



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

**In Scienze e Tecnologie Farmaceutiche
Ciclo XXIV**

TITOLO TESI

**Isolamento e caratterizzazione chimico-strutturale di
metaboliti secondari dal genere *Ononis* e *Seseli*.**

Settore scientifico disciplinari di afferenza
Chimica farmaceutica (CHIM 08)

Presentata da:

Dott.ssa Anna Rita Saba

Coordinatore Dottorato

Prof. Elias Maccioni

Tutor/Relatore

Dott.ssa Laura Casu

Dott. Marco Leonti

Esame finale anno accademico 2010 – 2011

Ai miei cari

Indice analitico

SUMMARY	1
RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. Uso delle piante nella medicina popolare	5
Bibliografia	11
2. IL GENERE <i>ONONIS</i>	13
2.1. Sistematica	13
2.1.1 Introduzione	13
2.1.2 Caratteristiche del genere <i>Ononis</i>	13
2.1.3 Distribuzione in Italia	14
2.2. Fitochimica del genere <i>Ononis</i>	14
2.2.1 I flavonoidi	14
2.2.1.1 Struttura e proprietà chimico-fisiche	14
2.2.1.2 Distribuzione e funzione nelle piante	16
2.2.1.3 Attività farmacologiche e terapeutiche	19
2.2.2 I resorcinoli	22
2.2.2.1 Introduzione	22
2.2.2.2 Attività biologica	28
2.2.3 Le isocumarine	29
Bibliografia	32

3. ONONIS NATRIX L.	36
3.1. Caratteristiche della pianta	36
3.2. Luogo di raccolta	37
3.3. Risultati fitochimici dell'<i>Ononis natrix</i> L.	38
3.4. Estrazione e isolamento	40
3.4.1 Frazionamento dell'estratto diclorometanico	40
3.5. Delucidazione delle strutture note isolate dall'<i>Ononis natrix</i> L. 46	
3.5.1 2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone	46
3.5.2 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone.....	49
3.5.3 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone.....	52
3.5.4 2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxydihydrochalcone	55
3.5.5 2',4-dimethoxy-4',6'-dihydroxydihydrochalcone	58
3.5.6 2',4'-dihydroxy-4-methoxydihydrochalcone	61
3.5.7 2',4'-dihydroxychalcone	63
3.5.8 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone	66
3.5.9 7-hydroxyflavanone.....	69
3.5.10 7-hydroxy-8-methoxyflavanone	72
3.5.11 5,7-dihydroxyflavanone.....	75
3.5.12 5-methoxy-7-hydroxyflavanone	78
3.5.13 7-hydroxy-8-methoxyflavone	80
3.5.14 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone	83

3.6. Delucidazione delle strutture nuove isolate dall'<i>Ononis</i>	
<i>natrix</i> L	86
3.6.1 Composto 15	86
3.6.2 Composto 16	95
3.6.3 Composto 17	103
3.7. Risultati biologici sui composti isolati dall'<i>Ononis natrix</i> L	110
3.7.1 Screening biologico preliminare	110
3.7.2 Risultati biologici	111
Bibliografia	114
4. IL GENERE <i>SESELI</i>	117
4.1. Sistematica	117
4.1.1 Introduzione	117
4.1.2 Caratteristiche del genere <i>Seseli</i>	118
4.1.3 Distribuzione in Italia	118
4.2. Fitochimica del genere <i>Seseli</i>	119
4.2.1 Le cumarine	119
4.2.1.1 Struttura e proprietà chimico-fisiche	119
4.2.1.2 Distribuzione e funzione nelle piante	121
4.2.1.3 Le cumarine nel genere <i>Seseli</i>	122
4.2.1.4 Attività farmacologiche e terapeutiche	126
4.2.2 I cromoni	127
4.2.3 Finilpropanoidi	128
4.2.4 Lignani	129
4.2.5 Terpeni	130

4.2.6 Sesquiterpeni	131
4.2.7 Poliacetileni	133
4.2.7.1 I poliacetileni nel genere <i>Seseli</i>	134
 Bibliografia	 137
 5. SESELI PRAECOX	 142
5.1. Caratteristiche della pianta	142
5.2. Luogo di raccolta	143
5.3. Risultati fitochimici della <i>Seseli praecox</i>	144
5.4. Estrazione e isolamento	147
5.4.1 Frazionamento dell'estratto diclorometanico	147
5.5. Delucidazione delle strutture note isolate dalla <i>Seseli praecox</i>	151
5.5.1 9-(acetyloxy)8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-pyrano[2,3-<i>f</i>]chromen-10-yl (Z)-2-methyl-2-butenoate	151
5.5.2 9-(acetyloxy)8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-pyrano[2,3-<i>f</i>]chromen-10-yl-3-methylbutenoate	155
5.5.3 9-(acetyloxy)8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-pyrano[2,3-<i>f</i>]chromen-10-yl-2-methylbutenoate	159
5.5.4 9-(acetyloxy)8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-pyrano[2,3-<i>f</i>]chromen-10-yl-2-methylpropanoate	163
5.5.5 9,10-dihydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-pyrano[2,3-<i>f</i>]chromen-2-one	167

5.5.6 Phellopterina	170
5.5.7 Bergaptene	173
5.5.8 Imperatorina	176
5.5.9 Isoimperatorina	179
5.5.10 4-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one..	182
5.5.11 7-methoxy-5-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-2H-chromen-2-one	184
5.5.12 Peucenin-7-methyl ether	187
5.5.13 Falcarinolo.....	189
5.5.14 Falcarindiolo	192
5.5.15 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2- methylchromone	195
5.6. Delucidazione della nuova struttura isolata dalla <i>Seseli</i>	
<i>praecox</i>	198
5.6.1 Composto 15	198
5.7. Risultati biologici sui khellactoni isolati dalla <i>Seseli praecox</i>...	205
5.7.1 Inibizione canali al Ca ⁺⁺	205
5.7.1.1 Introduzione.....	205
5.7.1.2 Commento dei risultati	206
5.7.2 Inibizione delle Pgp nella MDR (multidrug resi stance)	209
5.7.2.1 Introduzione.....	209
5.7.2.1 Commento dei risultati ottenuti	214
5.7.3 Commenti e progetti futuri	216
Bibliografia	217

6. MATERIALI E METODI	221
6.1. Metodi di isolamento e tecniche usate nell'isolamento dei composti	221
6.1.1 Percolazione.....	221
6.1.2 Cromatografia	222
6.1.2.1 Cromatografia su strato sottile (TLC).....	223
6.1.2.2 Cromatografia liquida sotto vuoto (VLC)	223
6.1.2.3 Cromatografia a colonna aperta classica (CC)	224
6.1.2.4 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)	226
6.2. Delucidazione dei composti isolati; strumenti impiegati per l'identificazione dei composti	227
6.2.1 La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)	228
6.2.1.1 La spettroscopia NMR unidimensionale (1D)	228
6.2.1.2 La spettroscopia NMR bidimensionale (2D)	230
6.2.2 La spettroscopia infrarossa (IR)	231
6.2.3 La spettroscopia UV.....	232
6.2.4 La spettroscopia di massa (MS)	233
6.2.3 HPLC-MS Q-TOF Analysis	235
6.3. Metodi e strumenti per la determinazione dell'attività biologica	235
6.3.1 Analisi del calcio intracellulare	235
6.3.2 Saggio di efflusso delle Pgp transfettate nelle cellule MDCK tramite Rhodamine123	236
6.3.2.1 Linea cellulare MDR1-MDCK.....	236
6.3.1 Analisi dell'attività antimicrobica.....	237

Bibliografia	238
PUBBLICAZIONE I	240
PUBBLICAZIONE II	251

ABBREVIAZIONI

- C Carbon Atom
- CC Column Chromatography
- CDCl₃ Deuterated Chloroform
- d Doublet
- dd Double Doublet
- DCM Dichloromethane
- d Chemical Shift
- DMSO Dimethyl sulfoxide
- DQF-COSY Double-quantum Filtered Correlation Spectroscopy
- EtOAc Ethyl acetate
- eV Elettron volt
- FACS Flow cytometry Activated Cell Sorting
- Fr Fraction
- H Proton
- Hex Hexan
- HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HPLC High Pressure (Performance) Liquid Chromatography
- HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence
- Hz Hertz
- IC₅₀ 50% Inhibition Concentration
- J Coupling constant
- MDCK Madin Darby Canine Kidney
- MDR Multi Drug Resistant
- MeOH methanol
- mg Milligram
- MHz Megahertz
- μl Microliter
- μM Micromolar
- MS Mass Spectrometry
- MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole
- ppm Part per Million
- Pgp P- glycol-protein
- Rh123 Rhoamina 123

- ROESY Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
- RP Reverse Phase
- R_t Retention time
- s Singlet
- SD Standard deviation
- sp. Species
- spp. Species (plural)
- SERCA Sarco Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase
- ssp. Subspecies
- SPE Solid Phase Extraction
- TLC Thin Layer Chromatography
- VLC Vacuum Liquid Chromatography

SUMMARY

In a continuation of our research on bioactive natural products from *Seseli praecox* we now focused on a population growing on the island of San Pietro (Sardinia). With respect to the population growing on limestone from Ogliastra (Sardinia) studied previously this population grows on weathered volcanic substrate and shows different morphological characteristics. *Seseli* sp. is a classical medicinal plant taxon and mentioned by Dioscorides as well as Galenos amongst other indications against orthopnea, chronic cough, uterine spasms and epilepsy. Orthopnea, a form of breathlessness caused by increased central and pulmonary blood volume has been associated with chronic heart failure. The phytochemical investigation of the extract obtained from the stems of *S. praecox* afforded five known khellactones, five furocoumarins, two coumarins, two chromone, as well as falcarinol and falarindiol and a new natural compound 5-hydroxy-6-[3-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-pentenyl]-7-methoxy-2-methyl-4-H-cromen-4-one.

Khellactones are dihydroseselin type angular pyranocoumarins and have been obtained from different Apiaceae species used in local medicine as well as food. Similar to the medicinal indications of *Seseli* sp., *Ammi visnaga* (L.) Lam. is used against cardio-vascular and urological problems. Visnadine, a khellactone obtained from *A. visnaga* fruits was shown to inhibit Ca^{2+} channels *ex vivo*. According on these data, 5 khellactones are tested as potential inhibitors to the Ca^{2+} channel. Only Hyuganin D was active.

Different papers suggest that pyranocoumarins could be a potential MDR reversing agent. In this thesis we remark that Hyuganin D showed ability to induces calcium transients reproducible and in the same time are able to inhibit P-gp in Rhodamine123 efflux assay in Pgp transfected MDCK cells with an effect similar to vinblastine. We are currently developing the cytotoxicity test.

We have also investigated the secondary metabolites of *Ononis natrix*, a small shrub belongs to the family Legumynose (tribe Trifoleae). The infusion of its roots and flowers has been used for the treatment of some disturbances of the urinary tract, in fact have been reported to have diuretic and antirheumatic proprieties. Members of this genus has been also used in folk medicine for the treatment of jaundice, kidney stones and skins diseases. Compounds isolated from the genus *Ononis* have also show antibiotic, molluscicidal, antiviral activities. In this thesis we describe the isolation and determination of the structure of three new natural product: two dihydroisocoumarins(1-

[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate) and 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate. Additionally we have isolated 12 known compounds (two flavones, four flavanones, a chalcone and six dihydrochalcones). All compounds were evaluated for their activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The most active compound against *S. aureus* is 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (2 µg). 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone, 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate and 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate show a good activity against *S. aureus* (16 µg). Other compounds are less active than these. The most active compound against *C. albicans* is 7-hydroxy-8-methoxyflavone (8 µg) and 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone show a good activity against *C. albicans* (16 µg).

RIASSUNTO

Continuando la nostra ricerca sui prodotti naturali bioattivi del genere *Seseli praecox* abbiamo pensato di analizzare la popolazione che cresce sull'isola di San Pietro (Sardegna). Rispetto alla popolazione che cresce su zone calcaree dell'Ogliastra (Sardegna) studiate in precedenza questa popolazione cresce su substrato vulcanico e mostra diverse caratteristiche morfologiche. *Seseli* sp. è una classica pianta medicinale citata da Dioscoride, nonché da Galeno e viene indicata contro ortopnea, tosse cronica, spasmi uterini e l'epilessia. L'ortopnea, una forma di dispnea causata da un aumento del volume ematico centrale e polmonare è stata associata ad insufficienza cardiaca cronica. L'indagine fitochimica dell'estratto ottenuto dai gambi di *S. praecox* ha portato all'isolamento ed alla delucidazione di cinque khellactone noti, cinque furocumarine, due cumarine, due cromoni, nonché il falcarinolo ed il falarindiolo e di un nuovo composto naturale: 5-hydroxy-6-[3-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-pentenyl]-7-methoxy-2-methyl-4-H-cromen-4-one.

I Khellactoni sono pyranocumarine angolari tipo dihydroseselin e sono state ottenute da diverse specie di Apiaceae utilizzate nella medicina locale e come cibo. Simile alle indicazioni medicinali di *Seseli* sp., l'*Ammi visnaga* (L.) Lam. viene utilizzata contro i problemi cardio-vascolari e in urologia. Visnadine, un khellactone ottenuto dai frutti di *A. visnaga* inibiva i canali al Ca^{2+} ex vivo. Sulla base di questi dati i 5 khellactoni isolati sono stati testati come potenziali inibitori del canale al Ca^{2+} . Solo l'Hyuganin D è risultata attiva.

Diversi lavori hanno evidenziato che le pyranocoumarine potrebbero essere dei potenziali agenti che invertono la MDR suggerendoci di testare i khellactoni per la loro capacità di inibire l'espressione di P-gp in saggi di efflusso con Rhodamine123 in cellule MDCK trasfettate. Anche in questo caso solo l'Hyuganin D ha mostrato un effetto simile a vinblastina. Attualmente stiamo sviluppando i test di citotossicità.

Abbiamo anche studiato i metaboliti secondari della *Ononis natrix*, un piccolo cespuglio appartenente alla famiglia delle Leguminose (tribù Trifoleae). L'infusione delle radici e dei fiori è stata utilizzata per il trattamento di certi disturbi del tratto urinario, infatti sono riportate citazioni per le proprietà diuretiche e antireumatiche. I membri di questo genere sono stati usati anche nella medicina popolare per il trattamento della itterizia, i calcoli renali e malattie della pelle. I composti isolati dal genere *Ononis* hanno mostrato anche attività antibiotiche, molluschicide ed antivirali.

In questa tesi descriviamo l'isolamento e la delucidazione della struttura di tre nuovi prodotti naturali: due dihydroisocumarine (1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate e 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate) e il 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl) propanoate. Inoltre abbiamo isolato 12 composti noti (due flavoni, quattro flavanoni, un calcone e sei dihydrochalcones). Tutti i composti sono stati valutati per la loro attività contro lo *Staphylococcus aureus* e la *Candida albicans*. Il composto più attivo contro lo *S. aureus* risulta essere il 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone ad una concentrazione di 2 µg. Anche il 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone, e i due nuovi composti: 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate e 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl) propanoate mostrano una buona attività contro *S. aureus* ad una concentrazione di 16 µg. Gli altri composti presentano attività, ma non a concentrazioni così rilevanti. Il composto più attivo contro la *C. albicans* è il 7-hydroxy-8-methoxyflavone ad una concentrazione di 8 µg; mentre il 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-dihydrochalcone mostra attività ad una concentrazione di 16 µg.

1 INTRODUZIONE

1.1 Uso delle piante nella medicina popolare

Da tempi immemorabili l'innata paura degli esseri umani nei confronti delle malattie e delle sofferenze corporee ha stimolato a ricercare e sfruttare le risorse naturali. Infatti in tutti i continenti tutte le civiltà si sono dedicate, oltre che alla domesticazione e alla coltura di piante a scopi alimentari, alla ricerca di piante con proprietà terapeutiche.

È interessante e rilevante come, attraverso i millenni, l'insieme di queste nozioni si sia approfondito, e anche diversificato, senza essere mai interamente dimenticato. Si usava l'oppio, ricavato dal papavero, 4000 anni prima che se ne estraesse la morfina; e questo è un esempio della perennità di conoscenze che, rimaste empiriche per lungo tempo, sono state, da qualche secolo, rese più profonde dal progresso della scienza moderna.

Oggi, nonostante l'enorme sviluppo raggiunto dalla chemioterapia, la fitoterapia è sempre molto in uso; anzi gode di rinnovato successo dopo la constatazione delle conseguenze nocive dovute all'abuso di prodotti chimici. I progressi della conoscenza e dell'utilizzazione delle piante medicinali si possono inquadrare in tre periodi. La civiltà egiziana, greca e romana hanno trasmesso, soprattutto attraverso gli arabi, numerose notizie empiriche di popoli europei. Durante il Rinascimento, gli studiosi occidentali approfondirono la ricerca scientifica e, approfittando anche delle scoperte degli scienziati esploratori, svilupparono maggiormente le conoscenze acquisite, iniziando un lavoro di riordinamento rigoroso delle esperienze del passato.

Dopo la fine del XVIII secolo, il rapido progresso della scienza moderna ha arricchito e diversificato straordinariamente la conoscenza dei vegetali, che hanno oggi il supporto della paleontologia, della geografia, della genetica, della chimica e della citologia.

Nel 1873, l'egittologo tedesco Georg Ebers [Ebbell. Copenhagen, Levin & Munksgaard, (1937); Uarda (1880)] venne in possesso di un voluminoso rotolo di papiri e, decifrandone l'introduzione, fu sorpreso della seguente frase: "Qui inizia il libro relativo alla preparazione dei rimedi per tutte le parti del corpo umano". Questo scritto si rivelò il primo trattato medico egiziano conosciuto. Era costituito da una prima parte relativa alla cura delle malattie interne e da un elenco numeroso e straordinario di medicinali. Si può affermare, quindi, che 2000 anni prima dei medici greci esisteva già una scuola medica egiziana in possesso di nozioni e di pratiche ben distinte dalle credenze religiose.

Due delle ricette, contenute nei famosi rotoli di papiri, risalgono all'epoca della VI^a dinastia, vale a dire a 24 secoli prima di Cristo. Si è venuto a sapere, inoltre, che ai tempi dell'antico impero egizio, nel palazzo del faraone viveva e studiava un gruppo di medici già allora indirizzati a specializzazioni quali l'odontologia e l'oftalmologia. Ben più tardi, nel 450 a.C., Erodoto [Club Alpino Italiano (2003)] affermava: " In Egitto ogni medico cura una sola e determinata malattia; perciò i medici sono numerosissimi". Pressappoco nella stessa epoca, presso il tempio di Edfou (nell'Antico Egitto), si sviluppava una scuola di medicina dotata di un orto botanico ricco di piante medicinali.

Tra le piante maggiormente utilizzate dagli Egizi citiamo il ginepro, la coloquintide, il melograno, il seme di lino, il finocchio, l'acero, il cardamomo, il cumino, l'aglio, le foglie di senna, il giglio e il ricino. Un bassorilievo proveniente da Akhetaton raffigura una pianta medicinale, la mandragora, che acquisterà poi una grande importanza nella Farmacopea del Medioevo. Gli Egizi conoscevano già le proprietà analgesiche del papavero, utilizzato per la preparazione dei rimedi " contro le crisi che si prolungano in modo abnorme". Ancor più notevole è la conoscenza progressiva del dosaggio specifico di ogni droga: questa esperienza si estese alla fabbricazione e alla somministrazione di tutti i rimedi e si può affermare che nacque così la ricetta medica e la relativa posologia.

Le conoscenze mediche dell'antico Egitto si diffusero in particolare in Mesopotamia. Nel 1924, l'assirologo dott. Reginald Champbell Thompson del British Museum di Londra riuscì a identificare ben 250 tra vegetali, minerali e sostanze diverse di cui i medici babilonesi utilizzavano le proprietà terapeutiche e, in particolare, la belladonna, somministrata contro gli spasmi, la tosse e l'asma. Alcune tavolette mesopotamiche citano la canapa indiana, della quale si conoscevano le proprietà analgesiche, che veniva prescritta contro la bronchite, i reumatismi e l'insonnia. Ma furono soprattutto i Greci e, in seguito, per loro tramite, i Romani, che ereditarono le nozioni dagli Egizi portandole ad un più alto livello. Aristotele (384/83 a.C - 322 /321 a.C), spirito universale, si interessò di botanica e di scienze naturali; Ippocrate (460 a.C.-377 a.C. ca.), spesso detto "il padre della medicina", scrisse insieme con i suoi discepoli tutto il sapere medico dei suoi tempi nei trattati noti come *Corpus Hippocraticum*, in cui è prescritto il rimedio vegetale per ogni malattia, oltre alla relativa terapia. Nel II secolo a.C. Catone il Vecchio (234-149 a.C) nel suo trattato *De re rustica* cita 120 piante medicinali che egli stesso coltivava nel suo giardino. All'inizio dell'era cristiana, Dioscoride, nel suo trattato *De materia medica*, elencò più di 500 droghe di origine vegetale, minerale o animale; come i suoi predecessori, si prodigò per distinguere il razionale dall'irrazionale. Plinio il Vecchio (23-24 d.C -79 d.C) non ebbe questo scrupolo scientifico; infatti, nella sua monumentale

Naturalis Historia inserisce, a volte, descrizioni un po' fantasiose. Il greco Galeno, poi, la cui influenza sarà duratura come quella di Ippocrate, leggerà il suo nome a quella che ancora oggi è chiamata "Scuola Galenica" oppure "Farmacia Galenica". Praticamente vengono distinti l'impiego di "piante spontanee" essiccate ed i "preparati galenici", per i quali si usano solventi come acqua, alcool, aceto per concentrare i principi attivi della droga, che vengono usati per la preparazione di unguenti, impiastri e altri preparati galenici. In Occidente, dopo la caduta dell'Impero romano e durante il Medioevo, non ci furono rapidi progressi nel campo scientifico. Scienza, magia e stregoneria, tendono spesso a confondersi: le droghe come il giusquiamo, la belladonna e la mandragora sono considerate piante di origine diabolica. Infatti Giovanna d'Arco sarà accusata di aver tormentato gli inglesi con la forza e la virtù magica di una radice di mandragora celata sotto la sua corazza. Non si deve credere però che, durante il Medioevo, si perdano tutte le conoscenze acquisite nei millenni precedenti. I monaci, profondi conoscitori del latino e del greco, furono i depositari del sapere del passato; parecchi monasteri vantavano i loro "giardini dei semplici", cioè di erbe medicinali, dove coltivavano le piante necessarie per la cura dei malati [Mattiolo O (1899); Pozzana M. (1994)].

Viene tramandato il ricordo della suora benedettina [H.C. Werner, (1992); Laurence Moulinier, (1995); Hertzka, (1994); Margret (1999)] ricordata come la santa guaritrice Ildegarda, i cui trattati, noti con il nome di *Physica* [Teubner, Leipzig, (1903)], non si limitano a riassumere le antiche cognizioni, ma, per la prima volta, mettono in luce alcune piante, come la pilosella o l'arnica. Durante il Medioevo, la medicina fu dominata dalla Scuola di Salerno: gli studiosi di quella scuola divulgarono, tramite scienziati arabi, come Avicenna, Avenzoar, Ibn-el-Beithar, innumerevoli opere della medicina greca. Durante il Rinascimento, con il metodo della sperimentazione e dell'osservazione diretta, con il susseguirsi dei grandi viaggi esplorativi verso le Indie e l'America, nasce un nuovo periodo di progresso scientifico e di conoscenza delle piante e delle loro virtù. All'inizio del XVI secolo, Paracelso (1533-1541), medico svizzero, tenta di isolare "l'anima", la "quintessenza" dei vegetali, cioè la fonte delle loro virtù terapeutiche [Paracelso 1976]. A quell'epoca, non disponendo di mezzi di analisi, che poi la tecnica moderna offrirà, cerca di raggruppare le piante secondo le loro proprietà mediante le loro caratteristiche morfologiche, la loro forma, il loro colore: cioè, secondo la teoria delle affinità. L'Europa diventa il centro del mondo, dove affluiscono i prodotti dei Paesi lontani insieme con numerose piante, alcune delle quali con proprietà terrificanti. I Conquistadores, purtroppo, fecero a proprie spese l'esperienza delle proprietà mortali del curaro; la corteccia della china veniva utilizzata per far calare la febbre della malaria, prima ancora che se ne sapesse estrarre il chinino. L'America ci fa conoscere le proprietà anestetiche e

stimolanti delle foglie di coca. L'italiano Pier Andrea Mattioli, contemporaneo di Paracelso, commenta l'opera di Dioscoride, scopre le proprietà dell'ippocastano e descrive 100 nuove specie [Mattioli, Pier Andrea 1974]. Pietro Andrea Mattioli, fu il più grande rinnovatore della farmacognosia e degli erbari del dopo Rinascimento, inoltre fu uno dei principali commentatori del lavoro di Dioscoride (Schelenz 1904, Arber 1938). Il Mattioli nacque a Siena nel 1501 e morì a Trieste nel 1577, il suo principale lavoro, *I Discorsi* è stato tradotto in moltissime lingue, è stato stampato in molteplici edizioni e sottoposto a diversi miglioramenti. Tra il 1541 e il 1542 Mattioli lavorò alla traduzione del *De Materia Medica* di Dioscoride dal greco, aggiungendovi i suoi discorsi e commenti. Poi finalmente nel 1544 pubblicò per la prima volta la sua opera principale, *Di Pedacio Dioscoride Anazarbeo Libri cinque Della historia, et materia medicinale tradotti in lingua volgare italiana da M. Pietro Andrea Matthiolo Sanese Medico, con amplissimi discorsi, et comenti, et dottissime annotationi, et censure del medesimo interprete*, più comunemente conosciuto come *I Discorsi di Pier Andrea Mattioli sull'opera di Dioscoride*. La prima stesura fu pubblicata a Venezia senza illustrazioni e dedicata al cardinale Cristoforo Madruzzo, principe-vescovo di Trento e Bressanone. Da notare che Mattioli non si limitò a tradurre l'opera di Dioscoride, ma la completò con i risultati di una serie di ricerche su piante ancora sconosciute all'epoca, trasformando i *Discorsi* in un'opera fondamentale sulle piante medicinali, un vero punto di riferimento per scienziati e medici per diversi secoli. Nel 1548 pubblicò la seconda edizione dei *Discorsi di Mattioli su Dioscoride*, con l'aggiunta del sesto libro sui rimedi contro i veleni, considerato apocrifo da molti. In seguito vennero pubblicate molte altre edizioni, alcune tuttavia senza la sua approvazione. Nel 1554 fu pubblicata la prima edizione latina dei *Discorsi di Mattioli*, chiamata anche *Commentarii*, ovvero *Petri Andreae Matthioli Medici Senensis Commentarii, in Libros sex Pedacii Dioscoridis Anazarbei, de Materia Medica, Adjectis quàm plurimis plantarum & animalium imaginibus, eodem authore*; fu la prima edizione ad essere illustrata ed è dedicata a Ferdinando I d'Asburgo. In seguito venne tradotta anche in ceco (1562), tedesco (1563) e francese. Secondo Osbaldeston (2009), Mattioli, per i suoi commentari del *De Materia Medica* prende spunto dall'opera Codice Bizantino Juliana Anicia. *I Discorsi* del Mattioli hanno riscosso un grande successo fra gli addetti ai lavori dell'epoca, per questo motivo l'opera subì diverse ristampe, quella del 1563, vendette circa 32.000 copie (Arber 1938, Madaus 1938, Marzel 1938). La più recente riedizione risale al 2000 ad opera di Osbaldeston. L'opera di Pio Font Quer (1999) *El Dioscorides Renovado* contiene specie di piante e taxa trattati sia da Dioscoride che dal suo commentatore castigliano Andrea Laguna (circa 1511-1559), la cui opera risulta pesantemente influenzata da Dioscoride. In questo libro a carattere scientifico, molto popolare, edito per la prima volta nel 1961, vengono descritte 678 specie medicinali,

rispetto al *De Materia Medica* troviamo delle novità, come la *Digitalis ssp.* Sulla scia di questa nuova ventata area di scienza furono molti coloro che si cimentarono nella scrittura di trattati medici e botanici, inoltre intorno al 1600 comparvero i primi erbari con campioni essiccati e videro la luce i primi orti botanici. Occorre, tuttavia, precisare che una descrizione botanica scientificamente corretta richiede l'uso di una terminologia tecnica specialistica che compare solo molto tempo dopo, con Linneo, nel 18° secolo. Fino a quel momento le descrizioni risultano, quindi, brevi e in gran parte fondate sull'analogia, raramente a carattere naturalistico, ma il più delle volte filosofico, magico e permeate di astrologia e occultismo (Tratto da Przybylo M 2001). Sorgono gli orti botanici: nel 1544 viene fondato quello di Pisa; nel 1590 Venezia affida a Cortuso quello di Padova. È il periodo in cui a Montpellier insegnano i più grandi botanici: Mathias de Lobel, Guillaume Rondelet, Jean e Gaspard Bauhin. Questi studiosi arricchirono sensibilmente la classificazione sistemica dei vegetali, che diventa sempre più indispensabile per le innumerevoli nozioni acquisite. Gli sforzi per la classificazione sfociano, nel 1735, nel *Sistema naturae* di Carlo Linneo. Il grande naturalista svedese adotta come principio di distinzione e di classificazione la distribuzione dei sessi nei fiori e le caratteristiche degli organi maschili, gli stami. Se si getta uno sguardo retrospettivo sul cammino percorso dopo le prime ricette della VI^a dinastia egiziana, si vede che è lunghissimo; ma si constata che è sempre andato nella stessa direzione, senza mutamenti o deviazioni radicali. L'elenco delle piante medicinali si è arricchito, la descrizione delle caratteristiche dei semplici e le indicazioni del loro uso sono diventate più precise; infine, diviene ad un certo punto indispensabile classificare con rigore le specie. Tuttavia, a quell'epoca, non si conoscono sempre le leggi evolutive e neppure, cosa ancora più importante, la struttura intima e i principi attivi che agiscono nella cura delle malattie: si conosce il loro effetto e questo è tutto. Infatti solo all'alba del XIX secolo la situazione muta profondamente, tanto da poter affermare che l'esaltazione in chiave scientifica dei medicamenti vegetali è una realtà del nostro tempo. In effetti, grazie ai progressi sostanziali compiuti dalla chimica vegetale, si è giunti a definire in larga parte la composizione chimica delle piante e a individuare numerose classi di composti organici ed inorganici che vi si trovano con una certa ripetitività: zuccheri, lipidi, vitamine, ormoni, alcaloidi, tannini, sali minerali, oligoelementi, glucosidi, mucillagini, saponine, etc..

L'indagine farmacologia e la sperimentazione clinica hanno, in un secondo tempo, consentito di spiegare, almeno in alcuni casi, le proprietà medicatrici di molte droghe vegetali. Ma nonostante questa grande mole di lavoro, alla quale hanno contribuito ricercatori di tutto il mondo, permangono ancora molti dubbi, così come numerosi interrogativi sono tutt'ora privi di una risposta esauriente.

Infatti le piante totali e i loro prodotti galenici a ben vedere rappresentano un grosso mistero e spesso i loro effetti farmacologici non sono giustificati dalle sostanze che contengono; ciò perché esse formano un composto chimico organizzato, costituito da un gran numero di molecole diverse che, nel momento in cui agiscono all'interno di un organismo vivente, danno luogo ad una sinergia fitocinetica sempre difficilmente prevedibile.

È per questa ragione che oggi l'isolamento del principio attivo, sebbene rappresenti solo una grossolana operazione riduzionista, è visto con favore sia dal farmacologo sia dal clinico, che in tal maniera possono disporre di una molecola ben definita e standardizzabile, della quale è possibile studiare l'assorbimento, la metabolizzazione, il meccanismo d'azione, l'eliminazione ed anche gli eventuali effetti collaterali. Tuttavia vale la pena di ricordare che separare una o poche sostanze preponderanti dal totum vegetale e rigettare sistematicamente gli altri costituenti, con il pretesto che sono inerti o inutili, è anche la strada maestra che porta alla non comprensione dell'intrinseco valore terapeutico di un vegetale. In altre parole si potrebbe dire che con questa metodologia il criterio di conoscenza sostanziale cede il passo ad un criterio di conoscenza solo formale.

Se è pur vero che l'impiego della droga totale, nonostante le maggiori conoscenze chimiche, farmacologiche e cliniche, rimane soggetto ad un certo margine di empiria, che spesso mal si concilia con l'aspirazione al razionalismo totale, non si deve tuttavia dimenticare che la pianta è un'unità terapeutica, un tutto organizzato dove ogni costituente, in definitiva, partecipa fattivamente al meccanismo della sua attività sanatrice. Questa constatazione non ci deve però esimere da uno studio moderno delle piante medicinali, così da poter realizzare una sintesi creatrice tra empirismo e razionalismo, fra scienza e tradizione.

BIBLIOGRAFIA

Arber, A., *Herbals, their origin and evolution. A chapter in the history of botany 1470–1670. Reprinted 1953, Cambridge University Press, Cambridge. 1953 (1938).*

The papyrus Ebers. The greatest Egyptian Medical document. Translated by B. Ebbell. Copenhagen, Levin & Munksgaard, (1937).

Hertzka, Gottfried. *Piccola farmacia di Sant'Ildegarda*. Milano: Editrice Ancora Milano, p. 228 (1994).

Hildegard of Bingen. *On Natural Philosophy and Medicine. Selections from Cause et Cure*. Translated from Latin with Introduction, Notes and Interpretative Essay by Margret Berger. Cambridge: D.S. Brewer, p. 166 (1999).

Laurence Moulinier, *Le manuscrit perdu à Strasbourg. Enquête sur l'œuvre scientifique de Hildegarde*, Publications de la Sorbonne - Press Universitaires de Vincennes, Paris, pp. 269-271 (1995).

Marzell, H., 2002 (1938). *Geschichte und Volksunde der deutschen Heilpflanzen*. Reprint of the edition by Hippokrates Verlag from 1938. Reichl Verlag, Der Leuchter, St Goar

Mattioli, Pier Andrea, *Opera quae extant omnia, hoc est Commentarii in VI libros Pedacii Dioscorides Anazarbei de medica materia; adjectis in margine variis Graeci textus lectionibus a Casparo Bauhino*. ... Editio altera. Basileae, J. König (1974).

Mattirolo O., *Cenni cronologici sugli Orti Botanici di Firenze* (1899).

Paracelso: *As Plantas Mágicas, Botânica Oculta*. São Paulo: Editora Hemus (1976).

Physica, in *Patrologia Latina*, vol. 197, *Causae et curae*, Teubner, Leipzig, (1903).

Przybylo M. "Dioskurides, de materia medica", Seminararbeit im Rahmen der Werkstoffkundevorlesung 2000/2001 (Studiengang/Lehrstuhl Restaurierung, Kunsttechnologie und Konservierungswissenschaft), Technische Universität, München.

Pozzana M., *Firenze. Giardini di città*, Firenze, pp. 52-54 (1994).

Shelenz, H., 2005 (1904). *Geschichte der Pharmazie*. (2nd reprint of the Berlin edition from 1904 by Julius Springer). Georg Olms Verlag, Hildesheim

Uarda: A Romance of Ancient Egypt. Georg Ebers. *The New Englander*, vol. 39, issue 155 (March 1880).

La belladonna scalcina, Articolo tratto da "Araberara" 6 giugno 2003, Club Alpino Italiano Sottosezione Valle di Scalve.

H.C. Werner, '*Homo cum creatura*'. *Der kosmische Moralismus in den Visionen der Hildegard von Bingen, in Mensch und Natur im Mittelalter*, a c. di A. Zimmerman-A. Speer, De Gruyter, Berlin-New York, pp. 67-88 (1992).

2 IL GENERE *ONONIS*

2.1 Sistematica

2.1.1 Introduzione

Regno	Plantae
Sottoregno	Tracheobinta
Superdivisione	Spermatophita
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sottoclasse	Rosidae
Ordine	Fabales
Famiglia	<i>Fabaceae</i>
Genere	<i>Ononis</i>

Il genere *Ononis* comprende circa 70-80 specie di erbe perenni o piccoli arbusti, nativi dell'Europa. Nella flora spontanea italiana sono presenti più di venti specie appartenenti al genere. Il nome del genere *Ononis* deriva dal greco onos= asino, onemi= distruggo e secondo Plinio erano piante, che per le scadenti qualità erano adatte come cibo per gli asini. Alcuni autori ritengono che derivi sempre dal greco onos = asino e osme= odore, ma con probabile allusione al cattivo odore che alcune specie emanano. (tratto da actaplantarum.org).

2.1.2 Caratteristiche del genere *Ononis*

In maggioranza, le specie di questo genere sono erbe perenni suffruticose con fusti legnosi solo alla base e in alto vischiosi per lo più pelosi o ghiandolosi. Le foglie sono in genere trifoliate con stipole lineari od ovate. Le varie specie si diversificano maggiormente nell'inflorescenza. I fiori, infatti, si possono presentare in *racemi pedunculati* formati da un asse comune lungo 1-5 cm sul quale sono inseriti 2 o 3 fiori oppure anche uno solo; i fiori sono portati da un proprio peduncolo lungo 1-6 mm, inserito nell'asse comune che appare articolato e spesso sopra l'ultimo fiore si prolunga in una resta. In altre specie con *racemi sessili*, l'asse comune manca del tutto, i fiori sono isolati oppure in 2 o 3 sono inseriti direttamente col proprio peduncolo alla base della foglia ascellante; questo peduncolo è lungo 1-5 mm spesso anche subnullo. I fiori a cinque

petali hanno la corolla papilionacea la cui dimensione varia a seconda delle varie specie. Possono essere gialli, rosa, rossi, bianchi o purpurei. Il frutto è un legume o baccello con quantità di semi variabile a seconda della specie. (Pignatti 1982).

2.1.3 Distribuzione in Italia

Il genere *Ononis* è presente in Italia con più di 20 specie di cui alcune presenti su tutto il territorio nazionale l'*O. pusilla* L., *O. reclinata* L. e *O. spinosa* L.; altre invece sono presenti solo in alcune regioni come *O. dentata* presente solo in Sardegna e Sicilia, *O. biflora* presente in Sardegna, Sicilia, Puglia e Lazio e l'*O. pendula* presente solo in Sicilia. L'*O. masquillierii* è invece un endemismo dell'Appennino tosco-emiliano. Le piante del genere *Ononis* crescono in rupi o incolti aridi e garighe dal livello del mare fino 1800 metri di altitudine per l'*O. rotundifolia*.(Pignatti 1982).

2.2 Fitochimica del genere *Ononis*

Nel genere *Ononis* si ha la produzione di diversi derivati flavonoidi quali: calconi, diidrocalconi, flavoni e flavanoni (Barrero et al. 1997, Wollenweber 2003), ma anche diidroisocumarine (San Feliciano et al. 1983, 1990), derivati dell'acido antranilico (Al-Khalil et al. 1995, Barrero 1990), derivati resorcinolici (Barrero et al. 1991, 1994).

Si sono riscontrati anche acidi alchilbenzoici (Barrero et al. 1991, 1994, 1998), lattoni aromatici (Barrero et al. 1989) e composti fenolici (Abdel-Kader 2001, San Feliciano et al. 1983).

2.2.1 I Flavonoidi

2.2.1.1 Struttura e proprietà chimico-fisiche

I flavonoidi sono sostanze polifenoliche a basso peso molecolare caratterizzati dal nucleo flavanico, 2-fenil-benzo- γ -pirano (C6-C3-C6), che consiste in due anelli benzenici (A e B) legati attraverso un anello eterociclico piranico (C) come mostrato in fig.2.1 (Coulter 1990, Cushnie 2005).

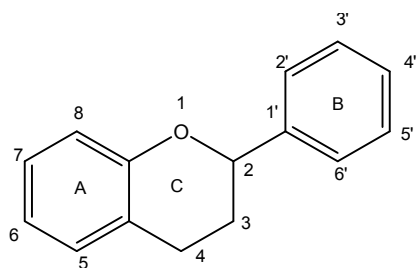


Fig.2.1 Struttura generica dei flavonoidi.

I flavonoidi differiscono per la posizione dei sostituenti, del gruppo glicosidico e per la giunzione tra l'anello A e B (Heim 2002). Sulla base della variazione dell'anello C i flavonoidi vengono suddivisi in sottoclassi (Tsuchiya 2010). La fig. 2.2 mostra le principali classi di flavonoidi e la loro struttura molecolare.

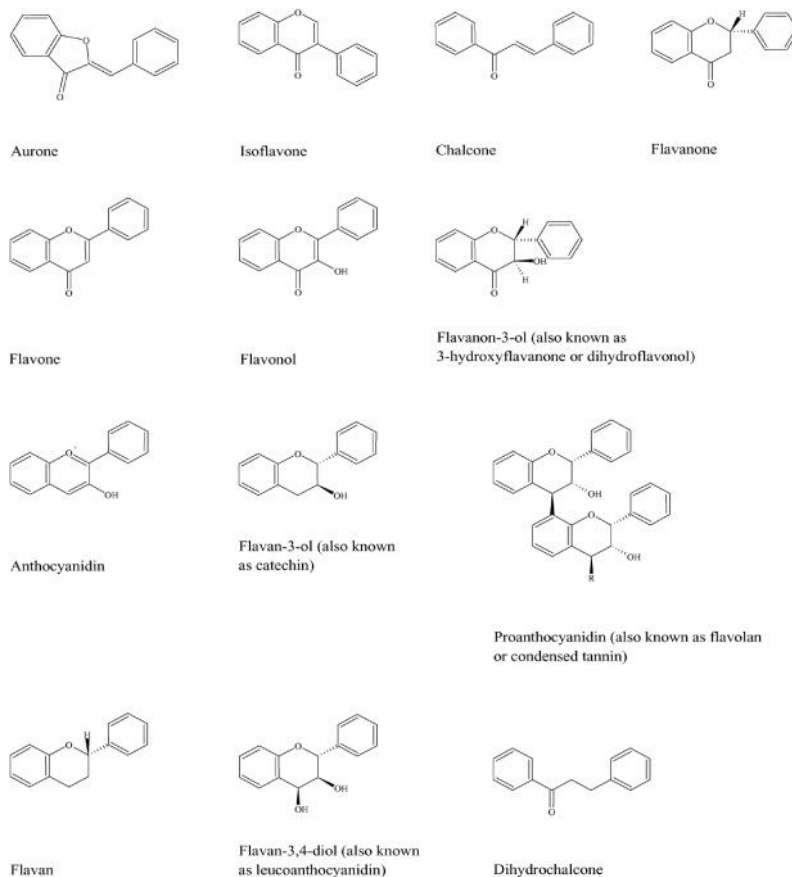


Fig. 2.2 Struttura molecolare delle principali classi di flavonoidi (Cushnie 2005).

I flavonoidi sono metaboliti secondari sintetizzati attraverso una combinazione di due vie, quella dell'acido scikimico e dell'acilpolimalonato. In particolare l'anello A si forma a partire dall'acetato e l'anello B dall'acido scikimico, i tre atomi che li uniscono originano dal fosfoenolpiruvato poi per successive idrossilazioni e riduzioni si formano i differenti flavonoidi (fig. 2. 3) (Ricciuti 2004).

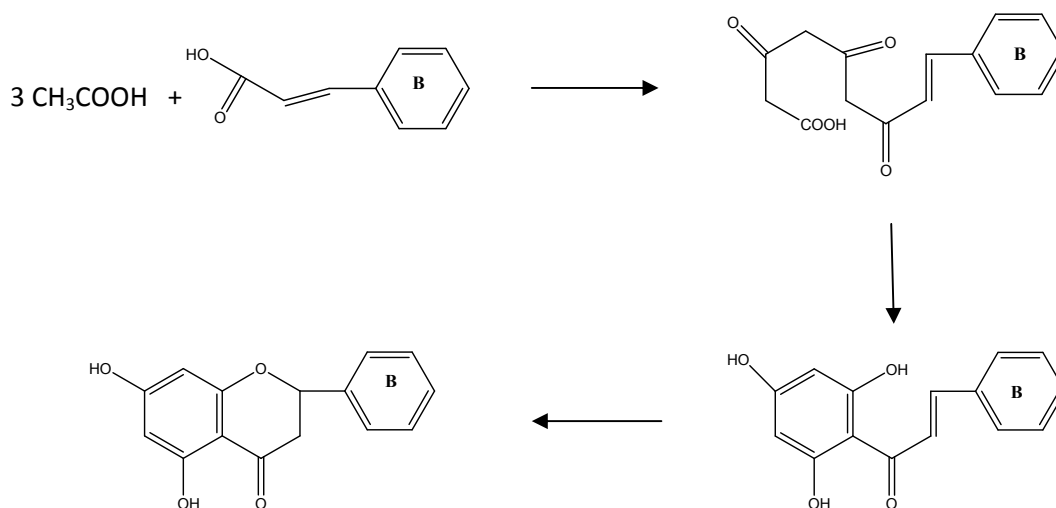


Fig. 2.3 Schema di biosintesi dei flavonoidi.

Nelle piante i flavonoidi sono spesso presenti come O-glicosidi o C-glicosidi. Gli O-glicosidi hanno il residuo zuccherino legato ad un OH dell'aglicone, solitamente in posizione 3 o 7, mentre i C-glicosidi hanno il residuo zuccherino legato ad un carbonio dell'aglicone in posizione 6 o 8 (Rijke 2006). Il glucosio e il residuo zuccherino più comune, ma è possibile trovare anche il ramnosio, il galattosio e lo xilosio (Rosati 2009).

2.2.1.2 Distribuzione e funzione nelle piante

I Flavonoidi sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale, ne sono stati identificati più di 4000 e la varietà e il tipo dipendono dalla crescita della pianta, dalle condizioni e dalla maturità (Pierpoint 1986). Le parti della pianta più ricche di tali sostanze sono i fiori, i frutti, la corteccia i semi e le radici (Ricciuti 2004).

La produzione di flavonoidi nelle foglie da parte delle piante è una risposta evolutiva contro le infezioni fungine, gli erbivori, i patogeni e i danni ossidativi (Harborne 1988, Swain 1986). Per quanto riguarda l'interazione pianta-funghi, alcuni flavonoidi sono costitutivi e hanno lo scopo di inibire la germinazione delle spore che si sono depositate

sulla superficie della foglia, altri invece sono indotti in seguito ad un'infezione fungina e funzionando come tossine ostacolano lo svilupparsi dell'invasione micotica (Ricciuti 2004). Mentre nei fiori i flavonoidi contribuiscono all'impollinazione attirando gli insetti, infatti alcuni di questi sono responsabili dei colori dei frutti, fiori e anche di alcune verdure (Harborne 1988). Per esempio le antocianine danno un'ampia gamma di colori, dal rosa, rosso, viola e blu che si ritrovano in fiori e frutti, mentre altri flavonoidi contribuiscono alla colorazione gialla o arancione dei frutti maturi (Coultate 1990, Ricciuti 2004).

Inoltre sono implicati nella fotosensibilizzazione, trasporto di energia, morfogenesi, determinazione del sesso, processi respiratori e della fotosintesi, nella regolazione delle attività ormonali e della crescita (Cushnie 2005).

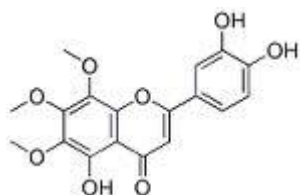
I flavonoidi abbondano in molte piante di uso alimentare, nella frutta (agrumi e mele in particolare), nei vegetali (spinaci, lattuga e cavoli) nei legumi ed in alcune bevande come il the verde e il vino (tabella 2 .1).

Se ne assume una quantità che varia dai 26 mg fino ad 1-2 g al giorno. Questa variabilità dipende dallo stato di maturazione dell'alimento e dalle modalità di conservazione preparazione e consumo (Ricciuti 2004).

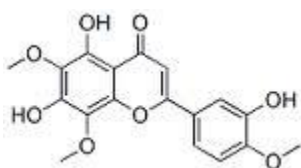
Sottoclassi di flavonoidi	Fonti alimentari	Flavonoidi rappresentativi
Flavonoli	Cipolle, cavoli, broccoli, mele, ciliegie, pomodori, frutti di bosco, the, vino rosso e grano saraceno Tartaria	Kaempferolo, rutina, quercetina e miricetina
Flavoni	Prezzemolo e timo	Apigenina, luteolina e crisina
Flavanoni	Limoni	Esperitina, naringenina e eriodictiolo.
Catechine	Mele e the	Catechina e gallo catechina
Antocianine	Ciliegie, uva, melanzane e pompelmo rosso	Petunidina, cianidina e delphinidina e malvidina
Isoflavoni	Legumi e semi di soia	Genisteina, daidzeina, gliciteina e formanantina

Tabella 2.1. Sottoclassi e fonti alimentari di flavonoidi (Sandhar 2011, Ren 2003).

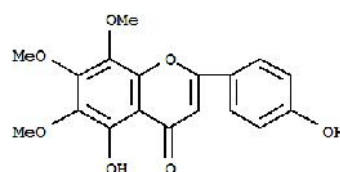
Nel genere *Ononis* sono stati isolati diversi composti appartenenti alla classe dei flavonoidi. Nel lavoro di Wollenweber E. (2003) sono stati utilizzati gli estratti di *O. fruticosa*, *O. natrix* subsp. *ramosissima* e l'*O. tridentata* da cui sono stati ottenuti diversi flavoni come il sideritiflavone, acerosin, xanthomicrol, agecorynin D e flavonoli quale la quercitina. Barrero et al. (1997) dall'estratto dell'*Ononis natrix* subsp. *ramosissima* ha ottenuto diversi composti tra cui quattro calconi, sei diidrocalconi, due flavanoni. In fig. 2.4 sono riportati alcuni composti isolati in questi due lavori.



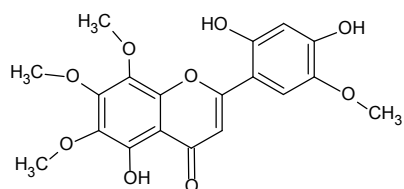
Sideritiflavone



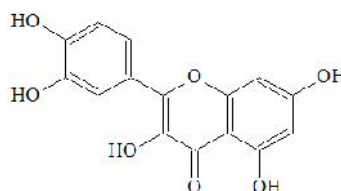
Acerosin



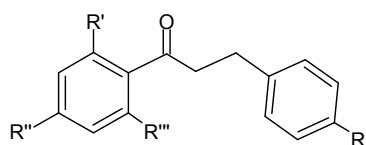
Xanthomicrol



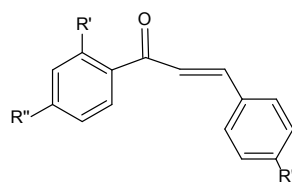
Agecorynin D



Quercitina



	R	R'	R''	R'''
1	H	OH	OH	OH
2	H	OH	OMe	OH
3	H	OH	OH	OMe
4	OH	OH	OMe	OH
5	OH	OH	OH	OMe
6	OMe	OH	OMe	OH



	R'	R''	R'''
1	OH	OH	H
2	OH	OMe	H
3	OH	OH	OH
4	OH	OMe	OH

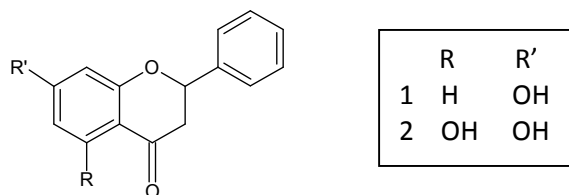


Fig 2.4 Flavonoidi isolati dal genere *Ononis*. (Wollenweber E. (2003), Barrero (1997)).

2.2.1.3 Attività farmacologiche e terapeutiche

La ricerca sui flavonoidi iniziò nel 1936 quando un biochimico ungherese Albert Szent-Gyorgi isolò dalla buccia di limone una sostanza sconosciuta capace di inibire la permeabilità capillare e aumentare la resistenza vascolare in sinergia con la vitamina C. Questa sostanza venne chiamata inizialmente citrina e successivamente vitamina P (Ricciuti 2004, Murray 1998). In realtà la citrina era costituita da due flavonoidi: l'esperidina e eriodictiolo (fig 2.5); anche la denominazione "vitamina P" fu abbandonata in quanto non furono mai dimostrati evidenti sintomi da carenza (Ricciuti 2004).

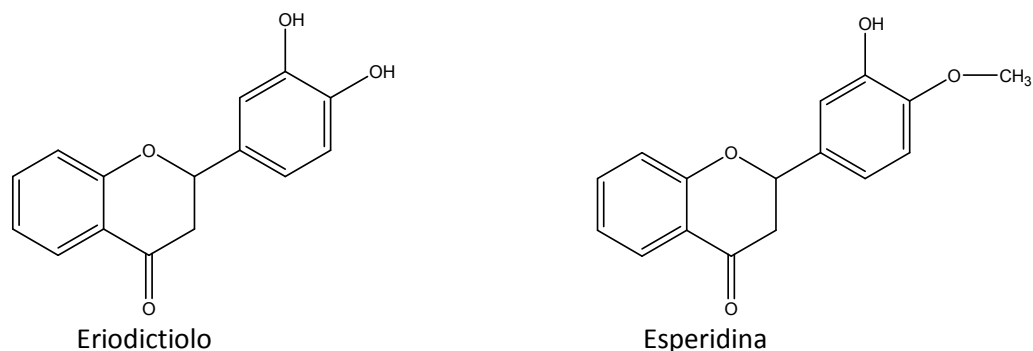


Fig. 2.5 Costituenti della citrina.

Ai flavonoidi sono attribuite un'ampia gamma di attività biologiche, le quali includono: antinfiammatoria, antibatterica, antivirale, antiallergica (Cushnie 2005, Murray 2008, Cook 1996), antitumorale citotossica, trattamento delle malattie neurodegenerative e vasodilatatoria (Williams 2004, Murray 2008, Tsuchiya 2010, Chebil 2006). Inoltre inibiscono la perossidazione lipidica, aggregazione piastrinica, la permeabilità e fragilità capillare e l'attività degli enzimi ciclo-ossigenasi e lipo-ossigenasi.

Le attività farmacologiche dei flavonoidi sono riconducibili alle loro proprietà come antiossidanti, potenti *scavengers* dei radicali liberi e chelatori di cationi bivalenti (Cook 1996, Chebil 2006, Middleton 2000).

I radicali liberi, come le specie reattive dell'ossigeno, possono provocare notevoli danni attaccando i lipidi delle membrane cellulari, le proteine dei tessuti e gli enzimi, i carboidrati e il DNA. Malattie in cui sono coinvolti i radicali liberi sono: il cancro, l'infarto, arteriosclerosi, il morbo di Alzheimer e quello di Parkinson, la cataratta, la retinite pigmentosa, l'artrite e l'invecchiamento (Rosati 2009).

I flavonoidi sono potenti antiossidanti contro i radicali liberi, infatti vengono descritti come *free-radical scavengers* (Pal 2009). Questa attività è attribuita al fatto che sono idrogeno donatori, infatti i gruppi fenolici, altamente reattivi, sono utilizzati come fonte di atomi di H, e il radicale successivamente prodotto può essere delocalizzato sulla struttura dei flavonoidi (Tripoli 2007), come mostrato in fig. 2.6.

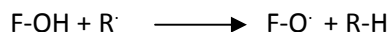


Fig. 2.6 Capacità *free-radical scavenging*

La capacità antiossidante dei flavonoidi è legata alla presenza di questi tre fattori strutturali (fig. 2.7):

- la struttura catecolica (due idrossili in orto) nell'anello B, che conferisce una buona stabilità ai radicali arilici, possibilità di formare legami idrogeno e partecipano alla dislocazione elettronica;
- i doppi legami 2,3 in coniugazione con il gruppo carbossilico in 4 sono responsabili della dislocazione elettronica dall'anello B;
- la presenza dei gruppi ossidrilici in posizioni 3 e 5. (Sandhar 2011).

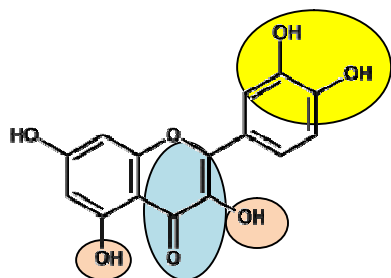


Fig.2.7 Quercitina. In giallo la funzione catecolica (a); in celeste il doppio legame 2,3 e la funzione carbossilica (b); in rosa i due gruppi ossidrilici in posizione 3 e 5 (c).

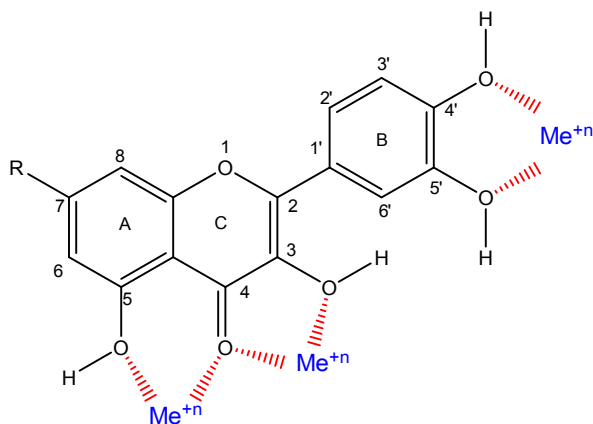


Fig. 2.8 Meccanismo con cui la quercitina riesce a legare i metalli (Rosati 2009).

La fig. 2.8 mostra come a questi tre fattori è legata anche la capacità dei flavonoidi di chelare i metalli coinvolti nel metabolismo dell'ossigeno come il ferro e il rame, che riducono il perossido di idrogeno generando il radicale ossidrilico (OH^\cdot), una specie molto reattiva (fig. 2.9) che riesce per esempio ad ossidare le LDL, lipoproteine a bassa intensità. (fig. 2.10) (Rosati 2009).

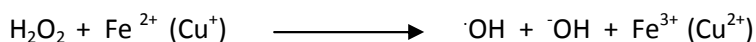


Fig. 2.9. Riduzione del perossido di idrogeno da parte di ferro o rame.



Fig. 2.10. Ossidazione delle LDL (L).

In fig. 2.11 è mostrato il meccanismo che coinvolge il gruppo catecolico nella neutralizzazione dei radicali liberi. Il gruppo catecolico reagisce con un primo radicale libero neutralizzandolo tramite la cessione di un H^\cdot da parte del gruppo fenolico; grazie alla presenza di una seconda funzione fenolica, il radicale catecolico può neutralizzare un secondo radicale libero, portando alla formazione di una struttura chinonica molto stabile attraverso la scissione omolitica di un legame π e la condivisione di questi elettroni con quelli spaiati degli ossigeni (Rosati 2009).

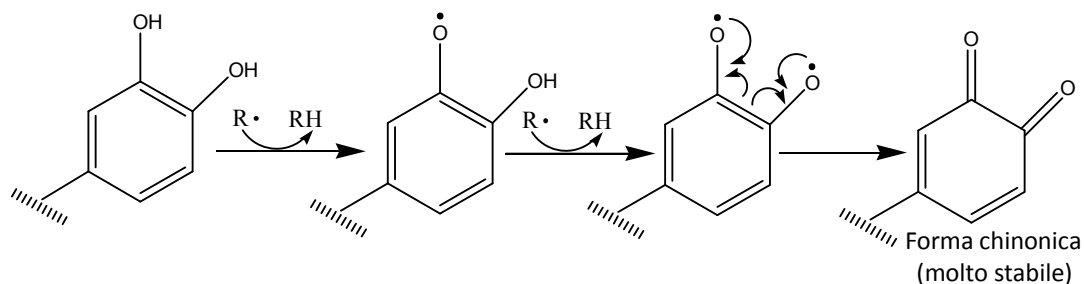


Fig. 2.11 Neutralizzazione di due radicali liberi da parte del gruppo catecolico (Rosati 2009).

La struttura catecolica nell'anello B aumenta fortemente l'inibizione della perossidazione lipidica e questa caratteristica strutturale è comune ai più potenti *scavengers* dei radicali superossidi, ossido nitrico e ossidrile e la sua assenza ne diminuisce l'attività antiossidante (Heim 2002). Anche l'assenza del gruppo ossidrile in posizione 3, come nei flavanoni e flavoni diminuisce l'azione antiossidante (Tripoli 2007).

2.2.2 I resorcinoli.

2.2.2.1 Introduzione

I composti fenolici sono presenti sia nel regno animale che vegetale, ma la maggior parte ha origine in quello vegetale (Harborne 1989). Essi sono metaboliti secondari formati da una catena laterale alifatica legata ad un idrossibenzene, comprendono gli alchifenoli, alchilresorcinoli, acidi anacardici e alchilcatecoli. Gli alchilresorcinoli (fig. 2.12) sono di gran lunga i più presenti in natura (Kozubek 2005).

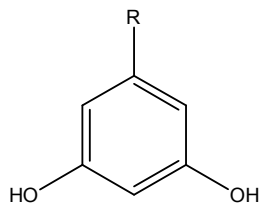


Fig. 2.12 Struttura base degli alchilresorcinoli (R= catena laterale alchilica).

La prima specie in cui furono isolati i resorcinoli lipidici o alchilresorcinoli fu Il *Ginkgo Bilboa* (Ginkgoaceae). Successivamente furono trovati nelle Anacardiaceae, nei semi di

cereali, e in altre famiglie tra cui le Leguminoseae, soprattutto nel genere *Ononis* e comprendono derivati sia con modificazioni nell'anello che nella catena (Kozubek 1999).

L'esistenza degli alchilresorcinoli è stata dimostrata anche nei batteri, nei funghi nei muschi e nelle alghe e in una spugna marina, *Haliclona* sp. (Kozubek 1999).

Le risorse naturali che contengono gli alchilresorcinoli includono 11 famiglie di piante superiori, 5 piante inferiori (alghe, muschi, e funghi), e 3 famiglie di batteri e una spugna marina come è riassunto nella tabella 2.2.

Fonte	Famiglia	Genere
Piante superiori	Anacardiaceae	<i>Anacardium</i>
		<i>Mangifera</i>
		<i>Melanorrhoea</i>
	Ginkgoaceae	<i>Ginkgo</i>
	Proteaceae	<i>Grevillea</i>
		<i>Hakea</i>
		<i>Opistholepis</i>
		<i>Protea</i>
		<i>Persoonia</i>
		<i>Cardwellia</i>
	Myrsinaceae	<i>Rapanea</i>
		<i>Ardisia</i>
	Primulaceae	<i>Lysimachia</i>
	Myristicaceae	<i>Knema</i>
		<i>Virola</i>
		<i>Myristica</i>
	Iridaceae	<i>Iris</i>
Araceae	<i>Philodendron</i>	
	<i>Monstera</i>	
Compositae	<i>Conyza</i>	
	<i>Artemisia</i>	
	<i>Baccharis</i>	
	<i>Senecio</i>	
Leguminoseae	<i>Ononis</i>	
	<i>Genista</i>	
	<i>lathyrus</i>	
Piante superiori	Gramineae	<i>Triticum</i>
		<i>Secale</i>
		<i>Hordeum</i>
		<i>Triticale</i>
		<i>Sorghum</i>
		<i>Oryza</i>
		<i>Agropyron</i>

Piante superiori	Gramineae	<i>Bromus</i>
		<i>Elymus</i>
		<i>Dactylis</i>
		<i>Arrhenatherum</i>
		<i>Alopecurus</i>
		<i>Festuca</i>
Algae	Chlorophyceae	<i>Botryococcus</i>
	Sargassaceae	<i>Cystophora</i>
Mosses		<i>Caulocystis</i>
		<i>Sphaerophorus</i>
		<i>Lobaria</i>
Fungi	Basidiomycetes	<i>Merulius</i>
		<i>Phlebia</i>
		<i>Phoma</i>
		<i>Corticium</i>
		<i>Pulchericium</i>
		<i>Verticillidiella</i>
		<i>Streptomyces</i>
	Hypnomyces	<i>Stemphylium</i>
	Bacteria	Actinomycetales
Pseudomonales		<i>Pseudomonas</i>
Eubacteriales		<i>Azotobacter</i>
Animals	Haliclonidae	<i>Haliclona</i>

Tabella 2.2. Fonti di alchilresorcinoli (Kozubek 1999).

La presenza di derivati resorcinolici in diverse specie del genere *Ononis* suggerisce che queste sostanze siano caratteristiche del genere (Barrero 1990). Dall'*Ononis natrix* subsp. *Hispanica* sono stati isolati diversi tipi di alchilresorcinoli come quelli riportati in fig. 2.13.

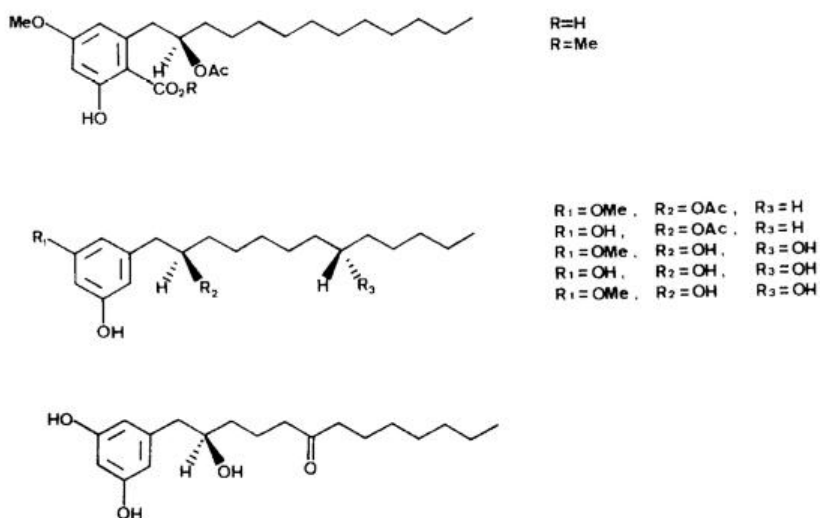


Fig.2.13 Resocinoli isolati dall'*Ononis natrix* subsp *hispanica* (Barrero 1990).

Dall'*Ononis natrix* sono stati isolati tre derivati resorcinolici di cui due nuovi composti naturali: il 5-(2-acetoxytridecyl)-3-methoxyphenol e il 5-(2-hydroxytridecyl)-3-methoxyphenol, riportati nella seguente figura (San Feliciano 1983), mostrati in fig. 2. 14.

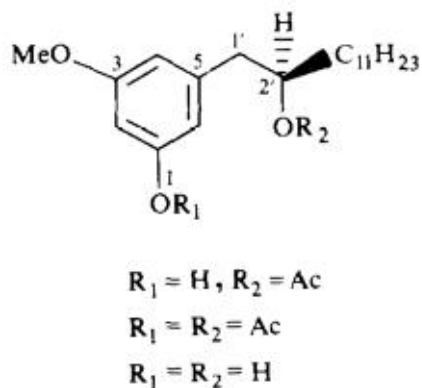


Fig. 2.14. Resorcinoli (San Feliciano 1983).

Dall'*Ononis pubescens* sono stati isolati diversi derivati resorcinolici, di cui la maggior parte nuovi composti naturali, che vengono riportati nella fig. 2.15 (Barrero 1994).

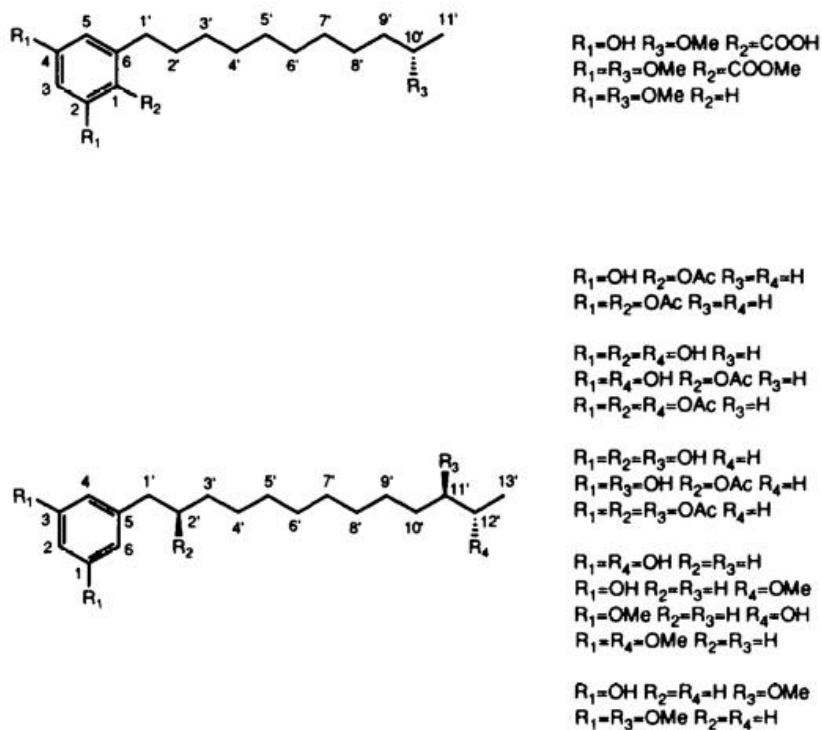


Fig. 2.15 Resorcinoli isolati dall'*Ononis pubescens* (Barrero 1994)

Dall'*Ononis speciosa* sono stati isolati diversi resorcinoli tra cui un nuovo composto naturale, il 5-(10-acetoxypentadec-8Z-enil)-resorcinolo (Barrero 1989). I composti sono riportati nella fig. 2.16.

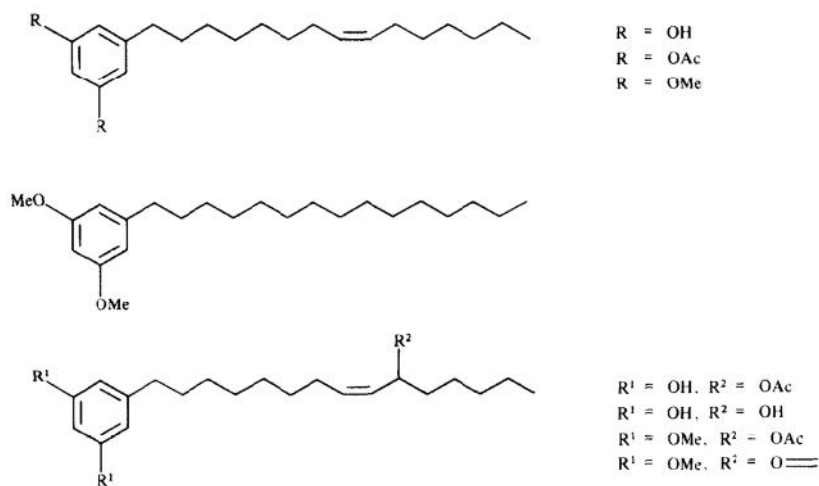


Fig. 2.16. Resorcinoli dall'*Ononis speciosa* (Barrero 1989).

Dall'*Ononis viscosa* sono stati isolati diversi composti tra cui un derivato resorcinolico, mai estratto prima, il (2'R-12'S)-5-(2-acetoxy-12-hydroxytridecyl)-resorcinol mostrato in figura 2.17 (Barrero 1991).

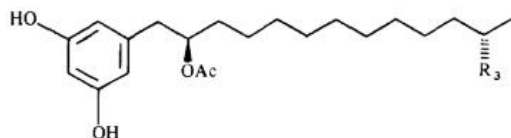


Fig. 2.17. Nuovo resorcinolo dall'*Ononis viscosa* (Barrero 1991).

Dall'*Ononis viscosa* subsp. *breviflora* sono stati isolati sette alchilresorcinoli e altri composti quali acidi alchilbenzoici, alchilisocumarine, pterocarpanie derivati dell'acido antranilico (Barrero 1994). Gli alchilresorcinoli sono mostrati in fig. 2. 18.

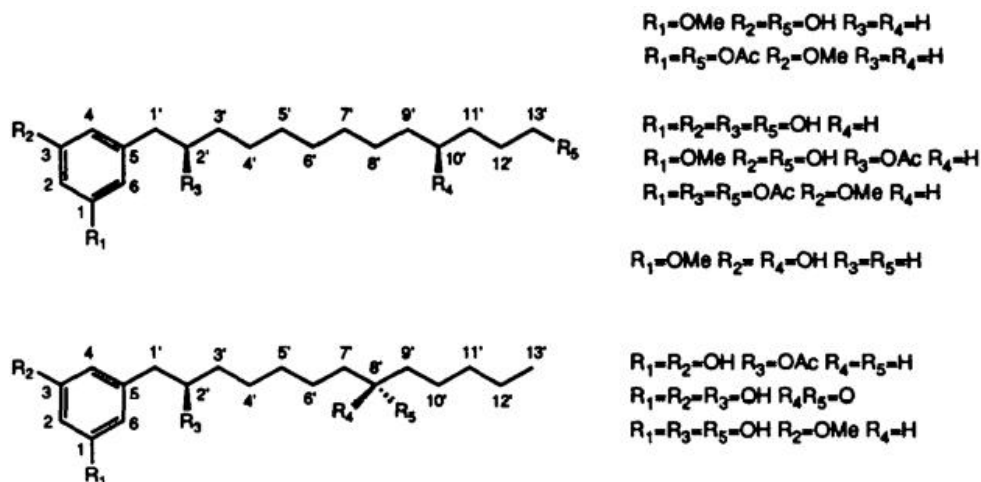


Fig. 2.18 Resorcinoli isolati dall'*Ononis viscosa* subsp. *breviflora* (Barrero 1994).

Dall'*Ononis natrix* subsp. *ramosissima* sono stati isolati diversi composti naturali tra cui due nuovi derivati resorcinolici, il 5-(2-acetoxy-8-oxotridecyl)-resorcinol e il 5-(2-acetoxy-7-hydroxy-8-oxotridecyl)resorcinol, mostrati in figura 2.19 (Barrero 1997).

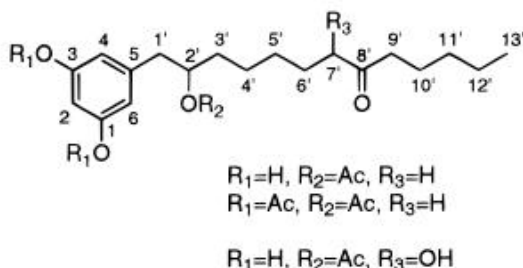


Fig. 2.19 Resorcinoli isolati dall'*Ononis natrix* subsp. *ramosissima*. (Barrero 1997).

2.2.2.2 Attività biologica

Gli alchilresorcinoli hanno diverse attività biologiche, già nel 1920 erano conosciute le proprietà antibatteriche e venivano utilizzati nel trattamento delle infezioni (Klarmann 1926). Gli studi effettuati dimostrano che questi composti sono attivi sui gram positivi, mentre hanno poca o nulla attività contro i gram negativi (Himejima 1991). Tra i diversi articoli a riguardo vale la pena citare uno studio fatto sul *Mycobacterium tuberculosis*, una miscela di alchilresorcinoli C_{13} monoinsaturi e i loro derivati metilenici sono stati testati su più di 200 pazienti dimostrando un'attività maggiore dell'80% nel trattamento della tubercolosi (Huang 1980).

Grazie alla loro natura anfifilica gli alchilresorcinoli possono essere incorporati nelle membrane biologiche come dei fosfolipidi di membrana, ma possono anche formare loro stessi delle membrane monostrato (Kozubek 1987). Inoltre possono aumentare o diminuire l'attività di alcuni enzimi di membrana, questo effetto pare sia dovuto al loro effetto sulla mobilità di membrana (Kozubek 1992). Gli alchilresorcinoli, infatti, sono in grado di modificare la permeabilità della membrana degli eritrociti, la differenza dell'effetto dipende dalla concentrazione, dalla lunghezza e i sostituenti della catena laterale: la lunghezza della catena laterale è inversamente proporzionale all'attività emolitica (Kozubek 1987). Gli alchilresorcinoli monoinsaturi causano un aumento di permeabilità molto maggiore rispetto a quelli saturi e ad una concentrazione di 15 μM possono causare lisi degli eritrociti (Kozubek 1980).

La loro interazione con le membrane biologiche e la loro natura anfifilica sembra essere alla base delle attività biologiche (Alastair 2004). Tante altre sono le attività biologiche attribuite agli alchilresorcinoli in letteratura, ma molto spesso i dati non sono così evidenti oppure gli studi sono stati fatti solo in vitro.

2.2.3 Le isocumarine

Le isocumarine e le 3,4-diidroisocumarine sono dei metaboliti secondari che si ritrovano in diverse varietà di funghi, licheni, spugne, batteri, piante superiori ed insetti. Nelle piante superiori si ritrovano solo in alcune famiglie come le Bignoniaceae, Compositae, Leguminoseae, Myristicaceae e Liliaceae (Qadeer 2008). Il nome isocumarina (1) deriva dal fatto che questi composti sono isomeri delle cumarine (2). Strutturalmente sono formate da un anello benzenico fuso con un pirano-lattone. Il loro analogo 3,4-diidro è chiamato 3,4-diidroisocumarina o isocroman-1-one (3) (Fig. 2.20).

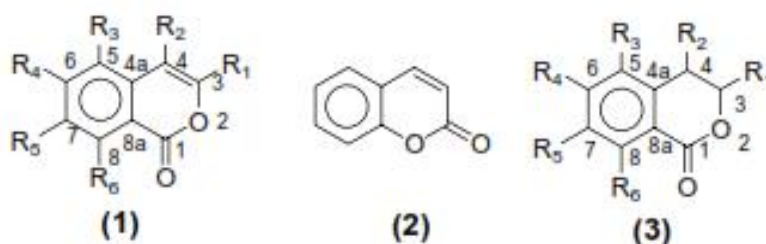


Fig 2.20 Struttura generale delle isocumarine (1), delle cumarine (2) e delle 3,4-diidroisocumarine (3).

In letteratura sono presenti diversi lavori sull'azione farmacologica di questa classe di composti, tra cui l'attività diuretica e antipertensiva ((Houlchen 1975), l'azione sul virus dell' HIV della coriandrin (Hudson 1993), altre invece sono state utilizzate nel trattamento del linfoedema (Piller 1976), mentre la phyllodulcin è un potente dolcificante ipocalorico (DuBois 1982) (Fig. 2.21).

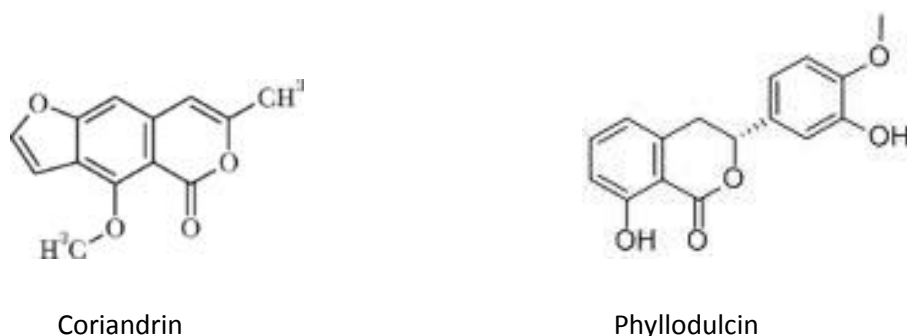


Fig. 2.21 Struttura della Coriandrin e Phyllodulcin.

Alcune isocumarine e diidroisocumarine sono invece dannose per l'uomo, come l'ochratoxin A che agisce inibendo la sintesi delle proteine, e l'ochratoxin B, entrambi metaboliti nefrotossici ed epatotossici di diverse specie di *Aspergillus* e *Penicillium* (Umezawa 1973, Vleggaar 1980). L'oosponol inibisce la dopamina β idrossilasi e causa gravi rash cutanei, bronchiti e pneumonia (Furutani 1977).

In letteratura si ritrovano diversi studi su differenti specie del genere *Ononis* da cui sono state isolate isocumarine.

Dall'*Ononis natrix* subsp. *hispanica* sono stati isolati diversi composti tra cui tre isocumarine naturali, mostrate in figura 2.22 (Barrero 1990).

