

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



FACOLTÀ DI AGRARIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO, DELLA PIANTA, DELL'AMBIENTE E DELLE PRODUZIONI
ANIMALI**

DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

XXV CICLO

**Fitotossine di *Inula viscosa* per il controllo delle piante
parassite**

RELATORE:

PROF. ANTONIO EVIDENTE

CORRELATORE

DOTT.SSA ANNA ANDOLFI

CANDIDATA: FABIANA AVOLIO

2010-2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 4
1.1 Le <i>Orobanche</i>	pag. 6
1.1.1 <i>Diffusione</i>	pag. 6
1.1.2 <i>Fasi di sviluppo</i>	pag. 7
1.1.3 <i>Gli strigolattoni</i>	pag. 8
1.2 La <i>Cuscuta</i>	pag. 9
1.2.1 <i>Diffusione</i>	pag. 9
1.2.2 <i>Fasi di sviluppo</i>	pag. 10
1.3 Metodi di controllo delle piante parassite	pag. 11
1.4 L' <i>Inula viscosa</i>	pag. 17
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 20
 	pag. 21
3 MATERIALI E METODI	pag. 21
3.1 Procedure sperimentali generali	pag. 22
3.2 Pianta di <i>Inula viscosa</i>	pag. 23
3.3 Estrazione e purificazione delle Inuloxine (A-D) e dell'acido- α -costico	pag. 23
3.4 Inuloxina A (1)	pag. 23
3.5 Inuloxina B (2)	pag. 24
3.6 Inuloxina C (3)	pag. 24
3.7 Inuloxina D (4)	pag. 24
3.8 Acido- α -costico (9)	pag. 24
3.9 Reazione dell'inuloxina A con il diazometano (5)	pag. 25
3.10 5- <i>O</i> -acetil-inuloxina C (6)	pag. 25
3.11 (S)- α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) dell'inuloxina D (7)	pag. 26
3.12 (R)- α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) dell'inuloxina D (8)	pag. 26
3.13 Saggi biologici su <i>Cuscuta campestris</i> e <i>Orobanche crenata</i>	pag. 27
3.13.1 Saggi di germinazione dei semi di <i>Cuscuta campestris</i>	pag. 27
3.13.2 Saggi di germinazione dei semi di <i>Orobanche crenata</i>	pag. 28
3.13.3 Analisi statistica	pag. 28
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 29
4.1 Determinazione della struttura dell'inuloxina A (1)	pag. 30
4.2 Determinazione della struttura dell'inuloxina B (2)	pag. 34
4.3 Determinazione della struttura dell'inuloxina C (3)	pag. 35
4.4 Determinazione della struttura dell'inuloxina D (4)	pag. 38
4.5 Identificazione dell'acido- α -costico (9)	pag. 40

4.6 Attività erbicida su <i>Cuscuta campestris</i> delle inuloxine A-D dei loro derivati e dell'acido- α -costico	pag. 42 pag. 42
4.7 Attività erbicida su <i>Orobanche crenata</i> delle inuloxine A-D dei loro derivati e dell'acido- α -costico	
5. CONCLUSIONI	pag. 44
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 46

1. INTRODUZIONE

In natura ci sono numerose interazioni tra gli esseri viventi, in alcune sono favorite entrambe le specie interagenti, ma in molti casi una delle due specie può subire gravi danni e l'altra ne trae benefici. Questo tipo di interazione denominata parassitismo causa notevoli perdite alle colture.

Con il termine piante parassite si intendono piante che non rivestendo alcuna funzione utile per l'uomo, vanno a danneggiare le produzioni agricole alterandone il rendimento. Tali piante sono incapaci di sintetizzare dagli elementi minerali e nutritivi materiali sufficienti per la loro crescita sopperiscono a questa deficienza fisiologica utilizzando le sostanze elaborate dalle piante ospiti, che di conseguenza manifestano generalmente un crescita ridotta. Il metabolismo di tali specie dipende del tutto o in parte da un altro organismo vivente, detto ospite, con il quale sono associati più o meno intimamente e sul quale hanno effetti dannosi. Nel parassitismo si realizza una condizione di simbiosi disarmonica, in quanto l'organismo parassita altera la biologia dell'ospite spesso ne determina la morte.

Le piante parassite si dividono in oloparassite ed emiparassite. Le prime essendo sprovviste di clorofilla dipendono totalmente dalla pianta ospite, dalla quale assumono tutte le sostanze nutritive. Le emiparassite, sebbene provviste di clorofilla, necessitano di determinate sostanze, che sottraggono al loro ospite. Per tali motivi le piante parassite sono provviste di austori, radici modificate, che penetrando a varie profondità nel corpo dell'ospite stabiliscono contatti con i tessuti vascolari. Molto spesso si osserva una elevata specificità d'ospite, mentre altre specie risultano polifaghe.

Attualmente si conoscono circa 3500 specie di piante parassite (Rispaill *et al.*, 2007) raggruppate in 20 famiglie e che rappresentano approssimativamente l'1% delle piante superiori. Tuttavia

non tutte procurano danni alle colture, infatti tra queste solo cinque famiglie comprendono specie che recano gravi problemi all'agricoltura. Queste sono:

- Scrophulariaceae : *Striga*, *Rhinanthus*, *Alectra*, *Parentucellia*, *Melampyrum*
- Orobanchaceae: *Orobanche*, *Cistanche*, *Phelypaea*
- Cuscutaceae: *Cuscuta*
- Viscaceae: *Viscum*, *Phoradendron*, *Arceutobium*
- Loranthaceae: *Dendrophoe*, *Tapinanthus*, *Amyema*

Tra queste, le specie appartenenti ai generi *Striga*, *Orobanche* e *Cuscuta* sono le più diffuse nelle regioni del Mediterraneo e del continente africano (Diaz 2009).

1.1 Le *Orobanche*

1.1.1 Diffusione

Le *Orobanche* e le *Phelipanche*, appartenenti alla famiglia delle *Orobanchaceae*, sono piante oloparassite che hanno perso la loro autotrofia (**Fig. 1**). Questo genere comprende circa 170 specie distribuite essenzialmente nell'emisfero settentrionale del globo (Schneeweiss *et al.*, 2004) e ottengono le loro risorse inorganiche ed organiche attaccando le radici di specie vegetali soprattutto nell'ecosistema selvatico. Molte specie hanno una specificità molto ristretta rispetto all'ospite. Per esempio le specie come *O. densiflora* Salzm. ex Reut., *O. gracilis* e *O. hederæ* Duby parassitano poche specie selvatiche in natura. Mentre specie come *O. aegyptiaca* (Pers.) (syn. *Phelipanche aegyptiaca*), *O. crenata* Forsk., *O. minor* Sm e *O. ramosa* (L.) Pomel (syn. *P. ramosa*) danno luogo ad un fenomeno parassitario molto più ampio (Sauerborn *et al.*, 1991; Parker 1994).

Tra queste *O. crenata*, *O. ramosa* e *O. aegyptiaca* sono particolarmente diffuse nei paesi dell'area del Mediterraneo, dell'Africa Orientale e del Medio Oriente (Abang *et al.*, 2007) interessando colture di importanza strategica quali le leguminose (fava, lenticchia, cece, pisello ecc.), le solanacee (pomodoro, patata, tabacco ecc.), specie orticole e il girasole (Parker 2009).

La produzione può subire perdite comprese tra il 5 ed il 100%. Tale variabilità è legata a diversi fattori quali: la suscettibilità dell'ospite, il livello di infestazione e le condizioni ambientali. Tra le varie specie *O. crenata* è sicuramente la più dannosa infestando colture di leguminose usate sia per alimentazione umana che degli animali da allevamento (Parker 2009).

Orobanche ramosa, particolarmente diffusa in Italia, è una parassita di specie vegetali appartenenti alla famiglia delle *Solanaceae* (principalmente patata, pomodoro e tabacco) e specie come la canapa e la colza (Parker e Riches 1993; Schneeweiss 2009). Nel corso degli anni, *O.*

ramosa ha determinato danni ingenti soprattutto alla produzione di solanacee nel bacino del Mediterraneo. In Grecia, nel 1986, è stata registrata una perdita media del 25% della produzione di pomodoro dovuta alle sue infestazioni (Parker 1994). Attacchi di *O. ramosa* sono stati segnalati anche in paesi non situati nel bacino del Mediterraneo, come ad esempio Cuba, Cile, Nepal, USA e Australia. (Parker 1993; Khatri *et al.*, 2002; Panetta e Lawes, 2007; Musselman e Bolin, 2008).

1.1.2 Fasi di sviluppo

Il principale fattore legato alla grande diffusione delle Orobanche è la capacità di produrre un'elevata quantità di piccolissimi semi, fino a 500.000 per pianta, che rimangono vitali anche per alcuni decenni nei terreni, germinando solo in presenza di determinati metaboliti presenti negli essudati radicali delle piante ospiti (Joel *et al.*, 1995, 2007). I terreni risultano pertanto contaminati e inadatti alla coltivazione delle specie ospiti. I semi germinano dopo un periodo di pre incubazione (Fase I, **Fig. 2**) formando una radichetta che cresce solo pochi millimetri (Fase II, **Fig. 2**) per raggiungere una radice ospitante entro pochi giorni prima di esaurire le risorse del suo piccolo seme. In caso di contatto con la radice dell'ospite (Fase III, **Fig. 2**), la radichetta sviluppa uno speciale organo, *haustorium*, che stabilisce le connessioni con il sistema vascolare dell'ospite (Fase IV, **Fig. 2**). Tramite questa connessione il parassita assume i nutrienti dall'ospite (Fase V, **Fig. 2**). I tubercoli parassitari crescono sottoterra per diversi mesi (Fase VI, **Fig. 2**) e successivamente portano a dei germogli fioriti (**Fig. 2**).

1.1.3 Gli strigolattoni

Gli strigolattoni sono considerati la famiglia di composti più rappresentativi nell'indurre la germinazione di varie specie di piante parassite. Lo strigolo, è il primo esempio di tali composti ad essere stato identificato per la germinazione della *Striga* ed isolato per la prima volta dagli essudati radicali del cotone (Cook *et al.*, 1972), e successivamente dagli essudati del mais e del giglio (Siame *et al.*, 1993) (**Fig. 3**). Successivamente sono stati isolati e caratterizzati nuovi metaboliti correlati come il sorgolattone e alectrolo (**Fig. 3**) che hanno evidenziato un'attività stimolante la germinazione dei semi di striga maggiore rispetto allo strigolo (Hauck *et al.*, 1992). Nel 1998 dagli essudati radicali del *Trifolium pratense*, ospite di *O. crenata*, è stato isolato insieme all'alectrolo, un nuovo strigolattone denominato orobancolo. Entrambi hanno rappresentato i primi strigolattoni isolati da piante ospiti di *Orobanche* (Yokota *et al.*, 1998), in quanto fino a quel momento tutti gli strigolattoni erano stati isolati da piante ospiti della *Striga*. L'orobancolo ha mostrato un'elevata attività stimolante della germinazione dei semi di *O. minor* e *S. asiatica*, sebbene tale attività risultava inferiore a quella dello strigolo (Diaz 2009). Negli ultimi anni sono stati identificati altri strigolattoni come il 2'-*epi*-orobancolo e il solanacolo, che rappresentano i primi strigolattoni naturali ad avere rispettivamente una stereochimica S al carbonio C-2' ed un anello benzenico nella struttura. Tali metaboliti sono isolati dagli essudati radicali del tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) e quando saggiate su semi di *O. minor* e *O. ramosa* (parassite del tabacco) ad una concentrazione 10^{-4} μ M ne inducevano la germinazione dell'80-90% (Xie *et al.*, 2007).

Alla luce dei risultati degli studi sia chimici che biologici condotti sugli strigolattoni, molti gruppi hanno intrapreso la sintesi di analoghi con l'obiettivo di:

- sintetizzare composti dotati di maggiore stabilità nell'ambiente;

-realizzare studi di correlazione struttura-attività (SAR) per individuare i fattori strutturali indispensabili per l'attività.

Tra questi i composti denominati GR (germination releaser) rappresentano un gruppo di analoghi degli strigolattoni naturali ottenuti utilizzando sintesi convenienti con pochi stadi di reazione. Tra questi il GR 24 (**Fig. 3**) è l'analogo più diffuso soprattutto per la sua attività (Humphrey *et al.*, 2006). Attualmente infatti il GR24 è ampiamente usato come standard nei saggi condotti su semi di piante parassite.

1.2 La *Cuscuta*

1.2.1 Diffusione

La *Cuscuta campestris* Yuncker (**Fig. 4**) è una pianta appartenente alla famiglia delle *Cuscutaceae*, originaria del Nord America e diffusa sia nell'ecosistema subtropicale che temperato, che parassita diverse piante spontanee e molte specie coltivate (Dawson *et al.*, 1994, Parker e Riches 1993, Holm *et al.*, 1997) determinando ingenti perdite nella produzione.

Cuscuta campestris è una pianta parassita di almeno 25 colture in 55 paesi (Holm. *et al.*, 1997). Le colture infestate da tale pianta sono: l'erba medica (*Medicago sativa* L.), il trifoglio (*Trifolium spp.*), la fava (*Vicia faba* L.), la barbabietola (*Beta vulgaris* L.), la carota (*Daucus carota* L.) e in misura minore l'asparago (*Asparagus officinalis* L.), il cece (*Cicer arietinum* L.), la vite (*Vitis vinifera* L.), il melone (*Cucumis melo* L.), la cipolla (*Allium cepa* L.), la patata (*Solanum tuberosum* L.), il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), la melanzana (*Solanum melongena* L.) e alcune piante ornamentali (Cooke e Black 1987; Parker e Riches 1993; Dawson *et al.*, 1994).

1.2.2 Fasi di sviluppo

La *Cuscuta* è una fanerogama oloparassita, che si connette ai fusti e alle foglie di un ampio numero di piante ospiti, utilizzandone le sostanze nutritive, in una condizione di permanente “chemioeterotrofia”. Sebbene contenga una piccola quantità di clorofilla (Fer 1976), la *Cuscuta* è una parassita obbligata e non può completare il suo ciclo vitale senza un ospite.

Talvolta può sopravvivere da un anno all’altro all’interno dei tessuti di un ospite perenne (Dean 1954; Stewart e Press 1990), ma normalmente vive come pianta annuale. I suoi semi sono di forma sferica, molto piccoli (con un diametro compreso tra 0,5 e 1 mm) e possiedono un tegumento esterno ruvido molto resistente. Tutte le specie sono piante senza radici, annuali o qualche volta perenni con fiori bisessuali e regolari. Cambiamenti delle condizioni ambientali, quali umidità e siccità, congelamento e scongelamento, e delle attività microbiche possono portare alla scarificazione ed alla conseguente rottura del tegumento. Diversamente da altre piante parassite, la *Cuscuta* non necessita di essudati radicali prodotti dall’ospite per la germinazione dei suoi semi (Vail *et al.*, 1990); la germinazione è invece influenzata solo dalle condizioni di temperatura e umidità (Allred e Tingey 1964). Una volta che i semi sono germinati, di solito in prossimità della superficie del suolo, le plantule si allungano ed emergono dal suolo. Esse formano precocemente dei fusticini pressoché privi di foglie e di radici. La porzione basale delle plantule funge da radice per quanto concerne l’assorbimento dell’acqua e l’ancoraggio, ma non penetra ulteriormente nel terreno. Quindi, le plantule entrano in una fase di crescita non parassitica (**Fig. 5**), dipendente per 4-9 giorni dalle riserve del seme (Kroschel 2001). In questa fase esse si muovono nello spazio circostante per circumnutazione, alla ricerca di un ospite. Il fusto si allunga rapidamente e, grazie ad un meccanismo di percezione fototropica (Haidair *et al.*,

1997), riesce prontamente a direzionarsi verso l'ospite, con il quale si connette. Durante la crescita, la *Cuscuta* può diffondersi su ospiti secondari a volte diversi dall'ospite primario (come genere o specie) attraverso gli austeri. Al termine del ciclo vitale, questa pianta produce fiori vestigiali, con tre-cinque petali bianchi, gialli o rosati ed altrettanti sepali riuniti in minuscole infiorescenze quasi sferiche e prive di peduncolo. Infine vengono prodotti piccoli frutti a capsula, ciascuna contenente quattro semi.

Come tutte le piante parassite la sopravvivenza e diffusione della *Cuscuta* è legata alla produzione di un elevato numero di semi e al loro lungo periodo di dormienza (Hutchinson e Ashton 1980).

1.3 Metodi di controllo delle piante parassite

Considerando gli ingenti danni che le piante parassite arrecano alla produzione agro-alimentare molteplici strategie sono messe in atto al fine di limitarne la diffusione. Oltre ai territori tradizionalmente interessati dalle loro infestazioni si segnalano sempre più frequentemente attacchi di specie parassite in nuovi ambienti (Grenz e Sauerborn 2007). Tale fenomeno è spesso associato alle pratiche colturali sempre più intensive, all'utilizzo di poche varietà colturali più suscettibili alla comparsa di forme di resistenza generate nelle specie parassite verso i metodi di controllo tradizionali.

Come per tutti i patogeni ad *habitus* terricolo, è difficile gestire il controllo delle piante parassite e l'eradicazione è praticamente impossibile con le tecniche agronomiche e di controllo chimico conosciute. I metodi chimici impiegati nella lotta a queste infestanti sono costosi, richiedono alte dosi di applicazione e generalmente una precisa scelta del momento del trattamento, inoltre,

spesso determinano problemi di persistenza e residualità nel terreno (Joel *et al.*, 1995; Surov *et al.*, 1997).

Il ciclo di vita di una pianta parassita può essere suddiviso in tre fasi, dipendenti dai danni che esse provocano alle colture. Nella fase di latenza e di condizionamento la pianta parassita non produce alcun danno alla pianta. Durante la germinazione la pianta parassita causa i primi danni alla pianta ospite, tuttavia il seme in questa fase è molto vulnerabile e quindi le misure di controllo, in questa fase, possono essere molto efficaci. L'ultima fase, la fase riproduttiva quella che genera rapidamente i nuovi semi è quella che reca il maggior danno alle colture. Come già precedentemente sottolineato sono i semi i principali responsabili della loro diffusione. Molti metodi di controllo si basano pertanto sulla loro distruzione mediante metodi fisici, chimici e agronomici.

L'eradicazione del potenziale di inoculo nel terreno può essere ottenuta mediante solarizzazione o fumigazione. Tali metodi che prevedono sostanzialmente la sterilizzazione del terreno mediante calore o gas, risultano efficaci ma nel contempo costosi. Spesso non sono applicabili su larga scala ed inoltre compromettono la fertilità stessa del terreno trattato (Foy *et al.*, 1989; Parker 1994).

Tra i metodi colturali si segnala l'intercropping, che consiste nel coltivare due o più colture in prossimità. Tale metodo è ampiamente adoperato in Africa (Oswald *et al.*, 2002). Alcuni esempi sono dati dalle colture di cereali come l'avena e il fieno greco che sono in grado di ridurre le infestazioni di *O. crenata* quando intercalate con i legumi mediante un fenomeno allelopatico (Fernandez-Aparicio *et al.*, 2007, 2008). Questo fenomeno è stato confermato con l'isolamento e la caratterizzazione del trigoxazonano (**Fig. 6**) dagli essudati radicali del fieno greco,

responsabile probabilmente dell'inibizione della germinazione dei semi di *O. crenata* (Evidente *et al.*, 2007).

I mezzi genetici, utilizzati in gran parte nelle colture annuali, sono rappresentati dall'introggressione di geni che conferiscono generalmente resistenza nei confronti di una determinata specie o varietà.

I mezzi chimici sviluppati per un numero ristretto di colture sono raramente adoperati in quanto per il loro impiego ci sono sia problemi economici che ambientali (Joel *et al.*, 2007).

Pertanto, negli ultimi anni, particolare attenzione è stata rivolta alla lotta biologica che ha lo scopo di ripristinare i normali equilibri tra le diverse specie viventi sempre alterati dagli interventi agronomici. I requisiti fondamentali su cui si basa la ricerca di questi organismi, sono l'efficacia nel ridurre la popolazione del bersaglio e la loro specificità di azione, evitando di creare problemi sia dal punto di vista ambientale che socio-economico. In tale ambito sono stati individuati molti agenti di biocontrollo di piante parassite essenzialmente insetti e microrganismi fitopatogeni che sono i più adatti nelle pratiche di lotta biologica. Tra quest'ultimi i funghi, essendo i principali responsabili di fitopatie considerando anche la loro facilità di impiego sono i più utilizzati. Infatti al fine di individuare nuove specie come potenziali agenti di biocontrollo, uno studio condotto in pieno campo ha consentito di isolare ed identificare da piante infette di *O. ramosa*, i principali funghi fitopatogeni (Abouized *et al.*, 2004). Sono stati identificati 54 isolati fungini appartenenti a 16 differenti specie, principalmente del genere *Fusarium*. Alcuni di essi sono risultati particolarmente virulenti e quindi potenzialmente utilizzabili come microerbicidi (Abouized *et al.*, 2004). I limiti fondamentali della lotta biologica consistono nel fatto che la ricerca scientifica per l'individuazione dell'agente biologico richiede elevati investimenti e spesso gli effetti benefici si manifestano con lentezza.

La migliore strategia di controllo delle avversità prevede però l'uso combinato di più metodi di controllo. Per tale motivo la Direttiva 2009/128/CE obbligherà l'agricoltura europea ad adottare la protezione integrata (IPM-integrated pest management) entro il 2014.

In tale ambito lo studio dei metaboliti secondari prodotti da microrganismi e da piante possono inserirsi nel controllo delle piante parassite. Tali ricerche sono finalizzate all'isolamento e alla caratterizzazione di metaboliti secondari potenzialmente adoperabili come erbicidi naturali anche in metodi di lotta integrata insieme al fungo e ad erbicidi chimici a basso dosaggio.

Il termine metabolita secondario fa riferimento a quei composti che partecipano per lo più a meccanismi ecologici d'interazione con altri organismi e con tutto l'ambiente. Tali composti presentano diversi vantaggi quali, strutture chimiche spesso originali e manifestare un'attività biologica specifica e spesso selettiva legata anche alla loro stereochimica.

Molti sono i vantaggi nell'utilizzo di prodotti naturali come fonte di nuovi composti da impiegare nell'ambito di metodi alternativi all'uso di pesticidi di sintesi, infatti la loro più breve emivita ambientale, rispetto a prodotti di sintesi, li rende preferibili in risposta ad una necessità di pratiche agricole maggiormente "environmental friendly" (UNCED 1992). Inoltre, l'opportunità di individuare composti con strutture chimiche, difficili da ottenere per via sintetica, con diversi siti e meccanismi d'azione, rispetto ai prodotti di sintesi comunemente utilizzati, attribuisce allo studio delle sostanze di origine naturale un ruolo chiave nello sviluppo di nuove classi di composti. I principali ostacoli allo sviluppo di questo tipo di ricerca risiedono nella scarsa quantità in cui, spesso, tali composti naturali sono presenti negli organismi produttori, ciò rende complicato la messa a punto di tutti i saggi e metodi di analisi necessari per poter ipotizzare una produzione in larga scala. La complessità stereochimica rende spesso difficile e costosa una loro sintesi enantioselettiva in alte rese.

Per il controllo delle piante parassite possono essere utilizzati metaboliti con attività inibente o stimolante la germinazione di semi (germinazione suicida). Molti esempi di metaboliti prodotti sia da funghi fitopatogeni che da pianta sono riportati in letteratura.

Lo studio dei metaboliti prodotti da alcuni funghi patogeni di *O. ramosa* (Abouized *et al.*, 2004) ha evidenziato la capacità da parte di diverse specie appartenenti al genere *Fusarium* di produrre gli acidi fusarico e deidrofusarico (**Fig. 7**) (Abouzeid *et al.*, 2004). Tali metaboliti isolati anche da *Fusarium nygamai*, patogeno della Striga insieme ai relativi metil esteri (Capasso *et al.*, 1996), sono risultati attivi nell'inibire la germinazione dei semi delle due specie parassite (Abouized *et al.*, 2004).

Da *Myrothecium verrucaria* e *F. compactum* funghi isolati da piante infette di *O. ramosa* (Abouzeid *et al.*, 2004) sono stati isolati ed identificati diversi metaboliti appartenenti a diverse classi della famiglia dei tricoteceni quali le verrucarine A, B ed M, la verrucarina L acetata, la roridina, isotrichoverrina B, trichoverrolo B e il neosolaniolo (Andolfi *et al.*, 2005). Tali metaboliti saggiati su semi di *O. ramosa* hanno mostrato una significativa attività inibente la germinazione alla concentrazione 10 μ M. Mentre il neosolaniolo acetato e la roridina A risultano attivi anche quando saggiati ad una concentrazione 1 μ M (**Fig. 8**).

Considerando che la germinazione dei semi di piante parassite (*Orobanche*) dipende dalla presenza di essudati radicali, prodotti dalle radici della pianta ospite, un nuovo approccio alternativo è stato proposto per il loro controllo, denominato “germinazione suicida”. Questo metodo prevede di indurre la germinazione dei semi mediante l'uso di composti con attività stimolante in assenza dell'ospite. In tal modo, le piante in assenza dell'ospite muoiono in pochi giorni, con conseguente riduzione dei semi. Gli studi per poter utilizzare tale approccio

alternativo, prevedono l'impiego di metaboliti secondari isolati da funghi fitopatogeni e piante, che hanno questo tipo di specificità.

Tra i composti fungini la fusicoccina, l' α -D-glucoside di un diterpenoide carbotriciclico e principale fitotossina prodotta e isolata da *Fusicoccum Anygdali* (**Fig. 9**) (Ballio *et al.*, 1968; Barrow *et al.*, 1968), per la sua peculiare attività ormone-simile esplicita a basse concentrazioni (10^{-6} - 10^{-8} M) rispetto a quella fitotossica (10^{-4} M) ha stimolato diversi gruppi di ricerca a condurre studi di correlazione struttura-attività. In tali studi sono stati utilizzati diversi analoghi naturali e sintetici della fusicoccina e l'ofiobolina A (Evidente *et al.*, 2006), che mostra un'analogia struttura carbotriciclica dell'aglicone della fusicoccina. Questi composti saggati su diverse specie di *Orobanche* e *Phelipanche* hanno evidenziato l'effetto stimolante la germinazione sia dose che specie dipendente.

Come già descritto precedentemente l'isolamento di metaboliti con attività stimolante da essudati radicali di piante ospiti e non, rappresenta un approccio per individuare nuovi composti dotati di tale attività (Yoneyama *et al.*, 2010). Tra questi, gli essudati di veccia comune (*Vicia sativa L.*) sono stati studiati, soprattutto perché le aree di coltivazione di tale specie coincidono con le aree maggiormente infestate dalle *Orobanche*. Dall'estratto organico di tale essudato sono stati isolati due metaboliti identificati come il soyasapogenolo B e il *trans*-22-deidrocampesterolo (**Fig. 10**) che sono risultati particolarmente attivi nello stimolare la germinazione dei semi in particolare di *O. minor* (Evidente *et al.*, 2011).

Dagli essudati radicali del pisello sono stati isolati e caratterizzati sia nuovi che noti polifenoli (Evidente *et al.*, 2009) che hanno evidenziato un'attività selettiva la stimolazione. I due nuovi metaboliti strutturalmente correlati agli strigolattoni erano denominati peagolo e peagoldione (**Fig. 11**) ed erano particolarmente attivi su *Phelipanche aegyptiaca* (Evidente *et al.*, 2009).

1.4 L'*Inula viscosa*

Al fine di individuare nuovi metaboliti da poter impiegare in strategie di lotta integrata delle piante parassite è stato condotto uno studio preliminare utilizzando estratti organici di diverse piante spontanee dell'area del Mediterraneo (Zermane *et al.*, 2011). Per tale studio sono state selezionate 9 specie quali: *Lavandula dentata* L., *L. stoechas* L., *L. multifida* L., *Cistus monspeliensis* L. 1753, *C. salvifolius* L. 1753, *C. heterophyllus* L. 1753, *Marubium vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. 1753 e *Inula viscosa* L. Aiton (**Fig. 12**). Piante di tali specie sono state raccolte in Algeria e la parte aerea è stata estratta con una miscela idroalcolica e quindi con diclorometano. Gli estratti così ottenuti, sono stati saggiati per valutare la loro capacità di inibire la germinazione dei semi di *C. campestris* e di *O. crenata*. Tra gli estratti organici, quelli ottenuti da *L. dentata*, *L. multifida*, *L. stoechas*, *M. vulgare* e *I. viscosa* risultavano essere i più attivi anche quando saggiati ad una concentrazione dieci e 100 volte inferiore (Zermane *et al.*, 2011). Tra questi considerando il pattern cromatografico relativo alla presenza di metaboliti gli estratti di *I. viscosa* sono risultati promettenti per ulteriori studi sull'isolamento e caratterizzazione di metaboliti da utilizzare per il controllo delle piante parassite. L'*inula viscosa* (**Fig. 13**) è una pianta perenne cespugliosa, generalmente sempreverde, della famiglia delle *Asteraceae*, la più numerosa tra le *Fanerogame*, che comprende un numero di generi stimato intorno a 959 circa, piuttosto comune nelle regioni mediterranee (Zermane *et al.*, 2011). L'*I. viscosa* è una pianta arbustiva perenne, dall'odore caratteristico che presenta cauli eretti, lignificati alla base, riccamente ricoperti di foglie, di altezza compresa tra 50-150 cm. Le foglie, lineari-lanceolate, sono ruvide e di colore verde con la parte superiore riccamente ricoperta di peli e di ghiandole. L'infiorescenza di forma piramidale è composta da numerosi capolini con i fiori giallo-dorati. La fioritura avviene in autunno, mentre i frutti sono costituiti da acheni.

Tale pianta è da tempo oggetto di studi in relazione alla presenza nelle diverse parti della pianta (radici, fusto, foglie, fiori, ecc.) di numerosi componenti di natura chimica diversa, le cui proprietà rendono interessanti alcune potenziali applicazioni nei settori farmaceutico, cosmetico, degli aromi e degli affini (Cum *et al.*, 2001). Infatti tale specie è conosciuta da tempo per le sue proprietà e quindi utilizzata nella medicina popolare essenzialmente per curare i disturbi del fegato, come analgesico, antinfiammatorio, antipiretico, antielmintico e antifungino (Chiappini *et al.*, 1982; Wollenweber *et al.*, 1991).

Numerosi studi sono stati condotti al fine di identificare ed isolare dalla sua biomassa i composti dotati di attività. Tale ricerche hanno consentito di individuare numerosi metaboliti. Tra le più importanti classi di composti chimici presenti sono da annoverare soprattutto mono-, sesqui- e tri-terpeni, flavoni, flavanoni e carboidrati. Sia gli estratti organici che alcuni metaboliti hanno mostrato attività antimicotica verso dermatofiti e la *Candida albicans* (Maoz e Neeman, 2000), proprietà antiossidanti e effetti antinfiammatori nei ratti (Schinella *et al.*, 2002), attività fungicida verso alcuni patogeni di interesse agrario (Wang *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2007). È stata osservata un' elevata variabilità nella composizione quali e quantitativa dei metaboliti prodotti in funzione delle condizioni pedo-climatiche, dell'area geografica di provenienza e dello stadio fenologico della pianta stessa (Mueller-Riebau *et al.*, 1995). Tra i metaboliti più tipici di questa specie sono da ricordare gli acidi sesquiterpenici ed i corrispondenti lattoni. Questi sono ulteriormente distinti in tre sottoclassi di composti quali eudesmanolidi, guaianolidi e germacranolidi (**Tabella 1**) (Cum *et al.*, 2001). Tra questi l'acido- α -costico ha mostrato diverse attività mentre i sesquiterpeni, tomentosina e inuviscolide inducevano l'apoptosi di cellule umane di melanoma (Rozenblat *et al.*, 2008) oltre a manifestare un'attività antiinfiammatoria, antiossidante, antibatterica e antifungina (Gayla *et al.*, 2010).

Tra i più significativi fitosteroli isolati ed identificati sia dalla parte aerea che dalle radici sono da annoverare gli stigmasteroli, i β -sitosteroli ed i taraxasteroli (Oksuz 1976; Simoes e Nascimento 1990).

Nonostante il numero elevato di studi sulla caratterizzazione chimica e biologica dei metaboliti prodotti da *I. viscosa*, nessuno studio era riportato in letteratura sulla loro potenziale attività erbicida.

Tale lavoro di tesi s'inserisce nell'ambito del progetto dal titolo "Breeding, agronomic and biotechnological approaches for reintegration and revalorization of legumes in Mediterranean agriculture (MediLeg)" che coinvolge ricercatori di diversi paesi dell'area del Mediterraneo. Tale progetto ha lo scopo di promuovere la coltivazione delle leguminose da granella nei paesi del Mediterraneo attraverso ricerche multidisciplinari. Infatti sono coinvolti agronomi, biotecnologi, chimici organici, genetisti, patologi e fisiologi vegetali di Algeria, Egitto, Francia, Italia, Marocco, Portogallo, Spagna e Tunisia.

Alcuni degli obiettivi proposti tendono a migliorare i metodi di coltivazione tradizionali o a svilupparne di nuovi nell'ambito di un'agricoltura sostenibile. Alcuni di essi sono la selezione di varietà più produttive e resistenti agli agenti biotici e abiotici e la messa a punto di strategie di lotta integrata efficaci per il controllo dei principali patogeni e delle specie infestanti e parassite.

2. SCOPO DELLA TESI

Considerando gli innumerevoli problemi legati alla diffusione delle piante parassite, e i problemi legati a loro controllo, l'oggetto della presente tesi è stato l'isolamento di nuovi metaboliti prodotti da *Inula viscosa* con una potenziale attività erbicida. In particolare il lavoro di tesi è stato articolato per raggiungere i seguenti obiettivi:

1. Ottimizzare il metodo di estrazione della parte aerea dell' *I. viscosa* più rapido ed esaustivo;
2. Purificare ed isolare i principali metaboliti prodotti dalla pianta utilizzando le comuni tecniche cromatografiche sia su colonna che su strato sottile (CC, TLC);
3. Determinare la struttura e stereo-struttura dei metaboliti bioattivi mediante tecniche spettroscopiche (IR, UV, NMR), la spettrometria di massa, e metodi chimici;
4. Saggiare l'attività inibente dei metaboliti sui semi di due piante parassite, *Cuscuta campestris* e *Orobanche crenata*;
5. Condurre una preliminare indagine sulla correlazione struttura-attività preparando alcuni derivati dei metaboliti bioattivi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Procedure sperimentali generali

Tutti i reattivi ed i reagenti usati, se non diversamente specificato, sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (Italia), dalla Merck (Germania) e dalla Carlo Erba (Italia). Le misure della rotazione ottica sono state effettuate in CHCl_3 con un Jasco P-1010-digital polarimeter; gli spettri IR sono stati registrati come film liquido con un spettrometro Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR; gli spettri UV sono stati registrati in CH_3OH con un spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis. Gli spettri ^1H e ^{13}C sono stati registrati a 400 e a 100 MHz in CDCl_3 con un spettrometro Bruker. Lo stesso solvente è stato utilizzato come standard interno. La molteplicità del carbonio è stata determinata mediante l'acquisizione di spettri DEPT (Berger e Braun, 2004). Gli esperimenti DEPT, COSY-45, HSQC, HMBC e NOESY sono stati condotti mediante microprogrammi Bruker. I chimica shifts sono riportati in valori di δ (ppm). Le costanti di accoppiamento (J) sono date in Hertz. Sono stati impiegati i seguenti simboli : s =singoletto, d =doppio, dd =doppio doppio, ddd = doppio di doppio doppio, m =multipletto, t =tripletto, dt =doppio tripletto, $quin$ =quintetto, brs = broad singoletto, brd =broad doppio. Gli spettri HRESI ESI e MS sono stati registrati su uno spettrometro Waters Micromass Q-TOF micro ed un Agilenten 1100 coupled. TLC analitiche e preparative sono state eseguite su lastre di gel di silice (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.25 e 0.50 mm, rispettivamente). I cromatogrammi sono stati visualizzati mediante luce ultravioletta (254 nm) o spruzzando prima con una soluzione di H_2SO_4 al 10 % in metanolo e poi con una soluzione al 5% di acido fosfomolibdico in etanolo seguita da riscaldamento in stufa a 110 °C per 10 minuti. Le purificazioni cromatografiche sono state condotte su colonne impaccate con gel di silice (Merck, Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm) e su

colonne LICOPREP RP-18 (Merck, 40-63 μm , 10x240 mm). I sistemi eluenti adoperati sono stati i seguenti:

- Eluente A: CHCl_3 - *i*-PrOH (95:5 v/v)
- Eluente B H_2O - CH_3CN (1:1 v/v)
- Eluente C: *n*-esano – ACOEt (55:45 v/v)
- Eluente D: *n*-esano - ACOEt (6:4 v/v)
- Eluente E: CHCl_3

3.2. Pianta di *Inula viscosa*

La parte aerea fresca di pianta di *Inula viscosa* è stata raccolta in primavera nelle aeree incolte nei pressi di Algeri (Algeria). La pianta raccolta nel pieno vigore vegetativo è stata rapidamente defogliata e le foglie sono state essiccate in una stufa ventilata 50 °C per due giorni. Il materiale vegetale è stato poi macinato in un blender, per ottenere una polvere sottile, e confezionato in sacchetti sotto vuoto fino al suo utilizzo.

