmente la polarità mediante l’utilizzo di AcOEt utilizzando il profilo di eluizione riportato e raccogliendo 62 frazioni di 500 ml ciascuna:

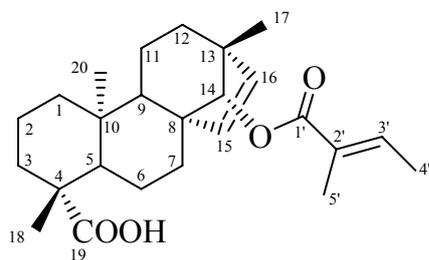
solvente	riunione	N° frazioni
<i>n</i> -esano	A	1-12
9:1	B	13-18
8:2	C	19-22
7:3	D	23-26
6:4	E	27-30
5:5	F	31-34
4:6	G	35-38
3:7	H	39-42
2:8	I	43-46
1:9	L	47-50
AcOEt	M	51-54
EtOAc-MeOH		
9:1	N	55–58
8:2	O	59–62

Queste riunioni, contenenti miscele di componenti grezzi, sono state ulteriormente ricromatografate su gel di silice. Dalla purificazione della frazione **D**, eluita con *n*-esano-AcOEt (8:2), è stata ottenuta una miscela di tre composti (400 mg). Dalle frazioni **E** ed **F** separate su una colonna di silice, è stato ottenuto il composto puro acido elasclepico (**1**)¹⁴ ed una sub-frazione contenente una miscela di tre composti (1 g). 100 mg di miscela, sono stati cromatografati su gel di silice, impregnata con AgNO₃ (5% w/w), l'eluizione *n*-esano-AcOEt (8:2) ha permesso di ottenere: l'acido *ent*-atis-16-en-19-oico (**2**)¹⁶, l'acido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**3**)¹⁶ e l'acido *ent*-kaur-16-ene-19-oico (**4**)³³. Dalla frazione **G** eluendo con *n*-esano-AcOEt (1:1), sono stati ottenuti 100 mg del nuovo metabolita l'acido meoidico (**5**).

Il confronto tra i dati spettroscopici dei composti **1–4** con quelli riportati in letteratura ha permesso la giusta caratterizzazione di questi metaboliti già isolati in questo genere³⁴.

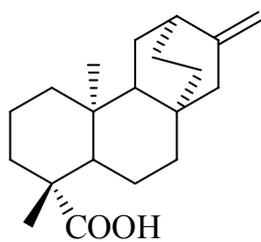
5.3.2 Caratterizzazione dei composti

Composto 1



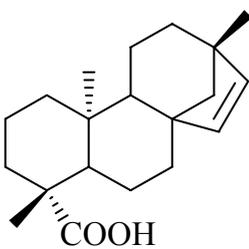
1

Composto 2



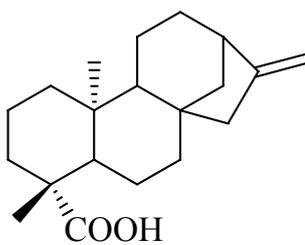
2

Composto 3



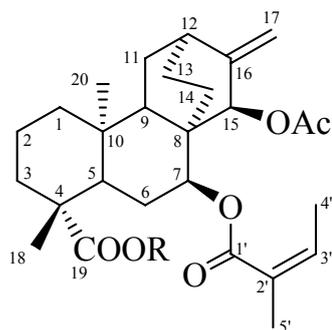
3

Composto 4



4

Composto 5



- 5** R = H
6 R = CH₃

Composto oleoso, $[\alpha]_D^{22}$: - 47.5: (*c* 0.6, CHCl₃); di formula molecolare C₂₇ H₃₈O₆ evidenziata mediante ESI-MS *m/z* (modalità positiva) 458 [M]⁺. Gli spettri ¹H- e ¹³C NMR hanno mostrato segnali tipici di un doppio legame esociclico (δ_H = 5.00, 1H, brs, H-17a; δ_H = 4.90, 1H, brs, H-17b; δ_C = 111.5, CH₂, C-17; δ_C = 151.6, C, C-16), un diagnostico quartetto di quartetti di un angelossi estere a δ_H = 6.01, 1H, qq, H-3'. La presenza di questa catena era confermata anche dalla presenza dei segnali di due CH₃ vinilici (δ_H = 2.01, 3H, dq, CH₃-4'; δ_C = 15.8, CH₃, CH₃-4'; δ_H = 1.92, 3H, quint, CH₃-5'; δ_C = 21.0 CH₃, CH₃-5') e di due carboni quaternari a δ_C = 167.0 C, C-1' e δ_C = 128.8 C, C-2'. I segnali degli spettri inoltre indicavano l'esistenza di: due gruppi metilici terziari (δ_H = 1.18, 3H, s, Me-18; δ_C = 20.6, CH₃, C-18; δ_H = 0.98, 3H, s, Me-20; δ_C = 12.5 CH₃, C-20), un gruppo carbossilico (δ_C = 182.7, C, C-19), un acetile e due metini in posizione 7 e 15, a cui erano legate due funzioni esteree (δ_H = 5.36, 1H, brs, H-15; δ_C = 75.1, CH, C-15; δ_H = 5.07, 1H, t, H-7; δ_C = 74.8 CH, C-7). Gli esperimenti di correlazione 2 D NMR (¹H-¹H COSY, HMBC, HSQC) hanno confermato la presenza dello scheletro atisano e hanno permesso la giusta attribuzione di tutti i segnali ai rispettivi protoni e carboni. Una ricerca bibliografica indica che questo composto è il derivato de-metilato della margozianina (**6**), un atisano isolato diversi anni fa dall'*Elaeoselinum gummiferum*⁶. Il trattamento del nuovo metabolita **5** con diazometano porta alla formazione della margozianina (**6**)⁶ la cui analisi spettroscopica ha permesso di confermare la struttura e la configurazione assoluta dell'acido meoidico

Tabella 2 – Dati NMR relativi al composto 5

posizione	¹H	¹³C	HMBC
1	1.72, 1.05	39.9 t	H-3b, Me-20
2	1.87, 1.49	18.7 t	
3	2.24, 1.09	38.0 t	Me-18
4		43.2 s	H-5, H-3b, Me-18
5	1.67	49.2 d	Me-18, Me-20
6	2.28, 1.92	26.3 t	H-7, H-5
7	5.07 t (3.0)	74.8 d	H-15
8		38.9s	H-5
9	2.22	39.9 d	H-15, Me-20
10		37.9 s	
11	1.72, 1.49	26.0 t	
12	2.36	35.4 d	H-15, H-17a, H-17b
13	1.57, 1.24	26.4 t	
14	1.19 (2H)	26.6 t	
15	5.36 brs	75.1 d	H-17a, H-17b
16		151.6 s	H-15, H-17a, H-17b
17	5.00 brs, 4.90 brs	111.5 t	H-15
Me-17			
Me-18	1.18 s	28.6 q	H-3b
19		182.7 s	H-5
Me-20	0.98 s	12.5 q	H-5, Me-18, H-3b, H-9, H-1a
1'		167.0 s	H-7, Me-4', Me-5'
2'		128.8 s	Me-4', Me-5'
3'	6.01 qq (7.0, 1.0)	136.5 d	Me-4', Me-5'
Me-4'	2.01 dq (7.0, 1.0)	15.8 q	
Me-5'	1.92 quint (1.0)	21.0 q	H-3'
Ac		170.4 s	H-15
Me-Ac	1.95 s	21.7 q	

5.3.3 Attività biologica

Parallelamente all'analisi fitochimica, è stato svolto uno studio di valutazione biologica sul potenziale effetto antitumorale *in vitro*, su colture cellulari tumorali di glioma, dell'estratto e dei singoli metaboliti. L'attività biologica è stata saggiata mediante il test MTT (vedi paragrafo 3.6.1). su linee cellulari C6 di glioma di ratto, tumore maligno del sistema nervoso centrale particolarmente difficile da trattare a causa della sua elevata malignità ed invasività³⁵. L'estratto ottenuto dalla pianta, saggiato a due livelli di concentrazione (1000 e 100 µg/ml) per esposizione a 24 e 48h ha evidenziato un forte effetto antiproliferativo tempo e concentrazione dipendente. I buoni risultati ottenuti per l'estratto ci hanno spinto a focalizzare lo studio sulla valutazione del potenziale effetto antitumorale dei composti puri. I valori di IC₅₀ calcolati dalle curve di crescita hanno evidenziato il composto **3** come composto più attivo tra quelli saggiati con valori di IC₅₀ di 77 ± 16.

Bibliografia

1. Rosselli S, Maggio A, Eiroa C, Formisano C, Bruno M, Irace C, Maffettone C, Mascolo N (2008). Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from the aerial parts of *Elaeoselinum asclepium* subsp. *Meoides*. *Planta Med* 74(10), 1285-7.
2. Enciclopedia Motta, Milano (1962).
3. Cappelletti C. (1975) *Trattato di Botanica*. UTET, Torino.
4. Pignatti S. Flora d'Italia, Vol. 2. Bologna: Ed agricole; (1982).
5. Pinar M, Rodriguez B, Alemany A (1978). Gummiferolic acid, a new ent-atis-16-ene diterpenoid from *Margotia gummifera*. *Phytochemistry* 17(9), 1637-40.
6. Rodriguez B, Pinar M (1979). Margotianin, a new diterpenoid from *Margotia gummifera*. *Phytochemistry* 18(5), 891-3.
7. Rodriguez B, Pinar M (1979) Isomargotianoic acid, a new diterpenoid from *Margotia gummifera*. *An Quim C* 75(12), 936-8.
8. Pinar M, Rico M, Pascual C, Fernandez B (1983). Foetidin, an 8,9-seco-17-norkaurane diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytochemistry* 22(12), 2775-7.
9. Pinar M, Galan MP (1986). Diterpenoid acids from *Elaeoselinum foetidum*. *J Nat Prod* 49(2), 334-5.
10. Pinar M, Rico M (1984). New diterpenoid acids from *Elaeoselinum foetidum*. *An Quim C* 80(2), 138-41.
11. Pinar M, Rico M, Rodriguez B, Fernandez B (1984). A diterpenoid of the atis-16-ene class from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytochemistry* 23(1), 195-6.
12. Pinar M (1984). A diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytochemistry* 23(9), 2075-6.
13. Grande M, Segura M, Mancheno B (1986). New kaurane diterpenoids from the roots of *Elaeoselinum tenuifolium*. *J Nat Prod* 49(2), 259-64.
14. Grande M, Mancheno B, Sanchez MJ (1989). Elasclepiol and elascleplic acid, beyerane diterpenoids from *Elaeoselinum asclepium*. *Phytochemistry* 28(7), 1955-8.
15. Grande M, Mancheno B, Sanchez MJ (1991). Elasclepial and other tetracyclic diterpenoids from *Elaeoselinum asclepium*. *Phytochemistry* 30(6), 1977-82.
16. Grande M, Moran JR, Macias MJ, Mancheno B (1993). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of some tetracyclic diterpenoids isolated from

- Elaeoselinum* species. *Phytochem Anal* 4(1), 19-24.
17. Benigni R, Capra C e Cattorini PE *Piante Medicinali*. Inverni Della Beffa; Milano, (1962).
 18. Mongelli E, Pomilio AB, Sanchez Bustamante J, Guerra FM, Martinez Massanet G (2002). ent-kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *elaeoselinum foetidum*. *Phytother Res* 16, 387-8
 19. Oguntimein BO (1987). The terpenoids of *Annona reticulata*. Part II. *Fitoterapia* 58, 411-13
 20. Slimestad R, Marston A, Mavi S, Hostettmann K (1995). Larvicidal constituents of *Melanthera albinervia*. *Planta Med* 61, 562-3.
 21. Mitscher LA, Rao GS, Veysoglu T, Drake S, Haas TJ (1983). Isolation and identification of trachyloban-19-oic and (-)-kaur-16-en-19-oic acids as antimicrobial agents from the prairie sunflower, *Helianthus annuus*. *J Nat Prod* 46, 745-46.
 22. Ghisalberti EI (1997). The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia* 68, 303-325.
 23. Lajide L, Escoubas P, Mizutani J, Kingston J (1995). Termite antifeedant activity from tropical plants. Part 1. Termite antifeedant activity in *Xylopi aethiopica*. *Phytochemistry* 40, 1105-1112.
 24. Wiemer DF (1985). Natural repellents of the leafcutter ants. *Rev Latinoamer Quim*, 16, 98-102.
 25. Daniewski WM, Skibicki P, Bloszyk E, Budesinsky M, Holub M (1993). Constituents of *Helianthus mollis* and their antifeedant activity. *Pol J Chem* 67, 1255-9.
 26. da Costa FB, Albuquerque S, Vichnewski W (1996). Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspillioides* with trypanomicidal activity. *Planta Med* 62, 557-9.
 27. Alves TMA, Chaves PPG, Santos LMS, Nagem TJ, Murta SMF, Ceravolo IP, Romanha AJ, Zani CL (1995). A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 61, 85-7.
 28. Fatope MO, Audu OT, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H, McLanglin J (1996). Bioactive ent-Kaurene Diterpenoids from *Annona senegalensis*. *J Nat Prod* 59, 301-3.
 29. Costa-Lotufó LV, Cunha GMA, Farias PAM, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa