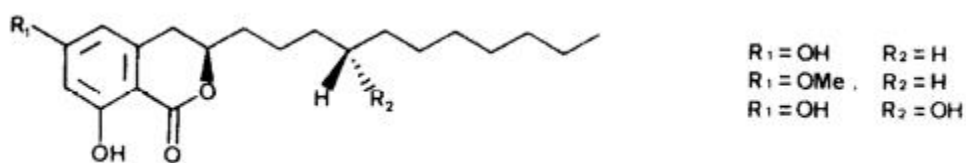


Fig. 2.22 Isocumarine isolate dall'*Ononis natrix* subsp. *hispanica* (Barrero 1990).

Dall'*Ononis natrix* sono state isolate diverse 3,4-dihydroisocoumarine di cui 5 nuove 3-alkyl-3,4-dihydroisocoumarins (Fig. 2.23) (San Feliciano 1983, 1990).

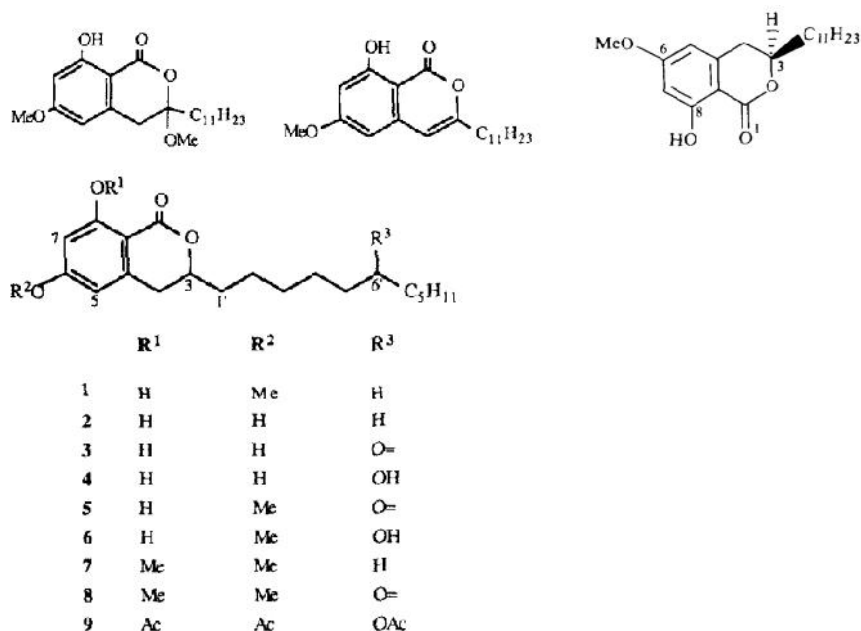


Fig.2.23 Alchilisocoumarine isolate dall'*Ononis natrix* (San Feliciano 1983, 1990).

Dall'*Ononis pubescens* sono state isolate quattro nuove alchilisocumarine naturali, mostrate in figura 2. 24 (Barrero 1994).

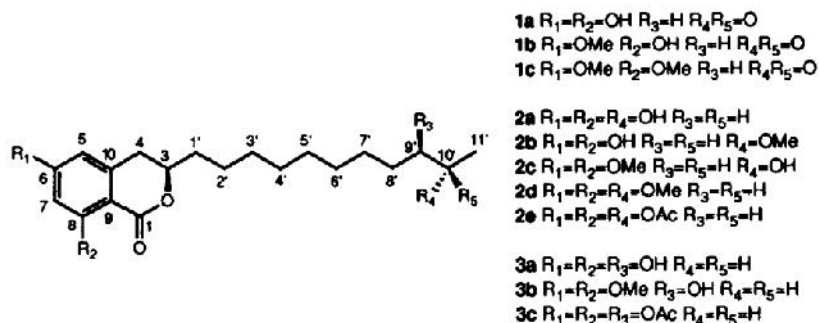


Fig. 2.24 Alchilisocumarine isolate dall'*Ononis pubescens* (Barrero 1994).

Dall'*Ononis viscosa* subsp. *breviflora* sono stati isolati diversi composti tra cui cinque alchilisocumarine, mostrate in figura 2. 25 (Barrero 1994).

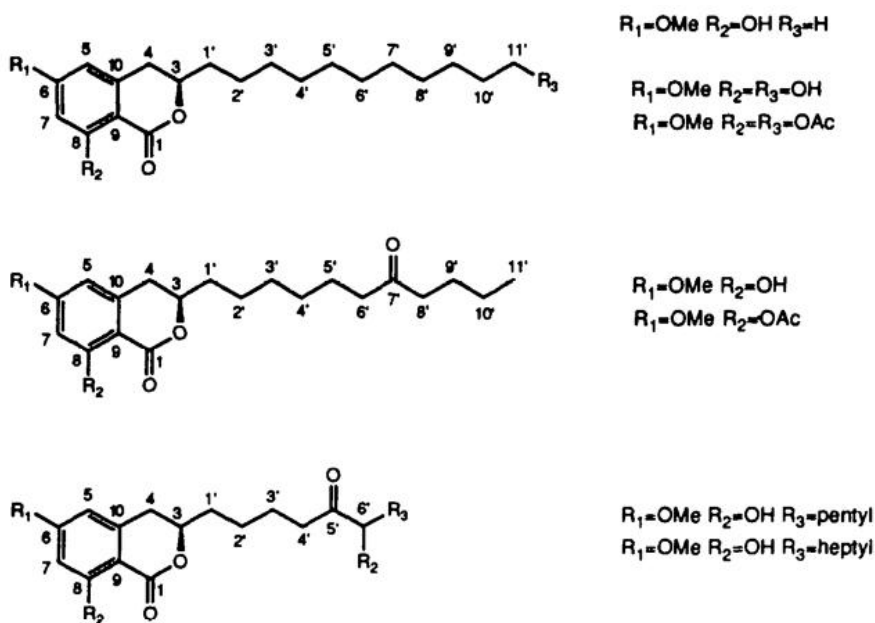


Fig 2.25 Alchilisocumarine isolate dall'*Ononis viscosa* subsp. *breviflora* (Barrero 1994).

BIBLIOGRAFIA

Abdel-Kader M.S. (2001). Phenolic constituents of *Ononis vaginalis* roots. *Planta medica*, 67, pg 388-390.

Alastair B. et al (2004). Dietary alkylresorcinols: absorption, bioactivities, and possibilities use as biomarkers of whole-grain wheat-and rye-rich foods. *Nutrition reviews*, 62, p5 81-95.

Al-Khalil S. et al. (1995). N-arachidylanthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. *Journal of natural products*, 58, pg 760-763.

Barrero A.F. et al. (1989). Resorcinol derivates and other components of *Ononis speciosa*. *Phytochemistry*, 25, pg 161-164.

Barrero A.F. et al. (1990). N- Δ^{13} -docosenoylanthranil acid and alkylresorcinols from *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. *Phytochemistry*, 29, pg 1967-1969.

Barrero A.F. et al. (1991). Resorcinol derivates from *Ononis viscosa*. *Phytochemistry*, 30, 641-643.

Barrero A.F. et al. (1994). Alkyresocinol and isocoumarins from *Ononis pubescens*. *Phytochemistry*, 35, pg 493-498.

Barrero A.F. et al. (1994). Resorcinol derivatives and other components from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry*, 36, 189-194.

Barrero A.F. et al. (1997). Resorcinol derivates and flavonoids of *Ononis natrix* subspecies *ramosissima*. *Journal of natural products*, 60, pg 65-68.

Barrero A.F. et al. (1998). Ptreocarpanes from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry*, 48, pg 187-190.

Chebil L. et al. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process biochemistry*, 41, pg 2237-2251.

Cook N.C, Samman S (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutritional biochemistry*, 7, pg 66-76.

Coulter T.P (1990). Food: the chemistry of its components. 2nd Ed. *The Royal Society of Chemistry*. pg 137-149

- Cushnie et al. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26, pg 343-356.
- DuBois G. (1982). Nonnutritive Sweeteners. The Search for Sucrose Mimics. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 17, pg 323-332.
- Furutani Y et al. (1977). Isolation and structure of new isocoumarins. *Agricultural and biological chemistry*, 41, pg 1179-1183.
- Harborne J.B (1988). Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular and medicinal properties*. pg 17-27 Alan. Liss New York, NY USA
- Harborne J.B (1989). *Methods in plant biochemistry*.
- Heim K.E et al. (2002). Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The journal of nutritional biochemistry*, 13, pg 572-584.
- Himejima M, Kubo I. (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39, pg 418-421.
- Houlchen, W. J.; Nadelson, J (1975). *British patent*.1374337 (1874); C.A. 83, 43196.
- Hudson JB. Et al. (1993). The unusual UVA-dependent antiviral properties of the furoisocoumarin, coriandrin. *Photochemistry, photobiology*, 57, pg 491- 496.
- Huang, P.-H., Chen, W.-S. & Hu, Y. (1980). Studies on antituberculosis constituents from *Ardisia japonica*. *Yao Hsueh T'ung Pao*, 15, pg 39.
- Klarmann E. (1926). Further studies on the introduction of alkyl and aryl groups into the nucleus of polyphenols. *J. Am. Chem. Soc.*, 48, pg 2358 – 2367.
- Kozubek A. Demel R.A. (1980). Permeability changes of erythrocytes and liposomes by 5-(n-alk(en)yl)resorcinols from rye. *Biochemical Biophysical Acta*, 603, pg 220 - 227.
- Kozubek A. (1987). The effect of 5-(n-alk(en)yl)resorcinols on membranes. I. Characterization of the permeability increase induced by 5-(n-heptadecenyl)resorcinol. *Acta Biochimica polonica*, 34, pg 357 - 367.

Kozubek A. (1987b). The effect of 5-(n-alk(en)yl)resorcinols on membranes. II. Dependence on the aliphatic chain length and unsaturation. *Acta Biochimica polonica*, 34, pg 387 - 394.

Kozubek A. et al. (1992). Modulation of the activities of membrane enzymes by cereal grain resorcinolic lipids. *Zeitschrift für Naturforschung*, 47c, pg 41-46.

Kozubek A, Tyman JH (1999). Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chemical reviews*, 99, pg 1-25.

Kozubek A, Tyman JH (2005). Bioactive phenolic lipids. *Studies in natural products*, 30, pg 119-190.

Middleton et al. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*, 52, pg 673-751.

Murray MT. (1998). Quercetin: nature's antihistamine. *Better nutrition*.

Pal RS. et al. (2009). In-vitro antioxidative activity of phenolic and flavonoids compounds extracted from seeds of *Abrus precatorius*. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 1, pg 136-140.

Pierpoint, W.S (1986). Flavonoids in the human diet. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. pg 125-140
Alan. Liss New York, NY USA

Piller NB. (1976). Conservative treatment of acute and chronic lymphoedema with benzo-pyrones. *Lymphology*, 9, pg 132-137.

Pignatti, (1982). La flora d'Italia

Qadeer G. (2008). Synthesis, characterization and biological activities of isocoumarins, triazoles, thiadiazoles and indolinones.

Ren W et al. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal research review*, 23, pg 519-534.

Ricciuti S, Cardini C. (2004). Flavonoidi. Profilo farmacologico e terapeutico. Pg 1-16.

Rijke E.D et al. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1112, pg 31-63.

Rosati O. (2009). Chimica delle sostanze organiche naturali. Pg 125-144.

Sandhar H.K et al. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1, pg 25-41.

San Feliciano A. et al. (1983). An isocoumarin and other phenolic components of *Ononis natrix*. *Phytochemistry*, 22, pg 2031-2033.

San Feliciano et al. (1990). 3,4-dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. *Phytochemistry*, 29, pg 945-948.

Swain T (1986). The evolution of flavonoids. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. pg 1-14 Alan. Liss New York, NY USA.

Tripoli E. et al. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food chemistry*, 104, pg 466-479.

Tsuchiya H (2010). Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food chemistry*, 120, pg 1089-1096.

Umezawa H (1973). Chemistry of enzyme inhibitors of microbial origins. *Pure and applied chemistry*, 33, pg 129-144.

Vleggaar, R.; Steyn, P. S. (1980). The biosynthesis of some miscellaneous mycotoxins. *Academic Press, New York*.

Williams RJ. et al. (2004). Flavonoids and isoflavonones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. *Free radical biology and medicine*, 36, pg 838-849.

Wollenweber E (2003). Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *Z. Naturforsch*, 58e, pg 771-775.

www.actaplantarum.org

3 ONONIS NATRIX L.

3.1 Caratteristiche della pianta

L'*Ononis natrix* o ononide bacaja è un'erba perenne suffruticosa, di circa 30-60 cm, diffusa soprattutto nell'area del Mediterraneo come mostrato in figura 3.1.



Fig.3.1 Distribuzione in Europa dell'*Ononis natrix*.

In Italia è presente in tutte le regioni tranne il Molise e la Calabria. Cresce in prati aridi da 0 a 1200 m sopra il livello del mare, raramente la si ritrova a 1700 m, fiorisce tra Aprile e Luglio. Morfologicamente presenta le caratteristiche tipiche del genere a cui appartiene: i fusti sono vischiosi, per lo più densamente pelosi, ramificati e di odore sgradevole; le foglie picciolate, generalmente trifogliate, sono divise in segmenti (1-2 cm) da lanceolati a subrotondi, dentati ai margini con 2 stipole lineari intere alla base; i fiori a racemi densi, fogliosi e pedunculati, formati da un asse comune lungo 1-5 cm sul quale sono inseriti 2-3 fiori o uno solo, collegati da un peduncolo lungo 2-3 cm articolato in alto e spesso sopra l'ultimo fiore si prolunga in una resta; la corolla papilionacea di 1,5- 2 cm è gialla col vessillo venato di rosso o violetto, il calice lungo 6-12 mm è formato da 5 denti lanceolati acuminati, vischiosi e pelosi. Il frutto è legume pendulo di 1,5-2 cm, che contiene numerosi semi leggermente tuberculati.

Come tipo biologico appartiene alle camefite suffruticose, cioè piante con fusti legnosi solo alla base, generalmente di piccole dimensioni, e alle emicriptofite cespitose, piante perennanti per mezzo di gemme poste a livello del terreno e con aspetto di ciuffi serrati (Fig.3.2).

Nel nostro territorio sono presenti due sottospecie: *Ononis natrix* L. subsp. *natrix* e l'*Ononis natrix* L. subsp. *ramosissima* (Desf.) Batt. La prima è una pianta con fusto eretto vischioso-ghiandoloso, calice con tubo lungo 1/2-1/3 dei denti, che presentano peli patenti lunghi \pm 1,5-2 mm, cioè 2-3-5 volte la larghezza dei denti stessi, corolla, lunga 8-20 mm. Presente in tutte le regioni, esclusa la Sicilia, dubbia in Molise e Calabria. La seconda è una pianta con fusto prostrato, glabro o con ghiandole, calice con tubo lungo quanto i denti con peli ghiandolari o subglabri. Presente in Sicilia e Sardegna, non più ritrovata in Liguria e Calabria (Pignatti 1982, www.actaplantarum.org).



Fig. 3.2 Particolari dell'*Ononis natrix* L. (www.actaplantarum.org).

3.2 Luogo di raccolta

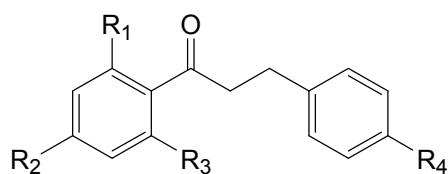
La pianta è stata raccolta nel settembre 2008 presso lo stagno di Molentargius.

Dopo la raccolta la pianta è stata mondata e ripulita da tutte le impurità e dai corpi estranei; successivamente, per consentire l'essiccazione, la pianta è stata riposta su delle griglie di metallo, situate in un ambiente fresco e asciutto, con temperatura non superiore a 30°C (per evitare la perdita di principi attivi e l'attacco ad opera di miceti e/o animali); infine, dopo l'essiccazione, la pianta è stata conservata in appositi contenitori e tenuta in un locale buio, fresco e asciutto.

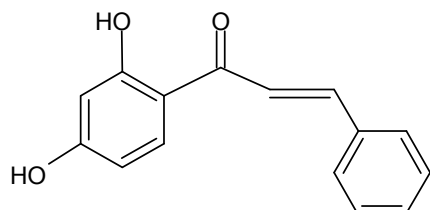
3.3 Risultati fitochimici dell'*Ononis natrix* L.

Nel presente studio sono stati isolati e delucidati sei diidrocalconi, un calcone, quattro flavanoni e due flavoni. Sono state inoltre isolate 3 nuovi composti naturali, due dihydroisocumarine: 1-[(5,7-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl) methyl] heptyl acetate (composto **15**) e il 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate (composto **16**); e il 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate (composto **17**) come mostrato in figura 3.3.

Dihydrochalcones

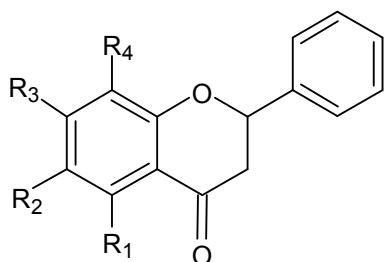


COMPOUNDS	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	OH	OH		
2	OH	OH	OCH ₃	
3	OH	OCH ₃	OH	
4	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
5	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
6		OH	OH	OCH ₃

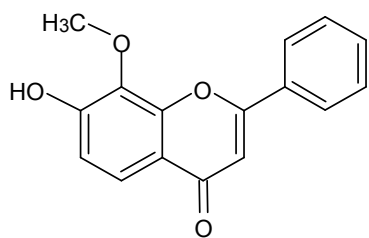


7 2',4'-Dihydroxychalcone

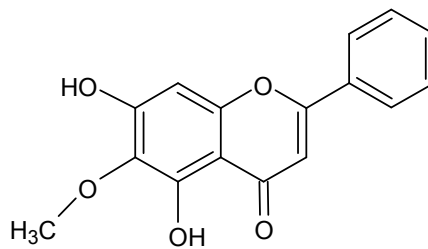
Flavanones



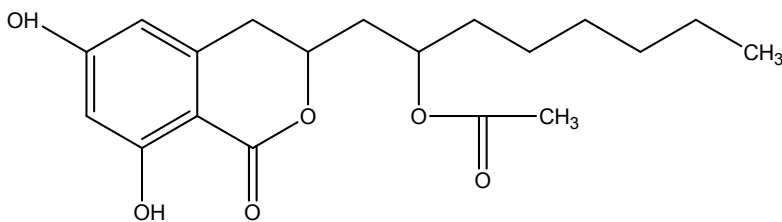
COMPOUNDS	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
8		OH	OCH ₃	OH
9			OH	
10			OH	OCH ₃
11	OH		OH	
12	OCH ₃		OH	



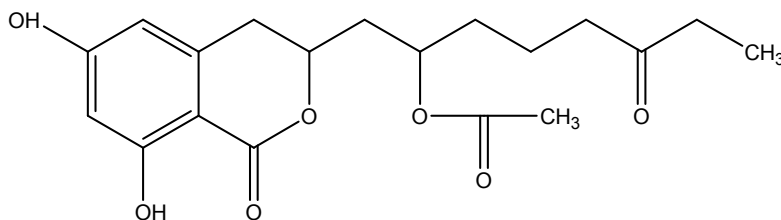
13 7-Hydroxy-8-Methoxyflavone



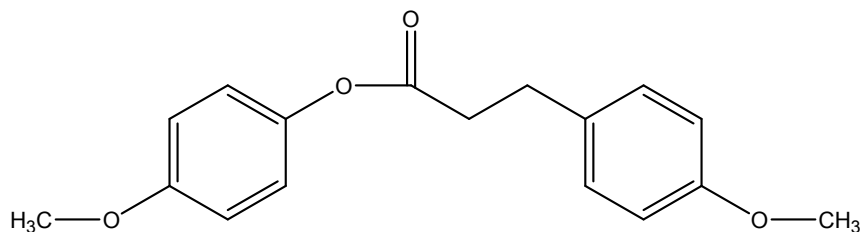
14 5,7-Dihydroxy-6-Methoxyflavone



15 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-3-yl) methyl] heptyl acetate



16 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate



17 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate

Fig.3.3 Composti isolati dall'*Ononis natrix*.

3.4 Estrazione e isolamento

1,7 Kg di fusti essiccati e polverizzati di *Ononis natrix* sono stati fatti percolare estensivamente, inizialmente con diclorometano (DCM) e successivamente con metanolo (MeOH). Dalla percolazione con solventi si sono ottenuti rispettivamente 390 e 300 g di estratto crudo.

3.4.1 Frazionamento dell'estratto diclorometanico

Un'aliquota di 20g dell'estratto in DCM è stata frazionata attraverso una cromatografia liquida sotto vuoto (VLC) usando 110 g di gel di silice (0.040-0.063 mm) come fase stazionaria e approssimativamente 50 mL di miscela esano/acetato di etile (EtOAc) per ciascuna frazione come fase mobile (8:2 per le frazioni 1-5, 7:3 per le frazioni 6-10, 5:5 per le frazioni 11-31, 3:7 per le frazioni 32-34, 2:8 per le frazioni 35-37, 100% EtOAc per le frazioni 38-44 e infine 5 MeOH: 5 EtOAc per le frazioni 45-54). Dopo la comparazione in cromatografia su strato sottile (TLC) delle 54 frazioni ottenute e viste le similarità sono state riunite in 21 distinte frazioni.

La frazione 5 (912 mg) viene cromatografata in colonna aperta (CC) utilizzando circa 120 g di gel di silice come fase stazionaria e una miscela di esano e acetato di etile (7.5 Hex: 2.5 EtOAc) come fase mobile. Si ottengono così 10 subfrazioni, di queste sia la 5.8 (307 mg) che la 5.9 (80 mg) vengono cromatografate in colonna aperta utilizzando rispettivamente 45 g e 10 g di gel di silice come fase stazionaria e una miscela di diclorometano e acetato di etile (9.9 DCM: 0.1 EtOAc) come fase mobile dando rispettivamente 8 e 7 subfrazioni. La frazione 5.8.3 corrisponde al composto puro **8** (6,8-dihydroxy-7-methoxyflavanone) del peso di 11 mg, la frazione 5.8.5 al composto puro **1** (2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone) del peso di 55.6 mg, mentre la frazione 5.8.7 corrisponde al composto puro **7** (2',4'-dihydroxychalcone) del peso di 102 mg. La frazione 5.9.5 (29.8 mg) viene iniettata e purificata in HPLC NP con una miscela di esano e acetato di etile (7 Hex: 3 EtOAc) come fase mobile e un flusso di 2.3 mL/min come condizioni operative, ottenendo così 3 subfrazioni. La frazione 5.9.5.2 corrisponde al composto **2** (2',4' dihydroxy-6'- methoxy-dihydrochalcone) con un tempo di ritenzione $t_R = 19'34''$ e del peso di 6.3 mg.

La frazione 6 (3.2 g) è stata frazionata attraverso VLC utilizzando 100 g di gel di silice come fase stazionaria e una miscela di solventi a polarità crescente come fase mobile (7 Hex: 3 EtOAc per le frazioni 1-35, 100% EtOAc per le frazioni 36-42 ed infine 100% MeOH per le frazioni 43-46). Dopo la comparazione con TLC delle 46 frazioni ottenute e viste le similarità sono state riunite in 9 distinte frazioni. Di queste la frazione 6.3 (2.7 g) è stata

cromatografata con C.C utilizzando 260 g di gel di silice e come fase mobile una miscela di diclorometano/acetato di etile (9.9 DCM: 0.1 EtOAc) ottenendo così 9 subfrazioni. La frazione 6.3.1 corrisponde al composto puro **3** (2',6'-dihydroxy-4'-methoxy-dihydrochalcone) del peso di 131.2 mg. La frazione 6.5 (103 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 15 g di gel di silice e come fase mobile una miscela di diclorometano/acetato di etile (9.9 DCM: 0.1 EtOAc) ottenendo 6 subfrazioni. Di queste la frazione 6.5.4 (7.5 mg) è stata purificata in HPLC NP con una miscela di esano e acetato di etile (7 Hex: 3 EtOAc) come fase mobile e un flusso di 2.3 mL/min come condizioni operative, ottenendo così 5 subfrazioni. La frazione 6.5.4.4 corrisponde al composto **6** (2',4'-dihydroxy-4-methoxydihydrochalcone) con un tempo di ritenzione $R_t = 16'7''$ e un peso di 0,4 mg.

La frazione 7 (4.5 g) è stata frazionata tramite VLC utilizzando 100 g di gel di silice e una miscela a polarità crescente di esano/acetato di etile (9:1 per le frazioni 1-2, 8:2 per le frazioni 3-4, 7:3 per le frazioni 5-30, 3:7 per le frazioni 31-36, 100% EtOAc per le frazioni 37-40 e infine 100% MeOH per le frazioni dalla 41-45). Dopo la comparazione tramite TLC delle 45 frazioni e viste le similarità, sono state riunite in 9 subfrazioni. La frazione 7.2 (1.85 g) è stata cromatografata C.C utilizzando 190 g di gel di silice e una miscela di cloroformio/acetone (9.7 CHCl_3 : 0.3 acetone), si sono così ottenute 9 subfrazioni. La frazione 7.2.4 (211.6 mg) è stata iniettata e purificata in HPLC NP con una miscela di esano/acetato di etile (6 Hex: 4 EtOAc) come fase mobile e un flusso di 2.3. mL/min come condizioni operative, ottenendo così 4 subfrazioni. La frazione 7.2.4.1 corrisponde al composto puro **12** (5-methoxy-7-hydroxyflavanone) con un tempo di ritenzione $R_t = 12'2''$ e un peso di 83.5 mg, mentre la 7.2.4.2 corrisponde al composto **10** (7-hidroxy-8-methoxyflavanone) con un tempo di ritenzione $R_t = 13'7''$ e un peso di 13 mg e infine frazione 7.2.4.3 corrisponde al composto **4** (2',6'-dihydroxy-4,4'-methoxydihydrochalcone) con un tempo di ritenzione $R_t = 15'3''$ e un peso di 7.2 mg. La frazione 7.2.7 (1.2 g) è stata cromatografata con C.C utilizzando 134 g di gel di silice e come miscela eluente un mix di esano/acetato di etile (6 Hex: 4 EtOAc), ottenendo così 7 subfrazioni. La frazione 7.2.7.3 (174 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 19 g di gel di silice e una miscela di etere di petrolio/acetato di etile (7 Petroleum ether : 3 EtOAc) come fase mobile, si sono così ottenute 4 subfrazioni. La frazione 7.2.7.3.1 (58 mg) è stata iniettata e purificata in HPLC NP con una miscela eluente di esano/acetato di etile (6 Hex: 4 EtOAc) e un flusso di 2.3 mL/min ottenendo così 2 picchi. il secondo picco, 7.2.7.3.1.2, eluito a $R_t = 14'8''$ corrisponde al composto puro **11** (5,7- dihydroxyflavanone) e un peso di 46 mg. La frazione 7.2.7.6 (33 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 8 g di gel di silice e una miscela di diclorometano/metanolo con l'aggiunta di acqua distillata per un massimo del 10% di metanolo (9.7 DCM: 0.3 MeOH + H_2O) come fase mobile, si sono così ottenute 3

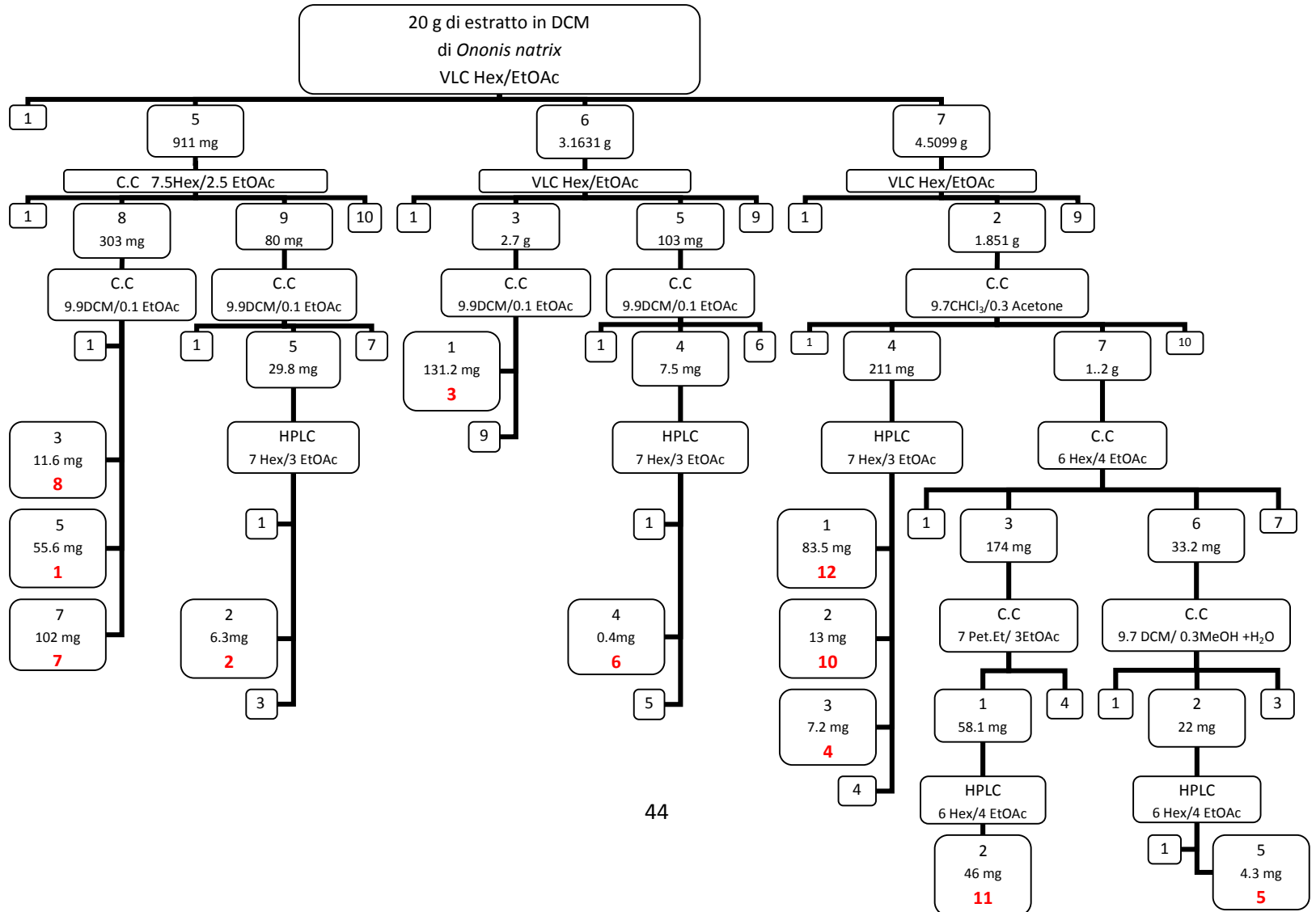
subfrazioni. La frazione 7.2.7.6.2 (22 mg) è stata iniettata e purificata in HPLC NP con una miscela eluente di esano/acetato di etile (6 Hex: 4 EtOAc) e un flusso di 2.1 mL/min ottenendo così 5 subfrazioni. La frazione 7.2.7.6.2.5, eluito a $R_t=19'25''$ corrisponde al composto puro **5** (2',4-dimethoxy-4',6'-dihydroxydihydrochalcone) e un peso di 4.3 mg.

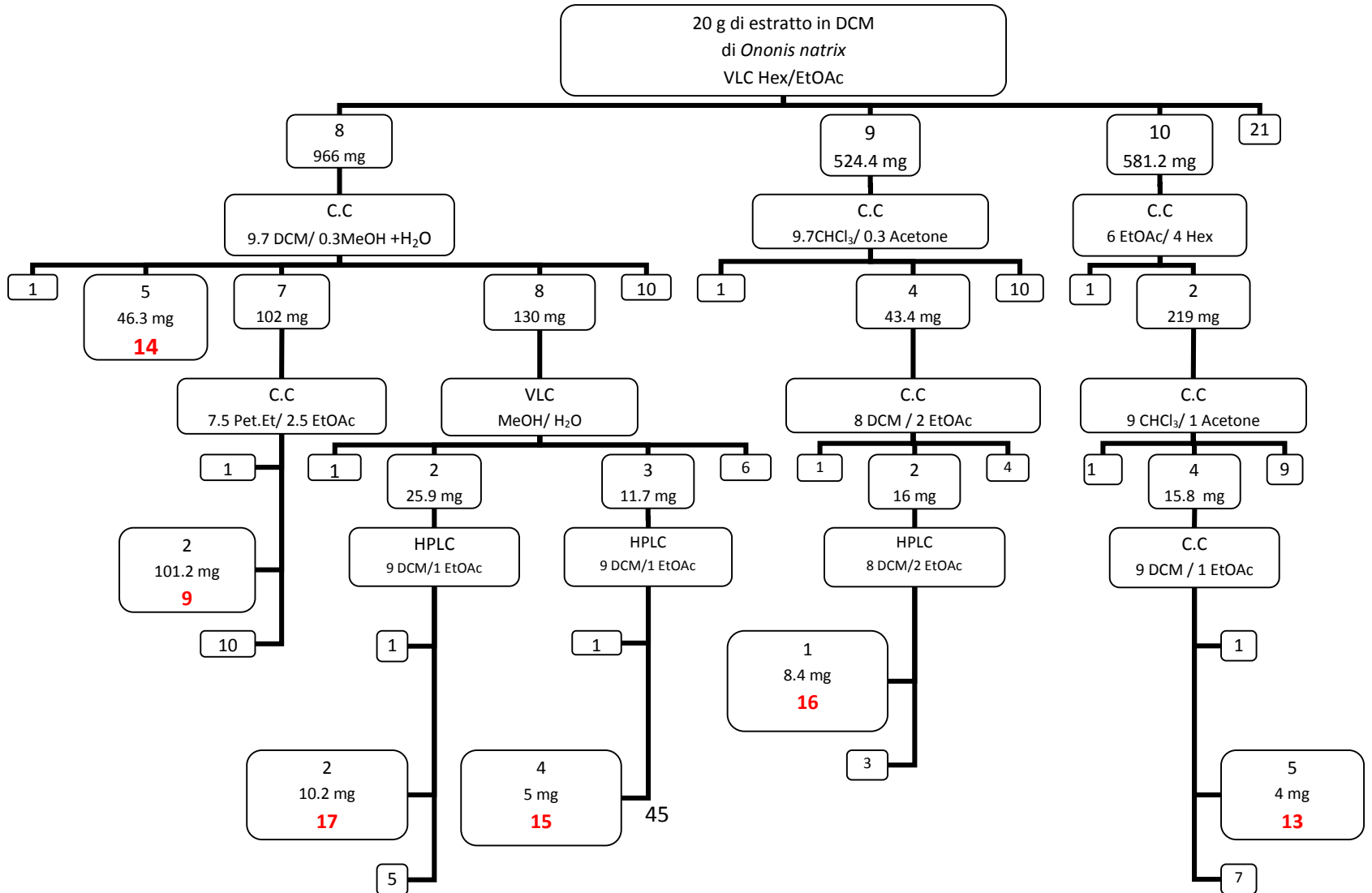
La frazione 8 (966 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 106 g di gel di silice e una miscela di diclorometano/metanolo con l'aggiunta di acqua distillata per un massimo del 10% di metanolo (9.7 DCM: 0.3 MeOH + H₂O) come fase mobile, si sono così ottenute 10 subfrazioni. La frazione 8.5 del peso di 46.3 mg corrisponde al composto puro **14** (5,7-dihydroxy-6-methoxy-flavone). La frazione 8.7 (102 mg) è stata cromatografata utilizzando 11 g di gel di silice e una miscela di etere di petrolio/ acetato di etile (7.5 Petroleum ether: 2.5 EtOAc), si sono ottenute 10 subfrazioni. La frazione 8.7.2 del peso di 101.5 mg corrisponde al composto puro **9** (7-hydroxyflavanone). La frazione 8.8 (130 mg) è stata frazionata attraverso VLC in fase inversa, usando come fase stazionaria il gel di silice e come fase mobile una miscela di metanolo/acqua (5:5 per la frazione 1, 6:4 per le frazioni 2-5, 7:3 per le frazioni 6-9, 8:2 per le frazioni 10-16 e infine 100% MeOH per le frazioni 17-19). Le 19 frazioni sono state comparate tramite TLC e viste le similarità, sono state riunite in 6 subfrazioni. La frazione 8.8.2 (25.9 mg) e la frazione 8.8.3 (11.7 mg) sono state purificate in HPLC NP con una miscela eluente di diclorometano/acetato di etile (9 DCM: 1 EtOAc) e un flusso di 2.2 mL/min ottenendo rispettivamente 5 e 4 subfrazioni. La frazione 8.8.2.2 del peso di 10.2 mg corrisponde al nuovo composto naturale: 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate (**17**), mentre la frazione 8.8.3.4 del peso di 5 mg corrisponde al nuovo composto naturale: 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl) methyl] heptyl acetate (**15**).

La frazione 9 (524 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 76 g di gel di silice e una miscela di cloroformio/ acetone (9 CHCl₃: 1 acetone), ottenendo così 10 subfrazioni. La frazione 9.4 (43.4 mg) è stata cromatografata con C.C usando 4.5 g di gel di silice e una miscela di diclorometano/acetato di etile (8 DCM: 2 EtOAc), si sono così ottenute 4 subfrazioni. La frazione 9.4.2 (16 mg) è stata iniettata e purificata in HPLC NP con una miscela di diclorometano/acetato di etile (8 DCM: 2 EtOAc) come fase mobile e un flusso di 2 mL/min, si sono così ottenute 3 subfrazioni. La frazione 9.4.2.1 del peso di 8.4 mg, eluita a $R_t= 16'97''$ corrisponde al nuovo composto naturale: 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate (**16**).

La frazione 10 (581 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 67 g di gel di silice e una miscela di esano/acetato di etile (6 EtOAc: 4 Hex) ottenendo così 2 subfrazioni. La frazione 10.2 (219 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 38 g di gel di silice e una miscela di cloroformio/ acetone (9 CHCl₃: 1 acetone), si sono così ottenute 9 subfrazioni. La frazione 10.2.4 (15.8 mg) è stata cromatografata con C.C utilizzando 3 g di gel di silice e

una miscela di diclorometano/acetato di etile (9 DCM: 1 EtOAc), ottenendo così 7 subfrazioni. La frazione 10.2.4.5 del peso di 4 mg corrisponde al composto puro **13** (7-hydroxy-8-methoxyflavone).



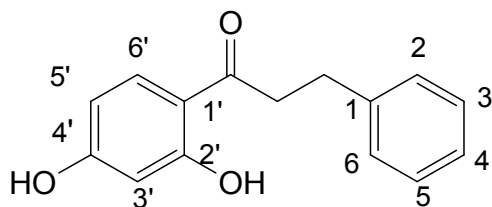


3.5 Delucidazione delle strutture note isolate dall' *Ononis natrix*

La struttura dei composti noti è stata determinata attraverso lo studio degli spettri NMR monodimensionali al protone ^1H NMR ed al carbonio ^{13}C NMR e di massa esatta (ESI).

I dati analitici e spettroscopici sono coerenti con i dati riportati in letteratura.

3.5.1 2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone



Il campione si presenta come cristalli aghiformi gialli.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 12.73 (1 H, s, OH-2'), 7.59 (1 H, d, J= 8.4, H-6'), 7.25 (2 H, m, H-2,6), 7.20 (2 H, m, H-3,5), 7.16 (1 H, m, H-4), 6.35 (1 H, H-5'), 6.32 (1 H, H-3'), 3.21 (2 H, t, J= 15.3, j= 8.4, H-2 α), 3.02 (2 H, t, J=15.3, j=8.4, H-2 β).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 203.623 (CO), 165.123 (C-4'), 162.835 (C-2'), 140.789 (C-1), 132.162 (C-6'), 128.552 (C-3,5), 128.342 (C-2,6), 126.254 (C-6), 113.645 (C-1'), 107.85 (C-5'), 103.545 (C-3'), 39.659 (C- α), 30.352 (C- β).

Riferimenti bibliografici:

Yang Huan et al. (2009). Flavonoid aglicones of *Oxytropis falcata*. *Chemistry of natural compounds*, 45, pg: 239-241.

Bao-Ning Su et al. (2003). Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay. *Phytochemistry*, 63, pg: 335-341.

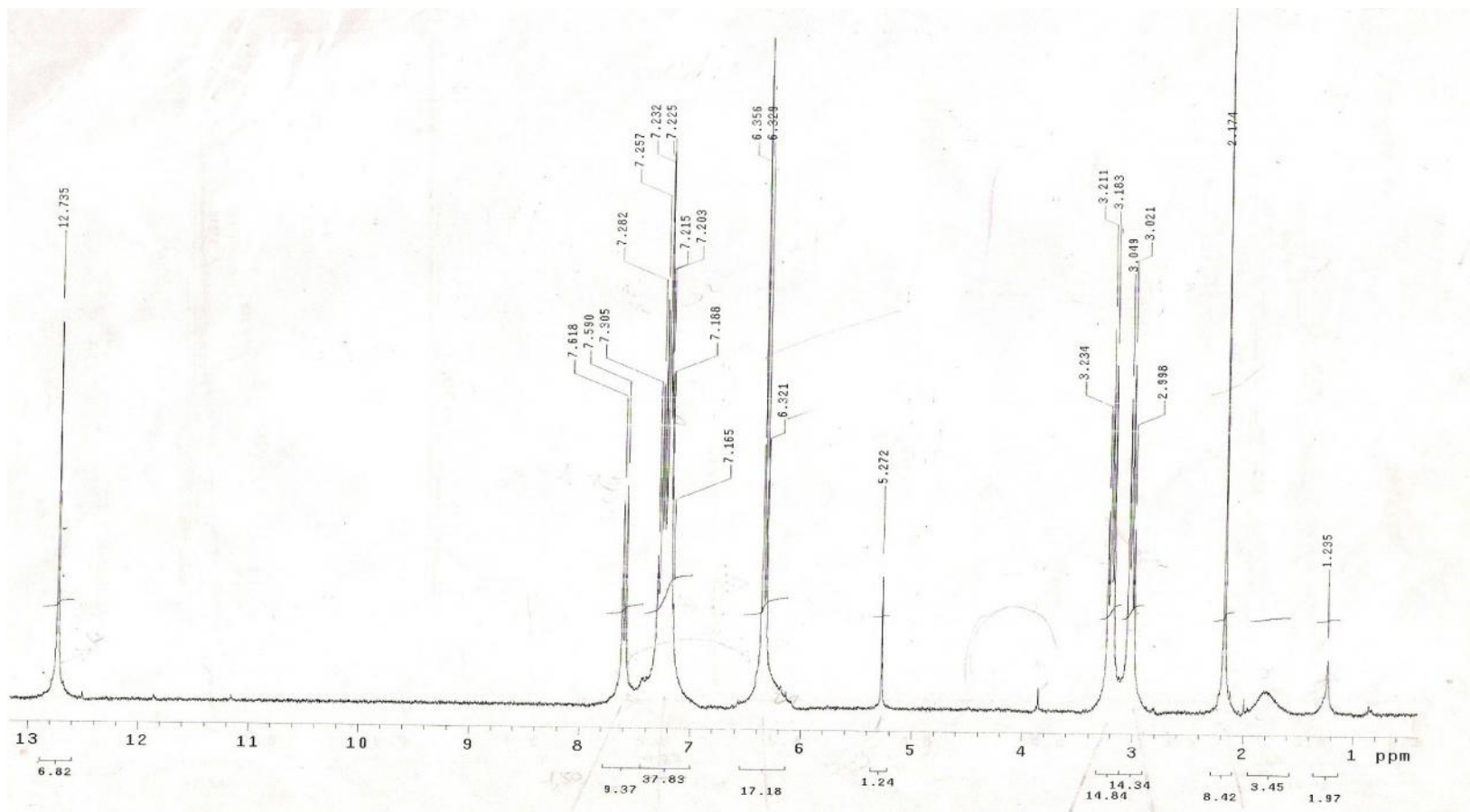


Fig. 3.4 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone.

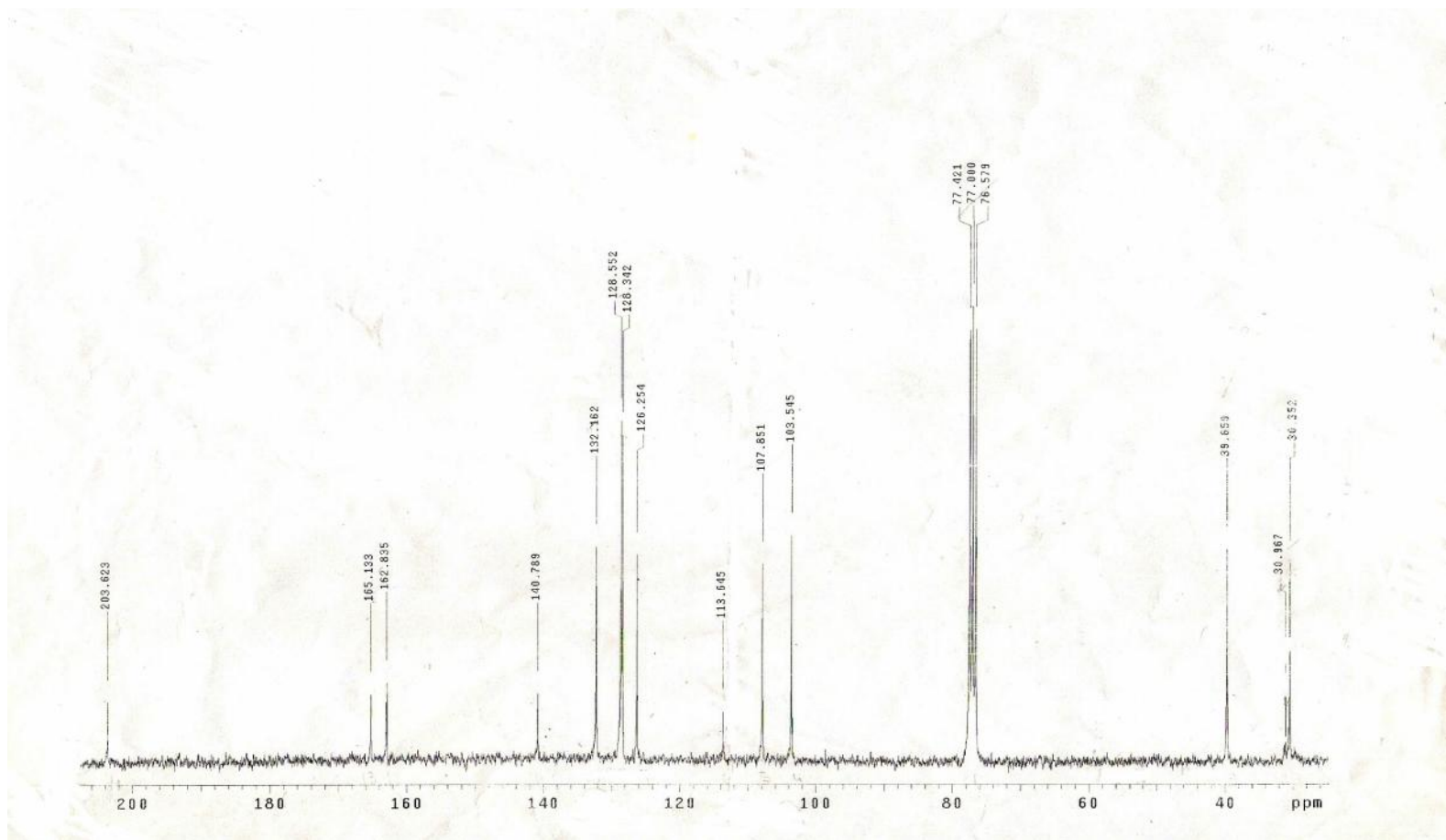
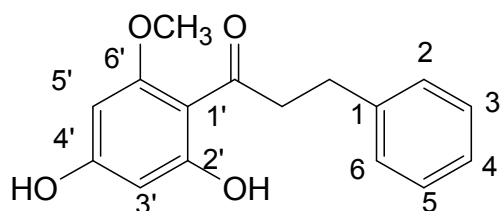


Fig. 3.5 ^{13}C -NMR spettro del 2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone.

3.5.2 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone



Il campione si presenta come cristalli aghiformi bianchi.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 13.89 (2 H, s, OH-2', 4'), δ = 7.29-7.17 (5 H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 5.97 (1 H, d, J= 2.4, H-3'), 5.88 (1 H, d, J= 2.4, H-5'), 3.81 (3H, s, OCH_3 -6'), 3.28 (2 H, t, J= 15.9, j= 7.5, H-2 α), 2.96 (2 H, t, J=15.3, j=7.2, H-2 β).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 204.449 (CO), 167.302 (C-6'), 163.433 (C-2'), 162.640 (C-4'), 141.647 (C-1), 128.407 (C-2, 3, 5, 6), 125.914 (C-4), 105.7 (C-1'), 96.553 (C-3'), 90.683 (C-5'), 55.651 (OCH_3), 45.729 (C- α), 30.918 (C- β).

Riferimenti bibliografici:

Kuo Yuh-Chi et al. (2004). Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. *Planta Medica*, 70, pg: 1237 – 1239.

Hufford C. D. et al. (1980). Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. *Phytochemistry*, 19, pg: 2036 – 2038.

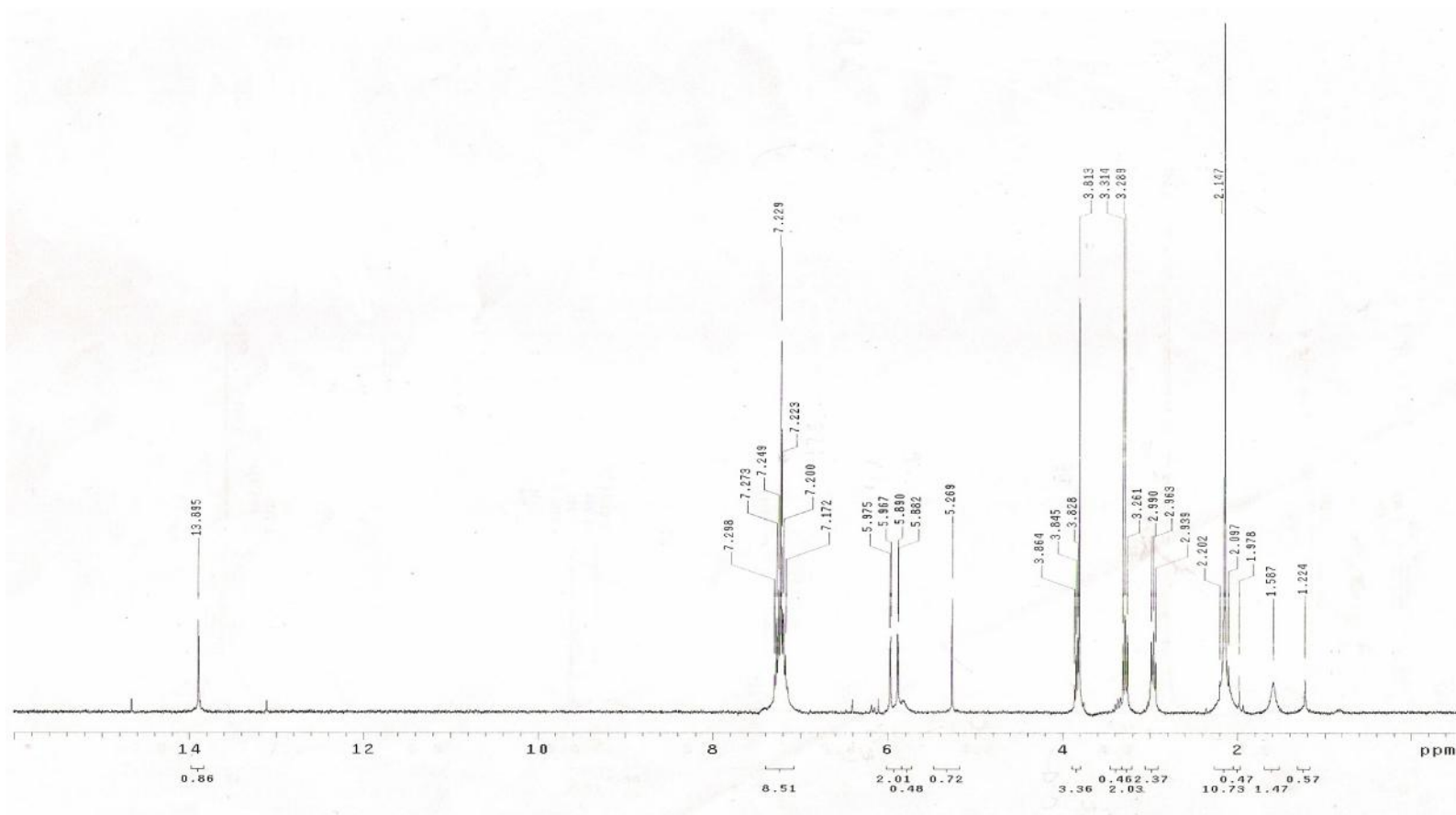


Fig. 3.6 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone.

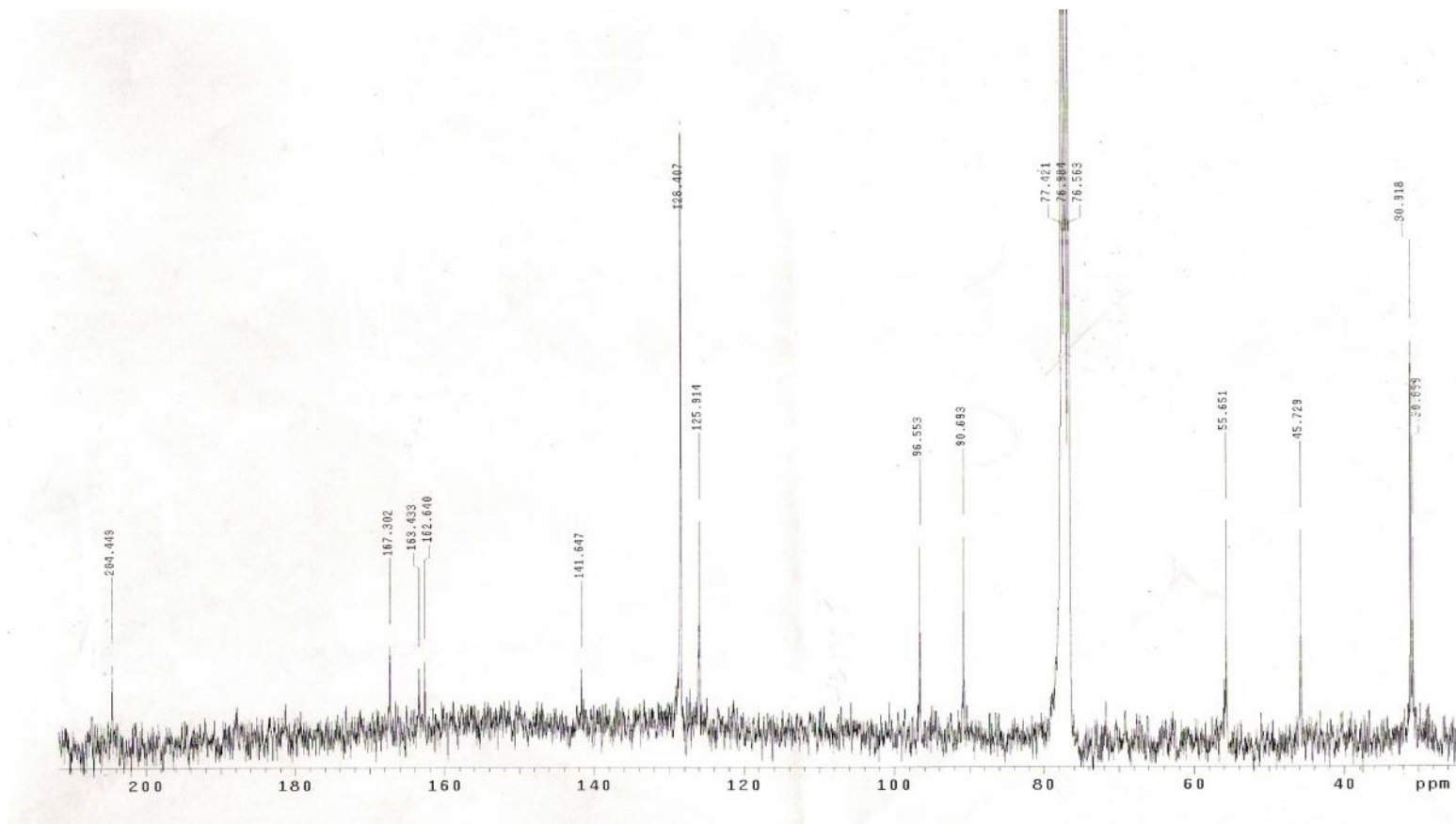
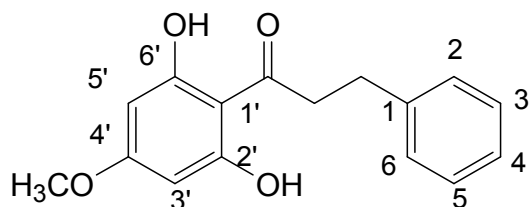


Fig. 3.7 ^{13}C -NMR spettro del 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone.

3.5.3 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone



Il campione si presenta come cristalli gialli.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 7.26-7.16 (5 H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 5.89 (2 H, s, H-3', 5'), 3.75 (3H, s, OCH_3 -4'), 3.36 (2 H, t, J = 15.9, j = 7.5, H-2 α), 2.99 (2 H, t, J =15.3, j =7.2, H-2 β).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 204.449 (CO), 168.272 (C-4'), 165.510 (C-6'), 163.022 (C-2'), 141.571 (C-1), 128.451 (C-2, 6), 128.389 (C-3, 5), 125.934 (C-4), 104.743 (C-1'), 94.444 (C-3', 5'), 55.520 (OCH_3), 45.597 (C- α), 30.525 (C- β).

Riferimenti bibliografici:

Hermoso A. et al (2003). Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. structural requirements for activity. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 11, pg: 3975-3980.

Joshi, A. S. et al (2001). Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. *Planta medica*, 67, pg: 186-187.

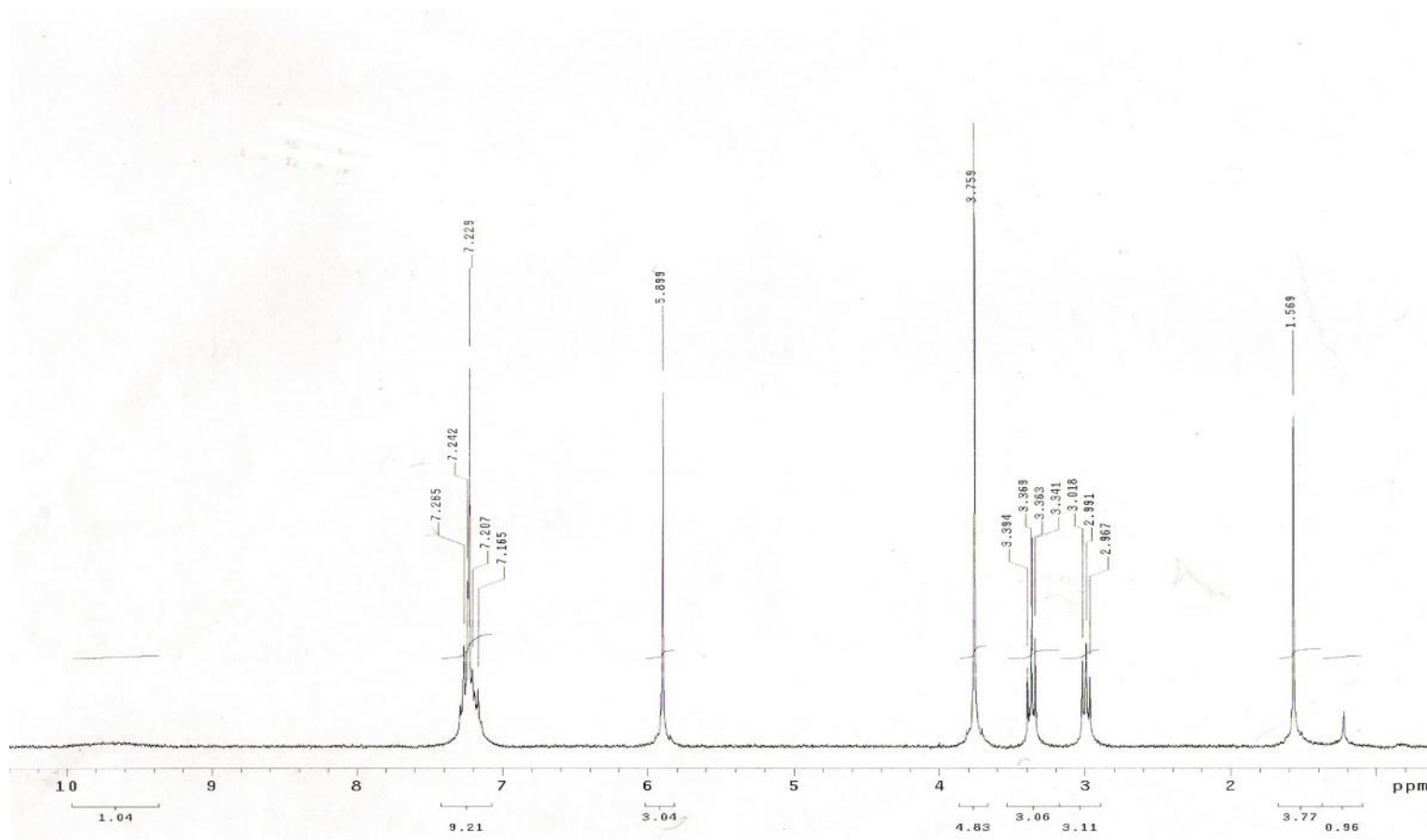


Fig. 3.8 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone.

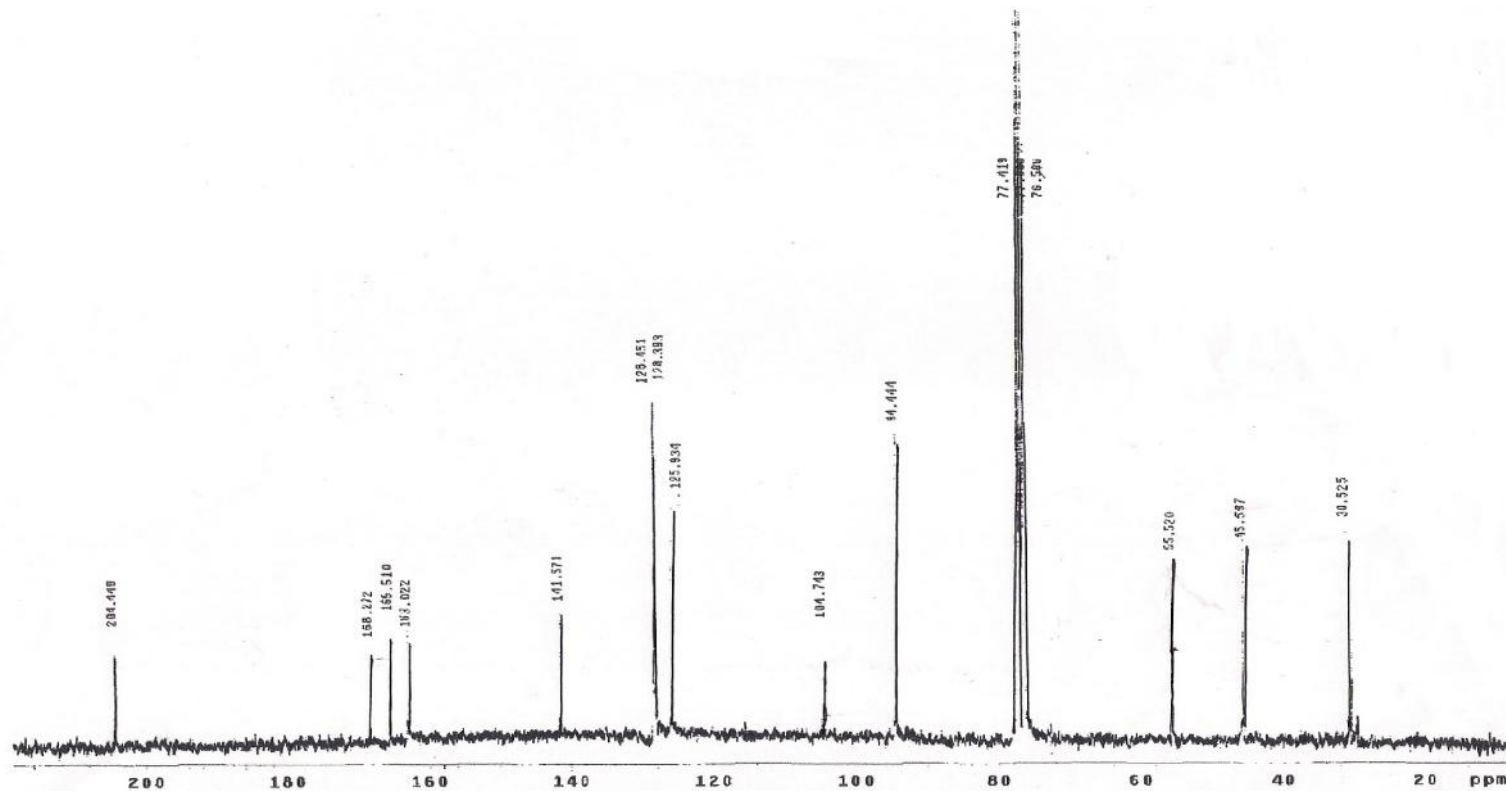
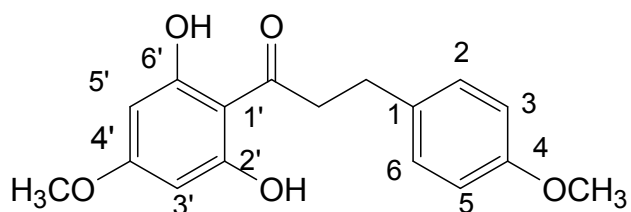


Fig. 3.9 ^{13}C -NMR spettro del 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone.

3.5.4 2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-dihydrochalcone



Il campione si presenta come cristalli gialli.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 7.12 (2 H, d, J = 9, H-2, 6), 6.81 (2 H, d, J = 8.4, H-3, 5), 5.89 (2H, s, H-3', 5'), 3.76 (3H, s, OCH_3 -4'), 3.75 (3H, s, OCH_3 -4), 3.33 (2 H, t, J = 15.3, j = 8.1, H-2 α), 2.99 (2 H, t, J = 15.6, j = 8.1, H-2 β).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 206.826 (CO), 168.272 (C-4'), 170.007 (C-4'), 165.458 (C-2', 6'), 157.729 (C-4), 133.59 (C-1), 129.304 (C-2, 6), 113.77 (C-3, 5), 104.733 (C-1'), 94.34 (C-3', 5'), 55.4 (OCH_3 -C-4), 55.23 (OCH_3 -C-4'), 45.835 (C- α), 29.662 (C- β).

Riferimenti bibliografici:

Shintaro Kamiya et al. (1989). Syntheses of several dihydrochalcones- amino acid and peptide conjugates. *Agricultural and biological chemistry*, 53, pg: 1365-1373.

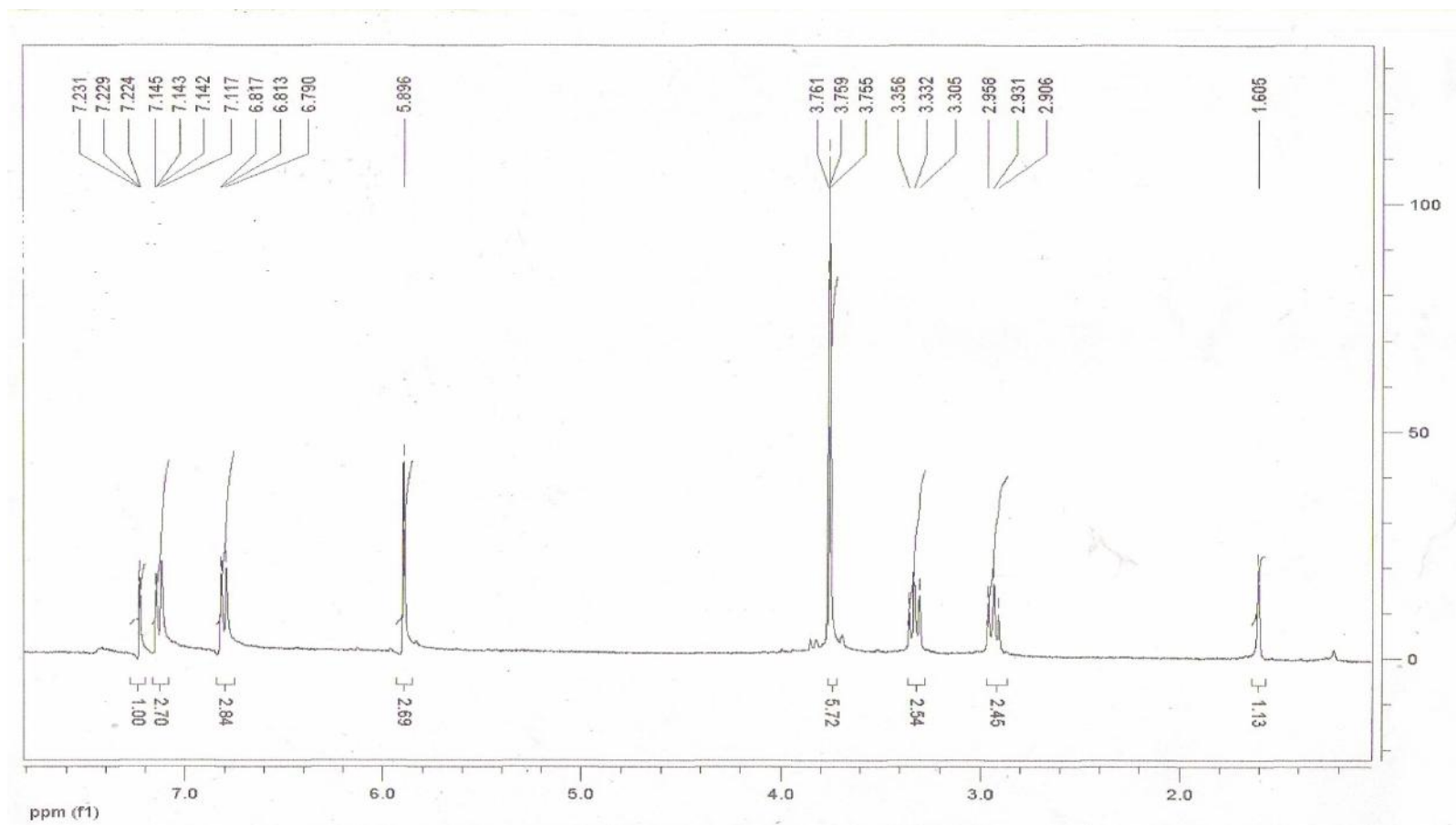


Fig. 3.10 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',6'-dihydroxy-4,4'-methoxydihydrochalcone.

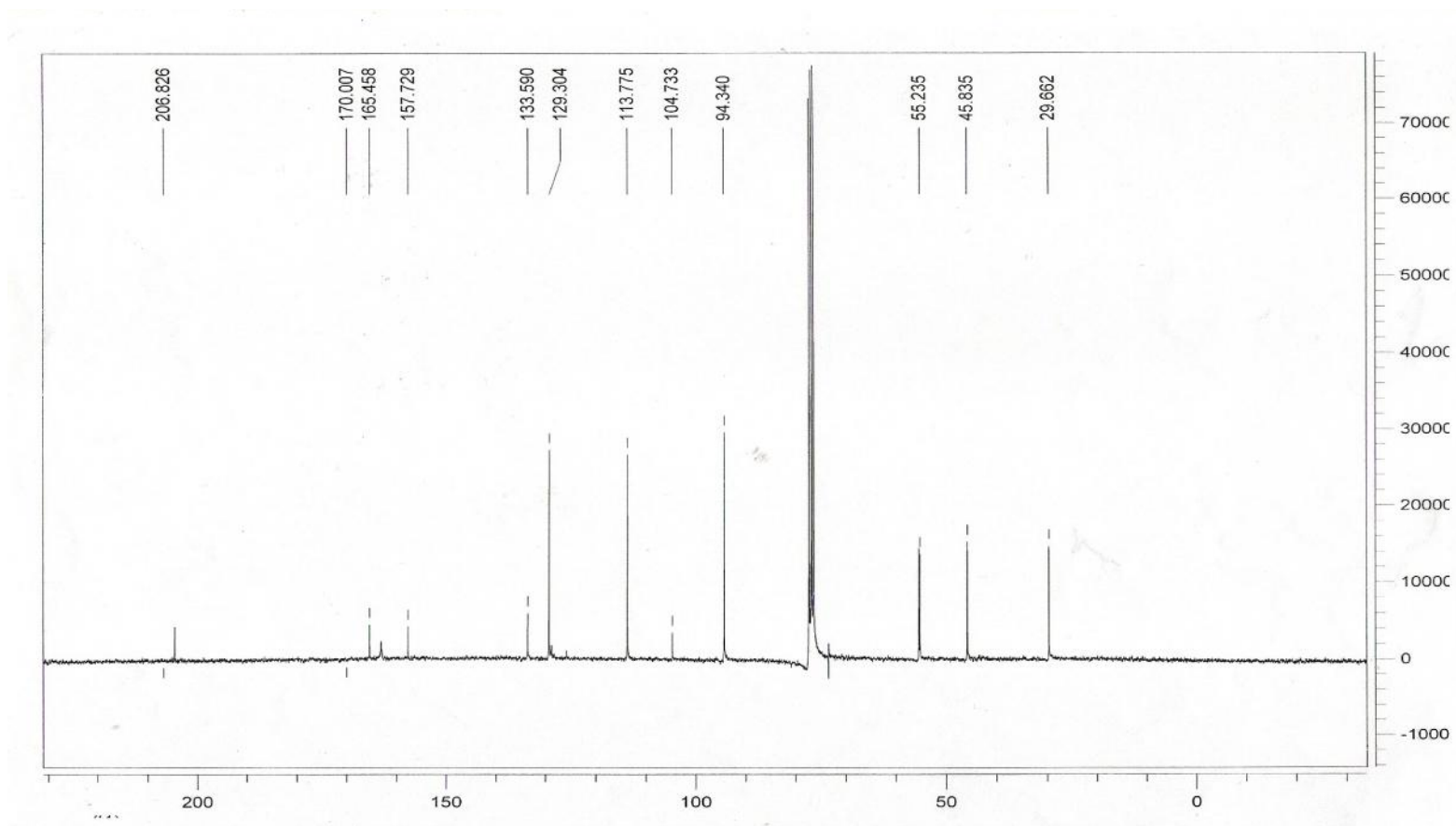
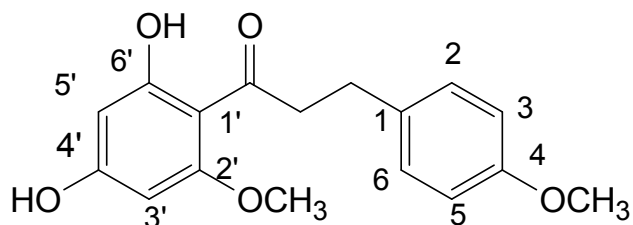


Fig. 3.11 ^{13}C -NMR spettro del 2',6'-dihydroxy-4,4'-methoxydihydrochalcone.

3.5.5 2',4-dimethoxy-4'6'-dihydroxy-dihydrochalcone



Il campione si presenta come solido bianco.

^1H NMR (300 MHz, MeOD, δ , ppm, J/Hz) δ : 7.217 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2-6), 6.914 (2H, d, J =8,7 Hz, H-3-5), 6.046 (1H, d, J =2.1 Hz, H-5'), 5.979 (1H, d, J =2.1 Hz, H-3'), 3.934 (3H, s, OCH_3 - 2'), 3.848 (3H, s, OCH_3 -4), 3.303 (2H, t, J = 15.6 Hz, j = 8.1 Hz, H- α), 2.96 (2H, t, J = 15.6 Hz, j = 8.1 Hz, H- β).

^{13}C NMR (300 MHz, MeOD, δ , ppm) δ : 206.038 (C=O), 168.574 (C-6'), 166.925 (C-4'), 165.168 (C-2'), 159.688 (C-4), 135.281 (C-1), 130.578 (C-2-6), 115.103 (C-3-5), 106 (C-1'), 97.296 (C-3'), 92.43 (C-5'), 56.405 (OCH_3 -C-2'), 55.935 (OCH_3 -C-4), 47.554 (C- α), 31.611 (C- β).

Riferimenti bibliografici:

Seidel V. et al (2000). (Rel)-1b,2a-di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3b,4a-di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniothalamus gardneri* and *Goniothalamus thwaitesii*. *Phytochemistry*,55, pg: 439-446.

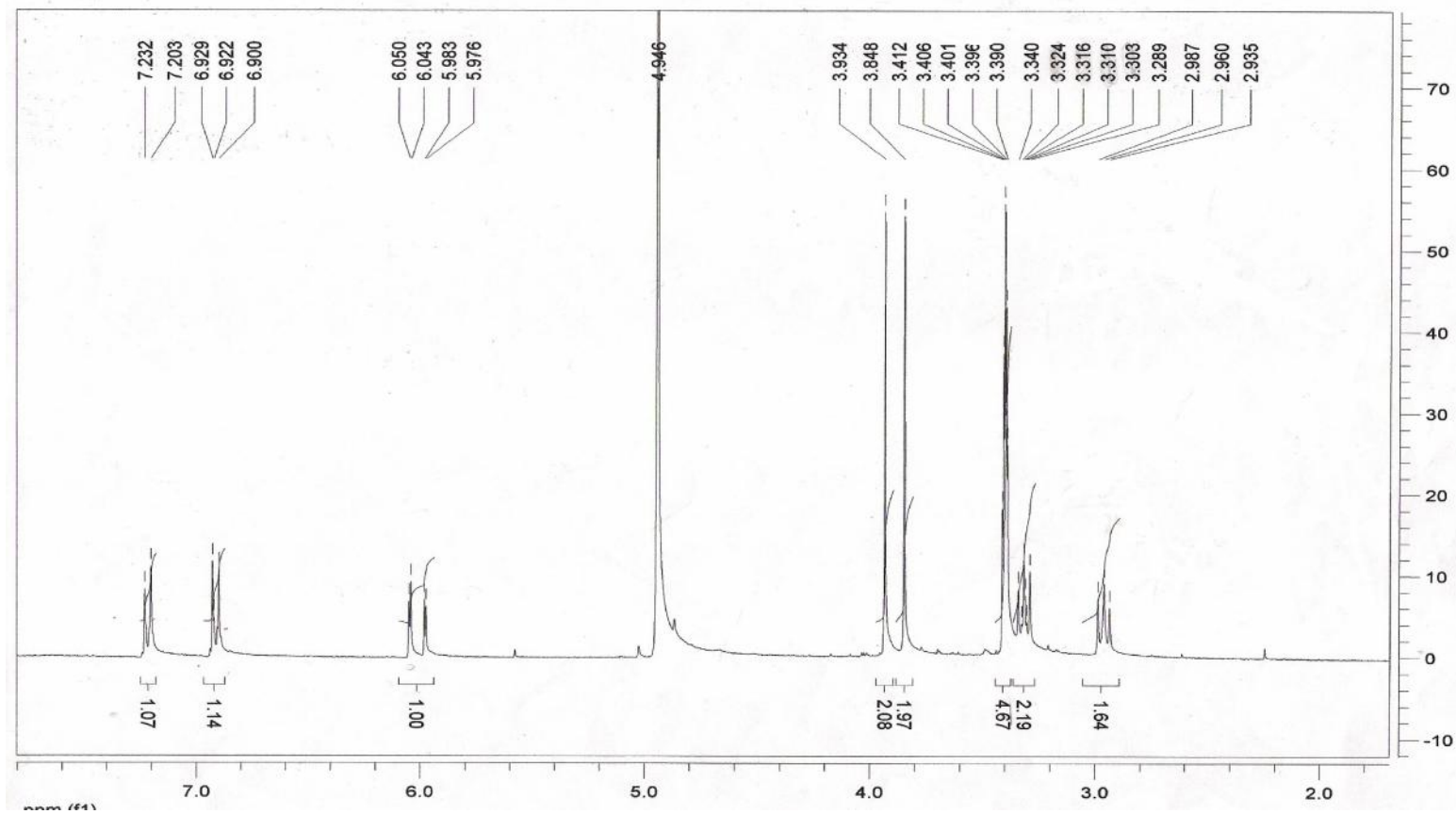


Fig. 3.12 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',4'-dihydroxy-4,6'-methoxydihydrochalcone.