3.3. Estrazione e purificazione delle Inuloxine (A-D) e dell'acido- α -costico

400 g di foglie essiccate sono state estratte con un litro di soluzione idroalcolica costituita da H_2O - CH_3OH (1:1). La sospensione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore e successivamente centrifugata a 7000 rpm per 30 min. Il surnatante ottenuto è stato estratto 3 volte con CH_2Cl_2 (3x400 mL). Gli estratti organici sono stati combinati, anidrificati con Na_2SO_4 per 1 ora, filtrati ed evaporati sotto pressione ridotta, producendo un residuo oleoso di colore rosso- marrone (6.12 g). Tale estratto mostrava un'elevata attività inibente la

germinazione di semi di *O. crenata* e *C. campestris*. (**Schema 1**) ed è stato cromatografato su una colonna di gel di silice adoperando l'eluente A, seguito da eluizione finale con metanolo (**Schema 1**). Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante TLC di gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente e raggruppate in 9 gruppi di frazioni omogenee. L'intero processo di purificazione è stato seguito attraverso saggi di fitotossicità presso il laboratorio della dottoressa Nadja Zermane, Ecole Nationale Superieure Agronomique (ENSA) Alergeri, Algeria.

I residui della seconda e terza frazione evidenziavano la presenza di un metabolita principale e sono state ulteriormente purificate. Inoltre quando saggiate su semi di *O. crenata* e *C. campestris* tali frazioni inibivano significativamente la germinazione dei semi di entrambe le specie. Pertanto esse sono state riunite (800 mg) e purificate su una colonna a fase inversa a media pressione usando il sistema eluente B. Sono state ottenute tre gruppi di frazioni omogenee (**Schema 1**), una delle quali la frazione A, la meno polare, ottenuta come un olio giallo omogeneo, è stata identificata come l'acido- α -costico (**9**, 455 mg, 1.14 g/Kg, *Rf* 0.35). La seconda frazione, denominata B, isolata come un olio giallo è stata denominata inuloxina A (**1**, 105 mg, 262.5 mg/Kg, *Rf* 0.52). Il residuo della frazione quello più polare (80 mg) ulteriormente purificato mediante TLC preparativa usando l'eluente C, forniva tre metaboliti come oli omogenei, denominati, inuloxina B, C e D (**2**, 17 mg, 42.5 mg/Kg, *Rf* 0.52;**3**, 32 mg, 80 mg/Kg, *Rf* 0.31;**4**, 12mg, 30 mg/Kg, *Rf* 0.25, rispettivamente).

3.4 Inuloxin A (**1**)

L'inuloxina A (**1**) ottenuta come un olio giallo mostrava : $[\alpha]_D^{25} +8,5$ (c 1.9); IR ν_{\max} 1755, 1706, 1659, 1119 cm^{-1} ; UV λ_{\max} nm (log ϵ) 284 (2.14); Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono riportati in

Tabella 2; HR ESIMS (+) m/z 519 $[2M+Na]^+$, 287 $[M+K]^+$, 271.1321 [calcolato per $C_{15}H_{20}NaO_3$, 271,1310, $M+Na]^+$, 249 $[M+H]^+$, 231 $[M+H-H_2O]^+$.

3.5 Inuloxina B (2)

L'inuloxina B (2) ottenuta come un olio mostrava : $[\alpha]_D^{25} +49.9$ (c 0.2); IR ν_{max} 1764, 1711, 1190 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 270 (2.40); Gli spettri 1H e ^{13}C NMR sono riportati in **Tabella 2** ; HR ESIMS (+) m/z 289 $[M+K]^+$, 273,1357 [calcolato per $C_{15}H_{22}NaO_3$ 273.1467 $M+Na]^+$.

3.6. Inuloxina C (3)

L'inuloxina C (3) ottenuta come un olio giallo mostrava : $[\alpha]_D^{25} +13.1$ (c 0.3); IR ν_{max} 3428, 1758, 1662, 1635, 1152 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 262 (1.07); Gli spettri 1H e ^{13}C NMR sono riportati in **Tabella 2**; HR ESIMS (+) m/z 519 $[2M+Na]^+$, 287 $[M+K]^+$, 271.1319 [calcolato per $C_{15}H_{20}NaO_3$, 271.1310 $M+Na]^+$, 253 $[M+Na-H_2O]^+$, 249 $[M+H]^+$.

3.7 Inuloxina D (4)

L'inuloxina D (4) ottenuta come un olio aveva: $[\alpha]_D^{25} +81.8$ (c 0.2); IR ν_{max} 3407, 1756, 1657, 1122 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 257 (1.05); 1H e ^{13}C sono riportati in **Tabella 2**; HR ESIMS (+) m/z 251,1658 [calcolato per $C_{15}H_{23}O_3$, 251.1647 $M+H]^+$, 233 $[M+H-H_2O]^+$.

3.8 Acido- α -costico (9)

L'acido costico (9) ottenuto come un solido aveva: $[\alpha]_D^{25} +15$ (c 0.5); IR ν_{max} 3403, 2906, 1687, 1618, 1278 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 225 (3,38) (Shtacher e Kashman, 1970); $[\alpha]_D^{25} +10$ (c 0.8 $CHCl_3$); IR ν_{max} ($CHCl_3$) 2.900, 2.830 (v.s), 1.960 (v.s), 1.615 ($>C=C<COOH$) (s), 1.435 (s),

1.365 (m), 968 (v.s) cm^{-1} (Chen *et al.*, 2001); : $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +8$ (c 0.24 CHCl_3); IR ν_{max} 2916, 2848, 1696, 1621, 1436, 1278 cm^{-1} ; Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono riportati in **Tabella 6**; ESIMS (+) m/z 235 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 189 $[\text{M}-\text{COOH}]^+$.

3.9 Reazione dell'inuloxina A con diazometano (5)

Una soluzione eterea di CH_2N_2 (500 μL) è stata aggiunta all'inuloxina A (**1**, 28.4 mg) disciolta in CH_3OH (200 μL). La reazione era condotta per un ora a temperatura ambiente, ed interrotta per evaporazione della soluzione sotto flusso di N_2 . Il residuo (28.0 mg) così ottenuto, analizzato per TLC con il sistema eluente D evidenziava la presenza di un prodotto principale. Il residuo quindi è stato purificato mediante TLC preparativa utilizzando lo stesso solvente, forniva il derivato **5** come un olio (R_f 0.23, 15.3 mg). Tale derivato mostrava: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +13.9$ (c 0.1); IR ν_{max} 1761, 1709, 1552 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 320 (2.42), 275 (2.41); Il suo spettro ^1H NMR mostrava i seguenti segnali: δ 5.42 (1H, br dd, $J= 9.2, 2.9$, H-5), 5.25 (1H, ddd, $J= 11.9, 7.0, 4.3$, H-8), 4.78 (1H, ddd, $J= 13.6, 9.5, 4.5$, H-16A), 4.62 (1H, ddd, $J= 13.6, 8.9, 7.7$, H-16B) 3.02 (1H, ddd, $J= 10.2, 7.0, 3.2$, H-7), 1.70 (1H, ddd, $J= 12.4, 8.9, 4.5$, H-13A), 1.60 (1H, ddd, $J= 12.4, 9.5, 7.7$, H-13B); ESIMS (+) m/z : 301 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 285 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 263 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 267 $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

3.10 5-O-acetil-inuloxina C (6)

All'inuloxina C (**3**, 10 mg) sciolta in 50 μL piridina sono stati aggiunti 50 μL anidride acetica. La reazione era lasciata a temperatura ambiente per 48 ore. Successivamente la reazione era interrotta mediante l'aggiunta di CH_3OH e benzene. L'azeotropo così formato era evaporato sotto flusso di N_2 . Il residuo oleoso (12,0 mg) purificato su TLC preparativa utilizzando l'eluente A, forniva il derivato 5-O-acetil-inuloxina C come composto oleoso (**6**, R_f 0.82, 9.0

mg). Tale derivato **6** mostrava : $[\alpha]_D^{25} +33.8$ (0.1 c); IR ν_{\max} 1764, 1725, 1665, 1640 cm^{-1} ; UV λ_{\max} nm (log ϵ) 276 (2.11); $^1\text{H NMR}$, δH : 6.26 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-13), 5.60 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-13), 5.10 (1H, bs, H-15A), 4.90 (1H, bs, H-15B), 4.34 (1H, ddd, $J = 10.7, 9.3, 6.1$ Hz, H-8), 3.22 (1H, ddd, $J = 15.8, 5.8, 3.1$, H-9A), 2.68 (m, H-7), 2.55 (1H, dd, $J = 15.8, 10.7$ Hz, H-9B), 2.13 (m H-6A) 2.00 (s, MeCO), 1.99 (1H, m, H-2A), 1.94-1.69 (4H, m, H₂-3 e H₂-4), 1.71 (1H, m, H-2B), 1.43 (s, Me-14), 1.27 (1H, m, H-6B); ESIMS (+) m/z : 603 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 543 $[\text{2M}+\text{Na}-\text{AcOH}]^+$, 313 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 253 $[\text{M}+\text{Na}-\text{AcOH}]^+$; ESIMS (-) m/z : 289 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

3.11 (S)- α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) dell' inuloxina D (7)

10 μL di (R)-(-)-MPTA-Cl erano aggiunti all'inuloxina D (**4**, 3.2 mg) disciolta in piridina anidra (10 μL). La reazione condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione per un ora era interrotta dall'aggiunta di CH_3OH . La soluzione era evaporata sotto flusso di N_2 . Il residuo purificato su TLC preparativa utilizzando l'eluente E, forniva il derivato **7** come un solido omogeneo (1,9 mg, R_f 0,78). Tale derivato aveva: IR ν_{\max} 1755, 1742, 1657, 1451 cm^{-1} ; UV λ_{\max} nm (log ϵ) 281 (2.18), 267 (2.51), 260 (2.67); lo spettro $^1\text{H NMR}$ è riportato nella **tabella 5**; ESIMS (+) m/z 490 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 467 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.12 (R)- α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) dell' inuloxina D (8)

10 μL di (S)-(+)-MPTA-Cl erano aggiunti all'inuloxina D (**4**, 3.1 mg) disciolta in piridina anidra (10 μL). La reazione era condotta nelle stesse condizioni descritte in precedenza per preparare il derivato **7**. Il residuo grezzo, purificato mediante TLC preparativa utilizzando l'eluente E, forniva il derivato **8** come un solido omogeneo (1,8 mg, R_f 0,76). Tale derivato aveva: IR ν_{\max}

1758, 1742, 1654, 1454 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 281 (2.24), 267 (2.39), 261 (2.47); lo spettro ^1H NMR è riportato nella **tabella 5**; ESIMS (+) m/z 490 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 467 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.13 Saggi biologici su *Cuscuta campestris* e *Orobanche crenata*

Tali saggi sono stati condotti nei laboratori della dottoressa Nadjia Zermane, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) Algeri, Algeria. Semi di *C. campestris* e *O. crenata* sono stati raccolti nei campi infestati vicino Algeri, Algeria, rispettivamente nel giugno del 2007 e del 2009. I semi sono stati puliti e conservati a temperatura ambiente in contenitori di plastica fino al momento dell'uso. Prima di eseguire i test biologici, i semi di *Cuscuta* sono stati trattati con acido solforico concentrato per 10 minuti per interrompere la loro dormienza. I semi di *Orobanche* sono stati sterilizzati e preconditionati su dischi inumiditi con carta da filtro, (Whatman GF/A, Whatman International Ltd, England) in Piastre Petri da 9 cm e posti al buio a 22 °C per dieci giorni.

3.13.1 Saggi di germinazione dei semi di *Cuscuta campestris*

I semi di *Cuscuta* sono stati distribuiti uniformemente su dischi della stessa carta da filtro menzionata sopra e posti in piastre Petri sterili da 5.5 cm. L'estratto organico, le frazioni cromatografiche, i metaboliti puri e i loro derivati sono stati inizialmente sciolti in CH_3OH e poi portati alla concentrazione desiderata con H_2O distillata. 2 mL di tale soluzione sono stati poi aggiunti ad ogni piastra Petri. Gli esperimenti sono stati condotti in paragone a due controlli costituiti da CH_3OH all'1% in acqua distillata e da sola acqua distillata. I campioni sono stati saggiati anche ad una concentrazione dieci volte inferiore a quella iniziale. I saggi sono stati

condotti al buio e a 28 °C. Dopo 5 giorni è stata calcolata la percentuale di semi germinati per piastra. L'esperimento è stato condotto in triplicato e ripetuto due volte.

3.13.2 Saggi di germinazione dei semi di *Orobanche crenata*

I semi precondizionati di *O. crenata* sono stati trasferiti in piastre Petri sterili e posti sulla stessa carta da filtro menzionata in precedenza (4 dischi per piastra). Ad ogni piastra Petri, contenente i vari metaboliti disciolti in CH₃OH (<1% in acqua distillata), è stato aggiunto 1 mL della soluzione del germinante sintetico GR24 (10 ppm). Gli esperimenti sono stati condotti in paragone a due controlli costituiti da CH₃OH all'1% in acqua distillata e da sola acqua distillata a cui erano aggiunti 10 ppm di GR24. Le piastre Petri sono state incubate a 22 °C al buio. Dopo 10 giorni è stata determinata la percentuale di semi germinati rispetto al numero totale di semi. L'esperimento è stato condotto in triplicato ed è stato ripetuto due volte. Inoltre, la lunghezza del tubo germinativo di 5 semi di *Orobanche* selezionati casualmente per ogni replica è stata misurata con un microscopio ottico utilizzando un micrometro.

3.13.3 Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante l'uso del programma Statistical Product and Service Solutions per Windows Rel. 10.0.1 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). I dati sperimentali sono stati sottoposti ad un'analisi della varianza (ANOVA) con il test a intervallo multiplo Duncan ad un livello di significatività di $p \leq 0,05$.

4 .RISULTATI E DISCUSSIONE

Un'indagine preliminare condotta su differenti piante dell'area del Mediterraneo (*Lavandula dentata*, *L. stoechas*, *L. multifida*, *Cistus monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. heterophyllus*, *Marubium vulgare*, *Rosmarinus officinalis* e *Inula viscosa*) al fine di individuare delle specie con potenziale attività erbicida per il controllo di piante parassite. A tale scopo la parte aerea di di ogni pianta essiccata a temperatura ambiente e ridotta in polvere è stata sottoposta ad un processo di estrazione con solventi organici (Zermane *et al.*, 2011). I risultati dei saggi di inibizione della germinazione dei semi di *Cuscuta campestris* ed *Orobanche crenata* hanno evidenziato una significativa attività per gli estratti di *L. dentata*, *L. multifida*, *L. stoechas*, *M. vulgare* e *I. viscosa* (Zermane *et al.*, 2011). Tra questi considerando il pattern cromatografico relativo alla presenza di metaboliti gli estratti di *I. viscosa* sono risultati promettenti per ulteriori studi sull'isolamento e caratterizzazione di metaboliti da utilizzare per il controllo delle piante parassite. Tale estratto ottenuto da foglie essiccate e macinate sottoposte ad un processo di estrazione con una miscela idroalcolica e successivamente con CH₂Cl₂ è stato purificato attraverso diversi stadi cromatografici su CC e TLC (sia su silice che su fase inversa, **Shema 1**). Da tale purificazione sono stati isolati 5 metaboliti, quattro dei quali risultavano nuovi e correlati strutturalmente come di seguito riportato ed erano denominati inuloxine A-D (**Fig. 14-17**). Il principale metabolita identificato come l'acido- α -costico è dettagliatamente descritto nell'ultimo paragrafo. Le inuloxine A, C e D (rispettivamente 105.0, 42.5, 80.0 e 30.0 mg/kg), mostravano un' elevata attività inibente quando saggate sia sui semi di *Orobanche crenata* che di *Cuscuta campestris*. Una prima indagine spettroscopica (¹H e ¹³C NMR) evidenziava che le quattro inuloxine A-D (**1-4**) erano strutturalmente relazionate tra loro ed appartenevano, tutte, al gruppo

dei sesquiterpenni lattonici naturali (Fraga 2004, Herz *et al.*, 1967, Herz e Gvindan 1980). Esse contenevano sistemi bi e tri-ciclici, un differente arrangiamento dello scheletro carbonioso e differenti funzionalità. L'isolamento e il ritrovamento di questi composti nelle piante non è casuale, infatti i sesquiterpeni sono molto diffusi in diverse piante e soprattutto all'interno della famiglia delle *Asteraceae*, dalle quali sono stati isolati circa 4000 sesquiterpeni. Studi condotti su tali metaboliti riportano diverse attività biologiche tra le quali, l'attività citotossica, antibatterica e fungicida (Xie *et al.*, 2007; Muhammad *et al.*, 2003; Shtacher *et al.*, 1970). Le inuloxine A, C e D contenevano lo stesso anello 2-furanone 3,3,4,5-tetrasostituito, mentre l'inuloxina B conteneva lo stesso anello ma 3,4,5-trisostituito.

4.1 Determinazione della struttura dell'inuloxina A

L'inuloxina A (**1**, **Fig. 14**) aveva una formula molecolare $C_{15}H_{20}O_3$ come dedotto dall'analisi del suo spettro HR ESIMS, consistente con 6 insaturazioni, tre delle quali contenute nell'anello furanonico 3,3,4,5-tetrasostituito. Le altre due insaturazioni erano dovute alla presenza di un gruppo chetonico e di un doppio legame trisostituito. Tali evidenze strutturali erano confermate dall'analisi dello spettro IR (Nakanishi e Solomon 1977) e dagli spettri 1H e ^{13}C NMR (**Fig. 18**, **19** e **Tabella 2**). La presenza del gruppo carbonile lattonico e di quello chetonico era confermata dalla presenza nello spettro IR di bande caratteristiche a 1755 e 1706 cm^{-1} (**Fig. 25**). Inoltre lo spettro UV mostrava la presenza di un tipico assorbimento dovuto ad un gruppo carbonilico α - β insaturo (Scott 1964). La presenza di questi gruppi funzionali era confermata anche dagli spettri 1H e ^{13}C NMR (**Tabella 2**). In particolare lo spettro protonico mostrava la presenza di due doppietti rispettivamente a 6.18 δ ($J=3.0$ Hz) e a 5.47 δ (CH_2 -13), tipici chemical shifts di un gruppo metilenico, esociclico rispetto all'anello furanonico e quindi assegnati al CH_2 -13

(Pretsch *et al.*, 2000). Lo spettro ^{13}C NMR evidenziava la presenza di carboni olefinici dovuti ad un doppio legame 1,1-disostituito, ad un doppio legame trisostituito, ad un carbonio chetonico e ad un gruppo carbonilico del 2-furanone, a valori tipici di chemical shift a δ 120.8, 137.3, 118.8, 143.3, 206.6 e 168.9 (C-13 e C-11, C-5 e C-4, C-3 e C-12) (Breitmaier e Voelter 1987). L'anello furanonico risultava congiunto all'anello a 10 termini attraverso i carboni C-7 e il C-8, come si evidenziava dalle correlazioni osservate nello spettro HMBC tra C-7 e il C-8 con H₂-9 e H₂-6 (**Tabella 3 Fig. 22**) (Berger e Braun 2004). Lo spettro COSY mostrava l'atteso accoppiamento tra H-8 e H-7 (**Fig. 20**). Quest'ultimo risuonava come un multipletto a δ 3.27 nello spettro ^1H NMR ed era accoppiato a due protoni del gruppo metilenico adiacente che appariva come un multipletto a δ 2.40 e come un doppio doppietto a δ 2.13 (dd, $J = 10.0$ e 5.2 Hz). Questi ultimi, a loro volta, erano accoppiati con il protone olefinico (H-5) del doppio legame trisostituito che appariva come un doppio doppietto a δ 5.39 (dd, $J = 9.0$ e 5.2 Hz). Sulla base delle correlazioni osservate nello spettro HMBC tra Me-14 con C-3 e H-5 con Me-14, questo doppio legame era posizionato in α al gruppo carbonilico. Il protone H-8, legato all'altro carbonio di giunzione tra l'anello furanonico e il macrociclo a 10 termini, risuonava come un doppietto di doppio doppietto a δ 4.60 (ddd, $J = 11.0$, 8.5 e 2.5 Hz). Nello spettro COSY, questo protone era accoppiato a due protoni di un gruppo metilene adiacente (CH₂-9), che nello spettro ^1H NMR risuonavano rispettivamente come un doppietto di doppio doppietto δ 1.95 (ddd, $J = 13.7$, 5.4 e 2.5 Hz) e un doppio tripletto δ a 1.83 (dt, $J = 13.7$ e 11.2 Hz). Quest'ultimi erano accoppiati ad un carbonio secondario (C-10), che nello spettro protonico risuonava come un multipletto a δ 2.31. H-10 accoppiava con il metile geminale (Me-15) che risuonava come un doppietto a δ 1.09 (d, $J = 6.9$ Hz) e con i protoni del gruppo metilenico adiacente CH₂-1). Questi ultimi, nello spettro ^1H NMR risuonavano come un multipletto ad un valore di δ 2.20 ed erano a loro volta

accoppiati ai protoni di un altro gruppo metilenico (CH₂-2) che risuonavano come due multipletti rispettivamente a δ 2.44 e 2.52. Sulla base della correlazione osservate nello spettro HMBC tra i protoni del CH₂-2 e il carbonile in posizione 3 era possibile chiudere il macrociclo a dieci termini. Inoltre, gli accoppiamenti osservati negli spettri HSQC (**Fig. 21**) e HMBC permettevano di assegnare i chemical shifts a tutti i carboni come riportato in **Tabella 2**.

Sulla base di tali risultati l'inuloxina A poteva essere identificata come un 3-oxo-germacra-4,11(13)-diene-8- β -12-olide (**1**, **Fig. 14**). Tale struttura era confermata dagli ulteriori accoppiamenti *long range* osservati nello spettro HMBC che dalle correlazioni dello spettro NOESY (**Tabella 4 e Fig. 23**) (Berger e Braun 2004). Inoltre la struttura era supportata dai dati dell'HR ESIMS. Lo spettro registrato in modalità positiva mostrava la presenza del dimero sodiato, degli addotti con il potassio e con il sodio e dello ione pseudomolecolare a valori *m/z* rispettivamente di 519 [2M-Na]⁺, 287 [M-K]⁺, 271.1321 [M-Na]⁺ e 249 [M-H]⁺ (**Fig. 24**). La stereochimica *cis* tra l'anello 2-furanone ed il ciclodecenone, era dedotta dalla significativa correlazione osservata nello spettro NOESY tra il protone H-7 e l'H-8. Tale spettro evidenziava altresì la mancanza di un effetto NOE tra il protone olefinico H-5 e il metile 14 e tra il protone H-10 e il protone di giunzione H-8, e la significativa presenza di un effetto tra Me-14 e H-6A. Questi risultati permettevano di assegnare in tal modo la stereochimica relativa E ed α al doppio legame C4-C5 e al C-10.

Quindi la configurazione relativa assegnata all'inuloxina A era 4*E*, 7*R**, 8*R**, 10*S**. La struttura dell'inuloxina A e la presenza, in particolare, del 2-furanone 3,3,4,5 tetrasostituito, era confermata mediante una reazione di diazotazione. Questa è una tipica reazione di addizione ed inserzione di un gruppo metilenico (Carey e Sundberger 2000) che conduceva alla formazione del derivato **5** (**Schema 2**). Lo spettro protonico di tale derivato (**Fig. 26**), preparato anche per

condurre uno studio preliminare di correlazione struttura-attività, evidenziava l'assenza dei due protoni del gruppo metilenico esociclici dell'anello furanico (H₂-13) e la presenza di quattro doppi doppi doppietti dovuti all'accoppiamento tra i protoni dei due metileni CH₂-13 e CH₂-16. I protoni (CH₂-16) del gruppo metilenico ossigenato risuonavano δ 4.78 (ddd, $J = 13,6, 9,5, 4,5$) e 4.62 δ (ddd, $J = 13.6, 8.9, 7.7$) mentre quelli del metilene in β all'ossigeno risuonavano a δ 1.70 (ddd, $J = 12.4, 8.9, 4.5$) e 1.60 δ (ddd, $J = 12.4, 9.5, 7.7$). Altre differenze sostanziali osservate, paragonando lo spettro del derivato **5** rispetto con quello dell'inuloxina A, erano gli spostamenti a campi più alti del protone H-8 ($\Delta\delta$ 0,65) e a campi più bassi del protone H-7 ($\Delta\delta$ 0,25), mentre i valori di chemical shift degli altri protoni restavano sostanzialmente inalterati. Lo spettro di massa del derivato **5** evidenziava la presenza sia dell'addotto col sodio che col potassio a valori di m/z di 279 [M+K]⁺ e 263 [M+Na]⁺. Sulla base di questi ulteriori risultati l'inuloxina A poteva essere denominata come un (4*E*, 7*R**, 8*R**, 10*S**)-3-osso-germacra-4,11(13)-dien-8 β -12-olide. L'inuloxina A differiva dalla tayunin, un noto sesquiterpene con attività antifungina precedentemente isolato sempre da *I. viscosa* (Maoz *et al.*, 1999), per la stereochimica al C-10. Gli autori assegnavano a tale carbonio una configurazione S*, sulla base degli effetti NOE osservati tra H-8 e H-10. Tale effetto NOE, come già descritto precedentemente, non era osservato nello spettro NOESY dell'inuloxina A (**Fig. 23**). Tale stereochimica era confermata dall'ispezione del modello molecolare dell'inuloxina A. Infatti i due protoni erano orientati approssimativamente a 90° (**Fig. 27**). Inoltre lo spettro NOESY dell'inuloxina A mostrava anche la correlazione tra Me-15 ed i protoni dei due metileni adiacenti CH₂-1 e CH₂-9. Questi risultati suggerivano una relazione diastereoisomerica tra l'inuloxina A (5*Z*,7*R**,8*R**,10*R**) e la tayunin (5*Z*,7*R**,8*R**,10*S**). Questo risultato era in accordo con le precedenti osservazioni che

riportavano un pattern dei sesquiterpeni lattonici differente per la stessa pianta raccolta in differenti regioni (Maoz *et al.*, 1999; Bohlmann *et al.*, 1978).

4.2 Determinazione della struttura dell'inuloxina B

L'inuloxina B (**2**, **Fig. 15**) aveva una formula molecolare $C_{15}H_{22}O_3$ come dedotto dallo spettro HR ESIMS registrato in modalità positiva. Essa differiva dall'inuloxina A solo per la mancanza dell'insaturazione dovuta al metilene esociclico in posizione 13, come si evidenziava dal confronto degli spettri 1H e ^{13}C NMR con quelli dell'inuloxina A (**Tabella 2** e **Fig. 28**). Infatti, nello spettro 1H NMR erano presenti un doppietto a δ 1.60 (d, $J = 7.5$) ed un quintetto a δ 2.79 (quint $J = 7.5$ Hz) dovuti al metile secondario Me-13 e al protone del metino CH-11 adiacente. Nello spettro ^{13}C NMR i due carboni corrispondenti al C-13 e al C-11 risuonavano a δ 20.5 e 38.9. Questi risultati suggerivano, quindi, per il composto **2** la struttura di un 11,13-diidroderivato dell'inuloxina A. La struttura assegnata all'inuloxina B era confermata anche da tutti gli accoppiamenti osservati negli spettri COSY, HSQC e HMBC (**Tabella 3** e **Fig. 29, 30, 31**) che consentivano altresì di assegnare i valori di chemical shifts a tutti i protoni e ai corrispondenti carboni come riportato in **Tabella 2**. Tale struttura era anche confermata dai dati dello spettro HR ESI MS registrato in modalità positiva. Tale spettro evidenziava la presenza degli addotti col potassio e con il sodio a m/z di 289 $[M+K]^+$ e 273.1478 $[M+Na]^+$, 251 $[M+H]^+$ (**Fig. 33**). Nello spettro IR la mancanza della banda a 1659 cm^{-1} era un'ulteriore conferma della mancanza del doppio legame tra C-11 e C-13 (**Fig. 34**), mentre l'assorbimento a 270 nm nello spettro UV molto simile a quello osservato nello spettro dell'inuloxina A, confermava la presenza del gruppo carbonilico α - β insaturo del ciclodecenone. Le correlazioni osservate nello spettro NOESY (**Fig. 32**) consentivano di assegnare le configurazioni relative ai C-5, C-7, C-8 e

C-10, che risultavano essere le stesse per quelle osservate per il composto **1**. Infatti H-7 correlava con H-8, mentre erano assenti le correlazioni tra H-10 e H-8 e tra Me-14 e H-5. Al C-11 era possibile assegnare una configurazione S* sulla base della correlazione osservata tra H-11 e H-7. Sulla base di tali risultati l'inuloxina B poteva essere denominata come un (4E, 7R*, 8R*, 10S*, 11S*)-3-osso-germacr-4-en-8 β -12-olide. L'inuloxina B risultava essere correlata al sesquiterpene lattonico, diidrocostunolide (Sathe et al., 1968), preparato sinteticamente a partire dal costunolide a sua volta isolato da *Sassurea lappa* (Rao et al., 1960). Tali metaboliti, erano precedentemente studiati solo per i comportamenti allo spettrometro di massa ad impatto elettronico (Sathe et al., 1968; Sathe et al., 1969), mentre non era condotto nessuno studio sulla loro attività biologica. In ogni modo il diidrocostunolide differiva dall'inuloxina B per la giunzione *trans* tra l'anello 2-furanone e l'anello a 10 termini, per la stereochimica invertita al C-11 mentre mancava la stereochimica relativa al C-10.

4.3 Determinazione della struttura dell'inuloxina C

Come dedotto dall'analisi dello spettro HR ESIMS registrato in modalità positiva, l'inuloxina C (**3**, **Fig. 16**) aveva la stessa formula molecolare dell'inuloxina A C₁₅H₂₀O₃, ma differiva per i diversi gruppi funzionali presenti nel macrociclo a 10 termini. Gli spettri ¹H e ¹³C NMR evidenziavano rispetto a quelli di **1** sia la mancanza del carbonio carbonilico che del doppio legame trisostituito (**Tabella 2**, **Fig. 35 e 36**). Inoltre tali spettri mostravano la presenza nell'anello a 10 termini di un gruppo ossidrilico terziario e di un gruppo metilenico esociclico. La presenza di tali gruppi funzionali era confermata dallo spettro IR (**Fig. 42**) che evidenziava essenzialmente la presenza di bande a 3428, 1665 e 1635 cm⁻¹ dovute alla presenza del gruppo ossidrilico e dei due doppi legami (Nakanishi e Solomon 1977). I due protoni olefinici

risuonavano nello spettro ^1H NMR a δ 5.00 e δ 5.13 ed apparivano come dei *broad* singoletti. Nello spettro ^{13}C NMR i due carboni appartenenti a tale doppio legame risuonavano a δ 146.0 e δ 117.7. La posizione del doppio legame esociclico del macrociclo era assegnata utilizzando le correlazioni osservate nello spettro HMBC tra i protoni (H₂-15) del doppio legame e i carboni C-2 e C-9 (**Tabella 3** e **Fig. 39**). Inoltre, tale posizione era confermata dalle correlazioni osservate nello spettro NOESY (**Tabella 4** e **Fig. 40**) tra H-15A e i due protoni del gruppo metilenico presente in posizione 2, e del protone H-15B con i due protoni dell'altro gruppo metilenico in posizione 9. Il carbonio terziario ossidrilato (C-5) risuonava nello spettro ^{13}C NMR a δ 80.9. Lo spettro HMBC mostrava le correlazioni di questo carbonio C-5 con Me-14 e con i due protoni del gruppo metilenico in posizione 3. Inoltre Me-14, che nello spettro ^1H NMR risuonava come un singoletto a δ 1.24 e nello spettro ^{13}C NMR a δ 24.1 correlava con il carbonio quaternario adiacente (C-10) che risuonava a δ 59.3 (Pretsch *et al.*, 2000, Breitmaier e Voelter 1987). Questi risultati supportavano l'ipotesi della presenza nell'inuloxina C, di due anelli a sei termini uno dei quali era congiunto con stereochimica *cis* al 2-furanone 3,3,4,5-tetrasostituito. I due anelli a 6 termini risultavano congiunti attraverso i carboni C-5 e C-10. Lo spettro di massa registrato in modalità positiva mostrava la presenza, del dimero sodiato e degli addotti col sodio e col potassio rispettivamente a m/z di 519 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 271.1319 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 287 $[\text{M}+\text{K}]^+$. Inoltre lo spettro mostrava la presenza dello ione pseudomolecolare a m/z di 249 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e di uno ione a m/z di 253 $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$, dovuto alla perdita di H_2O dall'addotto col sodio. Gli accoppiamenti osservati negli spettri COSY, HSQC e HMBC (**Tabella 2** e **3**, **Fig. 37**, **38** e **39**) permettevano di confermare i fattori strutturali ipotizzati per il composto **3** e di assegnare i chemical shifts a tutti i protoni e ai carboni corrispondenti. Quindi l'inuloxina C poteva in tal modo essere formulata come un 1,15-metilene-5 β -idrossi-eudesm-1(15),11(13)-dien-8 β -12-olide.

La correlazione osservata nello spettro NOESY (**Tabella 4** e **Fig. 40**) tra H-8 ed Me-14 permetteva di assegnare una stereochimica R* al C-10. La giunzione *cis* tra il 2-furanone e l'anello adiacente a 6 termini era supportata, dalla correlazione osservata tra H-7 e H-8. Le suddette correlazioni permettevano in tal modo di assegnare la configurazione relativa ai carboni chirali presenti nell'inuloxina C, che risultavano essere 7R*, 8R*, 10R*. La stereochimica relativa al C-5 era determinata mediante la preparazione del derivato 5-O-acetil-inuloxina C (**6**) ottenuto mediante una tradizionale acetilazione condotta con piridina e anidride acetica (**Schema 3**). Gli spettri del derivato **6** confermavano la struttura assegnata all'inuloxina C. Lo spettro IR della 5-O-acetil-inuloxina C (**Fig. 43**) mostrava la mancanza della banda relativa al gruppo ossidrilico e la presenza di una banda a 1725 cm⁻¹ tipica del gruppo carbonilico del gruppo acetilico. Lo spettro ¹H NMR (**Fig. 44**) differiva da quello dell'inuloxina C essenzialmente per la presenza di un singoletto a δ 2.00, dovuto alla presenza dell'acetile. Lo spettro ESI-MS mostrava la presenza del dimero sodiato e dell'addotto col sodio rispettivamente a *m/z* di 603 [2M+Na]⁺ e 313 [M+Na]⁺. Inoltre lo spettro evidenziava la presenza di due ioni di frammentazione a *m/z* di 543 [2M+Na-AcOH]⁺ e 253 [M+Na-AcOH]⁺ generati dal dimero sodiato e dall'addotto sodiato per perdita di acido acetico. Lo spettro ESIMS registrato in modalità negativa evidenziava la presenza dello ione pseudomolecolare a *m/z* di 289 [M-H]⁻.

L'assenza della correlazione nello spettro NOESY (**Fig. 45** e **46**) tra l'acetile e Me-14 permetteva di assegnare una configurazione relativa R* al C-5. Essendo l'ossidrilico posizionato in β una stereochimica α era assegnata a Me-14. Sulla base dei risultati descritti, l'inuloxina C poteva essere formulata come un (5R*, 7R*, 8R*, 10R*)-1,15-metilene-5β-idrossi-eudesm-1(15),11(13)-dien-8β-12-olide. L'inuloxina C era correlata ad un eudesmanolide precedentemente isolato da *Artemisia umbelliformis*, avente il sistema a dieci termini con

giunzione *cis* e *trans*, ma mostrava il gruppo etilenico CH₂-15 e il metile Me-14 rispettivamente in posizione 4 e in 1 (Appendino *et al.*, 1983).