- C, Morais MO, Silveira ER, Gramosa NV, Rao VSN (2002). The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40, 1231-4.
30. Paiva LA, Gurgel LA, Silva RM, Tome AR, Gramosa NV, Silveira ER, Santos FA, Rao VS (2002). Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascul Pharmacol* 39, 303-7.
31. Han C, Abel PW, Minneman KP (1987). Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature* 329, 333-5.
32. Ambrosio SR, Tirapelli CR, da Costa FB, de Oliveira AM (2006). Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sci* 79, 925-33.
33. Ohno N, Mabry TJ, Zabel V, Watson WH (1979). Tetrachyrin, a new rearranged kaurenoid lactone, and diterpene acids from *Tetrachyron orizabaensis* and *Helianthus debilis*. *Phytochemistry* 18, 1687-9
34. Bruno M, Maggio AM, Spadaro V, Rosselli S (2008). The diterpenoids of the genus *Elaeoselinum* (Apiaceae) and their biological properties. *Curr Org Chem* 12(6), 464-75.
35. Denecke J, Fiedler K, Hacker-Klom U, Mölenkamp G, Jürgens H, Wolff JE (1997). Multiple drug-resistant C6 glioma cells cross-resistant to irradiation. *Anticancer Res* 17, 4531-4

Capitolo 6 Oli essenziali

Le piante aromatiche utilizzate fin dall'antichità per le loro proprietà medicinali, per speziare cibi e come conservanti hanno tessuti specializzati nella secrezione di metaboliti secondari presenti nelle radici, nei rizomi, nelle foglie e nei fiori. I prodotti di secrezione hanno natura chimica diversa tra loro: cristalli di ossalato di calcio, resine, gomme, mucillagini, terpeni, tannini, latici, pigmenti, oli essenziali¹. Il termine 'olio essenziale' fu usato per la prima volta nel XVI secolo da Paracelsus von Hohenheim, che definì il componente di una droga 'Quinta essentia'. Da allora ad oggi numerosi studi sono stati condotti sull'utilizzo e sulle tecniche di estrazione dei composti volatili da diverse parti della pianta. Le famiglie botaniche più ricche di oli essenziali sono: le Asteraceae, le Lamiaceae, le Rutaceae, le Liliaceae, le Magnoliaceae, le Cupressaceae, le Pinaceae. Le proprietà terapeutiche degli oli essenziali sono state oggetto di numerosi studi, in particolare l'azione antitumorale ha destato un grande interesse nella ricerca. Diversi lavori riportano l'azione preventiva degli oli durante la fase iniziale di carcinogenesi ed il loro effetto terapeutico nel trattamento di diversi tipi di tumori.

Nell'ambito delle Lamiaceae durante il mio periodo di dottorato è stata effettuato uno studio fitochimico di oli essenziali ottenuti da piante originarie del bacino del Mediterraneo. In questo capitolo è descritta l'analisi GC-MS e la valutazione del potenziale effetto antitumorale degli oli essenziali di *Teucrium* sp e di *Salvia* sp.

6.1 Oli essenziali e chemioprevenzione

La noce moscata (*Myristica fragrans* L.), ad esempio, ha mostrato un potente effetto epatoprotettivo, correlato alla miristicina, il maggiore costituente dell'olio essenziale in essa contenuto. Il meccanismo epatoprotettivo include un'inibizione del fattore TNF- α rilasciato dai macrofagi e blocco dell'apoptosi. Recentemente è stata inoltre evidenziata l'azione citotossica della miristicina sulle cellule umane di neuroblasoma SK-N-SH mediante un meccanismo apoptotico². Il citrale, presente in numerosi oli (vedi capitolo 2), costituente principale della citronella è un induttore della glutatione-S-transferasi. La relazione struttura-attività di questo metabolita ha rivelato che il gruppo aldeidico coniugato in posizione *trans* con il doppio legame della catena nell'isomero *trans*-citrone (geraniale) è l'elemento strutturale che determina questa azione, mentre l'isomero *cis*-citrone (nerale) non mostra alcuna attività. Questo risultato suggerisce che il citrale costituisce un potenziale agente chemio preventivo nei casi di carcinogenesi

correllata a processi infiammatori, come il cancro alla pelle e al colon², nei quali è stata evidenziata una mancata attività della GSTP1. Altri oli essenziali presentano effetti epatoprotettivi dovuto al loro contenuto in fenoli e monoterpeni, ad esempio: il cumino nero (*Nigella sativa* L.) attivo per la presenza di alte concentrazioni di timochinone²; l'essenza di arancia deve la sua efficacia al componente maggioritario, il limonene ed il finocchio dolce (*Foeniculum vulgare* Mill.) efficace per la presenza sia del *d*-limonene sia del β -mircene².

6.1.1 Oli essenziali e carcinogenesi

Gli oli essenziali ed i loro metaboliti mostrano un'azione antitumorale su diverse linee cellulari umane di cancro, in particolare sono attivi su cellule di glioma, del cancro al colon, del tumore al fegato, del cancro al seno e della leucemia².

L' α -bisabololo, uno dei sesquiterpeni principali dell'olio essenziale della camomilla (*Matricaria camomilla* L.), si è mostrato capace di indurre morte cellulare in cellule di glioma, senza alterare la vitalità delle normali cellule astrogliali². Recentemente è stata valutata la capacità del geraniolo, un monoterpene alcolico come descritto nel capitolo 2, di ridurre la crescita del tumore del colon senza alterare la vitalità delle cellule sane². Il composto ha determinato una riduzione del 70% della crescita cellulare con cellule bloccate nella fase S del ciclo cellulare e concomitante inibizione della sintesi del DNA. Il geraniolo, inoltre, si è dimostrato dotato di proprietà antiproliferative perché ha determinato una riduzione del 50% dell'attività della ornitina decarbossilasi, un enzima chiave della sintesi delle poliamine. In uno studio condotto nel 2004 è stata evidenziata l'azione antiangiogenica e proapoptotica del limonene. Il metabolita inoculato su cellule di cancro del tessuto gastrico nel topo, inibisce, *in vivo*, la crescita del tumore e la formazione di metastasi². Il *d*-limonene può inoltre indurre *in vitro* apoptosi sulle cellule tumorali gastriche BGC-823 in modo concentrazione dipendente e la sua efficacia sembra incrementata dalla combinazione con altri agenti citotossici come il 5-fluorouracile². L'eucaliptolo (1,8-cineolo) presente in elevate nel olio essenziale di eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) è stato testato su cellule HL-60 di leucemia umana. Le cellule trattate con questo metabolita hanno subito dei cambiamenti morfologici, dovuti alla frammentazione del DNA, indicando un'induzione all'apoptosi nelle cellule tumorali². Oltre all'azione dei singoli componenti bisogna ricordare che anche gli oli essenziali hanno mostrato un'azione anticancro *in vitro*, ad esempio l'olio

di *Melissa officinalis* L. è risultato attivo su diverse linee cellulari A549, MCF-7, Caco-2, HL-60 e K562², l'olio di *Artemisia annua* L. ha mostrato un' induzione all'apoptosi sulle cellule di epatocarcinoma umano SMMC-7721².

6.2 Famiglia delle Lamiaceae

Con il nome di Lamiaceae o Labiatae si accorpa una vasta ed omogenea famiglia di Dicotiledoni che comprende 200 generi e circa 3200 specie³. Il carattere morfologico più evidente è dato dal lembo della corolla, incurvata sia all'interno che all'esterno, ricordando la forma di un labbro, da cui il nome "Labiatae". Sono piante prevalentemente erbacee, annuali o perenni. In qualche raro caso, (alcune specie del genere *Hyptis*) presentano un abito arboreo, mentre ancora più raro è l'aspetto lianoso per poche specie del genere *Scutellaria*. Presentano fusto e rami a sezione quadrangolare, foglie prive di stipole, opposte o verticillate, semplici, pennatosette o pennatocomposte. I fiori sono ermafroditi, zigomorfi, riuniti in infiorescenze che possono essere a spicastro oppure a verticillastro. La corolla, caratteristica, è bilabiata e si compone di 5 petali: 2 formano il labbro superiore e 3 quello inferiore. L'ovario è supero e quadriloculare. Lo stilo è ginobasico, lo stimma è generalmente bifido, il frutto è un tetrachenio. I semi hanno scarso endosperma cellulare, spesso riassorbito durante lo sviluppo embrionale. L'impollinazione è quasi sempre entomogama e, nello specifico, è operata da ditteri ed imenotteri³. Sono piante aromatiche per la presenza, su tutta la pianta, di peli secretori e ghiandole contenenti oli essenziali che conferiscono alle Lamiaceae una provvida azione stimolante per le mucose e per le ghiandole, ecco perché vengono largamente utilizzate in medicina come toniche, sudorifere e stimolanti³.

6.2.1 Sistematica delle Lamiaceae

Le Lamiaceae vengono suddivise in otto sottofamiglie³:

- 1- *Ajugoideae*, i cui generi principali sono *Ajuga*, *Tenrium* e *Rosmarinum*;
- 2- *Prostantheroideae*;
- 3- *Prasioideae*, rappresentata dai generi *Prasium* e *Gomphostemma*;
- 4- *Scutellarioideae*;
- 5- *Lavanduloideae*;
- 6- *Stachyoideae*, che raggruppa generi molto importanti come *Melissa*, *Thymus*, *Mentha*, *Origanum*, *Satureja*, *Marrubium*, *Hyssopus*;
- 7- *Ocimoideae*, i cui principali generi sono *Ocimum*, della nostra flora spontanea, *Coleus* e *Plectranthus*, propri di altre regioni;
- 8- *Cathopheroideae*.

I generi indigeni della flora italiana possono essere divisi in due gruppi: *Tetrastemon* in cui gli stami fertili sono quattro, e *Distemon* in cui gli stami fertili sono due (i restanti due sono sterili oppure mancano del tutto). Tra i generi più importanti per numero di specie ricordiamo: *Salvia* (circa 500 specie), *Hyptis* (circa 300 specie), *Stachys* (circa 200 specie), *Scutellaria* (più di 100 specie)³. Indubbia è l'affinità delle Lamiaceae con le Verbenaceae, dalle quali si distinguono solo per l'inserzione dello stilo alla base dei lobi ovarici, mentre per le Verbenaceae alla sommità dell'ovario. Alla luce di quanto detto, i caratteri discriminanti una Lamiacea sono: fusti e rami a sezione tetragonale, odore aromatico, ovario supero bicarpellare e quadrilobato, ovuli anatropi e solitari, stilo inserito basalmente ai lobi ovarici. Meno facile risulta, invece, la separazione dei generi, poiché gli elementi discriminanti risiedono spesso nel calice, nella corolla o negli stami³.

6.2.2 Distribuzione geografica, habitat ed interesse

Sebbene la loro distribuzione sia cosmopolita, le Lamiaceae sono molto più diffuse nella zona mediterranea, che rappresenta il principale centro di differenziazione della famiglia. Allo stato spontaneo, molte di esse prediligono habitat nemorali, tuttavia la maggior parte preferisce ambienti aperti e soleggiati, entrando nella costituzione di macchie e garighe (*Salvia triloba* L. Fil.), pascoli aridi montani (*Stachys tymphaea* Hausskn.), o pascoli umidi (*Prunella vulgaris* L.). Alla base del loro ampio utilizzo vi è una caratteristica istologica che le accomuna: la presenza di ghiandole e peli secretori

contenenti oli essenziali lungo l'intera pianta, in particolare sul fusto e sulle foglie. Questo spiega il diffusissimo impiego nell'industria alimentare come aromatizzanti per cibi e bevande (*Mentha piperita* L.). Gli indigeni dell'Africa centrale raccolgono i piccoli semi di *Hyptis spicigera* per ottenere una gelatina che mescolano alle loro salse ed intingoli nel condimento delle carni³. Le Lamiaceae vengono impiegate dall'industria farmaceutica come piante medicinali. Questa famiglia trova un larghissimo uso anche in profumeria; ad esempio la *Lavandula spica*, oltre ad essere usata come essenza-base nei profumi, protegge lane e pellicce dall'attacco delle tarme. Ritroviamo molte specie sui davanzali come piante ornamentali per il loro profumo ed il loro piacevole aspetto; tra i vari generi ricordiamo *Cedronella*, *Leontis*, *Ajuga*, *Brunella*, *Lavandula*⁴. La nostra cultura culinaria si "profuma" di specie quali *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Satureja hortensis*. Alla luce di quanto detto, è evidente che la versatilità d'impiego fa delle Lamiaceae una delle famiglie di maggior interesse economico.