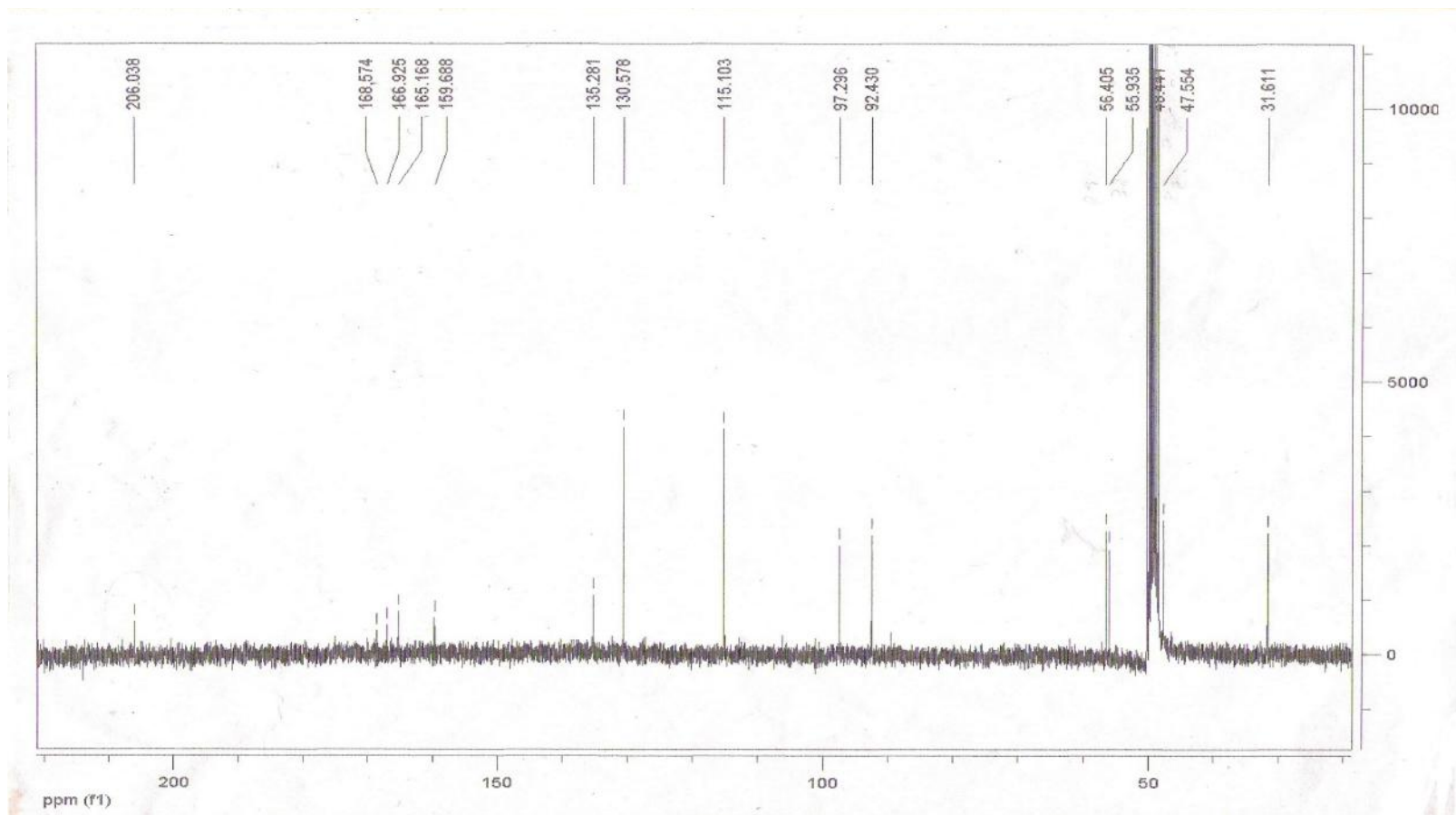
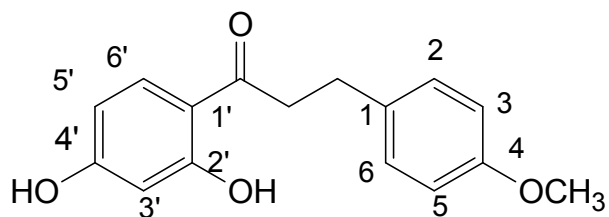


Fig. 3.13 ^{13}C -NMR spettro del 2',4'-dihydroxy-4,6'-methoxydihydrochalcone.

3.5.6 2',4'-dihydroxy-4-methoxy-dihydrochalcone



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 13.29 (1H, s, OH-2'), 12.72 (1H, s, OH-4'), 7.63 (1 H, d, J= 9, H-6'), 7.16 (2 H, d, J= 8.5, H-2, 6), 6.85 (2H, d, J= 8.5, H-3, 5), 6.37 (1H, m, H-5'), 6.35 (1H, d, J= 2 H-3'), 3.80 (3H, s, OCH_3), 3.20 (2 H, t, J= 15.5, j= 7.5, H-2 α), 3.01 (2 H, t, J=15.5, j=7.5, H-2 β).

Riferimenti bibliografici:

Jang, Dae Sik et al. (2006). Beccaridiol, an unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of *Diplectria beccariana*. *Phytochemistry*, 67, pg: 1836-1837.

Ribnicky et al. (2007). Compounds from an extract of *Artemisia* and methods for treating disorders. *Patent: US2007/224301 A1*.

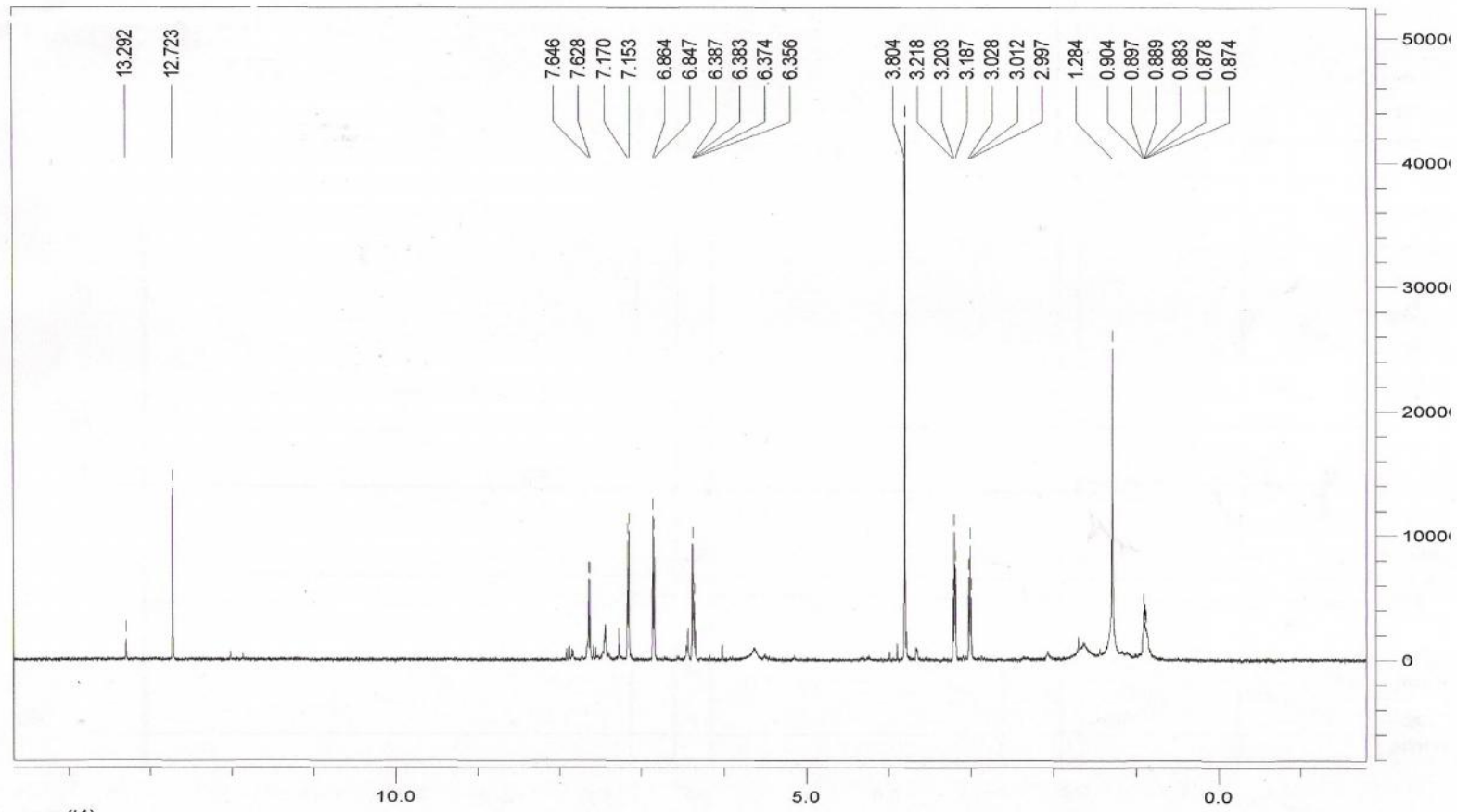
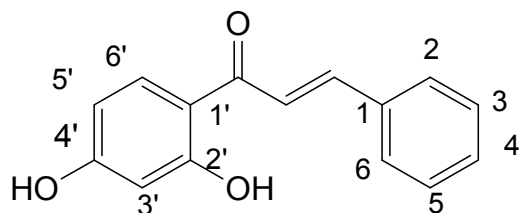


Fig. 3.14 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',4'-dihydroxy-4-methoxydihydrochalcone.

3.5.7 2',4'-dihydroxychalcone



Il campione si presenta come cristalli aghiformi gialli.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 13.32 (2 H, s, OH-2', 4'), 7.87 (1H, d, J=11.4, H- β), 7.82 (1 H, d, J=6.9, H-6'), 7.62 (2 H, d, J=2.7, H-2, 6), 7.61 (2 H, d, J= 1.8, H-3, 5), 7.55 (1H, d, J= 11.7, H- α), 7.39 (1H, H-4'), 6.43 (1H, H-3'), 6.40 (1 H, H-5').

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 191.949 (CO), 166.433 (C-2'), 162.5 (C-4'), 144.649 (C- β), 134.713 (C-1), 132.008 (C-6'), 130.713 (C-4), 128.989 (C-2, 6), 128.535 (C-3, 5), 120.212 α , (C-), 114.571 (C-1'), 107.688 (C-5'), 103.786 (C-3').

Riferimenti bibliografici:

Jun N. et al. (2007). Synthesis and evaluation of 2',4',6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, pg: 2396-2402.

Yang Huan et al. (2009). Flavonoid aglicones of *Oxytropis falcata*. *Chemistry of natural compounds*, 45, pg: 239-241.

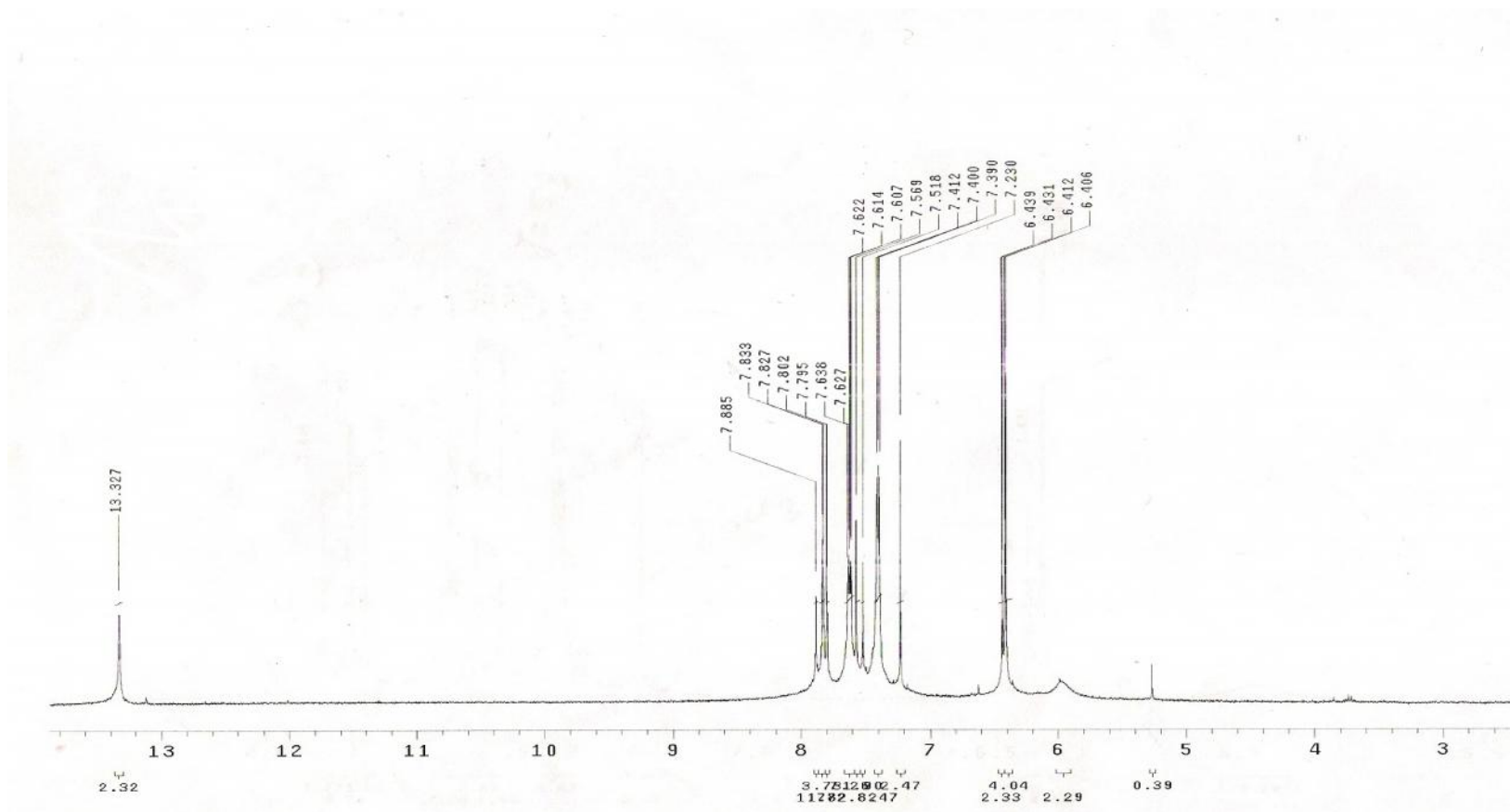


Fig. 3.15 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 2',4'-dihydroxychalcone.

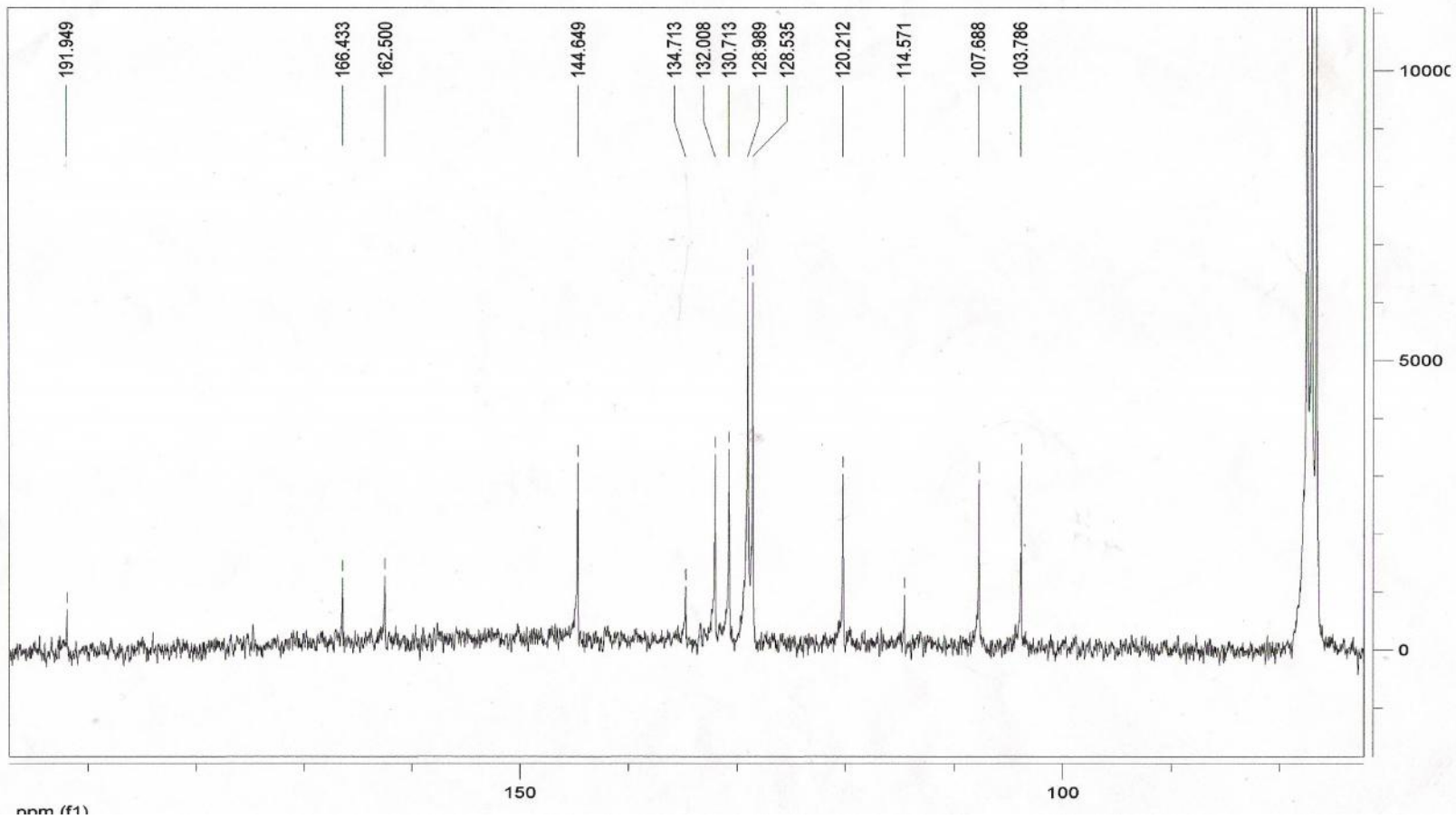
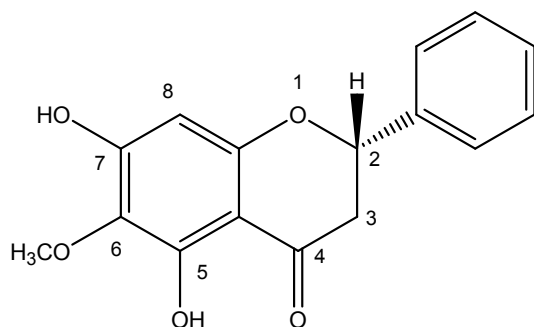


Fig. 3.16 ^{13}C -NMR spettro del 2',4'-dihydroxychalcone

3.5.8 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone



Il campione si presenta come cristalli gialli.

$\alpha = -38$ in CHCl_3

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): $\delta = 7.44\text{--}7.35$ (5 H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 6.1 (1 H, s, H-5), 5.44 (1H, dd, $J=12.6$, $j=3.3$, H-2), 3.84 (3H, s, $\text{OCH}_3\text{-7}'$), 3.05 (1H, dd, $J=17.4$, $j=12.6$, H-3), 2.84 (1 H, dd, $J= 17.4$, $j= 3.3$, H-3).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): $\delta = 195.546$ (CO), 159.872 (C-6), 157.882 (C-8), 152.734 (C-9), 138.280 (C-1'), 128.876 (C-3', 4', 5'), 127.549 (C-7), 125.930 (C-2', 6'), 102.914 (C-10), 95.954 (C-5), 79.606 (C-2), 61.526 (OCH_3), 43.479 (C-3).

Riferimenti bibliografici:

Chuan Li et al. (1997). (S)-Dihydrooroxilin A in human urine following oral administration of the traditional Chinese medicines: *Daisaiko-to* and *Shosaiko-to*. *Tetrahedron: Asimmetry*, 8, pp 1145-1147.

Chuan Li et al. (1998). Stereochemistry and Putative Origins of Flavanones Found in Post-administration Urine of the Traditional Chinese Remedies *Shosaiko-to* and *Daisaiko-to*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46, pp 807-811.

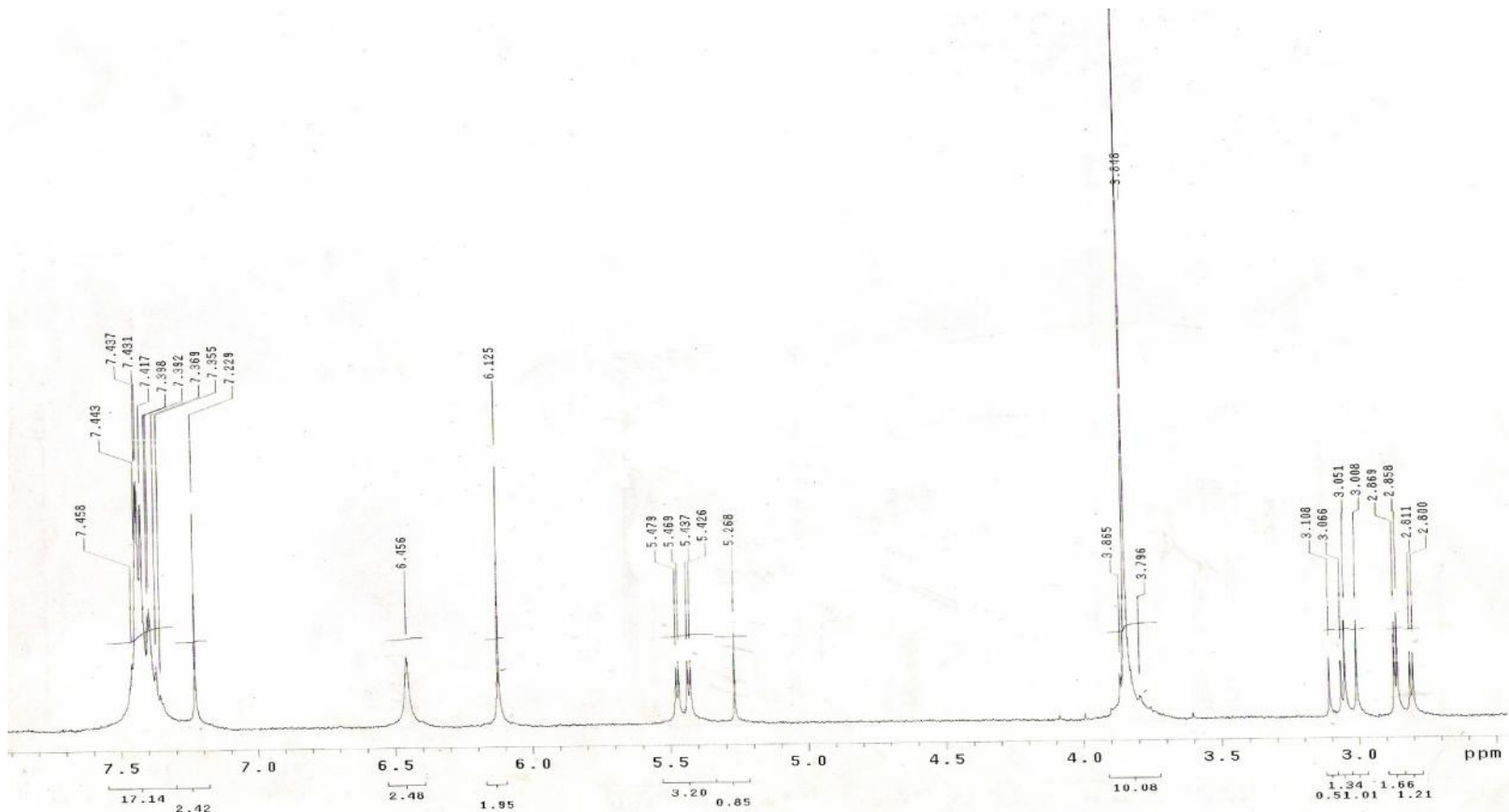


Fig. 3.17 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone.

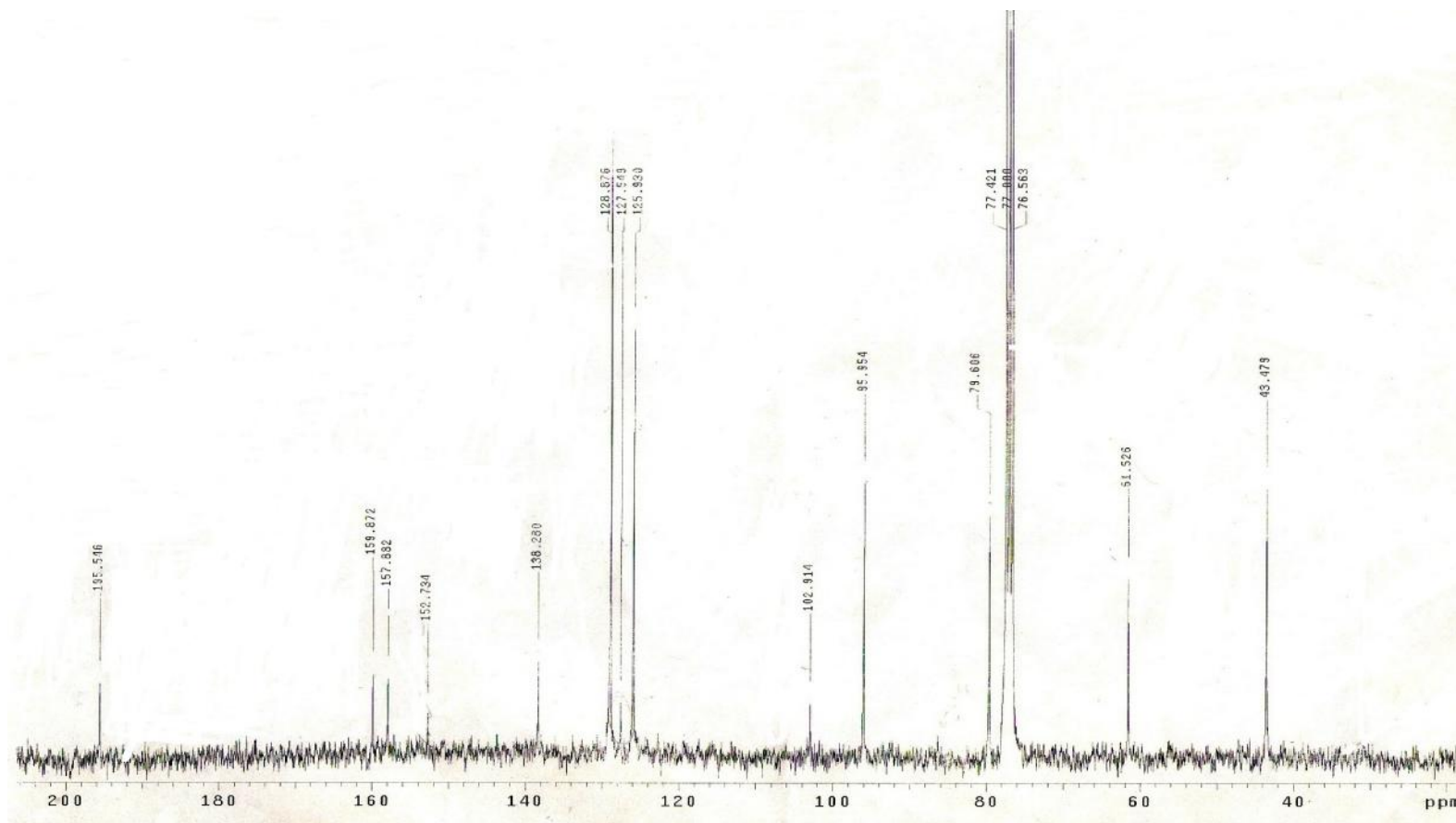
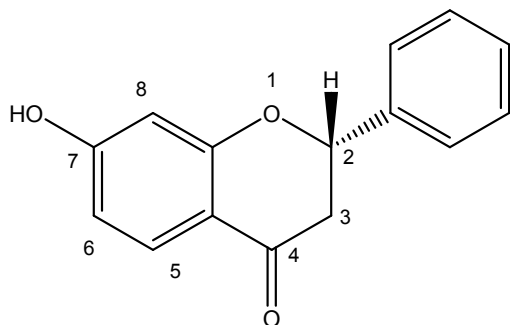


Fig. 3.18 ^{13}C -NMR spettro del 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone.

3.5.9 7-hydroxyflavanone



Il campione si presenta come solido bianco.

$\alpha = -90$ in CHCl_3

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): $\delta = 7.81$ (1H, d, $J = 8.7$, H-5), 7.42- 7.34 (5 H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 6.52 (1 H, dd, $J = 8.7$, $j = 2.4$, H-6), 6.44 (1H, dd, $J = 2.4$, H-8), 5.42 (1H, dd, $J = 12.9$, $j = 3$, H-2), 3.03 (1H, dd, $J = 16.8$, $j = 13.2$, H-3), 2.80 (1 H, dd, $J = 16.8$, $j = 3$, H-3).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): $\delta = 190.951$ (CO), 163.583 (C-9), 162.940 (C-7), 138.660 (C-1'), 129.417 (C-5), 128.828 (C-4'), 128.776 (C-3', 5'), 126.141 (C-2', 6'), 114.992 (C-10), 110.664 (C-6), 103.434 (C-8), 79.884 (C-2), 44.286 (C-3).

Riferimenti bibliografici:

Hitoshi K et al. (2005). Preparative monohydroxyflavanone syntheses and a protocol for gas chromatography-mass spectrometry analysis of monohydroxyflavanones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, pg: 547 – 554.

Hsin-Kaw H et al. (1998). Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. *Pharmaceutical Research*, 15, pg: 39 – 46.

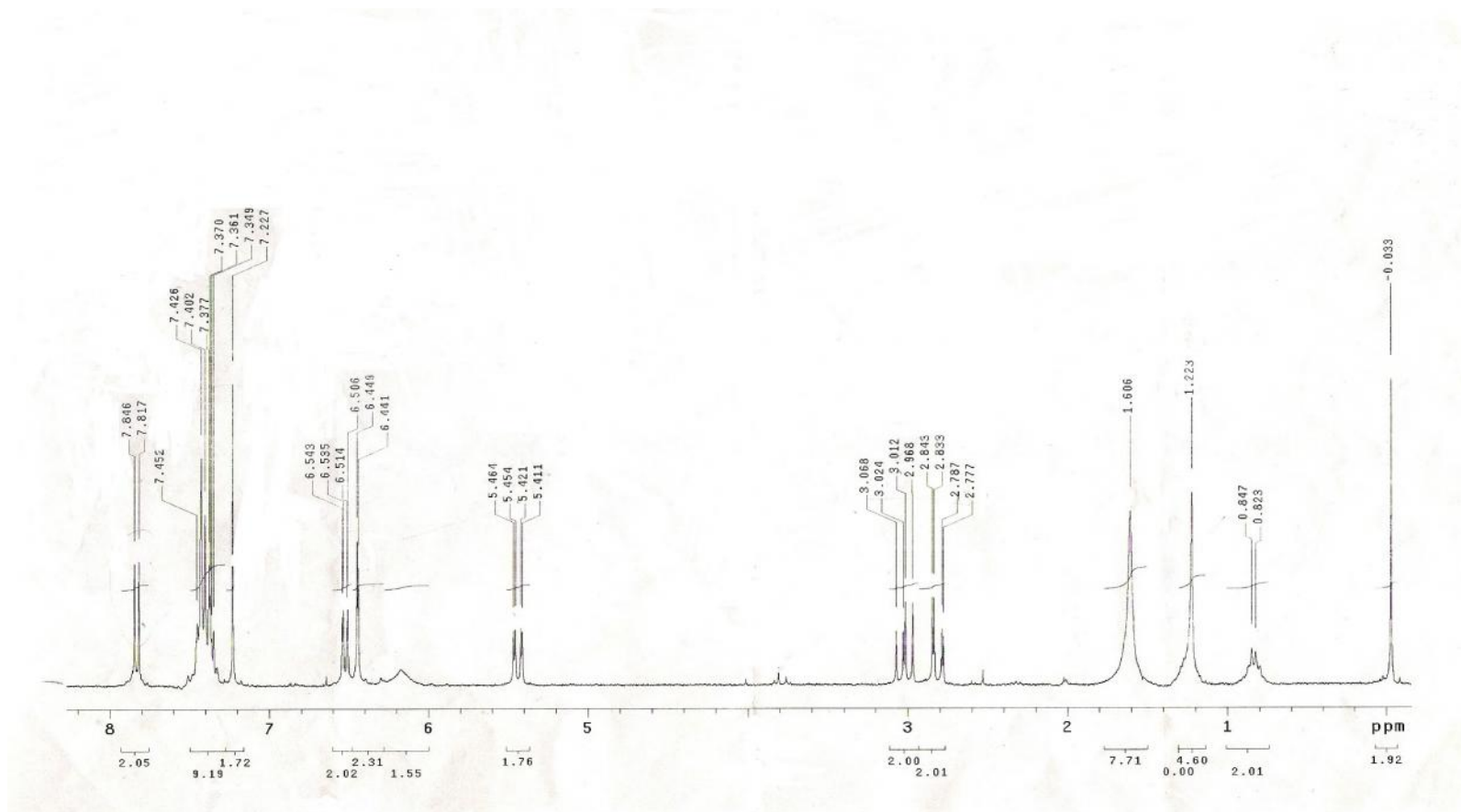


Fig. 3.19 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 7-idrossiflavanone.

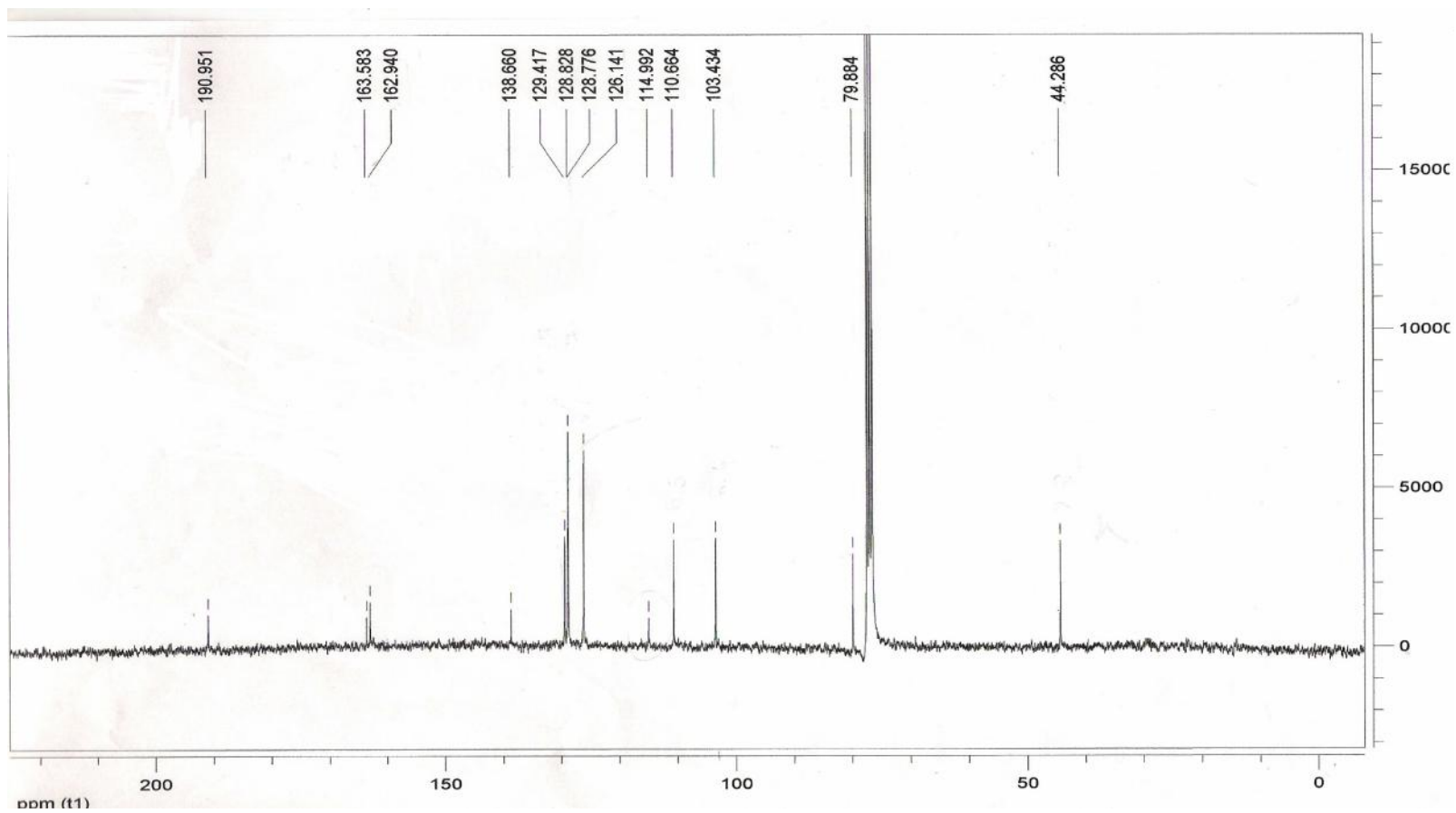
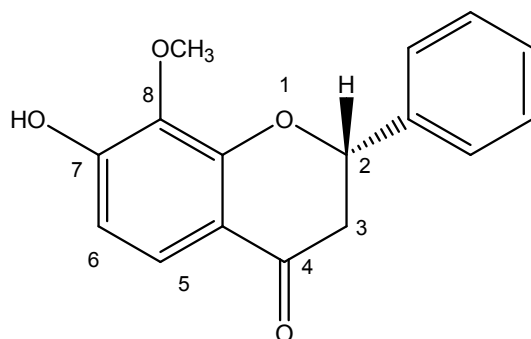


Fig. 3.20 ^{13}C -NMR spettro del 7-hydroxyflavanone.

3.5.10 7-hydroxy-8-methoxyflavanone



il campione si presenta come cristalli aghiformi gialli.

$\alpha = -98$ in MeOH

^1H NMR (300 MHz, MeOD, δ , ppm, J/Hz): $\delta = 7.61$ (1H, d, $J = 8.7$, H-5), 7.47- 7.36 (5 H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 6.52 (1 H, d, $J = 8.7$, H-6), 5.47 (1H, dd, $J = 12.9$, $j = 3.3$, H-2), 3.99 (3H, s, OCH₃), 3.03 (1H, dd, $J = 16.8$, $j = 12.9$, H-3), 2.85 (1 H, dd, $J = 16.8$, $j = 3.3$, H-3).

^{13}C NMR (300 MHz, MeOD, δ , ppm): $\delta = 190.322$ (CO), 155.182 (C-7), 154.408 (C-9), 138.653 (C-1'), 134.323 (C-8), 128.763 (C-3', 5'), 128.651 (C-4'), 125.861 (C-2', 6'), 115.639 (C-10), 109.372 (C-6), 80.243 (C-2), 61.249 (OCH₃), 44.399 (C-3).

Riferimenti bibliografici:

Ramadan M.A et al. (2000). Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs. *Phytochemistry*, 54, pg: 891-896.

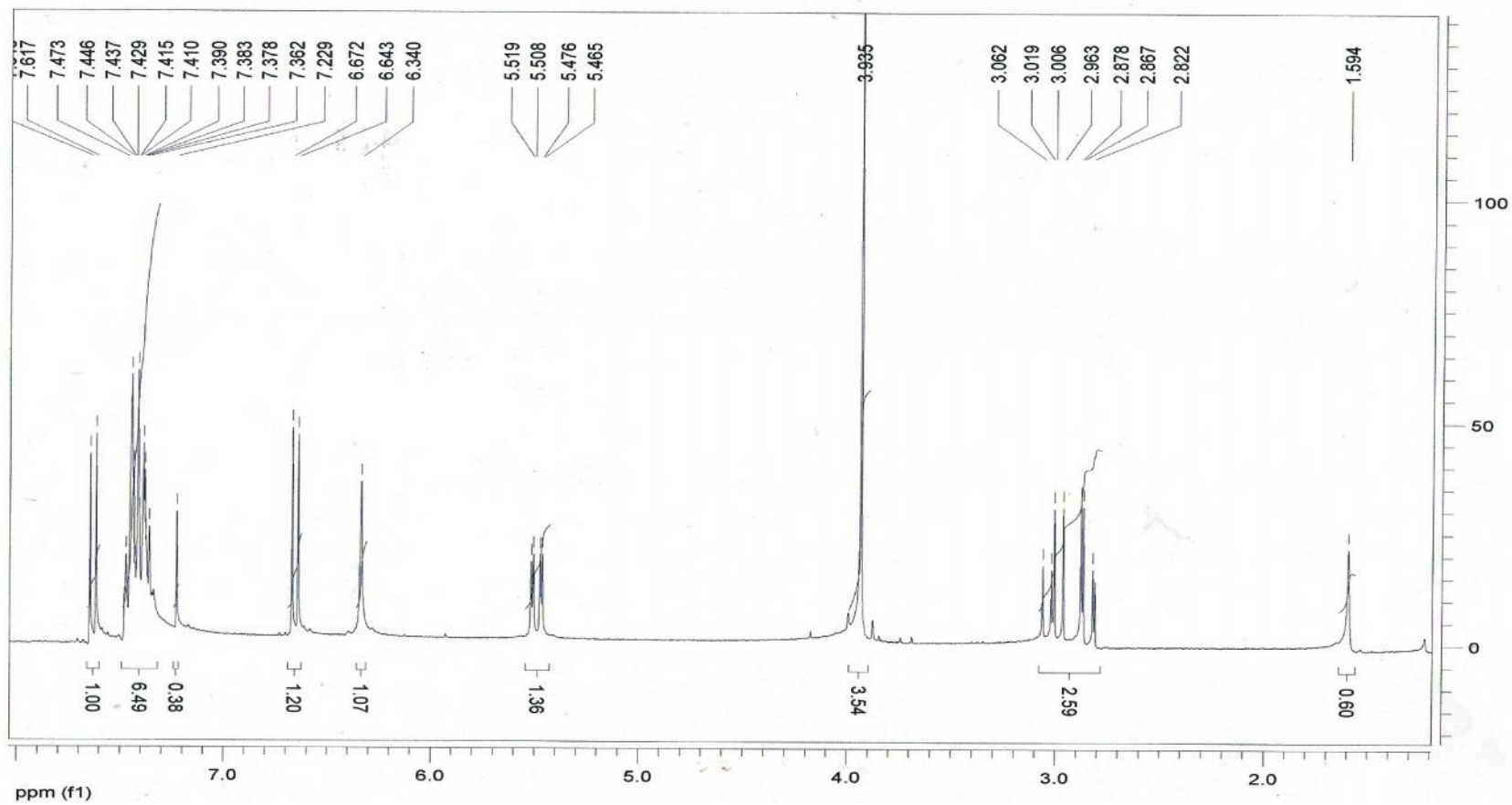


Fig. 3.21 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 7-hydroxy-8-methoxyflavanone.

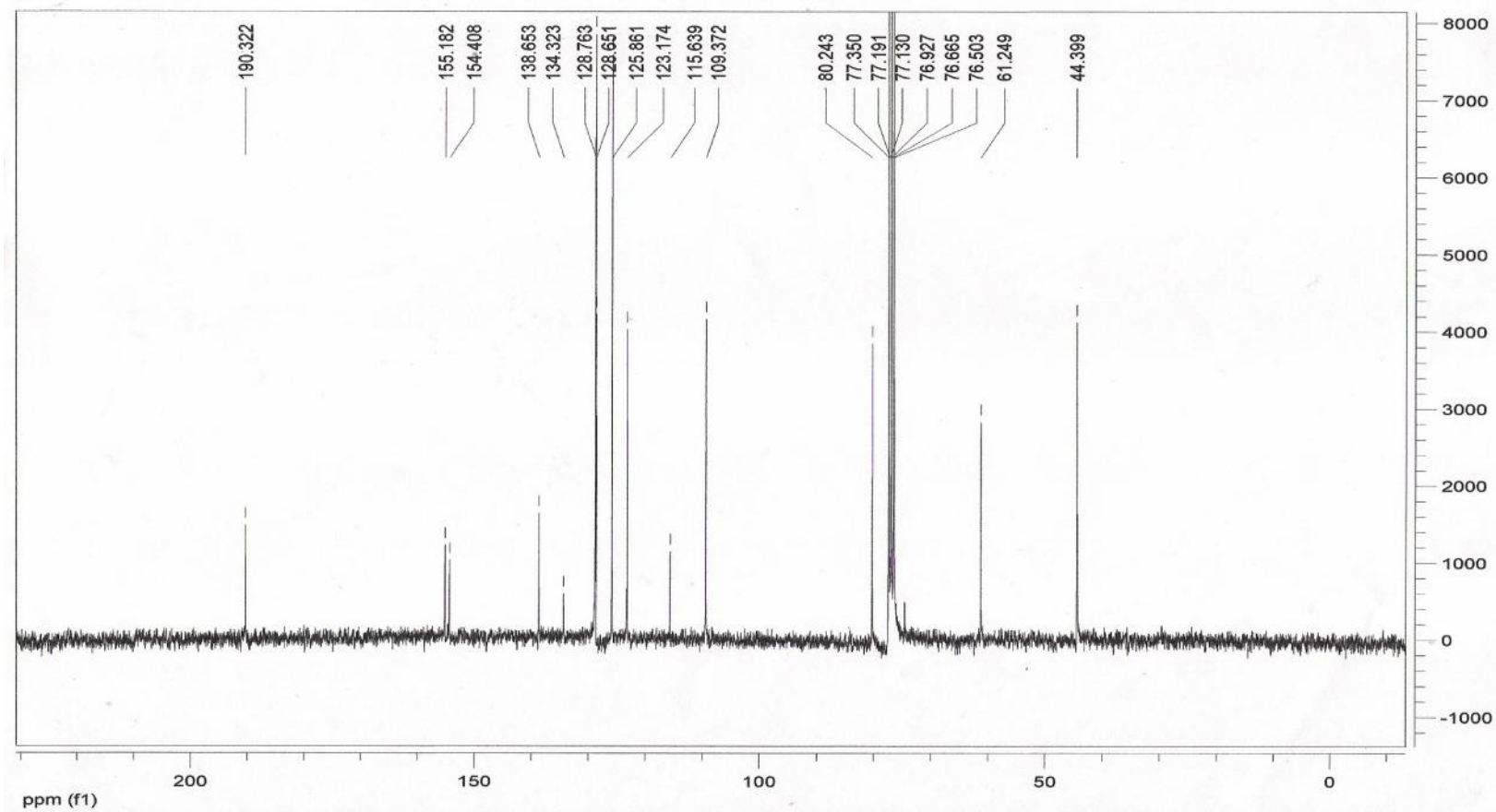
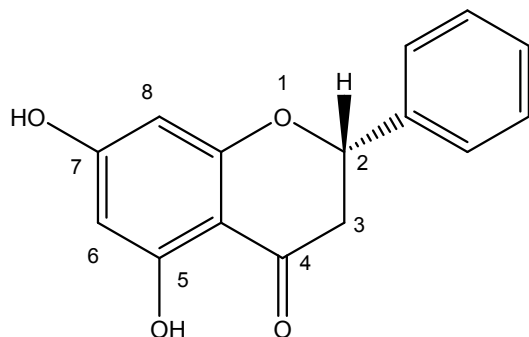


Fig. 3.22 ^{13}C -NMR spettro del 7-hydroxy-8-methoxyflavanone.

3.5.11 5,7-Dihydroxyflavanone



il campione si presenta come cristalli aghiformi gialli.

$\alpha = -49.09$ in MeOH

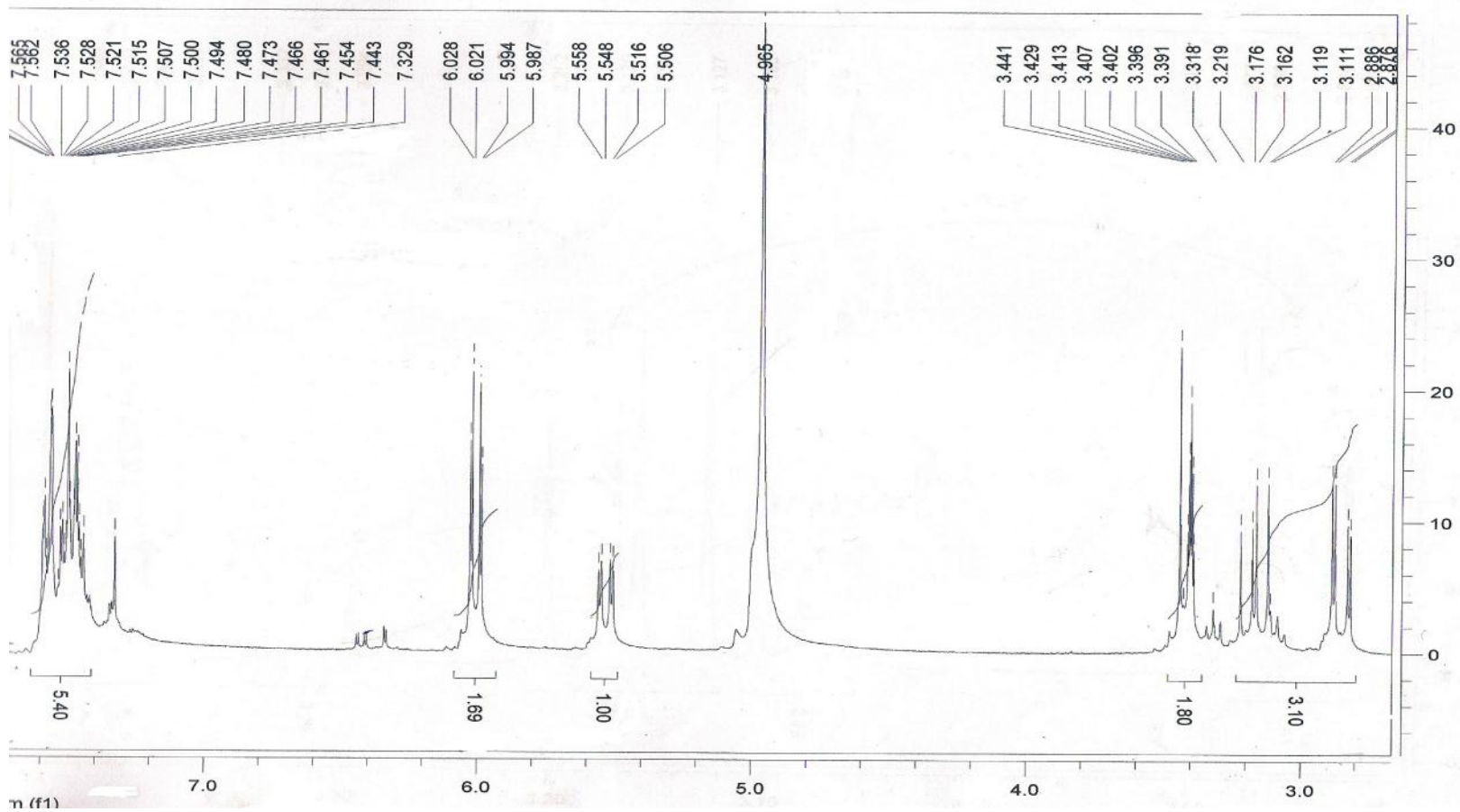
^1H NMR (300 MHz, MeOD, δ , ppm, J/Hz): $\delta = 7.56-7.32$ (5 H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 6.02 (1 H, d, $J = 2.1$, H-8), 5.98 (1 H, d, $J = 2.1$, H-6), 5.52 (1H, dd, $J = 12.6$, $j = 3$, H-2), 3.17 (1H, dd, $J = 17.1$, $j = 12.9$, H-3), 2.85 (1 H, dd, $J = 12.9$, $j = 2.4$, H-3).

^{13}C NMR (300 MHz, MeOD, δ , ppm): $\delta = 197.239$ (CO), 168.409 (C-7), 165.432 (C-5), 164.610 (C-9), 140.366 (C-1'), 129.667 (C-3', 5'), 129.421 (C-4'), 127.308 (C-2', 6'), 103.633 (C-10), 97.171 (C-8), 96.223 (C-6), 80.413 (C-2), 44.173 (C-3).

Riferimenti bibliografici:

Amy Yap Li Ching et al. (2007). Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.) *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 11, pg: 154-159.

Hanawa F. et al (2001). Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry*, 57, pg: 223-228.

Fig. 3.23 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 5,7-dihydroxyflavanone.

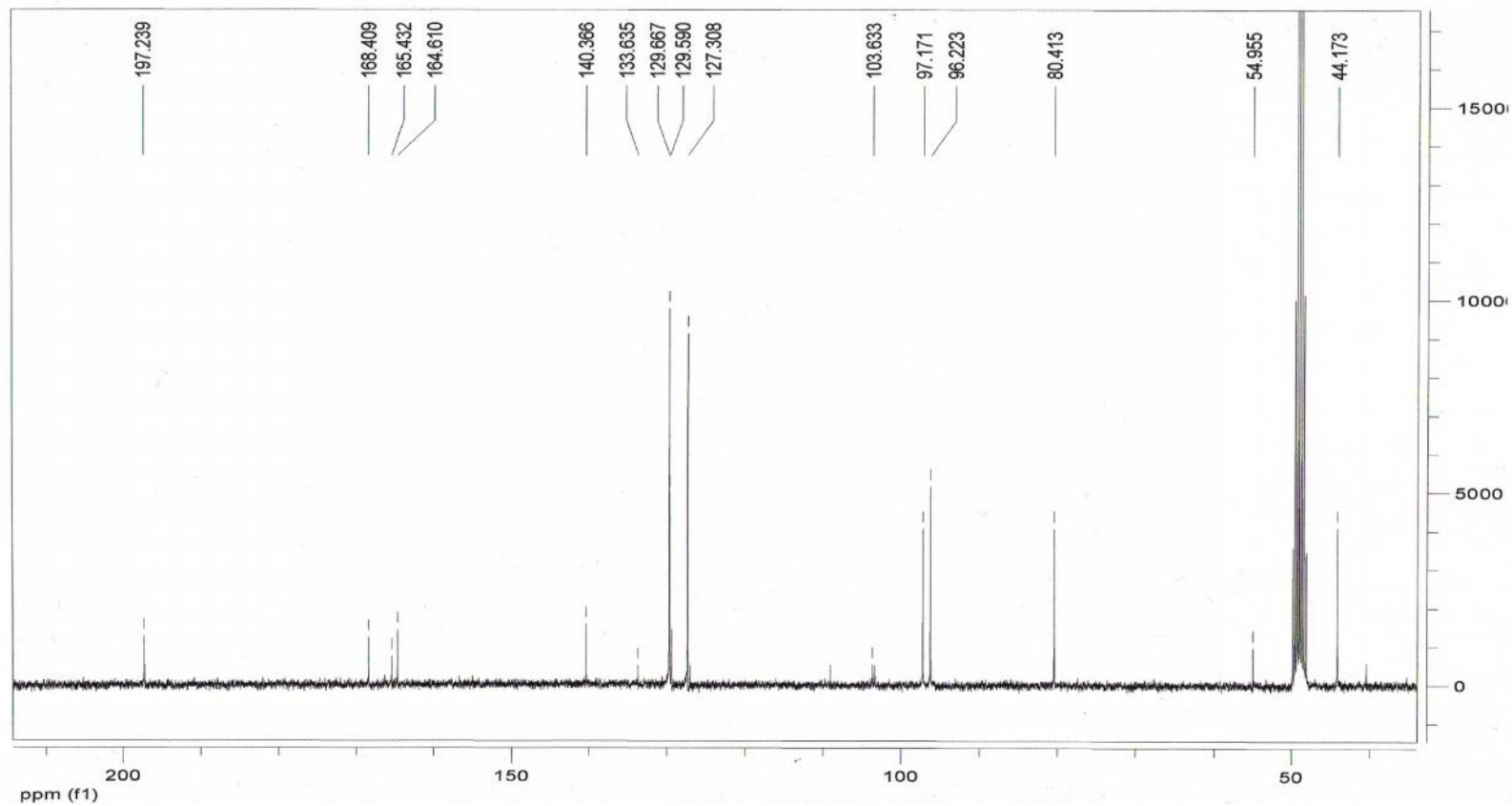
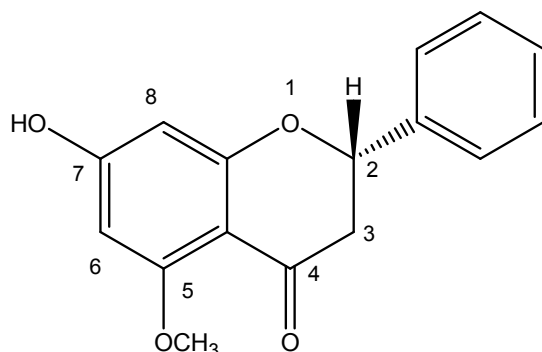


Fig. 3.24 ^{13}C -NMR spettro del 5,7-dihydroxyflavanone.

3.5.12 5-methoxy-7-hydroxyflavanone



Il composto si presenta come cristalli gialli.

$\alpha = -52$ in CHCl_3

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): $\delta = 11.859$ (OH), 7.43- 7.36 (5 H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 6.53 (1 H, s, H-8), 6.123 (1 H, s, H-6), 5.46 (1H, dd, J= 12.9, j= 3.3, H-2), 3.06 (1H, dd, J=17.4, j=12.9, H-3), 2.85 (1 H, dd, J= 12.9, j= 3.3, H-3).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): $\delta = 197.239$ (CO), 168.409 (C-7), 165.432 (C-5), 164.610 (C-9), 140.366 (C-1'), 129.667 (C-3', 5'), 129.421 (C-4'), 127.308 (C-2', 6'), 103.633 (C-10), 97.171 (C-8), 96.223 (C-6), 80.413 (C-2), 44.173 (C-3).

Riferimenti bibliografici:

Lee, Sunhee et al. (2009). Relationships between the structures of flavanone derivatives and their effects in enhancing Early growth response-1 gene expression. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, pp. 2116 – 2120.

Cao, Cong-Mei et al (2010). Two New Flavan-Flavanones from *Sarcandra hainanensis*; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 10, pp. 1395 – 1398.

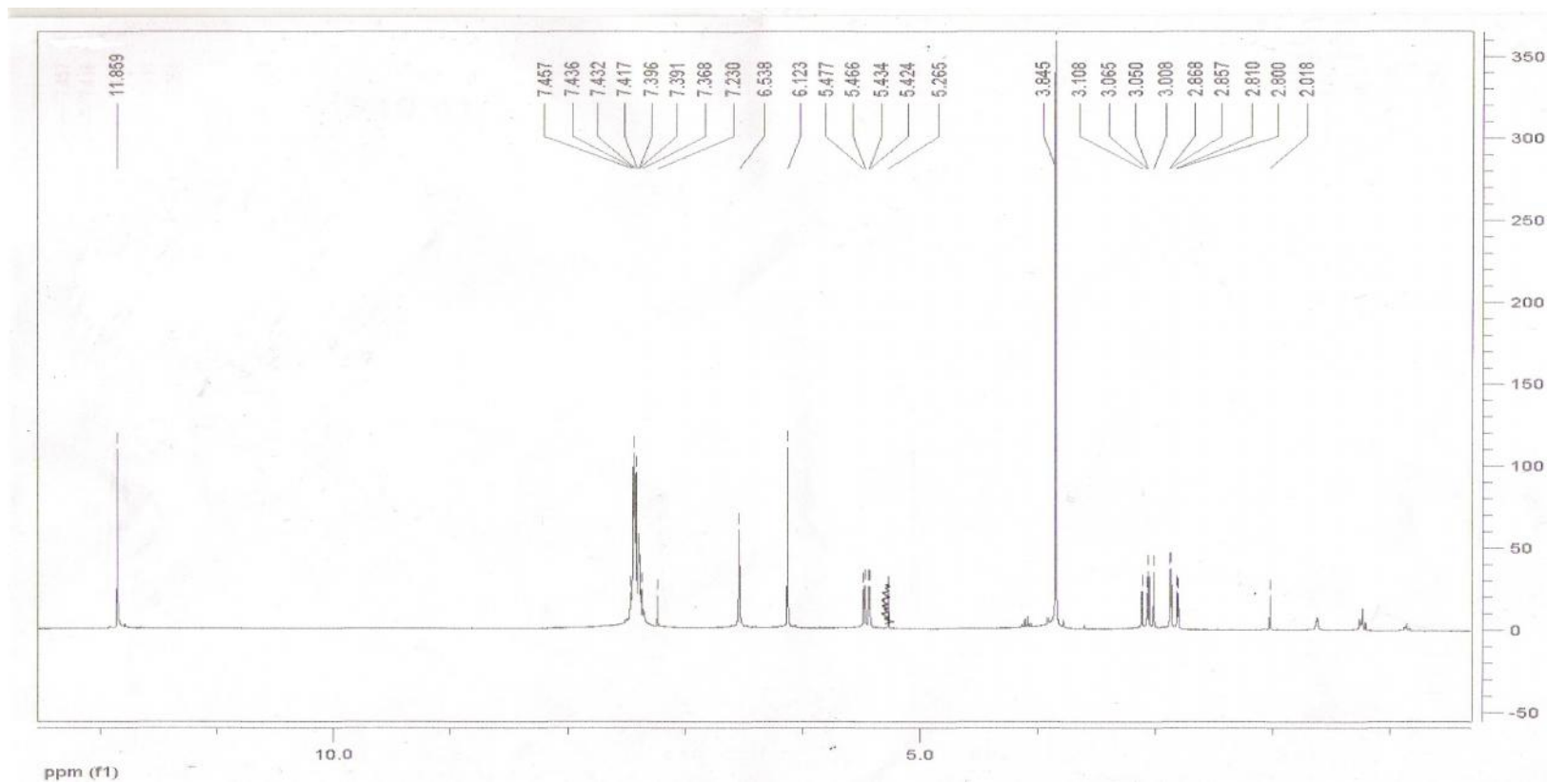
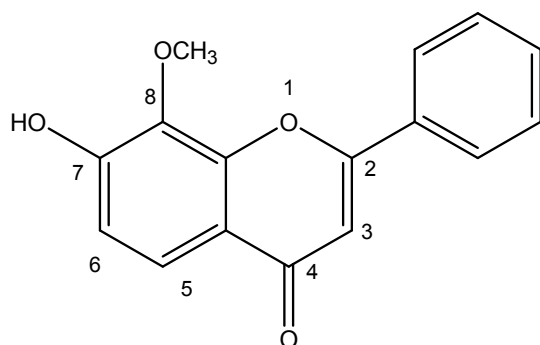


Fig. 3.25 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 5-methoxy-7-hydroxyflavanone

3.5.13 7-hidroxy-8-methoxyflavone



Il campione si presenta come solido bianco.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 7.90 (2H, dd, J = 2.1, j = 1.2, H-2',6'), 7.88 (1H, d, J = 8-7, H-5), 7.53 (2H, d, J = 2.1, H-3',5'), 7.51 (1H, dd, J = 1.2, H-4'), 7.03 (1H, d, J = 8.7, H-6), 6.75 (1H, s, H-3), 4.12 (3H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 177.755 (CO), 162.654 (C-2), 153.341 (C-9), 149.906 (C-7), 134.263 (C-8), 131.811 (C-1'), 131.575 (C-4'), 129.166 (C-3', 5'), 126.106 (C-2', 6'), 121.535 (C-5), 118.417 (C-10), 113.703 (C-6), 107.401 (C-3), 62.04 (OCH_3).

Riferimenti bibliografici:

Wimal H. et al (2009). Microbial metabolism. Part 10: Metabolites of 7,8 dimethoxyflavone and 5-methoxyflavone. Natural Product Research, 23, pg: 1231 – 1239.

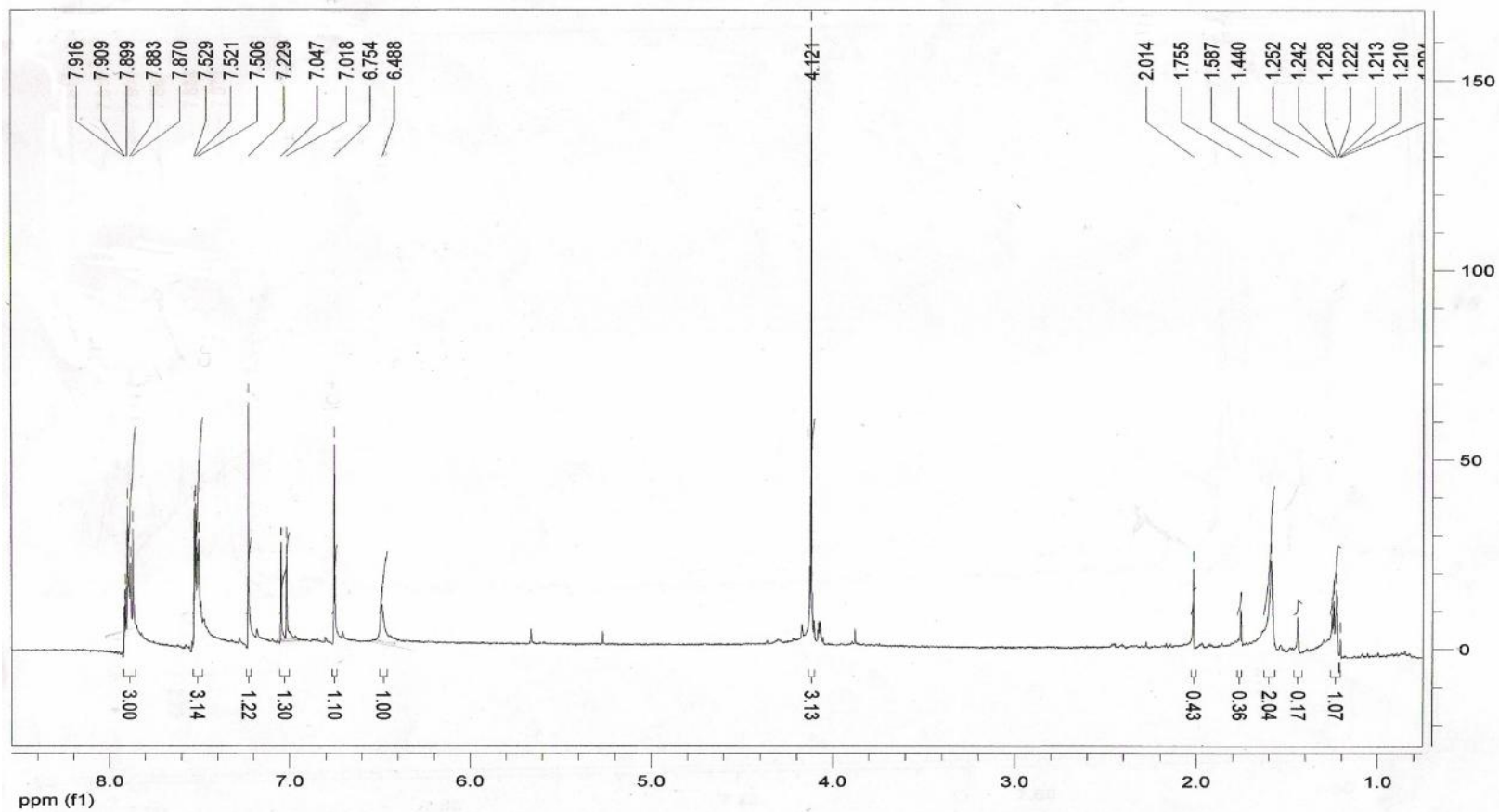


Fig. 3.26 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 7-idroxy-8-metossiflavone.

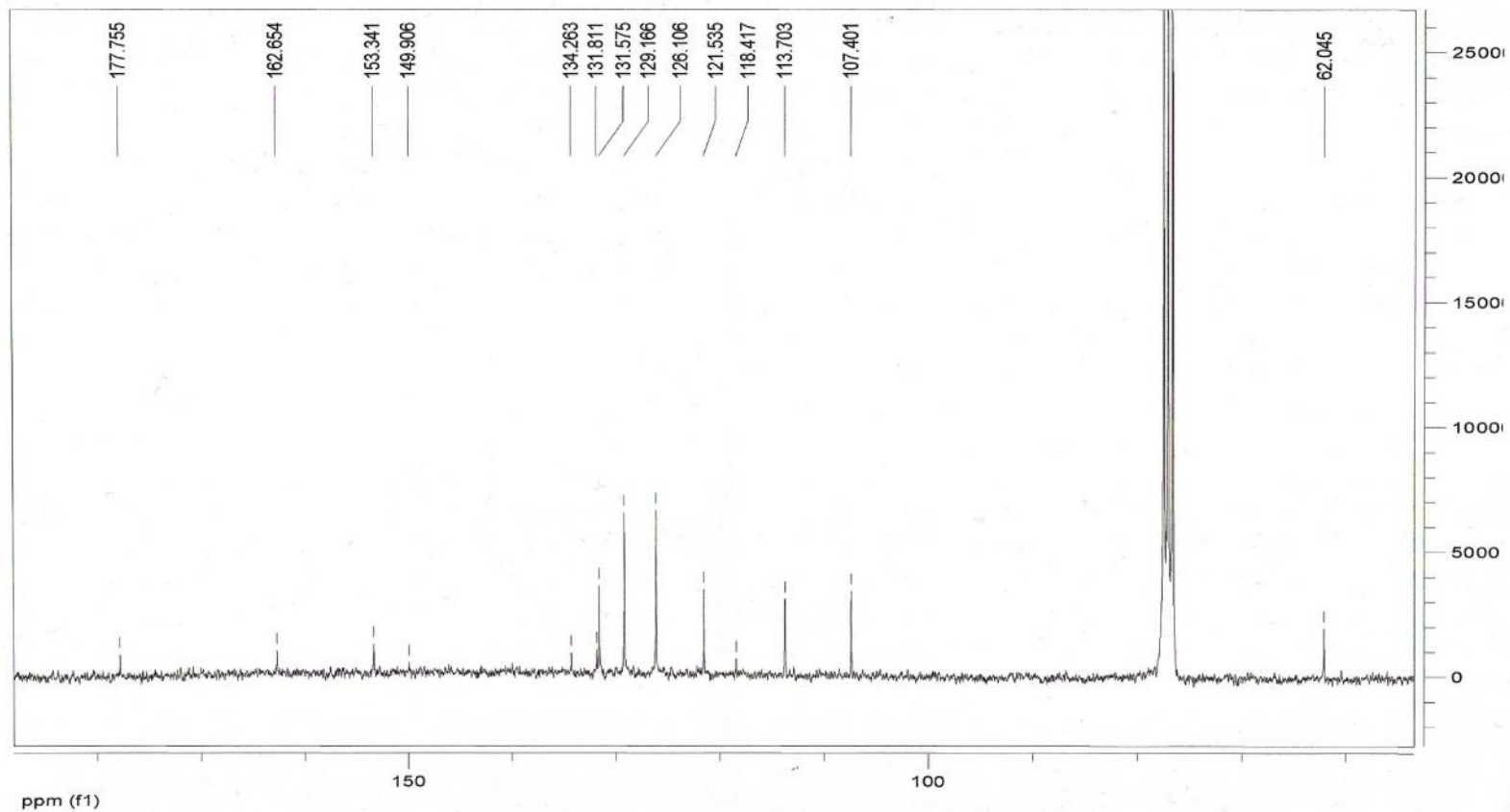
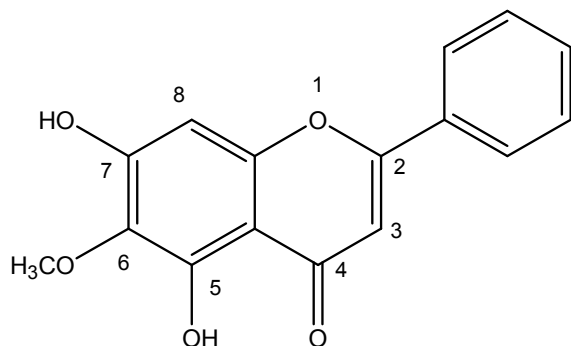


Fig. 3.27 ¹³C-NMR spettro del 7-idroxy-8-metossiflavone

3.5.14 5,7 dihydroxy-6- methoxyflavone

Il campione si presenta come cristalli gialli.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 12.46 (1H, s, OH), 7.89 (1H, d, J= 1.5, H-6'), 7.88 (1H, d, J= 1.2, H-2'), 7.53 (2H, m, H-3',5'), 7.51 (1H, m, H-4'), 6.65 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, s, H-8), 4.01 (3H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 182.323 (CO), 163.400 (C-2), 157.677 (C-9), 155.271 (C-5), 155.150 (C-7). 131.888 (C-4'), 131.143 (C-1'), 129.166 (C-3', 5'), 126.100 (C-2', 6'), 127 (C-6), 105.808 (C-10), 98.743 (C-8), 61.957 (OCH_3).

Riferimenti bibliografici:

Marques M.R et al. (2010). Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. *Fitoterapia*, 81, pg: 552 – 556.

Janaswamy Madusudana et al. (2007). Natural agent for treatment of gastrointestinal toxicity, associated symptoms and ulcers. *Patent: US2007/213281 A1*.

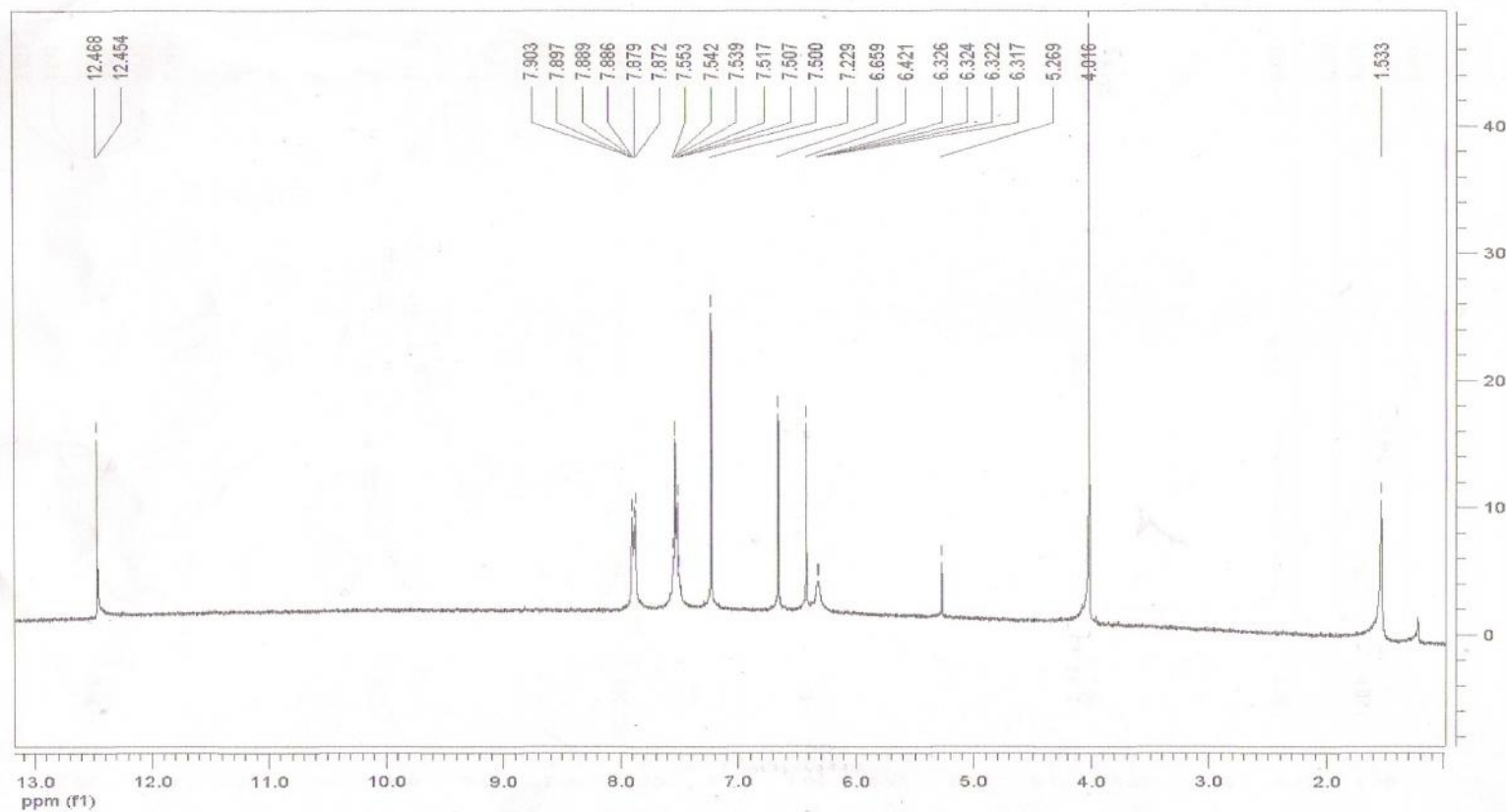


Fig. 3.28 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 5,7-idroxy-8-metossiflavone.

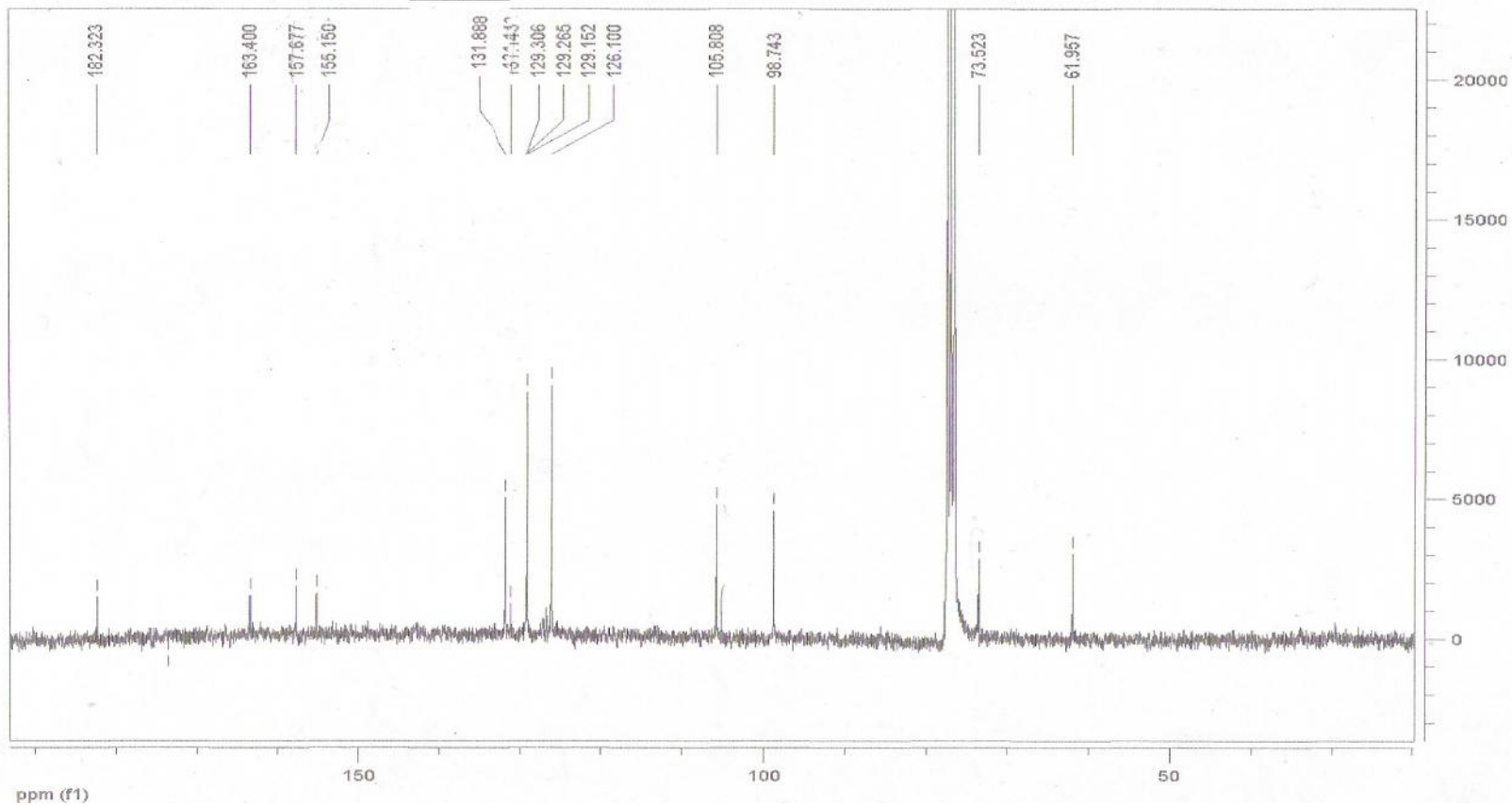
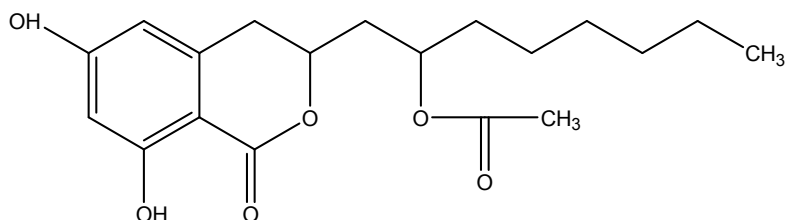


Fig. 3.29 ^{13}C -NMR spettro del 5,7-hidroxy-8-metossyflavone.