4.4 Determinazione della struttura dell'inuloxina D

L'inuloxina D (**4**, **Fig. 17**) aveva la stessa formula molecolare dell'inuloxina B C₁₅H₂₂O₃, come dedotto dallo spettro HR ESIMS registrato in modalità positiva. Differiva dal composto **2** per lo scheletro carbonioso e per i diversi gruppi funzionali. Negli spettri ¹H e ¹³C NMR (**Tabella 2** e **Fig. 47** e **48**) i segnali dovuti ai carboni e ai protoni del 2-furanone e quelli del sistema a 6 termini del macrociclo ad esso congiunto non erano molto diversi da quelli osservati per l'inuloxina A. Mentre lo spettro IR mostrava la presenza di bande molto simili a quelle osservate per l'inuloxina C (**Fig. 54**). Questi dati suggerivano quindi la presenza nell'inuloxina D di un sistema benzofuranonico. Oltre a tale sistema erano anche presenti i segnali di una catena 4-idrossiesan-2-ile. Questa ipotesi era confermata dalla presenza di un carbonio secondario ossidrilato (CH-4) che risuonava nello spettro ¹³C NMR δ 66.3 mentre il corrispondente protone risuonava nello spettro ¹H NMR come un multipletto a δ 3.80 (Pretsch *et al.*, 2000, Breitmaier e Voelter 1987). Questo carbonio insieme al metile adiacente in posizione 15 rappresentavano la coda della suddetta catena laterale legata al C-10 del sistema benzofuranonico. Infatti nello spettro COSY (**Fig. 49**) H-4 era accoppiato al Me-15 che si presentava come un doppietto (d, *J* = 6.2 Hz) a δ 1.24 e a due protoni appartenenti ad un gruppo metilene (CH₂-3) entrambi risuonanti come multipletti a δ 1.48 e δ 1.52. Questi ultimi a loro volta erano accoppiati ad altri due protoni di un altro gruppo metilenico adiacente (CH₂-2) che risuonavano come dei multipletti a δ 2.04 e δ 2.06. Questi a loro volta accoppiavano con un protone (H-1) di un carbonio secondario (C-1) che risuonava come un multipletto a δ 2.39. H-1 a sua volta correlava

con il metile adiacente (Me-14) che risuonava come un doppietto (d, $J = 6.9$ Hz) a δ 1.16. Le correlazioni osservate nello spettro HSQC (**Fig. 50**) permettevano di assegnare i chemical shifts a tutti gli altri carboni della catena laterale: C-3 a δ 36.7, C-2 a 35.4, C-1 a 33.8, Me-15 a 22.6 e Me-14 a 19.8. Gli accoppiamenti osservati nello spettro HMBC (**Tabella 3** e **Fig. 51**) tra C-9 e C-10 con Me-14 e tra C-1 con H-5 e H₂-9 consentivano di legare tale catena al carbonio olefinico quaternario C-10 del sistema benzofuranonico. C-10 nello spettro ¹³C NMR risuonava a δ 144.3 e correleva con due protoni del gruppo metilenico CH₂-9 che nello spettro ¹H NMR risuonavano come due multipletti a δ 2.01 e a δ 1.98. Questi protoni erano a loro volta correlati al carbonio olefinico CH-5 che risuonava come un doppio doppietto (dd $J = 8.7, 4.9$ Hz) a δ 5.52 e nello spettro ¹³C NMR risuonava a δ 118.7. I due protoni del gruppo metilene adiacente CH₂-6 che risuonavano come due multipletti a δ 2.48 e δ 2.21 nello spettro ¹H NMR correlevano oltre che con C-5 anche con C-8. Questo risultato consentiva di individuare il carbonio 6 come chiusura del sistema tetraidro benzofuranonico. Gli accoppiamenti osservati negli spettri COSY ed HSQC, permettevano di assegnare i chemical shifts a tutti i protoni e ai corrispondenti carboni come riportato in **Tabella 2**. Sulla base di questi risultati l'inuloxina D poteva essere formulata come l' 1,4-dimetil-4-idrossi-secoeudesm-5(10),11(13)-dien-8 β -12-olide. Tale struttura era confermata dallo spettro HR ESIMS registrato in modalità positiva. Questo spettro mostrava la presenza dello ione pseudomolecolare a m/z di 251.1658 [M+H]⁺ e dello ione a m/z di 233 [M+H-H₂O]⁺, generato da quest'ultimo per perdita di H₂O (**Fig. 53**). La stereochimica relativa dell'inuloxina D era dedotta dagli accoppiamenti osservati nello spettro NOESY (**Tabella 4** e **Fig. 52**). In particolare, come descritto precedentemente per le altre inuloxine, era osservato, anche in questo caso, una correlazione tra H-7 e H-8, che supportava la giunzione *cis* tra l'anello furanonico e l'anello a 6 termini. Quindi una configurazione R* era assegnata sia al C-7 che al

C-8. La stereochimica assoluta era assegnata al C-4 della catena 5-idrossiesan-2-ile applicando il metodo di Mosher modificato (Ohtani *et al.*, 1991). Il composto **4** era convertito nei corrispondenti esteri diastereoisomeri S-MTPA e R-MTPA (rispettivamente **7** e **8**) mediante la reazione con il cloruro dell'acido R-(-)- α -metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) e con S-(+) MTPA (**Schema 4**). I dati spettroscopici dei due derivati **7** e **8** erano totalmente concordi con la struttura assegnata all'inuloxina D. Il paragone dei dati ^1H NMR (**Tabella 5**, **Fig. 55** e **56**) di **7** e **8** [$\Delta\delta$ (**7-8**): Me-15-0.075; H-7+0.014; H-6A+0.018; H-6B+0.013; H-5+0.064; H-9A+0.035; H-9B+0.103; H-8+0.036; H-1+0.072; H-2A+0.030; H-2B+0.031; H-3A+0.099; H-3B+0.118; Me-14+0.068] consentiva di assegnare una configurazione S al C-4.

Sulla base di tali risultati l'inuloxina D poteva essere denominata come il (4*S*,7*R**,8*R**)-1,4-dimetil-4-idrossi-secoeudesm-5(10),11(13)-dien-8 β -12-olide. L'inuloxina D risultava essere correlata ad alcuni seceudesmanolidi come l'ivangulin, l'eriolangin e l'eriolanin isolati da *Iva angustifolia* e da *Eriophyllum lanatum*. Questi differivano dall'inuloxina D per i diversi gruppi funzionali del cicloesene e della la catena laterale legata. Nessun'altra attività era riportata sia per l'eriolangin che per l'eriloanin eccetto l'attività antileucemica (Herz *et al.*, 1967; Kupchan *et al.*, 1973).

4.5. Identificazione dell'acido- α -costico

Il metabolita principale di *Inula viscosa* (1.14g/kg, **9**, **Fig. 57**) era isolato dalla seconda e terza frazione della prima colonna di purificazione del corrispondente estratto organico. Tale metabolita era identificato come l'acido- α -costico mediante il confronto con i dati fisici (OR) e spettroscopici (^1H NMR, IR e UV) riportati precedentemente in letteratura. L'acido- α -costico era stato precedentemente isolato dalla stessa pianta come metabolita con ridotta attività antifungina

(Shtacher e Kashaman 1970). Studi precedenti riportano sia la sintesi completa (Iiu e Wynn 1985) che quella enantioselettiva dell'acido- α -costico (Chen *et al.*, 2011). Comunque poiché solo pochi dati dello spettro protonico e nessun dato dello spettro ^{13}C NMR erano riportati precedentemente, una completa assegnazione era effettuata utilizzando gli spettri COSY, HSQC, HMBC e NOESY (**Tabella 6**). L'acido- α -costico aveva una formula molecolare $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ come dedotto dallo spettro ESI-MS che mostrava la presenza dello ione pseudomolecolare a m/z 235 $[\text{M}-\text{H}]^+$ e dello ione a m/z 189 $[\text{M}-\text{COOH}]^+$ generato da quest'ultimo mediante perdita del carbossile. La presenza del carbossile era consistente nello spettro IR che mostrava la presenza di una tipica banda a 2916 cm^{-1} . Il carbonio del gruppo carbossilico risuonava nello spettro ^{13}C NMR a δ 171.9 e nello spettro HMBC risultava correlato ai due protoni olefinici del gruppo metilenico esociclico (H_2 -13). Questi protoni nello spettro ^1H NMR risuonavano come dei singoletti a δ 6.32 e δ 5.68. Il carbonio corrispondente nello spettro ^{13}C NMR risuonava a δ 125.4 e nello spettro HMBC era accoppiato ad H-7 che risuonava come un *broad* tripletto (brt $J=13.1$, 12.6 e 3.7) a δ 2.42 nello spettro ^1H NMR mentre nello spettro ^{13}C NMR era osservato a δ 40.0 nel ^{13}C NMR. Le correlazioni osservate nello spettro HMBC tra C-7 e H_2 -13, H-5, H_2 -8, H-6A mostravano che C-7 era il carbonio di giunzione tra l'anello B e la catena laterale. I carboni ed i protoni del sistema decalinico erano attribuiti sulla base delle correlazioni osservate negli spettri COSY, HSQC e HMBC e riportati in **tabella 6**. In particolare le correlazioni in quest'ultimo spettro tra C-5 e H_2 -2, Me-15, H-6A, H_2 -9 e Me-14 e del C-10 con H-9A, H-8B e H-2B individuavano anche i carboni a testa di ponte tra gli anelli A e B. La configurazione relativa del composto **9**, come rappresentato in Figura **57**, era confermata dalle correlazioni osservate nello spettro NOESY (Berger e Braun 2004). Infatti erano osservate le correlazioni tra i due protoni olefinici H-13A e H-13 B, tra quest'ultimo e H-6B, tra H-3 e H-2A ed Me-15, tra H-7 e H_2 -8 e

H-9A, tra H-2A e H₂-1 ed Me-14 ed infine tra H-2B e H₂-1. La mancanza di correlazione tra H-5 e Me-14 e la correlazione osservata tra H-7 e H-5 confermavano la giunzione *trans* tra gli anelli A e B ed una stereochimica R* al carbonio C-7. Pertanto l'acido- α -costico poteva essere denominato un (3Z,5R*,7R*,10R*) acido eudesma 3,11(13)-dien-12-oico.

4.6 Attività erbicida su *Cuscuta campestris* delle inuloxine A-D , dei loro derivati e dell'acido- α -costico

I saggi effettuati sull'estratto organico e sui metaboliti puri isolati da *Inula viscosa* sono stati condotti presso il laboratorio della Dott.ssa Nadjia Zermane dell'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Algeri, Algeria, secondo le modalità riportate nella parte sperimentale.

Saggiate su semi di *Cuscuta campestris* (**Tabella 7** e **Fig. 58**) ad una concentrazione 1.6×10^{-3} M, le inuloxine A, C e D (**1**, **3** e **4**) inibivano quasi completamente la germinazioni di tali semi. L'inuloxina B (**2**) saggiata alla stessa concentrazione induceva una minima riduzione della germinazione dei semi pari al 45%. L'inuloxina C acetilata (**6**) induceva una riduzione della germinazione del 76%, mentre il diazo derivato dell'inuloxina A (**5**) era completamente inattivo. Il metabolita principale, l'acido- α -costico (**9**) saggiato ad una concentrazione 1.7×10^{-3} M inibiva la germinazione dei semi del 76%. Quando erano saggiati ad una concentrazione dieci volte inferiore, tutti i metaboliti e i loro derivati erano completamente inattivi.

4.7 Attività erbicida su *Orobanche crenata* delle inuloxine A-D, dei loro derivati e dell'acido- α -costico

Le inuloxine A, C e D (**1**, **3** e **4**) saggiate ad una concentrazione 4.0×10^{-4} M inibivano completamente la germinazione dei semi di *Orobanche crenata* (**Tabella 7** e **Fig. 59**). Alla stessa

concentrazione l'inuloxina B (2) e il diazo derivato dell'inuloxina A (5) erano completamente inattivi. L'inuloxina C acetilata (6) riduceva in modo significativo la germinazione dei semi del 34%. Saggiati ad una concentrazione dieci volte inferiore tutte le inuloxine, i loro derivati e l'acido- α -costico perdevano la loro attività, mentre l'inuloxina C (3) mostrava ancora un significativo effetto inibente la germinazione. Saggiato sui semi di *O. crenata* ad una concentrazione 4.3×10^{-4} M l'acido- α -costico (9) stimolava la germinazione dei semi del 57% rispetto allo stimolante sintetico GR24 (Tabella 7) (Johnson *et al.*, 1976; Zwanenburg *et al.*, 2009). Tutti i composti fatta eccezione dell'acido- α -costico, riducevano il tubo germinativo dei semi di *O. crenata* in un range 48% -100% rispetto al controllo. Questo effetto inibente era preservato anche quando le inuloxine ed i loro derivati erano saggiati ad una concentrazione dieci volte inferiore. L'effetto soppressivo maggiore era fornito dall'inuloxina C. I risultati dei saggi consentivano di ipotizzare che la presenza dell'anello 2-furanone tetrasostituito è un elemento strutturale importante per l'attività. I differenti anelli congiunti al 2-furanone come octaidrociclododecenone, decaidronafto e tetraidrobenzo presenti rispettivamente nell'inuloxine A e B, C e D, e i loro gruppi funzionali non sembrano avere un ruolo rilevante nell'impartire tale attività biologica. Invece, la presenza nell'anello furanonico del gruppo metilenico esociclico, gioca un ruolo fondamentale per l'attività, infatti quando questo è saturo come nel caso dell'inuloxina B, l'attività nel complesso risulta inferiore. Un altro gruppo strutturalmente importante per l'attività nell'inuloxina C è il gruppo ossidrilico terziario legato al C-5. Infatti l'acetilazione di tale gruppo induceva una riduzione dell'attività sia sui semi di *O. crenata* che su quelli di *C. campestris*.

5. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi riporta l'isolamento e la caratterizzazione dei principali metaboliti prodotti da *Inula viscosa*, pianta appartenente alla famiglia delle *Asteraceae* e molto diffusa nella area Mediterranea. In particolare sono stati isolati dalla parte aerea di tale piante, oltre al noto metabolita, l'acido- α -costico, anche quattro nuove fitotossine, denominate inuloxine A-D. Queste fitotossine appartengono alla classe dei sesquiterpeni lattonici (Turner e Aldridge 1983; Dewick 2009; Osbourn e Lanzotti 2009). Le strutture delle 4 inuloxine erano determinate mediante tecniche spettroscopiche quali l' NMR mono e bidimensionale dell' ^1H e del ^{13}C , l'IR, l'UV, la spettrometria di massa e mediante l'utilizzo di metodi chimici. Le configurazioni relative erano determinate mediante le correlazioni osservate negli spettri NOESY. La configurazione relativa al C-5 dell'inuloxina C era determinata utilizzando la stessa tecnica NOESY sul derivato acetilato. La configurazione assoluta al C-4 della catena laterale 4-idrossiesan-2-ile dell'inuloxina D era determinata applicando il metodo di Mosher modificato. Per condurre studi preliminari di correlazione struttura-attività, un derivato dell'inuloxina A ed uno dell' inuloxina C erano preparati. I due derivati erano preparati mediante reazione di acetilazione e di diazotazione dai corrispondenti metaboliti naturali. L'attività fitotossica delle inuloxine, dei loro derivati e dell'acido- α -costico era valutata su due specie di piante parassite, *Orobanche crenata* e *Cuscuta campestris*. L'inuloxine A, C e D esibivano un'elevata attività su entrambe le specie portando ad un'inibizione della germinazione dei semi del 100%. L'inuloxina B risultava essere meno attiva nell'inibire la germinazione dei semi di *Cuscuta* e completamente inattiva sulla germinazione dei semi di *Orobanche*. Il metabolita principale, l'acido- α -costico, aveva un effetto inibente la germinazione dei semi di *Cuscuta* e un'attività stimolante sulla

germinazione dei semi di *Orobanche*. Le attività delle inuloxine e dei loro derivati hanno permesso pertanto di stabilire alcune correlazioni struttura-attività e quindi di determinare i gruppi fondamentali per l'attività. Un gruppo funzionale necessario nelle inuloxine per l'attività risultava essere l'anello 2-furanone tetrasostituito. Un ruolo importante per l'attività biologica era anche svolto dal gruppo metilenico esociclico del 2-furanone. Un ruolo è anche svolto da gruppo ossidrilico terziario presente nell'inuloxina C.

6. BIBLIOGRAFIA

Abang M. M., Bayaa B., Abu-Irmaileh B. E., Yahyaoui A. A participatory farming system approach for sustainable broomrape (*Orobanche* spp.) management in the Near East and North Africa, *Crop Protection* **2007**, *26* 1723-1732.

Abouzeid, M. A., Boari, A., Zonno, M. C., Vurro, M., Evidente A. Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramosa*. *Weed Sci.* **2004**, *52*, 326-332.

Allred K. T., Tingey D. L. Germination and spring emergence of dodder as influenced by temperature. *Weeds.* **1964**, *12*, 45-48.

Andolfi A., Boari A., Evidente A., Vurro M. Metabolites Inhibiting Germination of *Orobanche ramosa* Seeds Produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1598-1603.

Appendino G., Garboldi P., Nano G. M. Isomeric hydroperoxyeudesmanolides from *Artemisia umbelliformis*. *Phytochemistry.* **1983**, *22*, 2767-2772.

Ballio A., Brufani M., Casinovi G. C., Cerrini S., Fedeli W., Pellicciari R. Structure of fusicoccin A. *Experientia*, **1968** , *24*, 631-635.

Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E. B., Ohnsorge U. F. W., Thomas R. The Constitution of Fusicoccin. *Chem. Commun.* **1968**, 1198-1200.

Berger, S., Braun, S. 200 and More Basic NMR Experiments: a Practical Course, first ed. Wiley-VCH, Weinheim **2004**.

Bohlmann F., Mahanta P. K., Jakupovic J., Rastogi R. C., Natsu A. A. Naturally occurring terpene derivatives. Part. 142. New sesquiterpene lactones from *Inula viscosa* species. *Phytochemistry.* **1978**, *17*, 1165-1172.

- Breitmaier E., Voelter W. Carbon-13-NMR Spectroscopy. VCH, Weinheim. **1987**, 183-280.
- Capasso R., Evidente A., Cutignano A., Vurro M., Zonno M. C., Bottalico A. Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. *Phytochemistry*. **1996**, 41, 1035-1039.
- Carey F. A., Sundberger R. J. Advanced Organic Chemistry. Part B: Reaction and synthesis. Kluwer Academic/Plenum, New York. **2000**.
- Chen, Y., Zhou, G., Liu L., Xiong Z., Li Y.. Enantioselective total synthesis of eudesma-3,11(13)-dien-12-oic acid. *Synthesis*. **2001**, 9, 1305-1307.
- Chiappini I., Fardella G., Menghini A., Rossi C. Flavonoids from *Dittrichia viscosa*. *Planta Med.* **1982**, 44, 159-161.
- Cook C. E., Whichard L. P., Wall M. E., Egley G. H., Coggon P., Luhan P. A., McPhail A. T., Germination stimulants II. The structure of strigol-a potent seed germination stimulant of witchweed (*Striga lutea* Lour) *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6198-6199.
- Cooke D. A., Black I. D. Biology and Control of *Cuscuta campestris* and Other *Cuscuta* spp: A Bibliographic Review. South Australian Department of Agriculture, Adelaide, Australia. **1987**.
- Cum G., Spadaro A., Citraro T., Gallo R. *Inula viscosa* (L.) Aiton. – Part2: Extraction process and chemical characterization of the essential oil. *Essenze e Derivati Agrumari*. **2001**
- Dawson J. H., Musselman L. J., Wolswinkel P. D. Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed Sci.* **1994**, 6, 265-317.
- Dean H. L. Dodder overwintering as haustorial tissues within *Cuscuta*-induced galls. Iowa. *Acad. Sci.* **1954**, 61, 99-106.
- Dewick P. M. Medicinal natural products- A biosynthetic approach, third. Eds: J. Wiley & Sons Ltd., Chicester. **2009**, 210-234.

- Diaz M. G. Estudios de relacion estructura-actividad (SAR) en inductores de la germinacion de especies de *Orobanchae*, Universidad de Cadiz, Tesis Doctoral, **2009**.
- Evidente A., Andolfi A., Fiore M., Boari A., Vurro M. Stimulation of *Orobanchae ramosa* seed germination by fusicoccin derivatives: A structure–activity relationship study. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 19-26.
- Evidente A., Cimmino A., Fernández-Aparicio M., Rubiales D., Andolfi A., Melck D. Soyasapogenol B and *trans*-22-dehydrocam- pesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination. *Pest Manag. Sci.* **2011**, *67*, 1015-1022.
- Evidente A., Fernández-Aparicio M., Andolfi A., Rubiales D., Motta A. Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane by *Trigonella foenum-graecum* root exudate, inhibiting agent of *Orobanchae crenata* seed germination. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2487-2492.
- Evidente A., Fernández-Aparicio M., Cimmino A., Rubiales D., Andolfi A., Motta A. Peagol and peagoldione, two new strigolactone like metabolites isolated from pea root exudates. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6955-6958.
- Fer A. Absorption, translocation and metabolism of phosphates by *Cuscuta gronovii* Willd. seedlings during their preparasitic stage. *Biol. Plant.* **1976**, *18*, 450–459.
- Fernández-Aparicio M., Emeran A. A., Rubiales D. Control of *Orobanchae crenata* in legumes intercropped with fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Crop Prot.* **2008**, *27*, 653-659.
- Fernández-Aparicio M., Sillero J. C., Rubiales D. Intercropping with cereals reduces infection by *Orobanchae crenata* in legumes. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 1166-1172.
- Foy C. L., Jain R., Jacobsohn R. Recent approaches for chemical control of broomrape (*Orobanchae* spp.) *Rev. Weed Sci.* **1989**, *4*, 123–152.
- Fraga M. B. Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 669-693.

- Fry, W. Phytophthora infestans: the plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol.* **2008**, *9*, 385-402.
- Gayla A., Dovrat S., Bessler H., Grossman S., Nir U., Bergman M. Inhibition of inflammatory cytokine secretion by plant-derived compounds inuviscolide and tomentosin: the role of NFkB and STAT1. *Open Pharmacol. J.* **2010**, *4*, 36-44.
- Grenz H. J., Sauerborn J. The potential of organic agriculture to contribute to sustainable crop production and food security in Sub-Saharan Africa. Eds: Christian Hulsebusch, Florian Wichern, Hans Hemann, Peter Wolff. *Journal of Agriculture and Rural Development in the tropics an subtropic.* **2007**, 50-66.
- Haidair M. A., Orr G. L., Westra P. Effects of light and mechanical stimulation on coiling and prehaustoria formation in *Cuscuta* spp. *Weed Res.* **1997**, *37*, 219–228.
- Hauck C., Muller S., Schildknecht H. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *J. Plant. Physiol.* **1992**, *139*, 474-478.
- Hernández, V., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M., Ríos, J.L.,. Effects of naturally occurring dihydro flavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sci.* **2007**, *81* 480-488.
- Herz W., Govindan S. V. Glycosidic disecoeudesmanolides and other seco-seco-terpene lactones from *Picradeniopsis* species. X-ray analysis of bahia. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3163-3172.
- Herz W., Sumi Y., Sudarsanam V., Raulais A. Constituents of *Iva* specie IX. Ivangulin, a novel seco-eudesmanolide from *Iva angustifolia*. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3568-3662.
- Holm L., Doll J., Panch J., Harberger J. World Weeds: Natural Histories and Distribution. John Willey & Sons, New York, USA **1997**.

- Humphrey A. J., Galster A. M., Beale M. H. Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 592-614.
- Hutchison J. M., Ashton F. M. Germination of field dodder (*Cuscuta campestris*). *Weed Sci.* **1980**, *28*, 330-333
- Joel D. M., Hershenhorn J., Eizenberg H., Aly R., Ejeta G., Rich P.J. Biology and management of weedy root parasites. *Hortic. Rev.* **2007**, *33*, 267-349.
- Joel D. M., Steffens J. C., Matthews D. E. Germination of weedy root parasites. In Kigel J. Galili G. Eds: Seed development and germination. Marcel- Dekker. New York **1995**, 567-599.
- Johnson A., Rosebery G., Parker C. A. A novel approach to *Striga* and *Orobancha* control using germination stimulant. *Weed Res.* **1976**, *16*, 223-227.
- Khatri,P., Draghici,S., Ostermeier,G. C., Krawetz,S. A. Profiling gene expression using onto-express. *Genomics.* **2002**, *79*, 1-5.
- Kroschel J. A. Technical manual for parasitic weed research and extension. Kluwer Dordrecht. The Netherlands. **2001**, 256.
- Kupchan S. M., Baxter R. L., Chiang C. K., Gilmore C. J., Bryan R. F. Eriolangin and eriolanin, novel antileukaemic seco-eudesmanolides from *Eriophyllum lanatum*. *J. C. S. Chem. Commun* **1973**, 842-843.
- Liu H. J., Wynn H. The total synthesis of (\pm)- α -costal. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4843-4846.
- Maoz M., Kashman Y., Neeman I. Isolation and identification of a new antifungal sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Planta Med.* **1999**, *65*, 281-282.
- Maoz M., Neeman I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 479-482.

Mueller-Riebau F. J., Berger B. M., Yegen O. Chemical-composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oil of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agr. Food Chem.* **1995**, *43*, 2262-2266.

Muhammad I., Takamatsu S., Mossa J. S., El-Feraly F. S., Walker L. A., Clark A. M., *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 168-173.

Musselman L.J., Bolin J. F. New infestation of branched broomrape, *Orobanche ramosa* (Orobanchaceae), on black medic, (*Medicago lupulina*) (Fabaceae), in Virginia. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 315.

Nakanishi K., Solomon P. H. Infrared Absorption Spectroscopy, second Eds: Holden Day, Oakland. **1977**, 17-44.

Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.

Oksuz S. Ψ -Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Planta Med.* **1976**, *29*, 343-345.

Osborn A. E., Lanzotti V. Plant-derived natural products. Springer, Dordrecht. **2009**, 38-39.

Oswald A., Ransom J. K., Kroschel J., Sauerborn J. Intercropping controls *Striga* in maize based farming systems. *Crop Prot.* **2002**, *21*, 9-16.

Panetta F. D., Lawes R. Evaluation of the Australian Branched Broomrape (*Orobanche ramosa*) Eradication program. *Weed Sci.* **2007**, *55*, 644-651.

Parker C. Observation on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems world wide. *Pest. Manag Sci.* **2009**, *65*, 453-459.

Parker C. The present state of the *Orobanche* problem, in *Biology and Management of Orobanche, Proceedings of the Third International Workshop on Orobanche and Related Striga*

Research. Eds: Pieterse A. H., Verkleij J. A. C., Borg S. J. Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands, **1994**, 17–26.

Parker C. e Riches C. R., *Parasitic Weeds of the World: Biology and Control*. CAB International, Wallingford, UK, **1993**, 332.

Pretsch E., Buhlmann P., Affolter C. *Structure determination of organic compounds – Table of spectra data*. Springer-Verlag. Berlin. **2000**, 161-243.

Rao A. S., Kelkar G. R., Bhattacharyya S. C. Terpenoids. XXI. Structure of custunolide, a new sesquiterpene lactone from costus root oil. *Tetrahedron*. **1960**, 9, 275-283.

Rispail N., Jorin J., Rubiales D. Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New. Phytol.* **2007**, 173, 703-712.

Rozenblat S., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H., Cohen Y., Dovrat S. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 75, 369-382.

Sathe R. N., Kulkarni G. H., Kelkar G. R. Terpenoids. CXVIII. Partial hydrogenation of dihydrocostunolide. *Indian J. Chem.* **1968**, 6, 122-123.

Sathe R. N., Kulkarni G. H., Kelkar G. R., Das K. G. Terpenoids. CXXXVII: Fragmentation of costunolide and its derivatives under electron-impact. *Org. Mass Spectr.* **1969**, 2, 935-945.

Sauerborn, J. Economic importance of Phyto parasites *Orobanchae* and *Striga*. Eds: Ransom J.K., Musselman L. J., Worsham A. D, Parker C. Proceedings of the 5th International symposium on parasitic weeds, CIMMYT, Nairobi, Kenya, **1991**, 137-143.

Schinella, G.R., Tournier, H.A., Priero, J.M., Mordujovich de Buschiazzo, P., Ríos J.L., Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.* **2002**, 70, 1023-1033.

Schneeweiss G. M. A., Colwell J. M., Park C. G., Jang T. F., Stuessy T. F. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from nuclear ITS-sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2004**, *30*, 465-478.

Schneeweiss G. M. *List of Actual and Potential Broomrape Pest Species*. [Online]. <http://www.botanik.univie.ac.at/plant/chorology/PestSpeciesOrobanche.pdf> **2009**.

Scott A. Interpretation of the ultraviolet spectra of Natural products. Pergamon Press Ltd. Oxford. **1994**, 45-88.

Shtacher G., Kashman, Y. 12-Carboxyudesma-3,11(13)-diene. Novel sesquiterpenic acid with a narrow antifungal spectrum. *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 1221-1223.

Siame B. A., Weerasuriya Y., Wood K., Ejeta G., Butler L. G. Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1486-1491.

Simoes F., Nascimento J. Constituents of *Dittrichia viscosa* subsp. *Viscosa*. *Fitoterapia.* **1990**, *61*, 553-554.

Stewart G. R., Press M. C. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Rev. Pl. Physiol. Molec. Biol.* **1990**, *41*, 127-151.

Surov T., Aviv D., Aly R., Joel D. M., Goldman-Guez T., Gressel J. Generation of transgenic asulam-resistant potatoes to facilitate eradication of parasitic broomrapes (*Orobanche* spp.), with the *sul* gene as the selectable marker. *Theor. Appl. Genet.* **1997**, *96*, 132-137.

Turner W. B., Aldridge D. C. Fungal metabolites II. Academic press. London. **1983**. 228-272.

Vail S. L., Dailey O. D., Blanchard E. J., Pepperman A. B., Riopel J. L. Terpenoid precursors of strigol as a seed germination stimulant of broomrape (*Orobanche ramosa*) and witchweed (*Striga asiatica*). *J. Plant Reg.* **1990**, *9*, 77-83.

- Wang, W., Ben-Daniel, B.H. Cohen, Y.,. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Dis. Control Pest Manage.* **2004**, *94*, 1042-1047.
- Wollenweber E., Mayer K., Roitman J. N. Exudates flavonoids of *Inula viscosa*. *Phytochemistry.* **1991**, *30*, 2445-2446.
- Xie X. , Kusumoto D., Takeuchi Y., Yoneyama K., Yamada Y. 2'-*epi*-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8067-8072.
- Yokota T., Sakai H., Okuno K., Yoneyama K., Takeuchi Y. Alechol and Orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 1967-1973.
- Yoneyama K., Ayman A. A., Xie X., Yoneyama K., Takeuchi Y. Strigolactones as Germination Stimulants for Root Parasitic Plants. *Plant Cell. Physiol.* **2010**, *51*, 1095-1103.
- Zermane N., Vurro M., Boari A., Avolio F., Andolfi A., Evidente A. Towards broomrape and field dodder management using natural metabolites from plants. Abstract of 11th World Congress on Parasitic Plants, 7-12 June 2011, Martina Franca, Italy, 82.
- Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Reizeman A., Anikumar G., Sethumadhavan D. Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manage. Sci.* **2009**, *65*, 478-491.



Orobanche crenata



Orobanche foetida



Orobanche ramosa

Fig. 1 Alcune specie di *Orobanche*

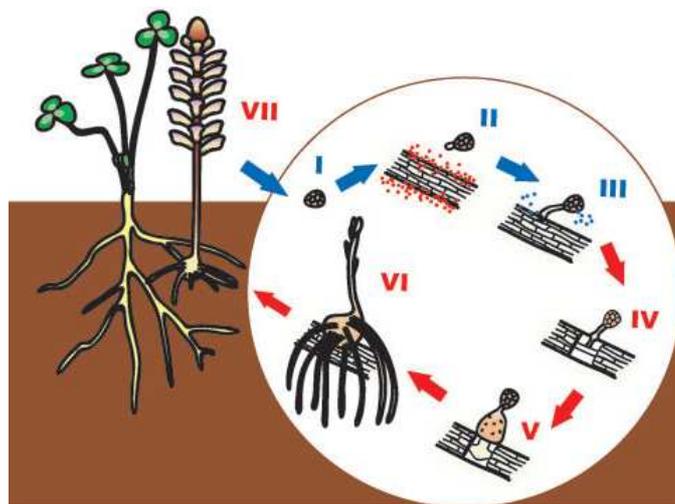
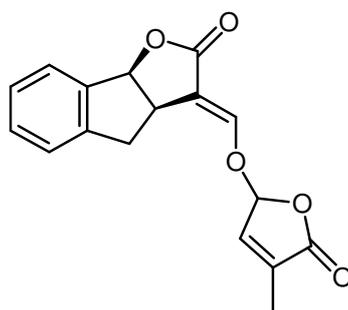
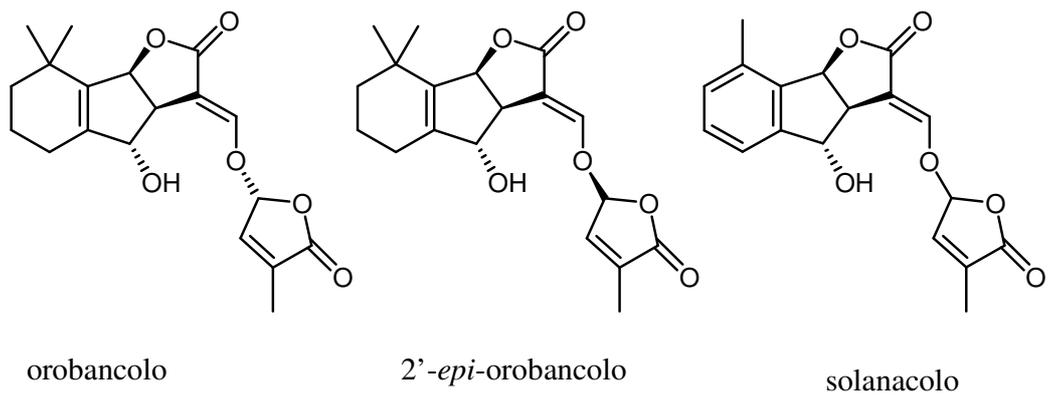
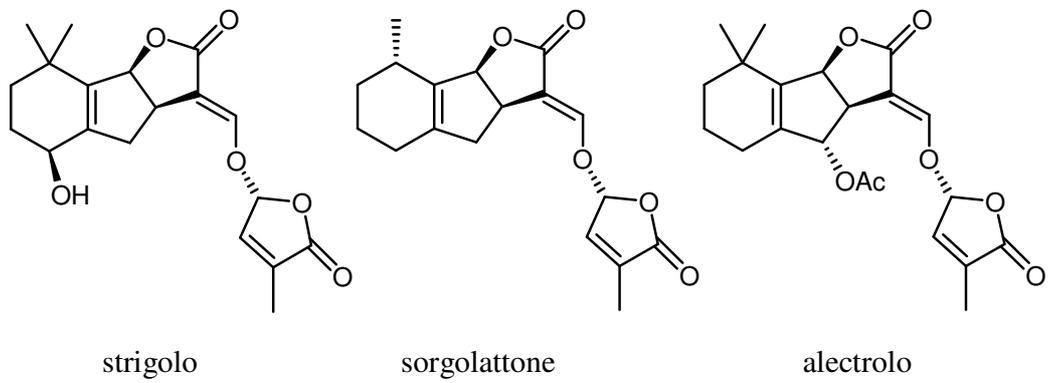


Fig. 2 Ciclo vitale delle *Orobanche*



GR24

Fig. 3 Strigolattoni naturali e sintetici



Fig. 4 *Cuscuta campestris*

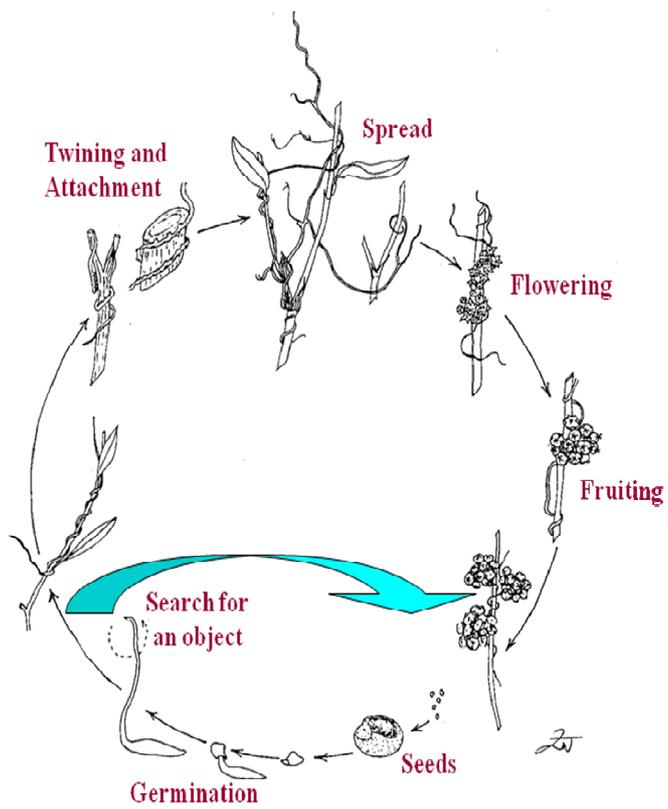


Fig. 5 Ciclo vitale della *Cuscuta campestris*

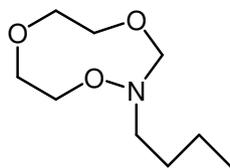
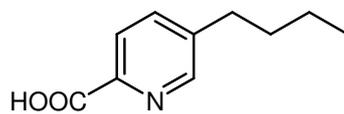
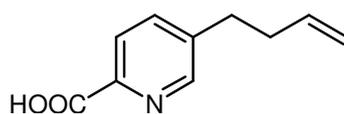