6.3 Genere *Teucrium*

L'etimologia del genere "*Teucrium*", ufficializzata da Linneo, deriva da Teucro, nome del primo re di Troia, e dalla denominazione di una pianta, *Teukrion*, che si incontra negli scritti di Discoride, in memoria del suddetto re che era figlio di Scafandro e della Ninfa Idaeia, la leggenda afferma che fu Teucro a diffondere presso il suo popolo la conoscenza delle virtù medicinali di alcune piante di questo genere³. Le piante del genere *Teucrium* sono erbacee, talvolta subarbustive leggermente legnose, in alcuni casi anche arbusti, talora annuali, altre volte perenni, ma tutte sono tormentose o pelose, amare ed aromatiche. Crescono spontaneamente, ma possono essere coltivate per siepi. I fusti sono eretti, alti 10-30 cm, pubescenti con macchie rossastre. Le foglie sono intere, dentate o incise, in alcuni casi sono profondamente divise o multifide, hanno un colore verde pallido nella pagina inferiore; le florali sono conformi o ridotte allo stato di brattee⁴. I fiori, rossi o rosa-violacei o bianchi o gialli, sono ermafroditi, irregolari, solitari ed opposti, all'ascella delle foglie o raccolti in falsi verticilli, in cime, in fascetti, in grappoli, o in spighe. Hanno un calice a cinque denti, persistente, di forma variabile (tubuloso o campanulato o raramente rigonfiato); i cinque denti sono quasi uguali, quello superiore può, talvolta, essere più largo.

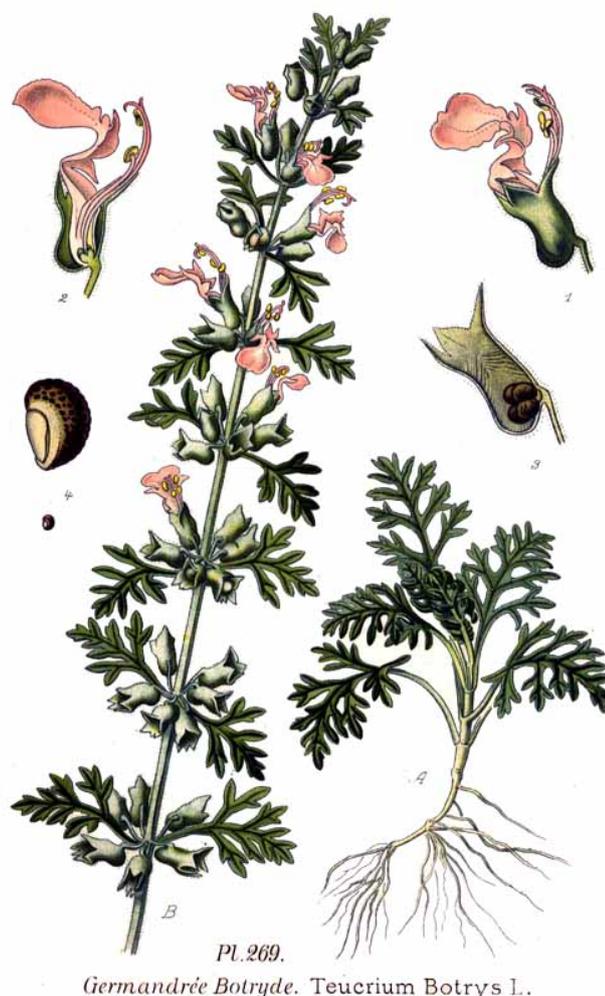


Fig. 1- Tavola illustrativa dei principali caratteri di riconoscimento della specie *T. botrys*, B-infiorescenza, 1-fiore sezionato, 2-fiore intero, 3-calice persistente sezionato e mostrante i frutti, 4-achenio ingrandito.

La corolla a prima vista sembra avere un solo labbro poiché quello superiore (che corrisponde a due petali) è profondamente diviso in due parti, le quali sono più o meno coerenti con i tre lobi del labbro inferiore; in tal modo la corolla sembra essere sprovvista del labbro superiore, mentre il labbro inferiore appare unico e pentalobato³. Il tubo della corolla è privo dell'anello peloso alla fauce ed il lobo mediano è più grande degli altri ed è concavo. Gli stami sono quattro, protrusi e paralleli, sono ravvicinati gli uni agli altri, sporgono dalla fessura del labbro superiore e possono essere dritti o incurvati all'innanzi. Le antere sono biloculari, con le logge confluenti in una sola fessura di deiscenza ed il polline matura con proterandria, prima della ricettività dei

rispettivi stigmi. L'ovario è quadripartito, denticolato, con le logge arrotondate all'apice. Lo stilo è semplice e caduco. Le parti del frutto sono ovoidi, sono quattro distinti acheni arrotondati all'apice, possono essere sia lisci sia rugosi³.

6.3.1 Sistematica del genere *Teucrium*

Le specie del genere *Teucrium* possono essere divise in otto sezioni denominate rispettivamente³:

- *brevifolium* (per *T. brevifolium* Scheber)
- *montbretii* (per *T. montbretii* Benth ssp. *heliotropiifolium* Barbey Davis)
- *polium* (per *T. polium*, *T. montanum*, *T. pyrenaicum*)
- *chamaedrys* (per *T. marum*, *T. chamaedrys*)
- *scorodonia* (per la sola specie *T. scorodonia*)
- *stachybothrys* (per *T. canadese* e per la specie *T. hircanicum*)
- *teucriis* (per le tre specie rispettivamente denominate *bicolor*, *orientale* e *fruticans*)
- *teucropsis* (per *T. betonicum*)

Possono ancora essere suddivise in altre otto sezioni, che si riconoscono attraverso la seguente chiave analitica:

- Piante a calice bilabiato, con labbro superiore formato da un dente circa il doppio più largo degli altri, o piante a calice a cinque denti o quasi;
- Fiori formanti spicacchi terminali. Bratteole e rami mai spinescenti (*Scorodonia*), o fiori in verticillacchi ascellari non formanti spicacchi, e bratteole e rami alla fine spinescenti (*Spinularia*);
- Verticillacchi riuniti a capolino (*polium*); verticillacchi non riuniti a capolino;
- Foglie intere, arbusti bianco- o ferrugineo-tomentosi (*teucriis*); foglie dentate o inciso-pinnatifide;
- Verticillacchi di 1-3 fiori, alla ascella di foglie non differenziate e quindi non formanti spicacchi (*scordium*);
- Verticillacchi di 2-6 fiori, alla ascella di foglie alquanto differenziate in brattee e pertanto formanti spicacchi (*chamaedrys*)³.
- Fiori viola-purpureo con aroma persistente (*T. brevifolium* Schreber).

- Semiarbusto nano-casmo fitico sempre verde con rami lignificati; foglie ottuse, picciolate e tomentose; fiori compatti o riuniti in racemi; corolla lunga 5-8mm (*T. montbretii* Benth. ssp. *heliotropiifolium* Barbey Davis).

6.3.2 Distribuzione geografica e varietà del *Teucrium*

Attualmente si attribuiscono un gran numero di specie al genere *Teucrium*, almeno 15-30 di queste fanno parte della nostra flora, allo stato di spontaneità, altre sono di origine francese mentre solo quattro specie appartengono alla flora spontanea dell'Inghilterra. L'area di spontaneità, nella quale crescono le specie del genere *Teucrium*, si identifica nelle regioni temperate e calde dell'Europa, dell'Asia, dell'Africa, dell'America boreale ed australe ed infine in Australia; il genere è dunque cosmopolita e le sue specie si trovano diffuse largamente sulla superficie terrestre, tranne che su quei territori dove l'inverno è freddo⁵. Tra le specie esistenti ricordiamo: il *Teucrium fruticans*, un arbusto diffuso nel Mediterraneo occidentale in zone litoranee calde; il *Teucrium montanum*, un piccolo cespuglio che fiorisce su prati aridi, sassosi ed assolati con substrato generalmente calcareo, molto comune sulle montagne dell' Europa meridionale; il *Teucrium polium* che cresce in luoghi aridi o rocciosi dal mare al piano montano, sia in Italia che in altri paesi del bacino Mediterraneo; il *Teucrium marum* che cresce in luoghi argillosi, sabbiosi e ben esposti alla luce; il *Teucrium brevifolium* Schreber, diffuso nell' Egeo meridionale; il *Teucrium montbretii* Benth. ssp. *heliotropiifolium* (Barbey) Davis, un arbusto nano che cresce su scogliere calcaree⁶.



Fig. 2 - Parti aeree di *Teucrium brevifolium* Schreb., e *Teucrium fruticans* L. (camedrio femmina)



Fig. 3 - Parti aeree *Teucrium montanum* L. (camedrio montano) e di *Teucrium polium* L. (canutola)



Fig. 4- Parti aeree di *Teucrium marum* L. e di *Teucrium chamaedrys* L.

6.3.3 Proprietà farmacologiche ed impiego terapeutico.

In passato le proprietà farmacologiche del camedrio (*Teucrium chamaedrys* L.) non erano conosciute e l'impiego terapeutico si basava sull'uso tradizionale della pianta, quali: turbe digestive, insufficienza epatica, astenia. Per le sue proprietà amare e aromatiche era utilizzato già dagli antichi greci per combattere l'atonìa e stimolare l'apparato digerente, inoltre la presenza di tannini ne giustifica l'uso come astringente nel trattamento stomatico delle diarree leggere. La pianta per le sue proprietà diuretiche era indicata per promuovere l'eliminazione della renella e dei prodotti del catabolismo, era inoltre utilizzata nel trattamento delle dermatosi, nelle forme reumatiche e come coadiuvante nelle terapie dimagranti⁶. In letteratura sono riportate numerosi studi che giustificano l'uso tradizionale di questa pianta, molte specie hanno mostrato interessanti proprietà analgesiche, ipoglicemiche, ipolipidemiche, antipiretiche, antiulcera e antiinfiammatorie⁷⁻¹⁰. Confermate da studi sperimentali, oggi si riconoscono le proprietà toniche, antiinfiammatorie e antispasmodiche del *T. montanum*⁷ L., le proprietà epatoprotettive del *T. polium*¹¹ L. usato anche come disinfettante di ferite e piaghe; le proprietà antiossidanti e diuretiche del *T. montbretii*¹⁰ Benth.

6.3.4 Metaboliti isolati e oli essenziali da varie specie di *Teucrium*

Il genere *Teucrium* è ricco di diterpeni con scheletro neoclorodano, più di 220 diterpeni sono stati descritti finora, molti di questi hanno un ruolo ecologico come antifeedant contro differenti specie di insetti¹². Tra i neoclorodani con proprietà antifeedant di questo genere ricordiamo: le teusandrine A-D e le teusandrine E-F dal *Teucrium sandasicum* O. Schwarz¹³, la teuciaponina A e la 12-*epi*-teuciaponina A dal *Teucrium maghrebicum* Greuter & Burdet¹⁴, l'auropolina e la 20-*epi*-auropolina nelle forme R ed S isolate dal *Teucrium polium* con attività antifeedant contro le larve della *Spodoptera littoralis*¹⁵. Studi fitochimici su diversi estratti di specie appartenenti al genere *Teucrium* hanno evidenziato la presenza di steroidi, iridoidi, flavonoidi, fenilpropanoidi ed oli essenziali^{16, 17}. Diversi studi sono presenti in letteratura sull'analisi fitochimica di oli essenziali da diverse specie di *Teucrium*. Recentemente l'analisi GC-MS di un olio essenziale ottenuto dalle parti aeree di *T. massiliense* L. ha evidenziato la presenza di 34 componenti, rappresentati soprattutto da linalolo (10.6%), linalil acetato (7.1%), zingiberene (4.7%) e γ -cadinene (4.1%). L'olio saggiato per valutare il suo potere antiossidante mediante il test DPPH, ha mostrato un'azione antiradicalica paragonabile a

quella del Trolox. Numerose sono le analisi di oli ottenuti dalle parti aeree di piante di *Teucrium* raccolte in Tunisia, in questa regione, infatti, vi è un tradizionale utilizzo nella medicina popolare di questi oli, per la cura di infezioni cutanee sia di derivazione virale che batterica. Recentemente sono state riportate le analisi di due specie endemiche della Tunisia: *T. ramosissimum* Desf. e *T. alopecurus* De Noe. L'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione e analizzato mediante GC-MS dalle parti aeree di *T. ramosissimum* Desf., specie endemica in Tunisia, ha mostrato una elevata quantità di sesquiterpeni idrocarburici (41.9%) e ossigenati (42.3%). L'olio essenziale ha mostrato una moderata attività antibatterica su cinque differenti ceppi batterici giustificando il suo utilizzo nella medicina popolare¹⁸. L'olio di *T. alopecurus* costituito da sesquiterpeni idrocarburici (61.3%) e ossigenati ha mostrato un'azione cicatrizzante sulle ferite¹⁹.