3.6 Delucidazione delle strutture nuove isolate dall' *Ononis natrix*.

La struttura dei composti è stata determinata principalmente attraverso lo studio degli spettri NMR monodimensionali al protone ^1H NMR ed al carbonio ^{13}C NMR e bidimensionali (HSQC, HMQC, COSY, Roesy) e di massa esatta (ESI).

3.6.1 Composto 15



Il composto 15 è stato isolato come un gomma gialla

Lo spettro al ^{13}C NMR mette in evidenza la presenza di 19 Carboni (Figura 3.30) di cui il segnale di un chetone legato ad un ossigeno (δ 162,7), 6 segnali dovuti ad un anello aromatico di cui 4 quaternari e due metini (δ 164,33; 162,7 segnali dovuti ad una sostituzione idrossilica C-6/C-8); (δ 141,7; 101,80 quaternari e δ 106,57; 101,89 metini), un segnale relativo ad un metilene benzilico (δ 34,6 C-4), un acetoxyl (δ 169,94 e 22,7) e diversi segnali di una catena lineare con un gruppo metilico terminale (δ 14,08).

I segnali risultano abbastanza tipici di una diidroisocumarina (Barrero 1994; San Feliciano 1983).

Osservando lo spettro ^1H NMR (Figura 3.31) del composto 15 si nota la presenza di gruppi idrossilici aromatici (δ 11,42), di protoni aromatici (δ 6,25 H-5 e δ 6,36 H-7), 2 protoni metilenici (δ 2,8 H-4), un CH (δ 4.54 m, H-4a) e 12 protoni di una lunga catena alifatica.

Gli esperimenti HSQC del composto 15 hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone (Figura 3.32).

Lo spettro DQF-COSY (Double Quantum Correlation Spectroscopy) mostra i protoni vicinali e geminali correlati via l'accoppiamento scalare (Figura 3.33). Precisamente

(vedasi anche l'espanso in figura 3.34) si osserva l'accoppiamento tra i protoni a δ 2,8 (H-4) ed il protone a δ 4.54 (H-4a) che a sua volta accoppia con i 2 protoni a δ 1.7-1.9 (H-1') che a loro volta accoppiano con δ 1.5 (H-3'); accoppiamento tra δ 3.5 (H-2') e δ 1.5 (H-3').

Tale spettro ha mostrato inoltre un sistema di spin tra il segnale a δ_H 6.25 (H-5) con δ_H 6.36 (H-7, $J= 0.8$) e δ 2,8 (H-4). In figura 3.35 vengono riassunte le correlazioni sopracitate.

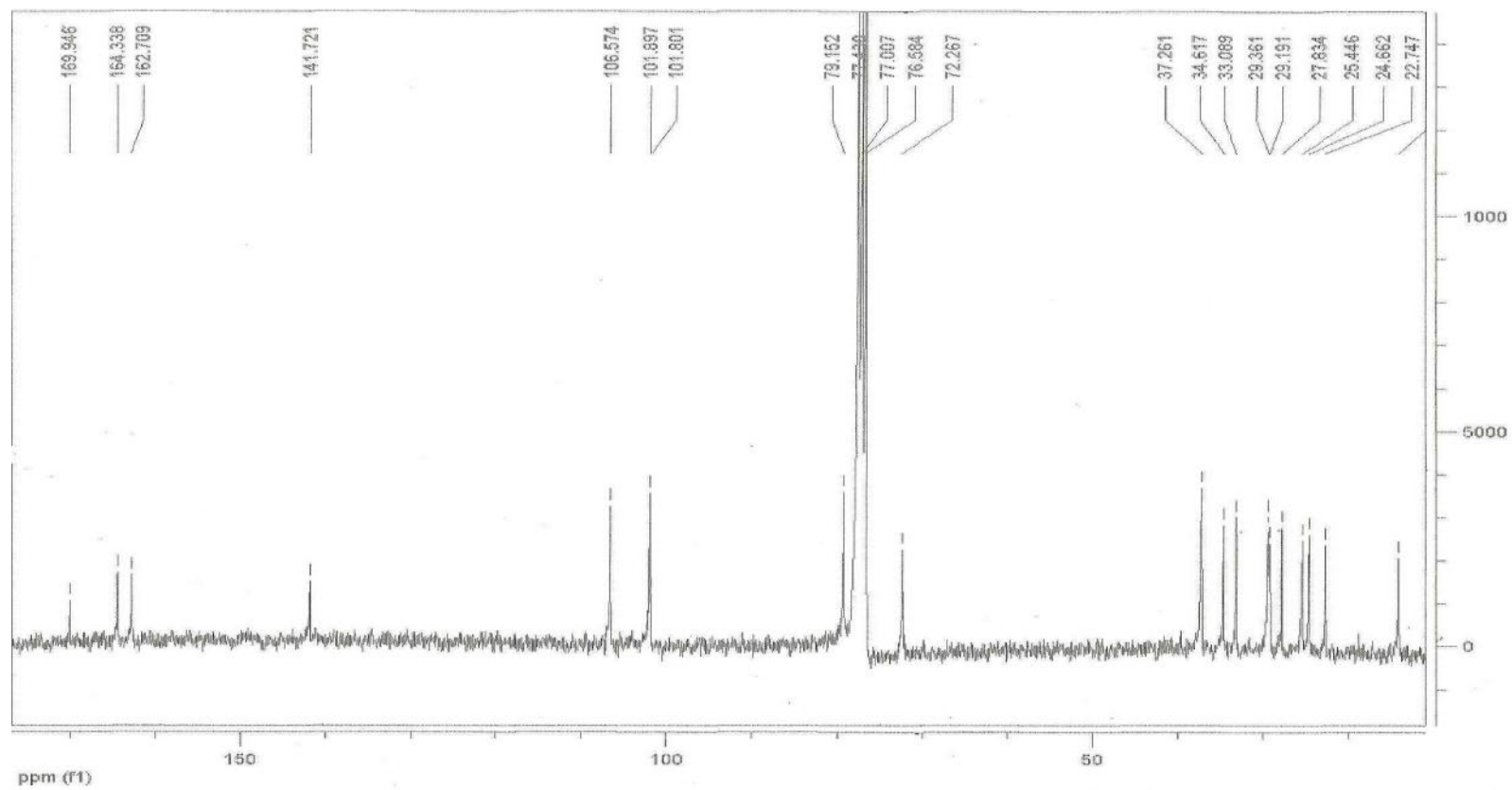


Fig. 3.30 Spettro al ¹³C-NMR del composto 15

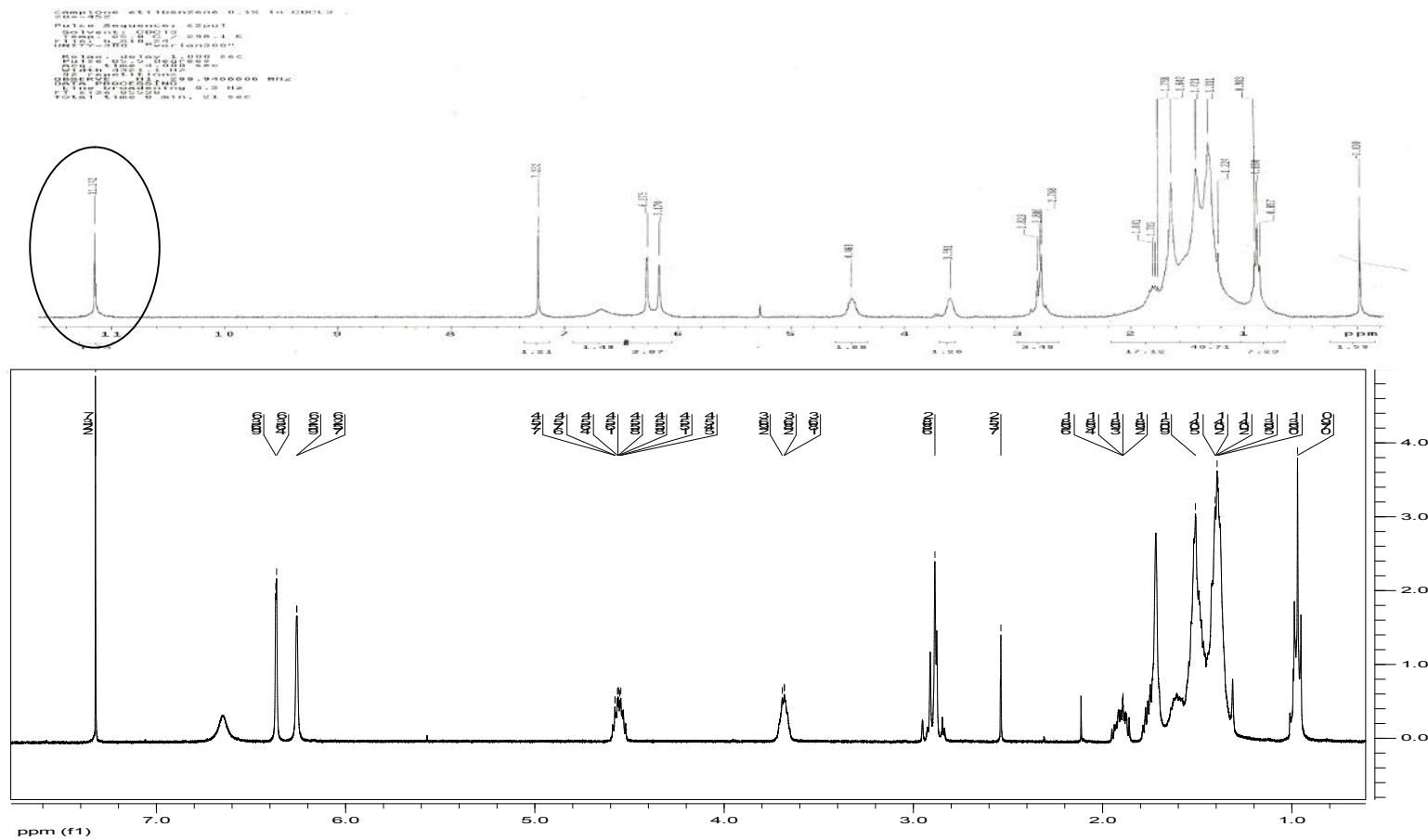


Fig. 3.31 Spettro al $^1\text{H-NMR}$ del composto 15

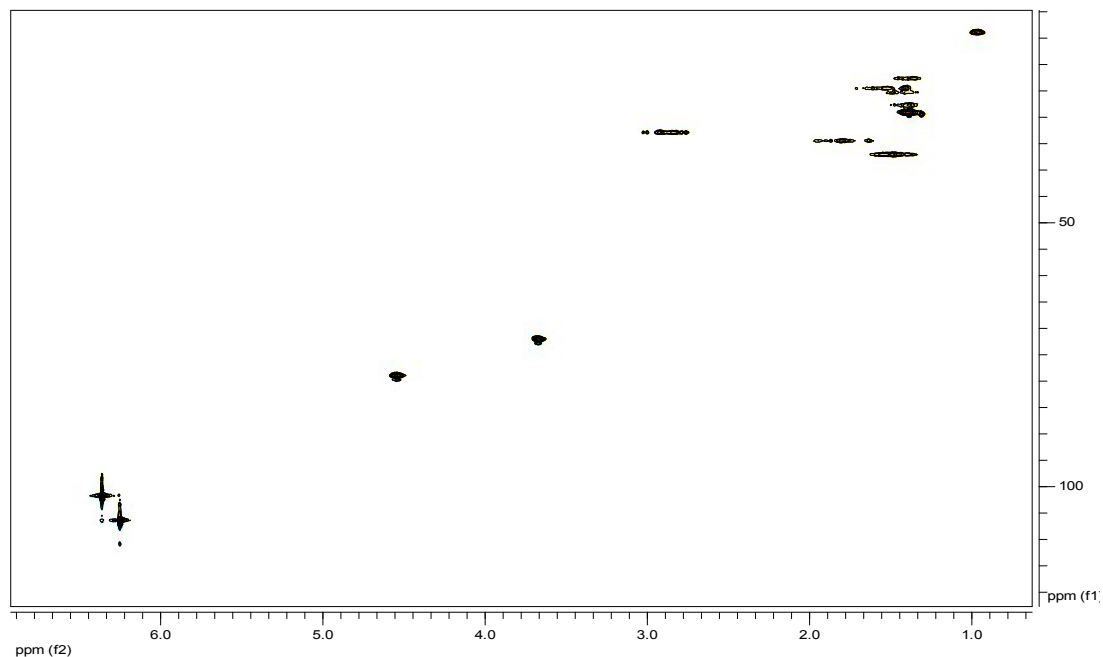


Figura.3.32 HSQC del composto 15

Di seguito vengono riportati i valori al ^{13}C NMR ed al ^1H NMR ipotizzati per la nostra struttura:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 11.142 (2 H, s, OH-6,8), 6.36 (1 H, d, J= 0.8, H-7), 6.25 (1 H, d, J= 0.8, H-5), 4.56 (1 H,m, H-3), 3.68 (1 H,m, H-2'), 2.88 (2 H, m, H-4), 1.9-1.4 (15 H, H-1',3',4',5',6',7',3''), 0.903 (3 H, m, H-8').

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 169.946 (COO) 164.338 (CO), 164.338(C-6), 162.709 (C-8), 141.721 (C-4a), 106.574 (C-5), 101.897 (C-7), 101.801 (C-8a), 79.152 (C-3), 72.267 (C-2'), 37.261 (C-3'), 34.617 (C-1'), 33.089 (C-4), 29.361, 27.834, 25.446, 24,662 (C-4'-7'), 22,747 (C-3''), 14.085 (C-8').

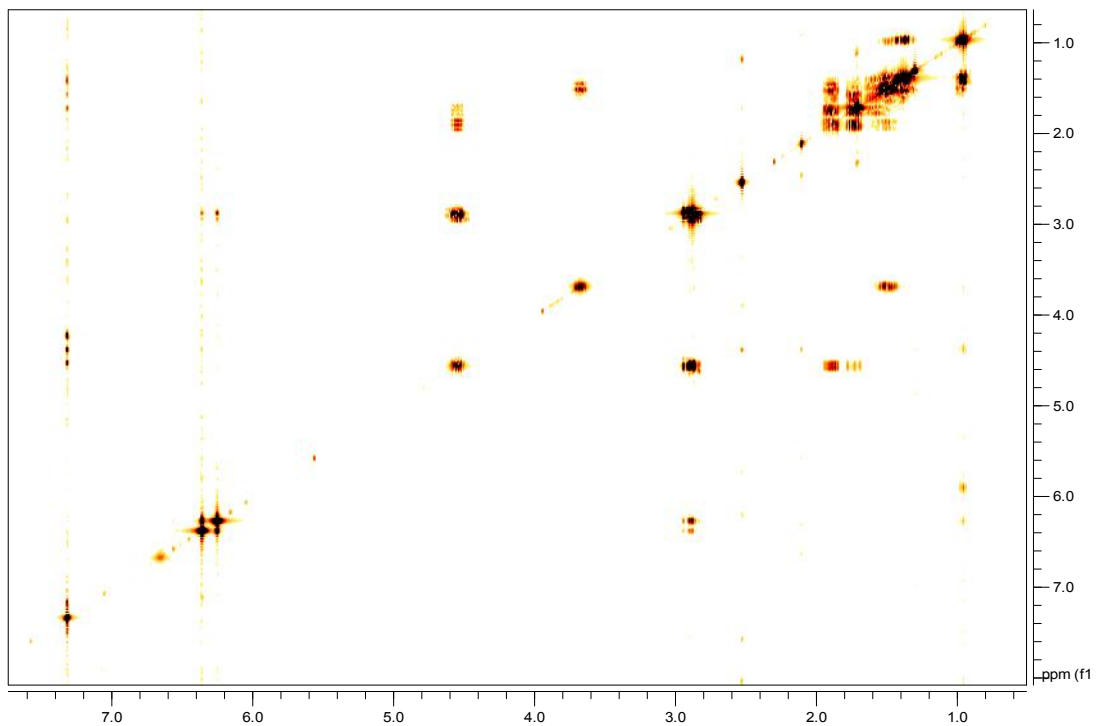


Figura 3.33 Spettro COSY del composto 15

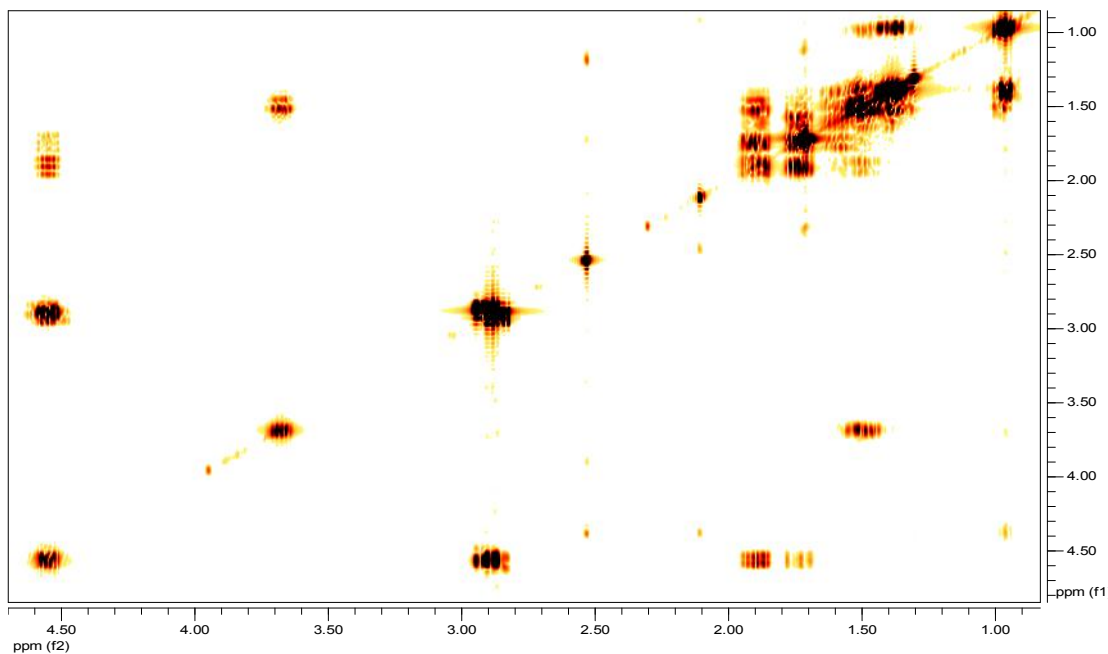


Figura 3.34 Espanso dello spettro COSY del composto 15

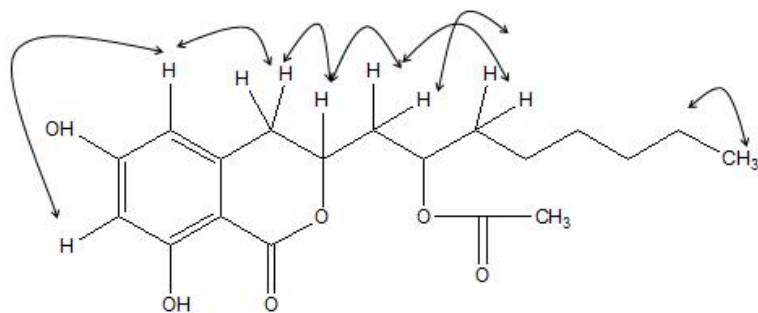


Figura 3.35 Maggiori correlazioni COSY evidenziate

Lo spettro HMBC (figura 3.36) ha permesso di evidenziare una serie di cross peak di correlazione tra le varie parti della molecola (alcune delle quali sono evidenziabili in Figura 3.37) che ci hanno permesso di sistemare il raggruppamento acetilico in posizione 2' della catena. Infatti i protoni metinici (H-4 a δ 2,8) mostrano cross-peak con il carbonio in posizione C-3 (79.151), in C-8a (101.801), in C-5 (106.574) e in C-4a (141.721).

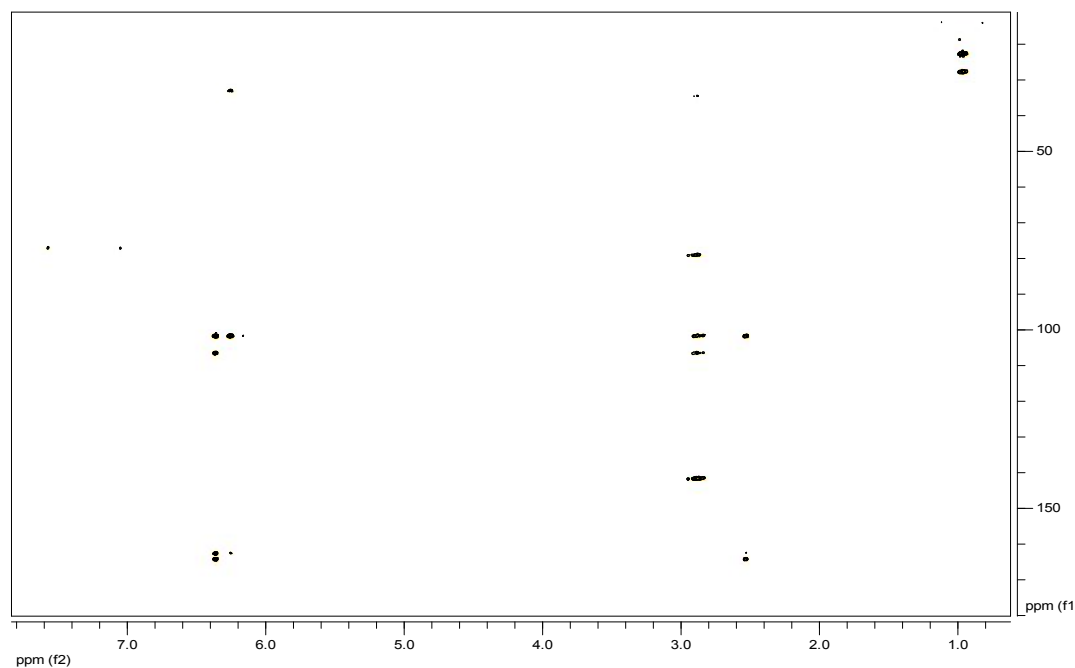


Figura 3.36 Spettro HMQC del composto 15

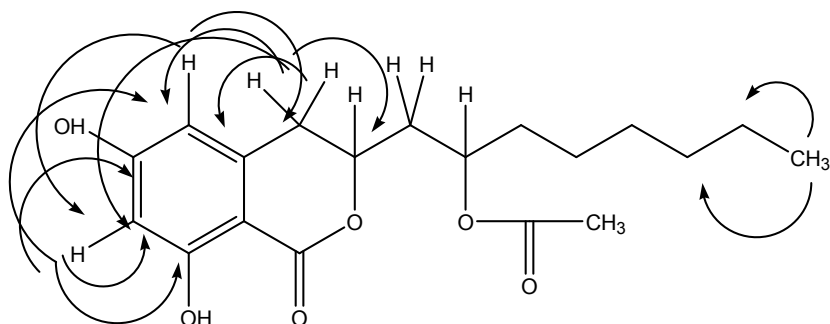


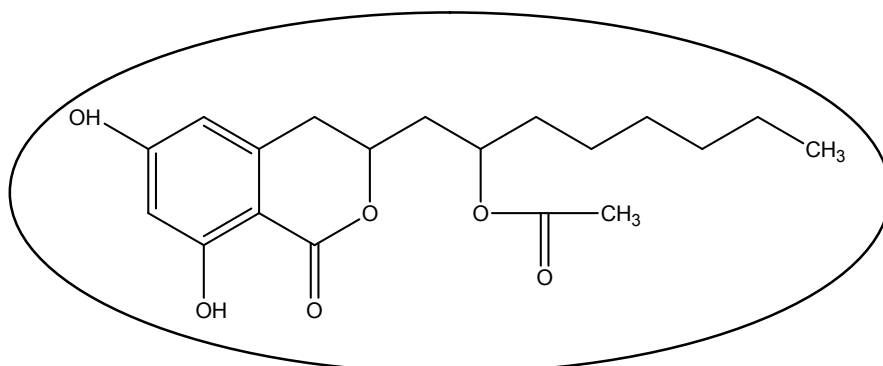
Fig. 3.37 Maggiori correlazioni HMBC evidenziate.

Il composto 15 mostra due centri chirali in posizione 3 e in posizione 2'. Il valore di α da noi calcolato risulta essere -22.6. L'assegnamento di configurazione assoluta R al C-3 è basata su un valore negativo di α , mentre l'assegnamento della configurazione R al carbonio 2' è data per confronto con il composto 16 e i dati in bibliografia. Infatti una configurazione S abbasserebbe il valore dell' α (come nel caso del composto 16 $\alpha = 9.8$). Coerentemente con i dati in bibliografia sulle dihydroisocumarine assegniamo la configurazione 3R-2'R (Barrero et al. 1994, 1991 e San Feliciano et al.1983).

La molecola da noi ipotizzata presenta una formula bruta di $C_{19}H_{26}O_6$ compatibile con una massa teorica di 350.

Grazie alla collaborazione con il Dr. Pierluigi Caboni del Dipartimento di Tossicologia della Facoltà di Farmacia è stato possibile effettuare il calcolo della massa (Figura 3.38) del nostro campione evidenziando un valore di 349 (M-H) che ne conferma la struttura.

Il composto risulta essere il **1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate**, nuovo composto naturale.



MS Data Review All Plots - 16/01/2012 12.01

File: g:\senk2012\130112\m15 16112 neg.xms

Sample: acn

Scan Range: 1 - 87 Time Range: 0.01 - 1.33 min.

Operator: max

Date: 16/01/2012 11.34

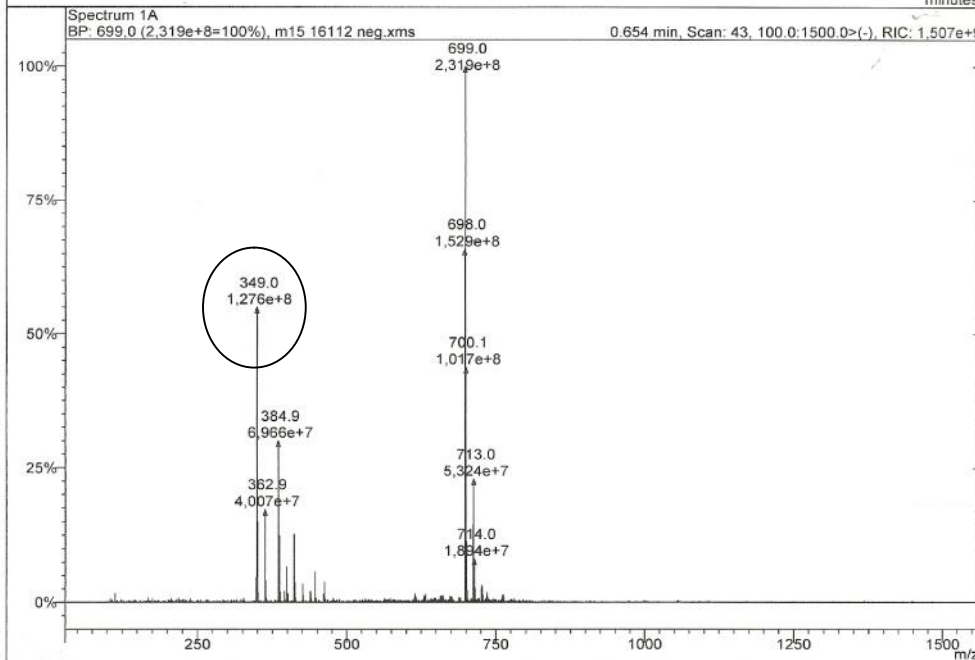
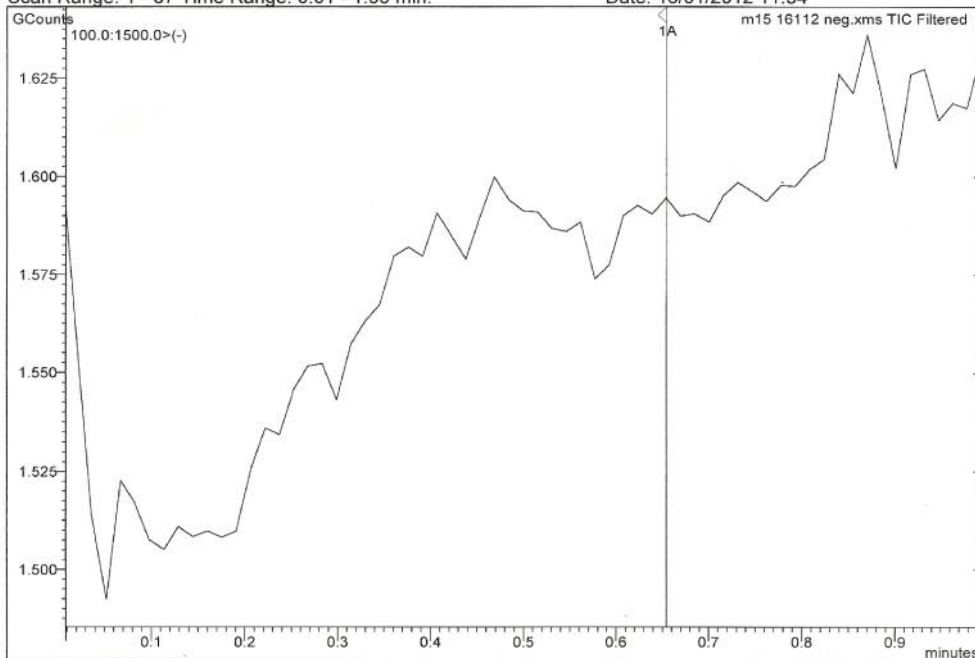
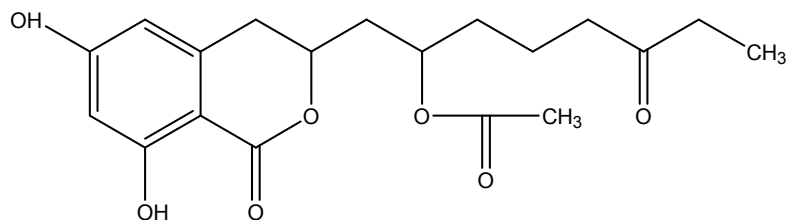


Figura 3.38 Spettro di massa (M-H)(ESI) del composto 15

3.6.2 Composto 16



Il composto 16 è stato isolato come un olio giallo.

Lo spettro $^1\text{H NMR}$ sembra essere del tutto simile al composto delucidato in precedenza (Figura 3.39) mentre lo spettro al carbonio (Figura 3.40) sembra essere dissimile per la presenza di un nuovo gruppo chetonico nella catena laterale (δ 212,2); ciò confermato da un valore di massa di 364 (Figura 3.41) compatibile con una formula di $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$.

Gli esperimenti HSQC del composto 16 hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone come riportato in Figura 3.42

Resta da stabilire la posizione del gruppo chetonico nella catena. Questo è stato possibile mediante un attento studio di correlazioni nello spettro HMQC (Figura 3.43). Si è ipotizzata la posizione del gruppo chetonico in 6' poichè mostra cross-peack con i protoni in posizione 7' (δ_{H} 1.79/ 1.64) e in posizione 5' (δ_{H} 2.4). Questo è ulteriormente confermato dal fatto che il metile terminale (δ_{H} 0.9 e δ_{C} 13.8, dt, $J=9$ $j=4$) correla in Cosy (figura 3.44) con un CH_2 (δ_{H} 1,79/1,64 e δ_{C} 34,5; dd, $J= 9\text{Hz}$, $j= 4$). Il valore del carbonio C-7' (34.5) indica la presenza di un gruppo chetonico.

Nelle figure 3.45 e 3.46 si evidenziano i maggiori cross peack di correlazione che suggeriscono la struttura ipotizzata.

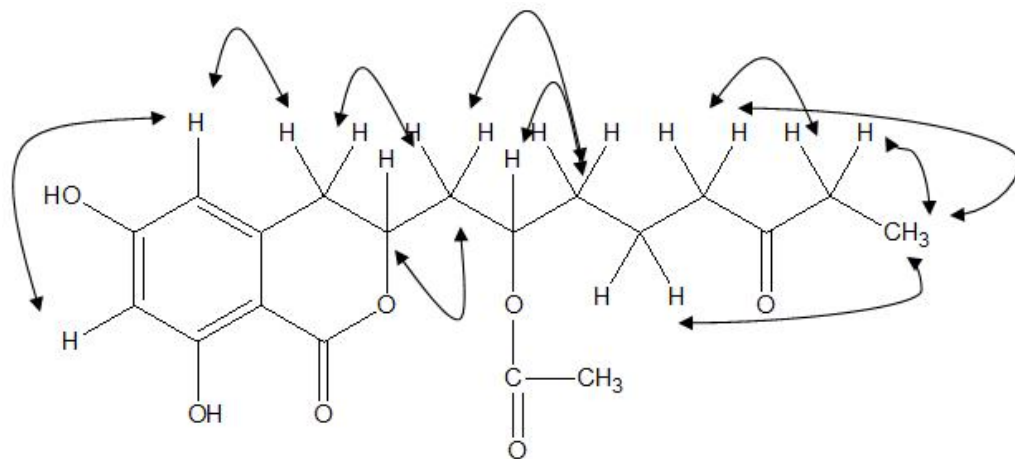


Fig. 3.45 Maggiori correlazioni COSY evidenziate.

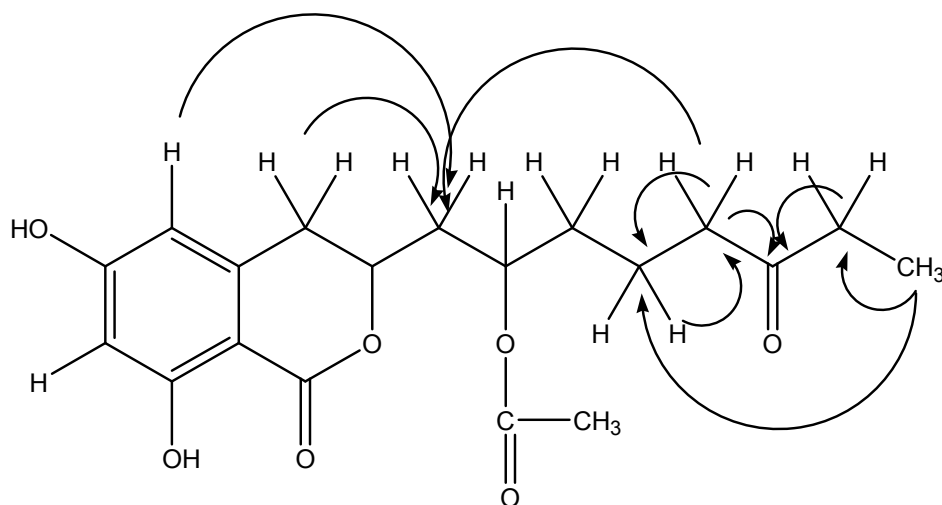
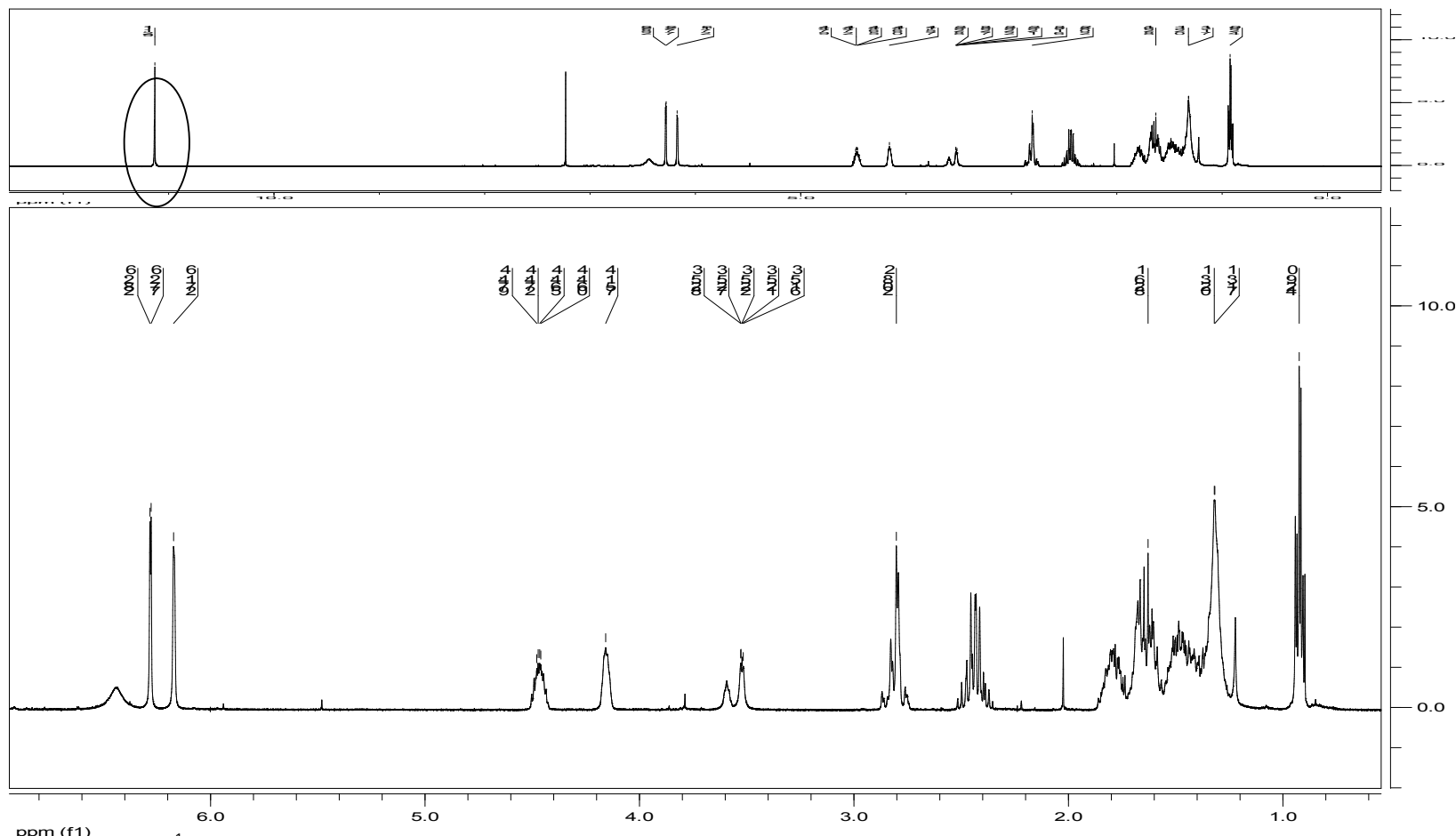


Fig. 3.46 Maggiori correlazioni HMBC evidenziate.



ppm (f1)
Figura 3.39 Spettro ^1H NMR del composto 16 e relativo espanso

Print Date: 28 Feb 2012 14:50:21

Spectrum 1A Plot - 28/02/2012 14.50

1 A Scan 74 from g:\senk2012\130112\m14 160112.xms

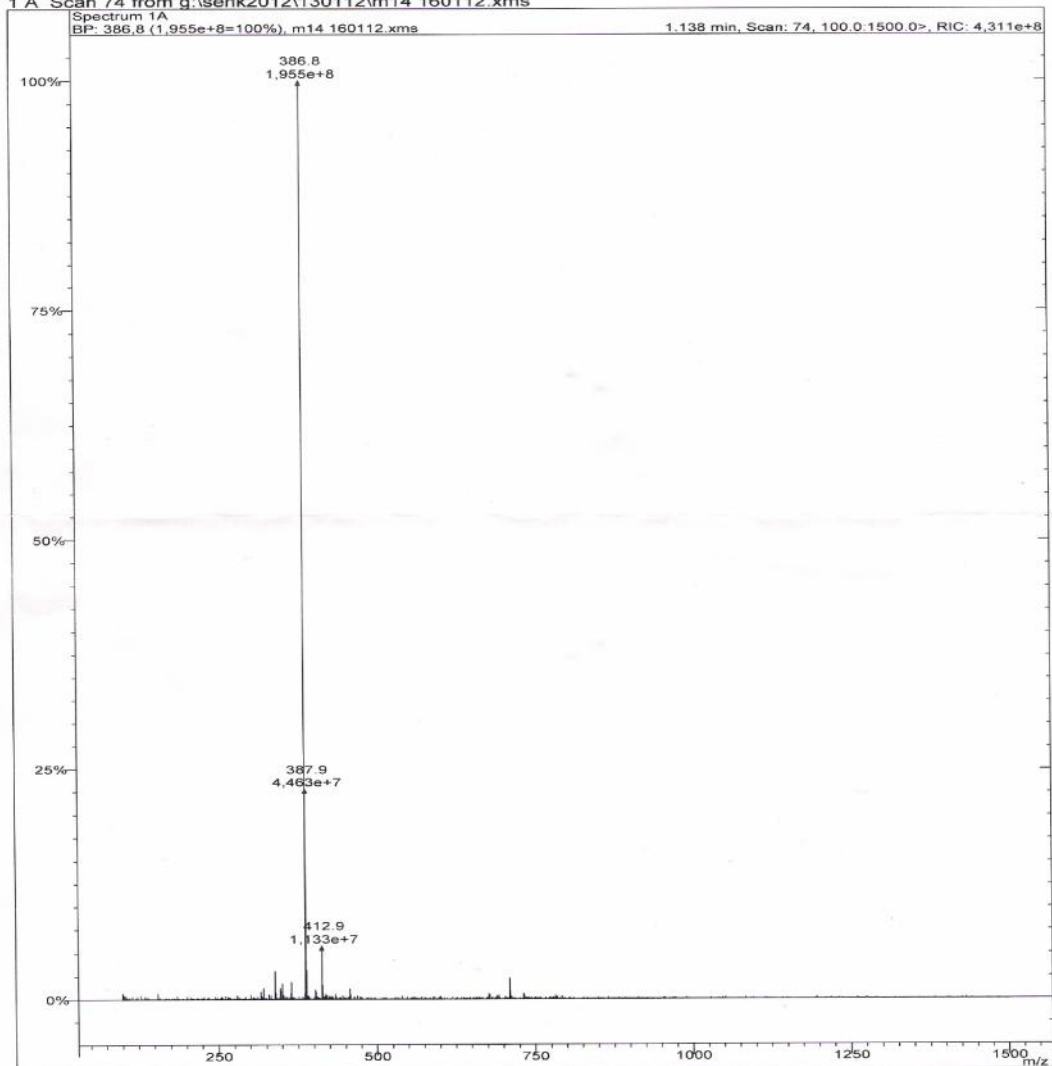
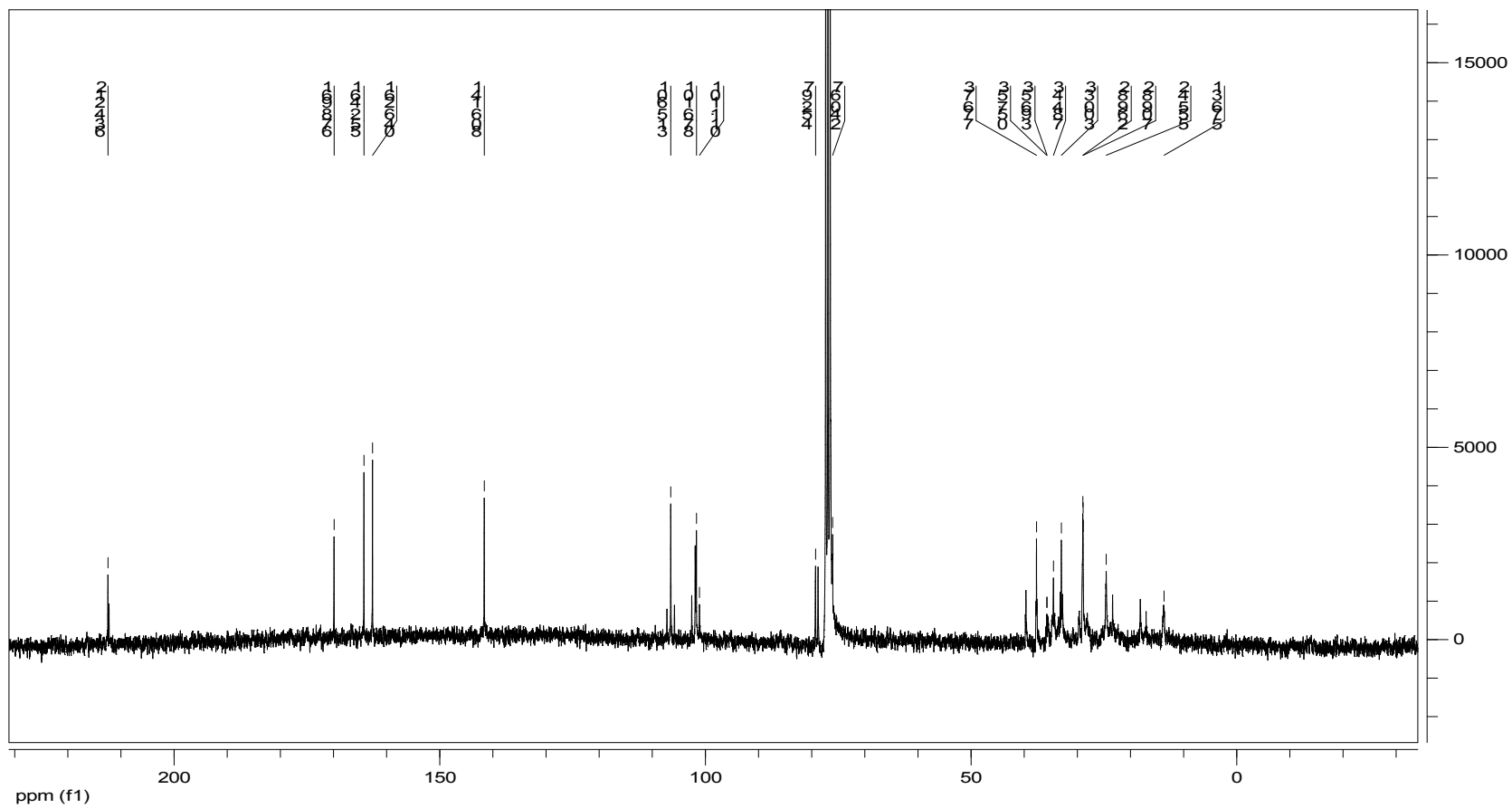


Figura 3.40 Spettro di massa (ESI) del composto 16

Nella figura 3.40 possiamo vedere l'addotto al sodio a 386.8 (M-H).

Figura 3.41 Spettro ^{13}C NMR del composto 16

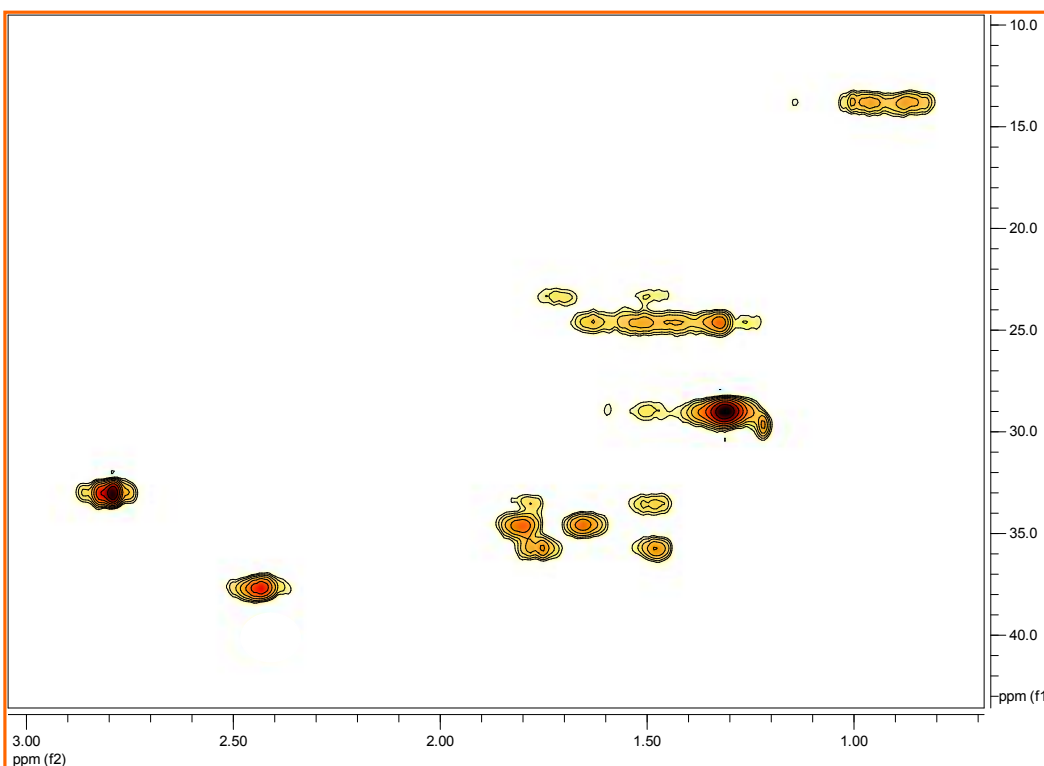
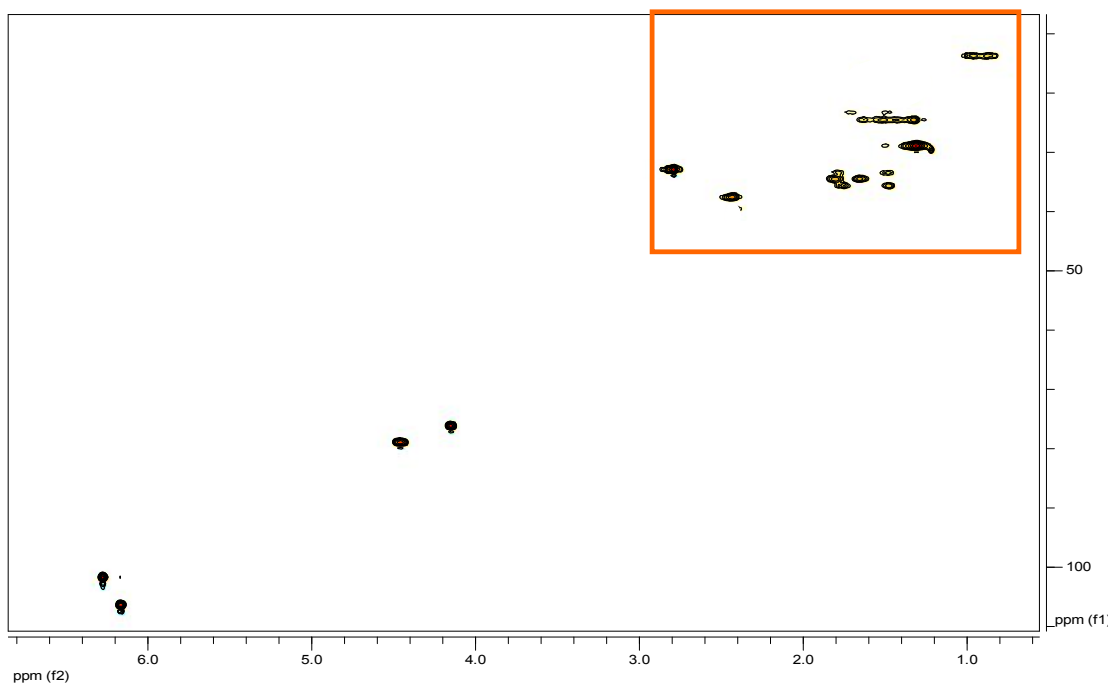


Figura 3.42 Spettro HSQC del composto 16 e relativo espanso

Di seguito vengono riportati i valori al ^{13}C NMR ed al ^1H NMR ipotizzati per la nostra struttura:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): δ = 11.126 (2 H, s, OH-6,8), 6.275 (1 H, s, H-7), 6.168 (1 H, s, H-5), 4.46 (1 H, m, H-3), 4.156 (1 H, m, H-2'), 2.82 (2 H, m, H-4), 2.431 (2H, m, H-5'), 1.8-1.3 (13 H, m, H-1', 3', 4', 5',7', 3''), 0.924 (3 H, dt, H-8').

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): δ = 212 (CO-6'), 169.876 (COO) 169.876 (CO), 164.255 (C-6), 162.640 (C-8), 141.608 (C-4a), 106.513 (C-5), 101.897 (C-7), 101.110 (C-8a), 79.254 (C-3), 76.926 (C-2'), 37.677 (C-5'), 34.487 (C-1'), 35.690 (C-7'), 33.003 (C-4), 28.962, 28.907 (C-3'-4'), 24.618 (C-3''), 13.752 (C-8').

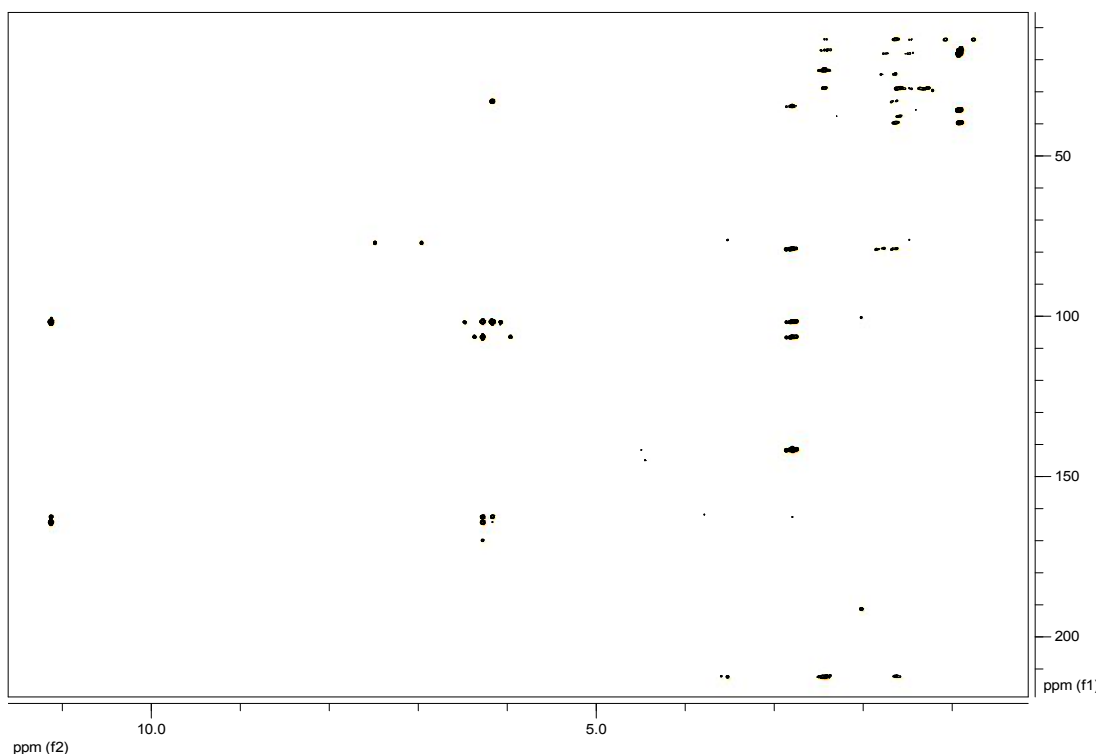


Figura 3.43 Spettro HMQC del composto 16

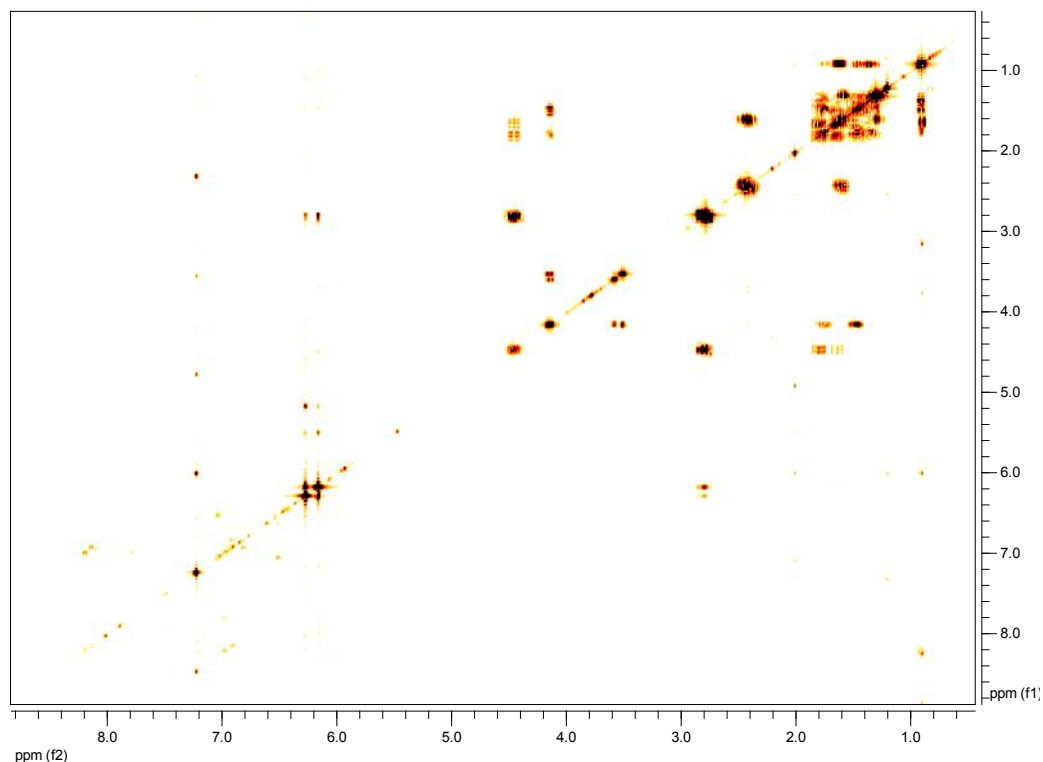
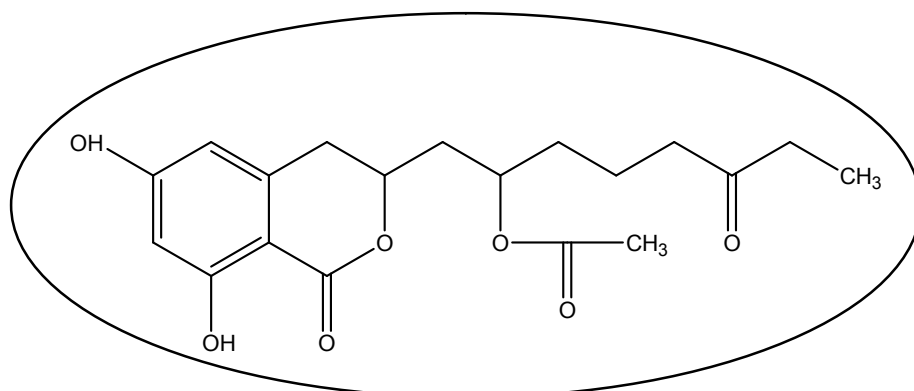


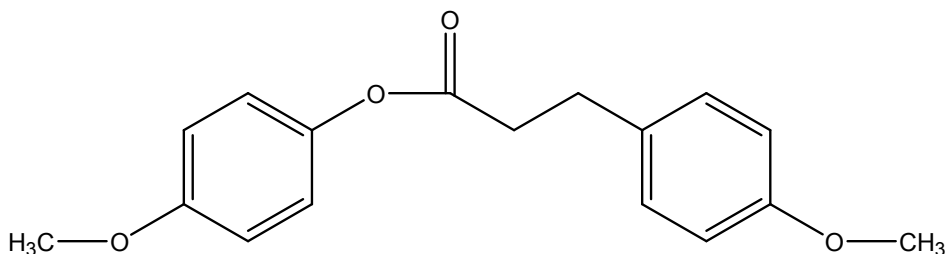
Figura 3.44 Spettro COSY del composto 16

Il composto 16 mostra due centri chirali in posizione 3 e in posizione 2'. Il valore di α da noi calcolato risulta essere di -9.8 . L'abbassamento del valore rispetto al composto 15 ($\alpha = -22.6$) è stato attribuito agli effetti di un sostituito con configurazione *S*. Mentre l'assegnamento di configurazione assoluta *R* al C-3 è basata su un valore negativo di α . Corentemente con i dati in bibliografia sulle dihydroisocumarine assegniamo la configurazione 3*R*-2'*S* (Barrero et al. 1994, 1991 e San Feliciano et al.1983).

I dati in nostro possesso fanno pensare che il composto 16 corrisponde al **1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate**



3.6.3 Composto 17



Il composto 17 è stato isolato come cristalli arancioni.

Osservando lo spettro al $^1\text{H-NMR}$ (figura 3.47) del composto 17 si nota subito la somiglianza con i dihydrochalconi. Infatti tale spettro mostra i tipici segnali dei protoni in posizione $\text{CH}_2\text{-}\alpha$ (2H, $\delta=3.4$, t, $J= 11.7$ Hz $J= 6$ Hz) , e $\text{CH}_2\text{-}\beta$ (2H, $\delta=2.94$, t, $J= 11.7$ Hz $J= 6$ Hz). Gli altri segnali sono un doppietto a $\delta_{\text{H}}= 7.141$ e un doppietto a $\delta_{\text{H}}= 6.791$ che indicano la presenza di una struttura simmetrica, e infine un singoletto a $\delta_{\text{H}}= 3.859$ dei gruppi metossilico.

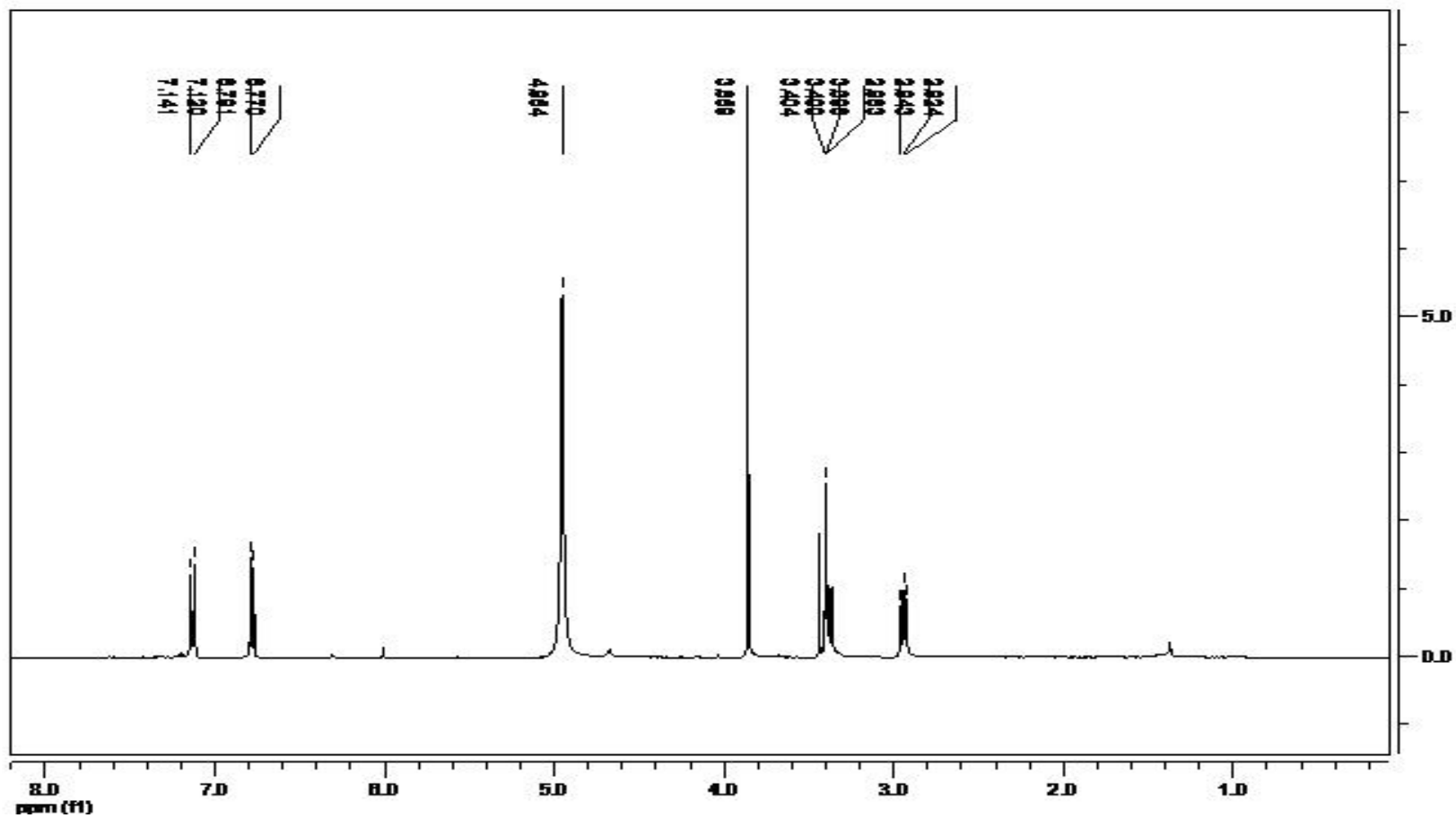
Nello spettro al $^{13}\text{C-NMR}$ (figura 3.48) sono presenti 10 segnali di cui 5 quaternari (δ_{C} 207, 167, 165, 134, 106), 2 segnali dei CH aromatici (δ_{C} 130.796, 116.392), un segnale del gruppo metossilico a $\delta_{\text{C}}= 56.144$ e 2 segnali per i carboni metilenici ($\delta_{\text{C}}= 47.810$, 31.660).

Gli esperimenti HSQC del composto 17 hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone come riportato in Figura 3.49.

Di seguito vengono riportati i valori al $^{13}\text{CNMR}$ ed al $^1\text{HNMR}$ ipotizzati per la nostra struttura:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD, δ , ppm, J/Hz) δ : 7.145 (4H, d, $J= 8.4$ Hz, H-2, 2', 6, 6'), 6.795 (4H, d, $J=8,7$ Hz, H-3,3', 5, 5'), 3.861 (6H, s, OCH_3 - 4, 4'), 3.408 (2H, t, $J= 11.7$ Hz $j= 6$ Hz H- α), 2.93 (2H, t, $J= 11.7$ Hz, $j= 6$ Hz, H- β).

$^{13}\text{C NMR}$ (300 MHz, MeOD, δ , ppm) δ : 207.021 (C=O), 167.722 (C-4), 165.825 (C-4'), 134.171 (C-1), 130.796 (C 2, 2', 6, 6'), 116.392 (C 3, 3', 5, 5'), 106.297 (C-1'), 56.144 (OCH_3 -C 4, 4'), 47.688 (C- α), 31.649 (C- β).

Fig. 3.47 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto 17.

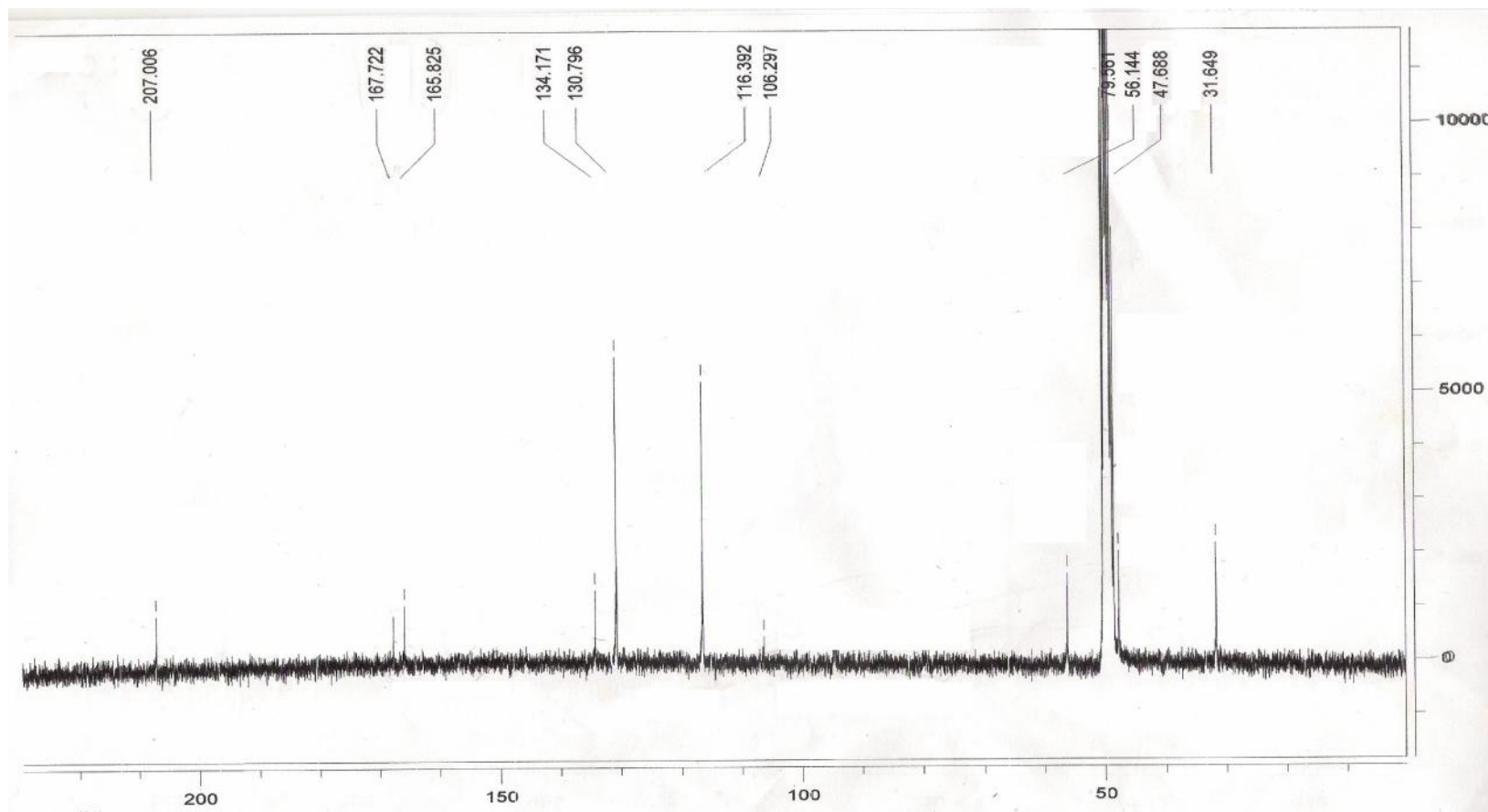


Fig. 3.48 Spettro ^{13}C -NMR del composto 17.

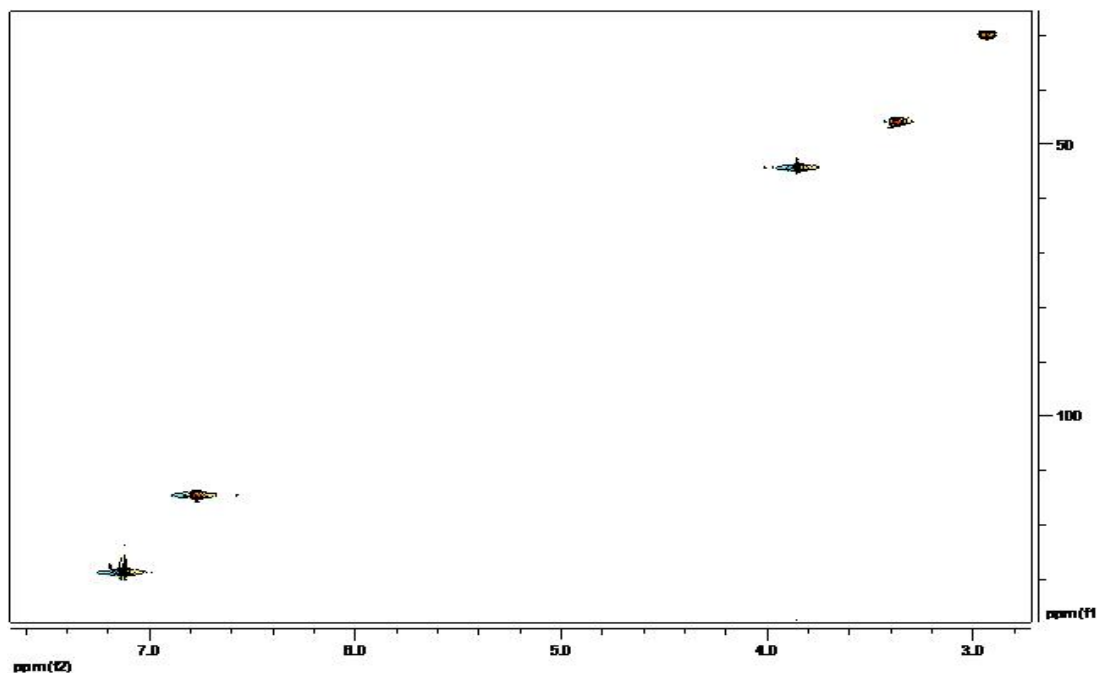


Fig. 3.49 Spettro HSQC del composto 17.

Lo spettro COSY (figura 3.50) mostra un sistema di spin per i segnali a $\delta_H=3.408$ (2H, t, $J=11.7$ Hz $j=6$ Hz H- α) e $\delta_H=2.93$ (2H, t, $J=11.7$ Hz, $j=6$ Hz, H- β), e per i segnali a $\delta_H=.145$ (4H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, 2', 6, 6') e $\delta_H=6.795$ (4H, d, $J=8,7$ Hz, H-3,3', 5, 5')

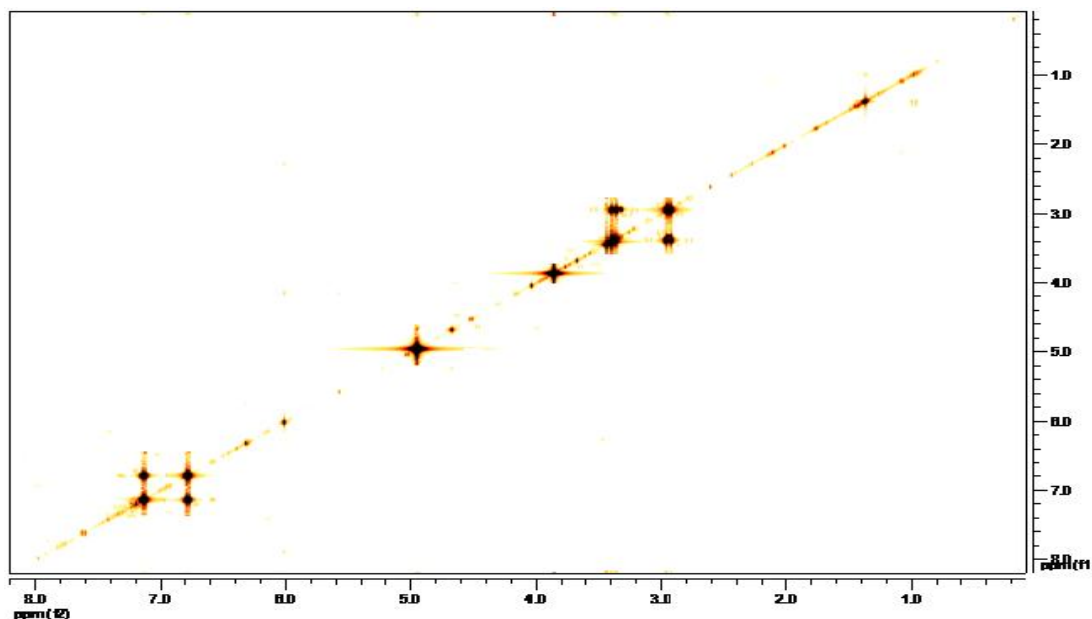


Fig. 3.50 Spettro COSY del composto 17.

Lo spettro HMBC (figura 3.52) ha permesso di evidenziare una serie di cross peak di correlazione tra le varie parti della molecola che ci hanno permesso di confermare la struttura ipotizzata.

Il CH₂ in α ($\delta_H=3.408$) mostra cross-peak con il carbonio in posizione C- β (31.649), in C-1 (134.171) e il CO (207.006); mentre il CH₂ in β ($\delta_H=2.93$) mostra cross-peak con il carbonio in posizione C- α (47.688), in C-2, in C-6 (130.796), in C-1 (134.171) e con il CO (207.006). La figura 3.51 mostra i maggiori cross-peak di correlazione. La posizione dell'ossigeno è giustificata dal fatto che nello spettro HMBC il gruppo chetonico mostra cross-peaks solamente con i due CH₂ in α e β e con i protoni a $\delta_H = 7.145$ (posizioni 2, 2', 6, 6'), mentre non è visto dagli altri protoni dell'anello (nello specifico queste correlazioni sono mostrate con frecce rosse nella figura 3.51).