Fig. 6 Il trigoxazonano isolato dagli essudati radicali del fieno greco

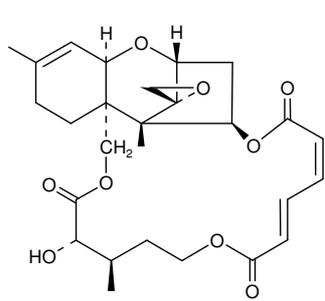


Acido fusarico

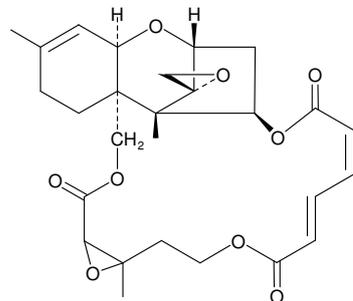


Acido 9,10-deidro-fusarico

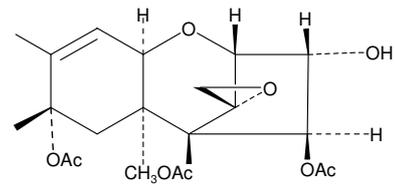
Fig. 7 Metaboliti isolati da diverse specie di *Fusarium* patogeni di *Orobanche ramosa*



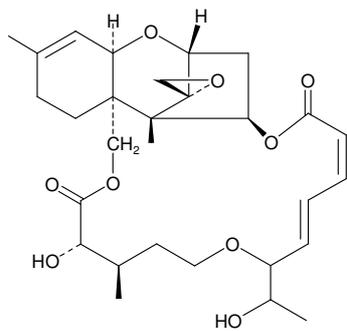
verrucarina A



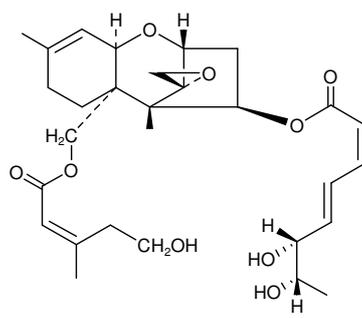
verrucarina B



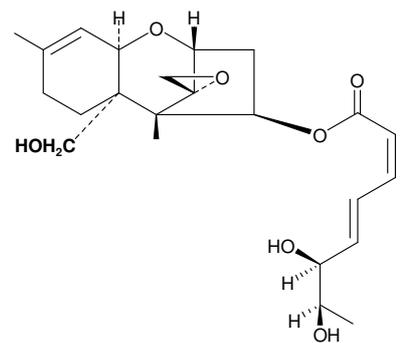
neosolaniolo acetato



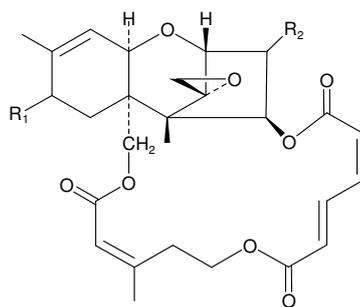
roridina A



isotrichoverrina B



trichoverrolo A



verrucarina L acetata $R_1=OAc$, $R_2=H$, verrucarina M $R_1=H$, $R_2=OH$

Fig. 8 Metaboliti isolati da *Myrothecium verrucaria* e *Fusarium compactum*

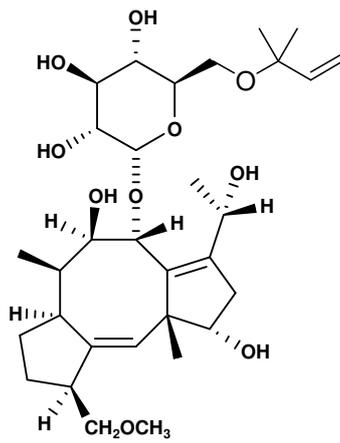
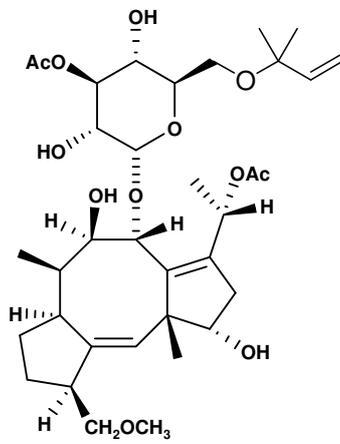
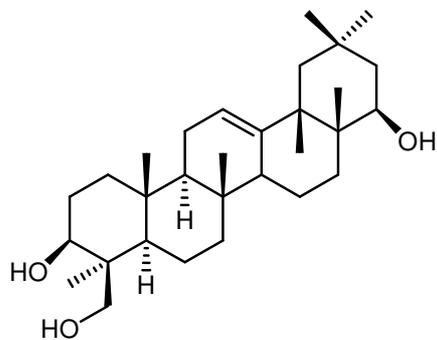
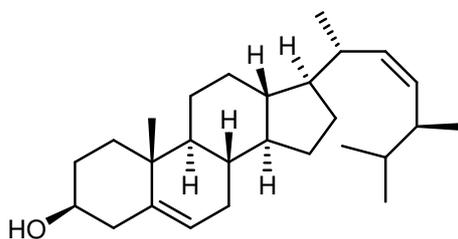


Fig.9 Struttura della fusicoccina e del dideacetil-fusicoccina usati in studi di correlazione struttura-attività germinante i semi di *Orobanchae*

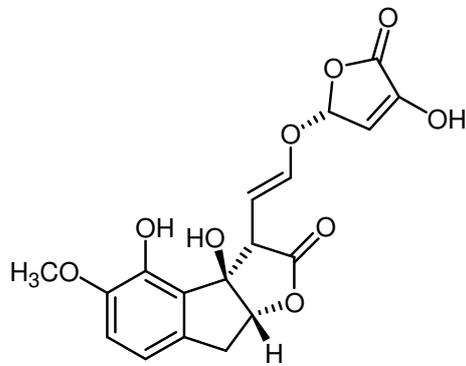


soyasapogenol B

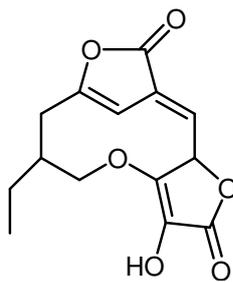


trans-22-deidrocampesterolo

Fig. 10 Metaboliti isolati dagli essudati di veccia comune (*Vicia sativa L.*)



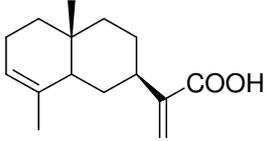
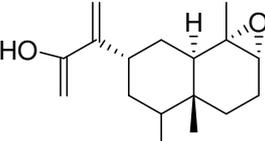
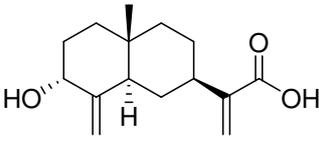
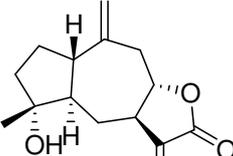
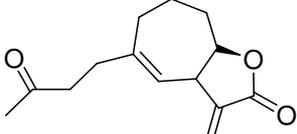
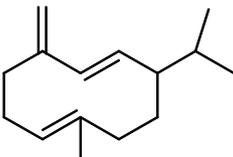
peagolo



peagoldione

Fig. 11 Struttura del peagolo e del peagoldione isolati da essudati radicali del pisello

Tabella 1 Principali sesquiterpeni ciclici isolati da *Inula viscosa*

	Struttura	Nome comune	Referenze
Eudesmanolidi		Acido- α -costico	Shtacher <i>et al.</i> , 1970
		Acido viscosico	Ulubelen <i>et al.</i> , 1987
		Acido viscico	Ceccherelli <i>et al.</i> , 1985
Guaianolidi		Inuviscolide	Bohlmann <i>et al.</i> , 1977
		Tomentosina	Lanzetta <i>et al.</i> , 1991
Germacranolidi		Germacrene D	Chahboun. <i>et al.</i> , 1998



Lavandula dentata



Lavandula stoechas



Lavandula multifida



Cistus monspeliensis



Cistus salvifolius



Cistus heterophyllus



Marubium vulgare



Rosmarinus officinalis

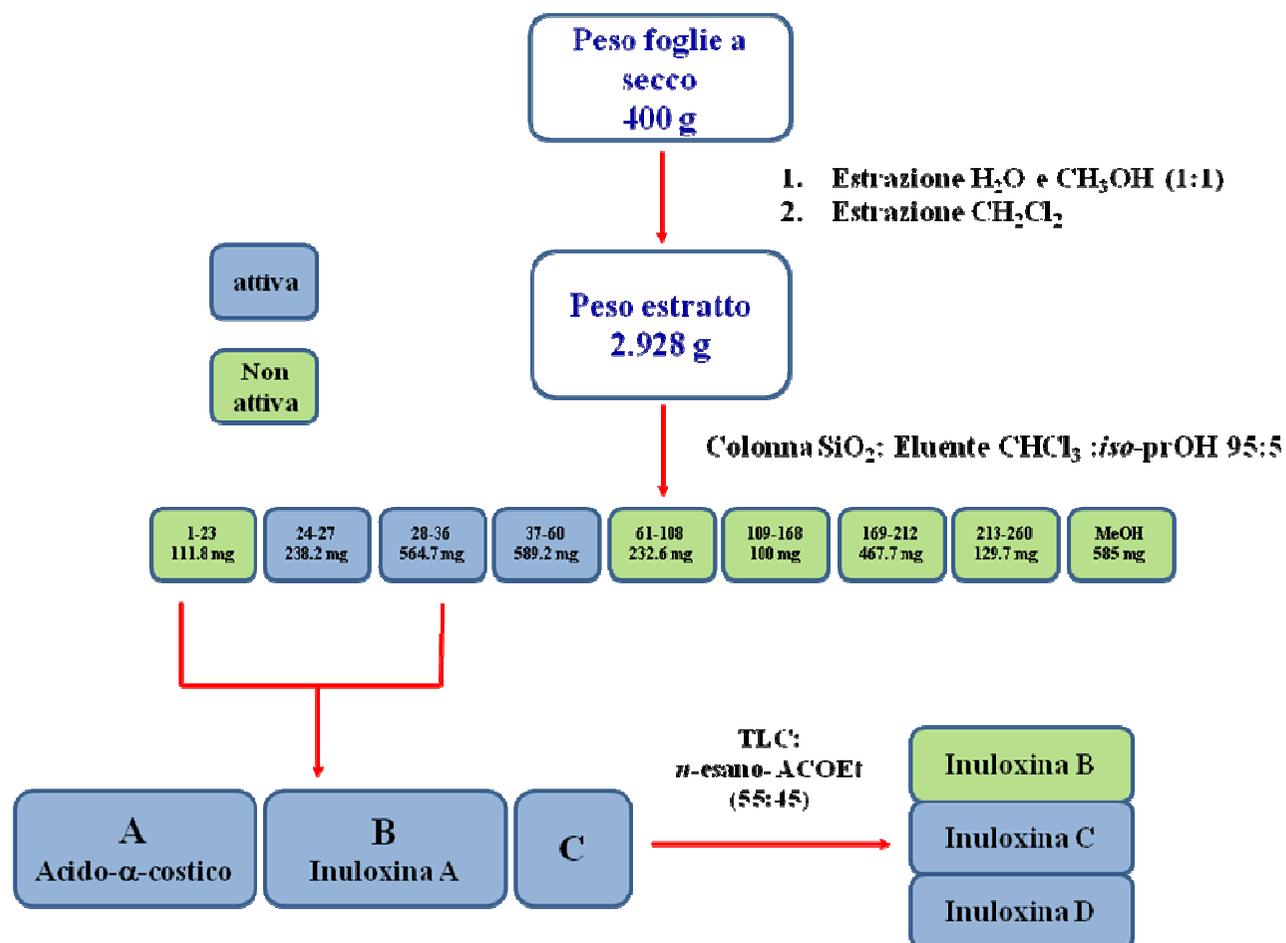


Inula viscosa

Fig. 12 Piante selezionate per lo studio preliminare



Fig. 13 Infiorescenza di *Inula viscosa*



Schema 1 Estrazione e purificazione dell'estratto organico di *Inula viscosa*

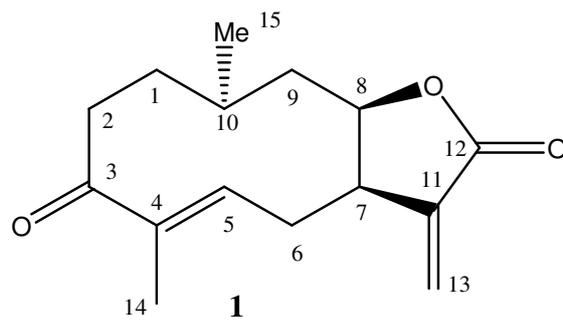


Fig. 14 Struttura dell' inuloxina A

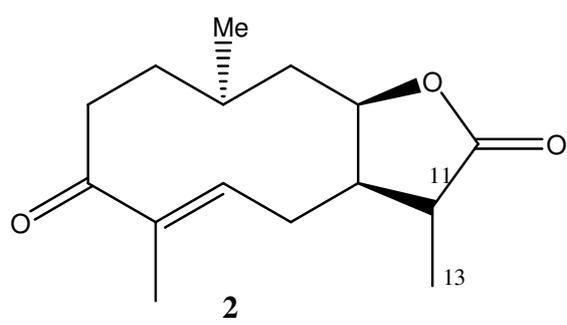


Fig. 15 Struttura dell' inuloxina B

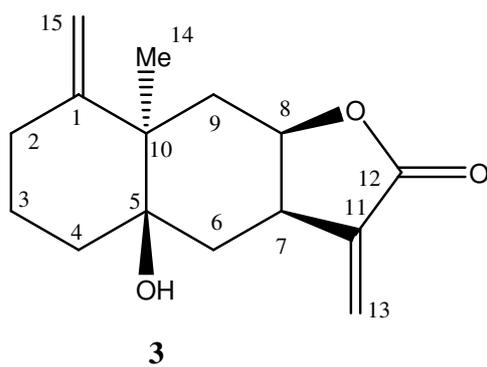


Fig. 16 Struttura dell' inuloxina C

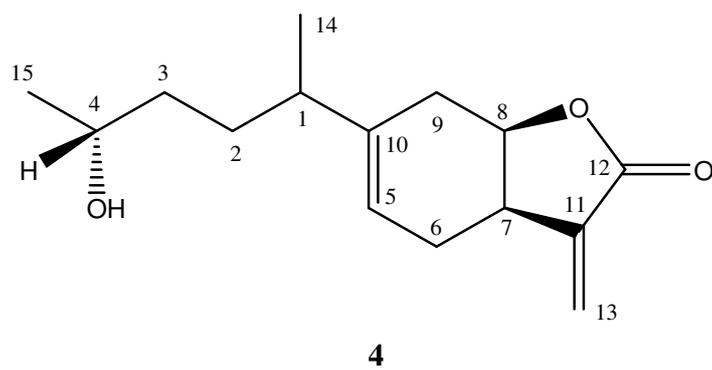


Fig. 17 Struttura dell' inuloxina D

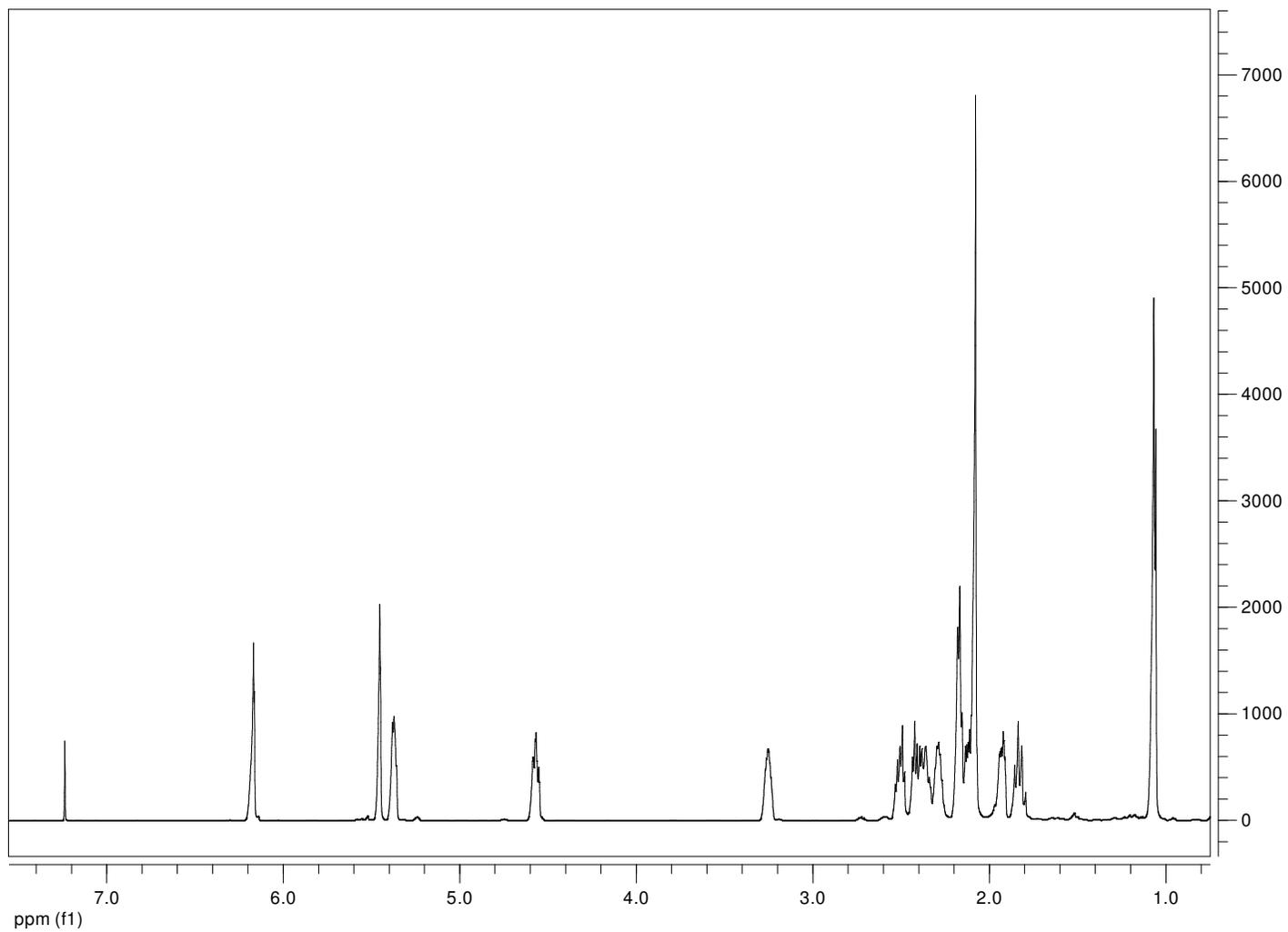


Fig.18 Spettro ^1H NMR dell'inuloxina A (**1**) registrato a 400 MHz in CDCl_3

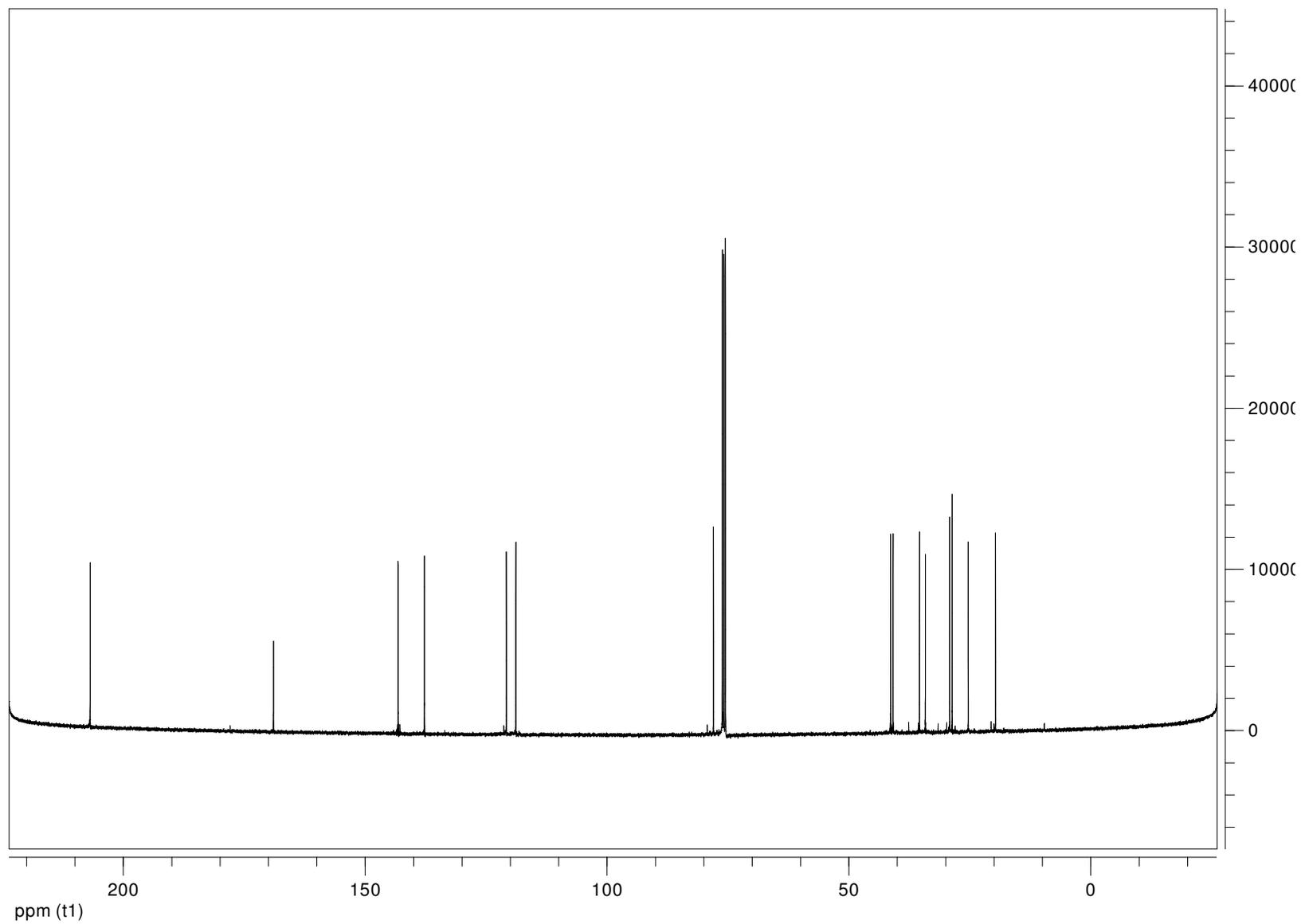


Fig. 19 Spettro ^{13}C NMR dell' inuloxina A (1) registrato a 100 MHz in CDCl_3

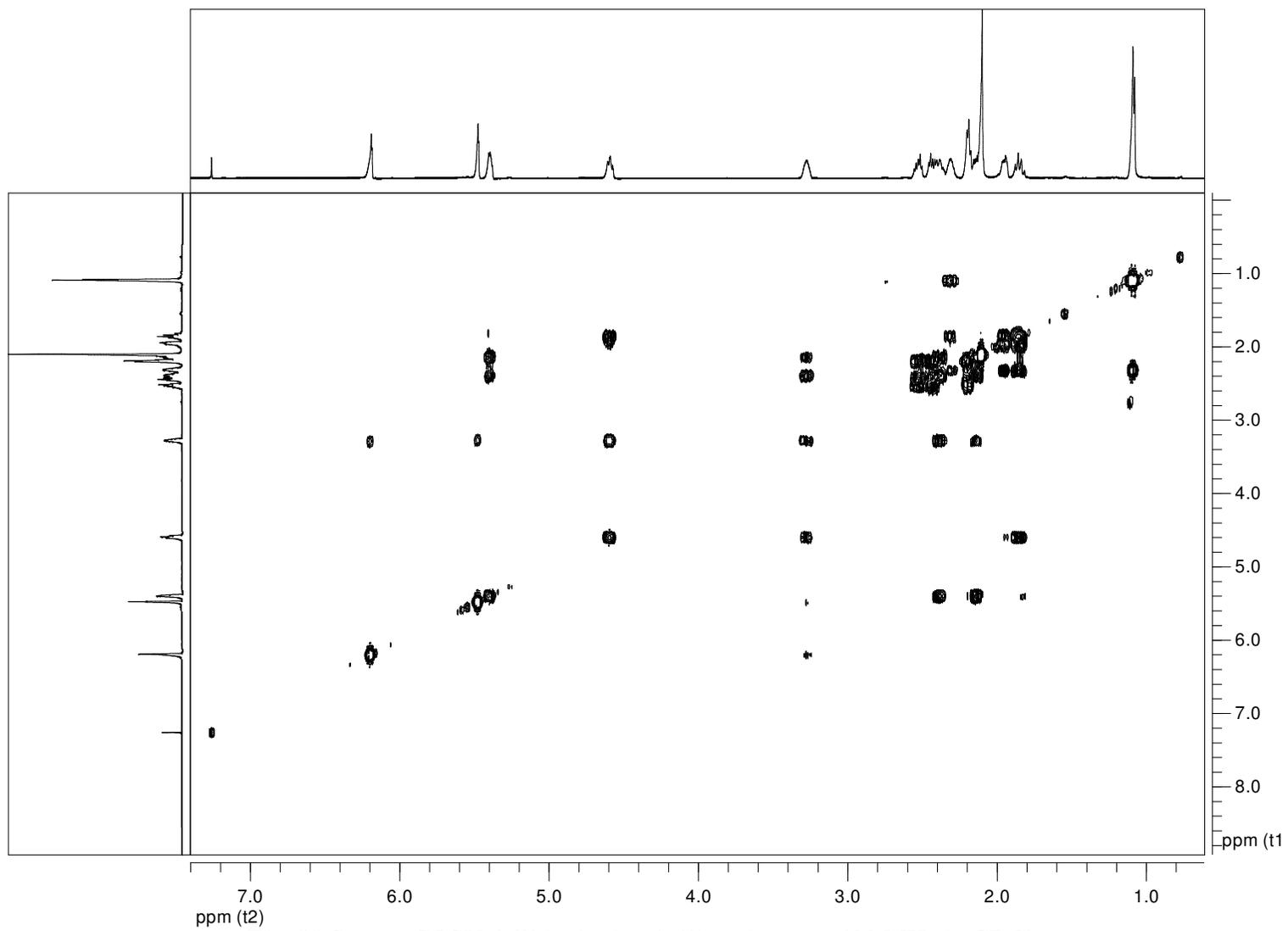


Fig. 20 Spettro COSY dell' inuloxina A (**1**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

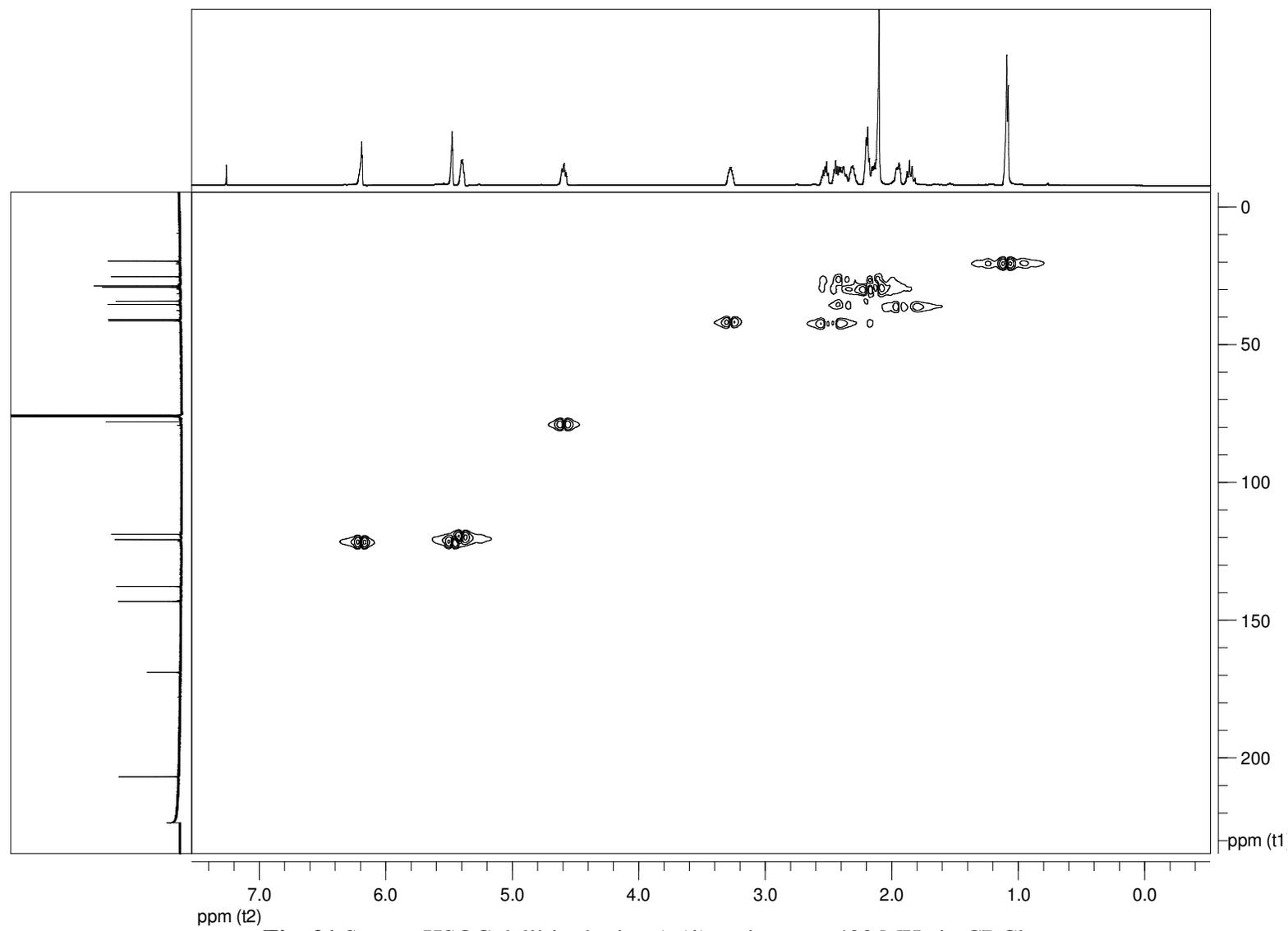


Fig. 21 Spettro HSQC dell' inuloxina A (**1**) registrato a 400 MHz in CDCl_3

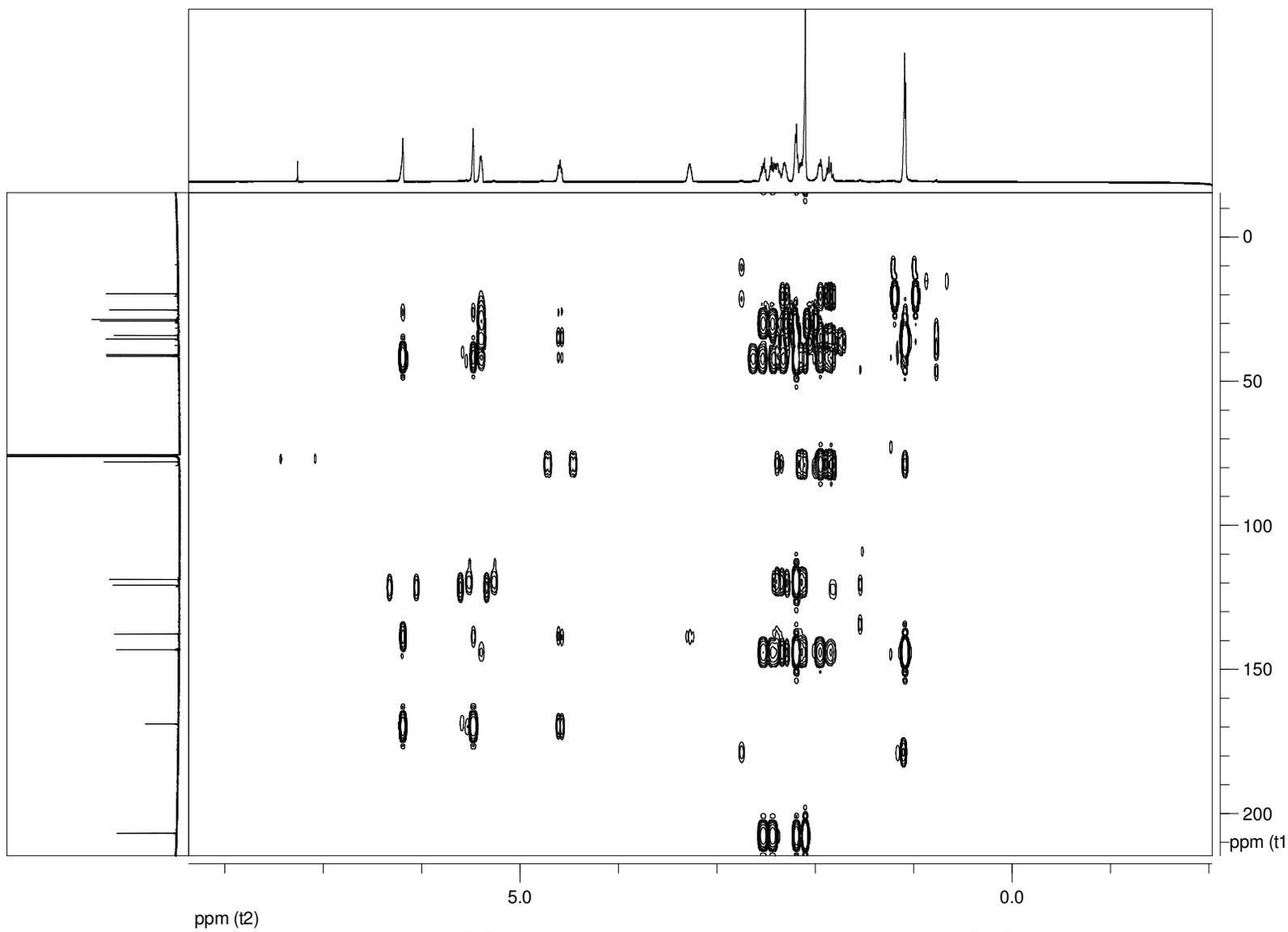


Fig. 22 Spettro HMBC dell' inuloxina A (**1**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

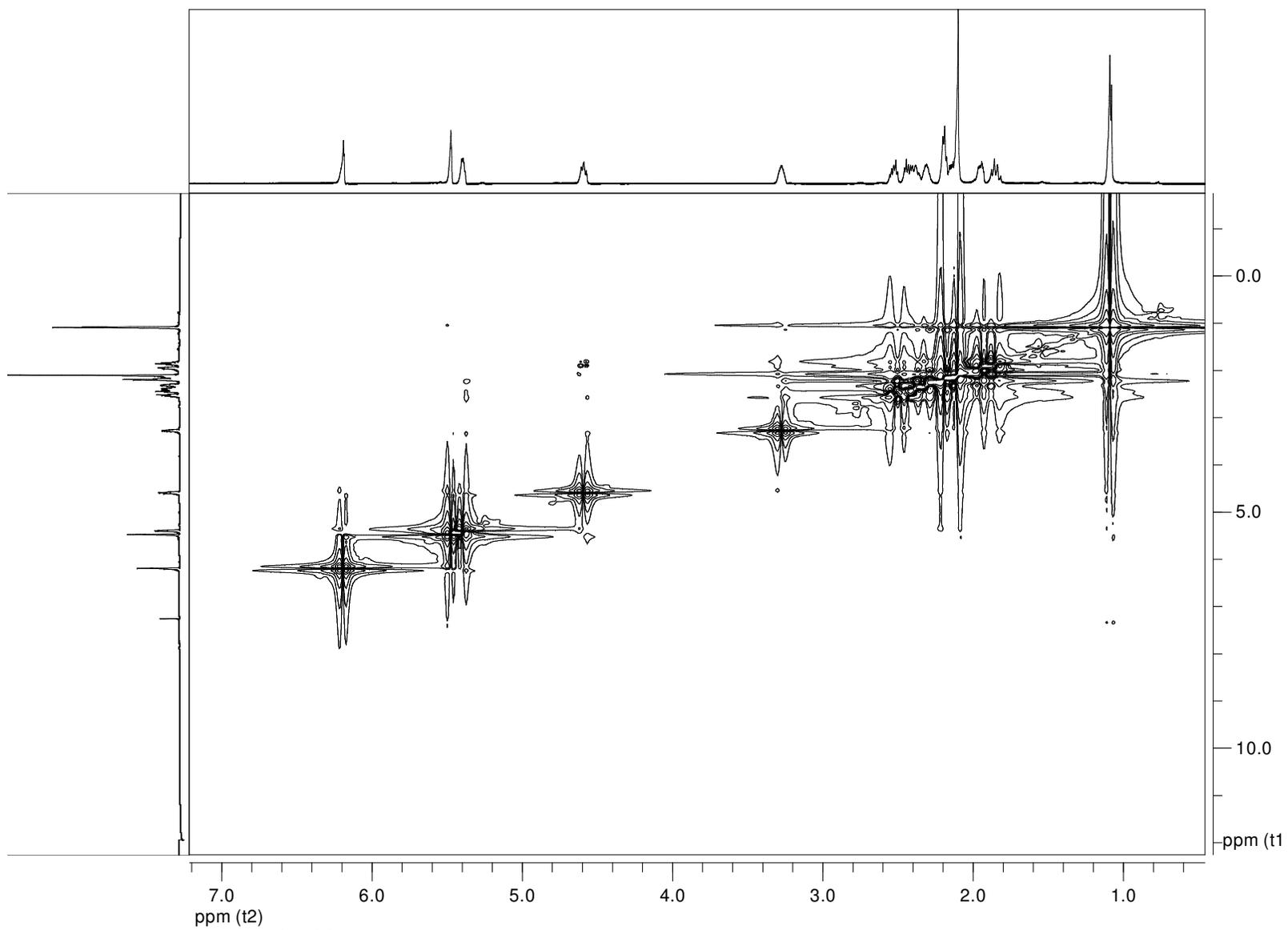


Fig. 23 Spettro NOESY dell'inuloxina A (**1**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