6.3.5 Materiali e metodi

6.3.5.a Caratteristiche dei campioni

Per il nostro studio le parti aeree del *Teucrium brevifolium* Schreber, sono state raccolte nel mese di luglio 2006 lungo la strada tra i villaggi di Ankassa e Menetes, a 269 m di altitudine, sull'isola di Karpathos, in Grecia. Le parti aeree del *Teucrium montbretii* Benth ssp. *heliotropiifolium* (Barbey) Davis sono state raccolte nel mese di giugno 2006 a Menetes, sulle scogliere calcaree a Linoseli (Kakiskala), sull'isola di Karpathos, in Grecia. Le parti aeree di *T. flavum* L sono state raccolte nel luglio 2006 vicino Milopotamos in Grecia; mentre le parti aeree di *T. polium* ssp *capitatum* raccolte nello stesso periodo a Gournes, sull'isola di Creta. I campioni (N° PAL 232/06 per *T. brevifolium*, 233/06 per *T. flavum*, 234/06 per *T. montbretii* and 235/06 per *T. polium*) sono stati depositati all'erbario presso il Dipartimento di Chimica Organica, Università di Palermo.

6.3.5.b Isolamento dell'olio essenziale

Le parti aeree seccate delle piante, sono state sottoposte ad idrodistillazione (vedi cap. 3) per tre ore secondo la procedura indicata dalla Farmacopea Europea¹⁹, usando un apparecchio tipo Clevenger (vedi paragrafo 3.1.3), sono stati ottenuti oli essenziali di colore giallo, dall'odore piacevole. Gli estratti sono stati anidrificati con solfato di sodio anidro e poi conservati al buio sotto N₂, a +4°C, pronti per le analisi GC e GC-MS. Le rese (w/w) sono state rispettivamente dello: 0.14% per l'olio essenziale di *T. brevifolium* (**B**); 0.10% per l'olio di *T. flavum* (**F**) e *T. montbretii* (**M**), 0.35% per il *T. polium* (**P**).

6.3.5.c Risultati dell'analisi GC-MS

I risultati di questo studio sono riportati nella tabella 1 dove i composti identificati sono elencati secondo i loro indici di ritenzione su una colonna HP 5 MS (vedi paragrafo 3.2.3). L'analisi degli oli essenziali ha permesso di identificare: 61 composti per **B**, che costituiscono il 92.1% dell'olio totale; 58 per **F**, che rappresentano il 95.7% dell'olio totale, 56 per **M** e 70 per **P** che rappresentano rispettivamente il 91.7% ed il 92.5% dell'olio totale.

Dall'analisi GC-MS è emerso che l'olio **B** è composto principalmente da sesquiterpeni (24.6% idrocarburi e 30.9% sesquiterpeni ossigenati) e monoterpeni (22.7%). Tra i

sesquiterpeni idrocarburici il componente più abbondante è il δ -cadinene (4.2%), mentre tra i 14 sesquiterpeni ossigenati presenti nell'olio **B**, è notevole il contenuto di spatulenolo (9%), cariofillene ossido (3.8%), viridiflorolo (3.4%) e β -eudesmolo (3.4%). Riguardo ai monoterpeni ossigenati, il più abbondante è il trans-pinocarveolo (3.8%), mentre il β -pinene (3.6%) è il componente più abbondante tra i monoterpeni idrocarburici.

In **F** i maggiori costituenti sono il cariofillene (12.2%), il 4-vinil guaiacolo (9.7%), il cariofillene ossido (7.9%) e l' α -umulene (6.0%). I sesquiterpeni costituiscono la frazione più abbondante dell'olio, rappresentando il 54.5% dell'olio totale, con una prevalenza di sesquiterpeni idrocarburici (39%) tra cui predominano il cariofillene e l' α -umulene. Tra gli 8 sesquiterpeni ossigenati (15.5%), il cariofillene ossido (7.9%) risulta essere il più abbondante. La frazione monoterpenica che ammonta al 9.1% dell'olio, presenta come maggiori costituenti il linalolo (3.4%) ed il terpinolene (1.3%). La frazione fenolica (13.7%), invece è costituita soprattutto da 4-vinil guaiacolo (9.7%).

Nel *T. montbretii* (**M**) invece i principali componenti sono carvacrolo (13.9%), cariofillene ossido (12.7%), acido esadecanoico (9.8%) e cariofillene (7.8%). Tra sesquiterpeni idrocarburici il cariofillene (7.8%), il β -bourbonene (3.5%) e l'alloaromadendrene (3.0%) sono predominanti, mentre tra i sesquiterpeni ossigenati i composti più abbondanti sono il cariofillene ossido (12.7%) e il cariofillenolo II (3.7%). La frazione monoterpenica che ammonta solo al 4.8% dell'olio, ed ha come maggiore costituente il linalolo (3.5%). E' stata inoltre evidenziata la presenza di altri componenti quali fenoli (15.2%) e acidi grassi (11.7%).

Il carvacrolo (10.1%), il cariofillene (9.8%), il torreiolo (7.6%) ed il cariofillene ossido (5.0%) costituiscono i maggiori costituenti dell'olio essenziale **P**. L'analisi GC-MS ha evidenziato anche per l'olio **P**, l'abbondanza di sesquiterpeni che ammontano al 55.8% dell'olio totale, con una prevalenza di sesquiterpeni idrocarburici (32.7%). Tra i 26 sesquiterpeni idrocarburici il cariofillene (9.8%), l' α -umulene (3.8%), il germacrene D (3.1%), l' α -amorfene (3.0%) e il δ -cadinene (2.9%) sono predominanti, mentre tra i sesquiterpeni ossigenati (23.1%) i composti più abbondanti sono il torreiolo (7.6%) ed il cariofillene ossido (5.0%). Riguardo ai monoterpeni ossigenati (13.6%) più abbondanti della rispettiva frazione idrocarburica (1.2%), sono da evidenziare il *cis*-verbenone (3.7%) ed il *cis*-verbenolo (2.1%). La frazione fenolica (11.6%) è rappresentata quasi interamente dal carvacrolo (10.1%). Dall'analisi dei quattro oli è

evidente che il genere è costituito da una predominanza di sesquiterpeni ed una scarsa presenza di monoterpeni. Tale risultato è coerente con dati precedenti presenti in letteratura^{8,20}, anche se naturalmente la qualità e la quantità dei singoli metaboliti varia a seconda della specie^{22,23}.

Tabella 1 - Composizione chimica degli oli essenziali di diverse specie di *Teucrium* raccolti in Grecia.

R _i ^a	R _i ^b	Compound	Identif ^c	% B	% F	% M	% P
938	1076	α -Pinene	R _i , MS, Co-GC	2.8			0.2
973	1132	Sabinene	R _i , MS				0.5
977	1452	1-Otten-3-ol	R _i , MS	0.7	0.3		
978	1118	β -Pinene	R _i , MS, Co-GC	3.6			0.2
993	1174	Mircene	R _i , MS, Co-GC	0.7			
1012		α -Terpinene	R _i , MS, Co-GC				t
1025	1278	<i>p</i> -Cimene	R _i , MS, Co-GC			t	0.3
1029	1218	β -Fellandrene	R _i , MS, Co-GC	2.8			
1030		Limonene	R _i , MS, Co-GC			t	
1038		(<i>Z</i>)- β -Ocimene	R _i , MS				t
1048		Fenilacetaldeide	R _i , MS, Co-GC			t	
1062	1450	<i>cis</i> -Linalolo ossido	R _i , MS				0.4
1063	1555	<i>cis</i> -Sabinene idrato	R _i , MS				0.3
1076		<i>trans</i> -Linalolo ossido	R _i , MS			t	0.2
1086	1265	Terpinolene	R _i , MS		1.3		
1093		<i>trans</i> -Sabinene idrato	R _i , MS				0.2
1098	1553	Linalolo	R _i , MS		3.4	3.5	0.8
1099		Isoamil isovalerato	R _i , MS		0.6		
1113		Fenil etil alcol	R _i , MS		0.1		
1128	1489	α -Camfolenale	R _i , MS	0.4			
1132	1653	<i>cis</i> -Pinocarveolo	R _i , MS		1.2		
1135	1789	<i>cis</i> -Sabinolo	R _i , MS				1.3
1136	1597	Nopinone	R _i , MS				0.5
1138	1654	<i>trans</i> -Pinocarveolo	R _i , MS	3.8	0.9		
1144	1663	<i>cis</i> -Verbenolo	R _i , MS		0.8		2.1
1148	1737	Veratrole	R _i , MS		2.5		
1155	1652	Sabina chetone	R _i , MS				0.6
1165		4-Vinil anisolo	R _i , MS		0.7		

1165	1587	Pinocarvone	R _i , MS	1.2			
1167	1719	Borneolo	R _i , MS, Co-GC	0.2			0.1
1175	1656	Umbellulone	R _i , MS				0.6
1176	1611	4-Terpineolo	R _i , MS, Co-GC		0.3	t	0.7
1189	1706	α -Terpineolo	R _i , MS, Co-GC				0.6
1193	1648	Mirtenale	R _i , MS	2.7			t
1196	1804	Mirtenolo	R _i , MS	1.4	1.4		1.0
1204	1723	<i>cis</i> -Verbenone	R _i , MS	0.9		0.1	3.7
1208		α -Ionene	R _i , MS			0.1	
1217	1845	<i>trans</i> Carveolo	R _i , MS	0.6	0.4		
1223		β -Ciclocitrato	R _i , MS			t	
1226	1878	<i>cis</i> -Carveolo	R _i , MS				0.6
1232		<i>p</i> -Anisaldeide	R _i , MS, Co-GC		0.3		
1232	1804	Cumin aldeide	R _i , MS				0.2
1241	1752	Carvone	R _i , MS	0.4	0.3		0.3
1249		Isoamil esanoato	R _i , MS		0.8		
1255	1857	Geraniolo	R _i , MS, Co-GC			0.5	
1275	1741	Fellandrale	R _i , MS	0.8			
1285	2115	<i>p</i> -Cimen-7-olo	R _i , MS	0.4	0.4		1.0
1290	2198	Timolo	R _i , MS, Co-GC			0.6	0.1
1297	2239	Carvacrolo	R_i, MS, Co-GC			13.9	10.1
1302	1797	<i>p</i> -Methossiacetofenone	R _i , MS, Co-GC	0.8			2.2
1313	2180	4-Vinil guaiacolo	R_i, MS		9.7		
1335	1476	δ -Elemene	R _i , MS	0.7			
1351		α -Longipinene	R _i , MS				0.1
1352	1466	α -Cubebene	R _i , MS	0.3	0.3	0.4	
1353	2186	Eugenolo	R _i , MS, Co-GC	0.8	0.8	0.7	0.4
1363		Ciclosativene	R _i , MS				t
1372	1493	α -Ilangene	R _i , MS	0.3		0.1	
1377	1497	α -Copaene	R _i , MS	0.7	2.8		0.7
1380	1835	(<i>E</i>)- β -Damascenone	R _i , MS	1.9	0.7	0.2	
1382	1547	β -Cubebene	R _i , MS			0.2	0.1
1385	1535	β -Burbonene	R _i , MS	1.8	3.1	3.5	0.3
1387	1600	β -Elemene	R _i , MS	0.9			0.3
1391		Ciperene	R _i , MS	0.4			
1396		α -Elemene	R _i , MS			0.2	