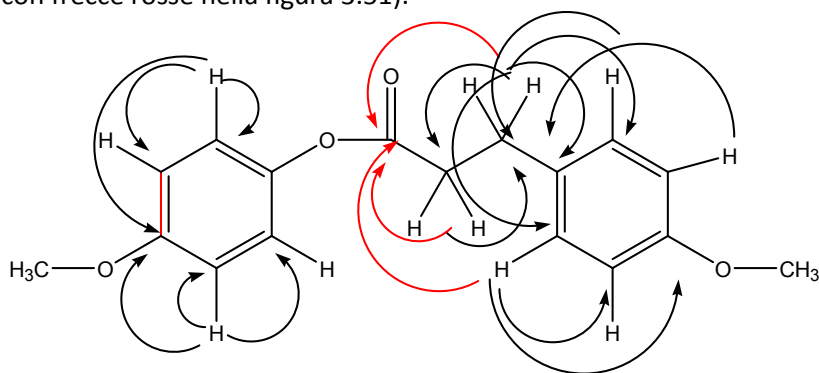


Fig. 3.51 Maggiori correlazioni HMBC

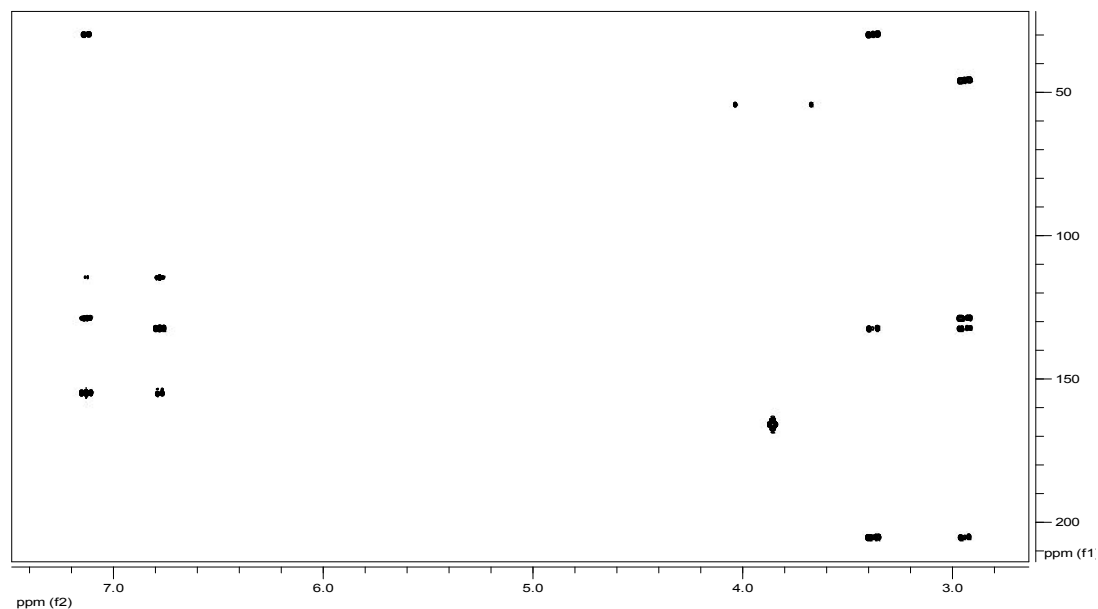


Fig. 3.52 Spettro del HMBC del composto 17.

Grazie alla collaborazione con il Dr. Pierluigi Caboni del Dipartimento di Tossicologia della Facoltà di Farmacia è stato possibile effettuare il calcolo della massa (Figura 3.53) del nostro campione evidenziando un valore di 286 corrispondente alla formula molecolare: $C_{17}H_{18}O_3$ che evidenzia la presenza di un ossigeno in più rispetto alla classica struttura dei dihydrochalconi e che conferma la struttura da noi ipotizzata.

Print Date: 22 Feb 2012 10:00:34

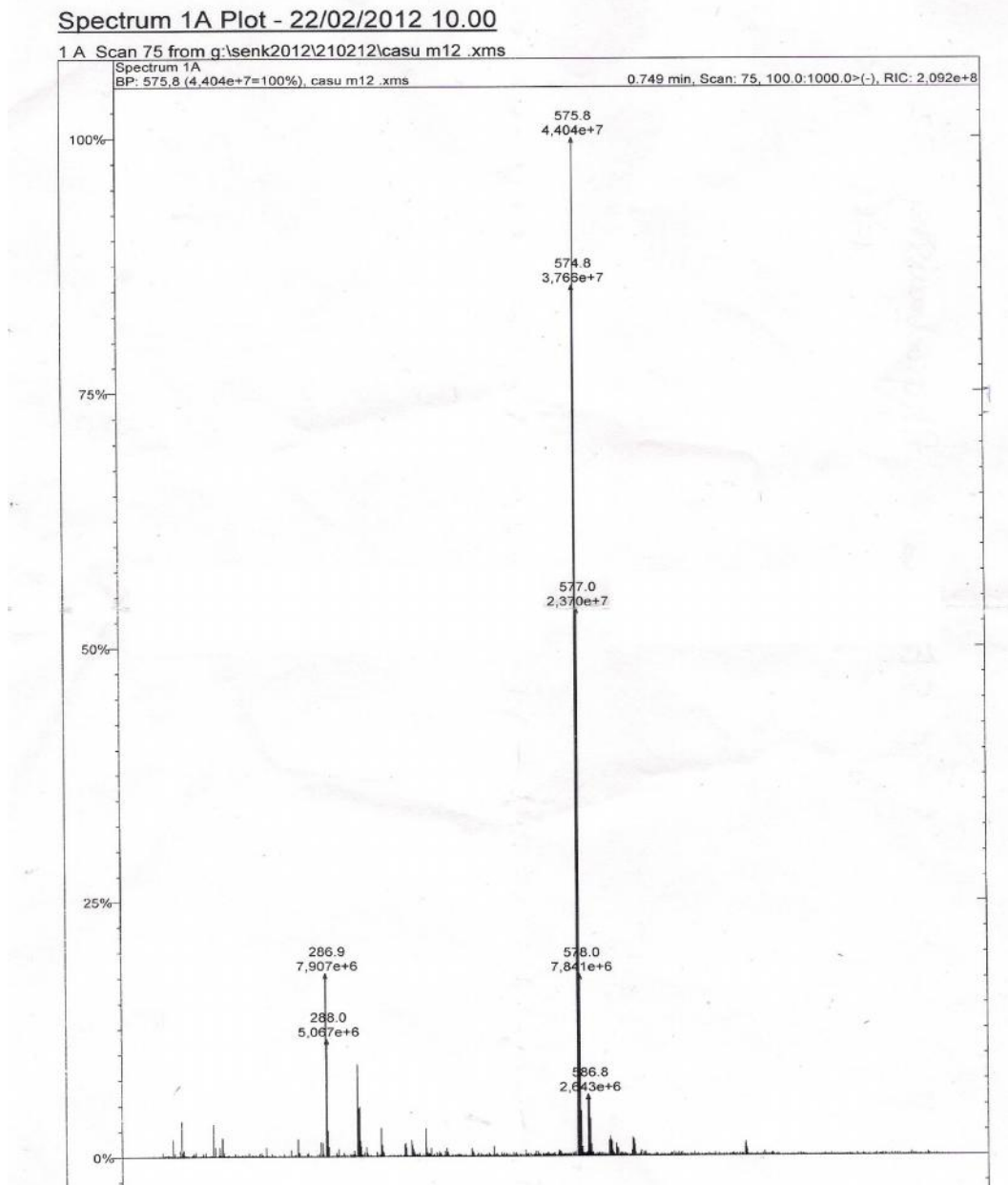
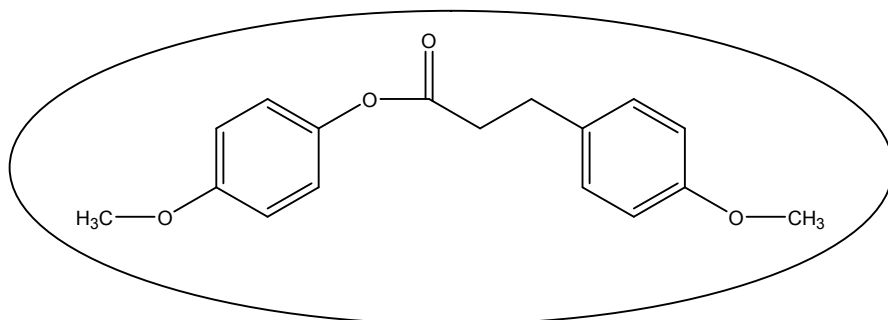


Fig. 3.53 Spettro di massa (ESI) del composto 17.

I dati in nostro possesso fanno pensare che il composto 17 corrisponde al: **4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate.**



3.7 Risultati biologici sui composti isolati dalla *Ononis natrix L.*

3.7.1 Screening biologico preliminare

Un preliminare screening biologico sull'estratto in diclorometano delle parti aeree dell'*Ononis natrix L.* ha mostrato *in vitro* attività antibatterica. Tenuto conto di questo si è proceduto effettuando un isolamento bioguidato. Ad un primo frazionamento con cromatografia sotto vuoto (VLC) è perciò seguito un test per verificare quali delle frazioni fosse attiva (fig. 3.30). Il ceppo utilizzato per effettuare il test è lo *Staphylococcus aureus*.

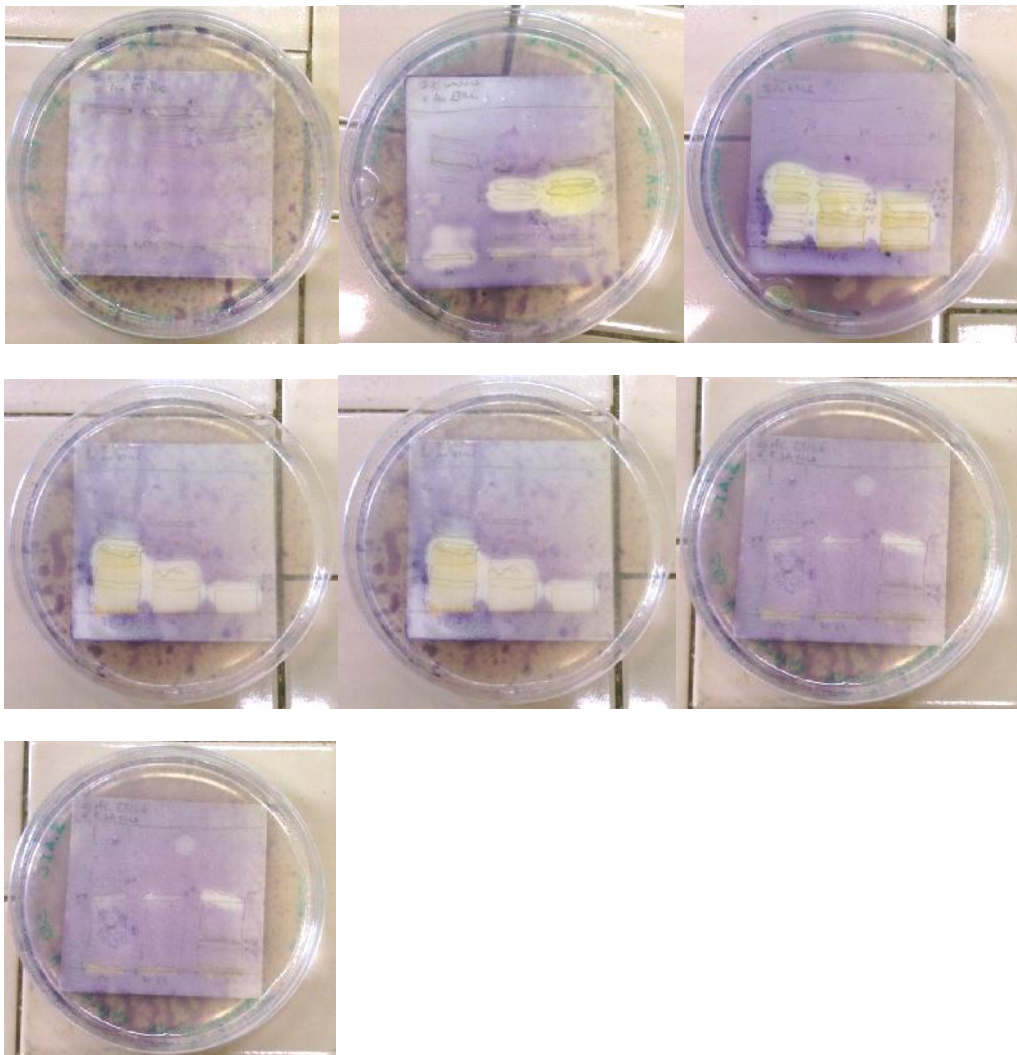


Fig. 3.30 Test su *Staphylococcus aureus* sulle frazioni della VLC.

Dopo essere inoculate le piastre sono state messe in stufa per 24 ore. Il giorno seguente sono state marcate con l'MTT (0,25 mg in 1 ml di acqua distillata). Questo composto viene assimilato nei mitocondri dando un metabolita blu, quindi le zone in cui la colorazione blu non è presente sono quelle in cui i batteri non sono cresciuti. Il lavoro si è quindi focalizzato sullo studio di quelle frazioni che erano risultate attive. I composti isolati sono risultati appartenenti alla famiglia dei flavonoidi e delle isocumarine e il 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate.

3.7.2 Risultati biologici

I composti isolati sono stati testati su *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. I test sono stati effettuati con piastra a 96 pozzetti, avendo nel pozzetto iniziale una concentrazione di 512 μg e nel decimo pozzetto di 1 μg , come controllo positivo è stato usato il cloramfenicolo e il miconazolo a seconda del ceppo utilizzato, mentre come controllo negativo il solvente usato per solubilizzare i composti, cioè il DMSO. I test sono stati effettuati almeno in triplicato. I risultati del test sono illustrati nel grafico seguente dove in ordinata troviamo la concentrazione espressa in μg che corrisponde a quella dei vari pozzetti della piastra e in ascisse i composti testati (fig. 3.31). Come si può notare dal grafico il composto 6 non è stato testato in quanto isolato in quantità insufficiente.

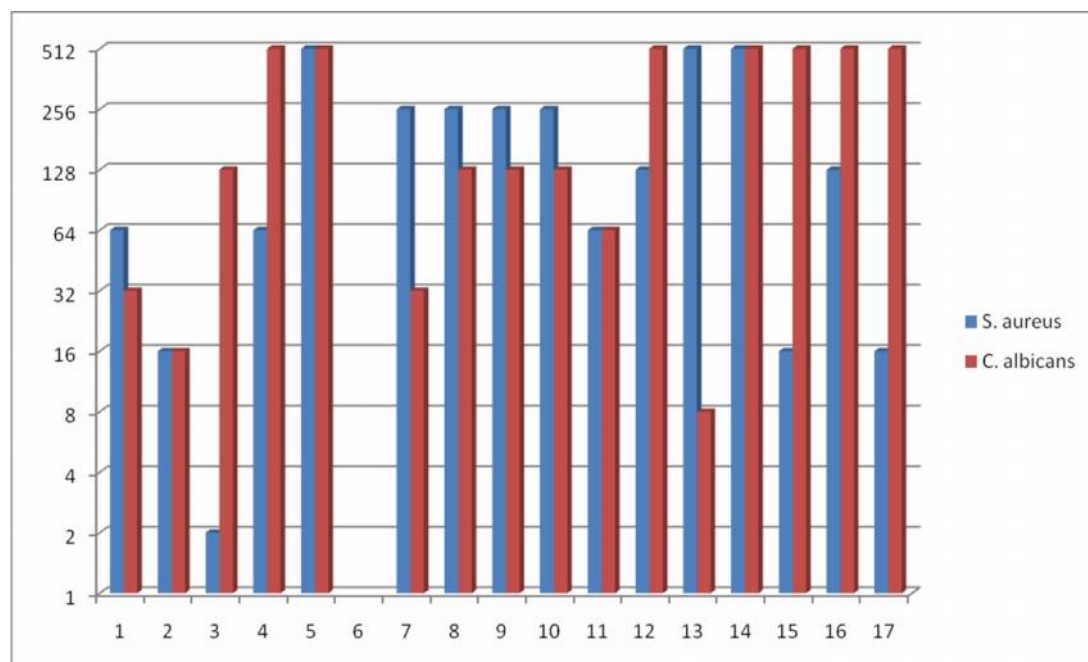


Fig. 3.31 Risultati dei test su *S. aureus* e *C. albicans*.

- 1= 2',4'-dihydroxy-dihydrochalcone.
 2= 2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone.
 3=2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone.
 4= 2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-dihydrochalcone.
 5= 2',4-dimethoxy-4'6'-dihydroxy-dihydrochalcone.
 6= 2',4'-dihydroxy-4-methoxy-dihydrochalcone.
 7= 2',4'-dihydroxychalcone.
 8= 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone.
 9= 7-hydroxyflavanone.
 10= 7-hydroxy-8-methoxyflavanone.
 11= 5,7-Dihydroxyflavanone.
 12= 5-methoxy-7-hydroxyflavanone.
 13= 7-hydroxy-8-methoxyflavone.
 14= 5,7 dihydroxy-6- methoxyflavone.
 15= 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate
 16= 1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate
 17= 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate

Come si può vedere dal grafico il composto più attivo sullo *S.aureus* risulta essere il composto 3 (2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone) con una concentrazione di 2 µg. Questo dato è discorde ad un altro studio effettuato dove invece non è stata riscontrata nessuna attività (Joshi A.S 2001). Per contro non risulta essere molto attivo contro la *C. albicans* (128 µg) confermando i dati in letteratura (Xing-Cong Li 2002). Il composto 7 (2',4'-dihydroxychalcone) risulta essere attivo sulla *C. albicans* ad una concentrazione di 32 µg confermando i dati in letteratura (Svetaz L. 2007). I composti 10 (7-hydroxy-8-methoxyflavanone) 11 (5,7-Dihydroxyflavanone) e 12 (5-methoxy-7-hydroxyflavanone) risultano essere debolmente attivi sulla *C. albicans* rispettivamente 128 µg e 64 µg, confermando i dati in letteratura (Agüero M.B 2010, Melliou E. 2004, Al-Rehaily 2008). Il composto 14 (5,7 dihydroxy-6- methoxyflavone) in un precedente studio è risultato essere attivo sullo *S. aureus* (Babu 2005), mentre nei nostri test non ha mostrato attività. Per quanto riguarda gli altri composti, non si sono trovati in letteratura dati riguardanti la loro attività sui ceppi da noi studiati, rilevante risulta essere l'attività del composto 13 (7-hydroxy-8-methoxyflavone) sulla *C. albicans* attivo ad una concentrazione di 8 µg e e del composto 2 (2',4'-dihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone) attivo ad una concentrazione di 16 µg su entrambi i ceppi.

Per quanto riguarda i due nuovi derivati isocumarinici da noi isolati risultano essere attivi sullo *S. aureus* e in particolare il composto 15 (1-[(5,7-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-

isochromen-3-yl)methyl]heptyl acetate) ad una concentrazione di 16 µg, mentre nel composto 16 (1-[(6,8-dihydroxy-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-3-yl)methyl]-5-oxoheptyl acetate) l'attività risulta essere notevolmente diminuita ad una concentrazione di soli 128 µg. Questo potrebbe essere dovuto alla presenza del gruppo chetonico nella catena laterale. Sulla *C. albicans* i due composti invece risultano essere praticamente inattivi.

Il nuovo composto naturale 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate è risultato attivo sullo *S. aureus* ad una concentrazione di 16 µg mentre risulta essere inattivo verso la *C. albicans*.

Sui due nuovi derivati isocumarinici da noi isolati e sul 4-methoxyphenyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate sono in corso ulteriori studi sulla citotossicità. Sarà inoltre interessante testare le due isocumarine su una possibile attività contro il virus dell'HIV riscontrato per altri derivati (Hudson 1993).

BIBLIOGRAFIA

Agüero M.B et al. (2010). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, pg: 194-201.

Amy Yap Li Ching et al. (2007). Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.) *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 11, pg: 154-159.

Al-Rehaily A.J. et al. (2008). Flavonoids and terpenoids from *Helichrysum forskahlii*. *Phytochemistry*, 69, pg: 1910-1914.

Babu K.S et al. (2005). Synthesis and in vitro study of novel 7-O-acyl derivatives of Oroxylin A as antibacterial agents. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 15, pg: 3953-3956.

Bao-Ning Su et al. (2003). Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay. *Phytochemistry*, 63, pg: 335-341.

Barrero A.F. et al. (1991). Resorcinol derivatives from *Ononis viscosa*. *Phytochemistry*, 30, 641-643.

Barrero A.F. et al. (1994). Alkyresocinol and isocoumarins from *Ononis pubescens*. *Phytochemistry*, 35, pg 493-498.

Cao, Cong-Mei et al (2010). Two New Flavan-Flavanones from *Sarcandra hainanensis*; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 10, pp. 1395 – 1398.

Chuan Li et al. (1997). (S)-Dihydrooroxylin A in human urine following oral administration of the traditional Chinese medicines: *Daisaiko-to* and *Shosaiko-to*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, pp 1145-1147.

Chuan Li et al. (1998). Stereochemistry and Putative Origins of Flavanones Found in Post-administration Urine of the Traditional Chinese Remedies *Shosaiko-to* and *Daisaiko-to*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46, pp 807-811.

Hanawa F. et al (2001). Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry*, 57, pg: 223-228.

Hermoso A. et al (2003). Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. structural requirements for activity. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 11, pg: 3975-3980.

Hudson JB. Et al. (1993). The unusual UVA-dependent antiviral properties of the furoisocoumarin, coriandrin. *Photochemistry, photobiology*, 57, pg 491- 496.

Hufford C. D. et al. (1980). Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. *Phytochemistry*, 19, pg: 2036 – 2038.

Janaswamy Madusudana et al. (2007). Natural agent for treatment of gastrointestinal toxicity, associated symptoms and ulcers. *Patent: US2007/213281 A1*.

Jang, Dae Sik et al. (2006). Beccaridiol, an unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of *Diplectria beccariana*. *Phytochemistry*, 67, pg: 1836-1837.

Jun N. et al. (2007). Synthesis and evaluation of 2',4',6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,15, pg: 2396-2402.

Joshi, A. S. et al (2001). Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. *Planta medica*, 67, pg: 186-187.

Kuo Yuh-Chi et al. (2004). Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. *Planta Medica*, 70, pg: 1237 – 1239.

Lee, Sunhee et al. (2009). Relationships between the structures of flavanone derivatives and their effects in enhancing Early growth response-1 gene expression. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, pp. 2116 – 2120.

Marques M.R et al. (2010). Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. *Fitoterapia*, 81, pg: 552 – 556.

Melliou E, Chinou I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of greek propolis. *Planta medica*, 70, pg: 515-519.

Pignatti (1982) Flora di Italia

Ramadan M.A et al. (2000). Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs. *Phytochemistry*, 54, pg: 891-896.

Ribnicky et al. (2007). Compounds from an extract of *Artemisia* and methods for treating disorders. *Patent: US2007/224301 A1*.

San Feliciano A. et al. (1983). An isocoumarin and other phenolic components of *Ononis natrix*. *Phytochemistry*, 22, pg 2031-2033.

Seidel V. et al. (2000). (Rel)-1b,2a-di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3b,4a-di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniothalamus gardneri* and *Goniothalamus thwaitesii*. *Phytochemistry*,55, pg: 439-446.

Shintaro Kamiya et al. (1989). Syntheses of several dihydrochalcones- amino acid and peptide conjugates. *Agricultural and biological chemistry*, 53, pg: 1365-1373.

Svetaz L. et al. (2007). Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the Mechanism of action. *Planta medica*,73, pg: 1074-1080.

Yang Huan et al. (2009). Flavonoid aglicones of *Oxytropis falcata*. *Chemistry of natural compounds*, 45, pg: 239-241.

Wimal H. et al (2009). Microbial metabolism. Part 10: Metabolites of 7,8 dimethoxyflavone and 5-methoxyflavone. *Natural Product Research*, 23, pg: 1231 – 1239.

Xing-Cong Li et al (2002). Fatty Acid Synthase Inhibitors from Plants: Isolation, Structure Elucidation, and SAR Studies. *Journal of natural product*, 65, pg: 1909-1914.

www.actaplantarum.org

4 IL GENERE *SESELI*

4.1 Sistematica

4.1.1 Introduzione

Regno	Plantae
Sottoregno	Tracheobinta
Superdivisione	Spermatophita
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sottoclasse	Rosidae
Ordine	Apiales
Famiglia	<i>Apiaceae</i>
Genere	<i>Seseli</i> L.

Al genere *Seseli* appartengono un numero limitato di specie; infatti solo 20 sono annoverate nella Flora Italiana, e ciò varia a seconda dell'interpretazione. Da alcuni anni a questa parte sono in corso degli studi sistematici che rendono evidente la presenza di alcune sottospecie finora non determinate, questo perché la tassonomia del genere risulta alquanto complicata a causa dei diversi polimorfismi esistenti e dell'indistinta delimitazione tra alcune caratteristiche presenti in alcune specie.

Per quanto riguarda la presenza del genere *Seseli* in Sardegna, è da considerare che diverse specie del genere sono native della Sardegna. Il Pignatti (1982) menziona come presente in Sardegna la *Seseli tortuosum* L. e la *Seseli bocconi* Guss. ssp. *praecox*. Al momento si stanno eseguendo diversi studi sistematici che rendono evidente che sotto la descrizione di *Seseli bocconi* Guss. ssp. *praecox* Gamisans del Pignatti sono raccolte diverse specie. *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans è una delle oltre 200 specie endemiche che contribuiscono al totale dell'intera flora sarda, stimata intorno a 2100 unità autoctone (Leonti et al. 2009. Leonti et al. 2006).

4.1.2 Caratteristiche del genere *Seseli*

La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Seseli* sono delle emicriptofite scapose, si tratta cioè di piante erbacee perenni o bienni con gemme svernanti a livello del suolo, che sono inoltre dotate di un asse florale eretto e spesso privo di foglie. Raggiungono generalmente un'altezza di 30-60 cm e sono glabre e glauche.

I fusti si presentano legnosi almeno alla base, con foglie inferiori differenti da quelle superiori. Mostrano fioritura a ombrelle con la presenza di 4-15 raggi, fiori bianchi ermafroditi, tetraciclici e pentameri con calice ridotto a 5 dentelli, 5 petali spesso con apice ripiegato oppure bilobo; gli stami sono 5 e i carpelli 2, l'ovario è infero con 2 stili divergenti. I fiori sono piccoli e nettariiferi e la funzione vessillare è svolta dall'infiorescenza. Presentano impollinazione entomogama ad opera di Ditteri, Lepidotteri, Imenotteri e Coleotteri (Pignatti 1982).

Il genere *Seseli* comprende circa 50 specie presenti in Europa, Asia, Africa e Australia (tratto da www.sardegnaambiente.it).

4.1.3 Distribuzione in Italia

Il genere *Seseli* è presente in Italia con circa 20 specie, alcune sono presenti su tutto il territorio italiano (*Seseli libanotis* (L.) Koch e *Seseli austriacum* (Beck) Wohlf.), altre invece come la *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans e *Seseli bocconi* Guss. sono degli endemismi sardo-corsi, mentre *Seseli polyphyllum* Ten. è un endemismo campano.

In generale la presenza di questo genere di Apiaceae si riscontra maggiormente nell'Italia centrale (Fig. 4.1).

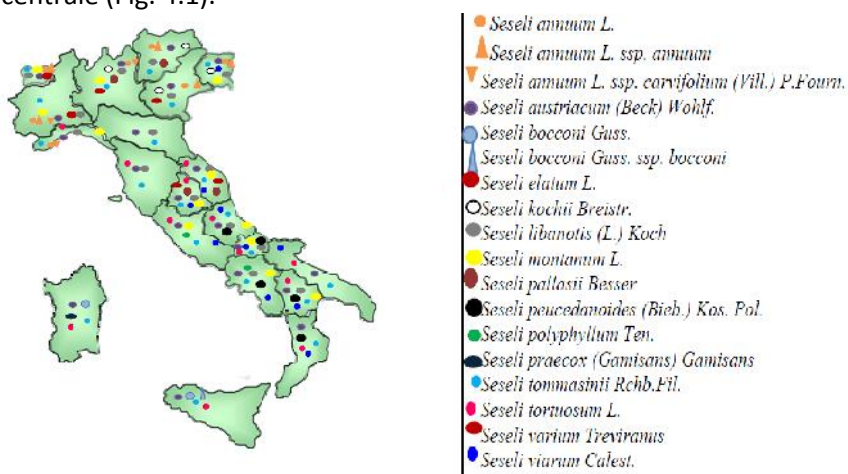


Fig. 4.1 Distribuzione della *Seseli* in Italia

4.2 Fitochimica del genere *Seseli*

Nel genere *Seseli* si riscontra la produzione di un gran numero di cumarine semplici, di pirano e furocumarine lineari e angolari e kellactoni (Austin 1968; Tosun A. 2007; Widelski 2007), sesquiterpeni, fenilpropanoidi e poliacetileni (Tosun 2003; Egan 1990).

4.2.1 Le cumarine

4.2.1.1 Struttura e proprietà chimico-fisiche.

Le cumarine rappresentano un gruppo eterogeneo di eterocicli naturali caratterizzati da un'elevata chemio diversità, che vanta la presenza di oltre 1800 strutture e una varietà di attività farmacologiche molto diverse (Murray 2005, Herz 2002). Il nome delle cumarine deriva da "coumarou", un tipo di legno che insieme alla fava tonka si ricava dalla *Dipteryx odorata*, una leguminosa tropicale originaria del Sud America nota anche con il nome di *Coumanouna odorata*. Da i semi di questa piante nel 1820 venne isolata per la prima volta la cumarina (Ricciuti 2004). Questa cumarina è presente in più di 27 famiglie di vegetali, ed è responsabile dell'odore dolce dell'erba appena tagliata (Ricciuti 2004)(Fig. 4.2).

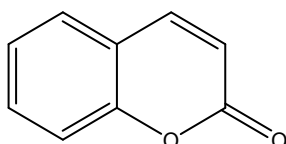


Fig. 4. 2 Il 5,6-benzo-2-pirone (cumarina).

Tutte le cumarine presenti in natura derivano dal 5,6-benzo-2 pirone e sono presenti sia in forma libera che glicosidica (eterosidi). Da un punto di vista biosintetico appartengono alla classe dei fenilpropanoidi, che derivano dal metabolismo dell'acido scikimico, o dall'introduzione di acido cinnamico, fenilalanina o tirosina in opportuni precursori (Ricciuti 2004) (fig. 4.3). Sono molecole che non presentano atomi di azoto. Inoltre quasi tutte le cumarine presentano un ossidrilico in posizione 7. La prenilazione dell'anello benzenico da parte della dimetilallil pirofosfatasi in posizione 6 di una 7-idrossicumarina produce le furano- e pirano-cumarine lineari, se invece avviene in posizione 8 si hanno gli omologhi angolari. Le furano-cumarine comprendono due steps successivi: l'ossidazione stereospecifica in posizione 4' e l'eliminazione del residuo idrossi-isopropilico in posizione 5' tramite la condensazione retro-aldolica (Ojala 2001).

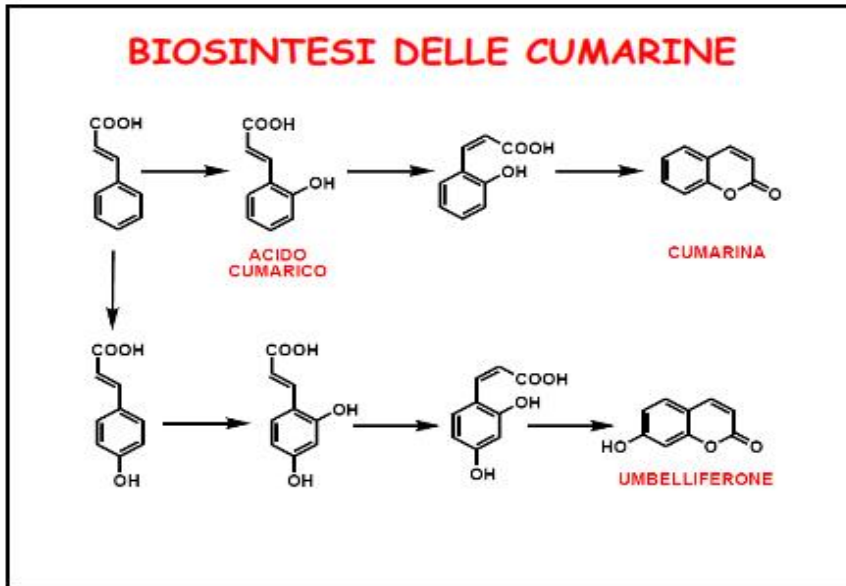


Fig. 4.3 Biosintesi della cumarina e dell'umbelliferone (7-idrossicumarina).

In base alla loro struttura chimica possiamo classificare le cumarine in 4 gruppi principali:

- Cumarine semplici: mostrano spiccate proprietà flebo toniche e antiedematose.
- Idrossi-cumarine: i principali rappresentanti di questo gruppo sono l'umbelliferone, l'esculentina, la scopoletina e derivano rispettivamente dalla ciclizzazione degli acidi p-cumarico, caffeico e ferulico (Morelli 2005). Hanno attività antispastica e ipotensiva, possono interferire nei processi di coagulazione del sangue e vengono utilizzati nella composizione di filtri solari.
- Furano-cumarine. possiedono un anello furanico condensato con il nucleo della cumarina. L'anello furanico può essere fuso alla cumarina in due modi principali, dando luogo a due classi di isomeri, le furanocumarine lineari (capostipite psoralene) e le furanocumarine angolari (capostipite angelicina). La presenza di un esteso sistema di doppi legami rende questi derivati in grado di esaltare l'azione cutanea dei raggi solari, in particolare dei raggi UV, con conseguente azione foto sensibilizzante. Questi effetti sono propri delle 6,7 furano-cumarine, mentre non si riscontrano nelle 7,8 furano-cumarine, a causa di una minore estensione del sistema coniugato di elettroni π nel gruppo cromoforo. Lo psolarene e i suoi derivati sono esempi di 6,7 furo-cumarine. Molte furanocumarine sono tossiche e foto mutagene e sono prodotte dalle piante principalmente come meccanismo di difesa dai predatori.
- Pirano-cumarine: possiedono un anello piranico condensato con il nucleo della cumarina. Anche in questo caso l'anello piranico può essere fuso in due modi dando luogo

alle pirano-cumarine lineari (tipo xantiletina) e a quelle angolari (tipo seselina). Come le furano-cumarine anch'esse inducono fotosensibilizzazione (Ricciuti 2004). Oltre queste quattro classi principali esistono anche le cumarine sostituite nell'anello pironico (eterociclico), le quali a loro volta comprendono:

- Le 4-idrossi-cumarine, tra cui dobbiamo citare il dicumarolo, un dimero impiegato in specialità medicinali anticoagulanti;
- Le 3-fenilcumarine o coumestani, tra cui il mio noto è il coumestrol;
- Le 4-fenilcumarine, come il calofillolide. Questi ultimi composti sono anche definiti neoflavonoidi e come le 3-fenilcumarine e altri composti quali pterocarpani e rotenoni, prendono origine proprio dai flavonoidi (Morelli 2005).

Degni di nota sono anche i khellactoni un tipo particolare di derivato cumarico, che è stato da noi isolato in questi studi. Questi composti sono oggetto di studi soprattutto per la loro attività anti AIDS (Lan Xie 1995, 1998; Li Huang 1994; Takeuchi 1997).

4.2.1.2 Distribuzione e funzione nelle piante.

Ad oggi le cumarine sono state isolate da più di 700 specie diverse, si ritrovano sia libere che come eterosidi in molte famiglie di dicotiledoni e soprattutto nelle *Apiaceae* e le *Poaceae*; in particolare abbondano nell'Imperatoria (*Peucedanum ostruthium*), nel Panace (*Heracleum spondylium*), nell'Asperula (*Asperula odorata*), nell'Angelica (*Angelica archangelica*) e nell'Ammi (*Ammi majus*) (Ricciuti 2004). Nella tabella seguente sono riassunte anche le altre principali famiglie in cui si ritrovano le curarine.

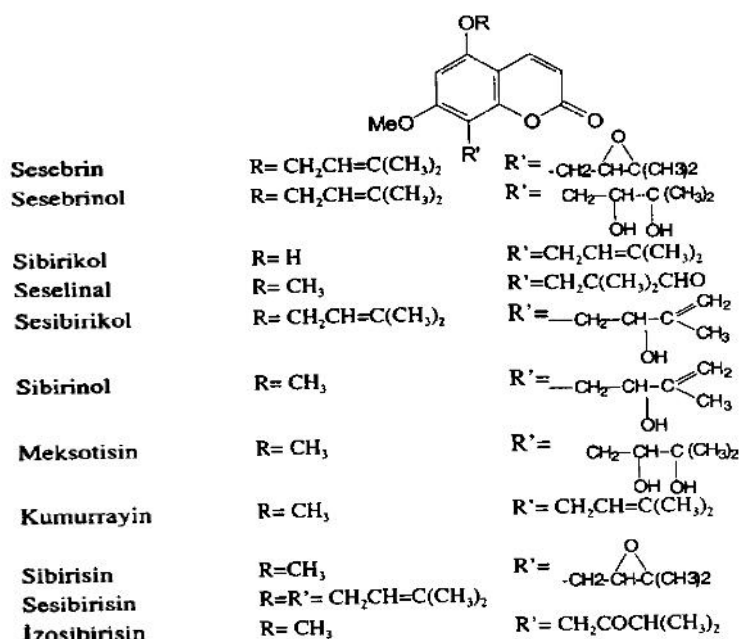
FAMIGLIA	SPECIE BOTANICA
APIACEAE	Varie
POACEAE	Varie
CAPRIFOLIACEAE	<i>Viburnum prunifolium</i> <i>Viburnum opulus</i>
COMPOSITAE	<i>Hieracium pilo sella</i>
HIPPOCASTANACEAE	<i>Aesculus hippocastanum</i>
LEGUMINOSAE	<i>Melilotus officinalis</i> <i>Melilotus albus</i> <i>Trifolium pratense</i>
MORACEAE	<i>Ficus carica</i>
RUBIACEAE	<i>Galium trifolium</i>
RUTACEAE	<i>Ruta Graveolens</i> Agrumi
UMBELLIFERAE	<i>Ferula asa foetida</i> <i>Pimpinella anisum</i> <i>Petroselinum sativum</i>

Tabella 4.1 Famiglie in cui sono presenti le cumarine.

Le cumarine si ritrovano anche in alcune famiglie di monocotiledoni come *Gramineae* e le *Orchidaceae*. Sono contenute in diverse parti della pianta, vengono sintetizzate soprattutto nelle foglie, ma se ne trovano alti livelli anche nei frutti, nelle radici e infine nei semi. La distribuzione delle cumarine biologicamente attive in una vasta gamma di piante sembra essere correlato con la loro capacità di agire come fitoalessine. Perciò si formano in risposta a lesioni traumatiche o malattie, durante il processo di appassimento o essiccazione, si accumulano sulla superficie delle foglie, frutti e semi, e inibiscono la crescita e la sporulazione di funghi patogeni e agiscono come repellenti contro scarafaggi e altri invertebrati terrestri (Weinmann 1997, Matern 1999). In altri casi le cumarine vengono dilavate dalle radici, come ad esempio dall’Avena selvatica, e nel terreno forniscono uno strumento di difesa contro i microrganismi ostili (Ojala 2001). Inoltre le cumarine sono attive anche nel metabolismo della pianta, prendendo parte nella regolazione della crescita (Weinmann 1997; Matern 1999). Le furano-cumarine, in particolare, sono note per inibire la crescita delle radici nelle punte e sembrano indurre disturbi della membrana, mentre la loro escrezione sulla superficie dei semi potrebbe essere un mezzo per ritardarne la germinazione (Ojala 2001).

4.2.1.3 Le cumarine nel genere *Seseli*.

Nel genere *Seseli* sono state isolate numerose curarine semplici come il sesebrinol, il sibirisin il seselinal, l’ostolo (Fig. 4.4); numerose furanocumarine angolari e lineari (Fig. 4.5./4.6) e piaranocumarine angolari e lineari (Fig. 4.7/4.8) (Tosun 2003).



Ostolo

Tortosuid

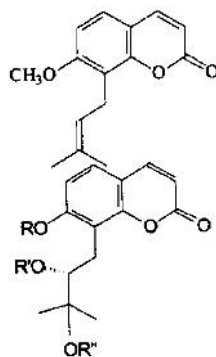
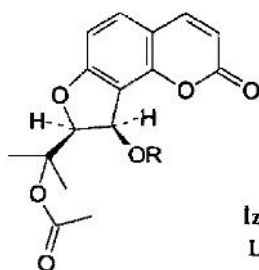
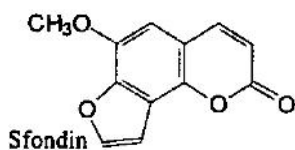


Fig. 4.4 Cumarine isolate dal Genere *Seseli*

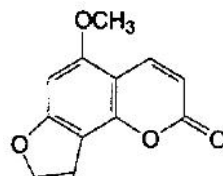


Izopösenidin
Libanotin

$\text{R}=\text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
 $\text{R}=\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$

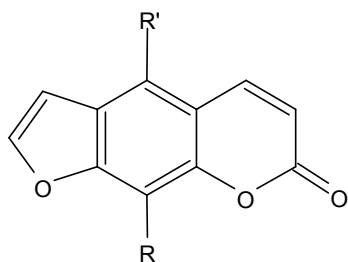


Sfondin



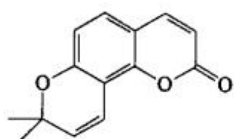
Isobergatene

Fig. 4.5 Furocumarine angolari isolate dal Genere *Seseli*

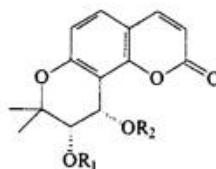


Psoralen	$\text{R}=\text{H}$	$\text{R}'=\text{H}$
Imperatorin	$\text{R}=\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}'=\text{H}$
Izoimperatorin	$\text{R}=\text{H}$	$\text{R}'=\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
Allozoimperatorin	$\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}'=\text{OH}$
Bergapten	$\text{R}=\text{H}$	$\text{R}'=\text{OCH}_3$
Ksantotoksin	$\text{R}=\text{OCH}_3$	$\text{R}'=\text{H}$
Ksantotoksol	$\text{R}=\text{OH}$	$\text{R}'=\text{H}$
Izopimpinellin	$\text{R}=\text{OCH}_3$	$\text{R}'=\text{OCH}_3$
Fellopterin	$\text{R}=\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}'=\text{OCH}_3$
Oksipösedanin hidrat	$\text{R}=\text{H}$	$\text{R}'=\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{CH}_3)_2$

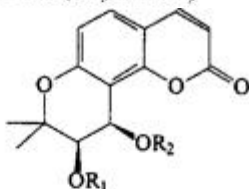
Fig. 4.6 Furocumarine lineari isolate dal Genere *Seseli*



Seselin

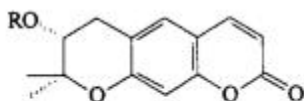


- $R_1=R_2= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
 $R_1= \text{COCH}_3$
 $R_1=R_2= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$
 $R_1= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$
- $R_2= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
 (Anomalin, Praeruptorin B)
 $R_2= \text{COCH}_3$ (Izopteriksin, Praeruptorin A)



- | | |
|--|--|
| $R_1=R_2= \text{H}$ | trans-kellakton |
| $R_1=R_2= \text{H}$ | cis-kellakton |
| $R_1= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ | $R_2= \text{H}$ (cis) |
| $R_1= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ | $R_2= \text{COCH}_3$ (cis) |
| $R_1= \text{H}$ | $R_2= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (cis) |
| $R_1= \text{COCH}_3$ | $R_2= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (cis) |
| $R_1=R_2= \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (cis) | $R_2= \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (cis) |
| $R_1=R_2= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (cis) | $R_2= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ (cis) |
| $R_1= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ | $R_2= \text{COCH}_3$ (Bokkonin) |
| $R_1= \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | $R_2= \text{H}$ |
| $R_1= \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ | $R_2= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ (Pteriksin) |
| $R_1= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ | $R_2= \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ |
| $R_1= \text{COCH}_3$ | |
| $R_1= \text{COCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ | |

4.7 Pirano-cumarine angolari isolate dal genere *Seseli*.



- $R= \text{COCH}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (-)-2'-senesioiloksi-1',2'-dihidroksantiletin
 $R= \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (-)-2'-izovaleriloksi-1',2'-dihidroksantiletin

4.8 Pirano-cumarine lineari isolate dal genere *Seseli*.

Dalla *Seseli devenyense* sono stati isolati due khellactoni: il (+)-4'-Decanoyl-cis-khellactone e il (+)-3'-Decanoyl-cis-khellactone (fig. 4.9) (Widelski 2005).



(+)-3'-Decanoyl-*cis*-khellactone

(+)-4'-Decanoyl-*cis*-khellactone

Fig. 4.9 Khellactoni isolati dalla *Seseli devenyense*. (Widelski 2005).

In uno studio su varie sottospecie della *Seseli Bocconi* sono stati isolati diversi khellactoni (fig. 4.10)(Bellino 1986).

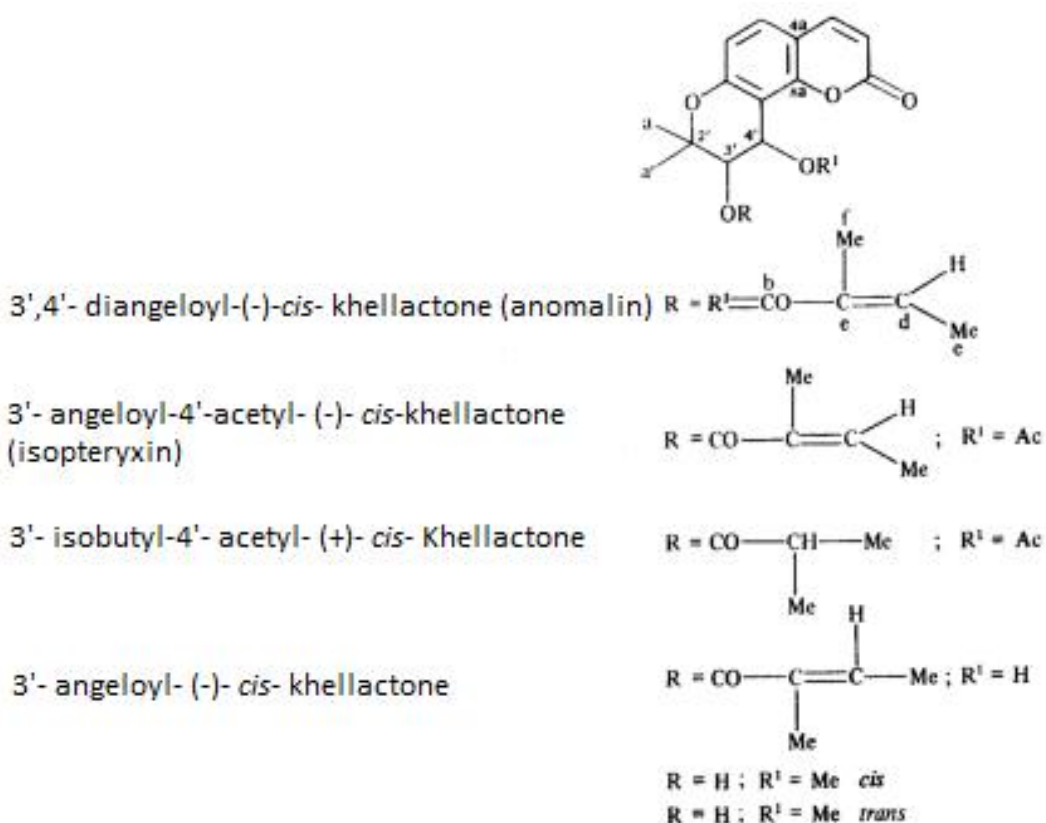


Fig. 4.10 Khellactoni isolati dalla *Seseli Bocconi* (Bellino 1986).

4.2.1.4 Attività farmacologiche e terapeutiche

Le cumarine sono state ampiamente studiate e hanno dimostrato di possedere diverse proprietà farmacologiche, ma anche effetti avversi. Inoltre bisogna sottolineare che hanno una biodisponibilità assoluta nell'uomo abbastanza bassa a causa di un esteso metabolismo epatico di primo passaggio (Ricciuti 2004). Le proprietà farmacologiche sono riassunte in tabella 4.2.

AZIONE FLEBOTONICA	AZIONE ANTITUMORALE
AZIONE ANTINFIAMMATORIA	AZIONE EPATOPROTETTICE
AZIONE SPASMOLITICA	AZIONE INIBITRICE DELLA 5ALFA-REDUTTASI
AZIONE ANTIBATTERICA	AZIONE ANTIMALARICA
AZIONE ANTIVIRALE	AZIONE NELL'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI
AZIONE ANTICOAGULANTE	AZIONE IMMUNOSOPPRESSIVA
AZIONE FOTOSENSIBILIZZANTE	AZIONE ESTROGENICA
AZIONE ANTIOSSIDANTE	

Tabella 4.2 Azioni farmacologiche delle cumarine.

Di tutte le cumarine introdotte in terapia in Italia come farmaci sono rimaste in commercio solo il warfarin e l'acenocumarolo (fig. 4.11) impiegati per il trattamento e la prevenzione delle malattie tromboemboliche arteriose e venose.

Il warfarin e gli anticoagulanti ad esso correlati bloccano la produzione epatica di alcuni fattori della coagulazione, attraverso l'inibizione di una reazione vitamina K- dipendente. In particolare le cumarine bloccano l'enzima epossido-reduttasi, deputato all'attivazione della vitamina K ad epossido (Ricciuti 2004).

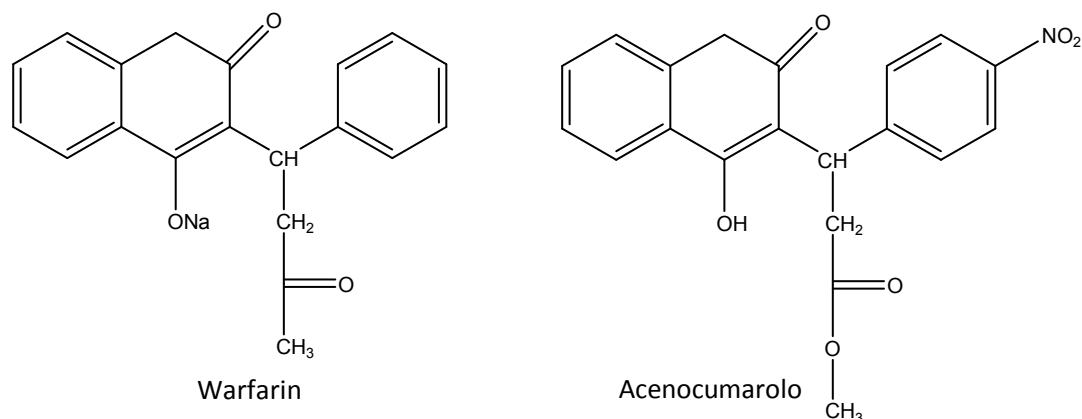


Fig. 4.11 Struttura del warfarin e dell'acenocumarolo.

Gli psolareni trovano utilizzo nella fotochemioterapia, trattamento che consiste nella somministrazione *per os* (o nell'applicazione topica) di uno psolarene, il paziente viene successivamente esposto a radiazioni UVA (320-400nm). La vitiligine (affezione cutanea caratterizzata da macchie bianche sulla pelle), la psoriasi, (anomala produzione dello strato più esterno della pelle), la mucosi fungoide e l'alopecia areata rispondono bene alla fotochemioterapia. Il meccanismo di fototossicità sulla pelle non è ancora del tutto chiarito; ma sono invece note le proprietà carcinogeniche e mutagene degli psolareni, questo è dovuto alla formazione di addotti con le basi pirimidiniche del DNA, come la timina, attraverso una ciclo addizione (Henrich 2004).

Inoltre lo psolarene è capace di interagire con diverse strutture biologiche; particolarmente interessante è l'interazione con gli acidi nucleici e in particolare con il DNA (Capasso 2000).

4.2.2 I cromoni

Con il termine cromone s'intende una molecola che deriva formalmente dal benzopirano per aggiunta di un gruppo chetonico nell'anello piranico. I cromoni presentano uno scheletro di base del tipo C₆C₃. Sono molecole abbastanza rare in natura, in quanto la loro struttura chimica rappresenta la base su cui vengono addizionati o sostituiti gruppi funzionali, che danno così origine a nuove famiglie di composti. I cromoni sono stati ottenuti da alcuni membri della famiglia delle Apiaceae, come *Daucus carota* L. (Czepa 2003), *Angelica archangelica* L., e *Archangelica litoralis* Fries. (Cisowski 1988, Harkar 1984). Mentre da *Ammi visnaga* (L.) Lam sono stati isolati furocromoni (Kuster 1994).

Per quanto riguarda il genere *Seseli* il seselirin è il primo cromone isolato, è un derivato contenente zolfo ottenuto da *S. sessilifolium* Schrenk (Savina 1970) (Fig.4.12).

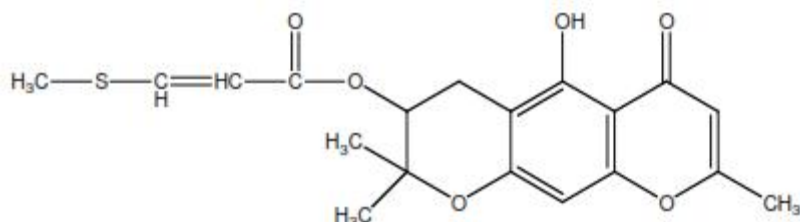


Fig. 4.12 Seselirin.

In un precedente lavoro abbiamo studiato la *Seseli Praecox* Gamisans Gamisans da cui abbiamo isolato il 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7methoxy-2-methylchromone, un nuovo composto naturale mostrato in figura 4.13. In uno studio biologico preliminare il nuovo cromone, ad una concentrazione di 10 μ M, non ha mostrato livelli di citotossicità associata ad effetti antiproliferativi apprezzabili. Successivamente è stato

testato su diverse linee cellulari tumorali ed è risultato che nelle cellule Jurka T e nelle cellule leucemiche HL60 presenta una IC_{50} di circa 20 μ M (Leonti et al. 2010).

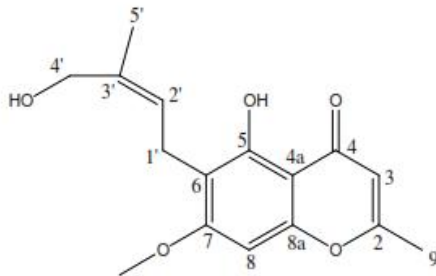


Fig. 4.13 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl) 7-methoxy-2-methylchromone.

Il peucenin-7-methylether (fig. 4.14), un composto strutturalmente simile al precedente è stato isolato dalla famiglia delle Rutaceae (Razdan et al. 1987) ed è stato anche da noi ottenuto in questo studio, insieme ad altri cromoni.

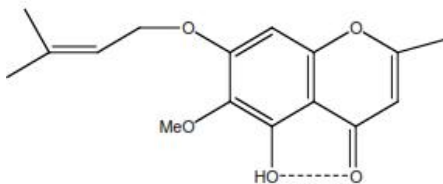


Fig. 4.14 Peucenin-7-methylether.

4.2.3 Fenilpropanoidi

I fenilpropanoidi (C_6-C_3) rappresentano un gruppo molto numeroso di prodotti naturali ampiamente diffusi nelle piante dove contribuiscono alla risposta verso tutti gli stimoli biotici e abiotici. Oltre ad essere indicatori delle risposte della pianta verso gli stress dovuti al variare della luce o del terreno, sono anche mediatori chiave delle piante verso i parassiti (La Camera 2004). Inoltre intervengono anche nella riproduzione delle piante (Dudareva 2004). I Fenilpropanoidi costituiscono il punto di partenza di metaboliti secondari più complessi come i lignani e i tannini che contribuiscono in modo sostanziale alla stabilità e alla robustezza delle gimnosperme e delle angiosperme verso danni ambientali, come siccità o fermento, ma dalla stessa via biosintetica derivano anche i flavonoidi e le cumarine. Infatti la diversità dei fenilpropanoidi, è il risultato dell'efficiente modifica e dell'amplificazione di un insieme molto limitato di strutture di base, derivato dalla via dell'acido scikimico (Herrmann, 1995).

Sono caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico con una catena alifatica laterale (con tre atomi di carbonio derivati dall'acido shikimico) e sono privi di zolfo; quindi la loro struttura, come evidente dal nome, è caratterizzata da un'unità propanoica (Capasso et al 2008).

Normalmente questi composti si ritrovano in forma coniugata e la loro presenza in forma libera, in genere, rappresenta la conseguenza di un artefatto (idrolisi chimica od enzimatica) verificatosi durante l'estrazione dai tessuti vegetali. Gli acidi idrossicinnamici ed i loro derivati possono esistere sia in forma *cis* (Z) che in forma *trans* (E), interconvertibile l'una nell'altra specialmente per effetto della luce UV: La forma prevalente in natura è quella *trans*, che si presenta molto più stabile (Capasso et al 2008).

Dalla *Seseli vayredanum* sono stati isolati dei fenilpropanoidi come il 2-Epideacyllaserine ed il Laserine (Fig. 4.15) (Barrero 1992; 1994, Tosum, 2003).

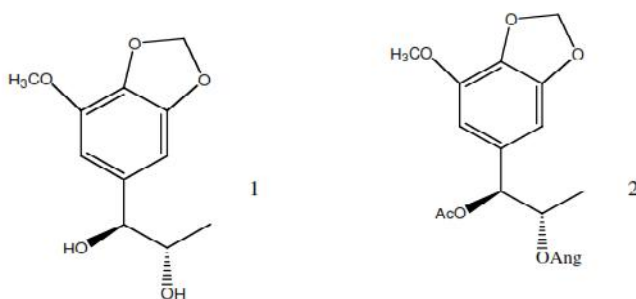


Fig. 4.15 2-Epideacyllaserine (1) e Laserine (Treo-1-acetoxo-2-angeloiloxo-3',4'-methilendioxy-1-phenilpropan (2).

4.2.4 Lignani

I lignani (C_6-C_3)₂, sono un ampio gruppo di metaboliti secondari presenti nei tessuti legnosi delle piante, strutturalmente derivano dal fenilpropano (Capasso 2008). Nelle piante edibili sono presenti come glucosidi strettamente associati ai costituenti della fibra; nelle parti legnose sono principalmente presenti come agliconi (Baiano 2010). I lignani esplicano attività antitumorale (particolarmente nei confronti del tumore al colon e al seno) (Baiano 2010) per questo motivo rivestono un grande interesse farmacologico; inoltre possiedono proprietà antibatteriche e antifungine, grazie alle quali, le piante si difendono dall'aggressione dei microrganismi (Capasso 2008). I lignani aiutano l'organismo femminile ad utilizzare gli estrogeni. Nelle donne in età fertile con livelli elevati di estrogeni, i lignani possono prevenirne il sovraccarico, di conseguenza, lo sviluppo dei tumori indotti dagli estrogeni. Nelle donne in menopausa, i lignani agiscono come gli estrogeni prevenendo la perdita di materiale osseo. (Baiano 2010).

I lignani sono ampiamente distribuiti nei cereali, come il germe di grano, il riso, il frumento, la crusca; inoltre sono presenti nei semi di lino, nei vegetali e nella frutta quale: frutti di bosco, ciliegie, mirtili e pappa reale. (Tratto da: www.farmasalute.it).

In una recente comunicazione del 2007 (Vuckovic) è stata riportata l'attività citotossica di quattro lignani (di cui uno nuovo) isolati dalle parti aeree della *Seseli annuum* (trovata in Serbia): eudesmina, magnone A, hernone ed il nuovo seselidone (Fig. 4.16).

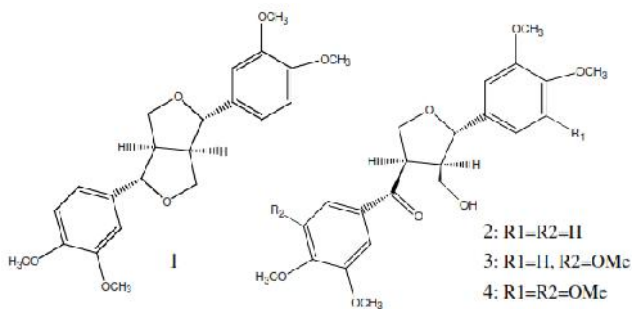


Fig. 4.16 Lignani citotossici isolati dalla *Seseli annuum*. Eudesmina (1), Magnone A (2), Hernone (3), Seselidone (4).

4.2.5 Terpeni

I terpeni o terpenoidi sono una grande classe di metaboliti secondari prevalentemente di origine vegetale. Sono in genere classificati tra i lipidi non saponificabili, in quanto ne condividono molte proprietà, prima fra tutte quella di essere solubili in solventi poco polari, ed in virtù della loro origine biosintetica vengono definiti isoprenoidi, infatti essi derivano dalla condensazione di unità isopreniche a cinque atomi di carbonio (fig. 4.17), e possono essere lineari, ciclici o entrambi.

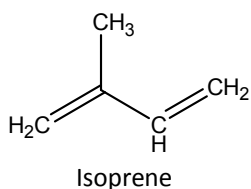


Fig. 4.17 Formula dell'isoprene.

Le unità isopreniche risultano legate in modo testa-coda nella struttura terpenoidica; a seconda del numero di queste unità si ha la classificazione (fig.4.19).

Classificazione	Unità isopreniche	Atomi di carbonio
Emiterpeni	1	5
Monoterpeni	2	10
Sesquiterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sesquiterpeni	5	25
Triterpeni	6	30
Tetraterpeni	8	40

Fig. 4.18 Classificazione dei terpeni.

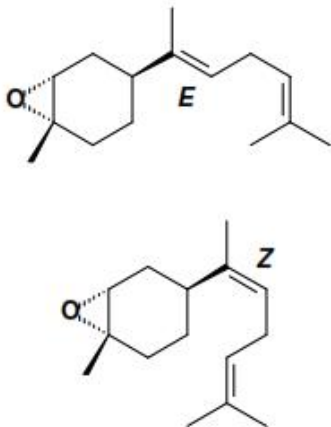
Quando i terpeni sono modificati con reazioni tali da portare alla formazione di gruppi funzionali contenenti atomi diversi dal carbonio, come gruppi idrossilici, carbonilici o contenenti azoto, vengono chiamati terpenoidi (vitamine liposolubili A, D, E, K) (Capasso et al. 2008). I terpeni vengono prodotti da molte piante, soprattutto conifere e da alcuni insetti, sono i componenti principali delle resine e degli oli essenziali delle piante, sono quindi miscele di sostanze che conferiscono a ogni fiore o pianta un caratteristico odore o aroma. Rappresentano anche i precursori biosintetici degli steroidi e del colesterolo. L'isoprene deriva dall'acetato attraverso la via dell'acido mevalonico, il quale, prima di prendere parte a reazioni biosintetiche, viene trasformato in Δ^3 -isopentenil pirofosfato, che rappresenta l'isoprene "attivo", cioè il nucleo di base presente nelle strutture terpeniche.

I terpenoidi trovano applicazione come agenti terapeutici in diversi tipi di patologie dell'apparato respiratorio, gastrointestinale e nervoso (Capasso et al. 2008).

4.2.6 Sesquiterpeni

I sesquiterpeni sono dei terpeni a 15 atomi di carbonio e possono essere classificati in tre gruppi principali: aciclici, monociclici e biciclici (Capasso 2008). Il precursore di questi composti è il farnesilpirofosfato, che si origina per condensazione del geranilpirofosfato e dell'isopentenilpirofosfato. Caratteristica di questi composti è che possono incorporare scheletri molto diversi (a catena aperta, monociclici, biciclici, triciclici) che portano numerose funzioni ossigenate (alcoli, aldeidi, chetoni, acidi etc) e legami multipli carbonio-carbonio, dando origine a composti naturali molto complessi (Rosati 2009). Questi prodotti naturali sono costituenti di un gran numero di oli volatili, dalle proprietà antimicrobiche e insetticide e costituiscono i prodotti di difesa della pianta (Henrich 2004). I sesquiterpeni sono presenti, oltre che nelle piante superiori anche nei microrganismi,

animali marini e negli insetti, dove svolgono la funzione di ferormoni (fig. 4.19) (Capasso 2008).



Questi **epossidi bisabolenici** isomeri sono stati riconosciuti essere il componente principale del ferormone di aggregazione della *Nezara viridula*, insetto infestante diverse coltivazioni, come ad esempio quelle della soia.

Fig. 4. 19 Esempio di sesquiterpeni con funzione di ferormoni.

Un gran numero presenta un'addizionale funzione lattonica e a questa categoria appartengono i lattoni sesquiterpenici: si tratta di composti caratteristicamente presenti nelle piante appartenenti alla famiglia delle Compositae, biologicamente molto attivi, che possono essere responsabili di effetti molto tossici per l'uomo. Ai sesquiterpeni appartengono anche gli azuleni, che sono composti relativamente instabili, caratterizzati dal colore blu. Uno tra i più importanti sesquiterpeni è sicuramente l'artemisinina (Fig. 4.22), dalle interessanti proprietà antimalariche (Henrich 2004).

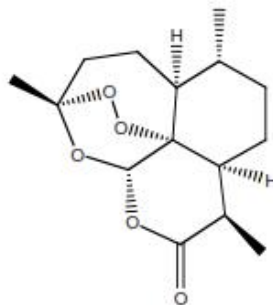


Fig. 4. 20 Artemisinina.

Inoltre i sesquiterpeni risultano essere liposolubili e quindi vengono rapidamente assorbiti a livello del SNC, per questo motivo mostrano interessanti proprietà antimalariche (Henrich 2004).

Nel genere *Seseli* sono stati isolati numerosi sesquiterpeni, alcuni dei quali vengono riportati in Figura 4.21. (Tosun 2003; Barrero 1992; Barrero 1994).

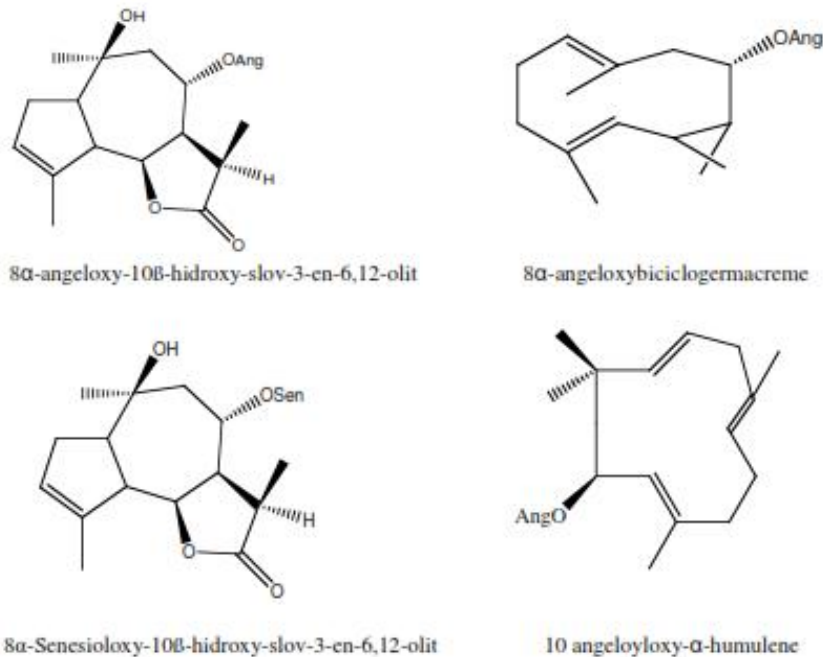


Fig. 4.21 Alcuni sesquiterpeni isolati dal genere *Seseli*.

4.2.7 Poliacetileni

Un'altra classe di composti, che caratterizzano lo spettro dei metaboliti secondari delle Apiaceae, sono i poliacetileni (Hu 1990, Zidorn 2005).

I poliacetileni sono interessanti marcatori chemosistematici per un certo numero di famiglie di piante superiori le Apiaceae, Araliaceae e Asteraceae (Bohlmann 1973; Hansen 1986). I poliacetileni sono noti per i loro effetti nematodici, i quali possono essere utilizzati con successo in agricoltura biologica (Chitwood, 2002), inoltre dimostrano avere potente attività antifungina (Muir 1982; Rollinger 2003) e antibatterica (Kim 2003). I poliacetileni hanno dimostrato essere inibitori di una serie di enzimi come ad esempio il diacilglicerolo aciltransferasi (Lee 2004), induttori dell'ossido di azoto sintasi (Wang 2000; Bae 2001), del colesteril estere e del trasferimento di proteine (Kwon 1996) così come enzimi di microsomiali e mitocondriali (Kim 2003).

Esperimenti in vitro indicano che alcuni poliacetileni potrebbero avere attività antiallergenica (Wang 2001) ed antinfiammatoria (Resch 2001). Inoltre, i poliacetileni hanno dimostrato di essere citotossici nei confronti di una serie di linee cellulari di cancro solidi e leucemici (Kim 1989, Matsunaga 1990, Ito 2001, Zidorn 2005) e di potenziare la citotossicità di altre droghe anti-cancro (Matsunaga 1994).

Un uso medicinale di puri poliacetileni non è fattibile a causa della loro pronunciata instabilità chimica e della loro capacità di indurre reazioni allergiche (Hausen 1987). Infatti un certo numero di piante che contengono C-poliacetileni sono state segnalate per le reazioni irritanti della pelle che causano la dermatite allergica da contatto (ACD) ed il falcarinolo è stato indicato come responsabile della maggior parte delle reazioni allergiche della pelle causate dalle Apiaceae e dalle Araliaceae. Tuttavia, il consumo di prodotti alimentari contenenti poliacetileni potrebbe avere un vantaggio chemiopreventivo. Effetti negativi a causa di un eccessivo apporto di poliacetileni con la dieta umana non sono da prevedere, perché i poliacetileni hanno un sapore amaro in alte concentrazioni (Czepa 2003). È importante quindi sottolineare che la qualità e la purezza dei poliacetileni è cruciale prima di una analisi biologica. I poliacetileni sono termicamente instabili e possono subire la foto decomposizione se esposti alla luce del sole.

4.2.7.1 I poliacetileni nel genere *Seseli*

Dalle radici della *Seseli gummiferum* è stato isolato il falcarinolo (Larsen 1969). Dalla *Seseli mairei* è stato isolato il Seselidiolo studiato per la sua attività antitumorale (Hu 1990) (Figura 4.23).

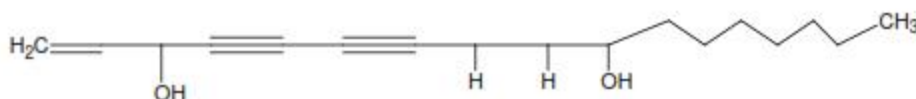


Fig. 4.24 Seselidiolo, un poliacetilene isolato dalla *Seseli mairei*.

In un precedente lavoro sulla *Seseli Praecox* Gamisans Gamisans abbiamo isolato diversi derivati poliacetilenici: un nuovo composto, il dihydroseseliolo o heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diolo (Figura 4.22), il falcarindiolo, il falcarinolo e i suoi prodotti di degradazione (ginsenoyne J, falcarinone, E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol) (Figura 4.23).

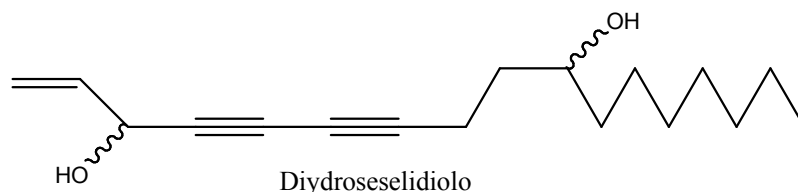


Fig. 4.22 Struttura del nuovo poliacetilene da noi isolato dalla *Seseli Praecox* Gamisans Gamisans.

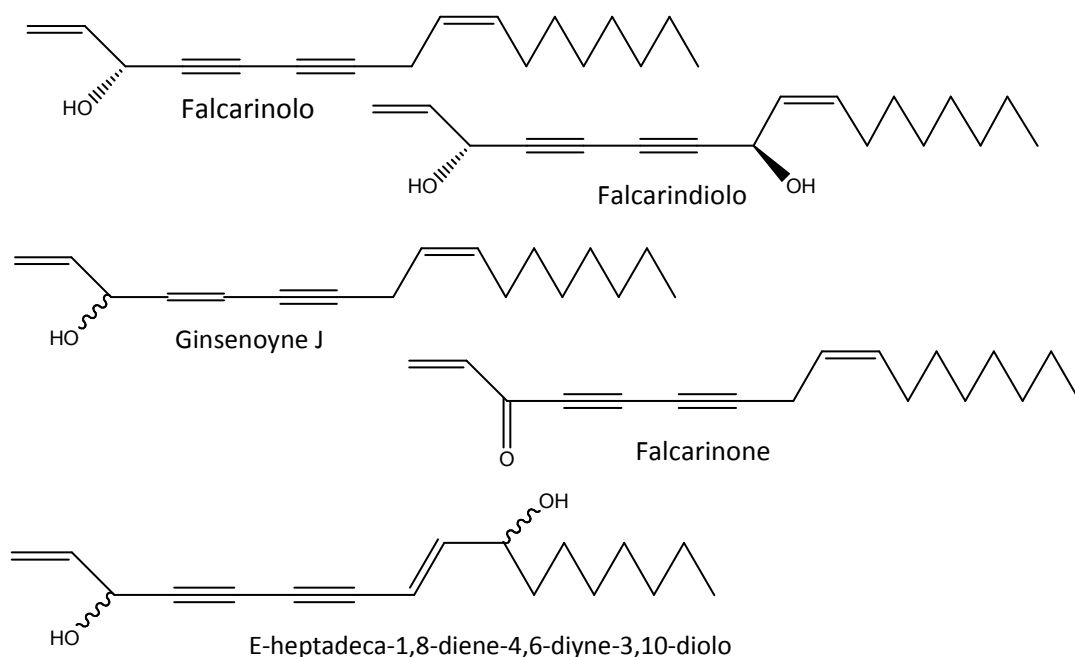


Fig. 4.23 Composti isolati dalla *Seseli Praecox* Gamisans Gamisans.

Il falcarinolo, noto anche col nome di panaxinolo e carotatoxin, è un irritante della pelle e si trova nelle carote, nel prezzemolo, nel sedano e anche nella nota pianta medicinale *Panax ginseng* (Leonti et al. 2010). È stato recentemente dimostrato un effetto dose-dipendente bifasico del falcarinolo sulle cellule epiteliali (Hansen et al.1986, Calabrese 2003). Basse concentrazioni di falcarinolo stimolano la crescita di queste cellule, di contro, concentrazioni superiori hanno dato un effetto inibitorio. Ciò è in linea con il presupposto che i metaboliti secondari bioattivi contribuiscono agli effetti benefici di una dieta ricca di frutta e verdura contro il cancro e le malattie cardiovascolari (Hansen et al. 1986). Negli esseri umani, è stato dimostrato di recente che il falcarinolo presente nelle carote è biodisponibile in concentrazioni biologicamente rilevanti (Brandt et al. 2004).

È stato anche dimostrato che la dieta ricca di falcarinolo, inibisce lesioni cancerose nei topi trattati con sostanze cancerogene azoxymethane (Brandt, et al. 2004).

Il falcarinolo ed altri poliacetileni inibiscono la germinazione delle spore di differenti funghi, ed è probabile che vengano prodotti dalle piante come antimicotici.

Il falcarinolo da noi estratto è risultato essere responsabile dell'attività sui recettori CB riscontrata nell'estratto in DCM dei fusti della *Seseli praecox* Gamisans Gamisans. L'estratto in toto (sciolto in DMSO), infatti, è risultato avere la capacità concentrazione-dipendente di spostare il ligando [3H] CP55,950 recettoriale non-selettivo dei cannabinoidi dai recettori

CB (Gertsch et al 2008). È importante sottolineare che l'interazione di legame con i recettori CB rilevata non era dovuta ad effetti non specifici della membrana. Inoltre, il falcarindiolo non ha mostrato affinità rilevabili verso i recettori CB.

Il falcarinolo è stato identificato come il composto principale responsabile delle reazioni allergiche cutanee causate da specie Araliaceae (Hansen et al. 1986) e Apiaceae (Murdoch et al. 2000). Questo si lega sul sito di legame del recettore CB₁ dell'anandamide e potentemente inibisce l'azione della stessa agendo come agonista inverso covalente e potenzialmente irreversibile (cioè antagonista). I nostri studi suggeriscono che l'inibizione dell'azione dell'anandamide a livello dei recettori CB₁ è collegata agli effetti pro allergenici riportati precedentemente per questo poliacetilene ed i nostri risultati in vivo con il prick test istamina lo confermano ulteriormente. Quindi il falcarinolo aggrava la formazione di edema indotta da istamina negli esseri umani, indicativo di un meccanismo mediato dal recettore CB₁.

BIBLIOGRAFIA

Austin PW. Et al (1968). Components of *Seseli sibiricum*. Constitution and synthesis of sibiricin, a new coumarin. *Tetrahedron*, 24, pg: 3247-3253.

Bae EA., et al (2001). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of panaxytriol isolated from ginseng. *Arch Pharm Res.*, 24, pg: 297-299.

Baiano A. et al. (2010). I composti fenolici negli alimenti. Classificazione, distribuzione, metodi di estrazione e analisi. ARACNE editrice S.r.l. via Raffaele Garofalo, 133/A – B 00173 Roma.

Barrero A. et al. (1992). Sesquiterpenes and phenylpropanoids from *Seseli vayredanum*. *Phytochemistry*, 31, pg: 203-207.

Barrero A. et al. (1994). Sesquiterpene lactones and other constituents of *Seseli vayredanum*. *Phytochemistry*, 37, pg: 1351-1358.

Bellino A. et al (1986). Coumarins from *Seseli bocconi*. *Phytochemistry*, 25, 1195-1199.

Bohlmann F. et al (1978). Einige neue furanoeremophilane aus Senecio-Arten. *Phytochemistry*, 17, pg: 467-470.

Brandt K., et al. (2004). Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, pg: 384–393.

Calabrese EJ., Baldwin LA., (2003). The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol. Sci.*, 71, pg: 246–250.

Capasso F. et al (2008). Farmacognosia, farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico. Springer-Verlag Milano Italia pg: 189-190, 201-203, 241-244, 454.

Chitwood DJ., (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Rev. Phytopathol.*, 40, pg: 221-249.

Cisowski W., Grimshaw J., (1988). Glucoside of chromone from *Angelica archangelica* L. and *Archangelica litoralis*. *Fries. herbs. Polish Journal of Chemistry*, 62, pg: 135-140.

Czepa A., Hofmann T., (2003). Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pg: 3865-3873.

Dudareva, N. et al. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol*, 135, pg: 1893–1902.

Egan D. et al. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis and application of coumarin coumarin-related compounds. Marcel Dekker inc, pg: 504-529.

Gertsch J. et al. (2008). Beta-Caryophyllene is a Dietary Cannabinoid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 105, pg: 9099–9104.

Gertsch J. et al. (2008). Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. *Planta Medica*, 74, pg: 638–650.

Hansen L., Boll P., (1986). Polyacetylenes in Araliaceae: Their Chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry*, 25, pg: 285–293.

Hansen L. et al. (1986). Allergic contact dermatitis from falcarinol isolated from *Schefflera arboricola*. *Contact Dermatitis*, 14, pg: 91–93.

Harker S. et al. (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry*, 23, pg: 419- 426.

Hausen BM., et al (1987). Allergic and irritant contact dermatitis from falcarinol and dihydrofalcarinol in common ivy (*Hedera helix* L.). *Contact Dermatitis*, 17, pg: 1–9.

Henrich M. et al. (2004). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Churchill Livingstone, pg: 73-75, 81-82.

Herrmann, K. (1995). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*, 107, pg: 7–12.

Herz W., et al(2002). Eds. Springer-Verlag: Wien, 83, pg: 1-529.

Hu CQ., et al (1990). Antitumor agents, 115. Seselidiol, a new cytotoxic polyacetylene from *Seseli mairei*. *Journal of Natural Products*, 53, pg: 932-935.

Ito A., et al (2001). Cytotoxic polyacetylenes from the twigs of *Ochanostachys amentacea*. *Journal of Natural Products*, 64, pg: 246-248.

Karniol IG., et al (1975). Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinol in man. *Pharmacology*, 13, pg: 502-512.

Kim JM., et al (2003). Falcarindiol inhibits nitric oxide-mediated neuronal death in lipopolysaccharide-treated organotypic hippocampal cultures. *Neuroreport.*, 14, pg: 1941-1944.

Kuster RM., et al (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry*, 36, pg: 221-223.

Kwon BM., et al (1996). Isolation of cholesteryl ester transfer protein inhibitors from *Panax ginseng* roots. *Chem. Pharm. Bull.*, 44, pg: 444-445.

La Camera, S. et al. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* 198, pg: 267–284.

Lan Xie et al. (1995). Asymmetric synthesis of 3',4'-Di-O(-)-camphanoyl-(+)-*Cis*-khellactone (DCK), a potent anti-HIV agent. *Tetrahedron Letters*, 36, pg: 4529-4532.

Lan Xie et al. (1998). Anti-aids agents 33.¹ Synthesis and anti-HIV activity of mono-methyl substituted 3',4'-di-O(-)-camphanoyl-(+)-*cis*-khellactone (DCK) analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8, pg: 2151-2156.