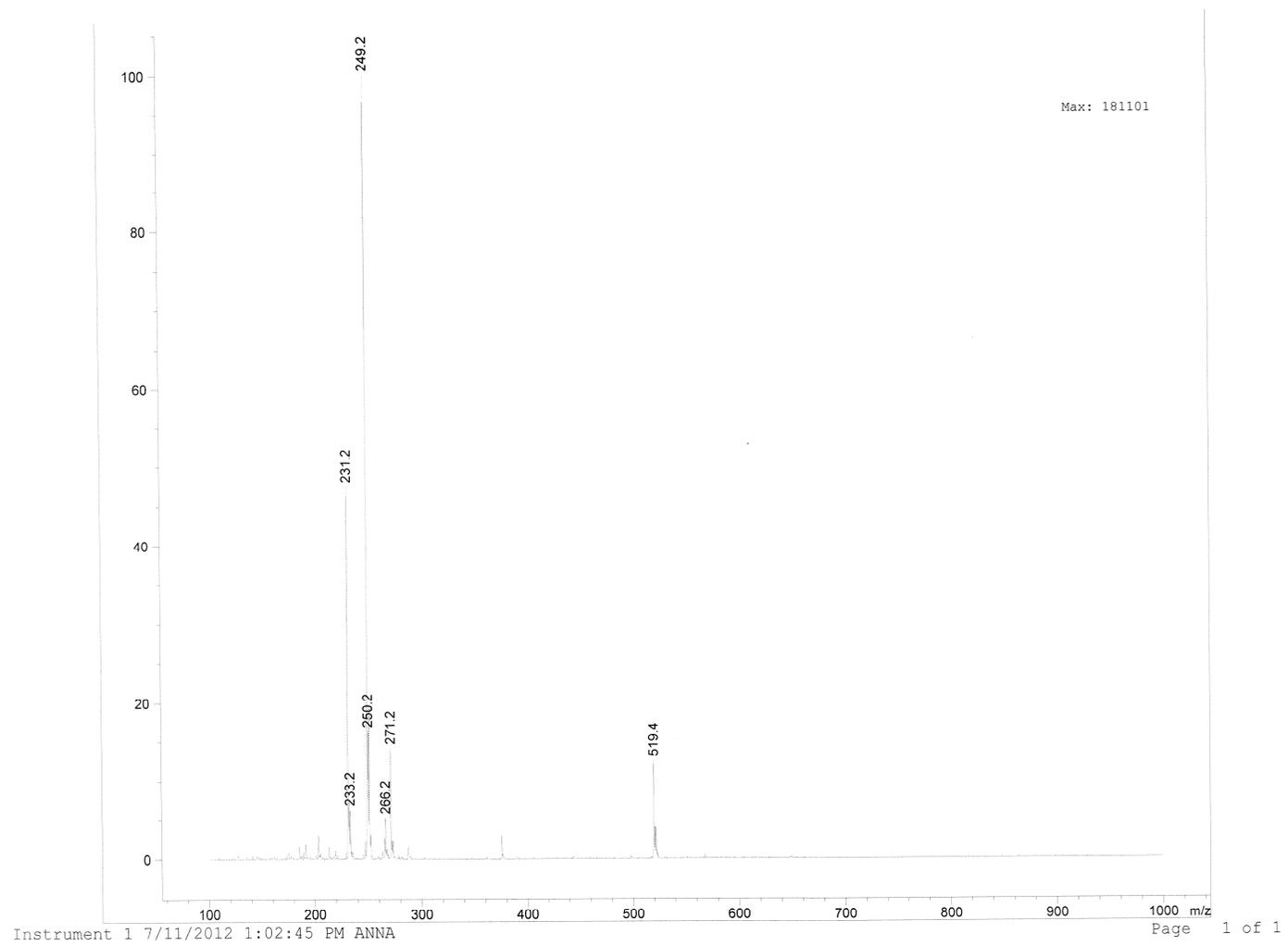


Fig. 24 Spettro APCI-MS dell' inuloxina A (1)

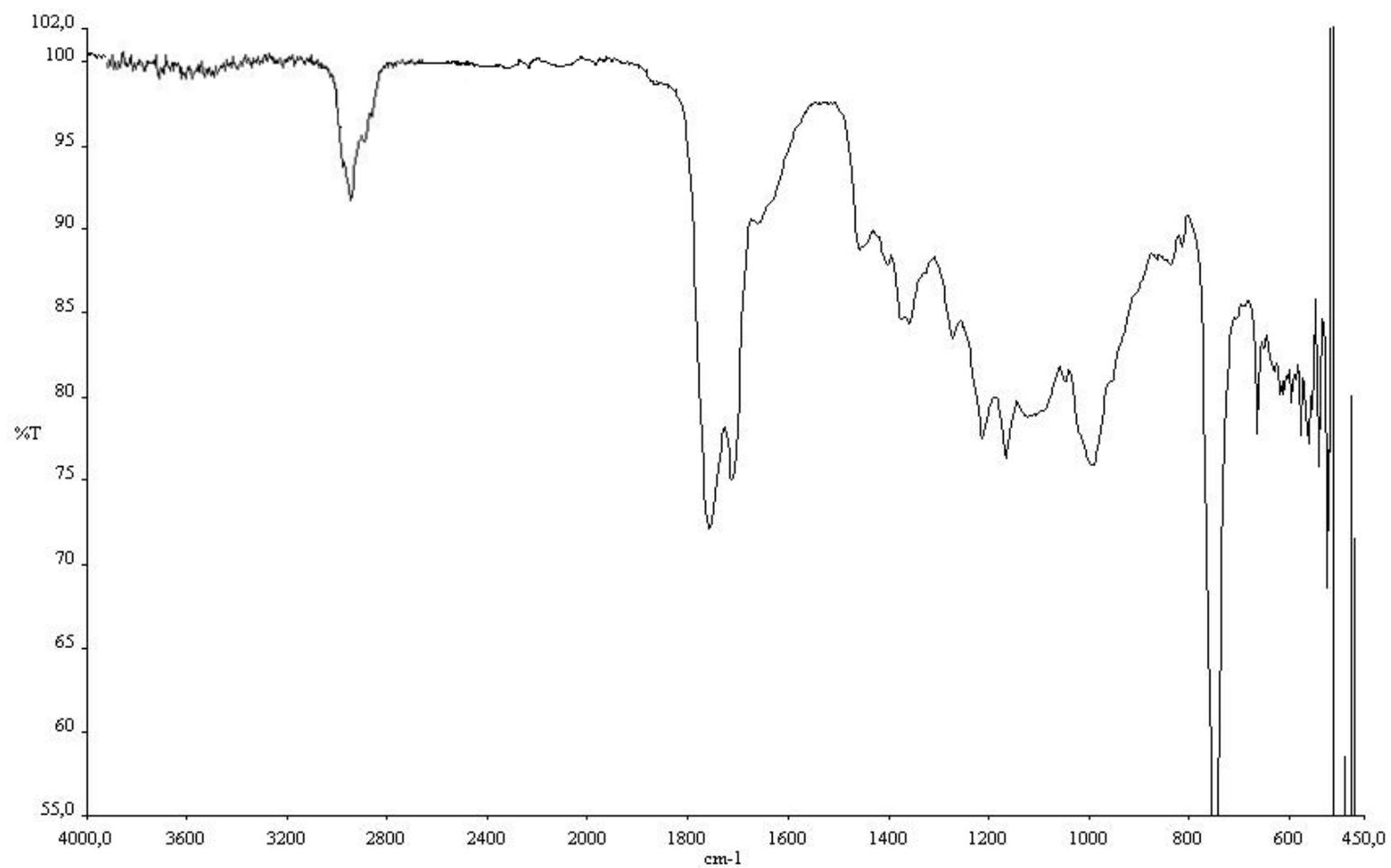


Fig. 25 Spettro IR dell'inuloxina A (**1**) registrato come film liquido

Tabella 2. ^1H e ^{13}C NMR delle inuloxine A-D (1-4)^{a,b}

Posizione	1		2		3		4	
	$\delta\text{C m}^c$	$\delta\text{H (J in Hz)}$	$\delta\text{C m}^c$	$\delta\text{H (J in Hz)}$	$\delta\text{C m}^c$	$\delta\text{H (J in Hz)}$		
1	29.1 t	(2H) 2.20 m	30.0 t	2.34 m 2.22 m	146.0 s		33.8 d	2.39 m
2	41.4 t	2.52 m 2.44 m	42.8 t	2.55 ddd(15.6, 9.3, 4.3) 2.44 ddd (15.6, 8.8, 6.6)	47.3 t	2.21 m 1.70 ddd (8.0, 8.0, 3.9)	35.4 t	2.06 m 2.04 m
3	206.6 s		207.3 s		26.6 t	1.69 m 1.85 m	36.7 t	1.52 m 1.48 m
4	143.3 s		141.8 s		41.2 t	1.75 m 1.99 m	66.3 d	3.80 m
5	118.8 d	5.39 dd (9.0, 5.2)	121.3 d	5.45 dd (10.1, 2.0)	80.9 s		118.7 d	5.52 dd (8.7, 4.9)
6	25.3 t	2.40 m 2.13 dd (10.0, 5.2)	21.1t	2.22 m 1.87 ddd (15.6, 10.1, 3.8)	29.7 t	1.27 m 2.32 ddd (13.2, 3.6, 3.2)	25.5 t	2.48 m 2.21 m
7	40.9 d	3.27 m	42.7 d	2.65 m	45.6 d	2.69 m	41.0 d	3.36 m
8	78.0 d	4.60 ddd (11.2, 8.5, 2.5)	78.8 d	4.61 ddd (11.0, 7.5, 6.1)	82.6 d	4.33 ddd (10.7, 9.0, 6.1)	78.2 d	4.66 ddd (11.8, 8.6, 2.9)
9	35.4 t	1.95 ddd (13.7, 5.4, 2.5) 1.83 dt (13.7, 11.2)	36.5 t	(2H) 2.05 m	40.7 t	3.24 ddd (15.6, 6.1, 3.2) 2.58 dd (15.6, 10.7)	31.6 t	2.01 m 1.98 m
10	34.1 d	2.31 m	33.0 d	2.34 m	59.3 s		144.3 s	
11	137.3 s		38.9 d	2.79 quin (7.5)	139.5 s		137.9 s	
12	168.9 s		177.3 s		170.3 s		169.0 s	
13	120.8 t	6.18 d (3.0) 5.47 d (3.0)	20.5 q	1.16 d (7.5)	120.7 t	6.27 d (3.5) 5.57 d (3.5)	120.8 t	6.27 d (3.2) 5.55 d (3.2)
14	28.6 q	2.10 s	28.4 q	2.14 s	24.1 q	1.24 s	19.8 q	1.16 d (6.9)
15	19.7 q	1.08 d (6.9)	10.5 q	1.13 d (7.2)	117.7 t	5.00 b s 5.13 b s	22.6 q	1.24 d (6.2)

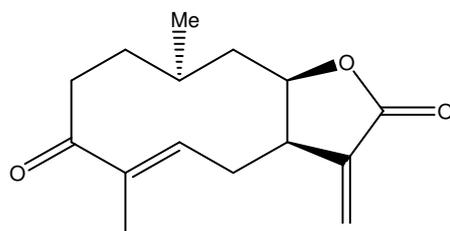
^aChemical shifts sono riportati in δ (ppm) rispetto al TMS;^b gli esperimenti NMR 2D ^1H , ^1H (COSY) ^{13}C , ^1H (HSQC) NMR hanno permesso di determinare le correlazione di tutti i protoni con i carboni corrispondenti.^c Le molteplicità sono state assegnate mediante spettri DEPT.

Tabella 3 HMBC delle inuloxine A-D (1-4)

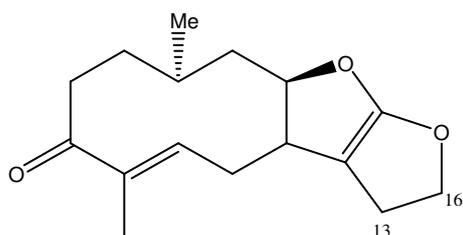
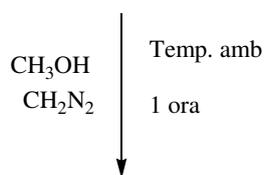
	1	2	3	4
C				
1	H ₂ -2, H-10	H ₂ -2, Me-15	H ₂ -9	H ₂ -9, H-5, Me-14
2	H-10, H ₂ -1, Me-14	H ₂ -1, H-10	H ₂ -15	Me-14, Me-15
3	H ₂ -2, H ₂ -1, Me-14	H ₂ -2, Me-14		H ₂ -2, Me-15
4	H ₂ -6, H ₂ -2, Me-14	H ₂ -1, H ₂ -2, H ₂ -6		Me-15
5	H ₂ -6, H ₂ -2	H ₂ -6	Me-14, H ₂ -3	H ₂ -9, H ₂ -6
6	H-5	H-5, H-8, H-11		H-5
7	H ₂ -9, H ₂ -6	H-11, H-5, H ₂ -6, H ₂ -9, Me-13	H ₂ -13, H ₂ -9, H-6A	H ₂ -13, H ₂ -9, H ₂ -6
8	Me-15, H ₂ -9, H ₂ -6	H ₂ -9, H-6B	H ₂ -9, H-6A	H ₂ -9, H ₂ -6,
9	Me-15, H-10	Me-15	Me-14, H ₂ -15	H-5, Me-14
10	Me-15	Me-15, H ₂ -9, H-1B,	Me-14	Me-14, H ₂ -9
11	H ₂ -13, H-8			H-13A
12	H ₂ -13, H-8	Me-13, H-7, H-11	H ₂ -13	H ₂ -13, H-8
13		H-11		
14	H-5	H-5		H-1, H ₂ -2
15	H ₂ -9, H-10			

Tabella 4 NOESY delle inuloxine A-D (**1-4**)

1		2		3		4	
H-7	H ₂ -13, H-8, H-5, H ₂ -6	H-7	H-8, H ₂ -6, H-11	H-7	H-8, H ₂ -6, H-13B	H-7	H-8
H-5	H-9A, H-2A, H ₂ -6, H-7	H-11	Me-13, H-7	H-6A	H-4B, H-6B, H-7	H-5	H ₂ -6, H-9A
H-8	H-7, H ₂ -1	H-5	H-2A, H ₂ -6, H-7	H-2A	H-2B	H-8	H-7, H ₂ -9
H-13A	H-13B, H ₂ -6, H-7			H-9A	H-9B, H-15B		
H-13B	H-13A, H ₂ -6, H-7	Me-15	H ₂ -9, H ₂ -1, H-10	H-9B	H-9A, H-15B	H-13A	H-13B
Me-14	H-9B, H-2B, H-6A			H-8	Me-14, H-9A, H-6A, H-7	H-13B	H-13A, H-7
Me-15	H ₂ -1, H-10, H ₂ -9			H-13A	H-13B, H-7	H-4	Me-15, H ₂ -3
				H-13B	H-13A, H-7, H ₂ -6		
				H-15A	H ₂ -2		
				H-15B	H ₂ -9		
				Me-14	H-2A		



1, inuloxin A



5

Schema 2 Reazione dell'inuloxina A (**1**) con diazometano

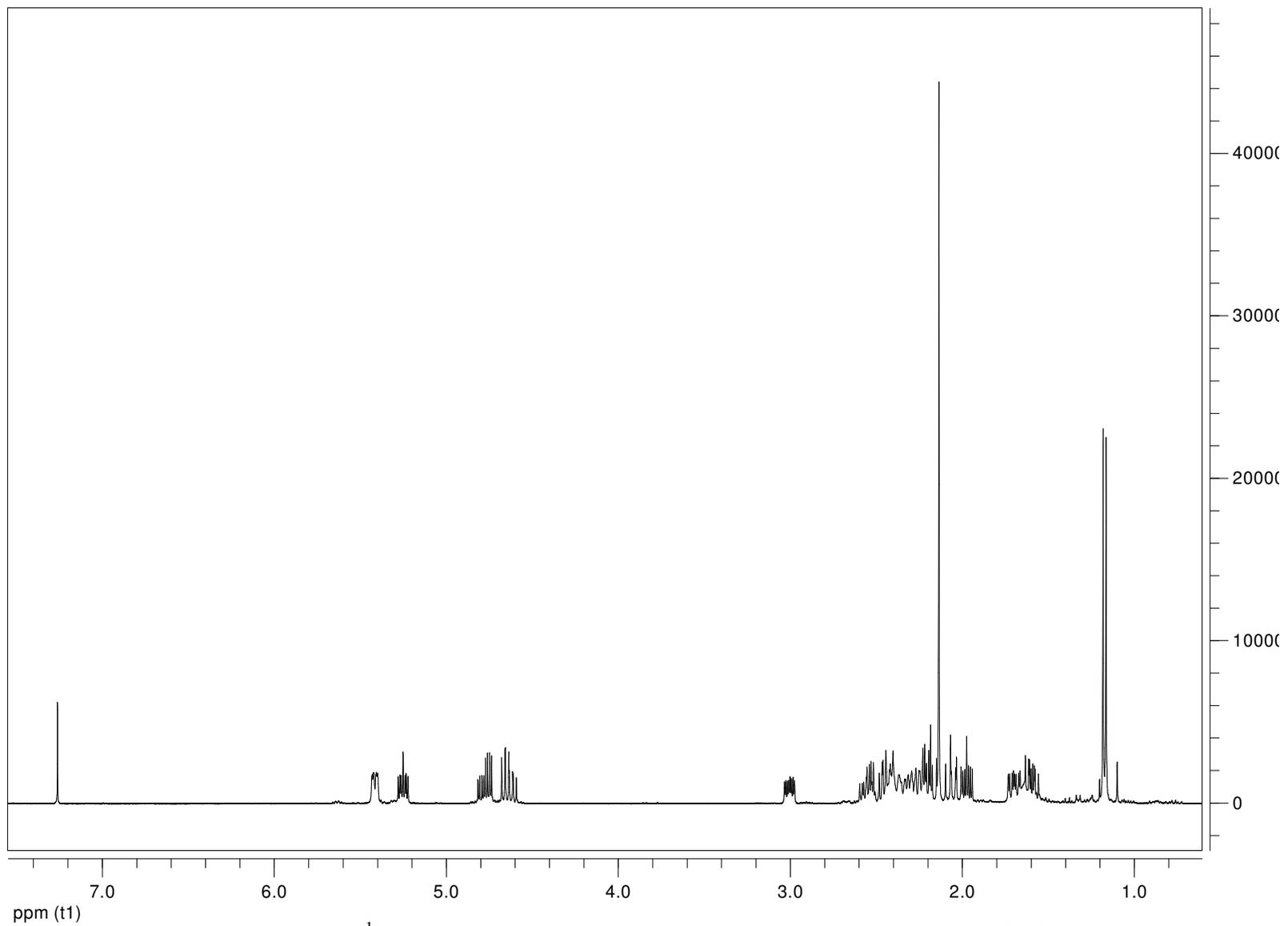


Fig.26 Spettro ^1H NMR del diazo dell'inuloxina A (5) registrato a 400 MHz in CDCl_3

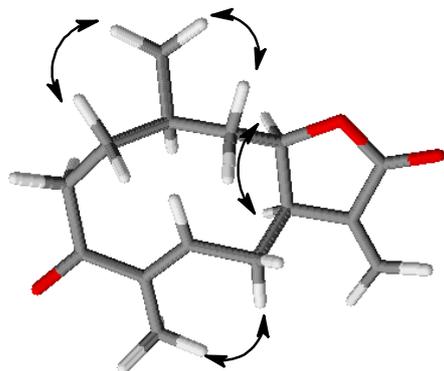


Fig. 27 Effetto NOE osservato nell'inuloxina A (**1**)

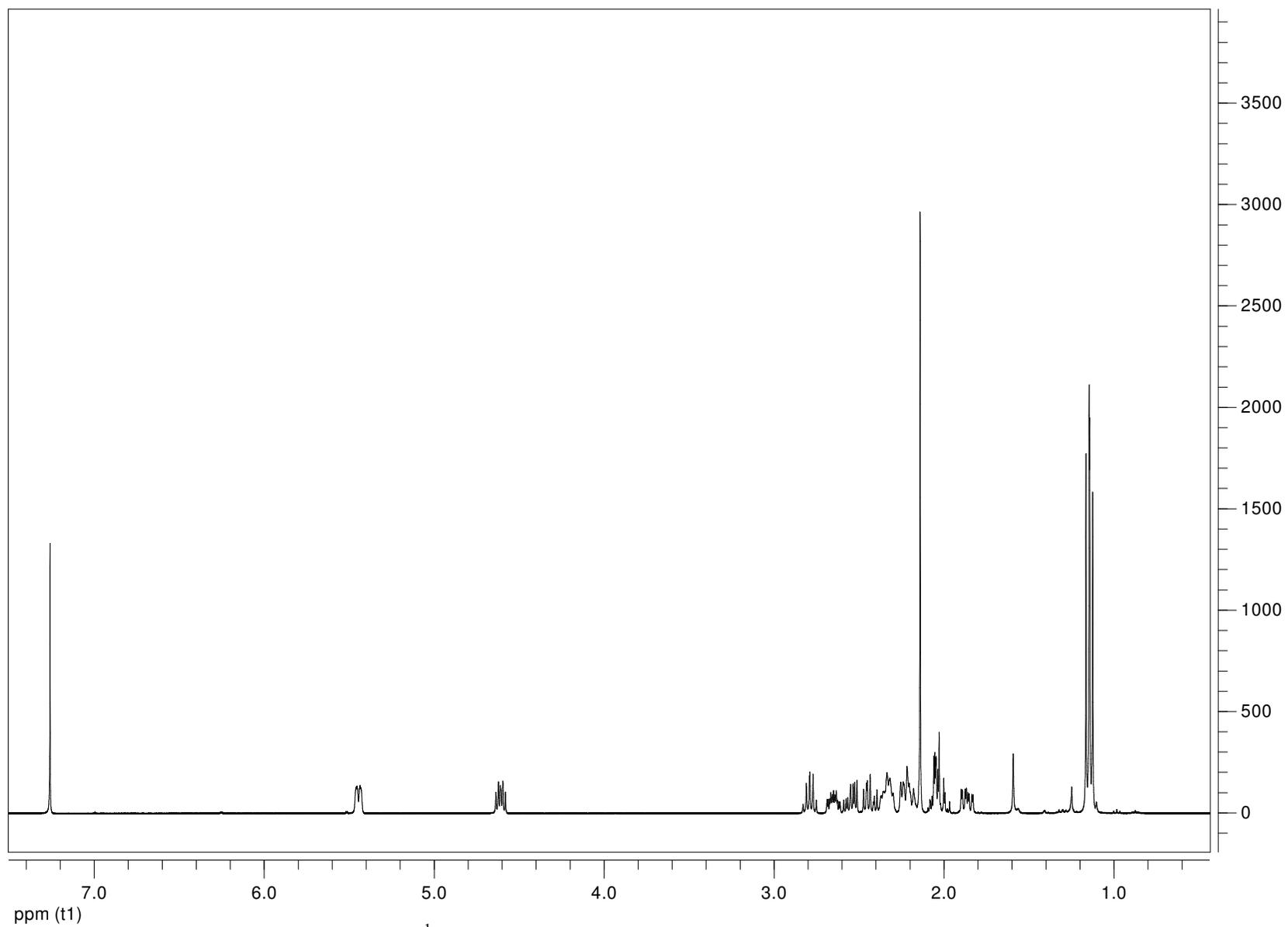


Fig. 28 Spettro ^1H NMR dell' inuloxina B (2) registrato a 400 MHz in CDCl_3

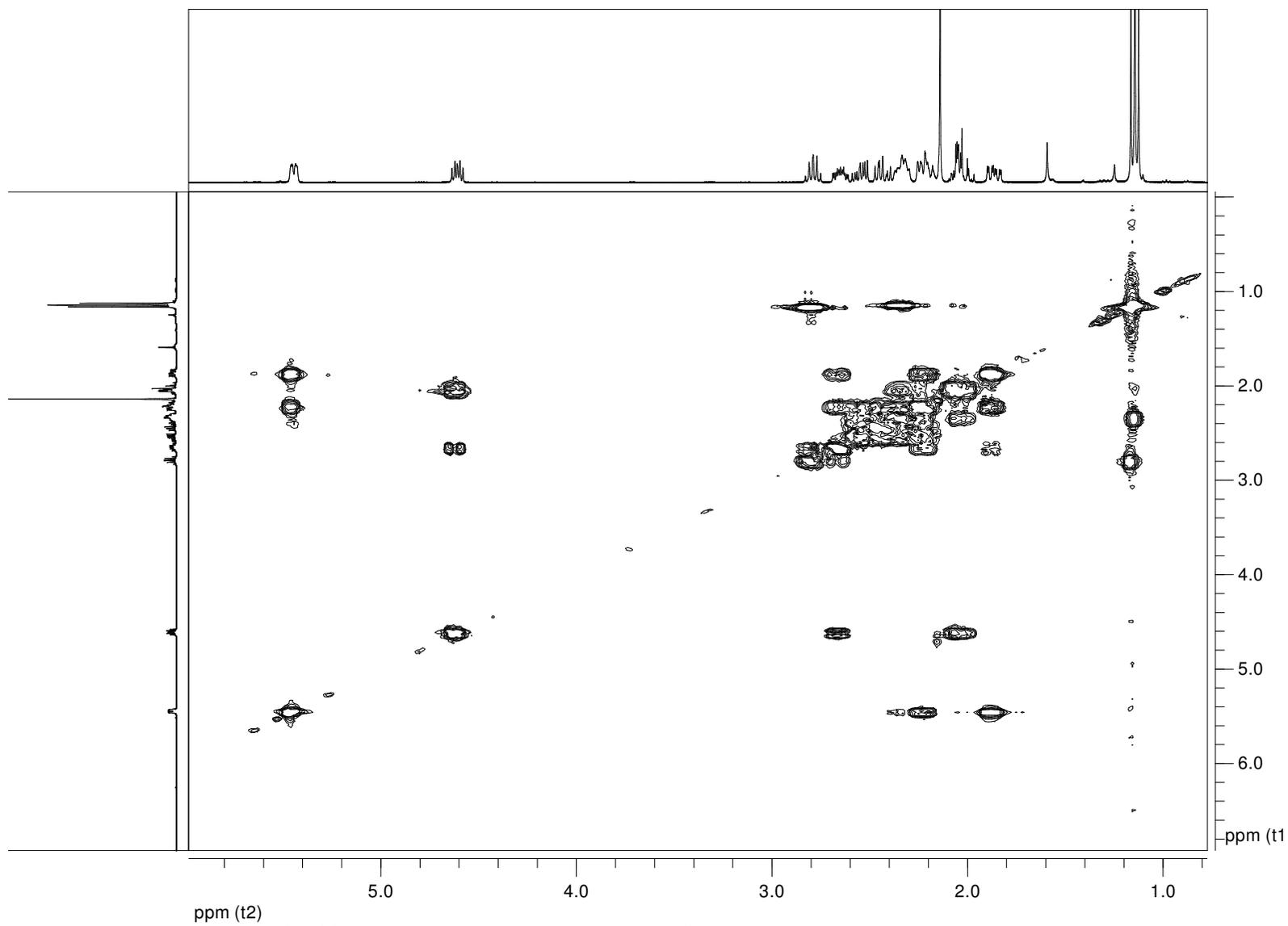


Fig. 29 Spettro COSY dell' inuloxina B (**2**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

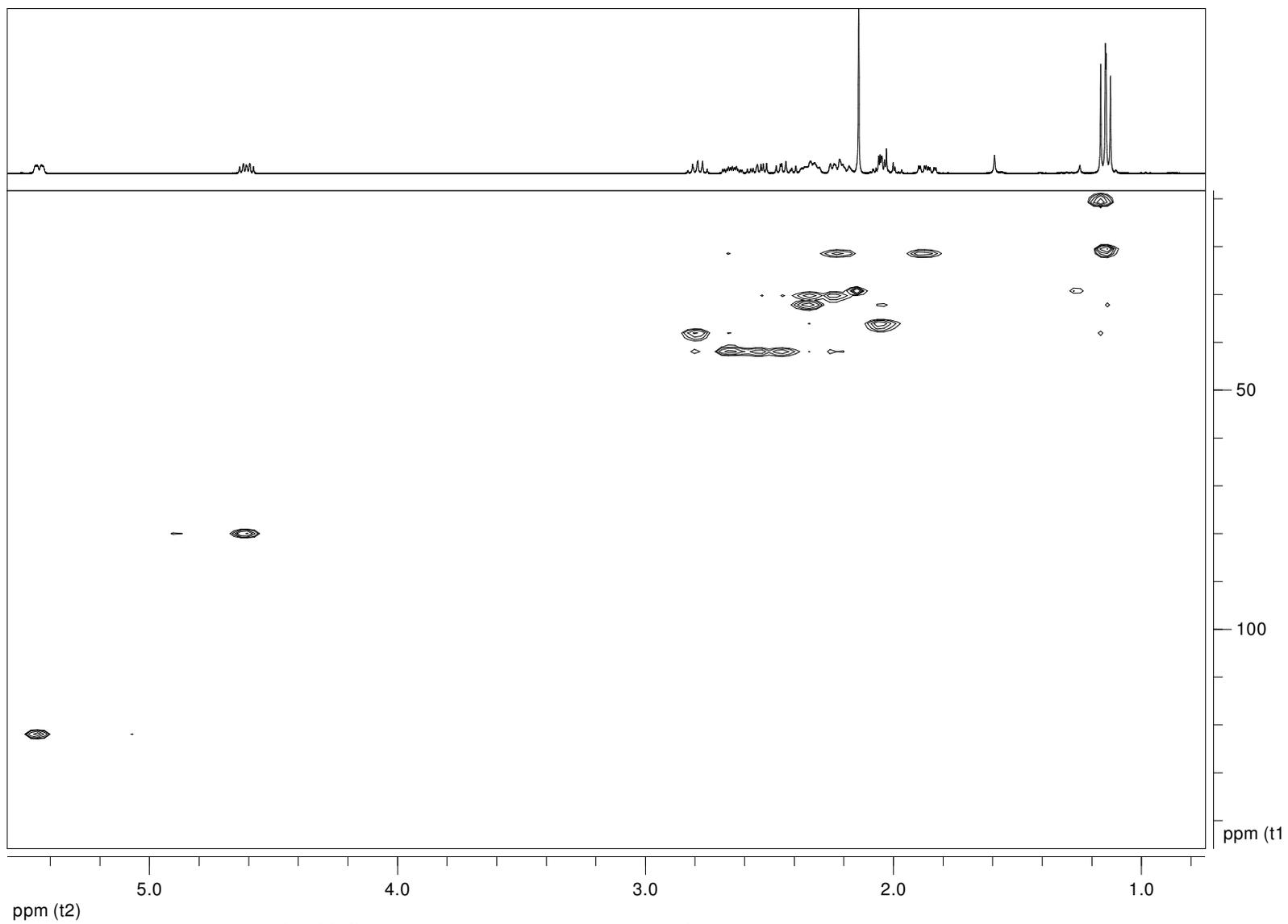


Fig. 30 Spettro HSQC dell' inuloxina B (**2**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

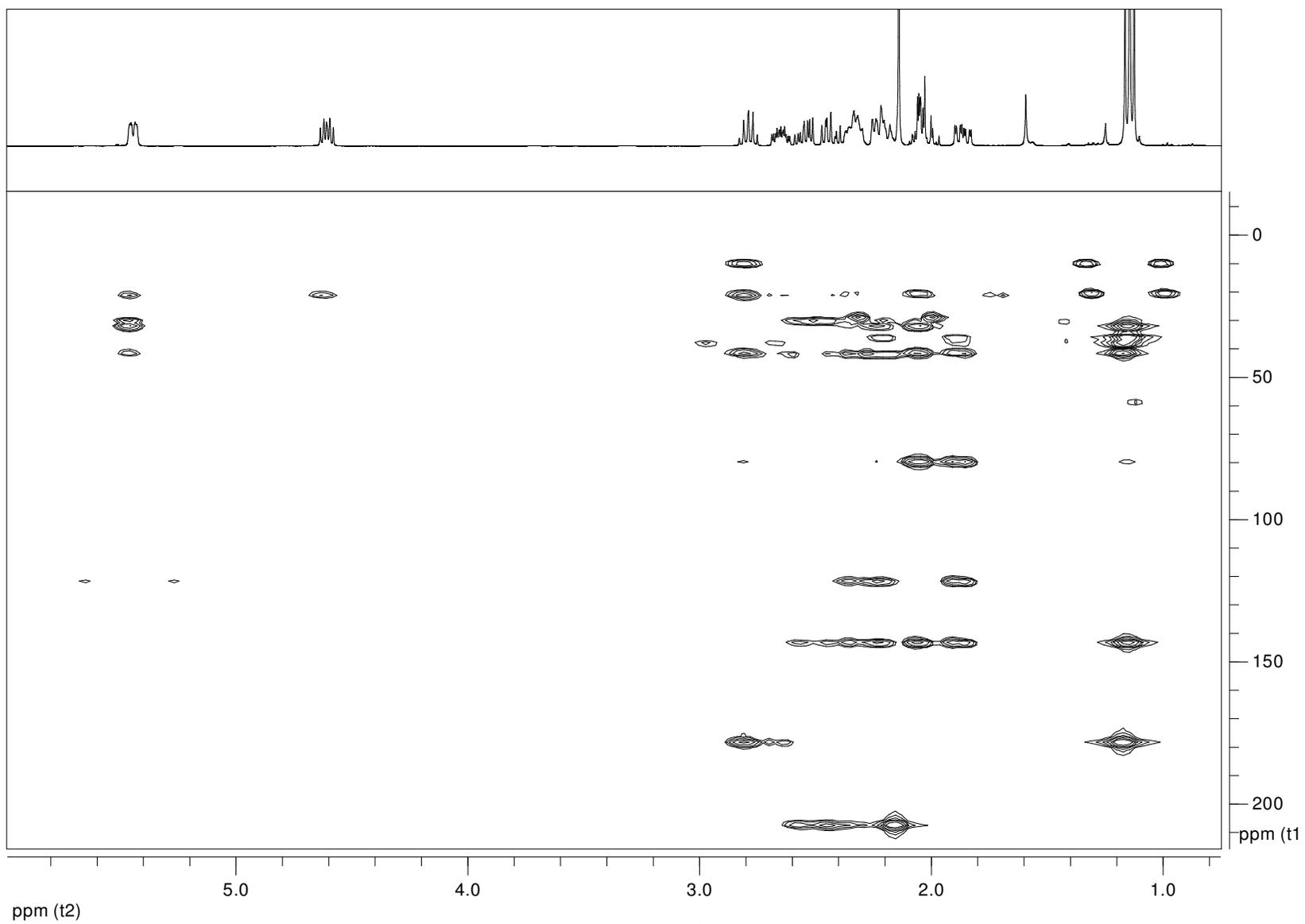


Fig. 31 Spettro HMBC dell' inuloxina B (**2**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