1408	1529	α -Gurjunene	R _i , MS	1.5			1.4
1409	1510	α -Funebrene	R _i , MS				0.2
1418	1612	Cariofillene	R_i, MS		12.2	7.8	9.8
1422		C ₁₀ H ₁₄	R _i , MS			0.8	
1423	1612	β -Gurjunene (Calarene)	R _i , MS	0.5			0.2
1424	1638	β -Cedrene	R _i , MS			0.6	
1435	1573	(Z)- α -trans-Bergamotene	R _i , MS		2.1		
1436	1650	γ -Elemene	R _i , MS				0.4
1437	1674	β -Umulene	R _i , MS				0.4
1437	1628	Aromadendrene	R _i , MS	1.7			
1455	1689	α-Umulene	R_i, MS		6.0	2.4	3.8
1463	1661	<i>allo</i> -Aromadendrene	R _i , MS	0.1	1.5	3.0	0.4
1473	16876	γ -Gurjunene (5,11-Guaiadiene)	R _i , MS	0.4			
1475	1715	β -Selinene	R _i , MS	1.7		0.3	
1477	1726	Germacrene D	R _i , MS		2.8	2.4	3.1
1478	1704	γ -Muurolene	R _i , MS	2.5	1.5	0.8	
1482	1957	(E)- β -Ionone	R _i , MS, Co-GC		0.8		
1483	1784	<i>ar</i> -Curcumene	R _i , MS				0.5
1485	1675	Epizonarene	R _i , MS	2.7			
1486	2355	Diidroactinidiolide	R _i , MS			1.0	
1487	1679	α -Amorfene	R _i , MS	0.3		0.4	3.0
1490	1694	<i>cis</i> - β -Guaiene	R _i , MS				1.2
1490		Valencene	R _i , MS			0.2	0.2
1491	1756	Biciclogermacrene	R _i , MS			0.4	0.7
1498		<i>epi</i> -Biciclosesquiphellandrene	R _i , MS		0.6	1.6	0.5
1503	1740	α -Muurolene	R _i , MS		0.3	0.2	
1506	1760	(E,E)- α -Farnesene	R _i , MS		0.9		
1510	1743	β -Bisabolene	R _i , MS		0.7		
1513	1709	Ledene	R _i , MS		0.3		
1515	1776	γ -Cadinene	R _i , MS	0.6	0.4		
1520		1- <i>endo</i> -Burbonanolo	R _i , MS			0.4	
1526	1773	δ -Cadinene	R _i , MS	4.2	2.9	2.0	2.9
1538	1799	Cadina-1,4-diene	R _i , MS				0.4
1541	1918	α -Calacorene	R _i , MS	1.8	0.6		0.3
1550	1942	β -Calacorene	R _i , MS	1.2			
1553	2076	<i>cis</i> - α -Copaen-8-olo	R _i , MS	0.7			

1554	1856	Germacrene B	R _i , MS	0.3			0.7
1565	2057	Ledolo	R _i , MS	0.7		1.2	
1577	2069	Germacrene D 4-ol	R _i , MS				2.7
1578	2150	Spatulenolo	R _i , MS	9.0			
1580	2008	Cariofillene ossido	R _i , MS, Co-GC	3.8	7.9	12.7	
1588	2098	Globulolo	R _i , MS			1.5	0.3
1591	2104	Viridiflorolo	R _i , MS	3.4	2.2	0.2	
1598	2108	Guaiolo	R _i , MS		1.0		
1605	2071	Umulene epossido II	R _i , MS		2.4		1.4
1606	2133	Cedrenolo	R _i , MS	0.5			0.1
1608	2098	β-Oplopenone	R _i , MS		0.4		
1635		Isospatulenolo	R _i , MS	2.5			
1640	2316	Cariofilladienolo I	R _i , MS		0.5	3.7	1.3
1642	2209	T-Muurolo	R _i , MS			1.0	
1645		Torreio	R _i , MS			0.1	7.6
1650	2258	β-Eudesmolo	R _i , MS	3.4			
1652	2255	α-Cadinolo	R _i , MS		1.0	0.6	4.5
1653	2252	α-Eudesmolo	R _i , MS	2.5			
1653		Ledene alcool	R _i , MS	0.7			
1664		Patchulolo	R _i , MS			0.4	
1669	2219	α-Bisabololo	R _i , MS, Co-GC	1.3			
1675		(Z)-α-Bisabolene epossido [#]	R _i , MS	1.6			
1677	2256	Cadalene	R _i , MS	3.4		0.2	1.1
1689		Isolongifolen-5-one	R _i , MS	0.3			
1691		Vulgarolo B	R _i , MS		0.1	1.6	
1698		cis(Z)-α-Bisabolene-epossido	R _i , MS				0.2
1723		Acido tetradecanoico metil estere	R _i , MS, Co-GC		0.1		
1762	2655	Benzil benzoato	R _i , MS, Co-GC		0.8		
1766	2287	Aristolone	R _i , MS	0.5			
1815		Esadecanale	R _i , MS	0.7			
1845	2131	Hesaidrofarnesilacetone	R _i , MS	1.8	2.6	1.5	0.6
1923	2814	Fenantrene	R _i , MS, Co-GC	1.5			
1929	2208	Acido esadecanoico metil estere	R _i , MS, Co-GC		1.9		
1950	2622	(Z)-Fitolo	R _i , MS		1.9		

1957	2931	Acido esadecanoico	R _i , MS, Co-GC	1.2	9.8		
1963		13- <i>epi</i> -Manoil ossido	R _i , MS		t		
2037	2388	Octadecanale	R _i , MS	0.9			
2048	2399	Kaurene	R _i , MS				0.6
2092		(Z)-9- acido ottadecenoico metil estere	R _i , MS, Co-GC	0.6			
2122	3157	(Z,Z)-9,12-acido ottadecadienoico	R _i , MS, Co-GC		1.9		
2300	2300	Tricosano	R _i , MS, Co-GC	0.5			
2400	2400	Tetracosano	R _i , MS, Co-GC	0.4			
2500	2500	Pentacosano	R _i , MS	1.8	0.7	0.8	
2700	2700	Eptacosano	R _i , MS	1.0	1.5	2.1	
2800	2800	Ottacosanp	R _i , MS		0.7		
2829		Squalene	R _i , MS, Co-GC	0.7			
2900	2900	Nonacosano	R _i , MS		1.9	2.6	
3100	3100	Entriacontan	R _i , MS		1.6	1.4	
		Monoterpeni idrocarburici		9.9	1.3	0.1	1.2
		Monoterpeni ossigenati		12.8	9.1	4.7	13.6
		Sesquiterpeni idrocarburici		24.6	39.0	26.7	32.7
		Sesquiterpeni ossigenati		30.9	15.5	23.4	23.1
		Fenoli		0.9	13.7	15.2	11.6
		Totale		92.1	91.7	90.0	93.5

^a :R_i: Indice di ritenzione su colonna HP-5; ^b :R_i: Indice di ritenzione su colonna HP Innowax

^c :R_i: = Indice di ritenzione identico alla bibliografia MS = Identificazione basata su confronto di spettri di massa; Co-GC = Tempo di ritenzione identico a quello di composti autentici; ^d: T = presente in tracce, meno dello 0.05 %.

6.3.5.d Analisi della vitalità cellulare degli oli essenziali

Parallelamente all'analisi fitochimica, è stato svolto uno studio di valutazione biologica del potenziale effetto antitumorale *in vitro*, su colture cellulari tumorali umane del colon, del polmone e del melanoma dei quattro oli essenziali del genere *Teucrium*.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio colorimetrico MTT (vedi paragrafo 3.6.1) basato sulla biotrasformazione del sale MTT, di colore giallo, in un composto, il formazano, di colore blu. Gli oli delle quattro specie medicinali di *Teucrium* sono stati testati nel range di concentrazione tra 1 e 300 µg/ml per 24, e 48 h di esposizione su tre linee cellulari tumorali umane, la linea CACO-2 adenocarcinoma del colon, la COR-L23 del carcinoma al polmone e la linea cellulare del melanoma C32. Gli effetti citotossici degli oli riportati in tabella 2, hanno mostrato che gli oli testati sono in grado di bloccare la proliferazione cellulare in modo concentrazione e tempo dipendente sulle linee tumorali. I valori di IC₅₀ calcolati hanno evidenziato un differente profilo antiproliferativo tra le specie; in particolare gli oli di *T. polium* ssp *capitatum* e *T. montbretii* ssp *heliotropiifolium* risultano essere più attivi sulle CACO-2, con un valore di IC₅₀ rispettivamente di 52.7 e 92.2 µg/ml. Gli oli di *T. polium* e *T. brevifolium* mostrano una selettiva citotossicità sulle cellule C32 (IC₅₀ di 91.2 µg/ml) e COR-L23 (IC₅₀ di 80.7 µg/ml), mentre l'olio di *T. flavum* risulta essere inattivo sulle cellule testate ad eccezione della linea COR-L23, sulla quale mostra una blanda attività (IC₅₀ di 104.2 µg/ml). I nostri risultati costituiscono una ulteriore conferma agli studi presenti in letteratura in cui è riportato l'effetto citotossico e citostatico su diverse linee cellulari tumorali umane come le U937 (leucemiche) e le SK-MEL-2 (di melanoma) sia dell'estratto etanolic²² che dei fenilpropanoidi estratti dal *T. polium*.¹⁷ Inoltre è stato suggerito che la frazione terpenica e gli oli essenziali di diverse specie di *Teucrium* siano in grado di promuovere il processo di morte cellulare⁹ ed i sesquiterpeni, i composti più rappresentativi del genere, sembrano essere i veri responsabili di questa azione²⁵.

Tabella 2 - Risultati dell'attività citotossica sulle linee cellulari tumorali dei 4 oli essenziali di *Teucrium*.

Essential oil	IC ₅₀ (µg/mL)		
	CACO-2	C32	COR-L23
<i>Teucrium flavum</i>	>200	>200	104.2 ± 2.1*
<i>Teucrium montbretii</i> ssp <i>heliotropifolium</i>	92.2 ± 2.1*	134.7 ± 2.1*	143.4 ± 2.1*
<i>Teucrium polium</i> ssp <i>capitatum</i>	52.7 ± 2.1*	91.2 ± 2.1*	103.9 ± 2.1*
<i>Teucrium brevifolium</i>	163.5 ± 2.1*	>200	80.7 ± 2.1*

Tempo di esposizione 48 h ± S.E.M. (n=3). CACO-2: adenocarcinoma del colon; C32: cellule di melanoma; COR-L23: carcinoma al polmone. Vinblastina (2 µg/ml) è stata usata come controllo positivo. * $p < 0.05$.

6.4 Genere *Salvia*

Il genere *Salvia* appartiene alla famiglia delle Lamiaceae, dell'ordine delle *Lamiales*, ed è composto da almeno 900 specie più decine di cultivar costituite da ibridi.²⁶ Si tratta di un genere composto di specie a ciclo annuale, biennale, perenne, a portamento suffruticoso, sino a raggiungere nei paesi d'origine le forme arbustive. Il fusto giovane ha sezione quadrangolare. Le foglie sono opposte e decussate, possono essere intere, dentate o crenate, lanceolatolineari, ovate o variamente divise. Le foglie dello stelo sono spesso diverse o più piccole di quelle basali. Le infiorescenze sono in verticillastri di due o più fiori in spighe o racemi (spicastro). Vi sono brattee membranose a volte più lunghe del calice e bratteole più piccole e colorate. Il calice, gamosepalo e persistente, può essere campanulato o tubulare, più o meno bilabiato, quasi sempre ricco di peli. Il labbro superiore è corto, tridentato, raramente intero, il labbro inferiore profondamente bidentato; i denti possono essere erbacei o spinulosi. La corolla, gamopetala e zigomorfa, è pentamera del tipo bilabiato, con le basi dei petali saldate in un tubo che si apre in due labbri: quello superiore, formato da due petali, concavo o spianato, quello inferiore trilobato, con il lobo centrale più grande. Il colore della corolla varia molto secondo la specie: dal bianco al giallo, all'arancio, al rosso, dal porpora, all'azzurro, al blu, al violetto, al viola in moltissime sfumature e a volte con macchiettature evidenti. L'Androceo è costituito da due stami fertili e due stami sterili, rudimentali o mancanti. Il Gineceo è bicarpellare con ovario supero diviso in quattro lobi fra mezzo ai quali è inserito lo stilo. Il frutto tetrachenio è del tipo schizocarpo: a maturità si disarticola in quattro acheni (tetrachenio) che rimangono nel fondo del calice. Le piante possono essere bianco-lanose, glandoloso-irsute o glandoloso-vischiose³.

la *Salvia officinalis* L., di cui possiamo trovare numerose testimonianze. Dai Romani veniva chiamata anche “Herba sacra”, a sottolinearne l’importanza e il largo impiego. Gli Egiziani utilizzavano la *Salvia* per imbalsamare i morti, ma aveva anche la reputazione di rendere le donne fertili. I Greci proibivano il suo impiego durante le competizioni sportive, poiché le sue proprietà euforizzanti ed eccitanti sembravano “dopare” gli atleti. La Scuola Salernitana (IX-XIX secolo) diceva: “Cur muriatur homo cui Salvia crescit in horto?” ed anche “Salvia salvatrix, natura conciliatrix”. La *Salvia* divenne molto popolare anche in Cina, nel XVIII secolo i mercanti cinesi potevano scambiare due cesti del loro miglior *Tè* per un cesto di *Salvia*. Nel sud della Francia un proverbio afferma che “Qui a de la Sauge dans son jardin, n’a pas besoin du médecin”. Infine un proverbio inglese recita così : “He that would live for aye, must eat Sage in may”. Come abbiamo visto, l’uso delle specie appartenenti al genere *Salvia* ha una lunga tradizione, al contrario, la loro coltivazione su larga scala ebbe inizio solo nel XX secolo. Ciò si può riscontrare nella storia della *Salvia sclarea* L.⁴. Nonostante questa specie fosse largamente diffusa nelle regioni meridionali dell’ex Unione Sovietica, essa non venne sfruttata per la produzione di olio fino al 1922. È stato riportato che per i successivi quattro anni la sua coltivazione crebbe fino ad occupare 9.500 ettari e la produzione di olio arrivò a fornirne 24 tonnellate. I primi tentativi di produzione su larga scala di questa stessa specie negli Stati Uniti possono essere datati verso la metà degli anni ’40; nella metà degli anni ’90 la Carolina del Nord divenne la maggior produttrice di olio di *Salvia sclarea* degli USA. Similmente in Europa, la coltivazione di tale specie cominciò solo nella seconda metà del XX secolo. Un esempio: sebbene la *Salvia sclarea* fosse stata introdotta in Bulgaria nel 1940 dalla Francia, la sua produzione su larga scala non fu avviata che 14 anni dopo vicino Sofia e intorno a Plovdiv. Un’altra importante specie, la *Salvia officinalis*, ha una storia molto simile, benché nei secoli passati crescesse in piccoli giardini in Europa la sua coltivazione ebbe inizio solo recentemente²⁴.