Larsen PK., et al (1969). Constituents of Umbelliferous plants . XII. The absolute configuration of Falcarinol, an acetylenic compound from the roots of *Seseli gummiferum* Pall. *Acta Chem Scand.*, 23, pg: 2552-2554.

Leonti M. et al. (2006). Wild gathered food plants in the European Mediterranean: a comparative analysis. *Economy botany*, 60, pg: 130-142.

Leonti M. et al. (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily- De Materia Medica revisited? *Journal of ethnopharmacology*, 121, pg: 255-267.

Leonti M., et al. (2010). Falcarinol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces pro-allergic effects in skin. *Biochemical Pharmacology*, 79, pg: 1815–1826.

Li Huang et al. (1994). 3',4'-Di-*o*-(-)-camphanoyl-(+)-ciskhellactone and related compounds: A. new class of potent anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4, pg: 593-598.

Matern et al. (1999). Biosynthesis of coumarins. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 1, pg: 623-637. Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. Elsevier Science Ltd., Oxford, UK.

Matsunaga H., et al (1990). Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 38, pg: 3480-3482.

Morelli I. et al. (2005). Manuele dell'erboristeria. Biosintesi, estrazione e identificazione delle sostanze di origine vegetale. Casa editrice: tecniche nuove.

Muir AD., et al (1982). Antibiotic compounds from New Zealand plants. I. Falcarindiol, an anti-dermatophyte agent from *Schefflera digitata*. *Planta Med.*, 44, pg: 129-133.

Murdoch SR., Dempster J. (2000). Allergic contact dermatitis from carrot. *Contact Dermatitis*, 42, pg: 236.

Murray, R.D.H. et al.(1982). The Natural Coumarins - Occurrence, Chemistry and Biochemistry. *John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK*.

Ojala Tiina (2001). Biological Screening of Plant Coumarins. *Academic dissertation. Division of Pharmacognosy, Department of Pharmacy. Faculty of Science. University of Helsinki*.

Pignatti (1982). Flora d'Italia.

Razdan TK., et al (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26, pg: 2063- 2069.

Resch M., et al (2001). Further phenols and polyacetylenes from the rhizomes of *Atractylodes lancea* and their anti-inflammatory activity. *Planta Medica*, 67, pg:437-442.

Ricciuti S., Cardini C., (2004). Le cumarine. *Il Policlinico Sez. Prat.*, 111, pg: 181-194.

Rollinger JM., et al (2003). Lignans, phenylpropanoids and polyacetylenes from *Chaerophyllum aureum* L. (Apiaceae). *Z. Naturforsch C.*, 58, pg: 553-557.

Rosati O. (2009). Chimica delle sostanze organiche naturali.

Savina AA., et al (1970). The structure of seselirin: A new chromone from the roots of *Seseli sessilifolium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 6, pg: 419-422.

Tosun A. et al. (2007). Coumarins from *Seseli hartvigii* roots. *Natural product communications*, 2, pg: 653-658.

Tosun A. et al. (2003). Ankara Ecz. Fack. Derg., 32, pg:269-284.

Takeuchi Y. et al. (1997). Anti-AIDS agents-XXVIII.¹ Synthesis and Anti-HIV activity of methoxy substituted 3',4'-Di-O(-)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone (DCK) analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, pg: 2573-2578.

Vučković I. et al (2007). A novel citotoxic lignan from *Seseli annum* L. *Phytotherapy research*, 21, pg: 790-792.

Wang CN., et al (2000). Inducible nitric oxide synthase inhibitors from *Saposhnikovia divaricata* and *Panax quinquefolium*. *Planta Medica*, 66, pg: 644-647.

Wang N., et al (2001). Antiallergic agents from natural sources. 3. Structures and inhibitory effects on nitric oxide production and histamine release of five novel polyacetylene glucosides from *Bidens parviflora* WILLD. *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 8, pg: 938-942.

Weinmann I. (1997). History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. . In: O'Kennedy & Thornes, pg: 1-22.

Widelski J. et al (2007). P1677 Natural coumarins from the plants *Seseli deventyense* and *Peucedanum luxurians* as in vitro antibacterial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, pg: 475.

Widelski J. et al (2005). Coumarins from the Fruits of *Seseli deventyense*. *Journal of natural product*, 68, pg: 1637-1641.

Zidorn C., et al (2005). Polyacetylenes from Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley and parsnip and their cytotoxic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pg: 2518-2523.

5 SESELI PRAECOX

5.1 Caratteristiche della pianta

La *Seseli praecox* è una pianta endemica della Sardegna e della Corsica (dove è presente solo nel golfo di Porto). In Sardegna sono presenti due endemismi: la *Seseli praecox* Gamisans Gamisans che cresce in Ogliastra (Leonti 2010a, 2010 b) da noi studiata in passato e oggetto della mia tesi di laurea e di una pubblicazione, e la *Seseli praecox* che cresce sull'isola di San Pietro oggetto del presente studio.

Il substrato dove cresce questo tipo di *Seseli praecox* è vulcanico (trachiti e andesiti), al contrario di quella ogliastrina che cresce su substrati calcarei. Le due specie presentano differenze morfologiche evidenti. Come tipo biologico appartiene ai piccoli cespuglietti suffruticosi, perenni sempreverdi, legnosi alla base (camefita).

Morfologicamente presenta le caratteristiche tipiche del genere a cui appartiene. Presenta fusti glabri, ombrelle del diametro di 2-5 cm, con una decina di raggi pubescenti. Anche i petali si presentano pubescenti e di colore bianco con fioritura estiva tardiva (da agosto fino ad ottobre). I frutti raggiungono dimensioni di 1.3-1.8 x 2.7-3.5 mm, sono pubescenti e con coste ingrossate, le brattee sono assenti, mentre le bratteole sono numerose (Pignatti 1982) (fig. 5.1 e 5.2).



Fig. 5.1. *Seseli praecox*



Fig. 5.2 Particolare di *Seseli praecox* recisa.

5.2 Luogo di raccolta

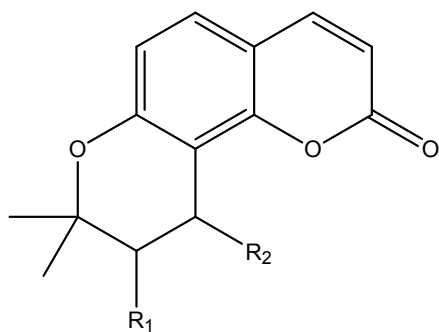
La pianta è stata raccolta nell'isola di San Pietro, località oasi Carloforte, nell'Ottobre del 2006 (Fig. 5.3). Dopo la raccolta la pianta è stata mondata e ripulita da tutte le impurità e dai corpi estranei; successivamente, per consentire l'essiccazione, la pianta è stata riposta su delle griglie di metallo, situate in un ambiente fresco e asciutto, con temperatura non superiore a 30°C (per evitare la perdita di principi attivi e l'attacco ad opera di miceti e/o animali); infine, dopo l'essiccazione, la pianta è stata conservata in appositi contenitori e tenuta in un locale buio, fresco e asciutto. La pianta è stata identificata e classificata dal Dr. Marco Leonti e riportata in erbario (Leonti 601) presso l'Università di Zurigo e l'ETH (Z/ZT) di Zurigo.



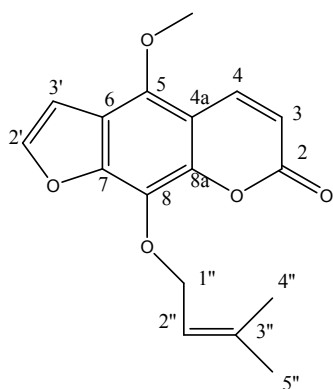
Fig. 5.3 Momento della raccolta.

5.3. Risultati fitochimici della *Seseli praecox*

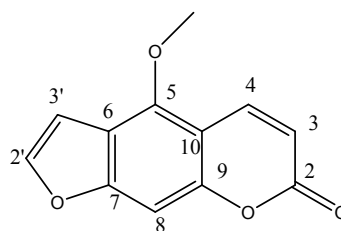
Nel presente studio sono stati isolati e delucidati cinque khellactoni (**1-5**), cinque furocumarine (**6-10**), due cumarine (**11-12**), tre cromoni (**13-14-15**), il falcarinolo (**16**) e il falcarindiolo (**17**).



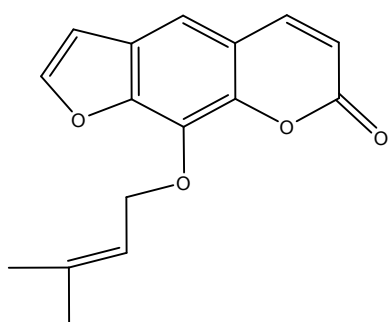
Compound	R ₁	R ₂
1		
2		
3		
4		
5	OH	OH



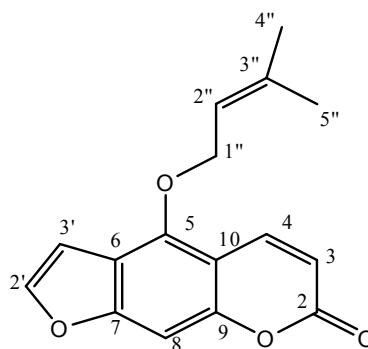
6 Phellopterina



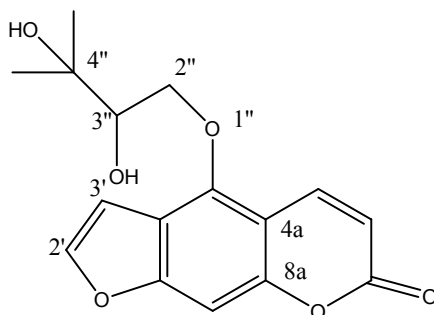
7 Bergaptene



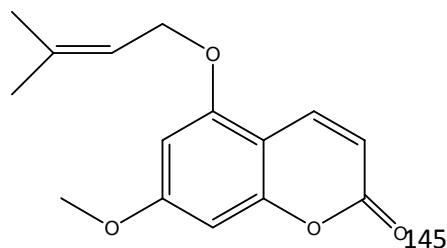
8 Imperatorina



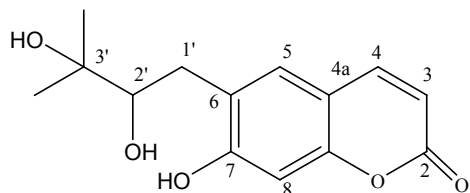
9 Isoimperatorina



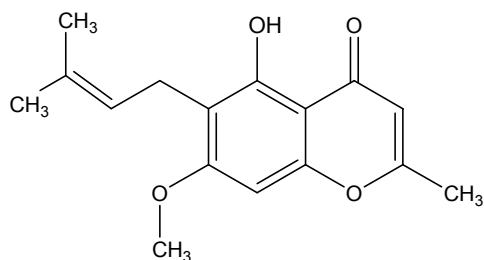
10 4-(2,3-Dihydroxy-3methylbutoxy)-7h-Furo[3,2-G]Chromen-7-One



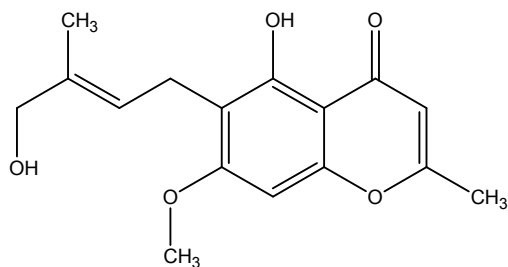
11 7-Methoxy-5-[(3-Methyl-2-Butenyl)Oxy]-2h-Chromen-2-One



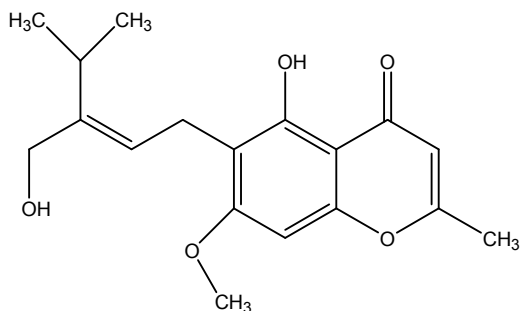
12 6-(2,3-Dihydroxy-3-Methyl-Butyl)-7-Hydroxy-Chromen-2-One



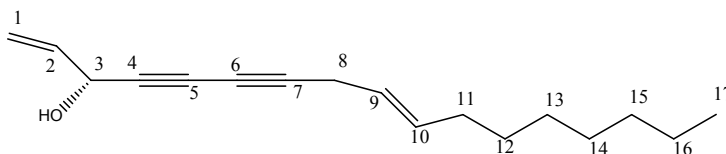
13 Peucenin-7-methylether



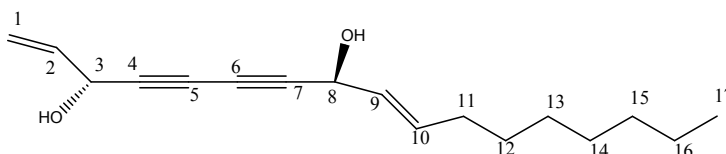
14 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl) 7methoxy-2-methylchromone.



15 5-hydroxy-6-[(E)-3-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-pentenyl]-7-methoxy-2-methyl-4H-chromen-4-one



16 Falcarinolo



17 Falcarindiolo

5.4 Estrazione e isolamento

Un Kg di fusti essiccati e polverizzati di *Seseli praecox* sono stati fatti percolare estensivamente, inizialmente con diclorometano (DCM) e successivamente con metanolo (MeOH). Dalla percolazione con solventi si sono ottenuti rispettivamente 42 e x 19g di estratto crudo.

5.4.1 Frazionamento dell'estratto diclorometanico.

Un'aliquota di 10g dell'estratto in DCM è stata frazionata attraverso cromatografia liquida sotto vuoto (VLC) usando 115 g di gel di silice (0.040-0.063 mm) come fase stazionaria. Inizialmente come fase mobile è stata utilizzata una miscela esano/diclorometano (DCM), approssimativamente 50 mL per ciascuna frazione (3:7 per le frazioni 1-4; 1.5:8.5 per le frazioni 5-11 e 100% DCM per le frazioni 12-19); successivamente è stata utilizzata una miscela DCM/acetato di etile (EtOAc) (9:1 per le frazioni 13-28 e 100% EtOAc per le frazioni 29-34). Dopo la comparazione in cromatografia su strato sottile (TLC) delle 34 frazioni ottenute e viste le similarità sono state riunite in 10 distinte frazioni.

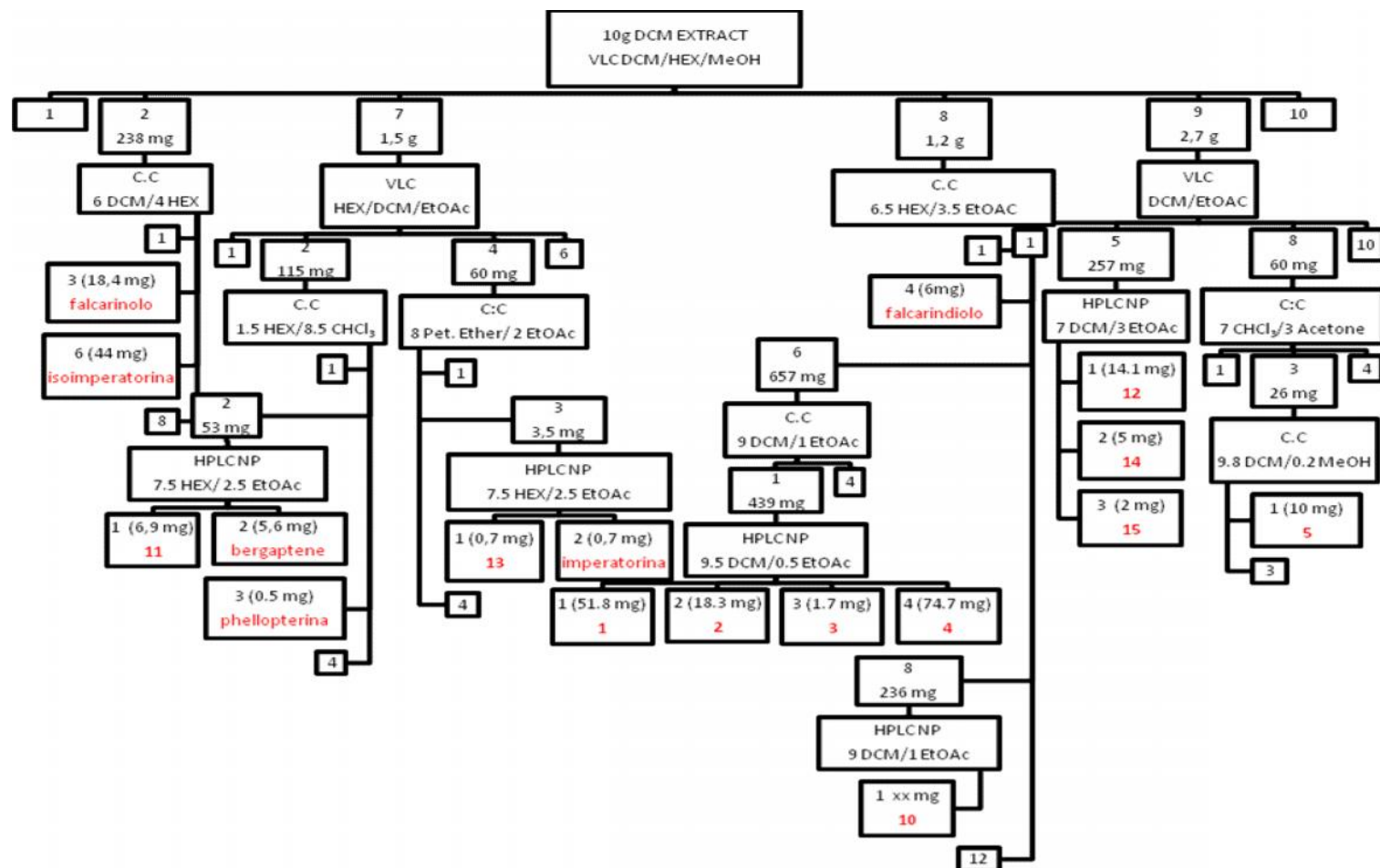
La frazione 2 (238 mg) viene cromatografata in colonna aperta (CC) utilizzando circa 106 g di gel di silice come fase stazionaria e una miscela di diclorometano ed esano (6 DCM: 4 Hex) come fase mobile, si ottengono così 8 subfrazioni. La frazione 2.3 (18.4 mg) corrisponde al falcarinolo puro (**14**), mentre la frazione 2.6 (44 mg) corrisponde all'isoimperatorina (**9**). La frazione 7 (1.5 g) è stata frazionata tramite VLC usando 101 g di

gel di silice e una miscela a polarità crescente di esano/DCM/EtOAc [4 Hex-6 DCM (0.5 L); 3 Hex-7 DCM (0.3 L); 2 Hex-8 DCM (0.3 L); 1 Hex-9 DCM (0.3 L); 100% DCM (0.3 L); 9 DCM- 1 EtOAc (0.2 L); 100% EtOAc (0.4 L)] ottenendo così 6 subfrazioni. La frazione 7.2 (155 mg) è stata cromatografata con CC utilizzando 16 g di gel di silice come fase stazionaria, ed eluita con una miscela di esano/cloroformio (1.5:8.5) dando 4 subfrazioni. La frazione 7.2.2 (53 mg) è stata iniettata e purificata HPLC NP usando come miscela eluente esano/acetato di etile (7.5:2.5) e un flusso di 3 mL/min ottenendo il 7-methoxy-5-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-2H-chromen-2-one (composto **11**, $t_R = 15.8$ min, 6.9 mg) e il bergaptene (composto **7**, $t_R = 17$ min, 5.6 mg). La frazione 7.3 (0.5 mg) corrisponde alla phellopterina (composto **6**). La frazione 7.4 (60 mg) è stata cromatografata con CC usando 10 g di gel di silice ed eluita con una miscela di petroleum ether/EtOAc (8:2) ottenendo così 4 subfrazioni. La frazione 7.4.3 (3.5 mg) è stata purificata in HPLC NP con esano/EtOAc (7.5:2.5) come miscela eluente e un flusso di 3 mL/min, ottenendo così la peucenin-7-methylether (composto **13**, $t_R = 17$ min, 0.7 mg) e l'imperatorina (composto **8**, $t_R = 28.7$ min, 0.7 mg).

La frazione 8 (1.2 g) è stata cromatografata con CC usando 130 g di gel di silice ed eluita con una miscela di esano/EtOAc (6.5:3) ottenendo 12 subfrazioni. La frazione 8.4 (6 mg) corrisponde al faltarindiolo (**15**). La frazione 8.6 (657 mg) viene cromatografata con CC utilizzando 180 g di gel di silice ed eluita con una miscela di DCM/EtOAc (9:1) ottenendo così 4 subfrazioni. La frazione 8.6.1 (439 mg) è stata iniettata e purificata in HPLC NP usando come miscela eluente DCM/EtOAc (9.5:0.5) ed un flusso di 2.5 mL/min, ottenendo così il composto **1** ($t_R = 15.5$ min, 51.8 mg), composto **2** ($t_R = 17.10$ min, 18.3 mg), il composto **3** ($t_R = 17.8$ min, 1.7 mg) e infine il composto **4** ($t_R = 18.4$ min, 74.7 mg). La frazione 8.8 (236 mg) è stata purificata in HPLC NP con una miscela di DCM/EtOAc (9:1) ed un flusso di 3 mL/min ottenendo così il 4-(2,3-dihydroxy-3methylbutoxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one (composto **10**, $t_R = 28.6$ min, 21 mg).

La frazione 9 (2.7 g) è stata frazionata attraverso VLC, usando 102 g di gel di silice come fase stazionaria e una miscela di solventi a polarità crescente di DCM/EtOAc [100% DCM (0.25 L); 9 DCM-1 EtOAc (0.2 L); 8 DCM-2 EtOAc (0.4 L); 7 DCM-3 EtOAc (0.2 L); 5 DCM-5 EtOAc (0.2 L); 4.5 DCM- 6.5 EtOAc (0.2 L); 2 DCM-8 EtOAc (0.2 L); 100% EtOAc (0.5 L)] ottenendo così 10 subfrazioni. La frazione 9.5 (257 mg) è stata iniettata e purificata in HPLC NP con una miscela eluente di DCM/EtOAc (7:3) e un flusso di 2.5 mL/min, ottenendo così il peucedanol (composto **12**, $t_R = 19.2$ min, 14.1 mg), il 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl) 7methoxy-2-methylchromone (composto **14** $t_R = 23.70$, 5 mg) e un nuovo cromone : (composto **15** $t_R = 23.7$, 2.3mg). La frazione 9.8 (60 mg) è stata cromatografata con CC, utilizzando 10 g di gel di silice e eluito con una miscela di cloroformio/acetone (7:3), ottenendo così 4 subfrazioni. La frazione 9.8.3 (26 mg) è stata

cromatografata con CC utilizzando 10 g di gel di silice e come fase mobile una miscela di DCM/MeOH (9.8:0.2) ottenendo 3 subfrazioni. La frazione 9.8.3.1 corrisponde alla dihydroxydihydroseselin (compound **5**, 10 mg). (Fig. 5.4).



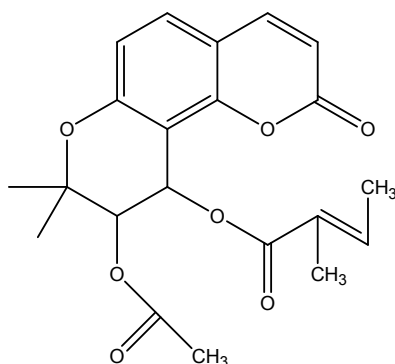
5.5 Delucidazione delle strutture note isolate dalla *Seseli praecox*

La struttura dei composti noti è stata determinata attraverso lo studio degli spettri NMR monodimensionali al protone ^1H NMR ed al carbonio ^{13}C NMR e di massa esatta (ESI).

I dati analitici e spettroscopici sono coerenti con i dati riportati in letteratura.

5.5.1 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-pyrano[2,3-*f*]chromen-10-yl (*Z*)-2-methyl-2-butenote

Nome comune: (+)-Pteryxin



Il composto si presenta come un olio viscoso

^1H NMR: 1.4 (3H, s, Me), 1.427 (3H, s, Me), 1.833 (3H, m, 5''Me), 1.98 (3H, dq, $J=7.2, 1.5\text{Hz}$, 4''Me), 2.05 (3H, s, OCOMe), 5.32 (1H, d, $J=4.9\text{ Hz}$, H-3'), 6.02 (1H, m, H-3'), 6.19 (1H, d, $J=9.5\text{ Hz}$, H-3), 6.60 (1H, d, $J=4.9\text{ Hz}$, H-4'), 6.78 (1H, d, $J=8,6\text{ Hz}$, H-6), 7.34 (1H, d, $J=8,6\text{ Hz}$, H-5), 7.57 (1H, d, $J=9.5\text{ Hz}$, H-4)

^{13}C NMR: 15,59 (4'), 20,39 (5'), 20.75 ((2''), 22,2 e 25,31 gem (Me)2, ,60,15 ((10), 70,5 (9), 77,1(8), 107,30 (10a), 112,5(4a), 113,27(3), 114,39(6), 127,4(2'), 129,21(5), 137,8(3'), 143.13(4), 154,02(10b), 156,57(6a), 159,67(2), 166.8(1'), 169,8(1'')

The physical and spectral data of **1** are identical with those proposed by Ganbaatar et al. (2008) for (+)-Pteryxin. The $[\alpha]^{25}$ value of -4° ($c\ 1.2$, CDCl_3) was different with the literature (lit: $[\alpha]^{25} +5^\circ$ ($c\ \text{CDCl}_3$)).

Riferimenti bibliografici:

Ganbaatar (2008). Plant Coumarins. 3. (+)-PTeryxin from *Peucedanum terebinthaceum*. *Chemistry of natural compounds*, 44, pg: 578-581.

Lemmich J et al. (1966). Constituents of Umbelliferous Plants. VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins. *Acta chemica Scandinavica*, 20, pg: 2497-2507.

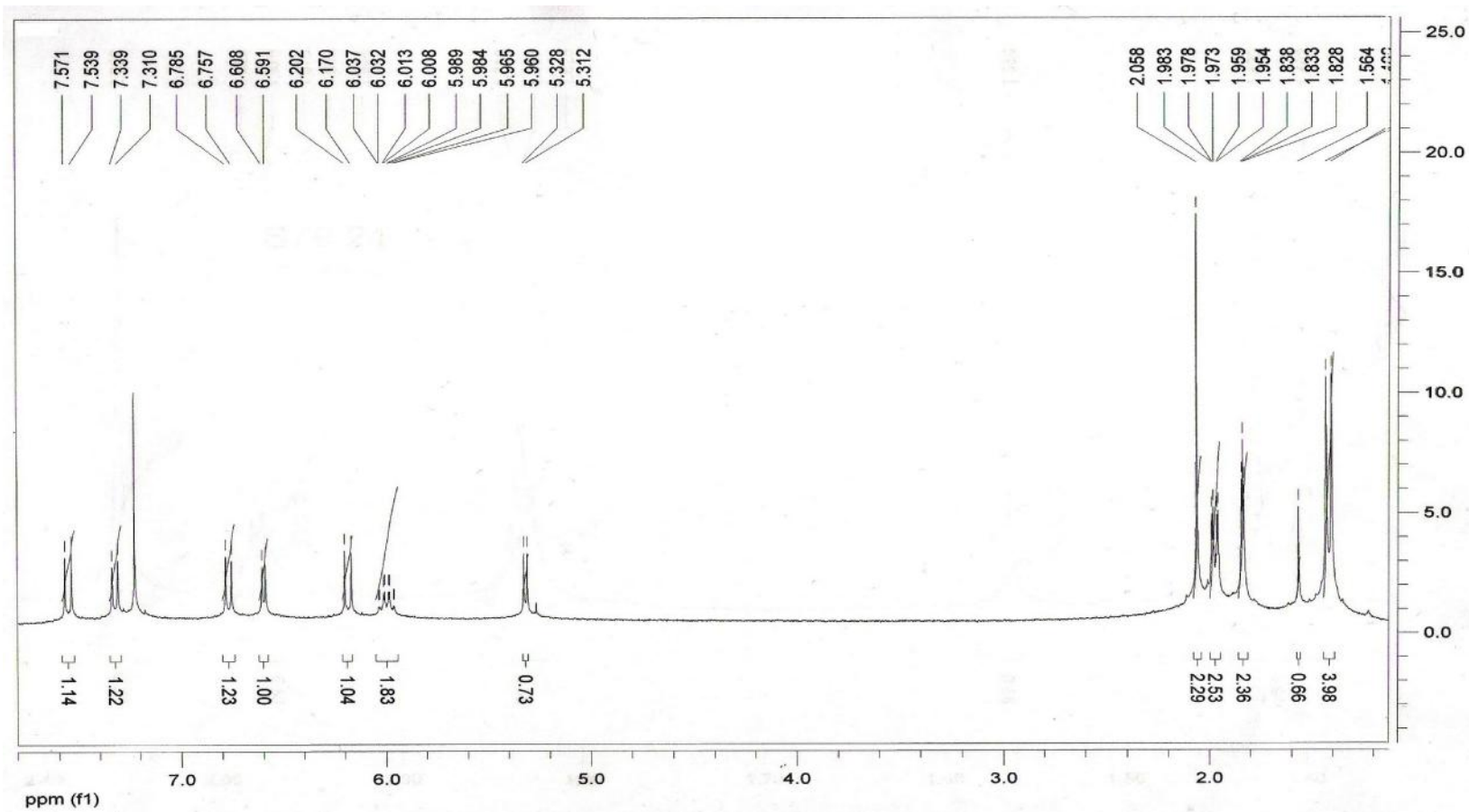


Fig. 5.5 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl (Z)-2-methyl-2-butenoate.

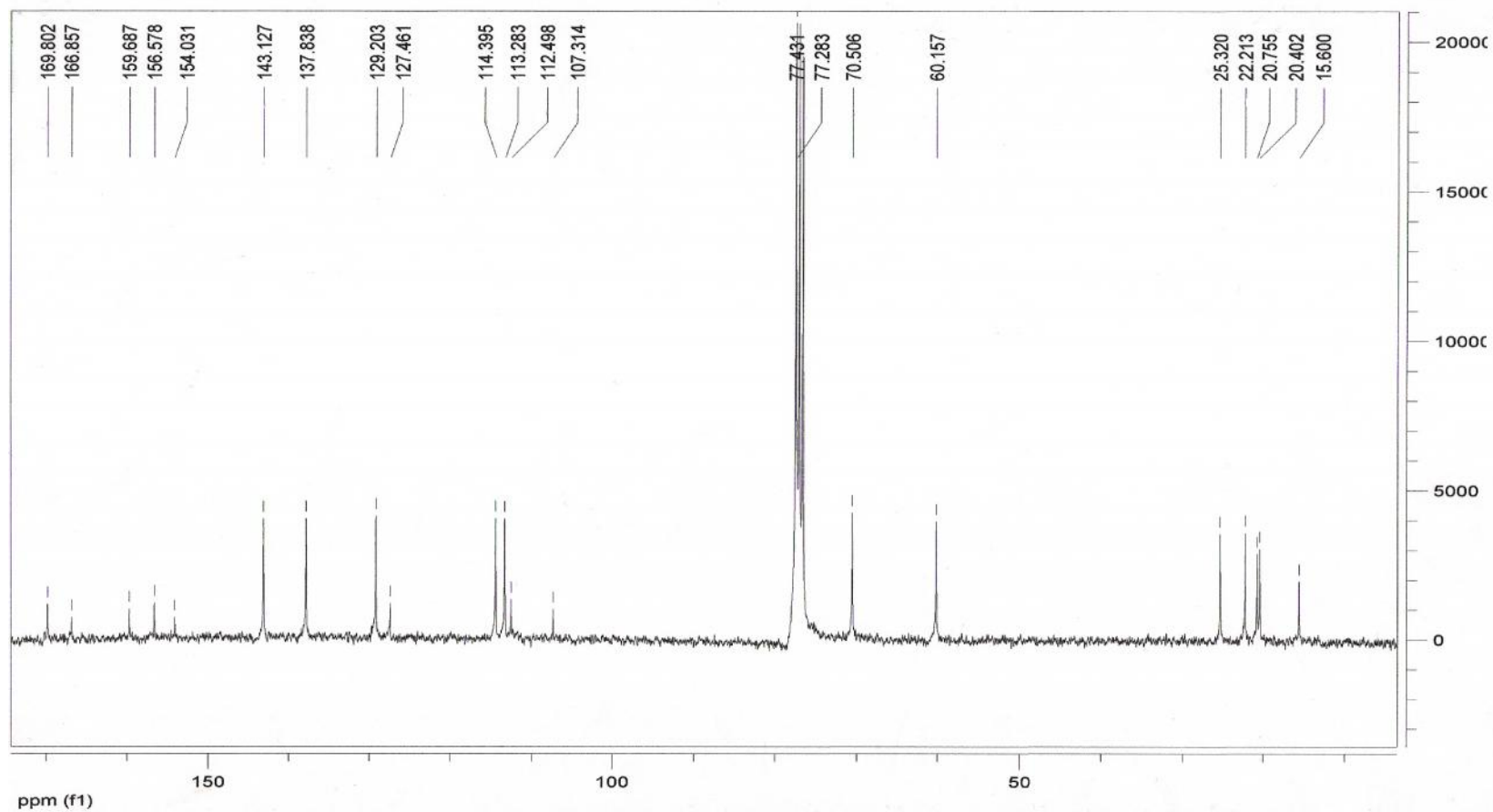
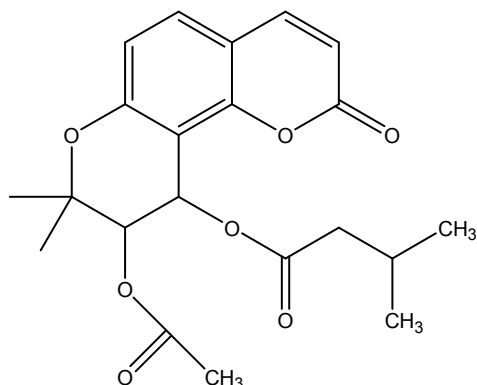


Fig. 5. Spettro ^{13}C -NMR del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-pyrano[2,3-*f*]chromen-10-yl (*Z*)-2-methyl-2-butenoate.

5.5.2 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl-3-methylbutenoate

Nome comune: suksdorfin

Altri nomi: 3'-R-O-acetyl-4'-isovaleryl-(+)-cis-khellactone



La configurazione relativa del composto 2 è stata assegnata come *cis* in base alla costante di accoppiamento (4.8 Hz) tra i protoni H-3' e H-4' e la piccola differenza tra la risonanza dei metili geminali ($\delta = 0.029$). (Lemmich 1966).

I dati fisici e spettrali del composto sono simili a quelli riportati in letteratura (Swager et al. 1985, Willette et al. 1962).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): 0,96 (2 overlapping 3H doublets), 1,39 (3H, s, Me-5'), 1,41 (3H, s, Me-6'), 2,69 (3H, s CO-Me), 5,28 (1H, d, $J=4,9$, H-3'), 6,52 (1H, d, $J=4,9$, H-4'), 6,21 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-3), 6,77 (1H, d, $J=8,7$ Hz, H-6), 7,33 (1H, d, $J=8,7$ Hz, H-5), 7,57 (1H, d, $J=9,6$ Hz, H-4).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): 175,2 (OCO), 169,6 (CO), 159,2 (CO), 156,4 (4a), 143,06 (4), 129,2 (5), 114,3 (6), 113,2 (3), 112,3 (10), 107,5 (8), 78,9 (2'), 70,67 (4'), 60,31 (3')

Riferimenti bibliografici:

Swager et al. (1985). Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochemistry*, 24, pg: 805-813.

Lemmich J et al. (1966). Constituents of Umbelliferous Plants. VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins. *Acta chemica Scandinavica*, 20, pg: 2497-2507.

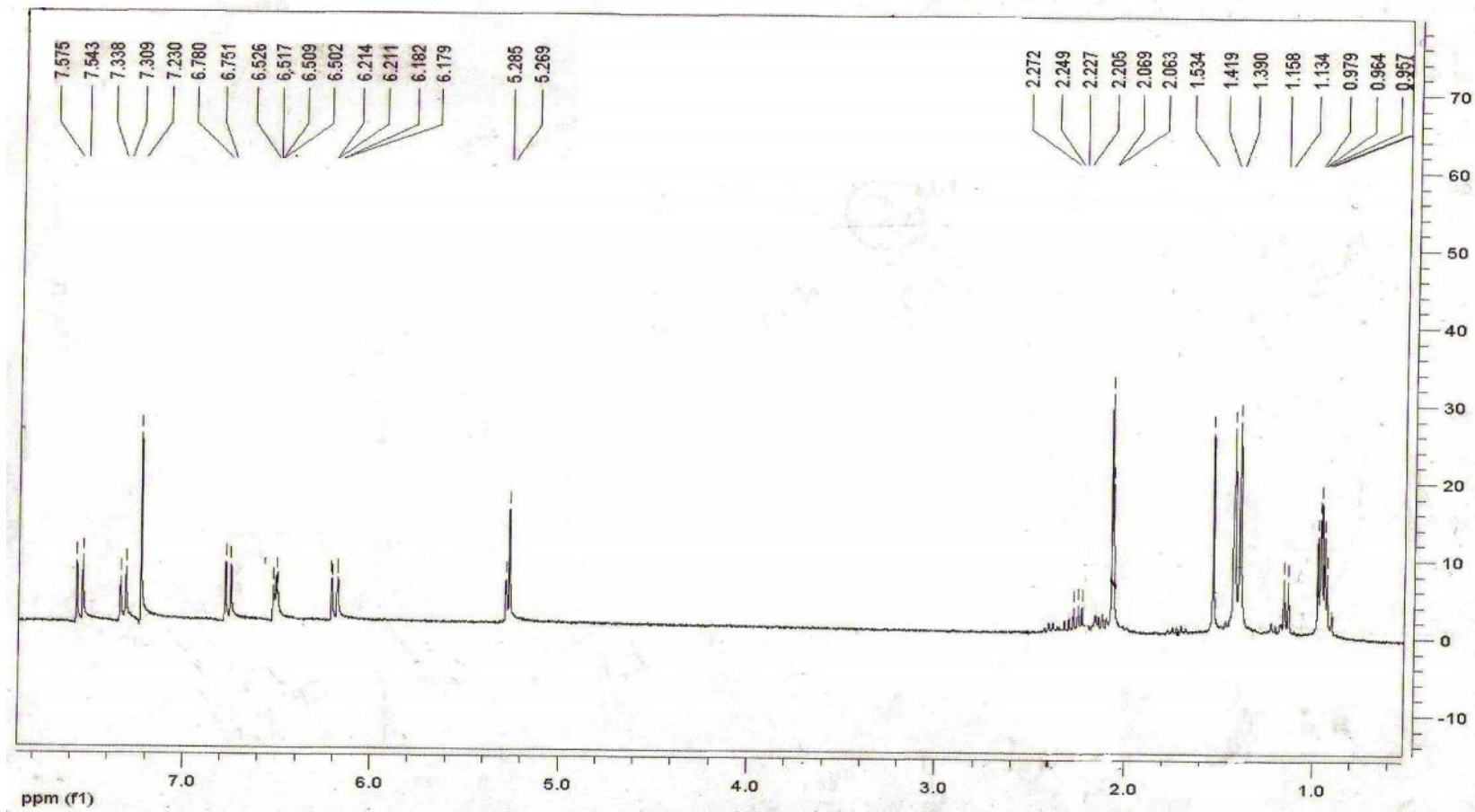


Fig. 5.7 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl-3-methylbutenoate.

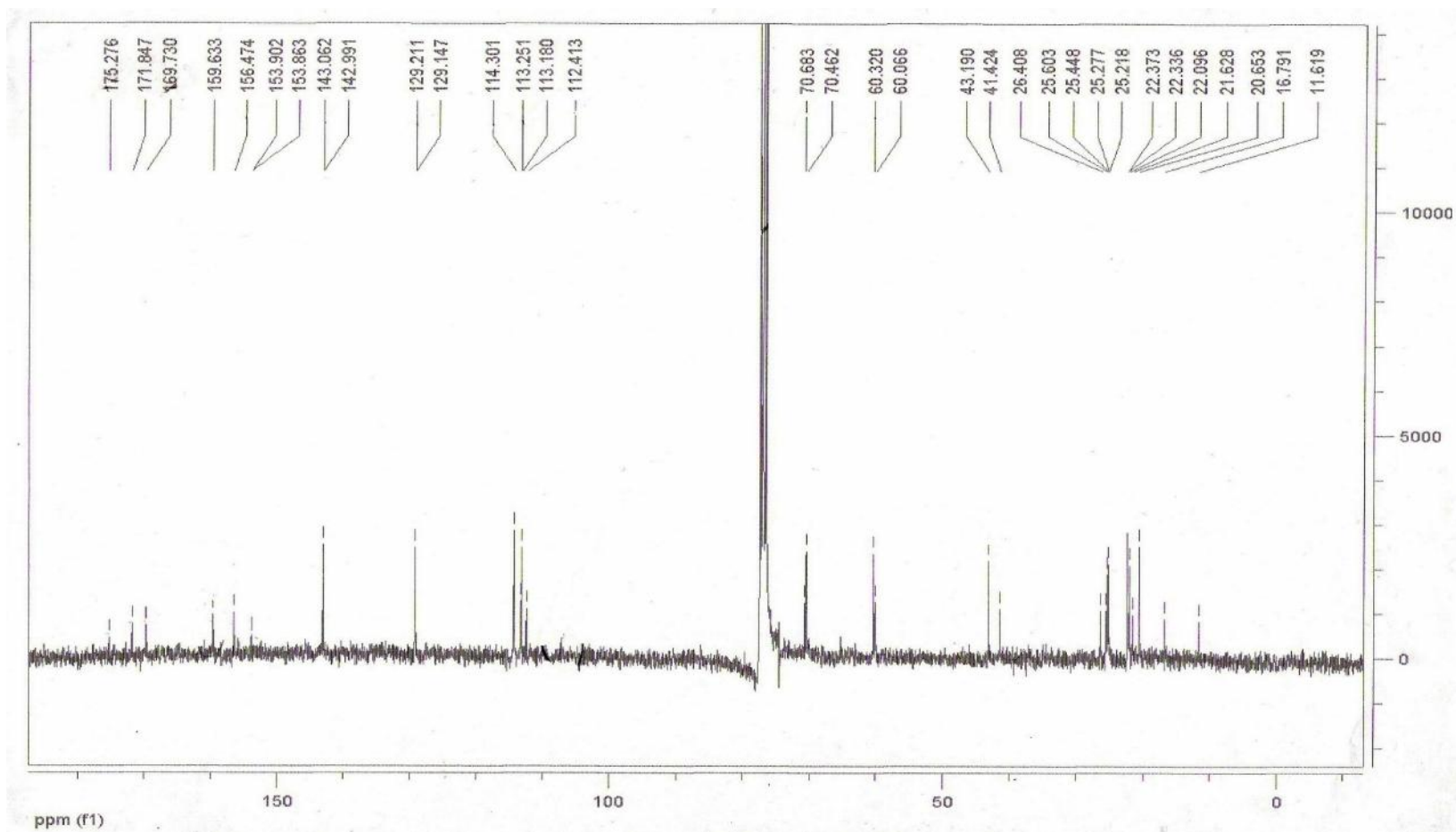
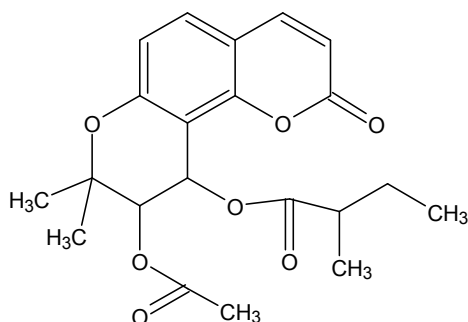


Fig. 5.8 Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl-3-methylbutenoate.

5.5.3 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl 2-methylbutanoate

Nome comune: Hyuganin C

Altri nomi: 3'-O-acetyl-O-(2''-methylbutanoyl)-cis-khellactone.



^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 6.19 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.56 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.33 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.77 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-6), 5.27 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-3'), 6.19 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4'), 2.06 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 2.4 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-3''), 1.73 (2H, m, $J = 6.6$ Hz, H-4''), 1.14 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C}3''$), 0.93 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, C-5''), 1.39 (3H, s, C-5'), 1.42 (3H, s, C-6'),

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 159.5 (C2); 113.2 (C3); 143 (C4); 112.3 (C4a); 129.22 (C5); 114.33 (C6); 156.46 (C7); 107.28 (C8); 156.4 (C8a); 78.1 (C2'); 71.69 (C3'); 60.08 (C4'), 25.6 ($\text{CH}_3\text{-C}2'$), 21.64 ($\text{CH}_3\text{-C}2'$), 175.2 (OCO-C1''), 169.65 (OCO-C1'''), 20.64 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 41.43 (C3''), 11.6 ($\text{CH}_3\text{-C}5''$), 26.42 (C4''), 16.80 ($\text{CH}_3\text{-C}3''$), 20.66 ($\text{CH}_3\text{-C}3''$).

$[\alpha]^{25} = + 6.25$ (c 0.9, CDCl_3).

La configurazione relativa del composto 3 è stata assegnata come *cis* in base alla costante di accoppiamento (3.9 Hz) tra i protoni H-3' e H-4' e la piccola differenza tra la risonanza dei metili geminali ($\delta = 0.032$). (Lemmich 1966).

Riferimenti bibliografici:

Matsuda et al. (2000). Medicinal Foodstuffs. XX. Vasorelaxant Active Constituents from the Roots of *Angelica furcujuga* KITAGAWA : Structures of Hyuganins A, B, C, and D. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 48, pg: 1429-1435.

Lemmich J et al. (1966). Constituents of Umbelliferous Plants. VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins. *Acta chemica Scandinavica*, 20, pg: 2497-2507.

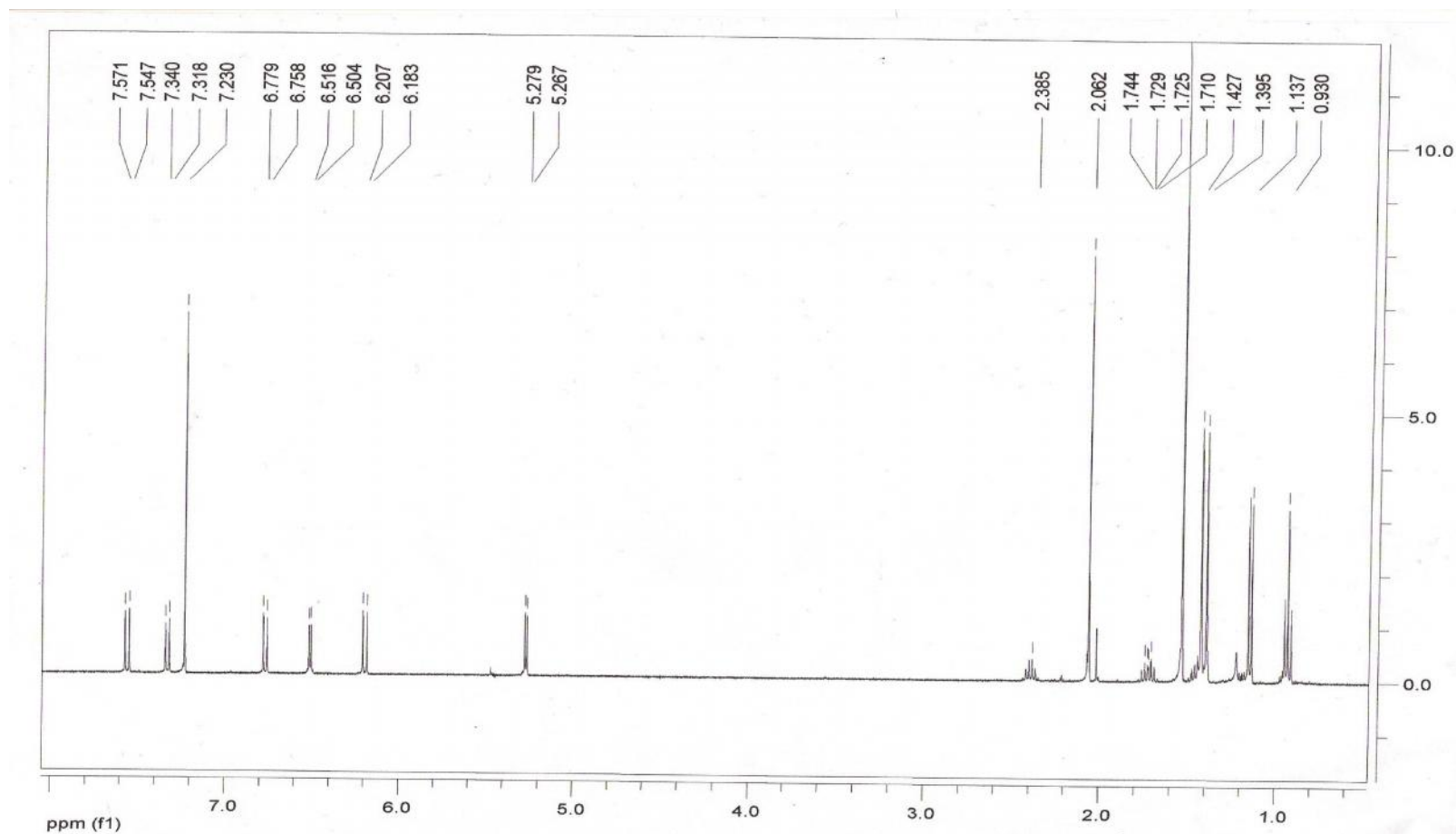


Fig. 5.9 $^1\text{H-NMR}$ spettro del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-pyrano[2,3-*f*]chromen-10-yl-2-methylbutenoate.

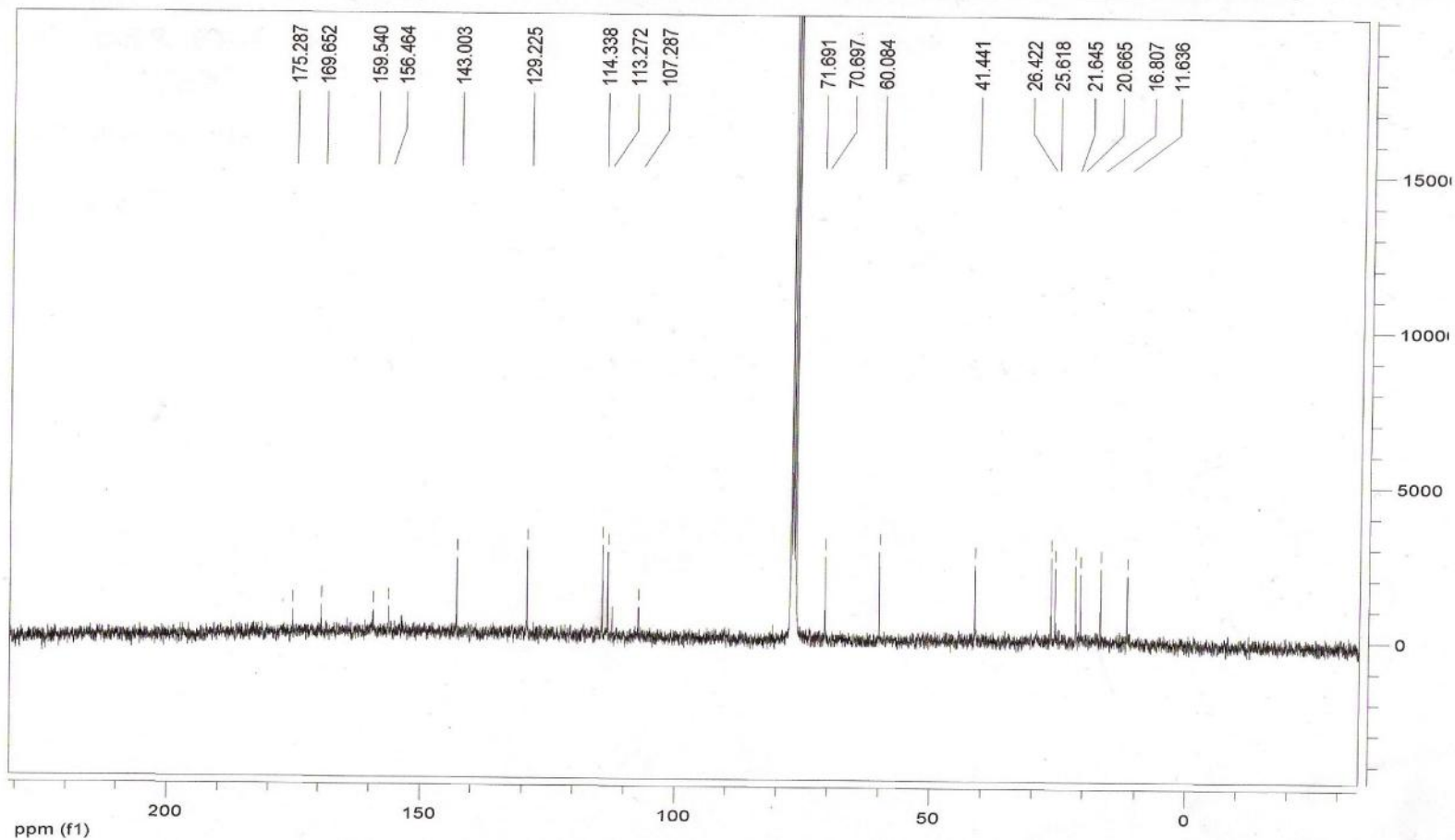
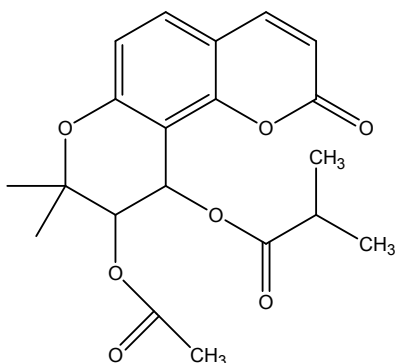


Fig. 5.10 ^{13}C -NMR spettro del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-pyrano[2,3-*f*]chromen-10-yl-2-methylbutenoate.

5.5.4 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-pyrano[2,3-*f*]chromen-10-yl 2-methylpropanoate

Nomi comuni: Seravschanin o Hyuganin D



$[\alpha]^{25} = + 8.4$ (c 0.9, CDCl_3) conforme ai dati in letteratura (Swager 1985, Matsuda 2000).

La configurazione relativa del composto 4 è stata assegnata come *cis* in base alla costante di accoppiamento (4.6 Hz) tra i protoni H-3' e H-4' e la piccola differenza tra la risonanza dei metili geminali ($\delta = 0.03$). (Lemmich 1966).

$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): 1.18 (3H, d, $J=7$, Hz, 3'''), 1.22 (3H, d, $J=7$ Hz, 4'''), 1.37 (3H, s, gem Me), 1.41 (3H, s, gem Me), 2.07 (3H, s, 2'-H3), 2.60 (1H, qq, $J=7$ Hz, 2'''-H), 5.28 (1H, d, $J=5$ Hz, H-3'), 6.20 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 6.49 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4'), 6.77 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-6), 7.33 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5), 7.57 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4)

$^{13}\text{CNMR}$: 18,8 (3'''), 18,9 (4'''), 20.75 (2''), 22,3 e 25,1 gem (Me)2, 34,1 (2'''), 60,6 (4'), 70,5 (3'), 77,4(2'), 107,30 (8), 112,6(10), 113,27(3), 114,39(6), 127,4(2'), 129,21(5), 137,8(3'), 143.13(4), 154,1(9), 156,7(7), 159,67(2), 166.8(1'), 175,9(1''')

Riferimenti bibliografici:

Lemmich J et al. (1966). Constituents of Umbelliferous Plants. VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins. *Acta chemica Scandinavica*, 20, pg: 2497-2507.

Matsuda et al. (2000). Medicinal Foodstuffs. XX. Vasorelaxant Active Constituents from the Roots of *Angelica furcujuga* KITAGAWA : Structures of Hyuganins A, B, C, and D.

Chemical & pharmaceutical bulletin, 48, pg: 1429-1435.

Swager et al. (1985). Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochemistry*, 24, pg: 805-813.

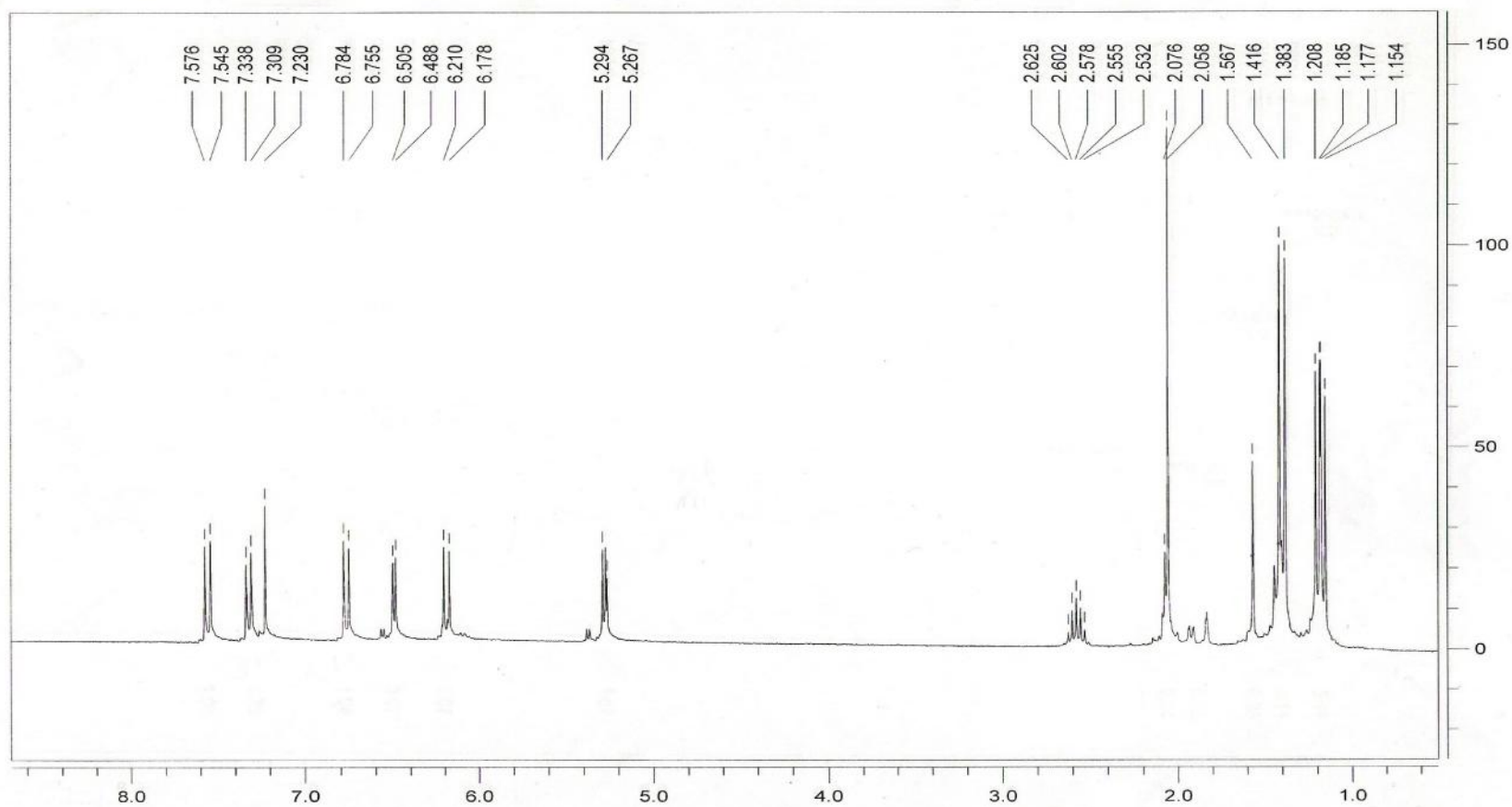


Fig. 5.11 spettro $^1\text{H-NMR}$ del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl 2-methylpropanoate.

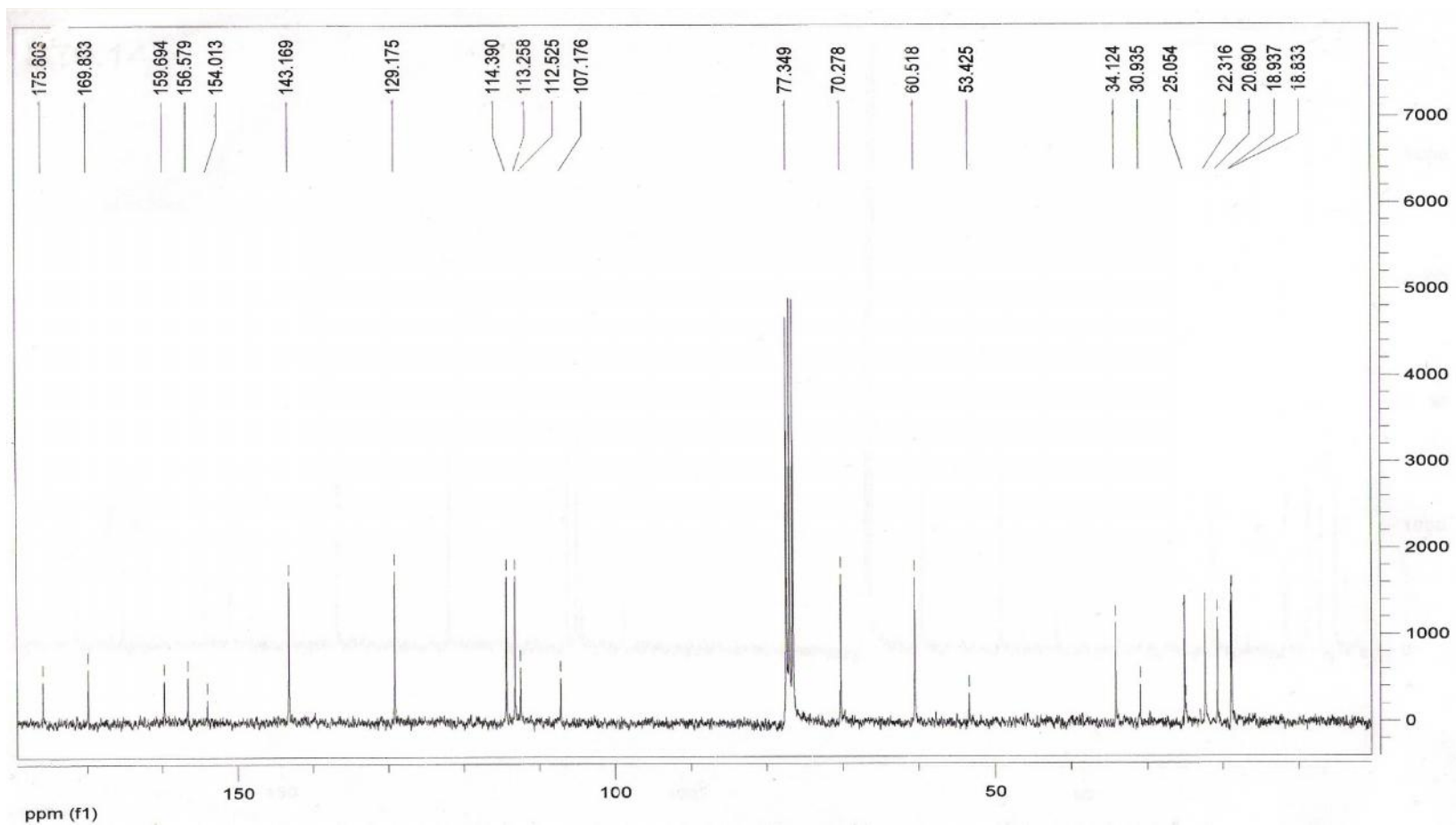
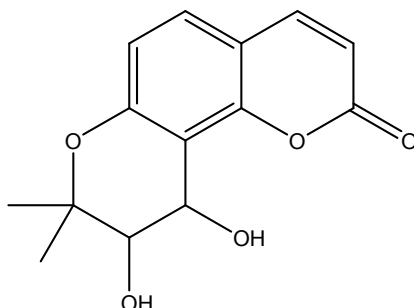


Fig. 5.12 Spettro ^{13}C -NMR del 9-(acetyloxy)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-10-yl 2-methylpropanoate.

5.5.5 9,10-dihydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-2-one

Nomi comuni: (+)-cis-khellactone o diidrossidiidrosseselin.



$[\alpha]^{25} = + 53.42$ (c 1.2, CDCl_3) diverso a quello riportato in letteratura $[\alpha]^{25} = + 81.2$ (c 2.4, CDCl_3) (Ganbaatar 2008).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): 1.37 e 1.42 (3H each s, Hz, 2'-Me), 3.26 (1H,d, J=6Hz, 3'-OH), 3.83 (1H, t, J=5,8 Hz, H-3'), 4.21 (1H, d, J=4,2Hz, 4'-OH), 5.17 (1H, d, J=4,5 Hz, H-4'), 6.23 (1H, d, J=9,3 Hz, H-3), 6.77 (1H, d, J=8,7 Hz, H-6), 7.30 (1H, d, J=8,7 Hz, H-5), 7.64 (1H, d, J=9,6Hz, H-4).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): 21,65 e 24,85 (gem Me), 61,16 (3'), 70,8 (4'), 78,9 (2'), 110,6 (8), 112,1 (10), 114,7(3), 114,9 (6), 127,4(2'), 128,5 (5), 144,19 (4), 154,5 (7) 159,3(4a), 160,8 (2)

Riferimenti bibliografici:

Ganbaatar Zh et al. (2008). Plant Coumarins. 3. (+)-PTeryxin from *Peucedanum terebinthaceum*. *Chemistry of natural compounds*, 44, pg: 578-581.

Lemmich J et al. (1966). Constituents of Umbelliferous Plants. VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins. *Acta chemica Scandinavica*, 20, pg: 2497-2507.

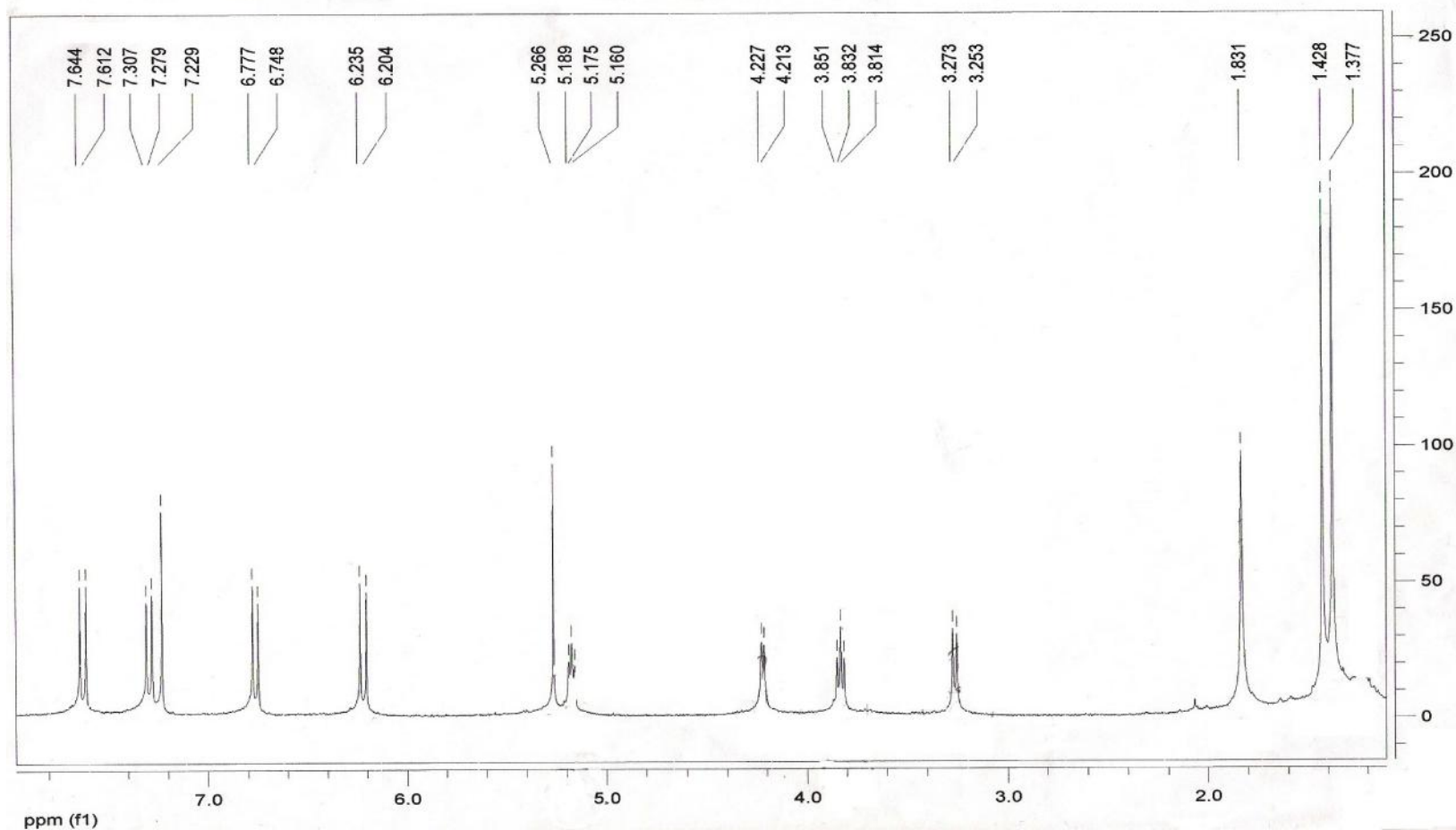


Fig. 5.13 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del 9,10-dihydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-2-one.

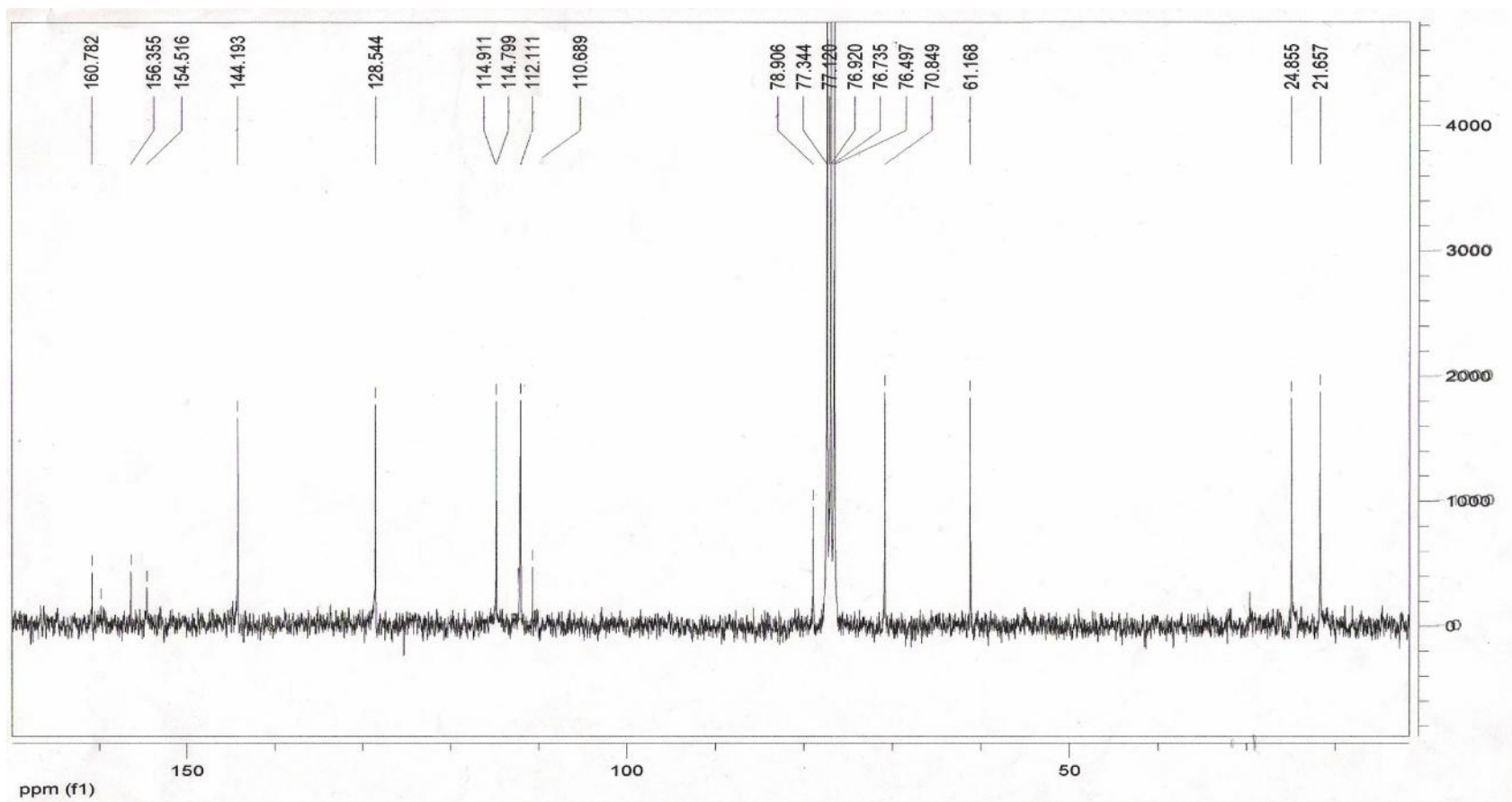
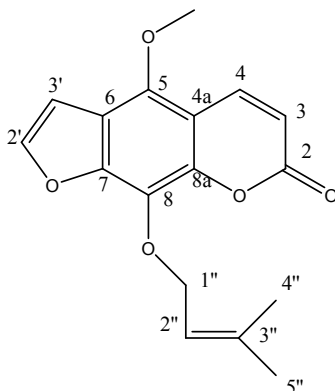


Fig. 5.14 Spettro ^{13}C -NMR del 9,10-dihydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-2-one.

5.5.6 Phellopterina



Phellopterina. m/z 300.308 (calc. for $C_{17}H_{16}O_5$)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.69 (1H, s, H-5''), 1.73 (1H, s, H-4''), 4.17 (1H, s, H-5-OMe), 4.83 (1H, d, $J = 7.3$ Hz H-1a''), 4.83 (1H, d, $J = 7.3$ Hz H-1''), 5.59 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2''), 6.27 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-3), 6.98 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-3'), 7.62 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 8.12 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.0 (q, C-5''), 25.8 (q, C-4''), 60.7 (q, C-5-OMe), 70.4 (t, C-1''), 105.0 (d, C-3'), 107.5 (s, C-10), 112.8 (d, C-3), 114.5 (s, C-6), 119.8 (d, C-2''), 126.8 (s, C-8), 139.4 (d, C-4), 139.7 (s, C-3''), 144.3 (s, C-9), 144.3 (s, C-5), 141.5 (d, C-2'), 150.8 (s, C-7), 160.5 (s, C-2).

Riferimenti bibliografici:

Bergendorff O. et al. (1997). Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Phytochemistry*, 44, pag: 1121-1124.

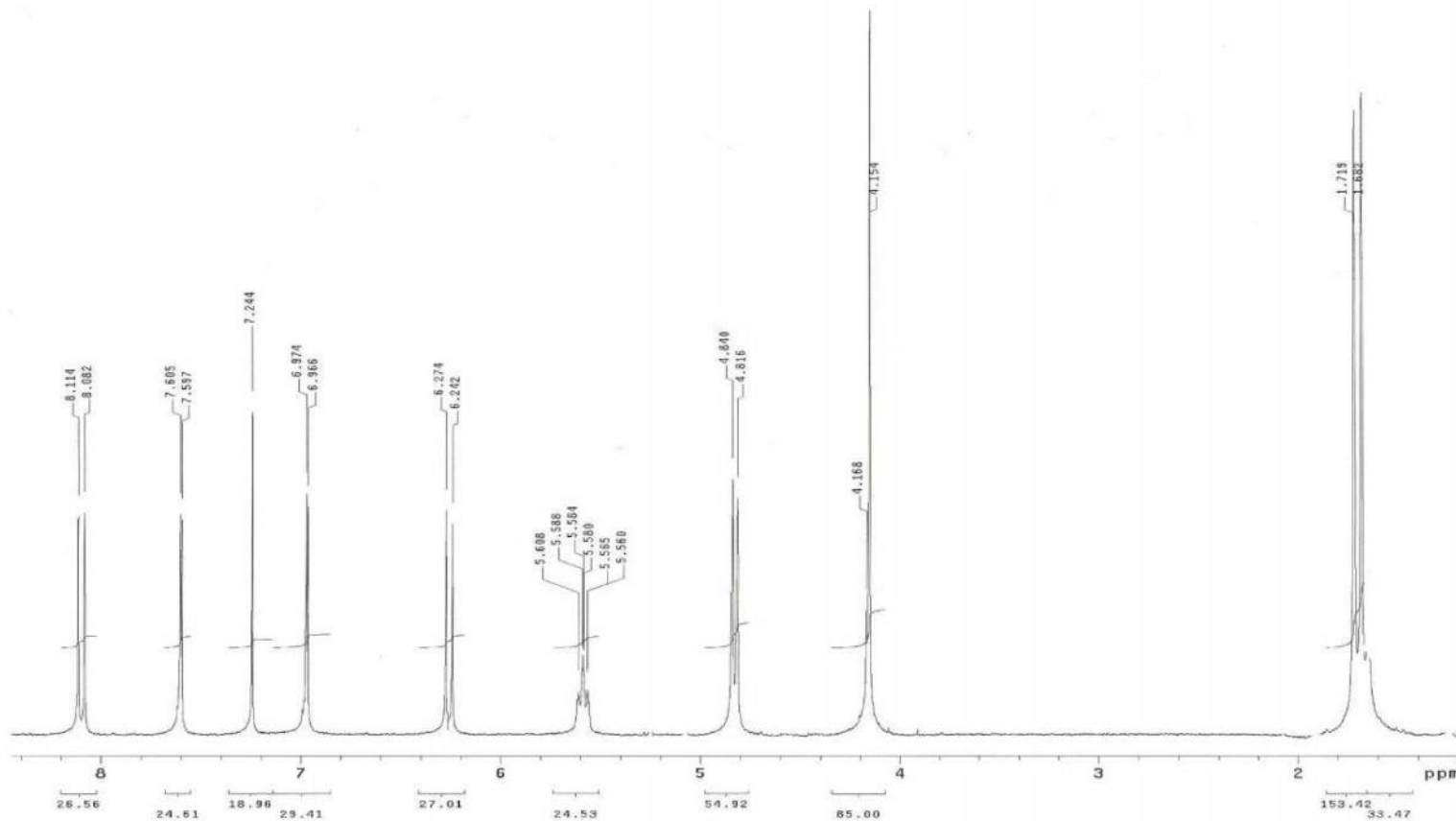
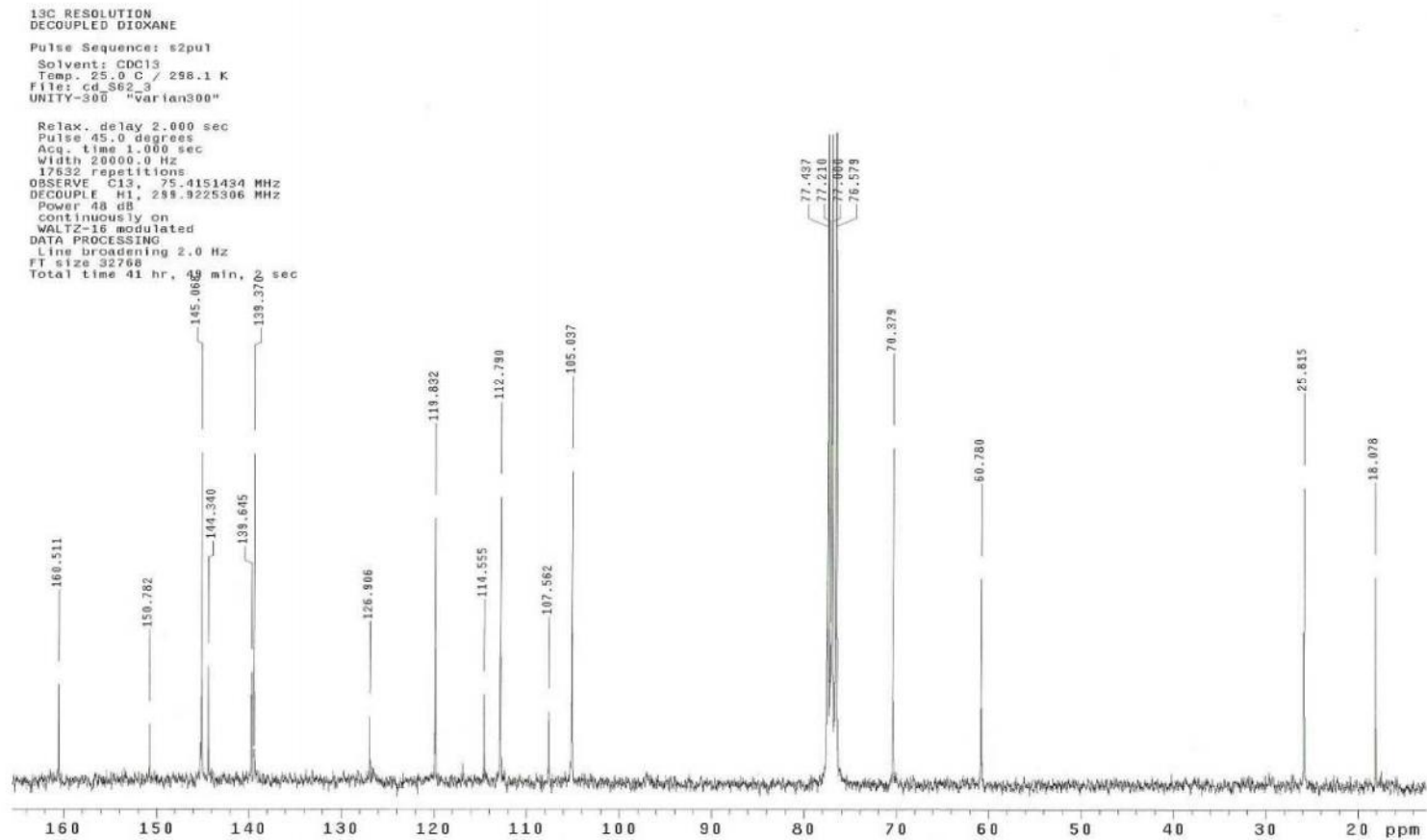
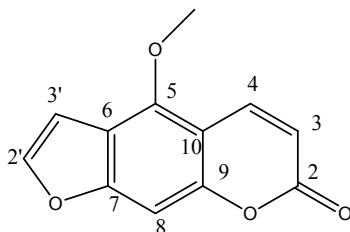


Fig. 5.15 Spettro $^1\text{H-NMR}$ della phellopterina.