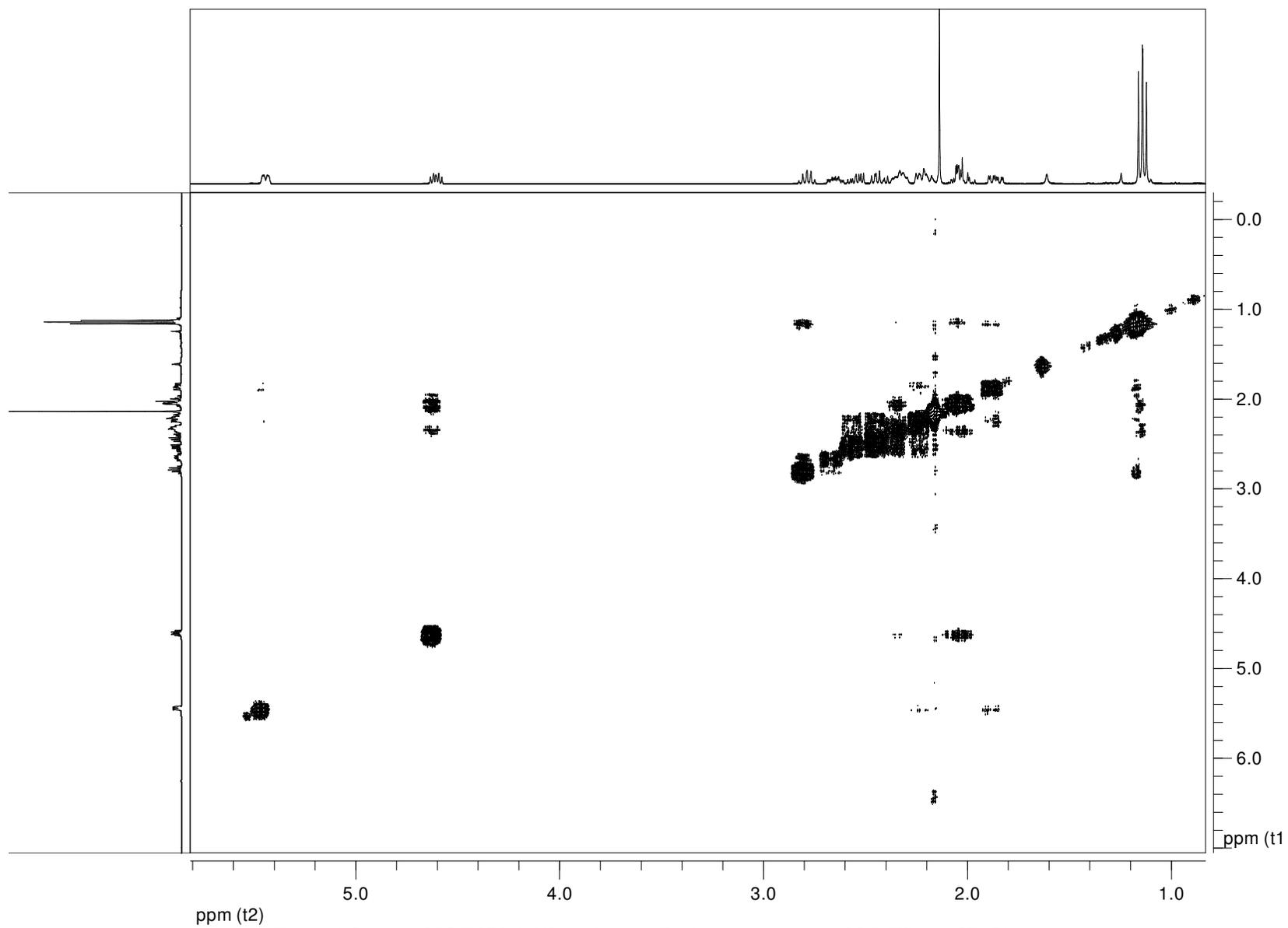


Fig. 32 Spettro NOESY dell' inuloxina B (2) registrato a 400 MHz in CDCl₃

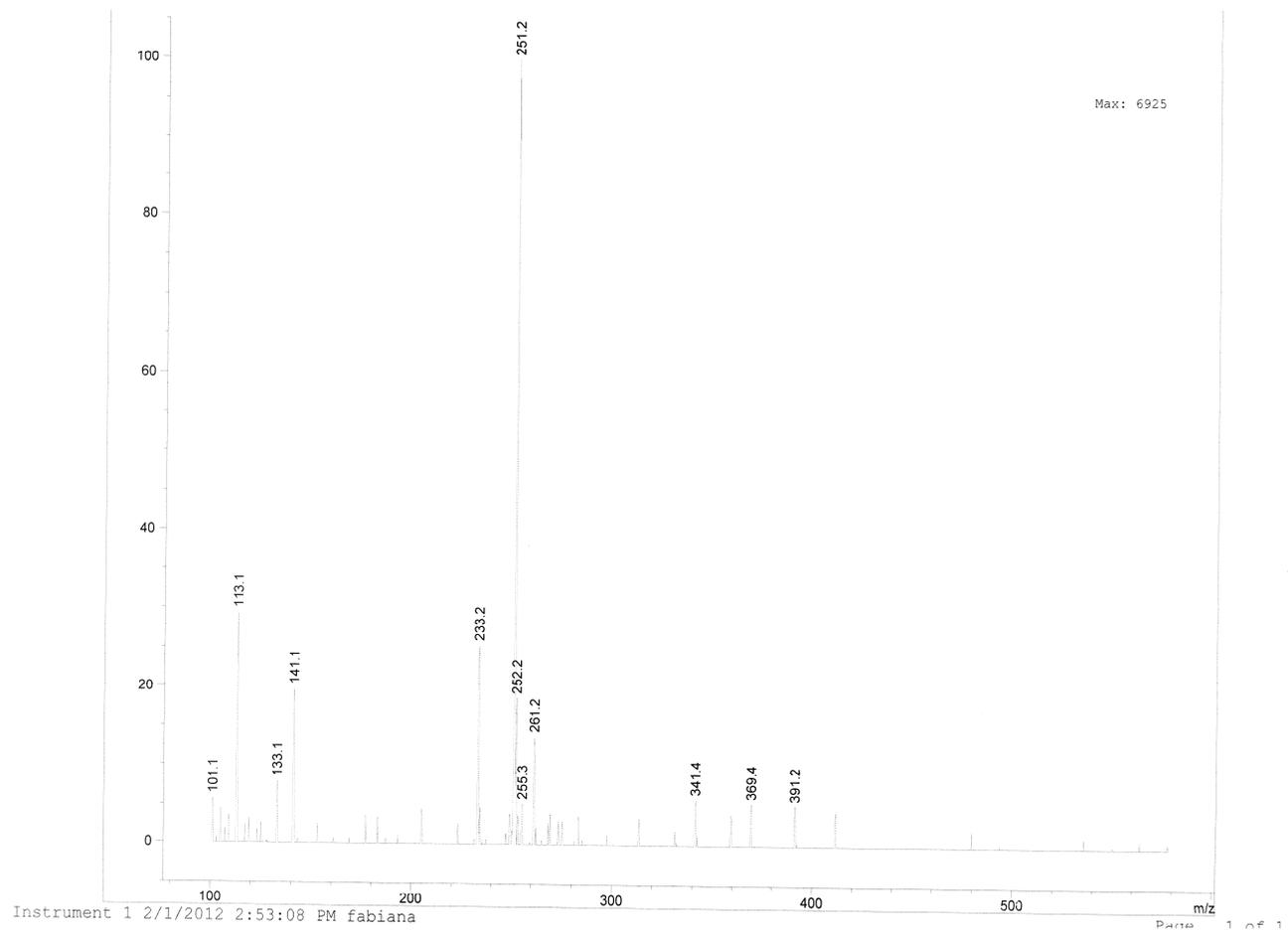


Fig. 33 Spettro APCI-MS dell' inuloxina B (2)

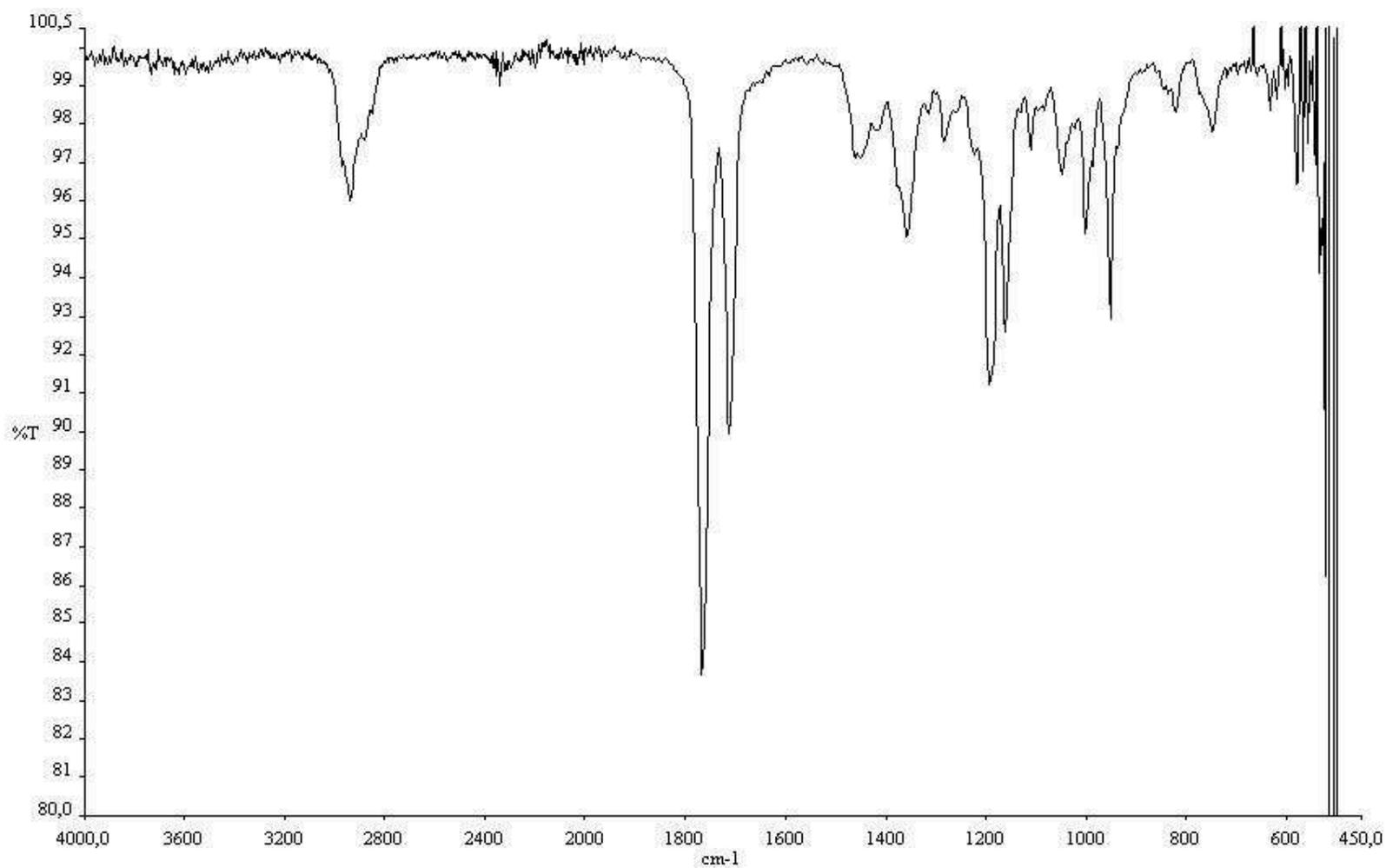


Fig. 34 Spettro IR dell'inuloxina B (2) registrato come film liquido

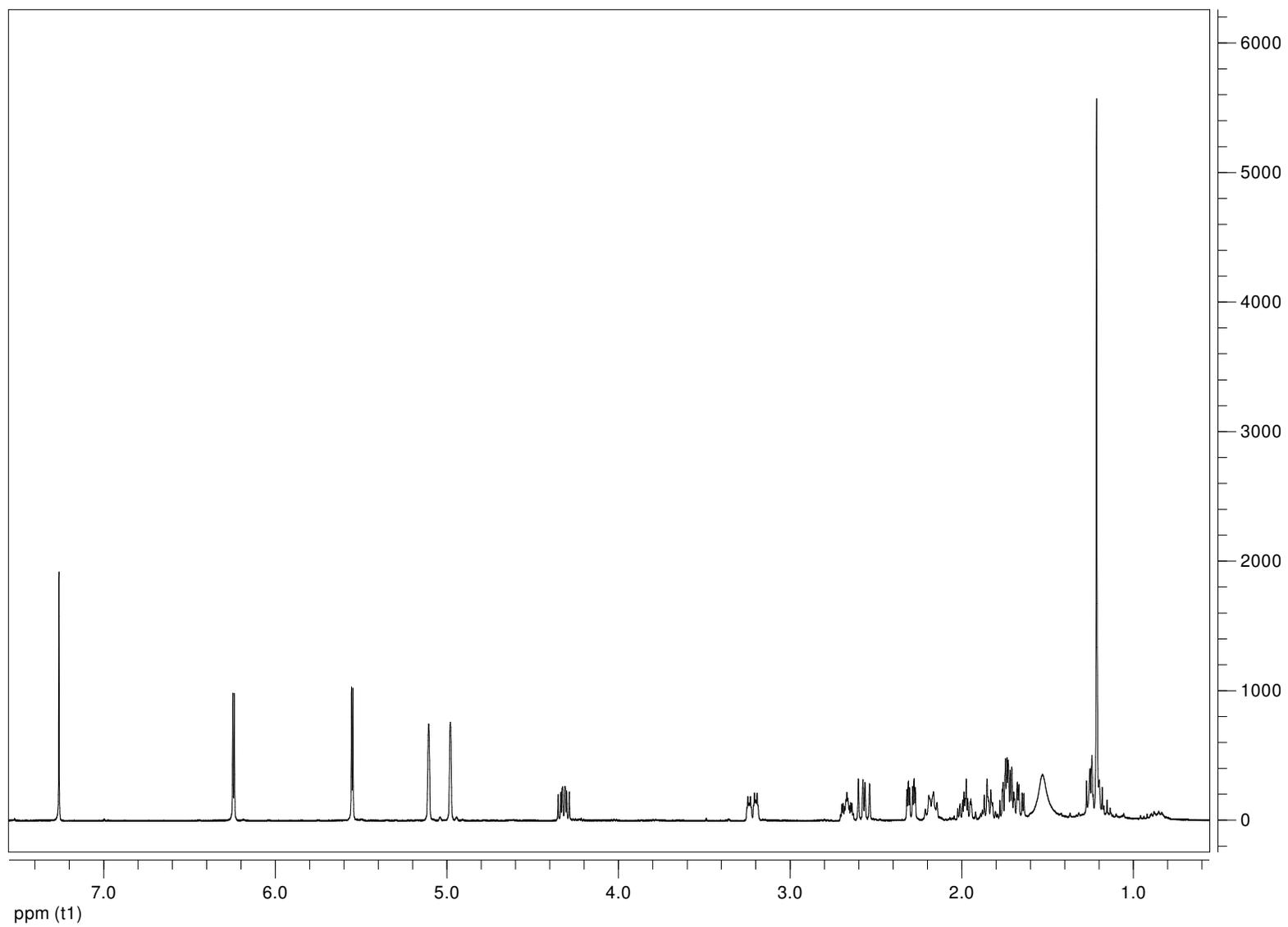


Fig. 35 Spettro ¹H NMR dell' inuloxina C (**3**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

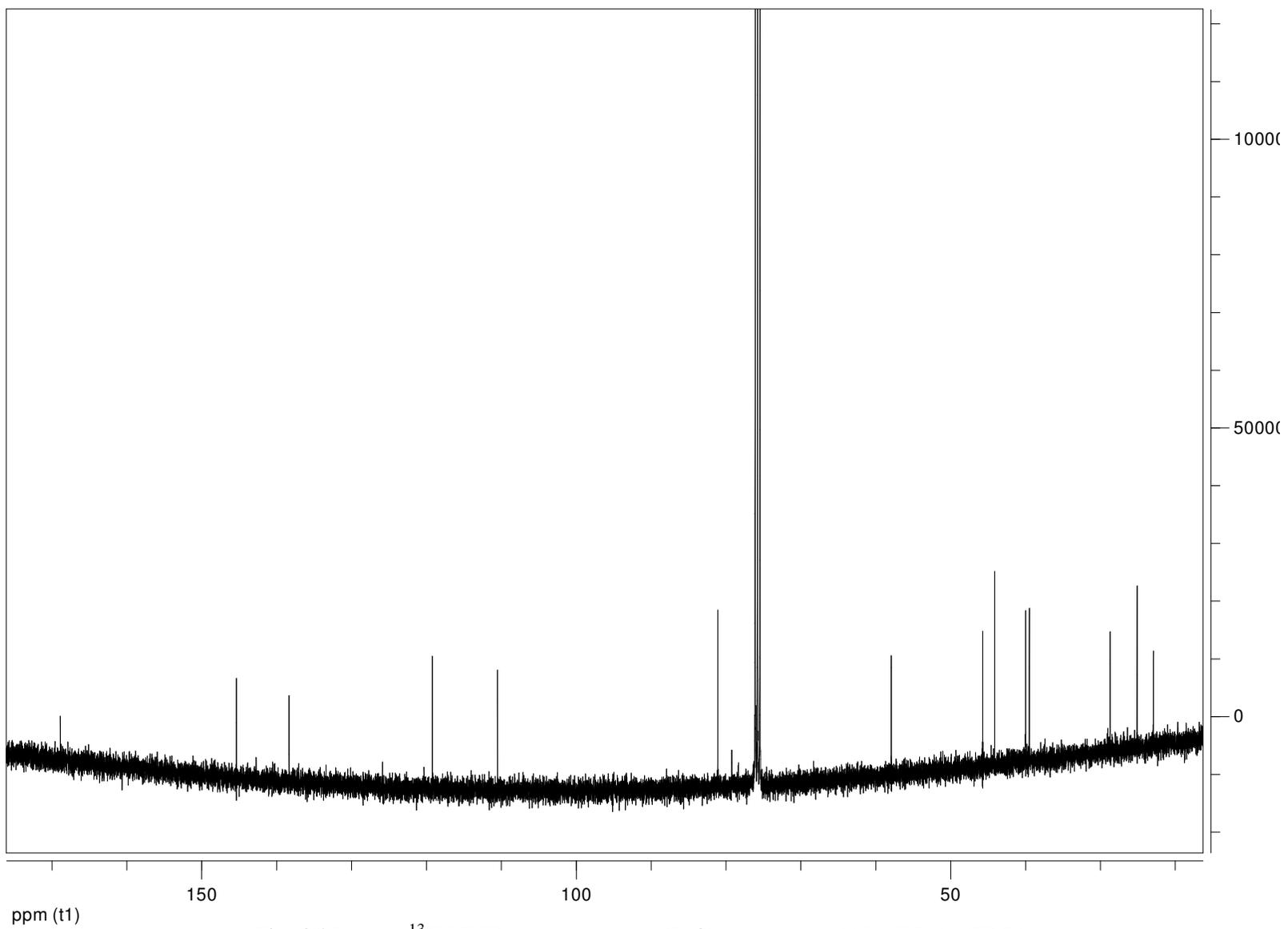


Fig. 36 Spettro ^{13}C NMR dell' inuloxina C (**3**) registrato a 100 MHz in CDCl_3

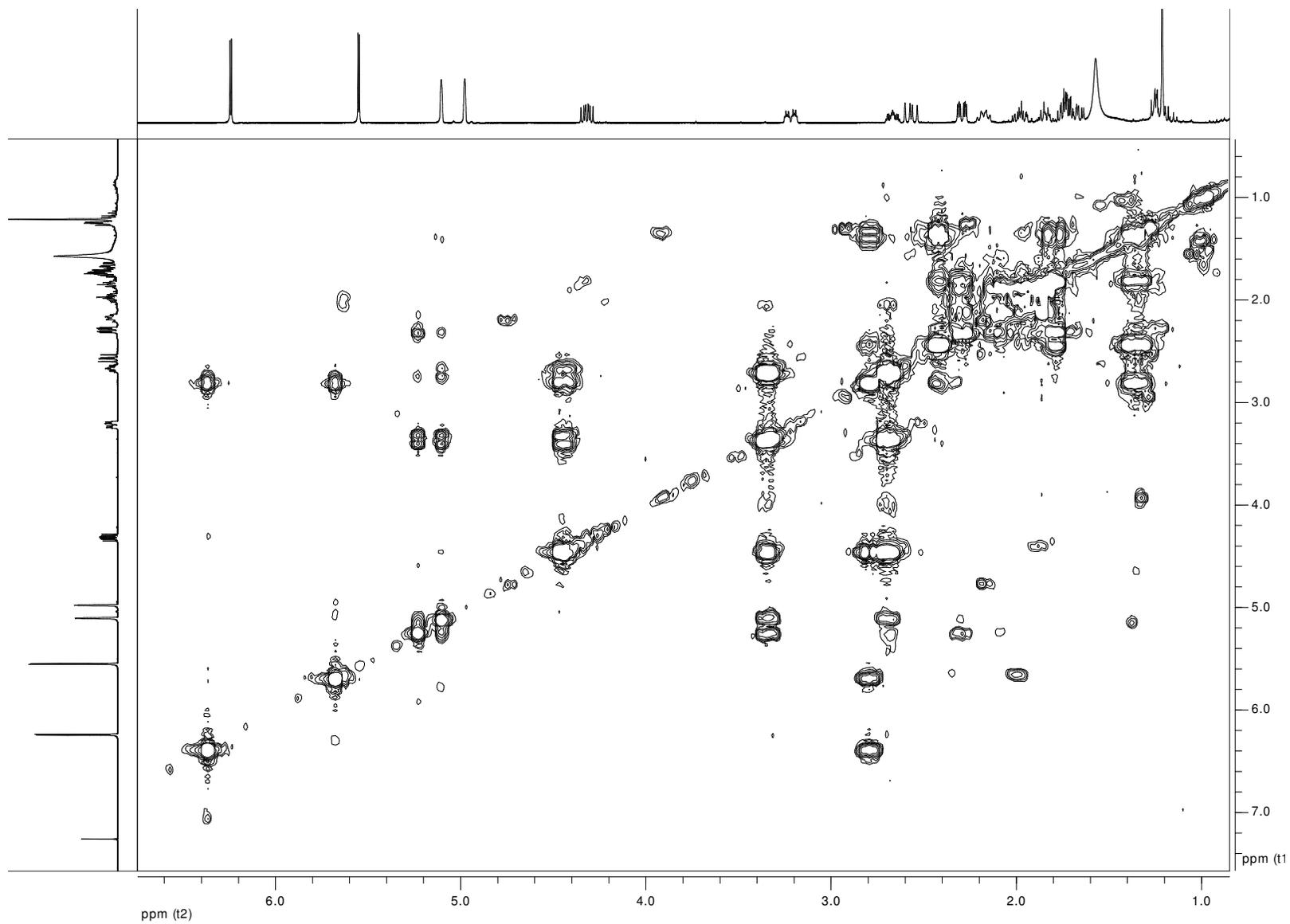


Fig. 37 Spettro COSY dell' inuloxina C (**3**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

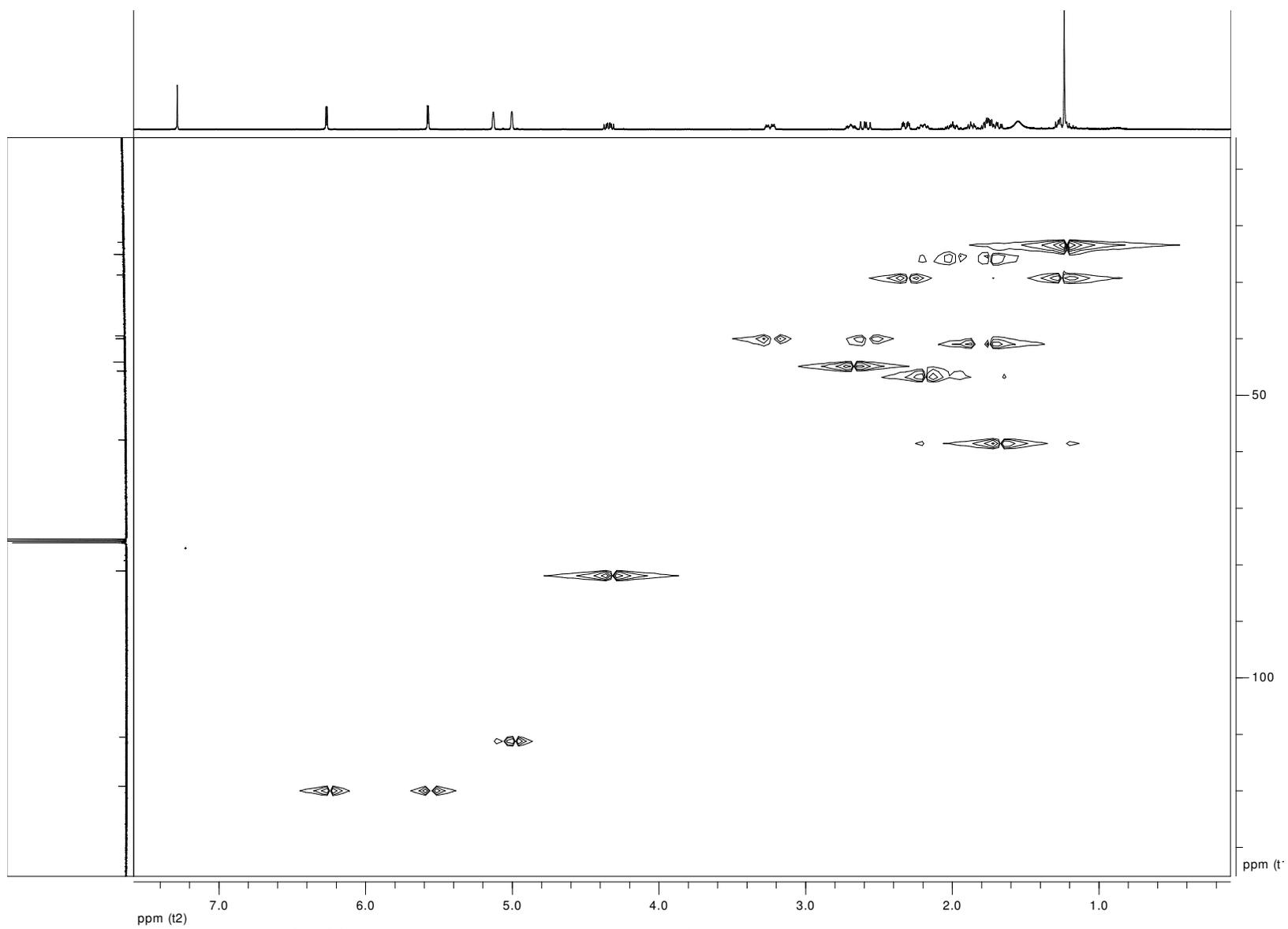


Fig. 38 Spettro HSQC dell' inuloxina C (**3**) registrato a 400 MHz in CDCl_3

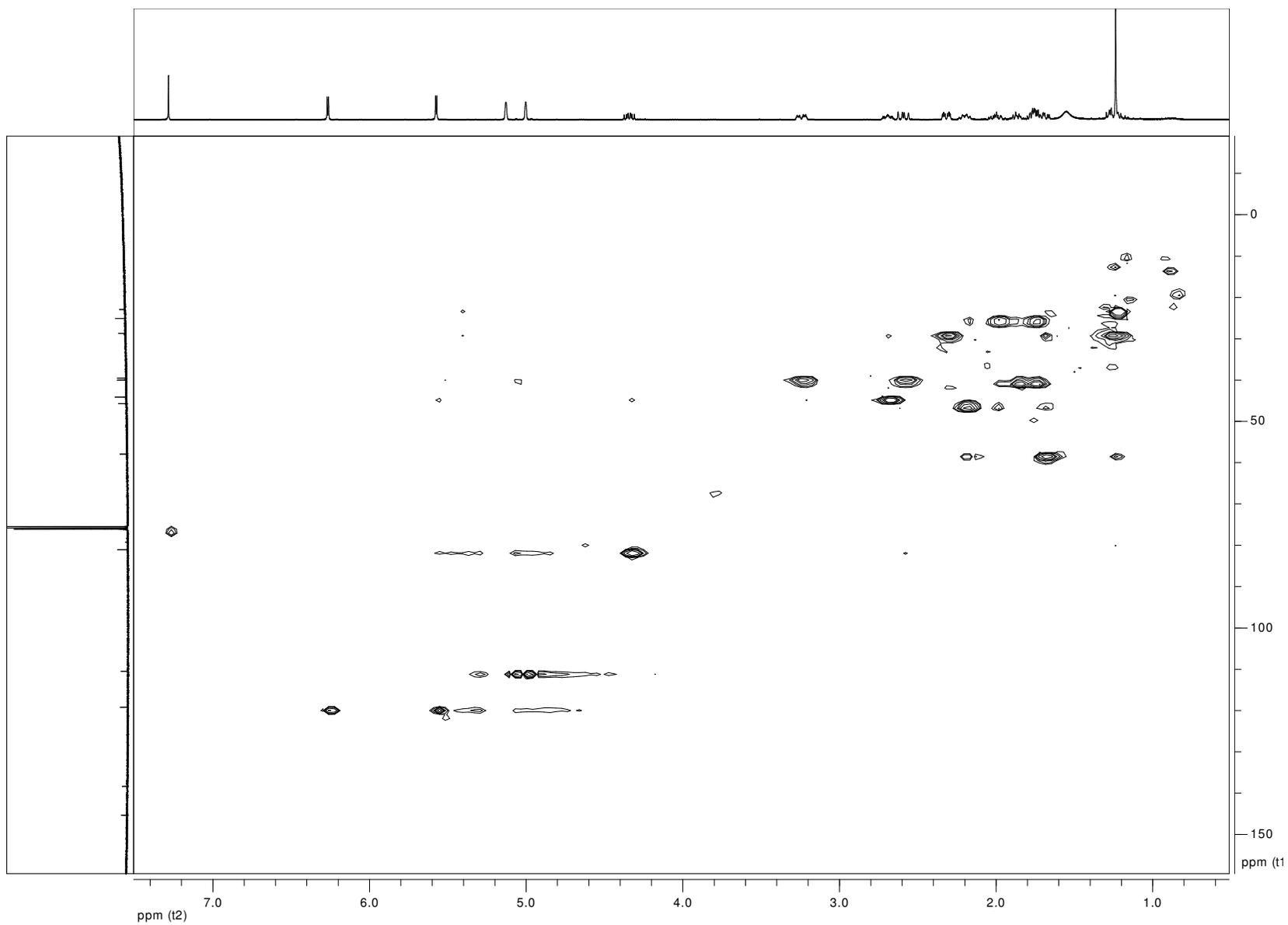


Fig. 39 Spettro HMBC dell' inuloxina C (**3**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

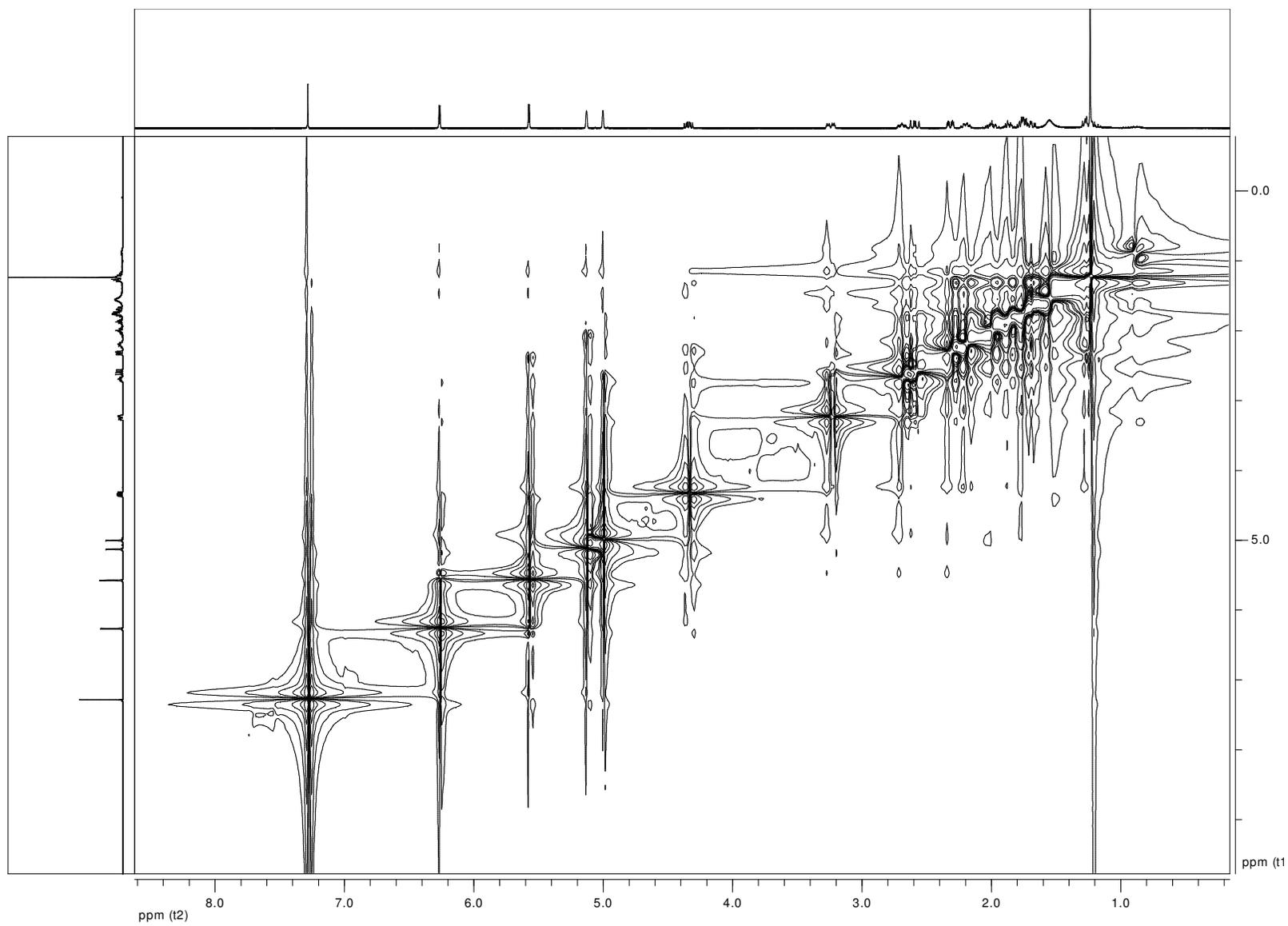


Fig. 40 Spettro NOESY dell' inuloxina C (**3**) registrato a 400 MHz in CDCl_3

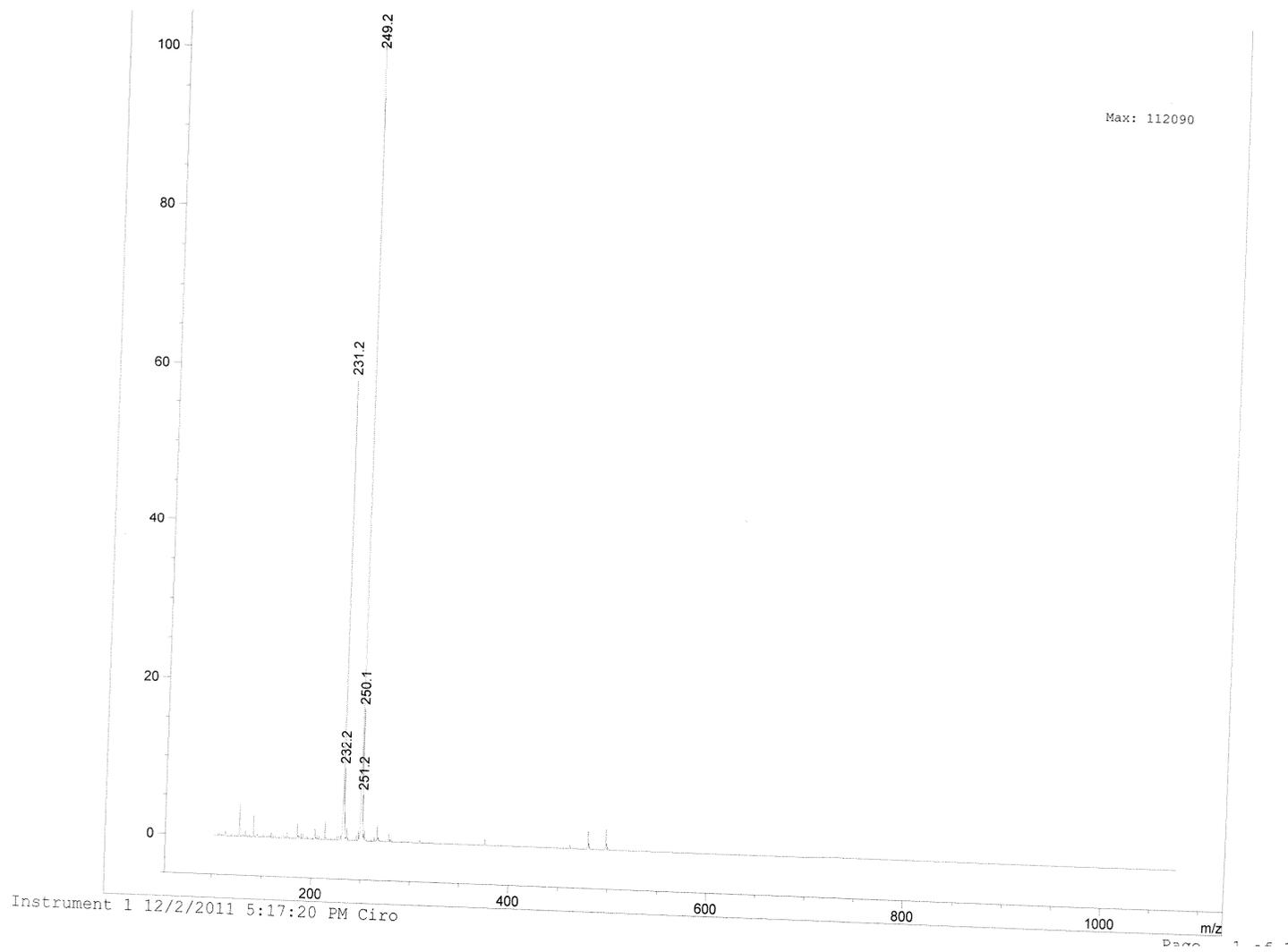


Fig. 41 Spettro APCI-MS dell' inuloxina C (3)