6.4.1 Le principali specie del genere *Salvia*

Le diverse specie di *Salvia* si ritrovano nelle Farmacopee di molti paesi in tutto il mondo. Le più conosciute ed utilizzate sono:

***Salvia officinalis* L.** - Presenta azione antispasmodica e colagogocoleretica; vari studi hanno dimostrato la sua efficacia nel migliorare i processi mnemonici e nel contrastare il deterioramento che caratterizza il morbo di Alzheimer. È stata dimostrata anche l'attività antiossidante, da sempre impiegata nell'alimentazione per conservare i cibi, dovuta ai diterpeni e all'acido rosmarinico, coadiuvata dall'azione antimicrobica. Oltre che come condimento eupeptico ed aromatizzante trova impiego in qualità di amaro-tonico e stimolante nelle turbe digestive; è efficace nel regolarizzare il flusso mestruale e nel calmare le reazioni dolorose, nonché nelle turbe della menopausa. I preparati di *Salvia*³ risultano, inoltre, efficaci per combattere l'eccessiva formazione di catarro nelle forme bronchiali. Viene impiegata come astringente ed antisettico nelle infiammazioni del cavo orofaringeo. L'olio essenziale riduce la sudorazione paralizzando le terminazioni nervose delle ghiandole sudoripare, tuttavia risulta neurotossico (azione convulsivante) se assunto per lungo periodo o ad alte dosi, per la presenza di tuione e canfora. Si trova segnalato anche che la *Salvia* può ridurre la lattazione, per cui è sconsigliata, a scopo cautelativo, durante l'allattamento²⁶⁻²⁹.

***Salvia bowleyana* Dunn** - È prevalentemente confinata in Cina, dove si può trovare nelle province centrali e sud-orientali. È molto simile alla *S. miltiorrhiza* Bunge e, in effetti, il suo nome cinese significa Miltiorrhiza del sud e viene utilizzata in medicina nella stessa maniera³.

***Salvia coccinea* P.J. Buch.** - In Messico i fiori vengono strofinati sulle guance come fard. In Sud America diverse piante vengono bollite in un gallone di acqua per dieci minuti e il decotto viene usato, caldo, per lavare le varici e per i coaguli di sangue.

***Salvia columbariae* Benth.** - È un'erba annuale originaria delle regioni sud-occidentali degli USA e del Messico settentrionale. Era un'importante pianta alimentare per le tribù native di questi territori, le quali credevano che una quantità di semi pari alla capienza di un cucchiaino potesse sostenere un membro della tribù per 24 ore durante una faticosa marcia. Veniva anche usata nella medicina popolare per il trattamento della diarrea³. I primi coloni spagnoli ricavarono da questa pianta uno dei migliori cataplasmi per la cura di ferite da sparo. Era anche usata per le infiammazioni degli occhi: i semi assorbono acqua e creano un rivestimento mucillaginoso e quando vengono posti sotto la palpebra

questo strato gelatinoso rimuove qualunque corpo estraneo, causa dell'irritazione, senza arrecare ulteriori danni.

***Salvia digitaloides* Diels** - Si trova nella Cina meridionale. La radice è usata in medicina, con le stesse finalità della *S. miltiorrhiza* Bge., ovvero per stimolare la circolazione, per trattare i disturbi femminili e per diminuire i gonfiori.

***Salvia divinorum* Vault** - Gli Indiani Mazatec (Mazatechi) del Messico usavano le foglie di questa pianta come base per preparare un infuso impiegato nelle cerimonie religiose in quanto in grado di provocare visioni e allucinazioni.



Fig. 6 - Infiorescenze di *Salvia sclarea* L. e *Salvia miltiorrhiza* Bge.



Fig. 7 - Infiorescenze di *Salvia lavandulaefolia* Vahl.

6.4.2 Proprietà farmacologiche ed impiego terapeutico.

Nei tempi passati alla salvia sono state attribuite tante, forse troppe, proprietà benefiche ritenendola addirittura utile per curare qualsiasi malattia. Oggigiorno, grazie alla ricerca medica, possiamo sapere quali sono le sue vere proprietà e quindi come usarla correttamente. Le radici ed i rizomi di *Salvia miltiorrhiza* (Tanshen) sono comunemente utilizzate in Cina per il trattamento di patologie cardiovascolari e cerebrovascolari²⁶. Nella medicina tradizionale cinese, si ritiene infatti, che la *Salvia miltiorrhiza* Bge. riduca la stasi ematica e favorisca il flusso sanguigno, stimoli il sanguinamento mestruale, diminuisca il dolore e l'infiammazione²⁷. Gli estratti della pianta vengono utilizzati nel trattamento di disturbi mestruali, angina pectoris e altre patologie del sistema circolatorio, artrite ed insonnia. L'uso tradizionale, è stato confermato da sperimentazioni in modelli animali, che hanno dimostrato che sia il Tanshen, sia i suoi principi attivi (tanshiononi) causano vasodilatazione delle arterie coronarie²⁹. La *Salvia miltiorrhiza* Bge. esercita un'attività simile all'antitrombina-III³⁰, per tale motivo gli estratti della pianta sono in grado di aumentare l'azione anticoagulante dell'eparina³¹. Studi *in vivo* hanno evidenziato che il Tanshen incrementa l'assorbimento, l'AUC ed l'emivita di eliminazione del warfarin, riducendone la clearance ed il volume di eliminazione³². Questa interazione può determinare un aumento dell'effetto anticoagulante del farmaco, pertanto l'uso della *Salvia miltiorrhiza* dovrebbe essere evitato nei pazienti trattati con warfarin.

Nel 2005 è stato condotto uno studio sulla capacità della *Salvia lavandulaefolia* Vahl. di migliorare il tono dell'umore e le capacità cognitive negli esseri umani³³. Lo studio scientifico, è stato effettuato su ventiquattro giovani volontari che, suddivisi in due gruppi, ai quali fu somministrato il placebo oppure l'olio essenziale di *Salvia lavandulaefolia*. Valutata attraverso test specifici, l'assunzione di olio essenziale di *S. lavandulaefolia* Vahl. migliorò, in rapporto al dosaggio, sia la memoria che il tono dell'umore dei partecipanti alla sperimentazione.

Gli effetti alluconigeni della *Salvia divinorum* Vahl, utilizzata dagli sciamani Mazatechi per curare diverse malattie, è stata ampiamente studiata fino a quando all'inizio degli anni ottanta le ricerche di Ortega e Valdés portarono all'isolazione di due nuove sostanze: la Salvinorina A e B, appartenenti alla classe dei neoclerodani³⁴. Venne ipotizzato che una delle nuove sostanze potesse essere l'enigmatico principio attivo, ma passarono altri dieci anni prima che qualcuno decise di sperimentare personalmente gli effetti della Salvinorina A. Nel 1993 Daniel Siebert sperimentò su di sé circa 1mg di

Salvinorina A, dimostrando che si trattava effettivamente della componente psicoattiva. La quantità assunta da Siebert risultò essere chiaramente eccessiva, fu stabilito che il dosaggio “soglia” necessario per percepire gli effetti psicoattivi era di circa 200mcg³⁷. Questo fa della Salvinorina A la sostanza psicoattiva naturale più potente conosciuta sino ad ora, in confronto alla psilocibina, che è approssimativamente cinquanta volte meno attiva a parità di peso, all’LSD (che però è un materiale semi-sintetico) è tra due e quattro volte più attivo. Il meccanismo di azione della Salvinorina A è tuttora completamente ignoto, trattandosi di una sostanza radicalmente diversa da qualsiasi altro materiale psicoattivo.

6.4.3 Principali metaboliti e oli essenziali del genere *Salvia*

Una delle classi di composti meglio caratterizzati nelle piante di *Salvia* include gli isoprenoidi, che mostrano attività antiossidanti, antibatterica, antifungina, antiflogistica e analgesica³⁶. I principi attivi (tanshinoni) isolati dalla *Salvia miltiorrhiza* Bge. determinano vasodilatazione delle arterie, in accordo con l’uso clinico, in Cina, della pianta nel trattamento dell’angina pectoris e dell’infarto del miocardio. Recentemente, è stato dimostrato che i diterpeni abietane e icetexane, isolati da diverse specie di *Salvia*, hanno attività antitumorale contro il cancro del colon e del polmone, ed il carcinoma della mammella^{37,38}. Inoltre, l’ortonaftochinone etiopinone, isolato dalle radici di alcune specie di *Salvia*, ha attività citotossica contro varie linee tumorali umane. Un composto strutturalmente simile e derivato dall’etiopinone (salvicina o saproortochinone) e alcuni analoghi hanno mostrato attività citotossica contro dodici linee tumorali solide, grazie alla loro abilità di indurre apoptosi³⁹. Questi composti anticarcinogenetici sono attualmente in fase di valutazione preclinica in Cina. Altri terpeni isolati dalla *S. miltiorrhiza* Bge., come il neo-tansinlattone, hanno mostrato effetti inibenti sulla crescita della linea cellulare del cancro al seno MCF-7 e attività antiossidante nelle cellule epatiche⁴⁰. Numerosi sono i lavori che riportano l’analisi e l’attività biologica di oli essenziali isolati da varie specie di *Salvia*. In uno studio condotto nel 2008 è riportata l’analisi di sette campioni di *Salvia miltiorrhiza* Bge. raccolti in diverse aree della Cina. L’analisi comparativa, quali e quantitativa, dei sette oli ottenuti ha evidenziato la presenza di 82 componenti, con una predominanza di β -cariofillene(12.2-31.7%), β -cariofillene ossido (1.4-11.6%), α -caryophyllene (4.8-10.6%), cadinadiene (7.4-29.3%), e acido esadecanoico (3.9-18.8%)⁴¹.

Un ulteriore lavoro sempre di questo anno riporta l'analisi GC-MS e la valutazione dell'attività antimicrobica, antiossidante e antivirale degli oli essenziali di *Salvia limbata* C.A. Mey. e *Salvia sclarea* L. Gli oli, testati su 35 ceppi batterici e 19 funghi, hanno mostrato un'azione inibente su tutti i funghi testati mentre non hanno mostrato alcuna azione antibatterica sui batteri saggiati⁴².

6.4.4 Materiali e metodi

6.4.4.a Caratteristiche dei campioni

Per il nostro studio le parti aeree di *S. bracteata* Banks et Sol. e *S. rubifolia* Boiss. sono state raccolte dalla Prof. N. Arnold in Libano tra le montagne della Békaa Valley, nel maggio 2007. I campioni sono stati depositati all'erbario presso il Botanischer Garten, dell'Università di Berlino.

6.4.4.b Isolamento dell'olio essenziale

Le parti aeree seccate delle piante, sono state sottoposte ad idrodistillazione per tre ore secondo la procedura indicata dalla Farmacopea Europea²⁰, usando un apparecchio tipo Clevenger (vedi paragrafo 3.1.3). Gli oli ottenuti sono di colore giallo, dall'odore piacevole. Gli oli sono stati anidrificati con solfato di sodio anidro e poi conservati al buio sotto N₂, a +4°C, pronti per le analisi GC e GC-MS. Le rese ottenute (w/w) sono state rispettivamente dello: 0.22% (*S. bracteata*) e 0.21 % (*S. rubifolia*).