Fig. 5.16 Spettro ¹³C-NMR della phellopterina.

5.5.7 Bergaptene



Bergaptene [M]⁺ m/z 216.0416 (calc. for C₁₂H₈O₄).Mp 180° (lit.mp 188°)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 4.24 (1H, s, H-5-OMe), 6.26 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-3), 7.02 (1H, d, J = 2.4 Hz H-3'), 7.12 (1H, s, H-8), 7.58 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 8.15 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-4).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 60.0 (q, C-5-OMe), 93.8 (d, C8), 105.0 (d, C-3'), 106.3 (s, C-10), 112.5 (d, C-3), 112.6 (s, C-6), 139.3 (d, C-4), 144.8 (d, C-2'), 149.5 (s, C-5), 152.7 (s, C-9), 158.3 (s, C-7), 161.2 (s, C-2).

Riferimenti bibliografici:

Bergendorff O. et al (1997). Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. *Phytochemistry*, vol. 44, No 6, p 1121-1124.

Harkar S. et al. (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry*, 23, pg: 419-426.

Razdan T.K. et al. (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26, pg: 2063-2069.

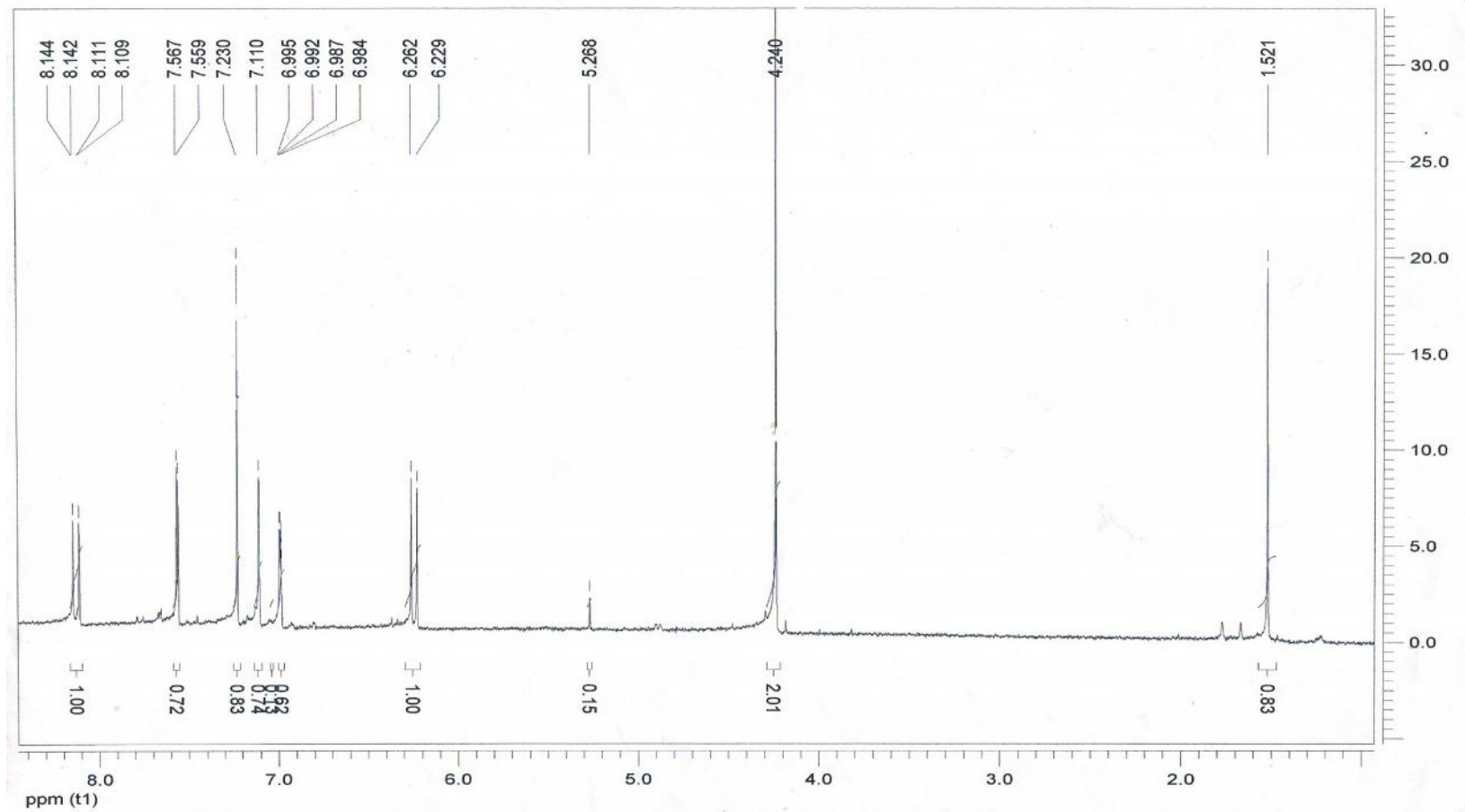
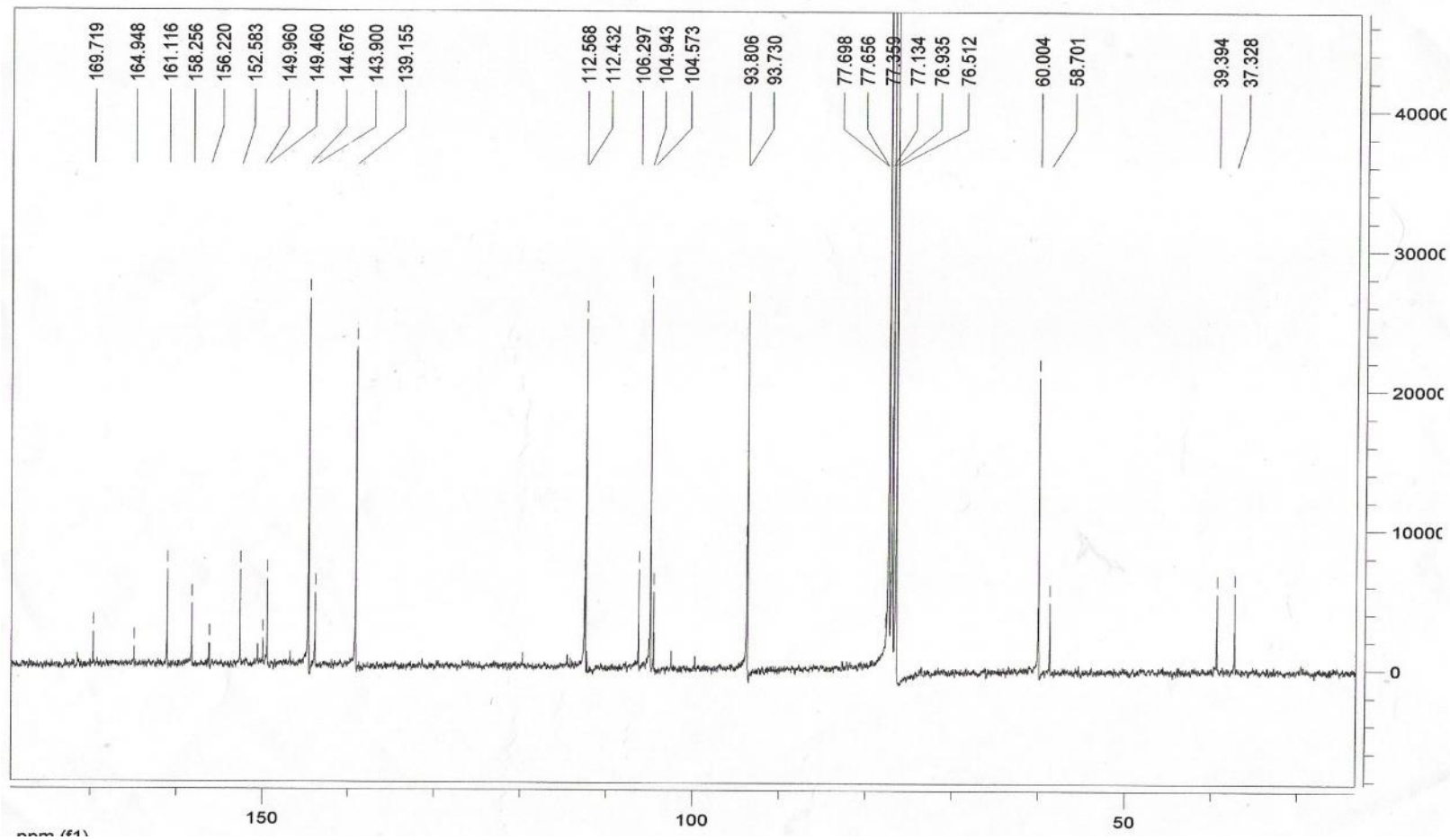
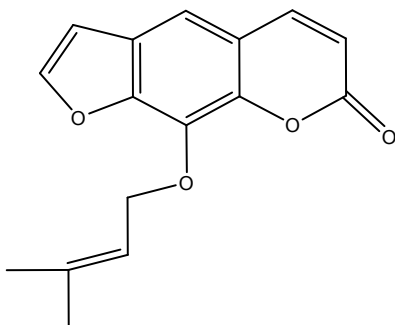


Fig. 5.17 spettro $^1\text{H-NMR}$ del bergaptene.

Fig. 5.18 Spettro ^{13}C -NMR del bergaptene.

5.5.8 Imperatorina



Imperatorina [M]⁺ m/z 270.0882 (calc. for C₁₆H₁₄O₄).Mp 102° (lit.mp 102-103°)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 1.69 (1H, s, H-5''), 1.72 (1H, s, H-4''), 4.98 (1H, d, J=7.1 Hz H-1''), 4.98 (1H, d, J = 7.1 Hz H-1''), 5.58 (1H, t, J = 7.1 Hz H-2''), 6.34 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 6.80 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-3'), 7.34 (s, H-5), 7.67 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2'), 7.75 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 18.1 (q, C-5''), 25.8 (q, C-4''), 70.1 (t, C-1''), 106.7 (d, C-3'), 113.1 (d, C-5), 114.6 (d,C-3), 116.4 (s, C-10), 119.7 (d, C-2''), 125.8 (s, C-6), 131.6 (s, C-8), 139.7 (s, C3''), 143.7(s,C-9), 144.3(d, C-4), 146.7(d,C-2'),148.5(s,C-7), 160.5(s,C-2).

Riferimenti bibliografici:

Bergendorff O. et al (1997). Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. *Phytochemistry*, vol. 44, No 6, p 1121-1124.

Harkar S. et al. (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry*, 23, pg: 419-426.

Razdan T.K. et al. (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26, pg: 2063-2069.

Zhoung P. et al. (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*, 53, pg: 689-687.

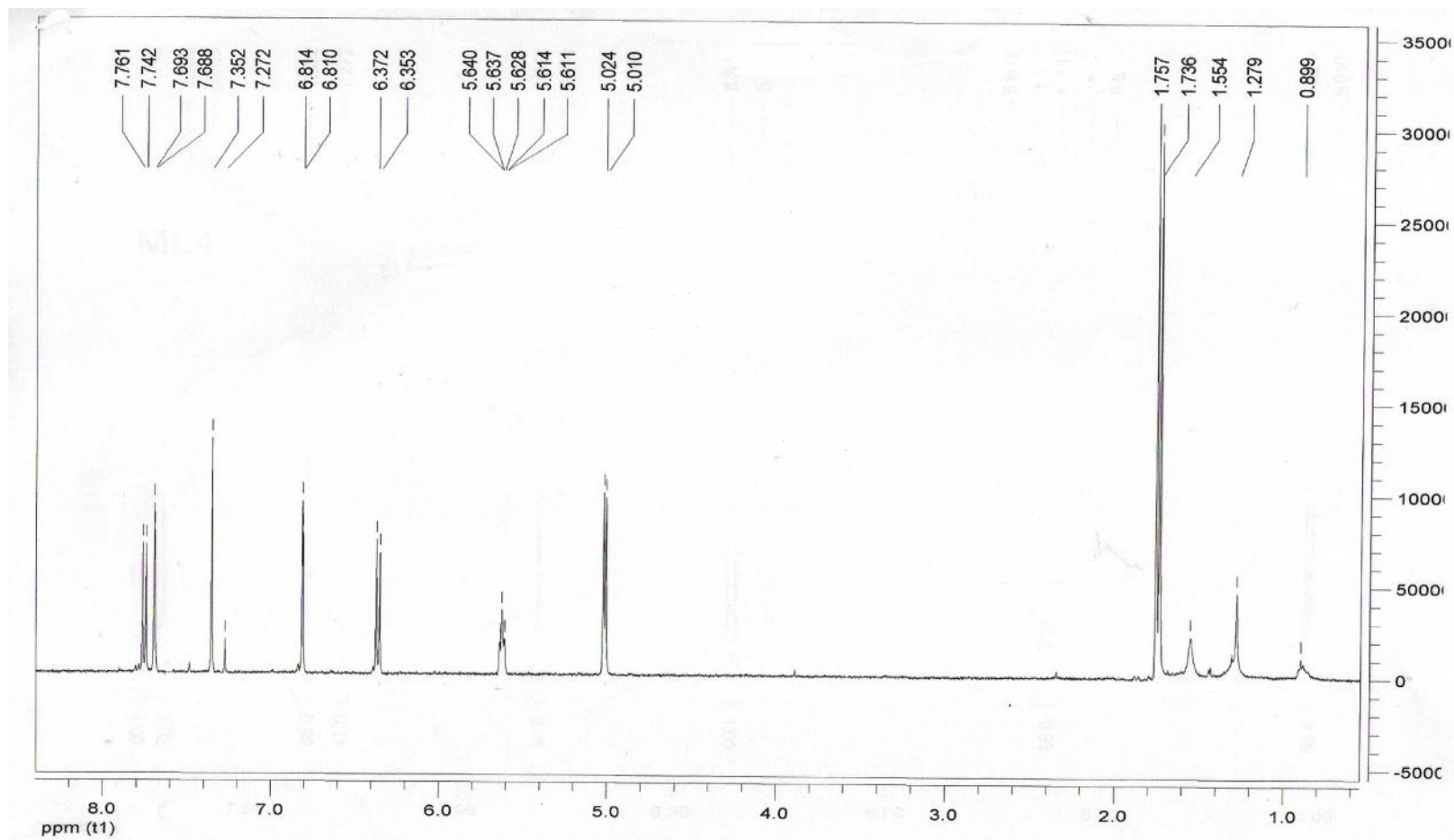


Fig. 5.19 Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'imperatorina.

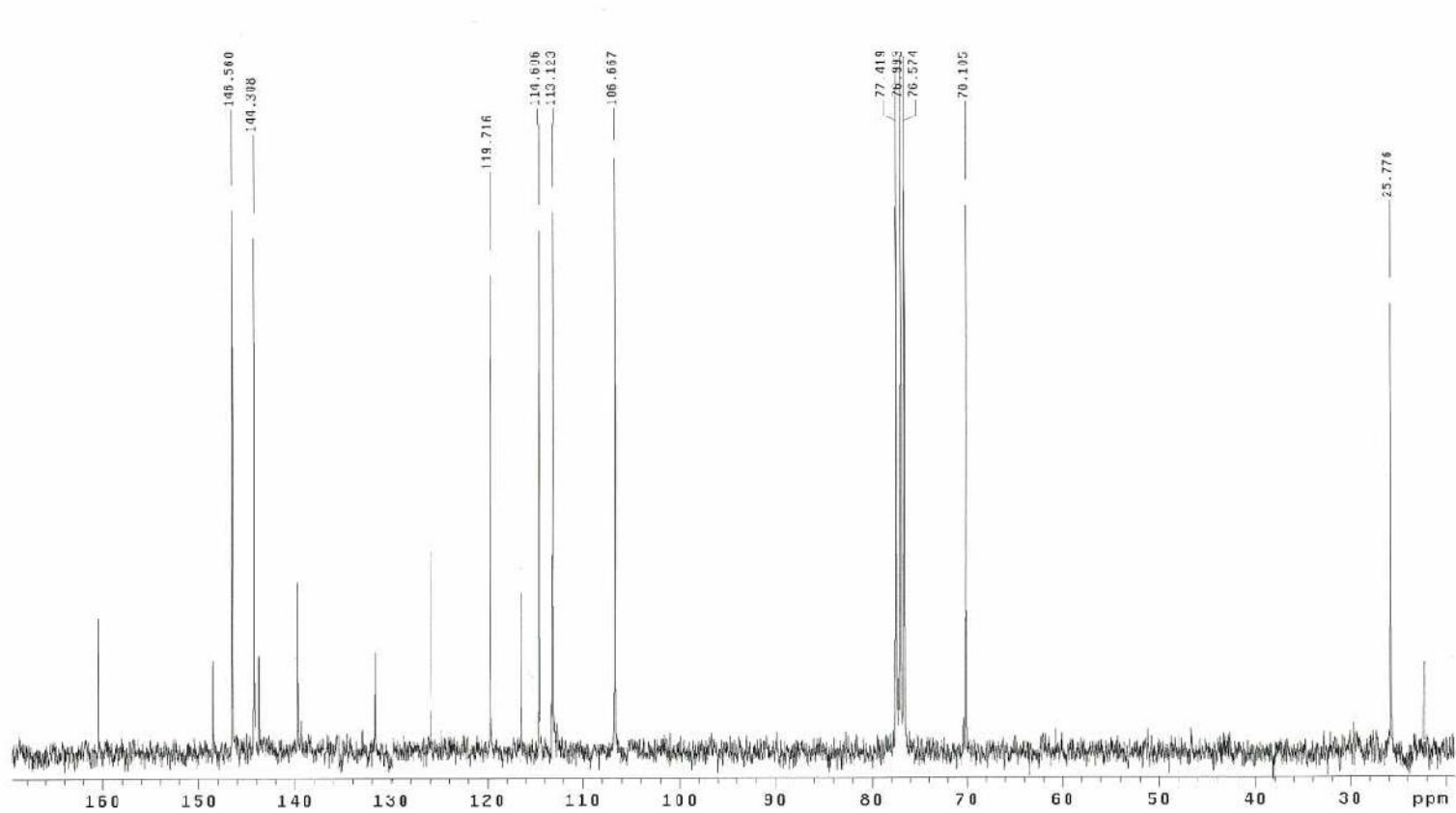
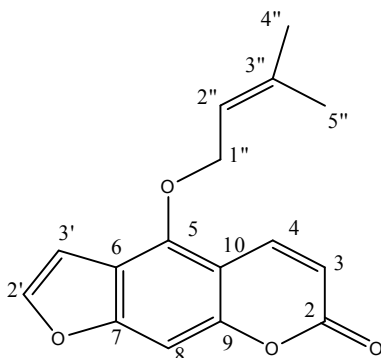


Fig. 5.20 Spettro ^{13}C -NMR dell'imperatorina.

5.5.9 Isoimperatorina



^1H NMR (CDCl_3 300MHz) δ : 1.668 ($5'$ s), 1.771 ($4''$ s), 4.900($1''$ d, $J=6.9$), 5.535 ($2''$ t, $J=2.7$), 6.257 (3 d, $J=9.9$), 6.930 ($3'$ d, $J=1.2$), 7.129 (8s), 7.568 ($2'$ d, $J=2.4$), 8.147 (4 d, $J=9.9$)

^{13}C NMR (CDCl_3 300MHz) δ : 18.154 ($5''$), 25.747 ($4''$), 69.663 ($1''$), 94.152 (8), 104.943($3'$), 107.436 (10), 112.477 (3), 114.114 (6), 118.993 ($2''$), 139.475 (4), 139.733 ($3''$), 144.780 ($2'$), 148.846(5), 152.561 (9), 158.016 (7), 161.194 (2)

Riferimenti bibliografici:

Marumoto S, Miyazawa M. (2010). Biotransformation of isoimperatorin and imperatorin by *Glomerella cingulata* and β -secretase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18, pg: 455-459.

Row E et al. (2006). Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Organic and biomolecular chemistry*, 4, pg: 1604-1610.

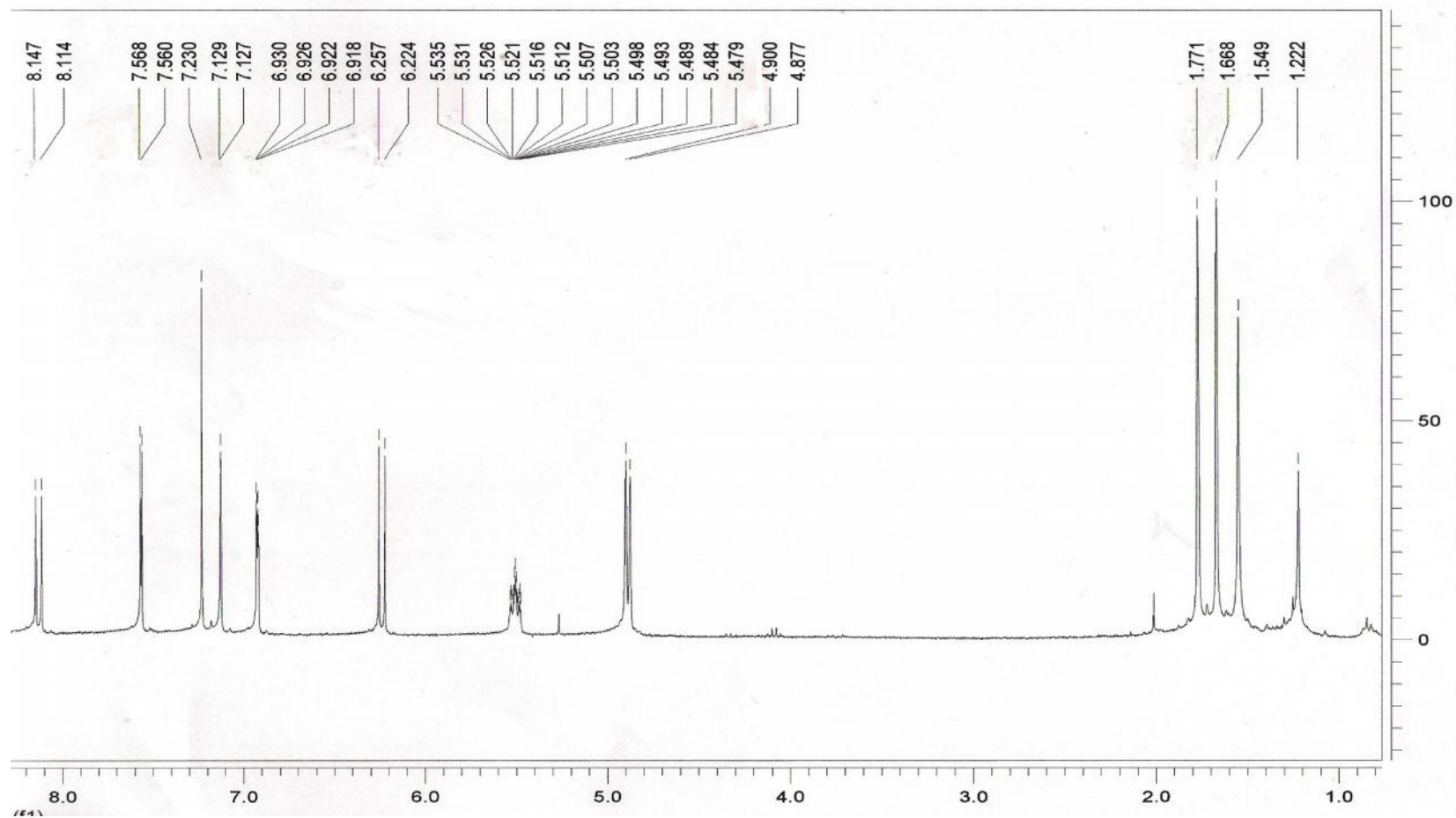


Fig. 5.21 Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'isoimperatorina.

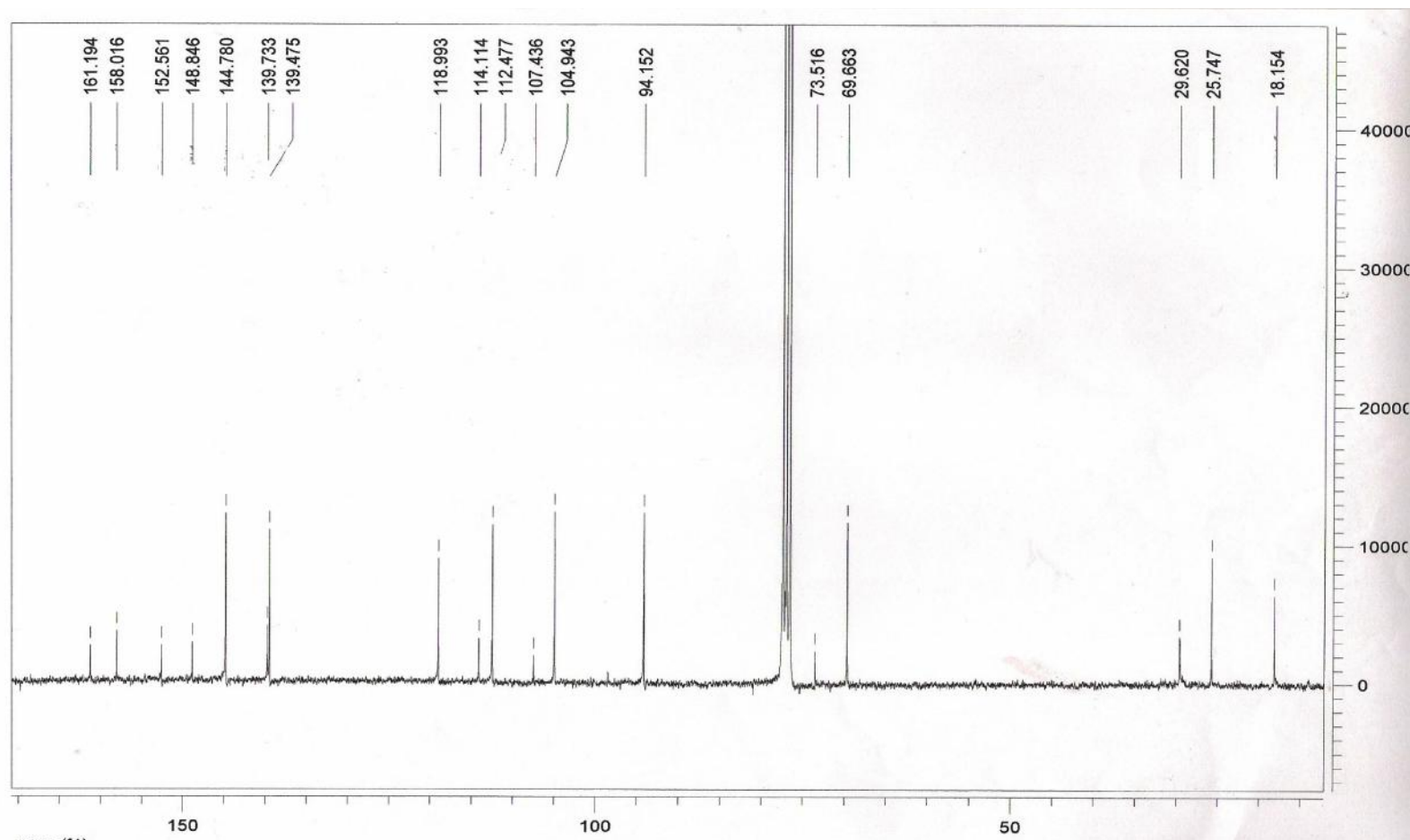
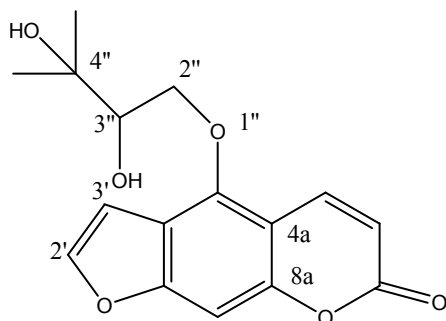


Fig. 5.22 Spettro ^{13}C -NMR dell'isoimperatorina.

5.5.10 4-(2,3-dihydroxy-3methylbutoxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one



^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.18 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.62 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H-2'), 7.17 (s, 1H, H-8), 7.00 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H-3'), 6.28 (d, 1H, $J = 10$ Hz, H-3), 4.73 (dd, 1H, $J = 3, 10.1$ Hz, H-2''), 4.47 (dt, 1H, $J = 2.5$ Hz, H-3''), 4.08 (dd, 1H, $J = 7.5, 10$ Hz, H-2''), 1.71 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-C-4}'$)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 161.0 (C=O); 113.0 (3); 139.0 (4); 107.3 (4a); 148.6 (5); 114.3(6); 158.1 (7); 94.8 (8); 152.6 (8a); 145.2 (2'); 104.7 (3'); 74.5 (1''); 76.6 (2''), 71.7 (3''); 26.6 (3''-Me); 26.6 (3''-Me).

Riferimenti bibliografici:

Row E et al. (2006). Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Organic and biomolecular chemistry*, 4, pg: 1604-1610.

Furumi K. Et al (1998). Novel antiproliferative faltarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8, pg: 93-96.

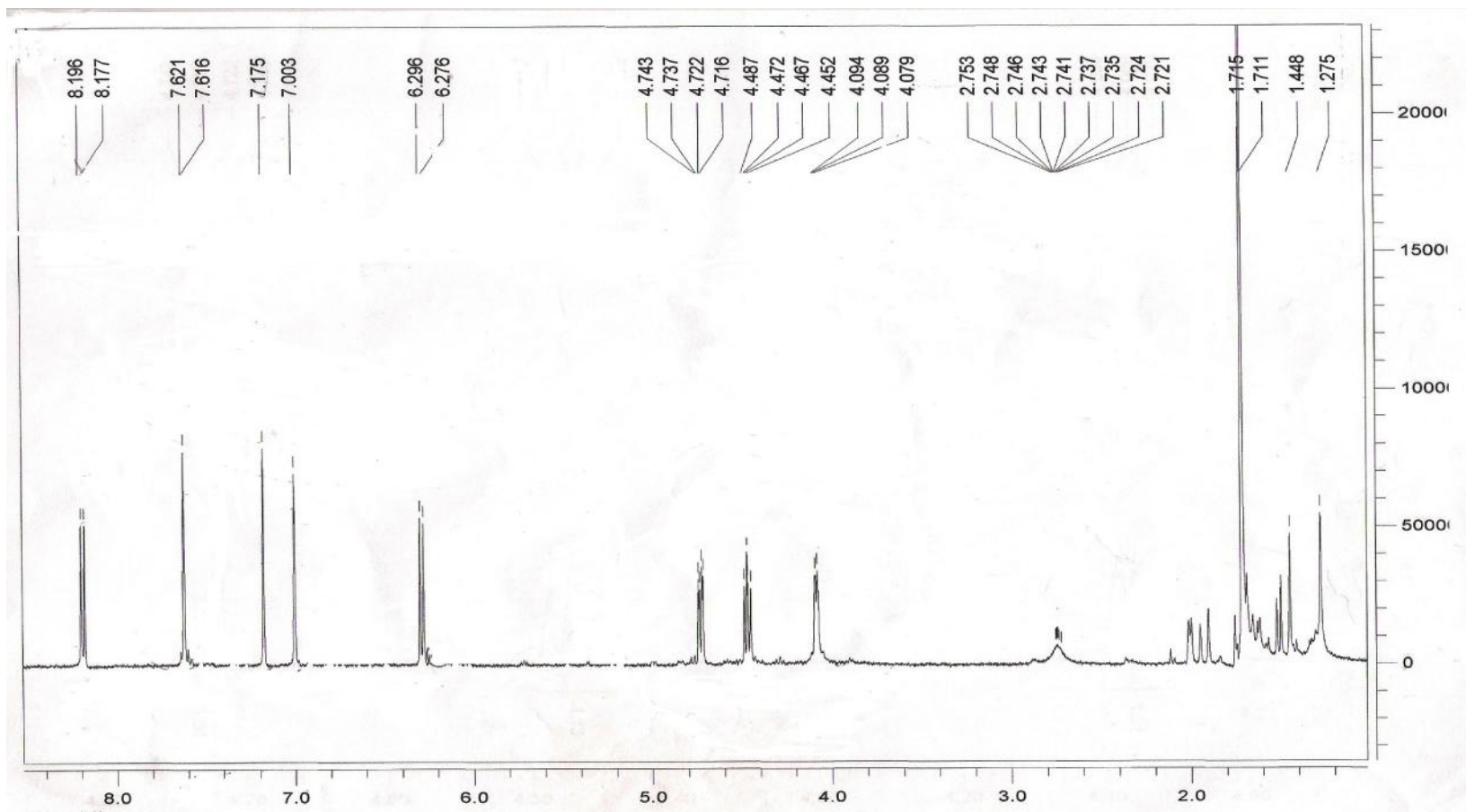
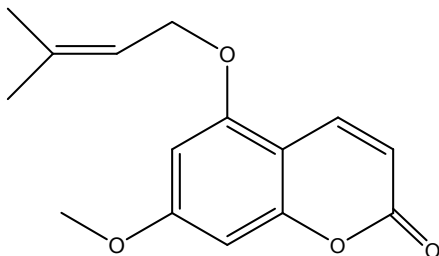


Fig. 5.23 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del 4-(2,3-dihydroxy-3methylbutoxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one.

5.5.11 7-methoxy-5-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-2H-chromen-2-one



^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.96 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4); 6.38 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6); 6.25 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8); 6.11 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3); 5.45 (1H, t, $J = 2.8$ Hz, H-3'); 4.54 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-2'); 3.82 (3H, s, O-CH₃); 1.78 (3H, s, CH₃ 5'); 1.72 (3H, s, CH₃ 6').

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 163.5 (C7); 161.5 (C=O); 156.7 (C8a); 156.2 (C6); 138.9 (C4); 118.5 (C3'); 110.7 (C3); 104.2 (C4a); 95.67 (C6); 92.6 (C8); 55.7 (O-CH₃); 65.6 (C2'); 25.72 (C-5'); 18.2 (C6').

Riferimenti bibliografici:

Ito C. et al. (1991). New Coumarins from Citrus Plants. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 39, pg: 2509-2513.

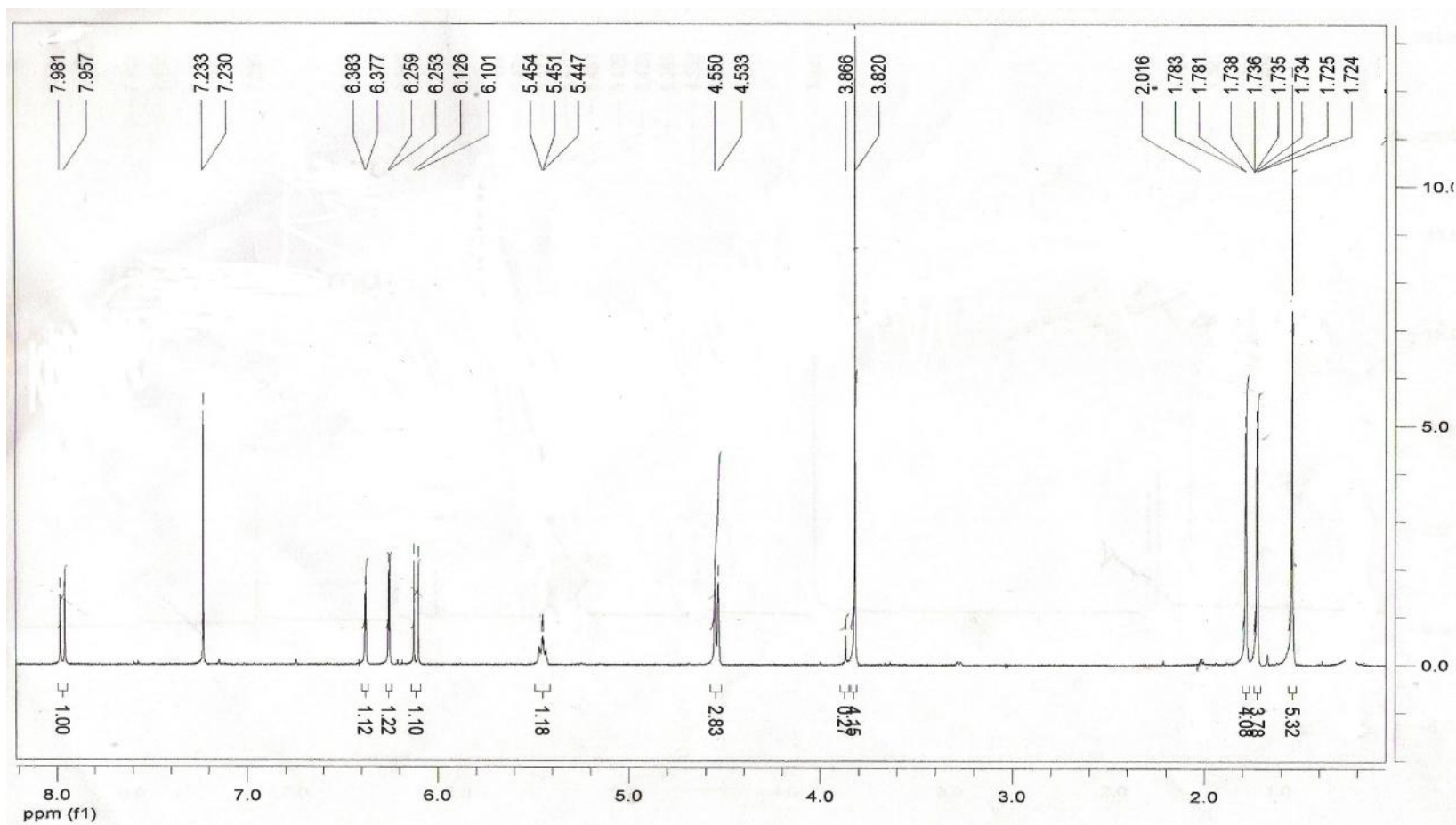


Fig. 5.24. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del 7-methoxy-5-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-2H-chromen-2-one.

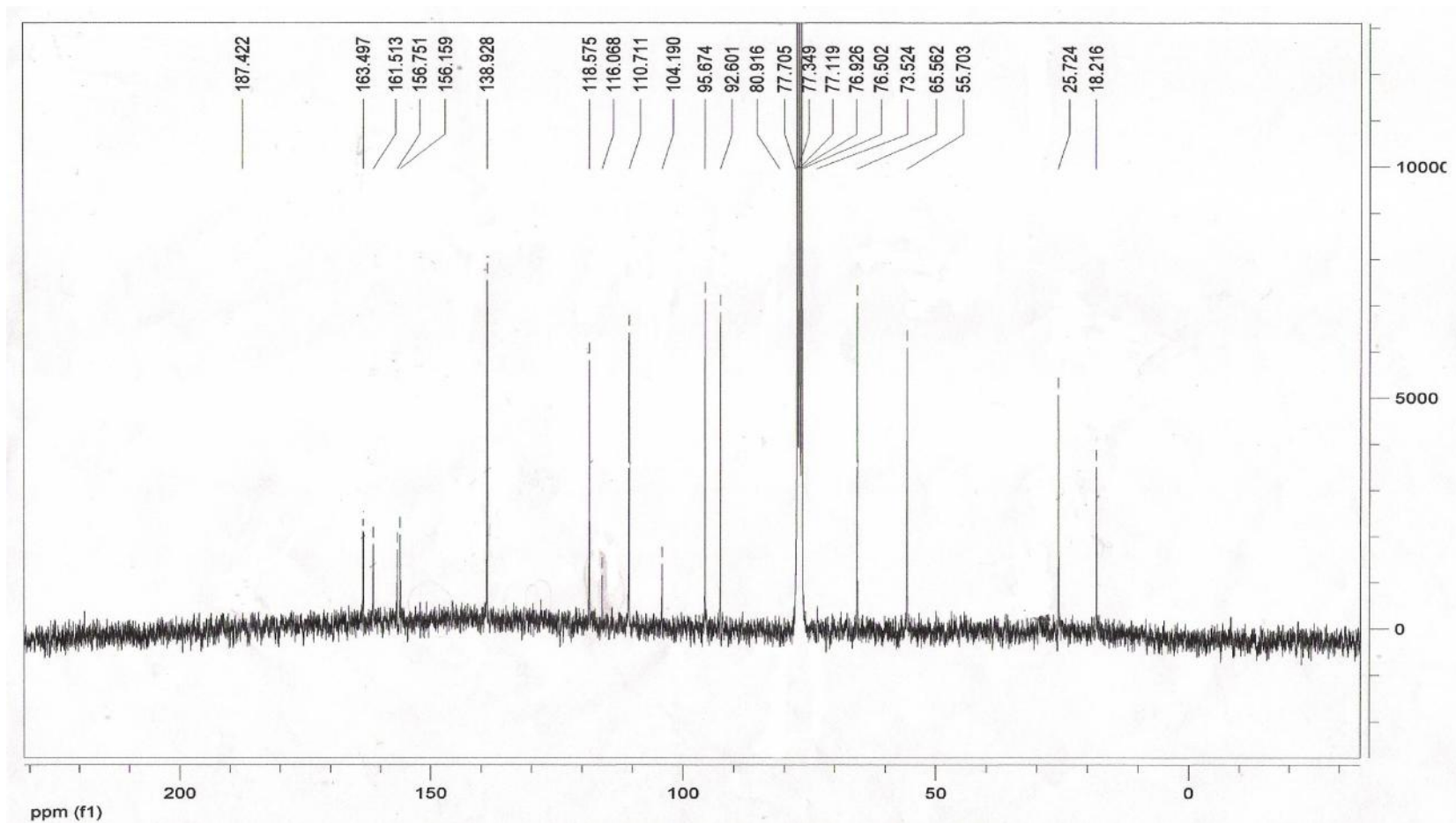
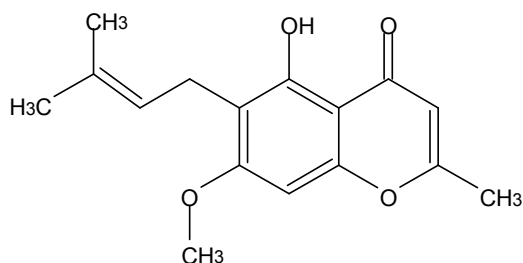


Fig. 5.25 Spettro ^{13}C -NMR del 7-methoxy-5-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-2H-chromen-2-one.

5.5.12 Peucenin-7-methyl ether



Gomma incolore; Mp 100° (lit 102°); [M]⁺ m/z 274,12 (calc. per C₁₆H₁₈O₄, 274.1205)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 12.75 (OH-arom); 6.37 (1H, s, H-8); 6.03 (1H, s, H-3); 5.23 (1H, t, J = 7 Hz, H-2'); 3.89 (3H, s, O-CH₃); 3.35 (2H, d, J = 7 Hz, H-1'); 2.34 (3H, s, CH₃-2); 1.79 (3H, s, CH₃-3'); 1.69 (3H, s, CH₃-3').

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz) δ: 165.7 (C2); 182.3 (C=O); 108.6 (C3); 104.8 (C4a); 158.4 (C8a); 163.3 (C5); 112.8 (C6); 163.3 (C7); 89.1 (C8); 56 (O-CH₃); 21.6 (C1'); 121.9 (C-2'); 131.9 (C3'); 25.8 (CH₃-3'); 18.6 (CH₃-3'); 20.6 (CH₃-2).

Riferimenti bibliografici:

Harkar et al. (1984). Steroids, chromone and coumarins from *angelica officinalis*. *Phytochemistry*, 23, pg: 419-426.

Waight et al. (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26, pg: 2063-2069.

Bohlmann et al. (1980). Chromones and flavans from *Marshallia obovata*. *phytochemistry*, 19, pg: 1815-1820.

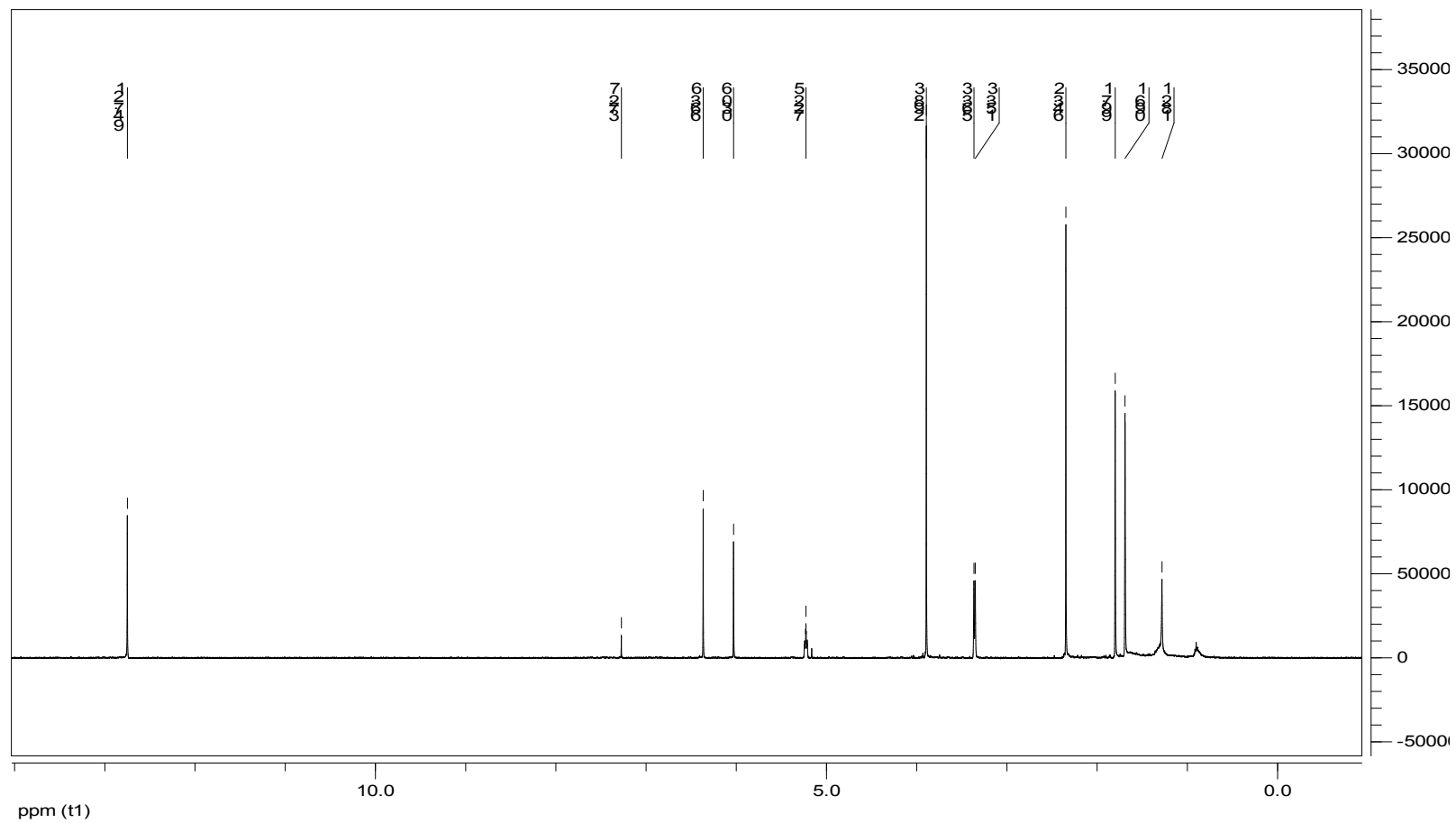
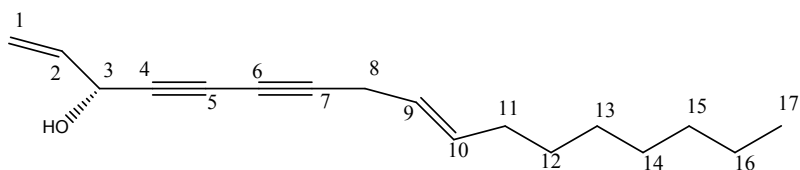


Fig. 5.26 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del peucenin-7-methyl ether.

5.5.13 Falcarinolo



Falcarinol $[M]^+$ m/z 244.37 (calc. for $C_{17}H_{24}O$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.88 (1H, *t*, J = 7.0 Hz, H-17), 1.28 (1H, *m*, H-13), 1.28 (1H, *m*, H-14), 1.28 (1H, *m*, H-15), 1.28 (1H, *m*, H-16), 1.37 (1H, *m*, H-12), 2.02 (1H, *dt*, J = 7.0, 7.0 Hz H-11), 3.03 (1H, *dd*, J = 7.0, 0.8 Hz, H-8), 4.90 (1H, *brd*, J = 5.5 Hz H-3), 5.24 (1H, *dt*, J = 10.2, 1.1 Hz), 5.37 (*dt*, J = 10.6, 7.0, 1.2 Hz, H-9), 5.46 (1H, *dt*, J = 17.2, 1.1 Hz, H-1), 5.51 (*dt*, J = 10.6, 7.0, 1.2 Hz, H-10), 5.94 (1H, *ddd*, J = 17.2, 10.2, 5.5 Hz, H-2).

^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.1 (*q*, C-17), 17.7 (*t*, C-8), 22.6 (*t*, C-16), 27.2 (*t*, C-11), 29.1 (*d*, C-14), 29.2 (*t*, C-12), 29.2 (*t*, C-13), 31.8 (*t*, C-15), 63.5 (*d*, C-3), 64.0 (*s*, C-6), 71.3 (*s*, C-5), 74.2 (*s*, C-4), 80.3 (*s*, C-7), 117.3 (*t*, C-1), 121.9 (*d*, C-9), 133.1 (*d*, C-10), 136.2 (*d*, C-2).

Riferimenti bibliografici:

Segeer C. et al. (2006). Reaction product analysis by high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance. Application to the absolute configuration determination of naturally occurring polyene alcohols. *Journal of Chromatography A*, 1136, pg: 82-88.

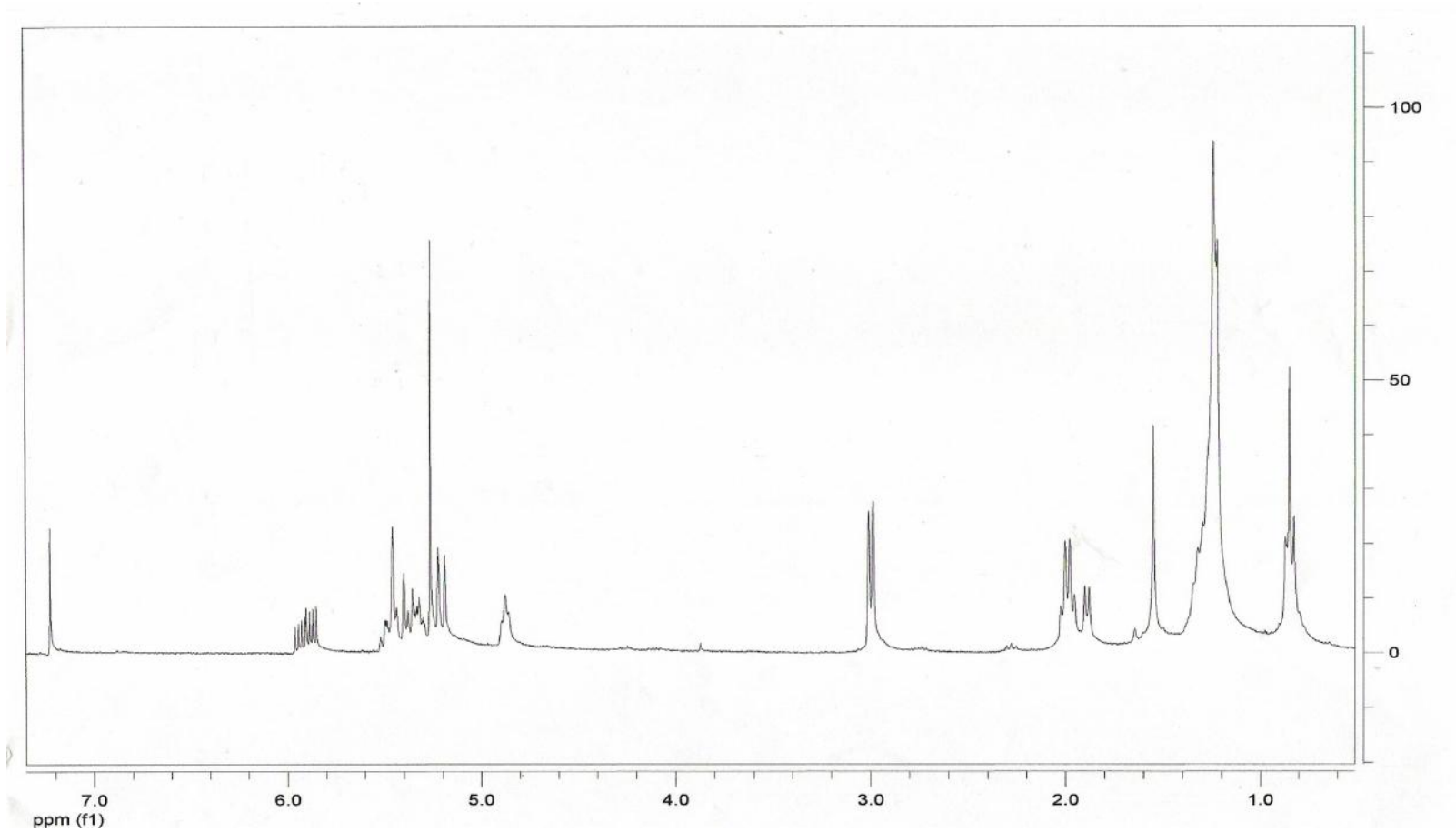


Fig. 5.27 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del falcarinolo.

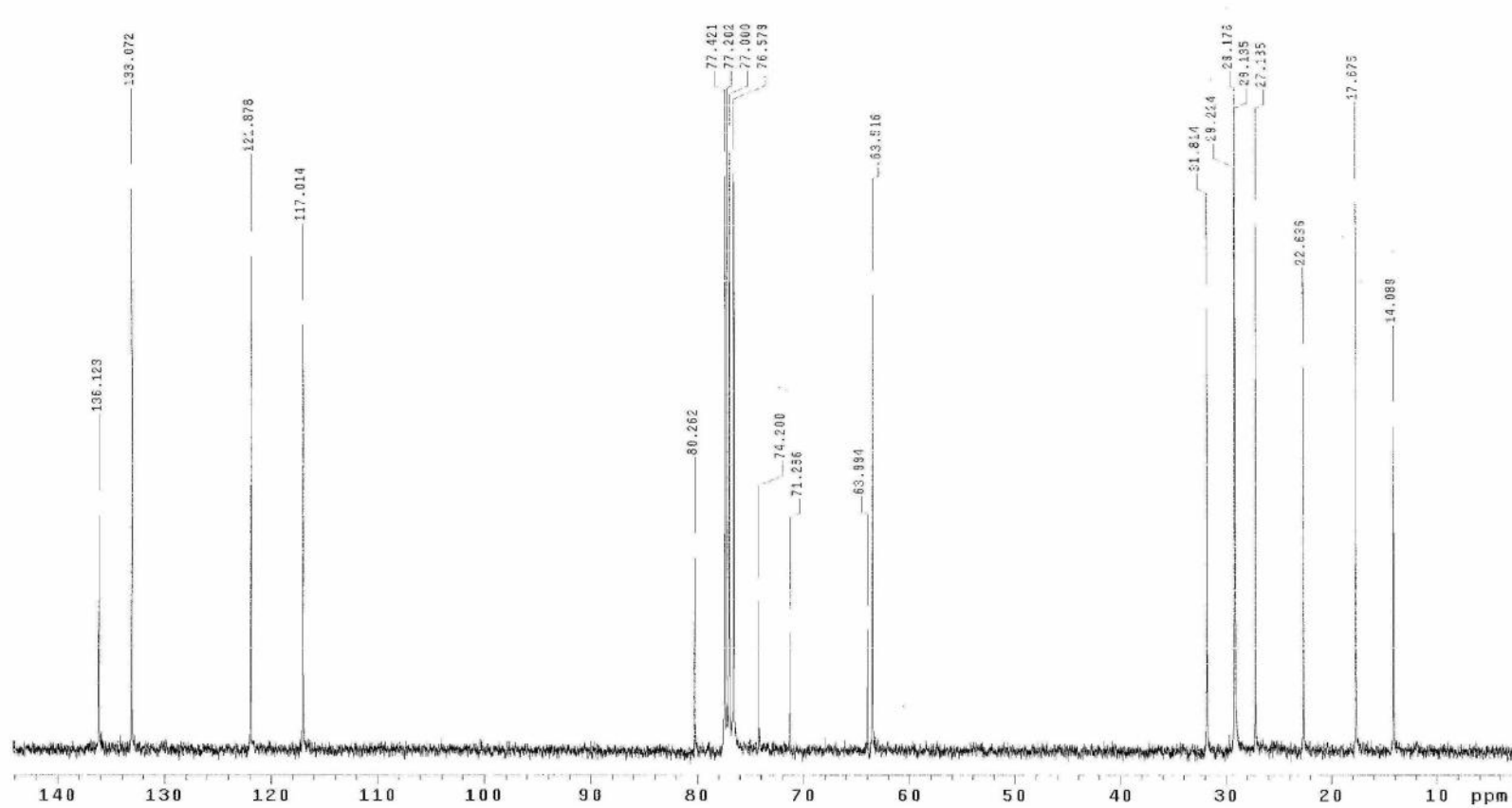
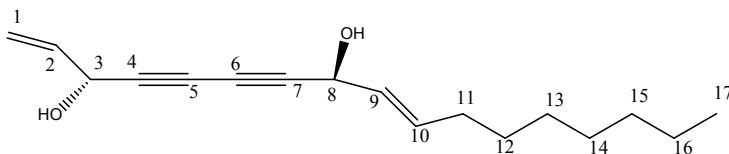


Fig. 5.28 Spettro ^{13}C -NMR del falcarinolo.

5.5.14 Falcarindiolo



Falcarindiolo $[M]^+$ m/z 260.24 (calc. per $C_{17}H_{24}O_2$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.88 (1H, *t*, J = 7.0 Hz, H-17), 1.28 (1H, *m*, H-13), 1.28 (1H, *m*, H-14), 1.28 (1H, *m*, H-15), 1.28 (1H, *m*, H-16), 1.39 (1H, *m*, H-12), 2.11 (1H, *dt*, J = 7.4, 7.0, 1.0 Hz H-11), 4.94 (1H, *d*, J = 5.5 Hz H-3), 5.26 (1H, *dt*, J = 10.2, 1.1 Hz), 5.21 (*d*, J = 8.2, Hz, H-8), 5.47 (1H, *dt*, J = 17.2, 1.1 Hz, H-1), 5.51 (*ddt*, J = 10.6, 8.2, 1.0, Hz, H-9), 5.61 (*ddd*, J = 10.6, 7.0, 1.0, Hz, H-10), 5.94 (1H, *ddd*, J = 17.2, 10.2, 5.5 Hz, H-2).

^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.1 (*q*, C-17), 22.6 (*t*, C-16), 27.7 (*t*, C-11), 29.1 (*d*, C-14), 29.1 (*t*, C-13), 29.3 (*t*, C-12), 31.8 (*t*, C-15), 58.6 (*d*, C-8), 63.5 (*d*, C-3), 68.7 (*s*, C-6), 70.3 (*s*, C-5), 78.2 (*s*, C-4), 79.9 (*s*, C-7), 117.3 (*t*, C-1), 127.7 (*d*, C-9), 134.8 (*d*, C-10), 135.8 (*d*, C-2).

Riferimenti bibliografici:

Seger C., et al. (2006). Reaction product analysis by high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance. Application to the absolute configuration determination of naturally occurring polyene alcohols. *Journal of Chromatography A* vol. 1136; pp. 82-88.

Lund DE., White M., (1990). Polyacetylenes in Normal and Water-Stressed “Orlando Gold” carrots (*Daucus carota*). *J. Sci. Food Agric.*, 51, pg: 507-516.

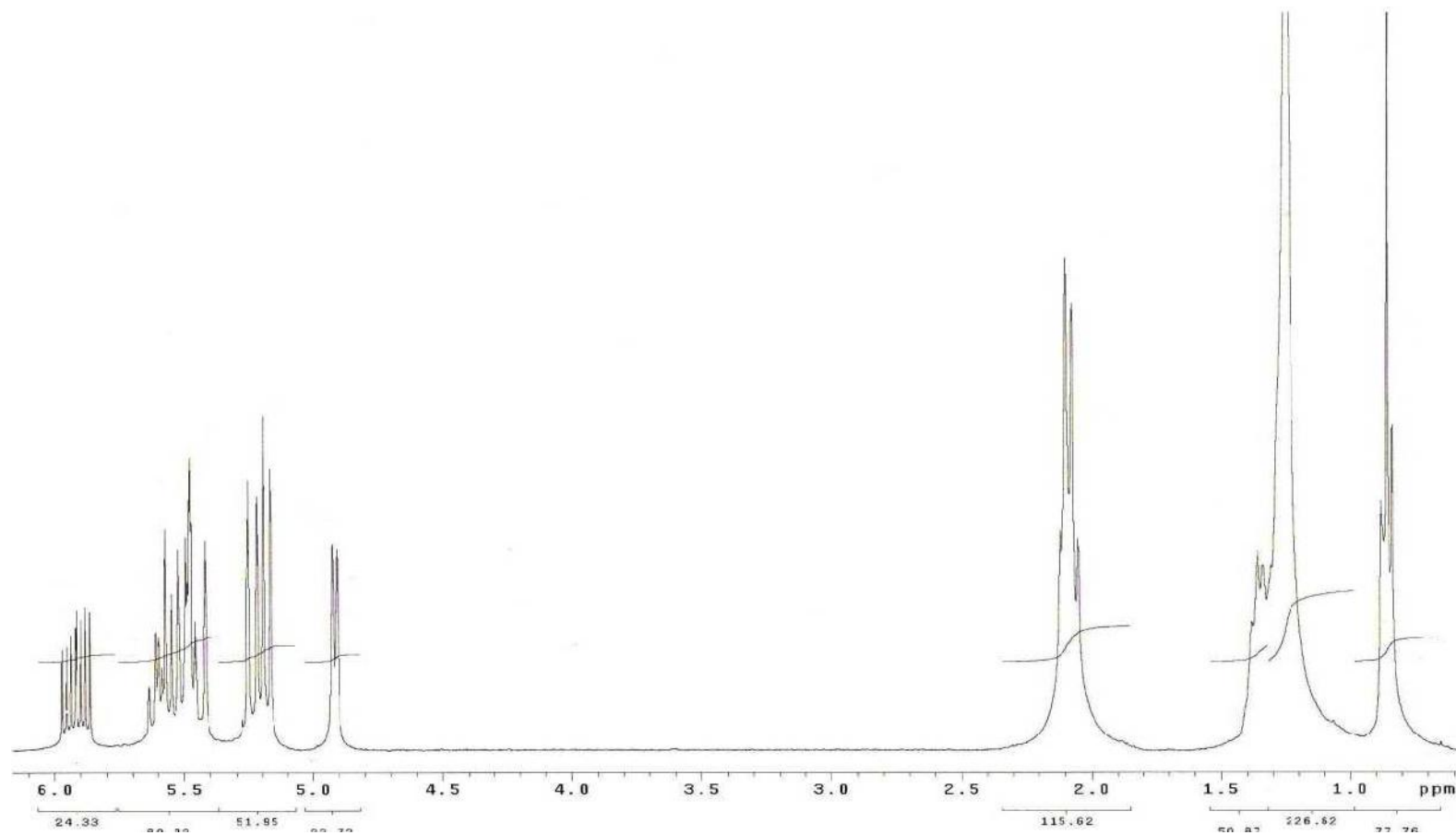
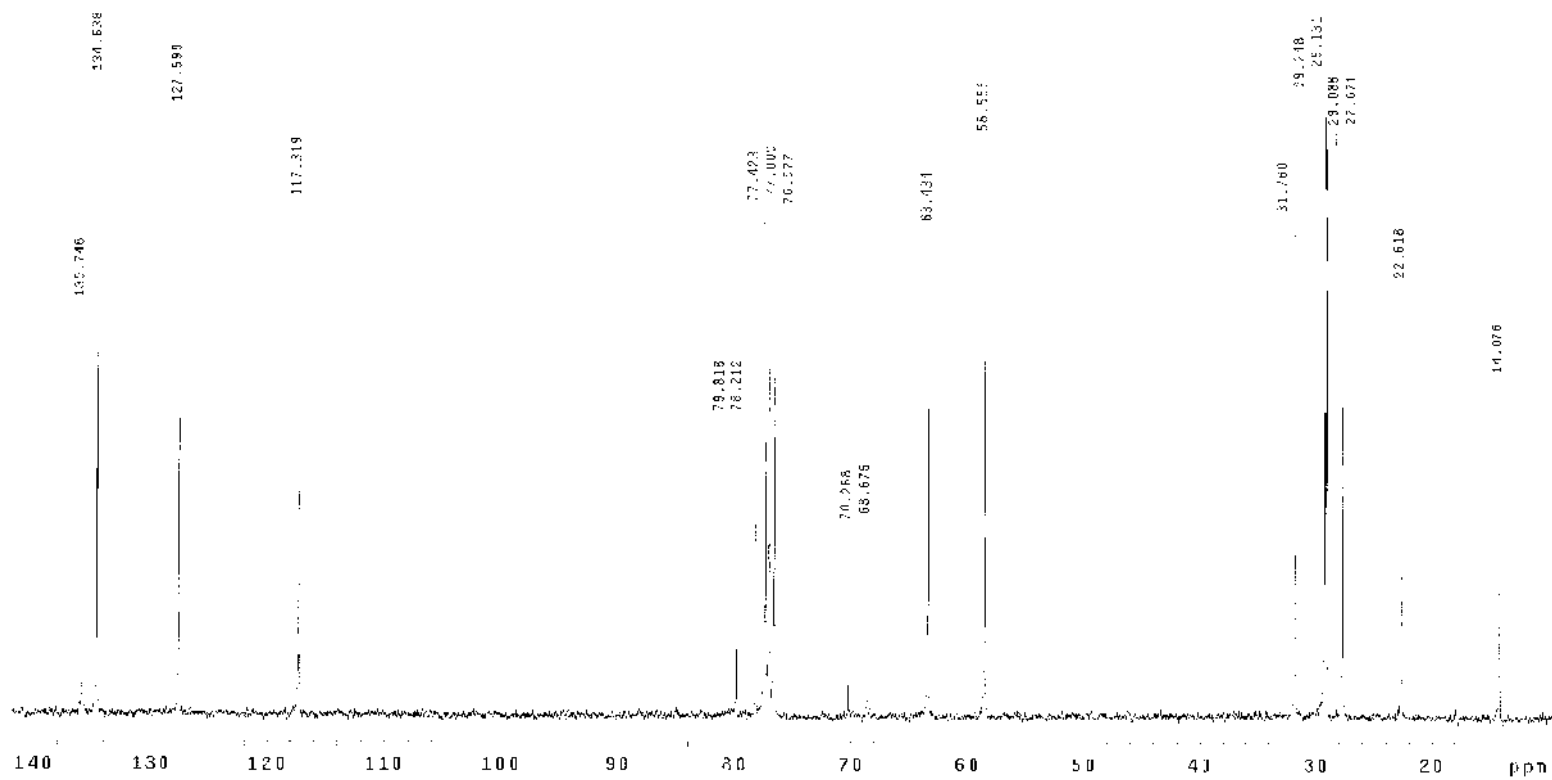
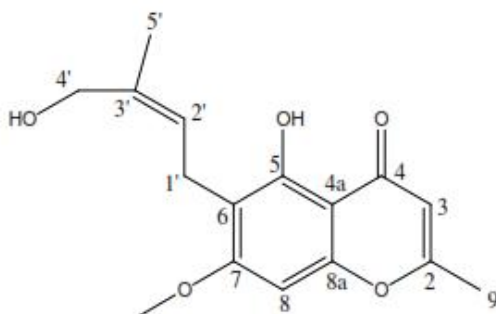


Fig. 5.29 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del falcarindiolo.

Fig. 5.30 Spettro ^{13}C -NMR del faltarindiol.

5.5.15 5-Hydroxy-6-(2-Z-Butenyl-3-Hydroxymethyl) 7methoxy-2-Methylchromone



Il campione si presenta come una gomma rosso bruna.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ : 1.75 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, Me (H-5')), 2.35 (3H, d, $J = 0.3$ Hz, Me (H-9)), 3.42 (2H, d, $J = 5.7$ Hz, H 1'), 3.91 (3H, s, OMe), 4.27 (2H, s, H4'), 5.34 (1H, dt, $J = 6$ Hz, 0.9 Hz, H-2'), 6.05 (1H, d, $J = 0.6$ Hz, H-3), 6.39 (1H, s, H-8), 13.06 (1H, s, OH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 20.5 (CH₃), 21 (CH₂), 22 (CH₃), 56 (OCH₃), 61.7(CH), 89.8 (CH), 105.3 (C), 108.9 (CH), 111.7 (C), 125.1 (CH), 135.2 (C), 156.6(C), 158.2 (C), 162.8 (C), 166.6 (C), 182.5 (C).

Riferimenti bibliografici:

Leonti, M., et al. (2010). A chromone from *Seseli praecox* (Apiaceae). *Natural Product Communications*, 5, pg: 551-554.

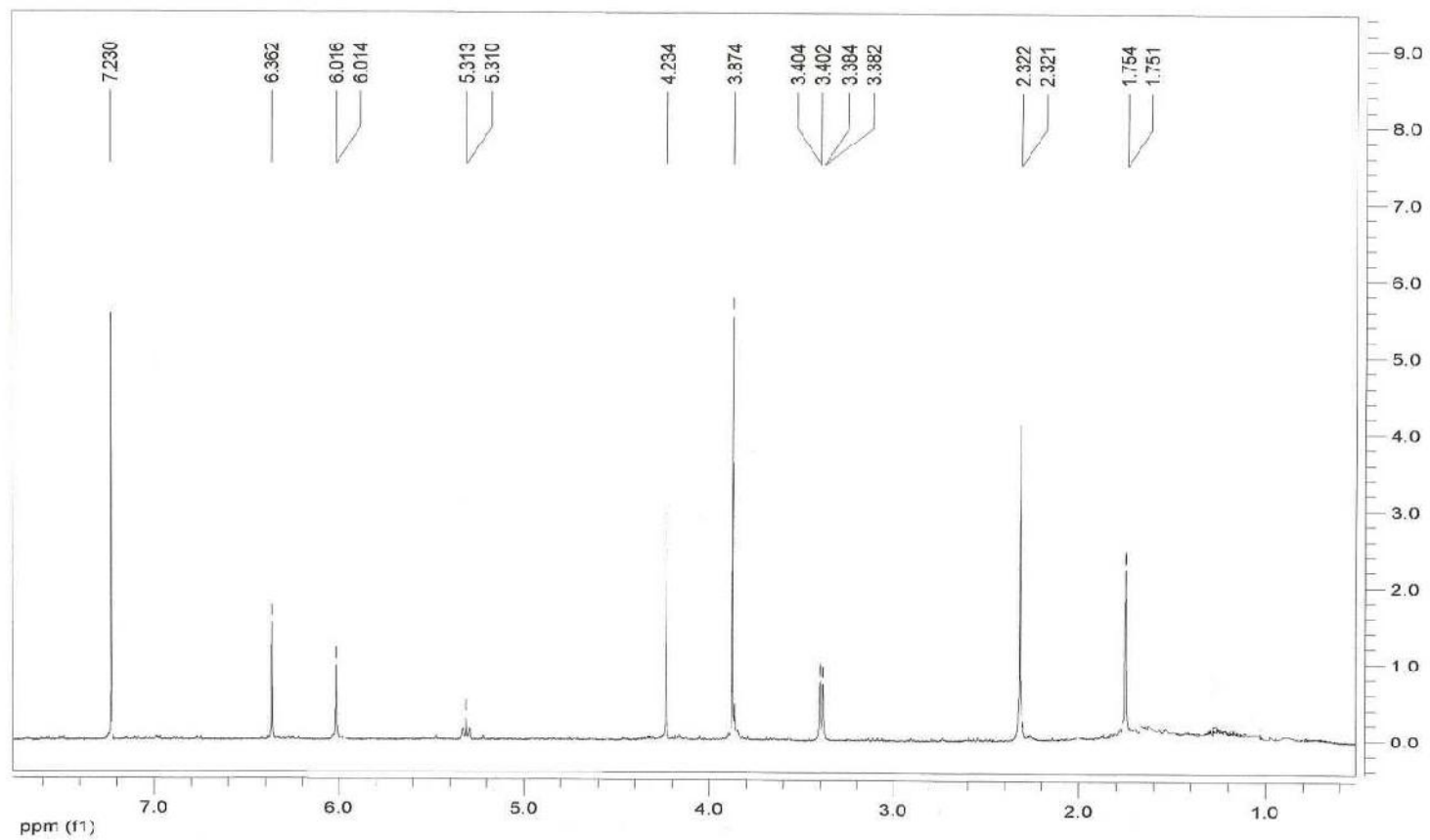


Fig. 5.31 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del 5-Hydroxy-6-(2-Z-Butenyl-3-Hydroxymethyl) 7methoxy-2-Methylchromone

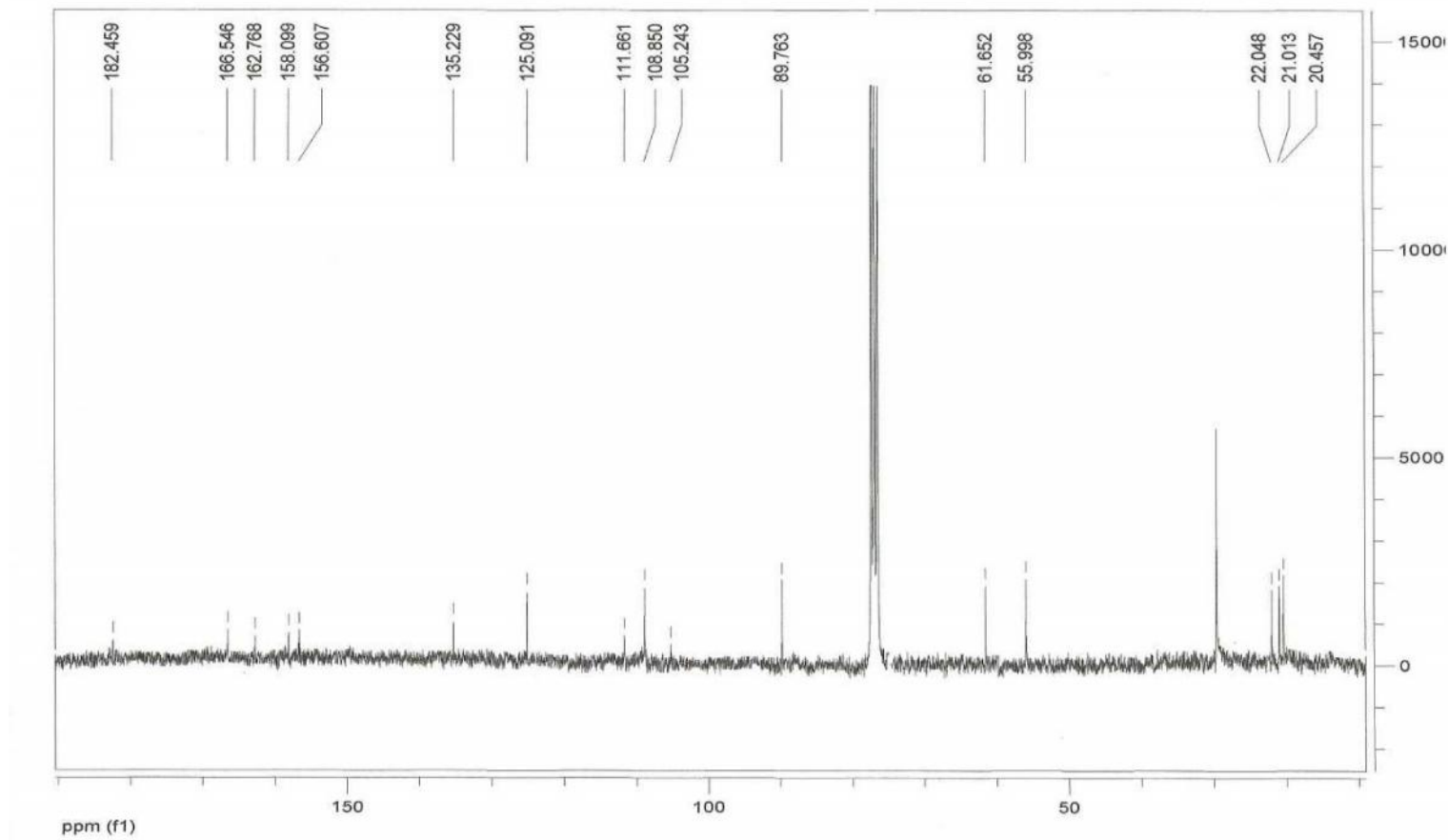
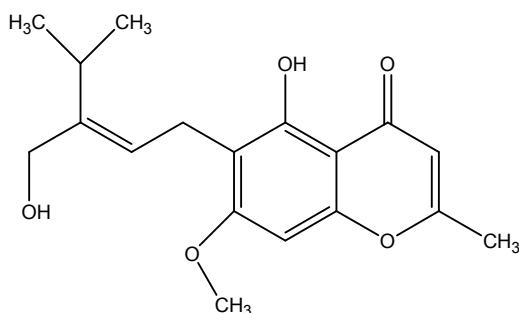


Fig. 5.32 Spettro ¹³CNMR del 5-Hydroxy-6-(2-Z-Butenyl-3-Hydroxymethyl) 7-methoxy-2-Methylchromone.