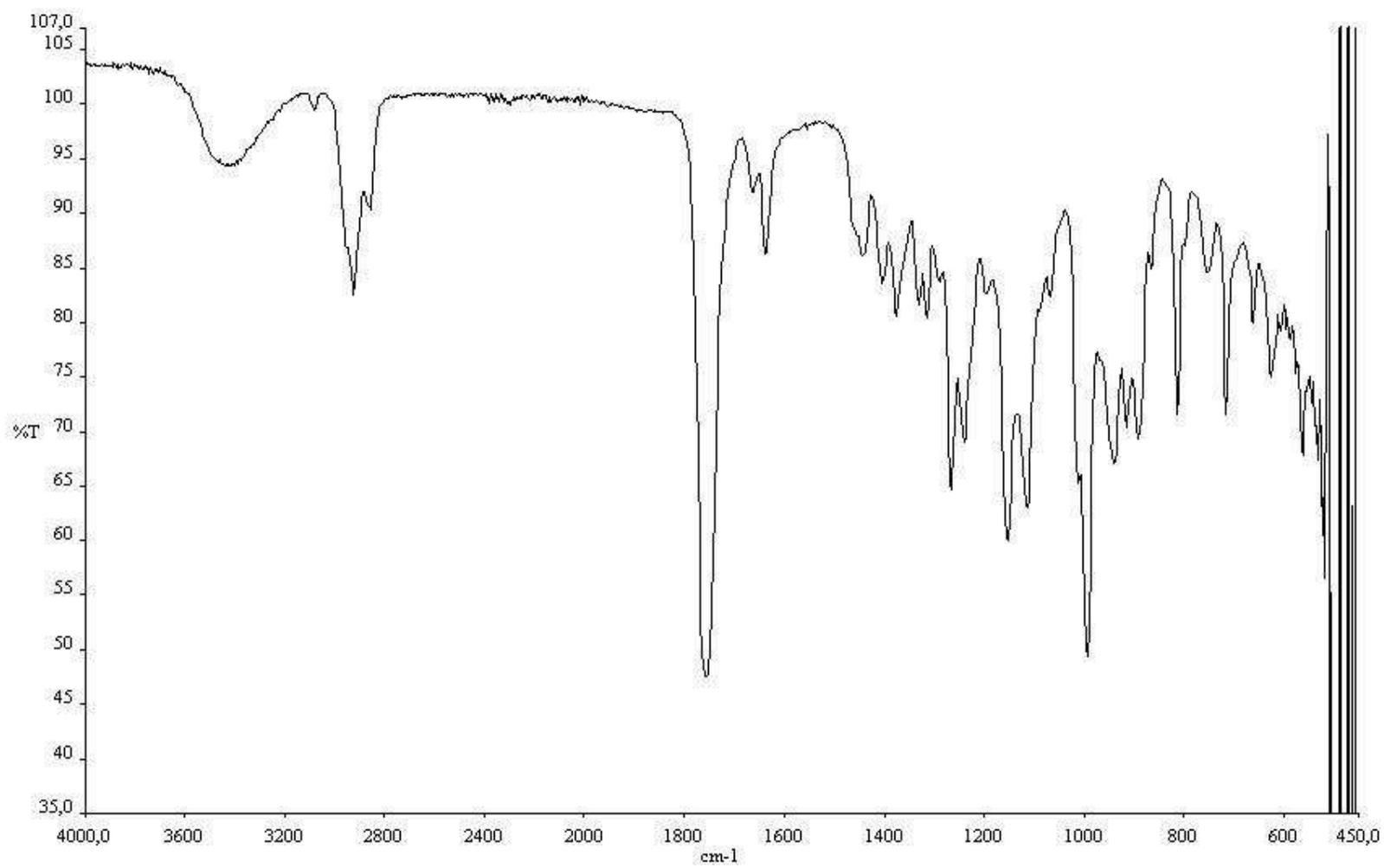


Fig. 42 Spettro IR dell'inuloxina C (3) registrato come film liquido

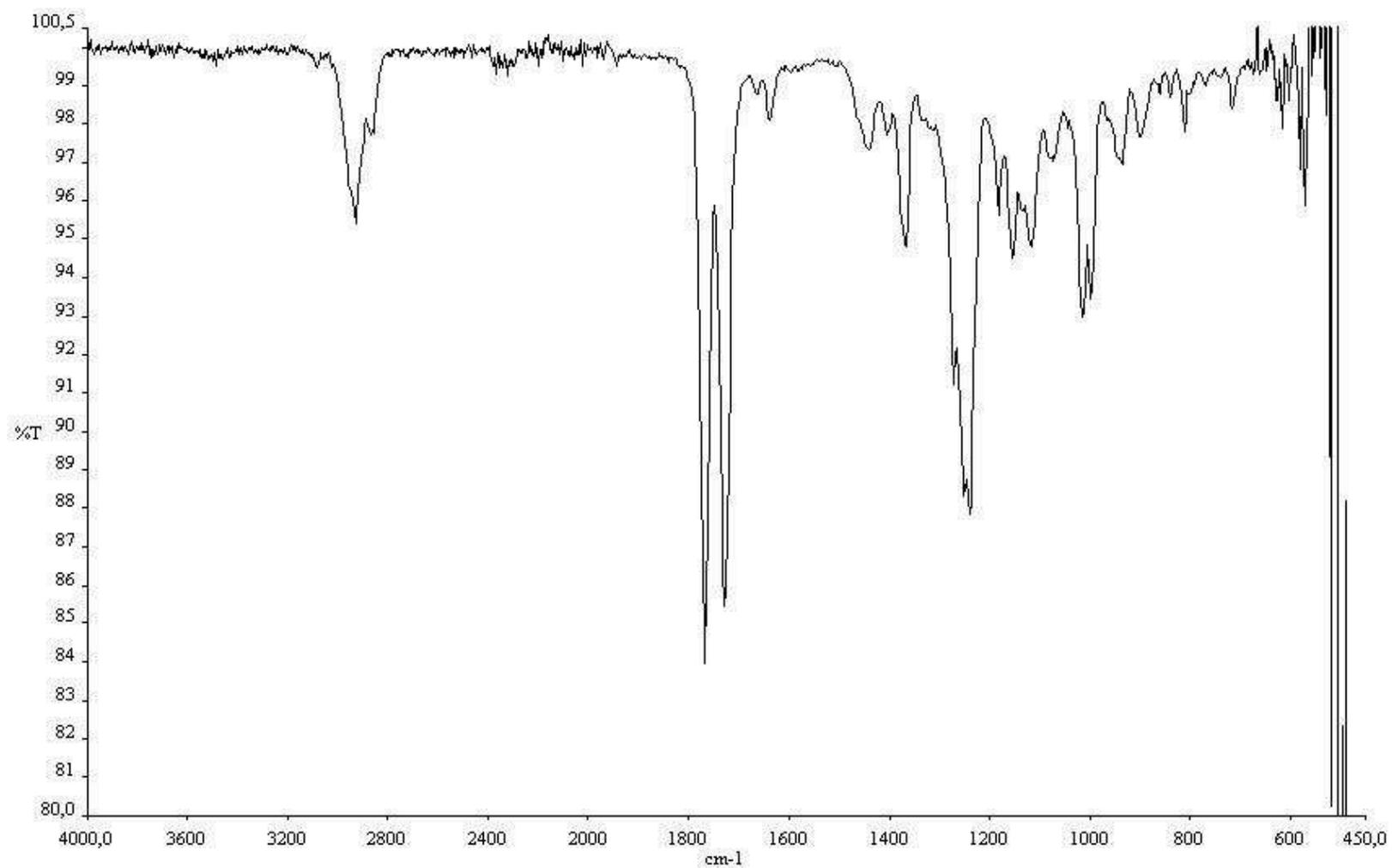
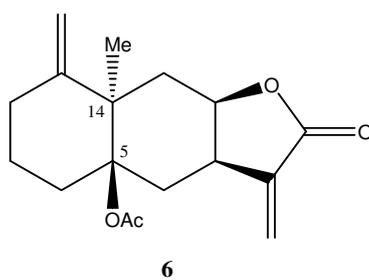
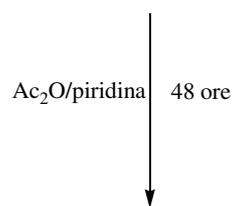
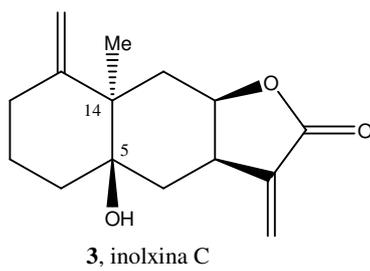


Fig. 43 Spettro IR del 5-*O*-Acetil inuloxina C (**6**) registrato come film liquido



Schema 3 Reazione di acetilazione dell'inuloxina C (**6**)

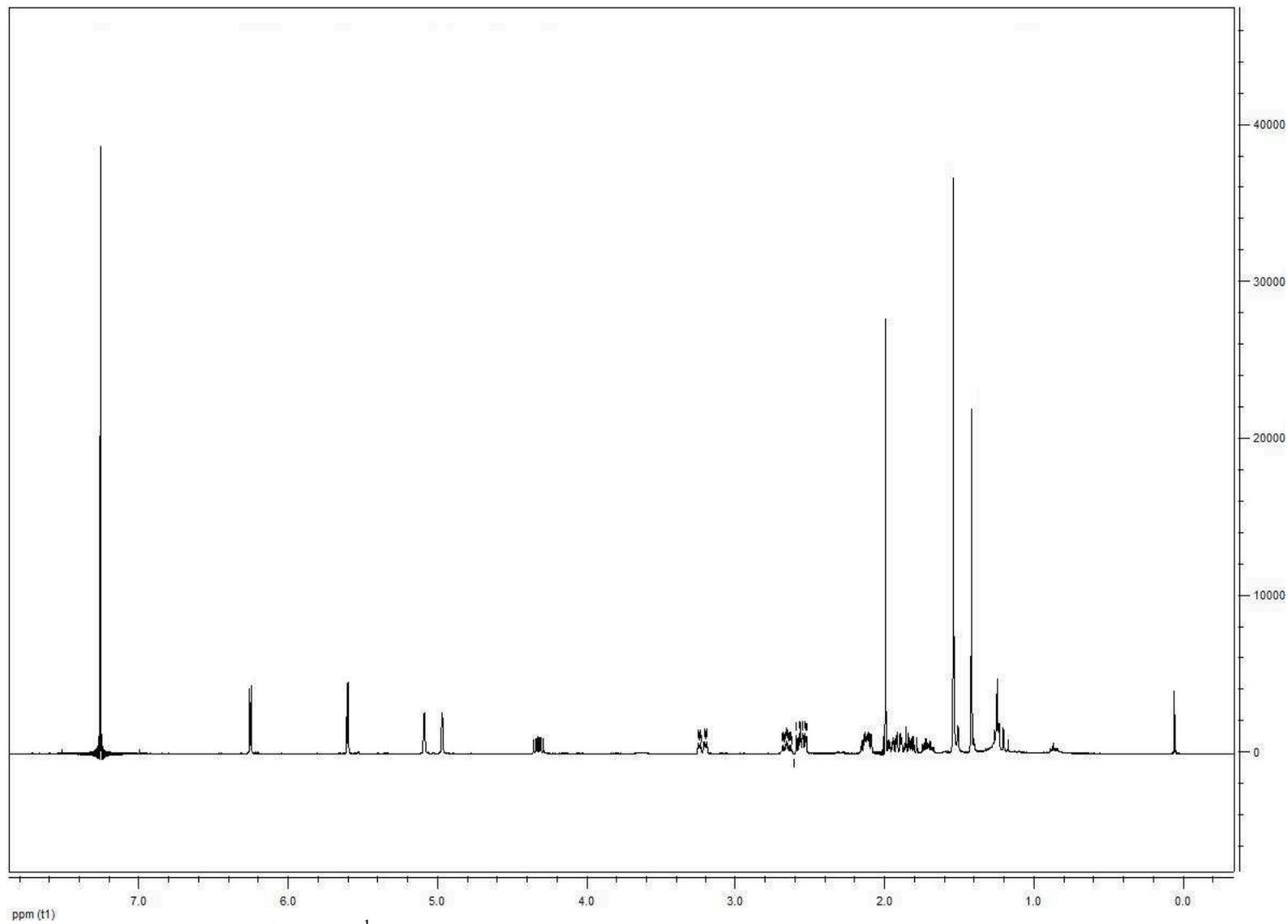


Fig. 44 Spettro ^1H NMR del 5-*O*-Acetil inuloxina C (**6**) registrato a 400 MHz in CDCl_3

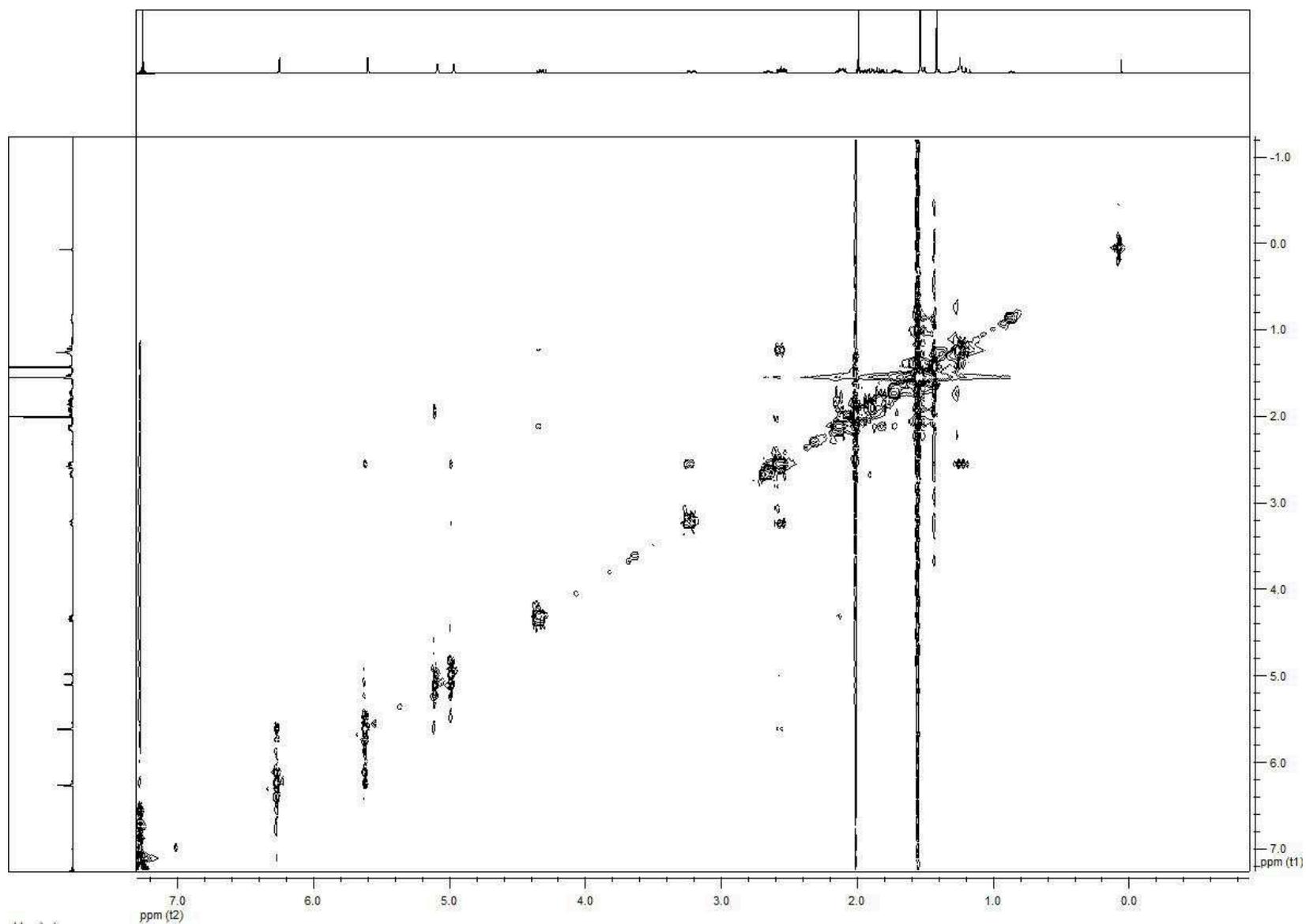


Fig. 45 Spettro NOESY del 5-*O*-Acetyl inuloxina C (**6**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

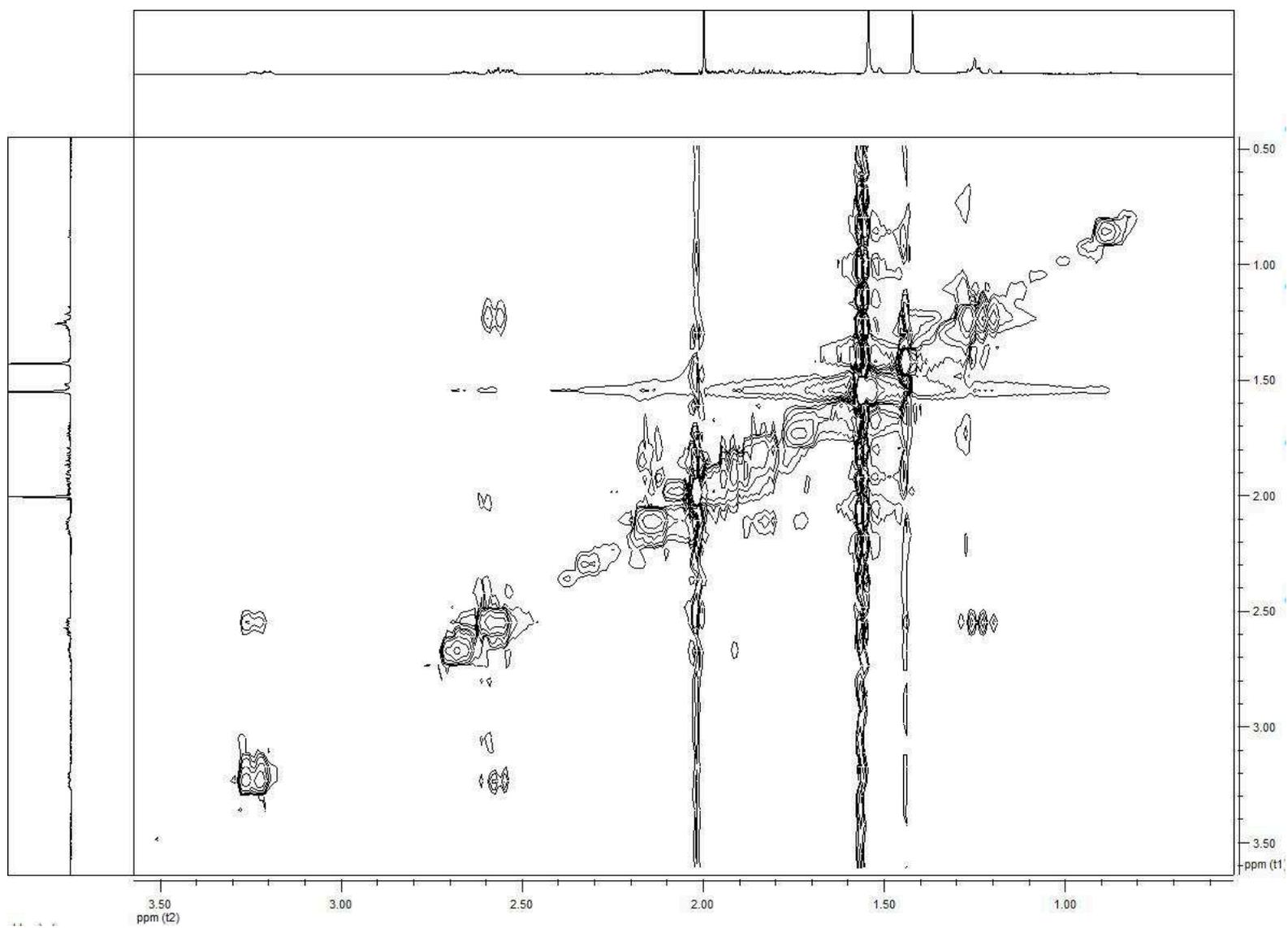


Fig. 46 Spettro NOESY espanso del 5-*O*-Acetil inuloxina C (6)

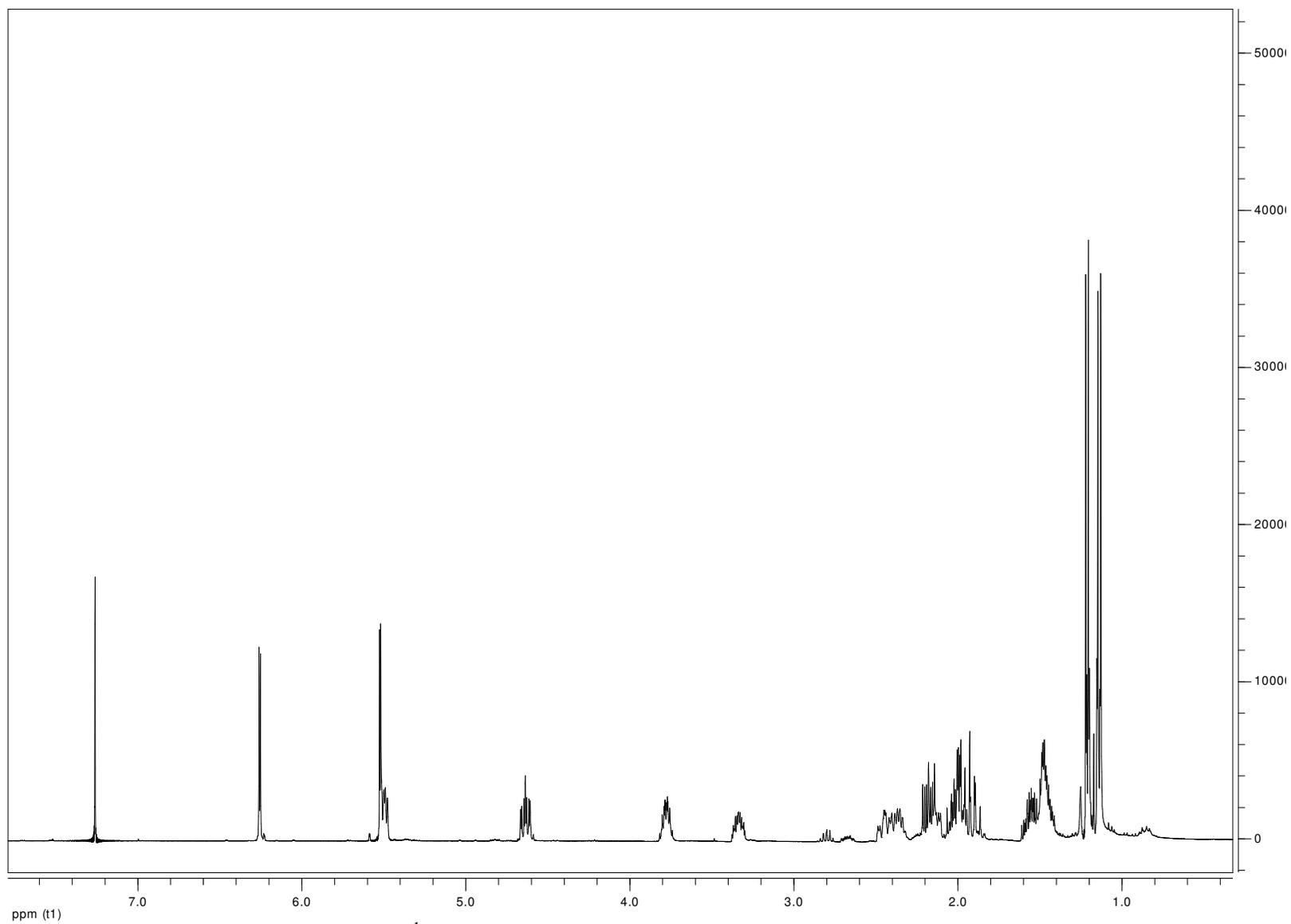


Fig. 47 Spettro¹H NMR dell' inuloxina D (**4**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

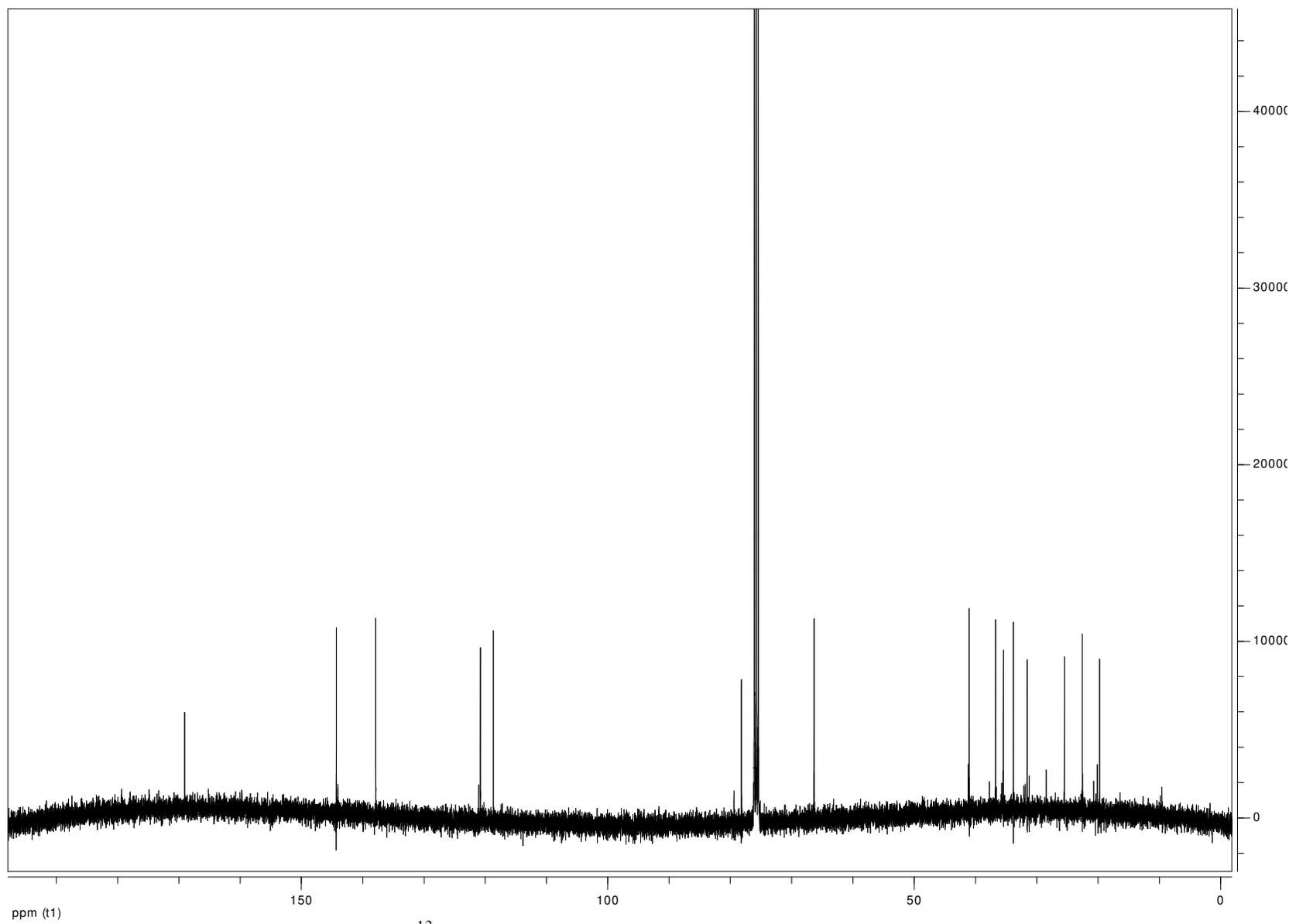


Fig. 48 Spettro ^{13}C NMR dell' inuloxina D (**4**) registrato a 100 MHz in CDCl_3

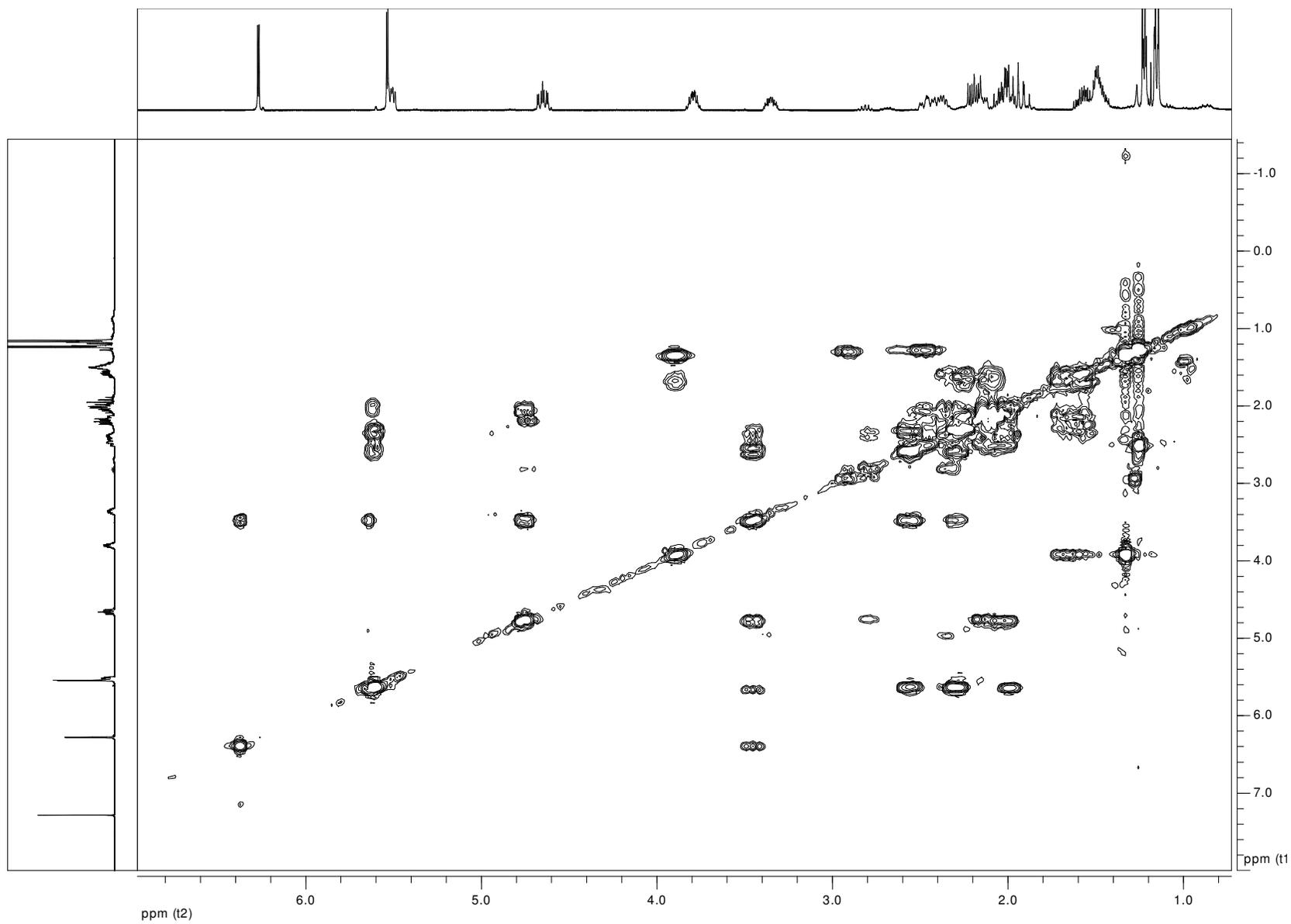


Fig. 49 Spettro COSY dell' inuloxina D (**4**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