6.4.4.c Risultati dell'analisi GC-MS

Numerosi studi in letteratura sulla caratterizzazione e l'impiego terapeutico di oli essenziali, da varie specie di *Salvia*⁴³ evidenziano che la qualità e la quantità dei singoli metaboliti varia a seconda di variazioni genetiche e dell'area geografica di origine delle specie.⁴⁴⁻⁴⁷. I risultati di questo studio sono riportati nella tabella 3 dove i composti identificati sono elencati secondo i loro indici di ritenzione su una colonna HP 5 MS (vedi paragrafo 3.2.3). L'analisi degli oli essenziali ha permesso di identificare: 75 composti per l'olio di *S. bracteata* (**Sb**), che costituiscono il 94.2% dell'olio totale; 56 per l'olio di *S. rubifolia* (**Sr**), che rappresentano il 95.7% dell'olio totale. Dall'analisi GC-MS è emerso che la frazione monoterpenica e sesquiterpenica è presente nell'olio **Sb** in concentrazione simile, rispettivamente del 33.4% e 37.1%. La frazione idrocarburica dei monoterpeni è costituita soprattutto da β -pinene (2.3%) e γ -terpinene (2.2%), mentre la frazione ossigenata è rappresentata dal pulegone (3.9%), il terpinen-4-olo (3.8%) e dalla canfora (2.1%). I maggiori costituenti tra i sesquiterpeni nell'olio **Sb** sono il cariofillene ossido (16.6%), il β -cariofillene (4.1%), l' α -copaene (3.4%), l' α -cubebene (2.8%) e il δ -cadinene (2.1%). La frazione fenolica (5.3%), invece è costituita soprattutto da carvacrolo (3.1%).

Confrontando i dati della nostra analisi con precedenti risultati in letteratura, si evince che esistono differenze sulla qualità dei metaboliti dell'olio di *S. bracteata* libanese e quello turco⁴³. Nonostante i composti più abbondanti siano gli stessi, la quantità dei metaboliti nell'olio turco è nettamente maggiore, con percentuali del 34.0% per il cariofillene ossido, del 11.3% per la canfora e del 6.4% per il cariofillene. Al contrario il pulegone, il terpinen-4-olo, il farnesil acetone, il γ -terpinene ed il *p*-cimene, presenti nell'olio **Sb** in buona concentrazione risultano totalmente assenti nell'olio turco, come del resto anche il carvacrolo (3.1%) che rappresenta il componente predominante della frazione fenolica nel nostro olio è presente in una percentuale molto bassa nell'olio turco (0.4%). Il timolo (6.6%), il componente più abbondante della frazione fenolica, presente nell'olio turco è l'unico derivato dell'idrossilazione enzimatica del *p*-cimene nei derivati fenolici. Le differenze evidenziate sia nella qualità che nella quantità dei singoli metaboliti, potrebbero essere dovute a variazioni genetiche e all'area geografica di origine delle specie, come già evidenziato in letteratura.⁴³⁻⁴⁷

Notevoli differenze sono anche state riscontrate con oli ottenuti dalle parti aeree di vari campioni di *S. bracteata* raccolti in Iran. In questo lavoro, le percentuali dei maggiori costituenti degli oli, il β -cariofillene (10.7-41.6%), il γ -muurolene (27.1-36.3%), il biciclogermacrene (1.8-9.9%), il cariofillene ossido (1.5-9.6%) e l' α -umulene (1.1-9.4%), sono diverse da quelle da noi descritte in tabella 3 per l'olio **Sb**.⁴⁷ L'olio **Sr** è costituito soprattutto da sesquiterpeni tra cui predominano il γ -muurolene (11.8%), il γ -cadinene (5.5%) e l' α -copaene (4.5 %). I sesquiterpeni ossigenati (8.6 %) sono rappresentati soprattutto dall'1-*epi*-cubenolo (3.7 %) e dall'umulene epossido II (1.8 %). La porzione monoterpica che ammonta al 31.8 % dell'olio, comprende soprattutto monoterpini ossigenati (18.8%); tra cui il *trans*-pinocarvil acetato (5.5 %) e l' α -thujone (5.1 %) come maggiori esponenti di questa classe. L' α -pinene (7.1 %) ed il *p*-cimene (3.4 %) rappresentano i costituenti più abbondanti dei monoterpini idrocarburi.

Tabella 3 - Composizione chimica degli oli essenziali di *Sb* e *Sr* raccolte in Libano

Ri^a	Ri^b	Composti	Identificazione^c	Sb%^d	Sr%^d
922		3-Metilcicloesano	I, MS	0.3	
925		Triciclene	Ri, MS		0.8
929	1035	α -Tuiene	I, MS	0.8	
938	1076	α-Pinene	Ri, MS, Co-GC	1.7	7.1
952		Camfene	Ri, MS, Co-GC		0.7
973	1132	Sabinene	Ri, MS	1.2	0.8
980	1118	β-Pinene	I, Co-GC, MS	2.3	
993	1174	Mircene	I, MS	0.6	
1013	1188	α -Terpinene	I, MS	0.5	
1013	1159	Δ^3 -Carene	I, MS	0.3	
1025	1280	p-Cimene	I, MS	1.3	3.4
1029		Limonene	Ri, MS, Co-GC		0.2
1035	1213	1,8-Cineolo	Ri, MS, Co-GC		1.0
1048	1663	Fenilacetaldeide	I, Co-GC, MS	1.9	
1057	1255	γ-Terpinene	I, Co-GC, MS	2.2	
1058	1556	cis-Sabinene idrato	I, MS	0.9	
1093	1474	trans-Sabinene idrato	I, MS	1.6	
1106	1430	α-Tujone	Ri, MS		5.1
1115	1449	β -Tujone	Ri, MS		1.4
1117		trans-p-Ment-2-en-1-olo	I, MS	t	
1129	1638	cis-p-Ment-2-en-1-olo	I, MS	0.8	
1132	1926	Feniletil alcol	I, MS	0.7	
1136	1664	trans-Pinocarveolo	Ri, MS	1.5	0.6
1138	1475	Mentone	I, MS	0.9	
1143	1532	Camfora	Ri, MS, Co	2.1	1.9
1155	1503	Isomentone	I, MS	0.6	
1157	1596	neo-Mentolo	I, MS	0.8	
1165		Pinocarvone	Ri, MS		0.1
1167	1719	Borneolp	I, Co-GC, MS	1.2	
1175	1611	4-Terpineolo	Ri, MS, Co-GC	3.8	2.5
1179	1763	Nafalene	I, Co-GC, MS	0.5	
1182	1864	p-Cimen-8-olo	I, MS	0.3	
1183	1757	cis-Piperitolo	I, MS	0.6	

1189	1706	α -Terpineolo	I, Co-GC, MS	1.4	
1196		1-Dodecene	I, Co-GC, MS	0.5	
1196	1804	Mirtenolo	Ri, MS	1.1	0.7
1204	1506	Decanale	I, MS	0.2	
1215	1772	Citronellolo	I, MS	0.4	
1233	1662	Pulegone	I, MS	3.9	
1290		Indolo	I, MS	0.2	
1293	2198	Timolo	I, Co-GC, MS	0.4	
1297	1661	trans-Pinocarvil acetato	Ri, MS		5.5
1297	2240	Carvacrolo	Ri, MS, Co-GC	3.1	1.3
1312	2180	4-Vinil guaiacolo	I, MS	1.0	
1331		Piperitenone	Ri, MS		t
1340		δ -Elemene	Ri, MS		t
1343		Piperitone	I, MS	0.6	
1351	1466	α -Cubebene	Ri, MS	2.8	t
1353	2186	Eugenolo	Ri, MS, Co-GC	0.9	1.6
1361	1549	β -Cubebene	I, MS	0.3	3.1
1371		Ilangene	Ri, MS		t
1377	1497	α-Copaene	Ri, MS	3.4	4.5
1384	1535	β -Burbonene	Ri, MS		0.6
1414	1612	(E)-Cariofillene	Ri, MS, Co-GC	4.1	1.1
1432	1572	α -trans-Bergamotene	I, MS	0.3	
1437	1628	Aromadendrene	I, MS	0.5	
1451	1868	(E)-Geranilacetone	I, MS	0.4	
1452	1673	(E)- β -Farnesene	I, MS	t	
1455	1689	α -umulene	Ri, MS	0.4	2.3
1463	1661	allo-Aromadendrene	Ri, MS	0.3	1.2
1474		γ -Gurjunene	Ri, MS		0.1
1477	1704	γ-Muurolene	Ri, MS	0.5	11.8
1483	1784	ar-Curcumene	I, MS	0.2	
1485		Epizonarene	I, MS	t	
1485	1815	Tridecan-2-one	I, MS	0.6	
1491	1678	cis-β-Guaiene	RI, MS		3.0
1500	1734	α-Muurolene	Ri, MS		3.2
1514	1776	γ-Cadinene	Ri, MS	0.3	5.5
1519	1853	1-S-cis-Calamenene	I, MS	1.1	1.2

1522	1941	α -Calacorene	Ri, MS	0.4	1.1
1525		α -Cadinene	Ri, MS		0.6
1526	1773	δ-Cadinene	I, MS	2.1	
1534		trans-Calamenene	Ri, MS		1.5
1550		β -Calacorene	Ri, MS		0.6
1566	2050	(E)-Nerolidolo	I, MS	0.8	
1573		Palustrolo	I, MS	0.1	
1575	2150	Spatulenolo	Ri, MS	t	0.5
1577	2008	Cariofillene ossido	I, MS	16.6	
1585	2098	Globulolo	I, MS	0.7	
1605	2071	Umulene epossido II	Ri, MS		1.8
1625	2088	1-epi-Cubenolo	I, MS	0.6	3.7
1641	2255	α -Cadinolo	Ri, MS	t	0.7
1642	2187	T-cadinolo	Ri, MS		0.7
1642	2209	T-Muurololo	I, MS	0.5	
1644	2080	Cubenolo	Ri, MS	0.8	1.2
1650	2257	β -Eudesmolo	I, MS	0.3	
1677	2256	Cadalene	Ri, MS		2.4
1694	2031	Pentadecan-2-one	I, MS	0.6	
1700	1700	Eptadecano	I, Co-GC, MS	0.9	
1800	1800	Octadecano	I, Co-GC, MS	0.4	
1845	2131	Esaidrofarnesil acetone	I, MS	2.6	0.8
1919	2386	Farnesil acetone	I, MS	2.9	
1950	2622	(Z)-Fitolo	RI, MS	1.5	1.2
1957	2931	Acido esadecanoico	Ri, MS	1.7	0.2
2000	2000	Eicosano	I, Co-GC, MS	0.3	
2100	2100	Eneicosano	Ri, MS, Co-GC		1.2
2300	2300	Tricosano	Ri, MS, Co-GC		1.1
2400	2400	Tetracosano	Ri, MS, Co-GC	0.5	t
2500	2500	Pentacosano	Ri, MS, Co-GC		0.9
2600		Esacosano	Ri, MS, Co-GC		t
2700	2700	Eptacosano	Ri, MS, Co-GC	0.7	1.5
2800		Ottacosano	Ri, MS, Co-GC		t
2900	2900	Nonacosano	Ri, MS	0.9	1.1
3000		Triacontano	Ri, MS		t
3100	3100	Entriacontano	Ri, MS		0.5

3200	Dotriacontano	Ri, MS		0.1
	Monoterpeni idrocarburici		10.9	13.0
	Monoterpeni ossigenati		22.5	18.8
	Sesquiterpeni idrocarburici		16.7	41.4
	Sesquiterpeni ossigenati		20.4	8.6
	Fenoli		5.4	2.9
	Composti carbonilici		9.5	
	Altri		8.8	11.0
	Totale		94.2	95.7

^a :R_i: Indice di ritenzione su colonna HP-5; ^b :R_i: Indice di ritenzione su colonna HP Innowax

^c :R_i: = Indice di ritenzione identico alla bibliografia MS = Identificatione basata su confronto di spettri di massa; Co-GC = Tempo di ritenzione identico a quello di composti autentici; ^d: T = presente in tracce, meno dello 0.05 %.

6.4.4.d Analisi della vitalità cellulare

La *S. bracteata* e la *S. rubifolia* sono utilizzate frequentemente nella medicina tradizionale del Libano⁴⁸ e la citotossicità degli oli essenziali di diverse specie di *Salvia* sulle cellule di melanoma è stata recentemente dimostrata.^{49,50} Nel tentativo di effettuare un'analisi fitochimica completa, è stato svolto uno studio di valutazione biologica del potenziale effetto antitumorale *in vitro*, su colture cellulari M14 di melanoma umano dei due oli essenziali del genere *Salvia*. La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio colorimetrico MTT (vedi paragrafo 3.6.1) basato sulla biotrasformazione del sale MTT, di colore giallo, in un composto, il formazano, di colore blu.