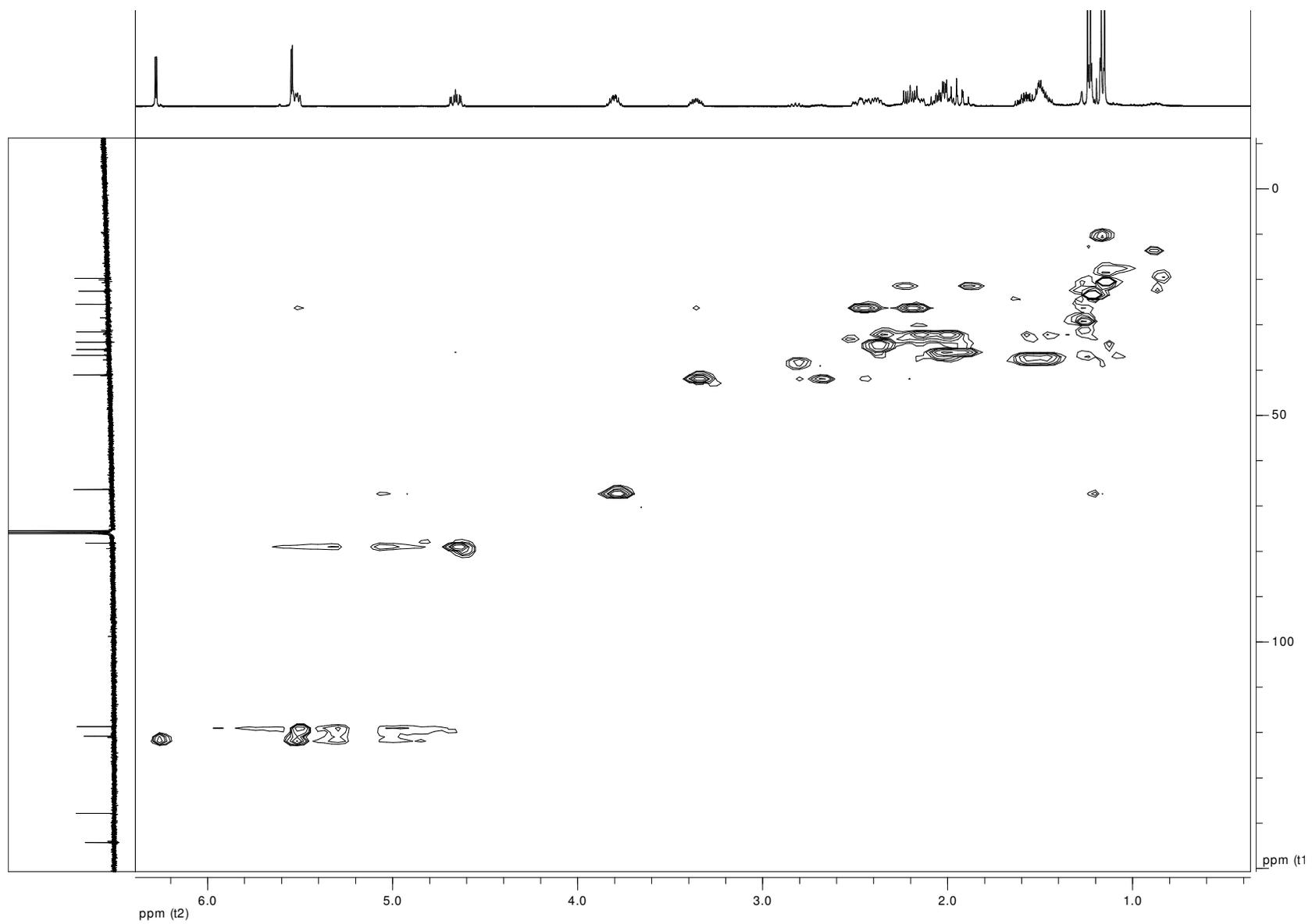


Fig. 50 Spettro HSQC dell' inuloxina D (**4**) registrato a 400 MHz in CDCl_3

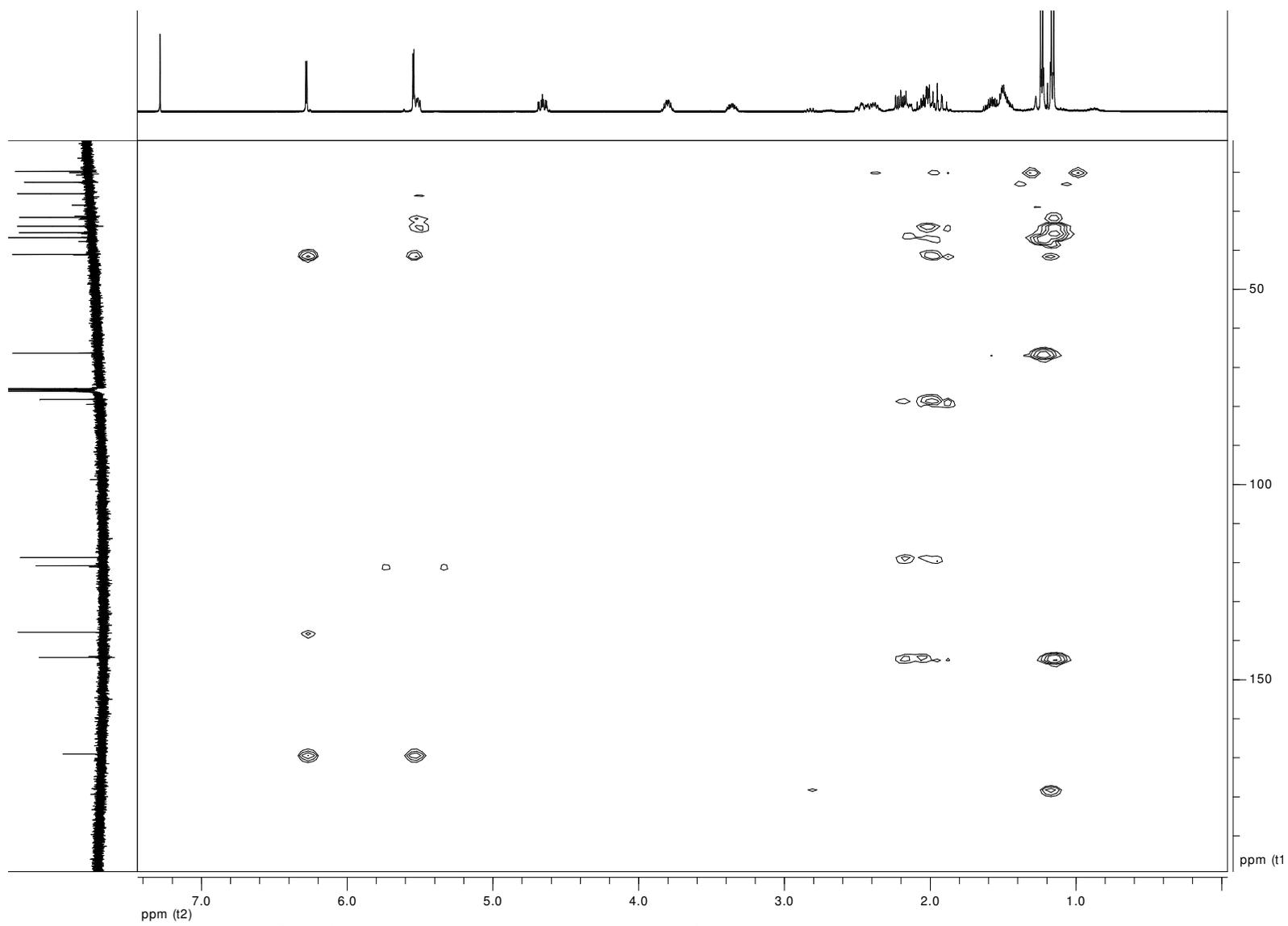


Fig. 51 Spettro HMBC dell' inuloxina D (**4**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

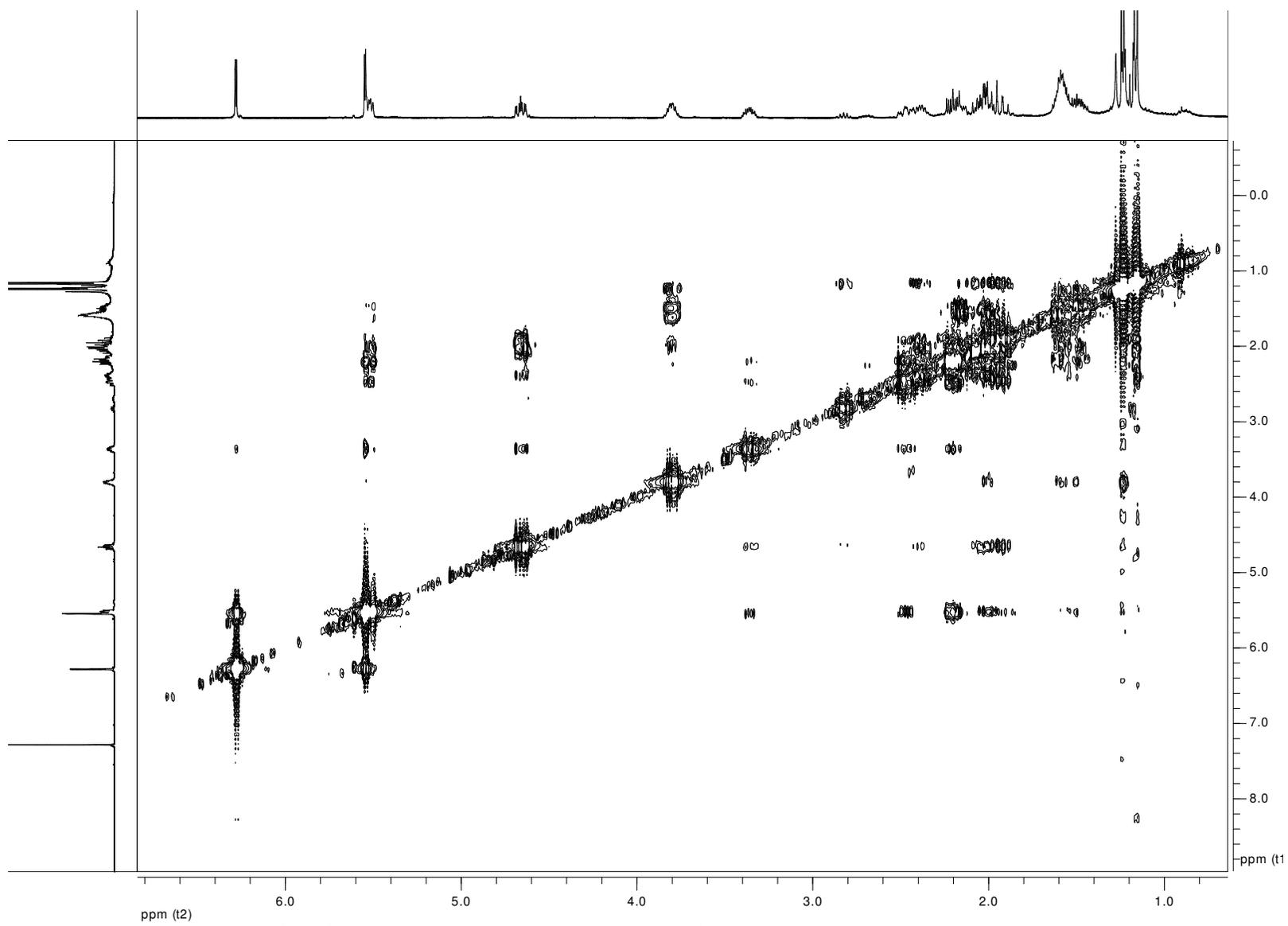


Fig. 52 Spettro NOESY dell' inuloxina D (4) registrato a 400 MHz in CDCl₃

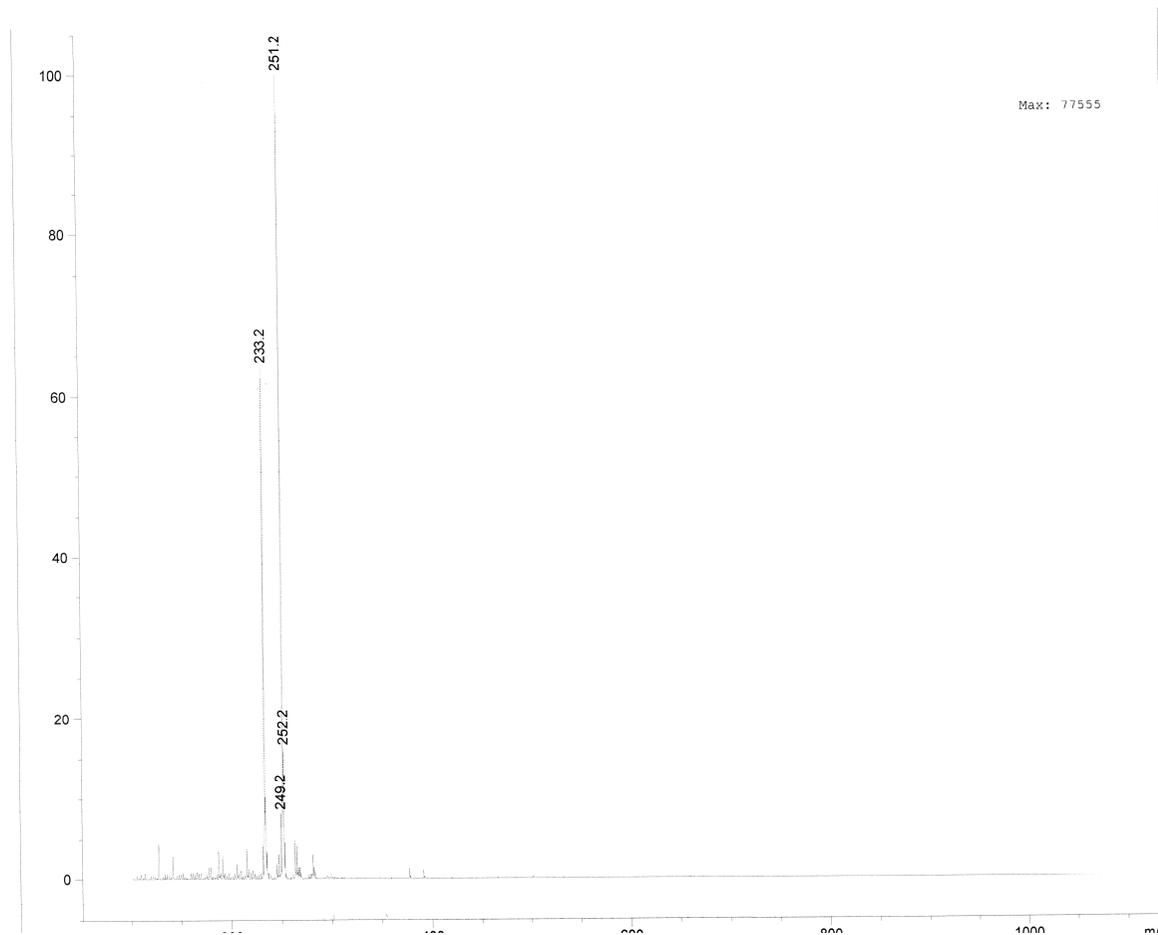


Fig. 53 Spettro APCI-MS dell' inuloxina D (4)

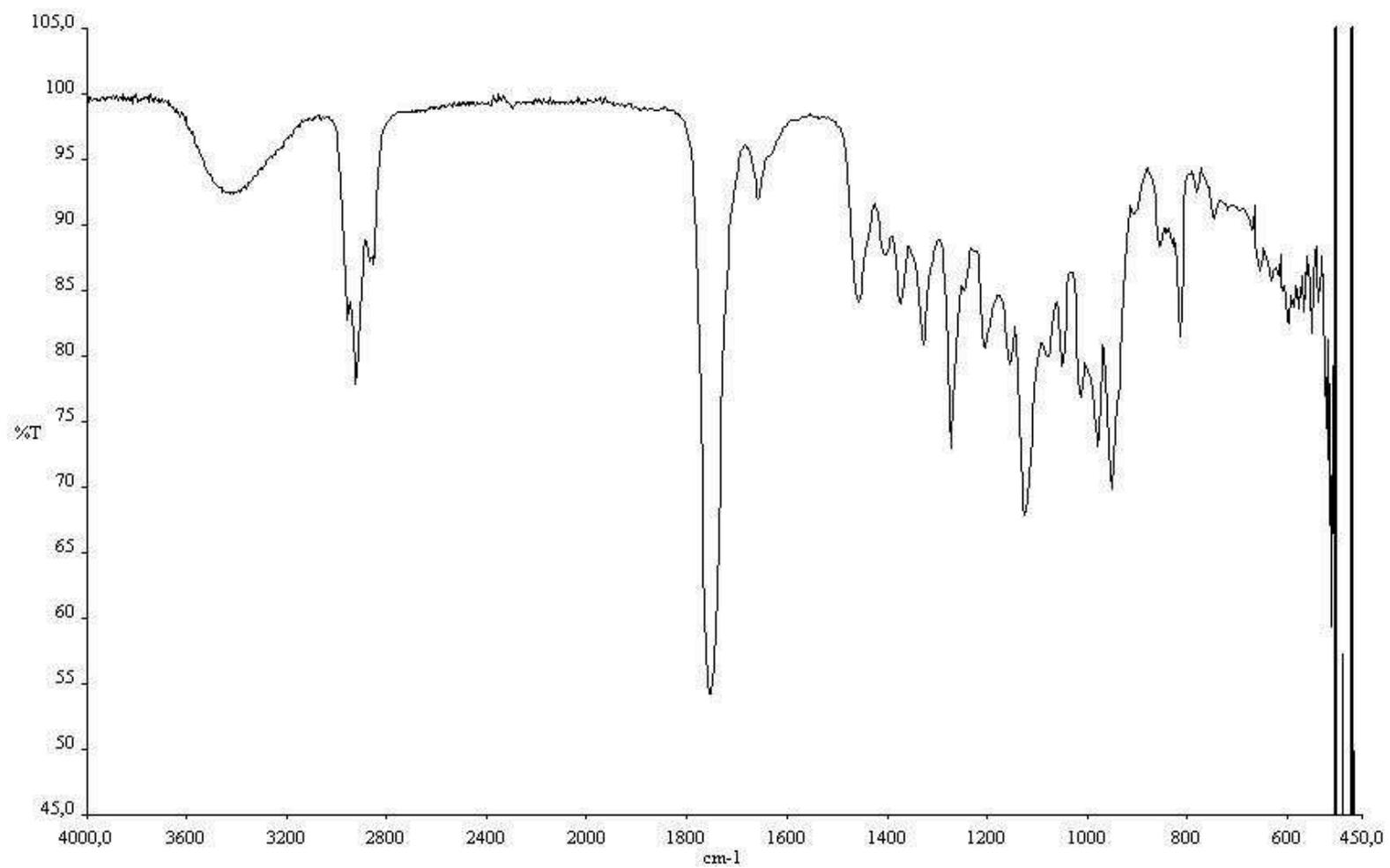
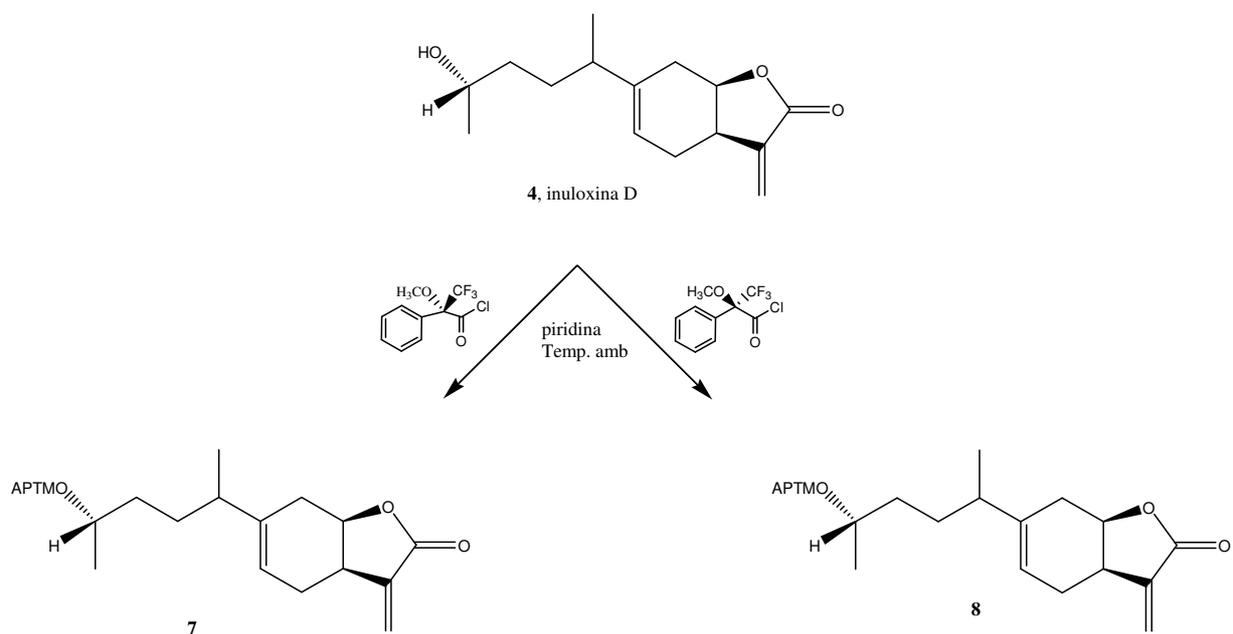


Fig. 54 Spettro IR dell'inuloxina D (4) registrato come film liquido



Schema 4 Reazione dell'inuloxina D (4) con l'R-(-) e l'S-(+) α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetil-cloruro (MTPA).

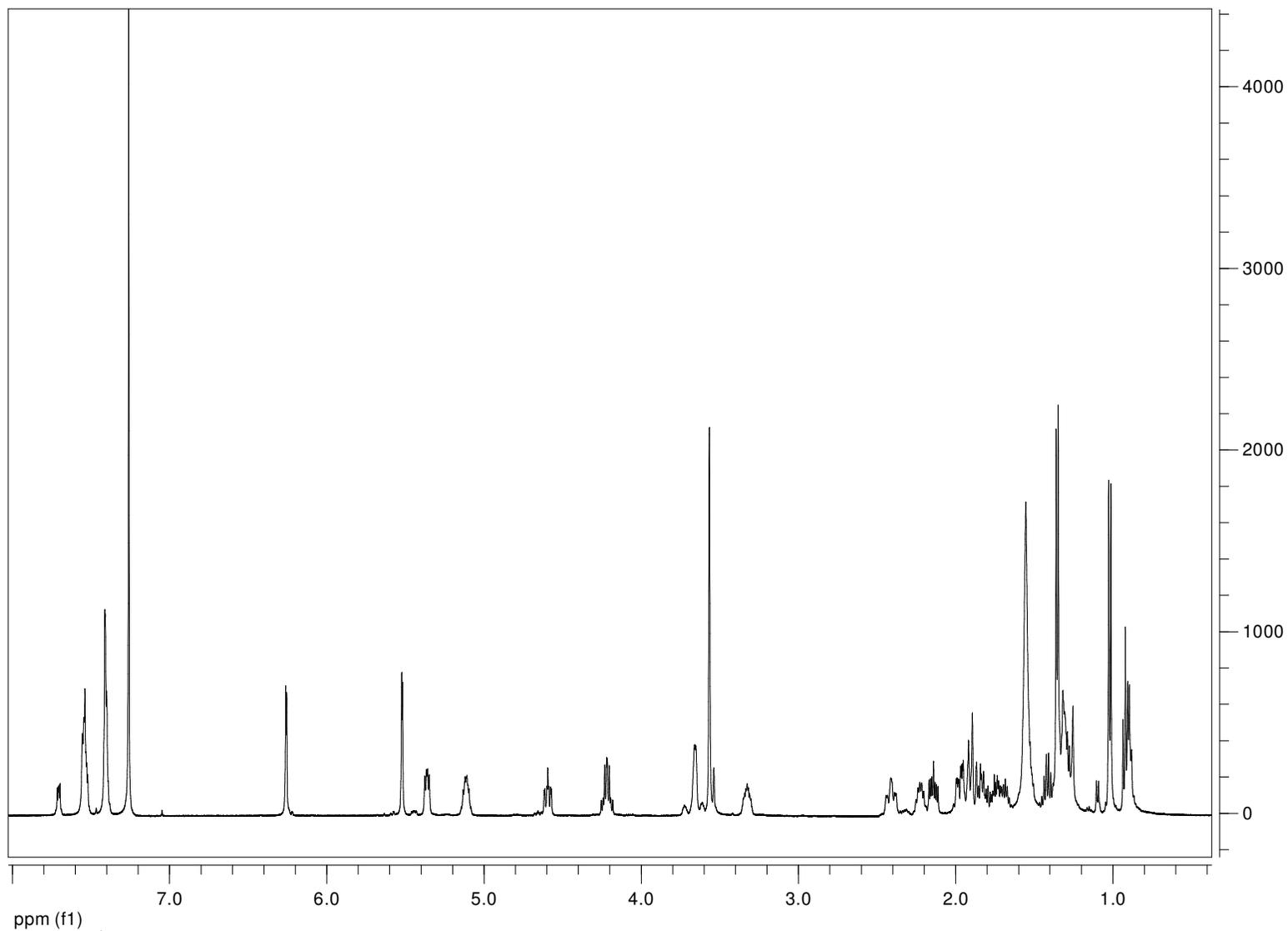


Fig. 55 Spettro ¹H NMR del (S)- α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) dell' inuloxina D (7) registrato a 400 MHz in CDCl₃

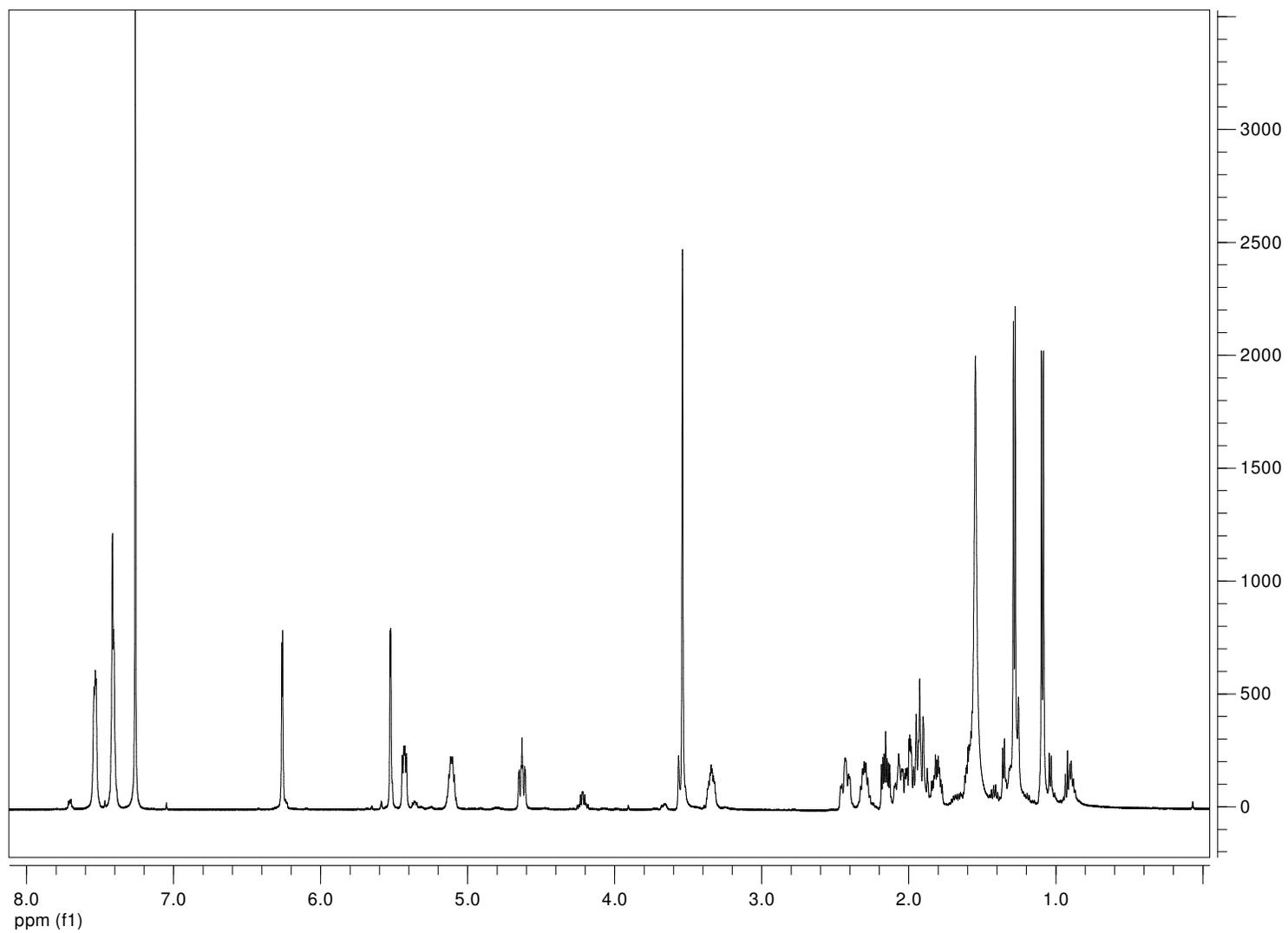


Fig. 56 Spettro ¹H NMR del (R)- α -Metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato (MTPA) dell' inuloxina D (**8**) registrato a 400 MHz in CDCl₃

Tabella 5 ^1H NMR dell'S e dell'R- α -metossi- α -trifluorometil- α -fenilacetato dell' inuloxina D

Posizione	7	8
	δH (J in Hz)	δH (J in Hz)
1	2.303 m	2.231 m
2	2.022 m	1.991 m
	1.994 m	1.963 m
3	1.420 m	1.321 m
	1.416 m	1.298 m
4	4.222 m	4.221 m
5	5.43 dd (8.5, 5.0)	5.366 dd (9.0, 5.0)
6	2.432 m	2.414 m
	2.157 m	2.144 m
7	3.340 m	3.326 m
8	4.634 ddd (11.5, 8.5, 2.5)	4.598 ddd (12.0, 8.5, 2.5)
9	1.931 m	1.896 m
	1.822 m	1.719 m
13	6.265 d (3.0)	6.261 d (3.0)
	5.529 d (3.0)	5.524 d (3.0)
14	1.282 d (6.5)	1.357 d (6.5)
15	1.091 d (7.0)	1.023 d (7.0)

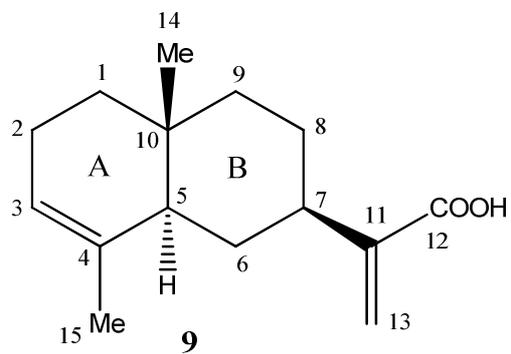


Fig. 57 Struttura dell'acido- α -costico (**9**)

Tabella 6 Dati spettroscopici dell'acido- α -costico (**9**)^{a,b}

Posizione	δ^c	δ^H	J (Hz)	HMBC
1	37.8 t	1.36 (2H) m		H-6B
2	23.4 t	2.09 m 1.96 m		H ₂ -3
3	121.1 d	5.32 br s		Me-4
4	134.8 s			H ₂ -2, Me-4
5	46.8 d	2.02 m		H ₂ -2, Me-4, H-6A, H ₂ -9 Me-10
6	40.1 t	1.27 q 1.46 dt	(13.1) (13.1, 3.7)	H-13B
7	40.0 d	2.42 brt	(13.1,12.6, 3.7)	H ₂ -13, H-5, H-8a, H- 8B, H-6A, Me-10
8	29.7 t	1.68 br d 1.56 ddd	(13.0) (13.0, 12.6, 3.7)	H-7, H-9A, H ₂ -6
9	27.4 t	1.86 br d 1.28 td	(12.6) (12.6, 2.7)	H-5, H-8A, Me-10
10	32.3			H-9A, H-8B, H-2B
11	145.1 s			H-13A, H-7
12	171.9 t			H ₂ -13
13	125.4 t	6.32 s 5.68 s		H-7
Me-14	15.7 q	0.84 s		H-6B, H-5, H-2B
Me-15	21.1 q	1.62 s		H ₂ -8

^aChemical shift sono riportati in valore di δ (ppm) rispetto al TMS.

^bGli spettri NMR 2D ¹H, ¹H (COSY) ¹³C, ¹H (HSQC) hanno permesso di determinare le correlazioni di tutti i protoni con i carboni corrispondenti

^cLe molteplicità sono state assegnate mediante lo spettro DEPT

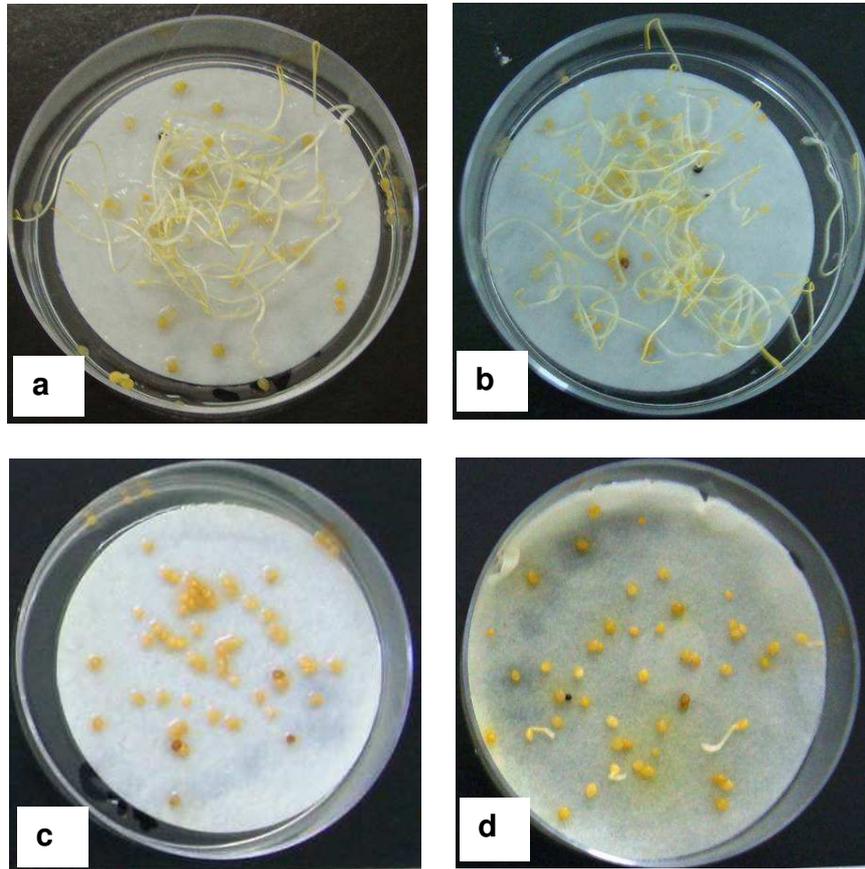


Fig . 58 Saggi di inibizione della germinazione dei semi di *Cuscuta campestris*
a) controllo negativo con acqua; b) controllo negativo con una soluzione
acquosa all'1% di metanolo; c) effetto delle soluzioni all'1% di metanolo delle
inuloxine A e D; d) effetto della soluzione all'1% di metanolo dell'inuloxina C.

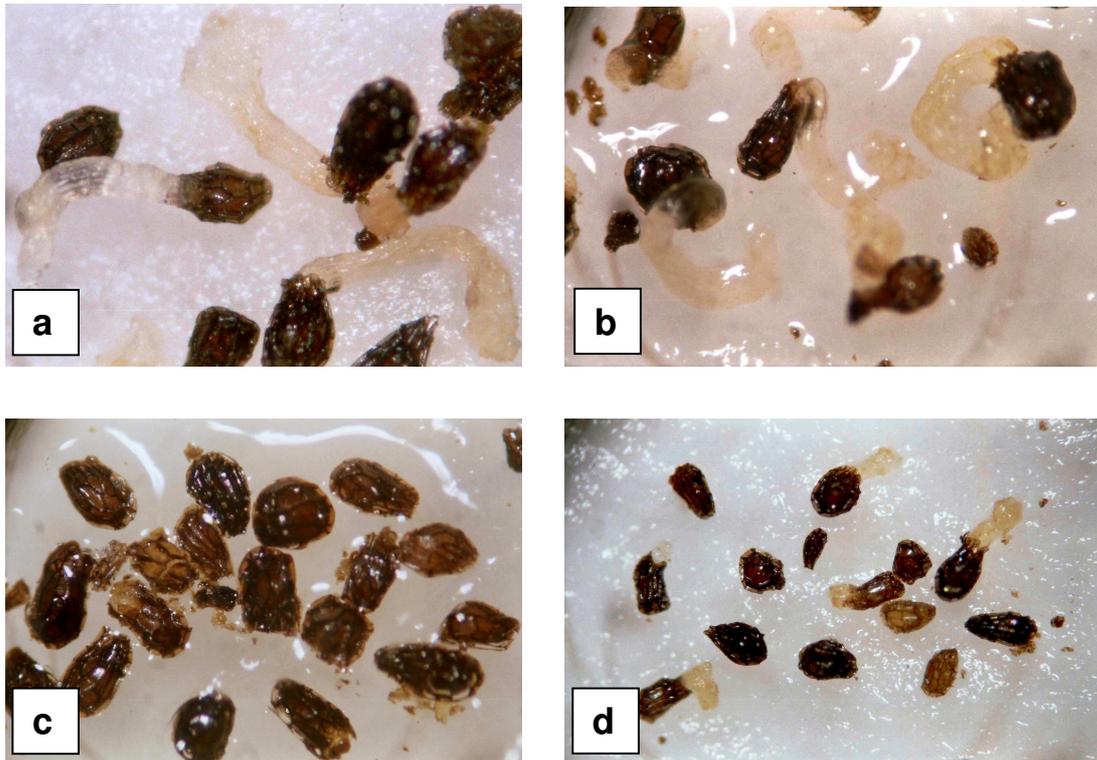


Fig. 59 Saggi di inibizione della germinazione dei semi di *Orobanche crenata*. a) controllo negativo acqua + GR24; b) controllo negativo acqua all'1% di metanolo + GR24; c) effetto delle soluzioni all'1% di metanolo delle inuloxine A, C e D; d) forte riduzione del tubo germinativo

Tabella 7 Effetti dei metaboliti isolati da *I. Viscosa*, dei derivati e dell-acido- α -costico su semi di piante parassite

Metabolita ^a	<i>Cuscutacampestris</i>	<i>Orobanchecrenata</i>	Elongazione del tubo di germe μm^b
	Germinazione dei semi % ^b	Germinazione dei semi % ^b	
Inuloxina A	0 d	0 d	0 d
Inuloxina B	34 b	40 c	43 b
Inuloxina C	2 d	0 d	0 d
Inuloxina D	0 d	0 d	0 d
Acido- α -costico	15 c	57 a	77 a
Inuloxina C acetilata	15 c	24 c	24 c
Diazo Inuloxina A	55 a	40 b	33 b
Controllo (H ₂ O) ^c	55 a	34 bc	82 a
Controllo (H ₂ O + MeOH) ^c	62 a	36 bc	n.t.

^ale inuloxine A-D sono state saggiate ad una concentrazione rispettivamente di $1.6 \cdot 10^{-3}$ M e di $4.0 \cdot 10^{-4}$ M su *C. campestris* e *O. crenata*, mentre l'acido- α -costico era saggiato ad una concentrazione di $1.7 \cdot 10^{-3}$ M su *C. campestris* e di $4.3 \cdot 10^{-4}$ M su *O. crenata*.

^ble lettere diverse all'interno di ogni colonna sono significativamente differenti (Duncan-test at $p \leq 0.05$). Media di tre repliche

^cI saggi effettuati su *O. crenata* contenevano lo stimolante sintetico GR24 come riportato dettagliatamente nella parte sperimentale.