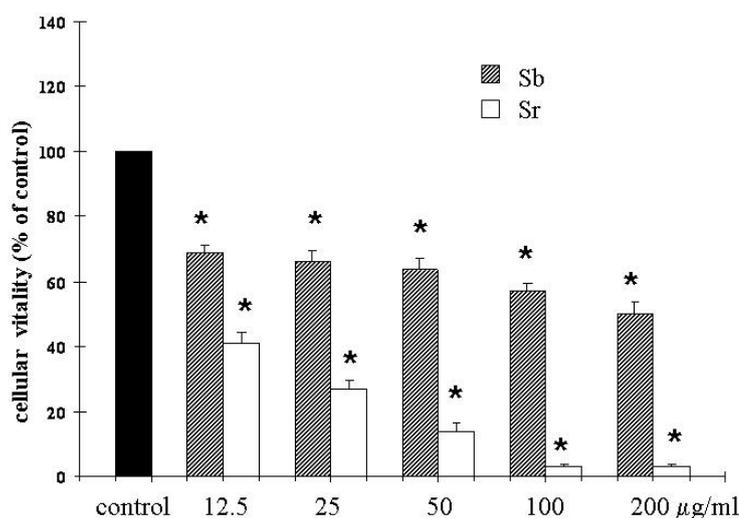


Fig. 8- Analisi della vitalità delle cellule M14 dopo trattamento con gli oli essenziali di *S. bracteata* (*Sb*) e *S. rubifolia* (*Sr*) a differenti concentrazioni (12.5-200 µg/ml) per 72 ore. I valori sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti, * ($p < 0.001$).

I risultati, riportati nel grafico, mostrano che gli oli delle due specie di *Salvia* testati nel range di concentrazione tra 12.5 e 200 µg/ml per 72 h di esposizione inibiscono la crescita cellulare, in particolare l'olio *Sr* risultata essere più citotossico. Inoltre è stato valutato il rilascio dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) nel medium (vedi paragrafo 3.6.2), come indicatore di danno aspecifico a livello cellulare. In questo modo è stato possibile identificare la concentrazione di oli utilizzabile esente da tossicità. Alle

concentrazioni di 12.5 e 25 µg/ml non si sono verificati effetti negativi sulla vitalità cellulare; solo utilizzando alte dosi di oli essenziale la vitalità/proliferazione cellulare è apparsa estremamente compromessa, confermando la tossicità dei componenti dell'olio ad alte dosi (tabella 4).

Tabella 4 - Rilascio dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) nelle cellule M14 trattate con diverse concentrazioni degli oli (*Sb*) e (*Sr*), espresso come percentuale di LDH rilasciato nel medium rispetto al totale di LDH.

<i>Trattamento</i>	<i>% LDH rilasciato</i>
Controllo	7 ± 0.9
<i>Sb</i>	
12.5 µg/ml	8.2 ± 0.8
25 µg/ml	9.7 ± 0.6
50 µg/ml	16.7 ± 0.7*
100 µg/ml	95.8 ± 1.9*
<i>Sr</i>	
12.5 µg/ml	7.7 ± 0.5
25 µg/ml	8.9 ± 0.6
50 µg/ml	20.6 ± 0.5*
100 µg/ml	43.5 ± 0.5*

Per la diretta visualizzazione del danno al DNA in singole cellule è stato eseguito il Comet assay (vedi paragrafo 3.6.3). La quantificazione del saggio COMET nelle nostre condizioni sperimentali espresso come TDNA e TMOM è riportato in tabella 5. Il saggio ha dimostrato che gli oli essenziali solo alle concentrazioni di 12.5-25 µg/ml, dopo 72 h di esposizione, determinano un evidente danno del DNA associato ad un drastico aumento sia dei valori di TDNA che di quelli dei TMOM. Al contrario nelle

cellule esposte per 72 h a concentrazioni di 50 e 100 µg/ml non si evidenziano significati aumenti dei valori di TDNA e di TMOM associati ad un processo apoptotico.

Tabella 5 - Comet assay di DNA genomico di cellule tumorali trattate con diverse concentrazioni di oli da *Salvia bracteata* (Sb) e *Salvia rubifolia* (Sr).

<i>Trattamento</i>	TDNA ^a	TMOM ^b
Controllo	38 ± 2.0	178 ± 8.2
Sb		
12.5 µg/ml	167 ± 11*	1400 ± 23*
25 µg/ml	174 ± 12*	1654 ± 34*
50 µg/ml	61 ± 1.5*	399 ± 17*
100 µg/ml	88 ± 8.2*	506 ± 10*
Sr		
12.5 µg/ml	190 ± 16*	1704 ± 33*
25 µg/ml	200 ± 15*	1925 ± 38*
50 µg/ml	91 ± 6.5*	506 ± 25*
100 µg/ml	97 ± 4.5*	503 ± 17*

Bibliografia

1. Senatore F 2000. *Oli Essenziali: Provenienza, estrazione ed analisi Chimica*, EMSI; Roma.
2. Edris AE (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Reserach*, 21, 308-323.
3. Enciclopedia Motta, Milano (1962).
4. Benigni R, Capra C e Cattorini PE *Piante Medicinali*. Inverni Della Beffa; Milano, (1962).
5. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Webb DA. *Flora Europaea*, Cambridge University Press, Cambridge, 1976; 3, 129-135.
6. Brown D. *Encyclopedia of Herbs and Their uses*. Dorling Kindersley: London, 1995; 210, 361.
7. Barrachina MD, Bello R, Martinez-Cuesta MA, Esplugues J, Primo-Yufero E, (1995). Anti-inflammatory activity and effects on isolated smooth muscle of extracts from different *Teucrium* Species. *Phytotherapy Research* 9, 368-71.
8. Bellomaria B, Arnold N, Valentini G (1998). Essential oil of *Teucrium flavum* subsp. *hellenicum* from Greece. *Journal of Essential Oil Research* 10, 131-3.
9. Ulubelen A, Topcu G, Sonmez U (2000). Chemical and biological evaluation of genus *Teucrium*. *Studies in Natural Products Chemistry*, (Bioactive Natural Products (Part D)), 591-648.
10. Özkan G, Kuleaşan H, Çelik S, Göktürk RS, Ünal O (2007). Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control* 18, 509-12.
11. Panovska TK, Kulevanova S, Gjorgoski I, Bogdanova M, Petrushevska G (2007). Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Acta Pharmaceutics* 57, 241-248.
12. Piozzi F, Bruno M, Rosselli S, Maggio A (2005). Advances on the chemistry of furano-diterpenoids from *Teucrium* genus. *Heterocycles* 65, 1221-34.
13. de la Torre MC, Rodriguez B, Bruno M, Fazio C, Baser KHC, Duman H (1997). Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium sandrasicum*. *Phytochemistry* 45(8), 1653-62.

14. Bruno M, Bondi ML, Rosselli S, Piozzi F, Al-Hillo MRY, Lamara K, Ladjel S (2000). Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium maghrebicum*. *J Nat Prod* 63(7), 1029-31.
15. Bruno M, Maggio AM, Piozzi F, Puech S, Rosselli S, Simmonds MSJ (2003). Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *polium* and their antifeedant activity. *Biochem Syst Ecol* 31, 1051-6.
16. Valant-Vetschera KM, Roitman JN, Wollenweber E (2003). Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae. *Biochem Syst Ecol* 31, 1279-89.
17. Saracoglu I, Calis I, Inoue M, Ogihara Y (1997). Selective cytotoxic and cytostatic activity of some phenylpropanoid glycosides. *Fitoterapia* 68, 434-8.
18. Giamperi L, Bucchini A, Fraternali D, Cara P, Ricci D, Epifano F, Genovese S, Curini M (2008). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium massiliense* L. *Journal of Essential Oil Research* 20(5), 446-9.
19. Ben Sghaier M, Chraief I, Skandrani I, Bouhlel I, Boubaker J, Kilani S, Neffati, A, Mahmoud A, Hammami M, Chekir-Ghedira L, Ghedira K (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Teucrium ramosissimum* (Lamiaceae). *Chem Biodiversity* 4(7), 1480-86.
20. European Pharmacopoeia 5th edition (2004) Council of Europe: *Strasbourg Cedex*, France 2.8.12, 217-218
21. Stanic G, Petricic J, Blazevic N, Plazibat M (1993). Essential oil of *Teucrium flavum* L. from Croatia. *Journal of Essential Oil Research*, 5, 625-7.
22. Baher ZF, Mirza M (2003). Volatile constituents of *Teucrium flavum* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 106-7.
23. Kovacevic NN, Lakusic BS, Ristic MS (2001). Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 163-65.
24. Nematollahi-Mahani SN, Rezazadeh-Kermani M, Mehrabani M, Nakhaee N 2007. Cytotoxic Effects of *Teucrium polium* on Some Established Cell Lines. *Pharm Biol* 45, 295-98.
25. Sylvestre M, Pichette A, Lavoie S, Longtin A, Legault J (2007). Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. *Phytother Res* 21, 536-40.

26. Gong X, Sucher NJ (1999). Stroke therapy in traditional Chinese medicine (TCM): prospects for drug discovery and development. *Trends Pharmacol Sci*; 20; 191-6.
27. Tang W, Eisenbrand G (1992). Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. Berlin: Springer-Verlag 891-902.
28. Lei XL, Chiou GC (1986). Cardiovascular pharmacology of *Panax notoginseng* (Burk) FH Chen and *Salvia miltiorrhiza*. *Am J Chin Med* 14; 145-152.
29. Ai CB, Li LN (1992). Salvianolic acids D and E: two new diposides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med* 58, 197-9.
30. Wang D, Girard TJ, Kasten TP, LaChance RM, Miller-Wideman MA, Durley RC (1998). Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids towards soluble tissue factor-factor VIIa complex. *J Nat Prod* 61; 1352-55
31. Zhang FC, Zheng LJ (1991). Effects of different administration of *Salvia miltiorrhiza* and heparin on antithrombin IIIAg, antithrombin III: A and alpha 2-macroglobulin in patients with cor pulmonale [Chinese]. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* 11; 589-91.
32. Chan TY (2001). Interaction between warfarin and danshen (*Salvia miltiorrhiza*). *Ann Pharmacother* 35, 501-4.
33. Tildesley NTJ, Kennedy DO, Perry EK, Ballard CG, Wesnes KA, Scholey AB (2005). Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiology & behavior* 83(5), 699-709.
34. Siebert D (1994). *Salvia divinorum* and Salvinorin A: New Pharmacologic Findings. *Journal of Ethnopharmacology* 43, 53-6
35. Valdes LJ (1994) *Salvia divinorum* and the Unique Diterpene Hallucinogen, Salvinorin (Divinorin) A. *Journal of Psychoactive Drugs* 26, 277-83
36. Wu WL, Chang WL, Chen CF (1991) Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines. *Am J Chin Med* 14, 207-16
37. Ryu SY, Lee CO, Choi SU (1997) In vitro cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med* 63, 339-42
38. Liu J, Shen HM, Ong CN (2000) *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in hepatoma HepG(2) cells. *Cancer Lett* 153, 85-93

39. Wang X, Nakagawa-Goto K, Bastow KF, Don MJ, Lin YL, Wu TS, Lee KH (2006). Antitumor agents. 254. Synthesis and biological evaluation of novel neo-tanshinlactone analogues as potent anti-breast cancer agents. *J Med Chem* 49, 5631-34
40. Wang X, Morris-Natsuke SL, Lee KH (2007) New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med Res Rev* 27(1), 133-48
41. Liang Q, Liang ZS Wang JR, Xu WH (2009). Essential oil composition of *Salvia miltiorrhiza* flower. *Food Chem* 113(2), 592-4.
42. Ogutcu H, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Serkedjieva J, Daferera D, Sahin F, Baris O, Gulluce M (2008). Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C.A.Mey. and *Salvia sclarea* L. *Turkish Journal of Biology* 32(3), 181-92.
43. Ozen HC, Toker Z, Ertekin AS, (2004). Essential oil composition of two *Salvia* species from Turkey. *AFS, Advances in Food Sciences* 26, 32-34.
44. Formisano C, Senatore F, Arnold NA, Piozzi F, Rosselli S (2007). GC and GC/MS analysis of the essential oil of *Salvia hierosolymitana* Boiss. growing wild in Lebanon. *Nat Prod Comm* 2, 181-4.
45. Raal A, Orav A, Arak E, (2007). Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis* 21, 406-11.
46. Amiri H. (2007). Quantative and qualitative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages. *Daru, Journal of Faculty of Pharmacy* 15, 79-82.
47. Sefidkon F, Hooshidary F, Jamzad Z, (2007). Chemical variation in the essential oil of *Salvia bracteata* Banks & Soland from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 10, 265-72.
48. Amini A. (1997). Illustrated Dictionary of Therapeutic Plants and their Traditional Usage in Kurdistan. Khoramabad: Taqbostan Publication.
49. Lee D, Lee S, Noh J, Hong S (1999). Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I from medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biosc Biotech Biochem* 63, 2236-9.

50. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F, (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer research* 27, 3293-9.