5.6 Delucidazione della nuova struttura isolata dalla *Seseli praecox*

La struttura dei composti è stata determinata principalmente attraverso lo studio degli spettri NMR monodimensionali al protone ^1H NMR ed al carbonio ^{13}C NMR e bidimensionali (HSQC, HMQC, COSY, Roesy) e di massa esatta (ESI).

5.6.1 Composto 15



Il composto si presenta come olio bianco

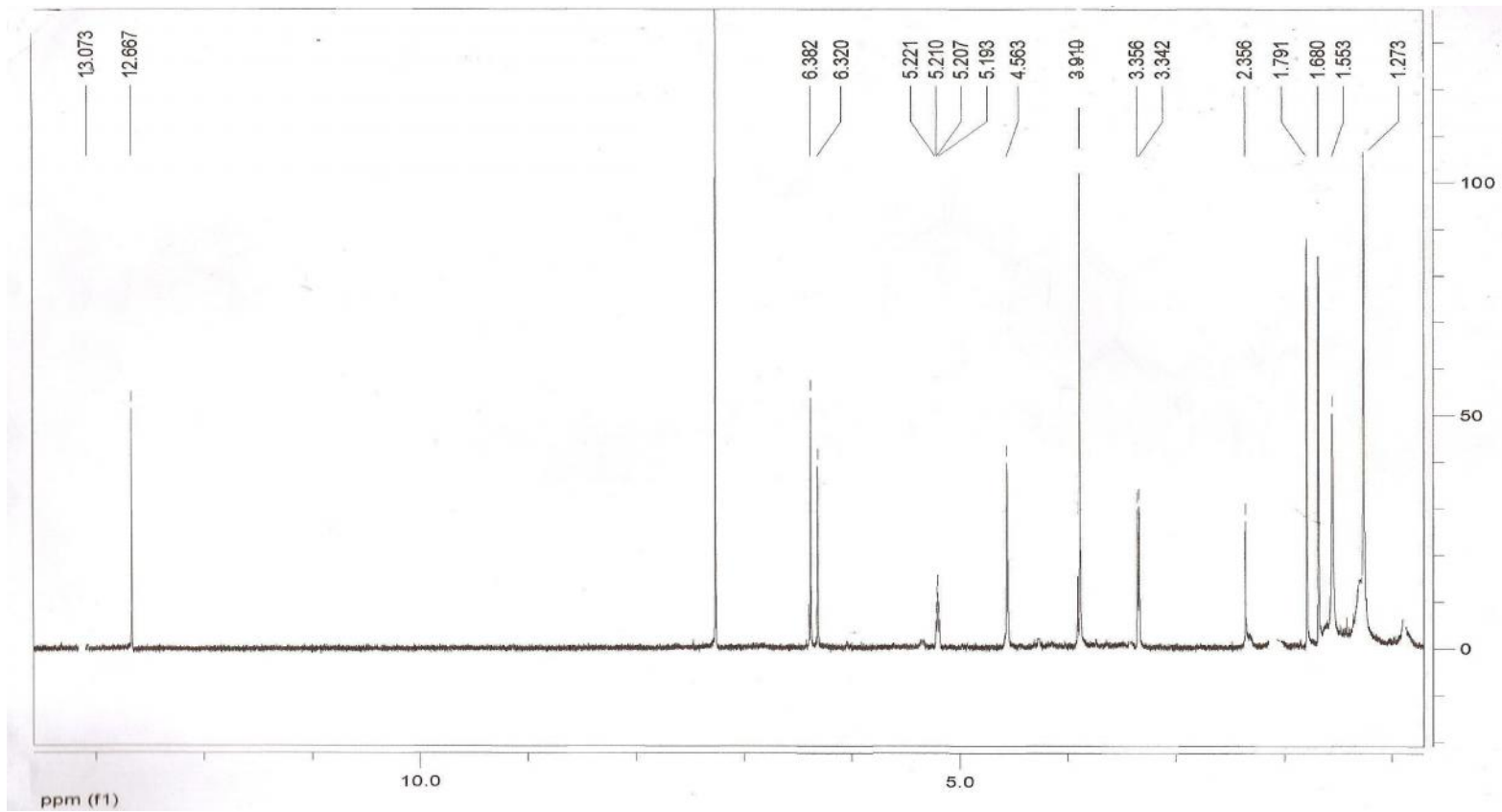
Ad un primo sguardo gli spettri del composto 15 sembrano alquanto simili al composto noto 14 (il 5-Hydroxy-6-(2-Z-Butenyl-3-Hydroxymethyl) 7methoxy-2-Methylchromone) visto precedentemente (Figura 5.33, 5.34).

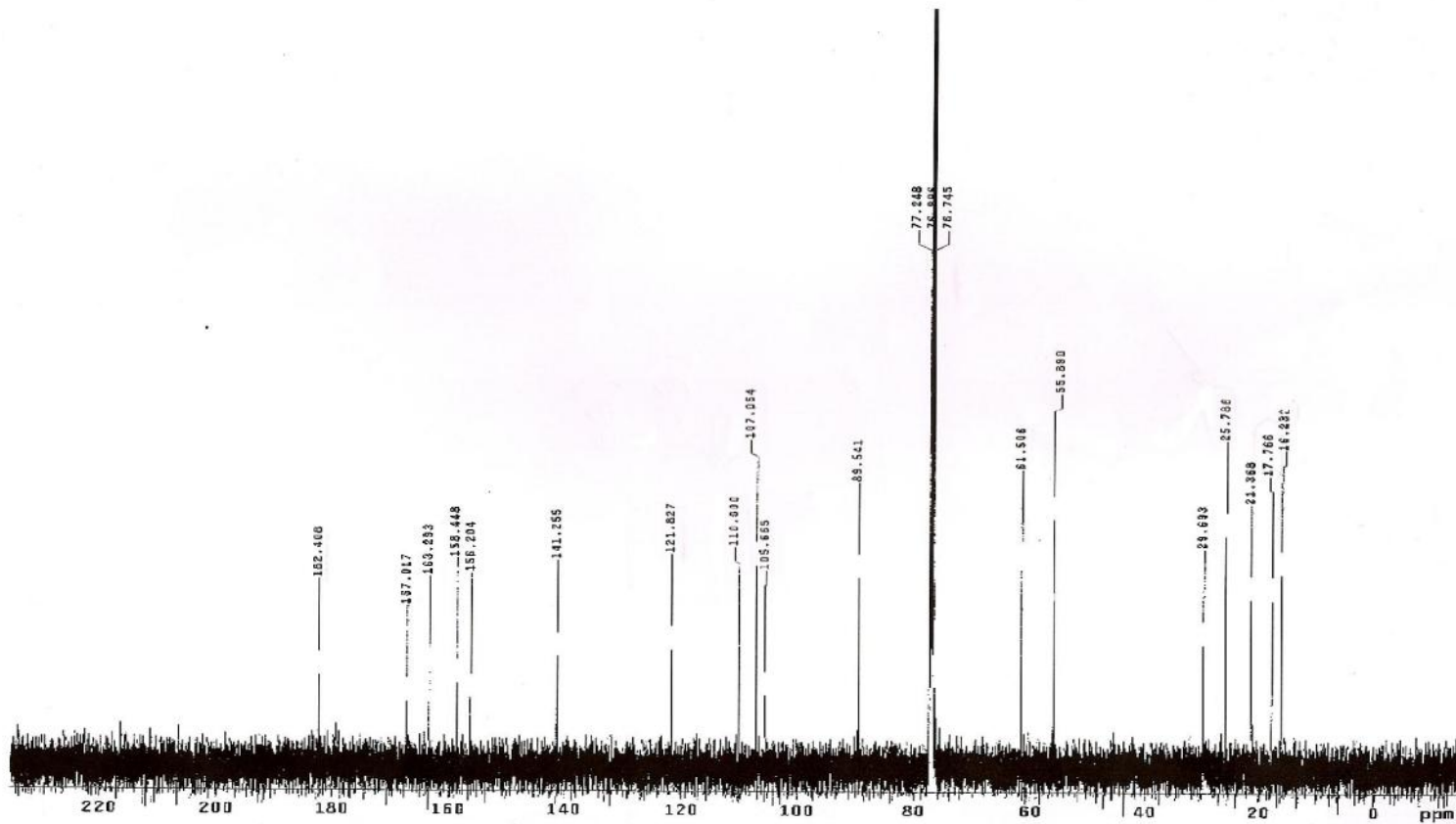
A differenza del composto precedente si evidenzia la presenza di un gruppo metilico (δ_c 17.7) ed un gruppo metinico (δ_c 29.6).

Lo spettro al carbonio (^{13}C NMR) contiene diciotto segnali che includono: un gruppo metossi (δ 55.8), tre metili (δ 17.6, 16.9, 29), due metileni (δ 21.2 e 61.2), quattro metini (δ 27.72, 89.5, 106.8, 121.8) e otto carboni quaternari (δ 107, 110.6, 141.2, 156.2, 158.4, 163.2, 167.8, 182.5 ppm).

Questi segnali corrispondono alla formula molecolare: $\text{C}_{18}\text{O}_5\text{H}_{22}$, congruente con $[\text{M}+\text{H}^+]$ a m/z ad un peso molecolare di 318 nello spettro di massa ESI. La presenza del carbonile a δ 182.5 e la risonanza del segnale con il gruppo metilico (δ_c 20.5 e δ_H 2.35) con la correlazione COSY con il protone metinico a δ 6.05,

suggerisce anche in questo caso la presenza di un nucleo del tipo 2-metilcromone (Cisowski et al. 1988. Harkar et al. 1984. Razdan et al. 1987).

Fig. 5.33 Spettro ^1H NMR del composto 15

Fig. 5.33 Spettro ^{13}C NMR del composto 15

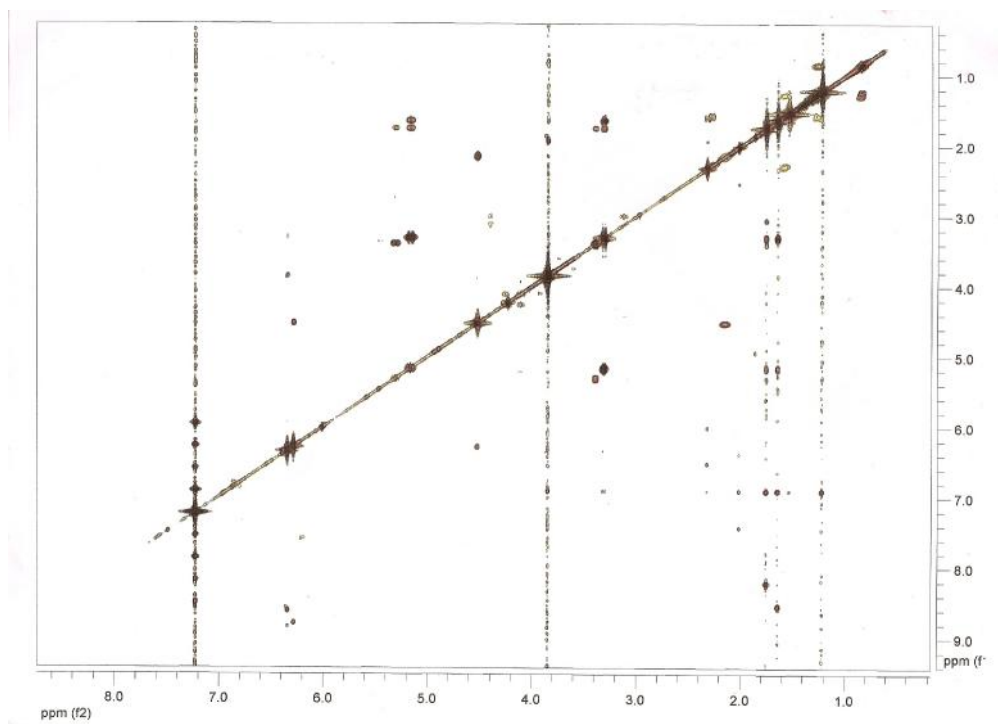


Figura 5.34 Spettro COSY del composto 15

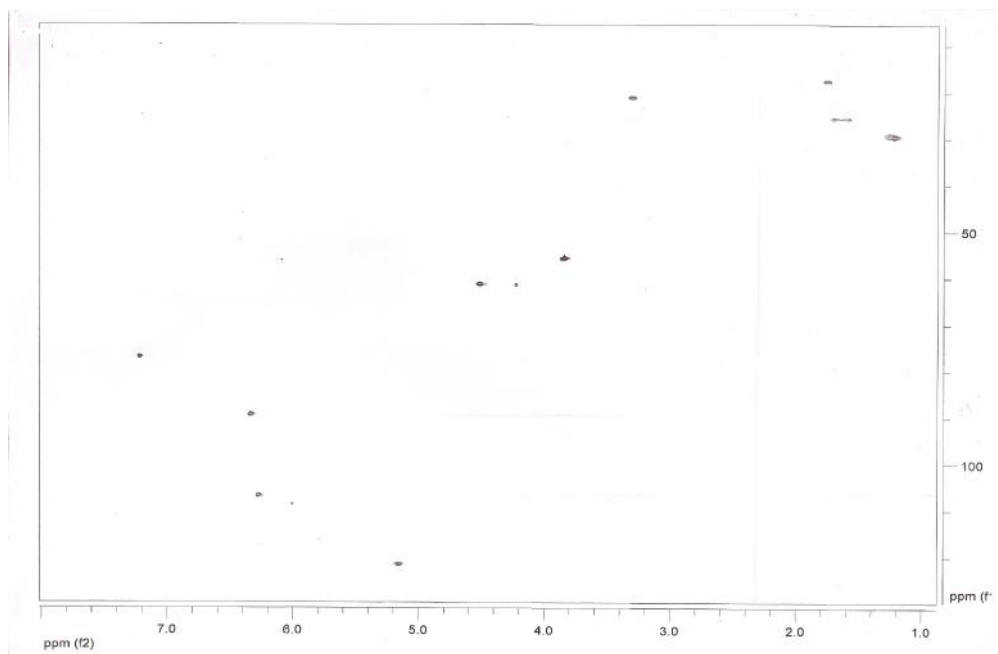


Figura 5.35 Spettro HSQC del composto 15

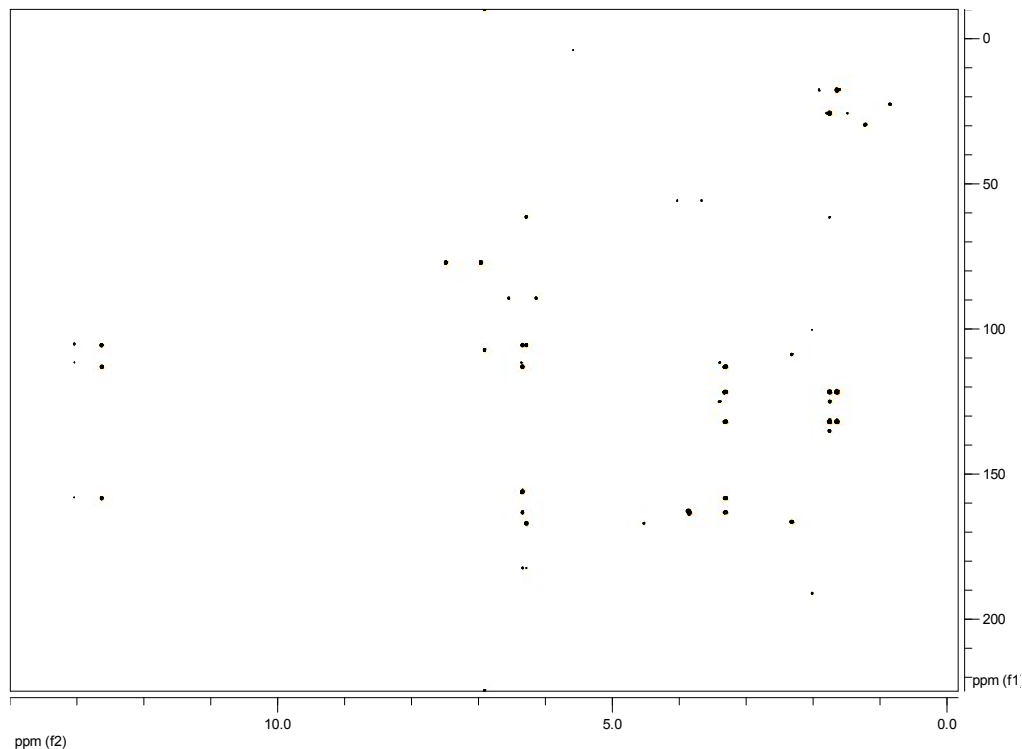


Figura 5.36 Spettro HMQC del composto 15

I possibili spostamenti delle giaciture sono in corrispondenza della catena in posizione 6 dell'anello aromatico.

Lo spettro DQF-COSY (Double Quantum Correlation Spectroscopy) mostra i protoni vicinali e geminali correlati via l'accoppiamento scalare (Figura 5.34).

Lo spettro HSQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) mostra le correlazioni tra un protone il carbonio a cui è direttamente legato (Figura 5.35)

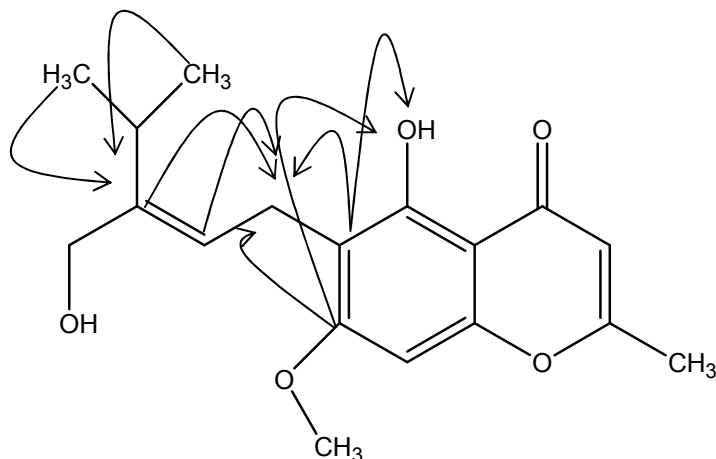
Riportiamo la tabella dei valori al carbonio ed al protone del nostro composto:

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) δ : 1.29 (3H, s), 1.69 (1H,m), 1.79 (3H,s), 2.35 (3H, s), 3.35 (2H, d, $J = 5.7$ Hz), 3.91 (3H, s, OMe), 4.56 (2H, s), 5.21 (1H, dt, $J = 6\text{Hz}, 0.9$ Hz), 6.32 (1H, s), 6.38 (1H, s), 12.66 (1H, s, OH).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 16.2, 17.7, 21.3 (CH₃), 25 (CH₂), 29.6 (CH), 55.8 (OCH₃), 61.5(CH), 89.8 (CH), 105.3 (C), 107(CH), 110.6(C), 121.8 (CH), 141.2 (C), 156.2 (C), 158.4 (C), 163.2 (C), 167 (C), 182.4 (C).

Lo spettro HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) correla un protone con i carboni separati da due o tre legami attraverso la loro costante di accoppiamento ($2J$, $3J$) (Figura 5.36).

Nella seguente figura vengono presentate alcune delle correlazioni della molecola.



Dai dati appena evidenziati il composto 15 presumibilmente sembra essere il 5-hydroxy-6-[(*E*)-3-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-pentenyl]-7-methoxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-one, nuovo composto naturale (Figura 5.37).

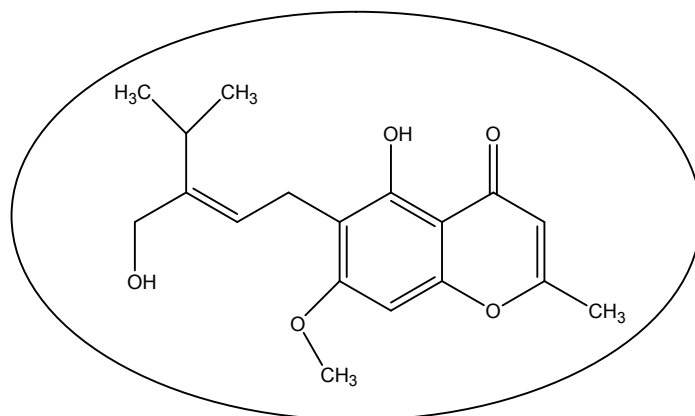


Figura 5.37 5-hydroxy-6-[(*E*)-3-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-pentenyl]-7-methoxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-one,

5.7 Risultati biologici sui Khellactoni isolati dalla *Seseli praecox*

5.7.1 Inibizione canali al Ca^{++}

5.7.1.1 Introduzione

A seconda della localizzazione nella cellula le Calcio-ATPasi si dividono in due classi, con circa il 50% di omologia di sequenza:

- SERCA (*Sarco/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPasi*), presente sul reticolo sarcoplasmatico o endoplasmatico con funzione di sequestrare Calcio all'interno delle cisterne.
- PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPasi*), tipica della plasmamembrana, pompa Calcio all'esterno della cellula.

La pompa Ca^{++} -ATPasi, insieme al cotrasportatore (antiporto) 3Na^{++} - Ca^{++} , fa parte dei meccanismi OFF del calcio.

Pompa del calcio della membrana plasmatica (PMCA) Ne esistono quattro isoforme e sono attivate dalla calmodulina; ha il compito di pompare uno ione calcio dal citosol all'esterno.

PMCA 1: ubiquitaria, ha la funzione di mantenere costante la concentrazione intracellulare di calcio. Presenta un sito per la fosforilazione da parte di protein-chinasi A e C (PKA e PKC) (che serve ad aumentare la velocità della pompa).

PMCA 2: neuroni.

PMCA 3: muscolo scheletrico e cervello.

PMCA 4: in fase di studio.

Esistono anche una PMCA epatica, inibita da vasopressina, ed una PMCA eritrocitaria, stimolata dagli ormoni tiroidei.

Pompa del calcio del reticolo sarcoplasmatico (SERCA) Ne esistono tre isoforme e ha lo scopo di rimuovere il calcio dal citoplasma facendolo entrare nel reticolo endoplasmatico e nel reticolo sarcoplasmatico. A differenza di PMCA, pompa 2 ioni Ca^{++} per ogni ATP idrolizzato.

SERCA 1: muscolo veloce (scheletrico).

SERCA 2: muscolo cardiaco e in molti altri tipi cellulari; serve a mantenere costante la concentrazione di calcio intracellulare. È regolata dalla calmodulina e dal fosfolambano.

SERCA 3: piastrine, eritroblasti, endoteli, epiteli.

SERCA è inibita da tapsigargina e dall'acido ciclopiazonico.

Il SERCA risiede nella membrana dei Reticoli sarcoplasmatici o endoplasmatici, e trasferisce due ioni Calcio dal citoplasma al lume di questi due organelli; è presente soprattutto nelle cellule muscolari, dove può costituire fino al 90% delle proteine di membrana. Entra in azione dopo che i livelli di calcio intracellulari citoplasmatici sono aumentati, in seguito a, ad esempio, stimoli elettrici che hanno aperto i canali del calcio voltaggio dipendenti: questo è il caso della contrazione muscolare.

5.7.1.2 Commento dei risultati

In riferimento alla pubblicazione in cui la Visnadina, un khellactone simile ai nostri, ottenuto dai frutti di *A. visnaga* inibiva i canali al Ca^{2+} ex vivo (Rauwald et al. 1993, Duarte et al. 1997) si è inizialmente pensato di testare i 5 khellactoni sulla loro possibile capacità di inibire la pompa al Ca^{++} . Questo è stato possibile effettuando il test su cellule HL60 (Cellule promyelocytic umane di leucemia) misurando i transienti di calcio intracellulare usando un fluorometric imaging plate reader ed usando come riferimento la Tapsigargina (Figura 5.38), un inibitore specifico della SERCA (Sarcoplasmic/ Endoplasmic Reticulum ATPase Pump), un pompa per il Ca^{++} ATP dipendente presente sul reticolo endoplasmatico.

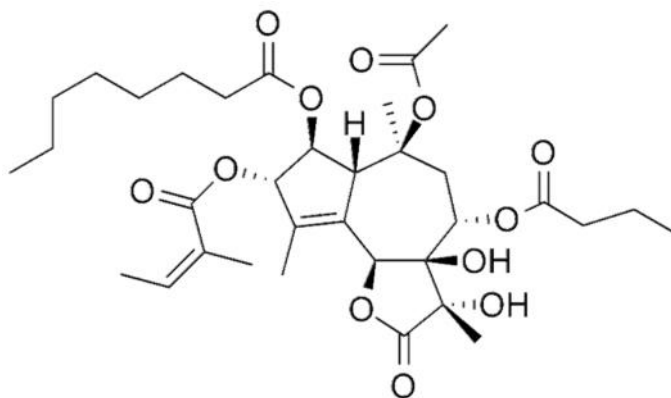


Figura 5.38 Formula della Tapsigargina

Come si può evidenziare nei grafici sotto riportati (Figura 5.39) solo il composto K1 (nel grafico linea verde scuro) corrispondente al Hyuganin D realmente affetta le cellule.

K-Compounds HL60

- 0.25% DMSO (yellow)
- 5 μ M K compounds (K1 dark green; K2 orange; K3 pink)
- 2 μ M Thapsigargin (light green)

ove

K1 Seravschanin o Hyuganin D

K5 Hyuganin C

K2 (+)-cis-Khellactone

K3 (+)-Pteryxin

K4 Suksdorfin

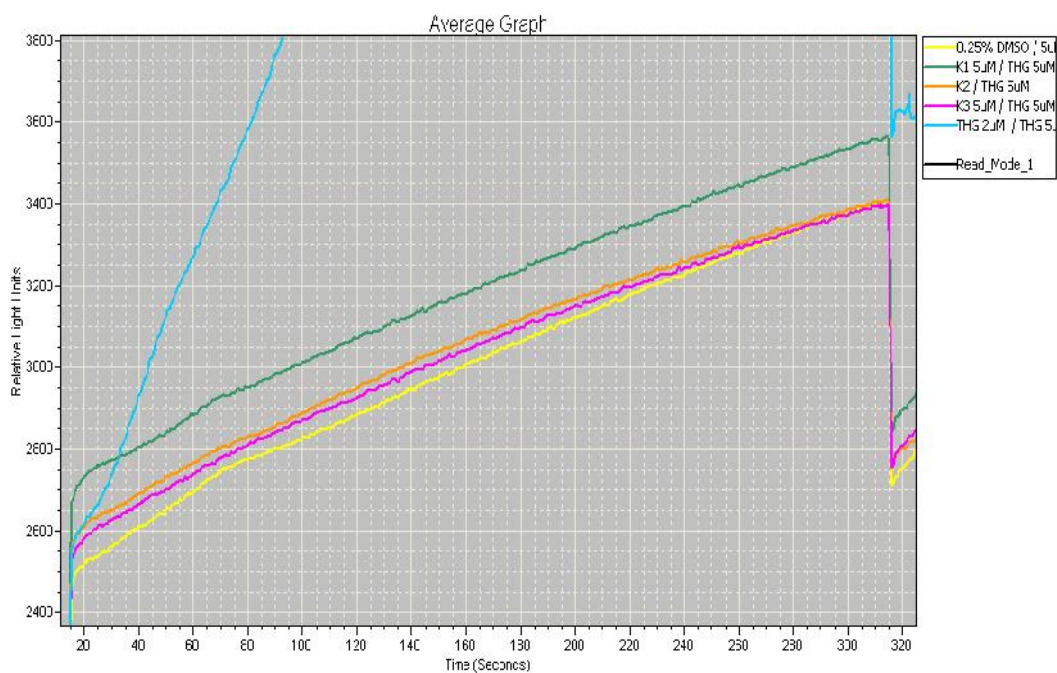
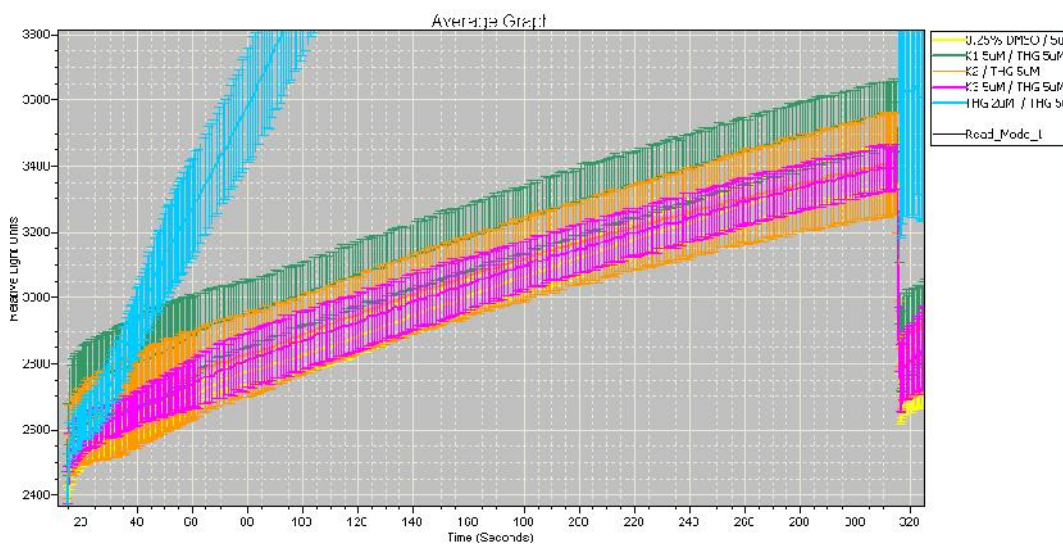


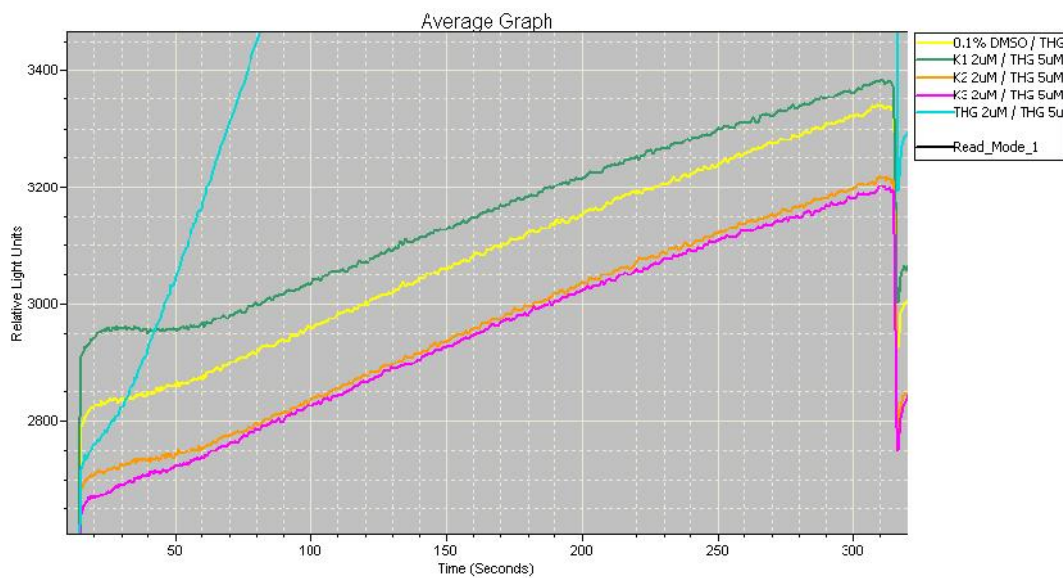
Figura 5.39 immagini evidenziate con un fluorometric imaging plate reader (FLIPR®) dove vengono misurati i transienti intracellulari di calcio.

Standard deviation plot:



K-Compounds HL60

- 0.1% DMSO (yellow)
- 2 μ M K compounds (K1 dark green; K2 orange; K3 pink)
- 2 μ M Thapsigargin (light green)



Standard deviation plot:

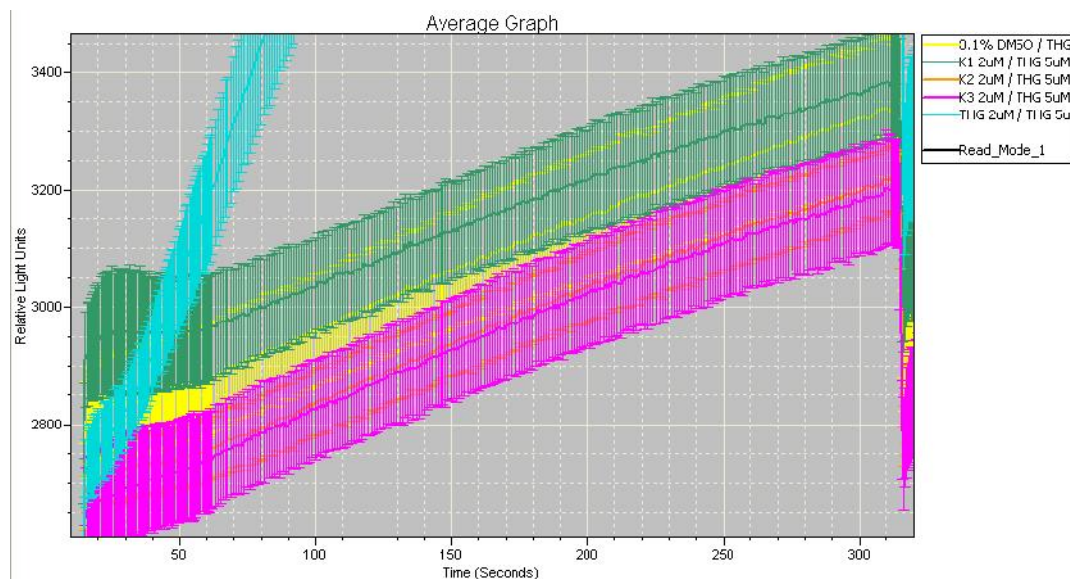


Figura 5.39 immagini evidenziate con un fluorometric imaging plate reader (FLIPR®) dove vengono misurati i transienti intracellulari di calcio.

Poiché l'omeostasi del calcio è coinvolta negli effetti anticancro (Florea AM et al., 2009; Zhu WH et al., 1995) e vista la bibliografia relativa alla possibile attività delle piranocumarine sulla inibizione della P-glicoproteina espressa dal gene MRD1 si è pensato di effettuare ulteriori test.

5.7.2 Inibizione delle Pgp nella MDR(multidrug resistance)

5.7.2.1 Introduzione

L'attività di molti farmaci dipende dalla loro capacità di attraversare le barriere per raggiungere il loro bersaglio. I farmaci lipofili sono in grado di farlo in assenza di sistemi di trasporto specializzati mediante diffusione passiva attraverso le membrane plasmatiche. Al contrario, i composti idrofilici necessitano di meccanismi di trasporto specifici per facilitare il loro trasporto. Comunque il tasso con cui un farmaco si accumula

in un tessuto è limitato non tanto dalla sua capacità di entrare nella cellula ma dalla sua tendenza a membrane plasmatiche. Questi meccanismi di efflusso giocano un ruolo critico nella limitazione dell'assorbimento e accumulo di sostanze esogene e possono effettivamente conferire resistenza a diversi farmaci (MDR multidrug resistance) nelle cellule tumorali.

I trasportatori che hanno un ruolo nella MDR sono proteine codificate dai geni ABC (ATP-binding cassette), di cui almeno sei sono associate al trasporto di chemioterapici (Kamau S. W. Et al 2005). Questi geni rappresentano la più ampia famiglia di proteine transmembrana che legano ATP e usano l'energia per guidare il trasporto di diverse molecole attraverso tutte le membrane. Le pompe ABC sono unidirezionali e muovono i composti dal citoplasma allo spazio extracellulare o in un compartimento intracellulare (reticolo endoplasmatico, mitocondri e perossisomi). Inoltre, è ormai noto che il più importante ruolo fisiologico delle proteine trasportatrici è nella detossificazione dell'organismo e nella protezione da sostanze xenobiotiche, mediante il trasporto dei composti idrofobici dentro le cellule come parte di un processo metabolico o fuori la cellula per la eliminazione dal corpo con l'urina e la bile (Modok et al., 2004; Troost et al., 2004).

Il gene ABCB1, anche noto come gene della resistenza multipla (MDR1), è il trasportatore meglio caratterizzato attraverso la sua capacità di conferire un fenotipo MDR alle cellule tumorali che hanno sviluppato resistenza ai farmaci. Il gene MDR1 codifica per una glicoproteina-P (PgP), che svolge un ruolo importante nello sviluppo della resistenza a molti chemioterapici antitumorali precludendone l'accumulo a livello delle cellule neoplastiche in caso di superespressione (Roninson, I. B., ed. 1991; Goldstein, L. Jet al., 1989; Noonan, K. E., et al. 1990; Chan, H. S. L., et al., 1990; Chan, H. S. L., et al. 1991).

La P-glicoproteina è una 170-kDa glicoproteina di transmembrana, che è sovraespressa in varie linee cellulari MDR. Funziona come una pompa di efflusso di farmaci ATP-dipendente che rapidamente estrude una varietà di farmaci antitumorali idrofobi da cellule bersaglio del cancro, ed in tal modo Impedisce i loro effetti citotossici (Gottesman et al, 2002; Tan et al, 2000). Più in generale, la PgP è responsabile dell'escrezione biliare e renale di molti farmaci e ne può modificare l'assorbimento intestinale o il passaggio a livello del SNC. Queste strutture proteiche sembrano essere una sorta di cancello intelligente attraverso il quale le cellule del nostro organismo possono regolare l'entrata o l'uscita dal citoplasma di particolari sostanze.

In cellule Madin Darby canine kidney (MDCK), stabilmente transfettate con il gene *mdr1* (MDR1-MDCK cellule), le P-gp sono altamente espresse e omogeneamente distribuite

sullo strato già pochi giorni dopo la semina. Questo è in contrasto con colture cellulari Caco-2 che esprimono le P-gp dopo 2-3 sett in quantità inferiori (Braun et al, 2000; Hammerle et al. 2000; Luker et al., 2000).

Le P-gp sono localizzate principalmente nella membrana plasmatica apicale (Simons e icone, 1997, Hammerle et al, 2000;. Luker et al., 2000), che si arricchisce di colesterolo, glicosfingolipidi (GSLs) e sfingomieline (SM) (Simons e van Meer, 1988; Hooper, 1999). Le cellule MDR1-MDCK Malthus rappresentano un ideale sistema per studiare l'influenza della modulazione dei lipidi sulla localizzazione e funzione della P-gp.

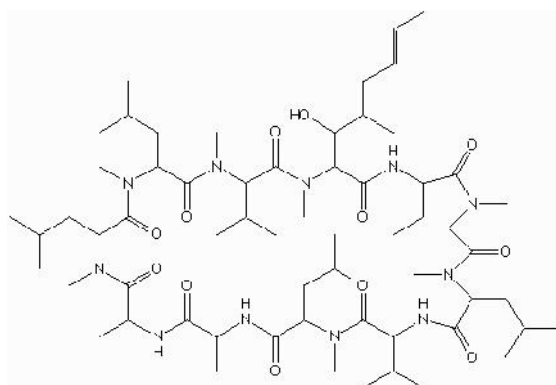
La Resistenza agli agenti chemioterapici delle cellule tumorali rimane quindi uno dei maggiori ostacoli nella realizzazione di un efficace trattamento per il cancro. I meccanismi molecolari di resistenza multidrug (MDR) nelle cellule tumorali può comportare l'iperespressione delle pompe di efflusso di membrana per la droga, mutazione p53, up-regulation di bcl-2, la riparazione del DNA o disintossicazione cellulare degli enzimi (Gottesman et al., 2001).

Potenziati agenti inibitori della P-glicoproteina sono stati sviluppati ed alcuni di loro seguono il percorso clinico (Goldstein, 1995; Thomas e Coley, 2003).

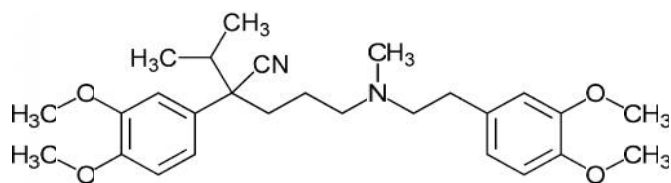
La prima generazione di agenti inibitori delle P-glicoproteine che è stata testata clinicamente include il calcio-antagonista verapamil, e l'immuno-soppressore ciclosporina A (Hindenburg et al. 1987, e Thomas Coley, 2003) (Figura 5.40).

Pur avendo una certa efficacia, questi agenti sono relativamente deboli inibitori della P-glicoproteina (con una EC 50, 2-10 μ M) e mostrano una dose-limite che riduce notevolmente la loro utilità clinica (Ozols et. al, 1987; Tan et al, 2000) .

Quindi vi è un notevole interesse per la ricerca di nuovi inibitori della glicoproteina P che non provochino tossicità significativa alle dosi necessarie per l'inibizione delle stesse.



verapamil



ciclosporina A

Figura 5.40 strutture del verapamil e della Ciclosporina A.

I materiali vegetali hanno una lunga storia nel trattamento del cancro, sia come agenti chemioterapici che per i trattamenti complementari.

Le cumarine costituiscono una classe importante di prodotti O-eterociclici naturali ampiamente distribuiti ed isolati da agrumi e verdure (5). Le cumarine naturali possiedono una varietà di attività biologiche, compresa l'attività antitumorale (6). Al contrario, poche informazioni sono disponibili sul potenza MDRmodulating di cumarine semplici, che sono considerate esercitare bassa tossicità per i mammiferi. Grazie alla presenza di cumarine nella dieta umana e impianti medicinali diversi studi hanno cercato di evidenziare i possibili effetti modulatori delle cumarine sull'MDR (7). Tre derivati cumarinici, il 6-metil, 7-metil e l'etil 3-coumarincarboxylate, non sono stati efficaci sul MDR efflusso pompa P-gp di cellule di linfoma di topo in vitro (8).

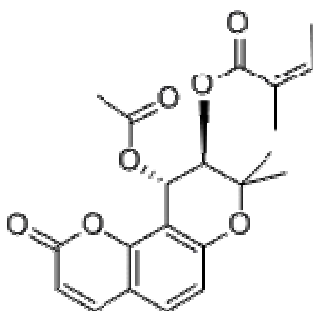
La 7-idrossicumarina e l'8-nitro-7-idrossicumarina sono risultati potenti agenti citotossici contro linee cellulari di carcinoma renale umano. Tuttavia, questi composti non erano un substrato per P-gp-mediata MDR (9, 10). I derivati pyranocoumarinici, come il racemo cis-3'-4'- angeloyl-acetossi-khellactone, è stato suggerito per la capacità di eludere il MDR fenotipo conferito mediante la sovraespressione di P-gp (11). In uno studio recente (Masami K. et al., 2005) sono state studiate 44 cumarine, di cui 14 composti inducono moderatamente l' inversione di MDR.

Il composto più attivo, il 6-idrossi-3-(2-idrossietil)-4-metil-7-Metossicumarina è risultato un modulatore MDR potente come il verapamil. Tutte le cumarine testate erano più citotossiche contro le cellule tumorali rispetto alle cellule normali. Sia 6-idrossi-7-metossi-4-metil-3-isopropylcoumarin e 3-etil-6-idrossi-7-metossi-4- methylcoumarin hanno mostrato la più alta citotossicità tumore-specifica (SI= 4.1 e 3.6, rispettivamente) evidenziando che le cumarine sono potenzialmente nuovi potenti modulatori MDR con bassa tossicità nei confronti delle cellule normali.

Il frazionamento bioguidato degli estratti di *Radix Peucedani* (La radice essiccata di *Peucedanum praeruptorum* Dunn famiglia Umbelliferae, noto anche come “ Baihua Qianhu” nella Medicina cinese) ha portato all'isolamento di composti piranocoumarinici quali (+/-)-3'-4' angeloyl-acetossi-cis-khellactone (Wu Y. J. Et al., European Journal of Pharmacology 2003).

L'erba è ben nota per il trattamento di malattie respiratorie e per l'ipertensione polmonare. Esso contiene un certo numero non-glicosidiche piranocoumarine di tipo angolare.

Il primo isolamento di praeruptorin A, B, C e D dall'erba è riportato da Chen et al. (1979). La struttura chimica di uno degli enantiomeri della praeruptorin A, attraverso la praeruptorin C, è stata riportata come il 3'(S). angeloyloxy-4'(S)-acetoxy-3'-4'-dihydroselesin (Figura 5.41)



Praeruptina A

Figura 5.41 Struttura della praeruptina A.

La praeruptorin A è stata riportata per gli effetti biologici quali azione antagonista al calcio (Okuyama and Shibata 1981), effetti bloccanti al canale al calcio (Chang et al., 1993; Li et al, 1994); Hao et al., 1996; Feng et al., 1998) e effetti antagonisti sulla aggregazione piastrinica (Aida et al., 1995).

In Wu et al 2003 viene riportata l'attività MDR-reversal delle piranocoumarine su cellule di cancro umano.

Oltre ai farmaci citotossici sopra elencati, una varietà di altri prodotti chimici agiscono come substrati per le Pgp. Tra questi vi sono un gran numero di coloranti fluorescenti che possono essere usati come sonde molecolari per lo studio di MDR. La rodamina 123

(Rh123), che è selettivamente localizza nei mitocondri [Johnson LV et al., 1981], è risulta la più efficiente effluxed da parte delle cellule MDR e relativamente non tossico .

L' efflusso può essere inibito da molecole come il verapamil e altri modulatori dell' MDR [9, 10]. Recentemente, è stato suggerito che l'uso di Rh123 insieme alla citometria a flusso può fornire un utile approccio alla la determinazione di attività della glicoproteina in cellule emopoietiche (11-13).

5.7.2.2 Commento dei risultati ottenuti

Si è pensato di testare i nostri Khellactoni sulla loro possibile attività di inibizione della P-glicoproteina espressa dal gene MRD1.

Anche in questo test (vedasi i metodi nel capitolo 6) solo il composto K1 ha mostrato una significativa attività inibitrice. In questo caso l'attività della Pgp è stata determinata attraverso lo studio dell'efflusso della rhodamine-123 usando cellule umane MDCK transfettate con il gene MDR-1 e l'inibitore delle Pgp verapamil e il substrato delle PGP vinblastine come controllo.

Nella figura 5.42 si può osservare come l'effetto del composto K1 è simile a quello della vinblastina (un alcaloide indolico contenuto nelle foglie della vinca rosea (*Catharanthus roseus*) e utilizzata nella cura dei tumori, incluso il linfoma di Hodgkin, il tumore ai polmoni, quello della mammella e dei testicoli).

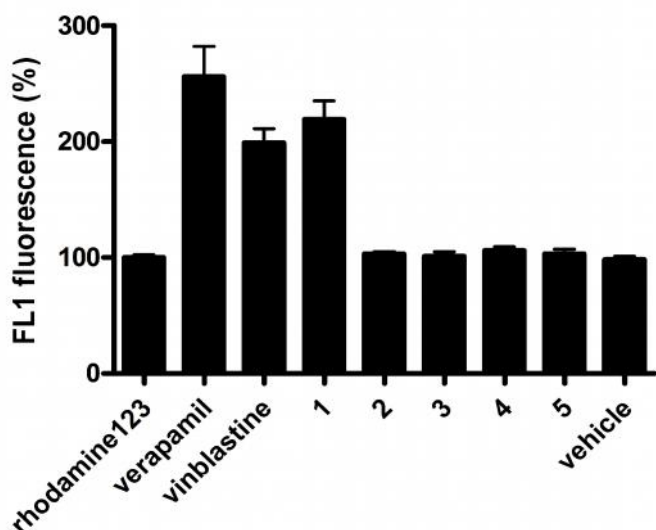


Figura 5.42 Effects of compounds **1-5** (5 μ M) on Pgp-mediated rhodamine123 (5 μ M) efflux from MDCK cells (2×10^6 cells) stably transfected with human MDR-1 (Pgp). Shown is the mean fluorescence measured (geo mean in FACS, 10^4 cells counted, see histogram insert) as % of remaining cellular rhodamine123 after washing, relative to control. The Pgp inhibitor verapamil and the Pgp substrate vinblastine (5 μ M) were used as positive controls. Data show mean values of 3 independent experiments \pm S.D.

Nella figura 5.43 invece si può osservare l'effetto dose dipendente del composto K1

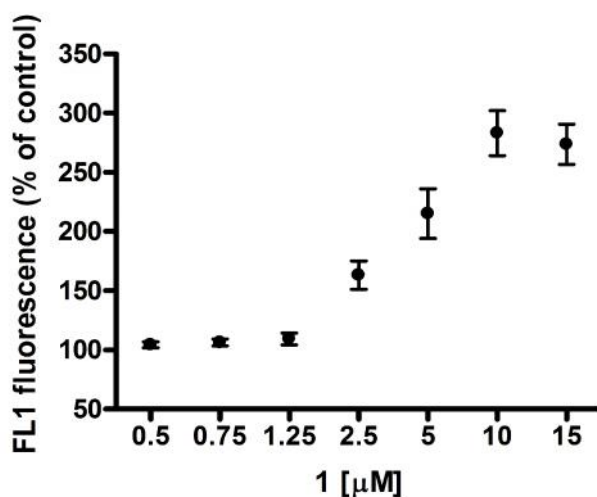


Figura 5.43 (Concentration-dependent effect on Pgp-efflux by compound K1.

5.7.3 Commenti e progetti futuri

Risulta interessante notare come in entrambi gli studi effettuati sui khellattoni isolati solo il composto K1 mostra attività. Si può presumere che la presenza del doppio legame rispetto agli altri composti giochi il ruolo decisivo. Attualmente siamo in attesa dei dati relativi alla citotossicità dei 5 campioni e stiamo modificando sinteticamente i khellactoni per poter spiegare una relazione struttura attività degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

Bergendorff O. et al. (1997). Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. *Phytochemistry*, 44, pag: 1121-1124.

Bohlmann et al. (1980). Chromones and flavans from *Marshallia obovata*. *phytochemistry*, 19, pg: 1815-1820.

Brinkmann U, Eichelbaum M: Polymorphism in the ABC drug transporter gene MDR1. The Pharmacogenomics journal : 2001, VOL. 1, P: 59-64.

Chan, H. S. L., Thorner, P. S., Haddad, G. & Ling, V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. (1990) *J. Clin. Oncol.* 8, 689-704.

Chan, H. S. L., Haddad, G., Thorner, P. S., DeBoer, G., Lin, Y. P., Ondrusek, N., Yeager, H. & Ling, V. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma (1991) *N. Engl. J. Med.* 325, 1608-1614.

Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991,66,85-94.

Chaudhary PM, Roninson IB. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *Nat Cancer Inst* 1993,85, 632-639.

Durate J, Vallejo I, Pérez-Vizcaino F, Jiménez R, Zarzuelo A, Tamargo J. 1997. Effects of visnadine on rat isolated vascular smooth muscles. *Planta Med.* 1997 Jun;63(3):233-6.

Florea AM, Büsselberg D; Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *di. Neurotoxicology.* 2009;30(5):803-10.

Furumi K. Et al (1998). Novel antiproliferative faltarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8, pg: 93-96.

Ganbaatar Zh et al. (2008). Plant Coumarins. 3. (+)-Pteryxin from *Peucedanum terebinthaceum*. *Chemistry of natural compounds*, 44, pg: 578-581.

Goldstein, L. J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S.-L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur, G. M., Lieber, M., Cossman, J., Gottesman, M. M. & Pastan, I. (1989) *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 116-124.

Gottesman, M.; Fojo, T; Bates, S.E. *Nat. Cancer* 2002, 1, 45-58

Harker S. et al. (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry*, 23, pg: 419-426.

Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. Monitoring of relative mitochondrial potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biochem* 1991;48:526-535.

Ito C. et al. (1991). New Coumarins from Citrus Plants. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 39, pg: 2509-2513.

Kamau S. W et al, *In vitro cell Dev Biol-Animal* 41:207-216 (2005)

Lampidis TJ, Munck JN, Krishan A, Tapiero H. Reversal of resistance to rhodamine 123 in adriamycin-resistant Friend leukemia cells. *Cancer Res* 1985;45:2622-2631.

Lemmich J et al. (1966). Constituents of Umbelliferous Plants. VIII. Coumarins from the Root of *Seseli libanotis* (L.) Koch. The Structure of Three New Coumarins. *Acta chemica Scandinavica*, 20, pg: 2497-2507.

Leonti, M., et al.(2010) A chromone from *Seseli praecox* (Apiaceae). *Natural Product Communications*, 5, pg: 551-554.

Leonti, M., et al. (2010). Falcarinol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces pro-allergic effects in skin. *Biochemical Pharmacology*, 79, pg: 1815-1826.

Lund DE., White M., (1990). Polyacetylenes in Normal and Water-Stressed "Orlando Gold" carrots (*Daucus carota*). *J. Sci.Food Agric.*,51, pg: 507-516.

MASAMI KAWASE et al.; Coumarin Derivatives with Tumor-specific Cytotoxicity and Multidrug Resistance Reversal Activity; *In vivo* 19: 705-712 (2005)

Matsuda et al. (2000). Medicinal Foodstuffs. XX. Vasorelaxant Active Constituents from the Roots of *Angelica furcijuga* KITAGAWA : Structures of Hyuganins A, B, C, and D. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 48, pg: 1429-1435.

Modok, S.; Heyward, C.; Callaghan, R. P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment. *J. Lipid Res.* 45:1910-1918; 2004.

Neyfakh AA, Serpinskaya AS, Chervonsky AV, Apasov SG, Kaxarov AR. Multidrug-resistance phenotype of a subpopulation of Tlymphocytes without drug selection. *Exp Cell Res* 1989, 185, 496-505

Neyfakh AA. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res* 1988,174, 161176.

Noonan, K. E., Beck, C., Holzmayer, T. A., Chin, J. E., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., Gazdar, A. F., Willman, C. L., Griffith, B., Von Hoff, D. D. & Roninson, I. B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7160-7164.

Pignatti (1982). La flora di Italia.

Razdan T.K. et al. (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry* , 26, pg: 2063-2069.

Rauwald HW, Brehm O, Odenthal KP. 1994. The involvement of a Ca²⁺ channel blocking mode of action in the pharmacology of *Ammi visnaga* fruits. *Planta Med.* 1994 Apr;60(2):101-5.

Roninson, I. B., ed. (1991) *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells* (Plenum, New York).

Row E et al. (2006). Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Organic and biomolecular chemistry*, 4, pg: 1604-1610.

Swager et al. (1985). Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochemistry*, 24, pg: 805-813.

Seger C. et al. (2006). Reaction product analysis by high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance. Application to the absolute configuration determination of naturally occurring polyne alcohols. *Journal of Chromatography A*, 1136, pg: 82-88.

Tapiero H; Munck J-N, Fourcade A, Lampidis TJ. Cross-resistance to rhodamine 123 in adriamycin- and daunorubicin-resistant friend leukemia cell variants. *Cancer Res* 1984,44,5544-5549.

Tan, B.; Piwnica-Worms, D.;Ratner, L. *Curr. Opin. Oncol* 2000, 12, 450-458

Troost, J.; Albermann, N.; Emil Haefeli, W.; Weiss, J. Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:705-711; 2004.

Waight et al. (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26, pg: 2063-2069.

Zhoung P. et al. (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*, 53, pg: 689-687.

Zhu WH, Loh TT. Roles of calcium in the regulation of apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Life Sci.* 1995;57(23):2091-9.

6 MATERIALI E METODI

6.1 Metodi di isolamento e tecniche usate nell'isolamento dei composti.

6.1.1 Percolazione

La prima fase, nell'isolamento di un prodotto naturale a basso peso molecolare, è una buona separazione. Nel presente lavoro, la materia vegetale, sottoforma di polvere secca, viene estratta in continuo, alla temperatura ambiente, tramite la percolazione con un sistema di solventi a polarità crescente (generalmente: n-esano, diclorometano, acetato di etile, metanolo, acqua). La percolazione è un procedimento estrattivo che secondo il suo significato letterale è l'attraversamento del materiale solido da parte di un liquido goccia a goccia. È una delle tecniche estrattive più utilizzate, sia nei laboratori che in scala industriale e viene riportata in diverse farmacopee. La droga, opportunamente triturrata, imbibita e rigonfiata, viene posta in un contenitore cilindrico o conico (fig. 6.1) munito in basso di un rubinetto. Sopra il rubinetto si trova un setto poroso o una reticella su cui viene messo del cotone idrofilo con la funzione di trattenere il materiale vegetale troppo fine. Si introduce quindi la droga nel percolatore esercitando una leggera pressione in modo da evitare la formazione di canali preferenziali. La droga viene quindi ricoperta con carta da filtro e appesantita da palline di vetro per impedirne la risalita e la conseguente fuoriuscita di materiale vegetale. Il percolatore viene caricata per $\frac{3}{4}$ del suo volume. Il solvente viene immesso dall'alto con il rubinetto aperto in modo da eliminare l'aria presente nella droga; appena il liquido comincia a gocciolare si chiude il rubinetto e si effettua una macerazione preliminare che può durare anche 24 ore. La velocità di gocciolamento viene stabilita in base alla droga da estrarre. Il solvente viene spinto dall'alto verso il basso attraverso la forza combinata della gravità e di quella della colonna di liquido soprastante, ridotta della forza di capillarità con cui la polvere tende a trattenerlo. Il solvente sposta il prodotto di macerazione, lava le cellule aperte della droga e consente la diffusione delle sostanze solubili, dalle cellule intere verso l'esterno, assicurando sempre una differenza di concentrazione. Il processo termina quando la soluzione che esce dal percolatore è priva di principi attivi. La percolazione è influenzata da diversi parametri: selettività del solvente, flusso del solvente e temperatura (Morelli I. 2005). Tale tecnica viene eseguita come prima fase di isolamento, in modo da ottenere una prima selezione delle classi di composti in esame in base alla loro affinità con solventi di bassa, media e alta polarità. Su ciascun estratto, così ottenuto, viene effettuata una serie di analisi biologiche in modo tale da focalizzare meglio il percorso di ricerca da seguire. Una volta individuato l'estratto (o gli

estratti) più interessanti per lo screening chimico biologico, inizia la fase vera e propria di separazione dei composti, mediante le varie tecniche cromatografiche.

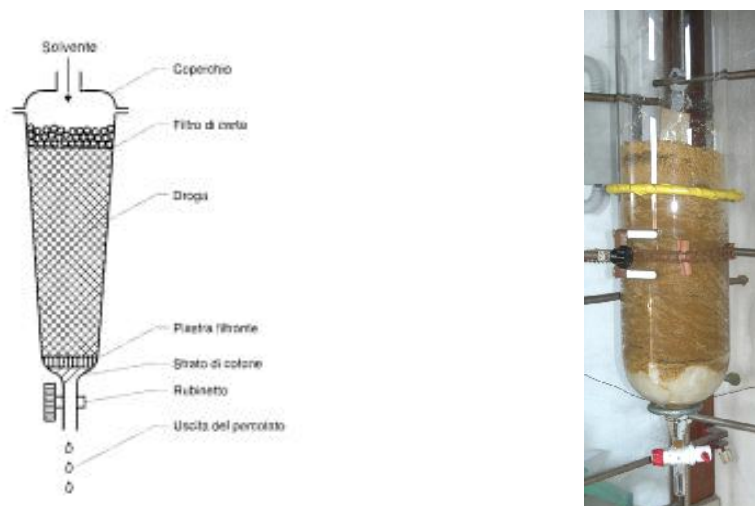


Fig. 6.1 Percolatore.

6.1.2 Cromatografia

I metodi cromatografici costituiscono un insieme molto vasto di tecniche analitiche. Si tratta di metodi chimico-fisici di separazione di miscele, basati sulla diversa affinità di ogni sostanza con due fasi diverse, una fase fissa ed una fase mobile, con cui la miscela viene messa a contatto. Facendo scorrere la fase mobile sulla fase fissa (o stazionaria) si stabiliscono una serie di equilibri competitivi basati sulla diversa affinità delle sostanze del campione per le due fasi: le sostanze più affini per la fase mobile vengono trascinate maggiormente da quest'ultima e quindi usciranno per prime dal sistema cromatografico, mentre quelle più affini per la fase fissa, usciranno successivamente. Pertanto i componenti del campione entrano tutti insieme nel sistema cromatografico ma escono uno alla volta, per effetto della competizione tra fase fissa e fase mobile. Disponendo di un adatto sistema di rivelazione, si può individuare l'uscita di ogni sostanza (analisi qualitativa) ed anche valutarne la concentrazione nella miscela iniziale (analisi quantitativa): il rivelatore infatti produrrà un segnale in corrispondenza dell'uscita di ogni componente.

Nella nostra ricerca di isolamento di estratti non volatili, sono state utilizzate tecniche cromatografiche quali la VLC, la TLC, la cromatografia in colonna, l'HPLC. La cromatografia su colonna (CC) e la cromatografia liquida sotto vuoto (VLC), sono state condotte usando Kiesel gel 60 (400÷400 mesh). La separazione tramite HPLC semipreparativo è stata

condotta con uno strumento Hewlett Packard 1050, con una colonna Spherisorb S5 ODS 2, 250 x 10 mm, diametro delle particelle 5 μ m (Waters), lunghezza d'onda $\lambda=254$.

6.1.2.1 Cromatografia su strato sottile (TLC)

La cromatografia su strato sottile è un metodo cromatografico facilmente applicabile che da buoni risultati di separazione (Kowalska 1996; Nyredy 1988). La lastrina per TLC è costituita da un sottile foglio di alluminio rivestito uniformemente dalla fase stazionaria (gel di silice e gel di silice RP-modificato). Il campione viene depositato sulla linea di semina e quindi la lastrina viene immersa in una vaschetta contenente l'eluente, che sale per capillarità e separa i componenti della miscela, a causa della diversa affinità per le due fasi, formando una serie di macchie che si vedono immediatamente, se possiedono un colore proprio, oppure vengono rivelate mediante lampada UV o opportuni reattivi chimici. Il movimento dell'analita cessa quando la fase mobile raggiunge la fine della lastrina e termina l'azione del flusso capillare o quando essa viene rimossa dalla camera cromatografica. Il movimento dell'analita viene espresso mediante il suo fattore di ritardo R_F , che è uguale al rapporto tra la distanza percorsa dall'analita dall'origine e quella percorsa dal solvente (Wilson 2000). Dal tipo di macchia e dalla sua disposizione sulla lastrina, si possono trarre informazioni qualitative e quantitative. Il processo di separazione della miscela è detto sviluppo. Le TLC utilizzate nel presente lavoro (usando come fase stazionaria gel di silice e gel di silice RP-modificato) sono servite per ottimizzare l'uso delle fasi mobili per VLC, HPLC, per le colonne aperte, per monitorare la separazione cromatografica, per screening antimicrobici e per le separazioni preparatorie.

6.1.2.2 Cromatografia liquida sotto vuoto (VLC)

La VLC è un metodo veloce per la separazione grezza degli estratti (Figura 6.1). Consiste essenzialmente in una cromatografia preparatoria di strato, fatta funzionare come colonna, il cui flusso è attivato dal vuoto (Coll 1986; Hostettmann 1986). L'apparecchio è costituito da una colonna filtrante, impaccata con il materiale assorbente della TLC. L'impaccamento uniforme della colonna è importante per avere buoni risultati, ciò si realizza applicando un vuoto da sopra la colonna stessa. Dopo aver riposto la fase stazionaria, la colonna viene fatta attraversare dal solvente che verrà utilizzato nell'eluizione. Il campione è disposto sulla parte superiore della colonna, precedentemente impaccata, nella forma dissolta o come polvere. La separazione è realizzata tramite l'eluizione con le miscele solventi adatte, cominciando solitamente con i solventi a bassa polarità ed aumentandone gradualmente la stessa. Il flusso delle miscele solubili è

effettuato dal vuoto. Anche se generalmente si usa il gel di silice come fase stazionaria, nella VLC possono essere usati anche assorbenti in controfase.

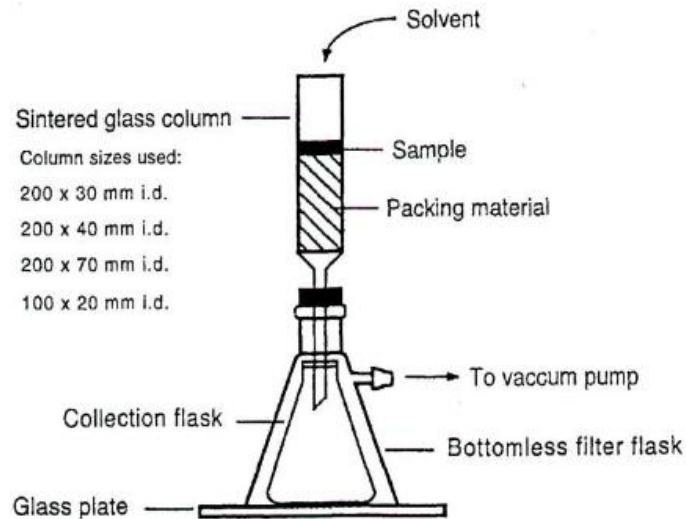


Fig. 6.2 Rappresentazione schematica della VLC (Coll 1986).

6.1.2.3 Cromatografia a colonna aperta classica (CC)

La cromatografia in colonna aperta, è il metodo di cromatografia maggiormente usato nella chimica dei prodotti naturali, perché è facile da effettuare e permette l'isolamento e la purificazione dei composti minori e maggiori. Un tipico sistema cromatografico su colonna include: un serbatoio per la fase mobile, collegato alla cima della colonna; la colonna stessa, contenente la fase stazionaria, dotata di un sistema di rilascio (nel caso più semplice, un rubinetto); un raccoglitore di frazioni (Figura 6.3). La combinazione della fase stazionaria e della fase mobile è molto importante per tale cromatografia. Nella cromatografia su colonna, la miscela da separare, caricata sulla cima della colonna, viene trascinata all'interno della matrice da una aggiunta continua di solvente (fase mobile). Durante il percorso, le varie componenti della miscela sono rallentate in misura variabile e quindi tendono a separarsi. Le varie componenti usciranno a tempi diversi dalla colonna, e saranno raccolte in frazioni diverse di eluato. Le separazioni sono ottenute usando o le miscele solventi in isocratica o tramite l'eluizione graduale con i solventi a polarità crescente. La forma e le dimensioni della colonna, sono determinate dalla quantità di sostanza da esaminare e di riflesso, dalla quantità di materiale adsorbente che deve essere

caricato. Il riempimento della colonna è una delle principali difficoltà sperimentali, poiché una difettosa distribuzione dell'adsorbente, comporta un deterioramento dei fronti delle bande e di conseguenza una difficile separazione delle componenti stesse. L'adsorbente può essere introdotto nella colonna, attraverso due diverse metodiche: a secco o a umido. Il caricamento della polvere secca deve essere fatto a piccole porzioni, per rendere più omogenea la distribuzione del materiale, si può scuotere lateralmente la colonna o spingere l'adsorbente verso il basso, mediante un disco attaccato ad un'asta. Prima dell'impiego, la colonna deve essere bagnata con il solvente che verrà usato per preparare la soluzione da cromatografare. Una buona impregnazione può essere raggiunta facendo preventivamente il vuoto nel tubo, in modo da eliminare le bolle d'aria. Nel riempimento a umido il materiale adsorbente viene da prima sospeso nel solvente e quindi introdotto, come pasta liquida a porzioni, nella colonna. Una regolare sedimentazione, viene facilitata scuotendo la colonna o applicando una leggera depressione, il che consente di eliminare l'eccesso di solvente. È consigliabile lasciare defluire il solvente durante il caricamento, in modo da evitare la formazione di gorgi, con conseguente stratificazione irregolare. Nel presente lavoro si è preferito il riempimento ad umido, perché viene ridotta la possibile formazione di bolle d'aria. Per rendere minima la diffusione, durante lo sviluppo del cromatogramma, è necessario che la banda, che si forma in testa alla colonna, dopo che si è introdotto il campione in esame, sia molto stretta. Si è pensato perciò di proteggere la superficie con della sabbia. Risulta inoltre importante ricordare che, l'estremità superiore della colonna deve essere sempre ricoperta da uno strato di solvente, onde evitare che la colonna vada a secco. Le frazioni cromatografate vengono recuperate in una serie di provette, mediante un collettore di frazioni automatico. La separazione delle molecole dipende dalle interazioni delle molecole stesse con la fase stazionaria, che consentono la ripartizione delle componenti tra le due fasi. Infatti, un concetto fondamentale in tutte le tecniche di cromatografia è quello di coefficiente di partizione. Il coefficiente di partizione, K_d , descrive il modo in cui un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili; ad una determinata temperatura, per una sostanza che si distribuisce tra volumi uguali di due fasi tra loro immiscibili, A e B, il valore di questo coefficiente è una costante e si definisce:

$K_d = \text{concentrazione nella fase A} / \text{concentrazione nella fase B}$.

Nel caso i volumi delle due fasi non siano uguali, si preferisce considerare le quantità totali di sostanza in ciascuna fase (concentrazione x volume) e si parla di coefficiente di partizione effettivo. E' chiaro che per ottenere una separazione il più possibile efficace tra le componenti di una miscela sarà necessario scegliere le fasi stazionaria e mobile in modo tale che le varie molecole della miscela abbiano coefficienti di partizione tra le due fasi il più possibile diversi. Le frazioni recuperate vengono esaminate e separate mediante metodi fisici e chimici.

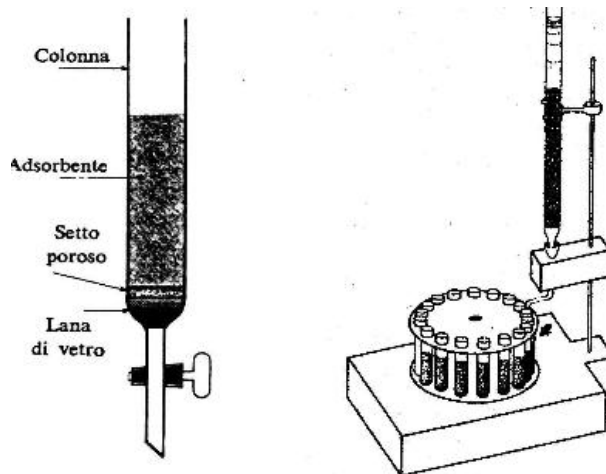


Fig. 6.3. Rappresentazione di una colonna cromatografica (CC) e di un collettore di frazioni (Pavia 1994).

Un tipo particolare di matrice stazionaria da noi utilizzata è il sephadex, un gel a bolle che è prodotto per reticolazione del destrano con l'epicloridrina. In questo caso si parla di cromatografia di esclusione o gel-filtrazione. La cromatografia ad esclusione si fonda su un principio abbastanza semplice: una colonna di particelle di gel è in equilibrio con un solvente adatto alle molecole da separare. Le molecole più grandi, completamente escluse dai pori, rimangono nel volume vuoto (o volume escluso) e passano attraverso gli spazi interstiziali, mentre le molecole più piccole si distribuiscono nel solvente presente sia all'interno sia all'esterno del setaccio molecolare e attraversano quindi la colonna a velocità più bassa. In questo caso la fase mobile è costituita da metanolo che si viene anche utilizzato per idratare il gel ed impaccare la colonna. Nel presente lavoro questo tipo di cromatografia è stato utilizzato prevalentemente per purificare i campioni dalla clorofilla.

6.1.2.4 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

La cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) rappresenta la naturale evoluzione della cromatografia su colonna a bassa pressione; con questa tecnica si possono separare miscele complesse anche in pochi minuti ed è possibile effettuare sia l'analisi qualitativa che quella quantitativa. Dal punto di vista teorico, essa si basa sui principi fisici dell'adsorbimento, della ripartizione e dello scambio ionico; ma, avvalendosi di tecnologie avanzate, consente di ottenere separazioni impossibili nella tradizionale cromatografia in fase liquida. La fase mobile è costituita da un liquido a bassa viscosità mentre la fase stazionaria è costituita da microparticelle solide porose, eventualmente rivestite da una fase liquida; la fase stazionaria è accuratamente

impaccata in colonne con un diametro interno di pochi mm e lunghe da 3 a 50 cm. Poiché le particelle solide hanno un diametro molto piccolo (da 3 a 10 μm), la fase stazionaria presenta un'elevata resistenza al flusso della fase mobile, che può essere superata solo introducendo quest'ultima mediante apposite pompe, in grado di fornire una pressione da 70 a 400 atm, con una portata costante; è proprio questa esigenza che ha limitato per molti anni lo sviluppo di questa tecnica, diventata di impiego comune solo negli ultimi decenni, grazie alla produzione di pompe sempre più efficienti.

La tecnica HPLC presenta diverse varianti, che possono essere classificate secondo vari criteri. Una prima classificazione, è basata sulla polarità delle due fasi:

a) cromatografia normale (NPC - Normal Phase Chromatography): utilizza una fase stazionaria polare ed una fase mobile apolare

b) cromatografia a fase inversa (RPC - Reverse Phase Chromatography): utilizza una fase stazionaria apolare ed una fase mobile. Le applicazioni dell'HPLC sono molto vaste: questa tecnica tende a sostituire la GLC in quanto, operando a temperatura ambiente, non presenta i noti problemi di vaporizzazione del campione; inoltre viene sfruttato il potere solvente di entrambe le fasi (mentre il carrier della GLC è praticamente inerte) e ciò migliora l'efficienza e la selettività della separazione, riducendo i tempi di lavoro. Nell'HPLC l'eluente (o solvente), contenuto in una riserva, viene prelevato da una pompa, miscelato col campione all'interno dell'iniettore e quindi fatto passare nella colonna cromatografica. All'uscita attraversa un rivelatore differenziale che, tramite un microprocessore, confronta una qualche caratteristica dell'eluente puro con il liquido uscente dalla colonna, rivelando i componenti della miscela analitica in ordine di eluizione. All'uscita del sistema cromatografico vi può essere un raccogliatore di frazioni, allo scopo di prelevare i vari componenti (cromatografia preparativa) da sottoporre ad ulteriori analisi con altre tecniche: in questo caso l'HPLC viene usata come tecnica di separazione di miscele. L'HPLC è stato utilizzato nel presente lavoro come una metodica di isolamento, purificazione ed identificazione dei prodotti naturali utilizzando una rivelatore UV ed IR.

6.2 Delucidazione dei composti isolati; strumenti impiegati per l'identificazione dei composti

Una volta che ogni composto è stato isolato e purificato, è necessario determinare la classe del composto ed infine la sua struttura particolare. Ciò viene realizzato tramite la combinazione di differenti informazioni strutturali, ottenute da numerose fonti quali: la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, la spettrometria di massa, la spettroscopia infrarossa, UV e visibile, il calcolo del potere rotatorio specifico, l'idrolisi acida. Nel nostro lavoro, gli spettri UV sono stati registrati mediante uno spettrofotometro GBC Cintra 5; gli

spettri ^1H NMR, ^{13}C NMR e le sequenze DQFCOSY, TOCSY, ROESY, GHSQC, GHMQC sono stati registrati a 25°C su uno strumento Bruker Avance 300 MHz oppure su VARIAN UNITY INOVA 400 MHz. in C_6D_6 , CD_3OD o CDCl_3 , impiegando il chemical shift del residuo del solvente come riferimento; gli spettri di massa sono stati registrati con un Agilent Technologies 6250 Accurate Mass Q-ToF LC/MS con il software Agilent MassHunter Workstation.

6.2.1 La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame; essa si è rivelata la tecnica analitica più importante per la caratterizzazione della struttura di un composto organico (Stradi 1981; Sanders 1988; Byrne 1993; Kalinowsky 1984; Jackman 1969). Questa tecnica strumentale consente di individuare il numero, il tipo e le posizioni relative di certi atomi di una molecola. Con la tecnica NMR sono osservabili solo i nuclei che possiedono un momento magnetico nucleare di spin, e che quindi si comportano come l'ago di una bussola che si può orientare in un campo magnetico applicato. Il momento magnetico nucleare di spin μ è dato dalla relazione:

$$\mu = \gamma I \frac{h}{2\pi}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, I è il numero quantico di spin nucleare, h è la costante di Planck. Lo spin nucleare viene prodotto dalle particelle che costituiscono il nucleo, protoni e neutroni. Diversi atomi presentano questa caratteristica (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P), ma gli atomi di idrogeno (^1H) e di carbonio (^{13}C) sono quelli più interessanti per il chimico organico. Con il termine di risonanza magnetica nucleare, si intende il fenomeno per cui, il nucleo di alcune sostanze, qualora venga inserito in un campo magnetico, è in grado di occupare diversi livelli energetici e quindi di assorbire energia nel passare dai livelli inferiori ai livelli superiori. L'insieme delle bande di assorbimento costituisce lo spettro NMR. L'insieme delle informazioni ottenute con gli spettri dell'idrogeno e del carbonio, non solo permette di definire la struttura del composto in esame, ma rivela anche particolari strutturali più sottili quali, ad esempio, aspetti configurazionali, conformazionali, etc.

6.2.1.1 La spettroscopia NMR unidimensionale (1D)

Dato che il dipolo magnetico μ di un certo nucleo è una costante, si potrebbe pensare che tutti i nuclei di un certo tipo (ad es. ^1H) debbano risuonare esattamente alla stessa

frequenza in un determinato campo magnetico applicato B_0 . Se le cose stessero così, la spettroscopia NMR sarebbe del tutto inutile perchè nello spettro avremmo un unico segnale per tutti gli idrogeni della molecola. Per fortuna, nelle molecole reali, questo fatto accade molto raramente poichè il segnale NMR di ogni nucleo risulta spostato nello spettro a frequenze più alte o più basse a seconda del suo intorno chimico. Per misurare quantitativamente la posizione dell'assorbimento di un protone si definisce un parametro che prende il nome di spostamento chimico (chemical shift) (δ). Un'unità δ corrisponde a una variazione dell'intensità del campo magnetico di un ppm (parte per milione). Per determinare il valore dello spostamento chimico dei vari protoni o carboni di una molecola, l'operatore registra uno spettro RMN aggiungendo al campione una piccola quantità di uno standard di riferimento (generalmente tetrametilsilano $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$), a cui si fa corrispondere il valore di assorbimento pari a $\delta=0$. Per $^1\text{H-NMR}$, la scala δ generalmente si estende da 0 a 14 ppm; mentre per $^{13}\text{C-NMR}$ è molto più grande e copre l'intervallo 0-220 ppm. In generale, idrogeni o carboni legati ad atomi più elettronegativi risultano schermati quindi sentono un campo magnetico applicato più intenso e subiscono la transizione a frequenze maggiori e, nello spettro, si trovano più a sinistra, ad uno spostamento chimico più alto. I gruppi funzionali possono essere identificati dai valori caratteristici dello spostamento chimico del ^{13}C e del ^1H . Nella scala δ del $^1\text{H-NMR}$, i semplici protoni idrocarburici tendono ad assorbire nella regione $\delta= 0,5-1,5$, i protoni sul carbonio adiacente al carbonile sono spostati a $\delta= 2-3$, gli atomi elettronegativi (ossigeno o alogeni) spostano i protoni a $\delta= 3-4$, i protoni vinilici sono spostati a $\delta= 5-6$, i protoni aromatici a $\delta= 7-8$, i protoni aldeidici a $\delta= 9-10$, ed i protoni degli acidi carbossilici sono i più spostati e cadono nell'intervallo 10-12 ppm. La scala degli spostamenti chimici nella spettroscopia $^{13}\text{C-NMR}$ utilizza come zero l'assorbimento del carbonio del tetrametilsilano TMS. I fattori che influenzano gli spostamenti chimici del ^{13}C sono l'ibridazione e l'elettronegatività degli atomi legati al carbonio. I semplici carboni dei metili CH_3 assorbono nella regione $\delta= 15-30$, i semplici carboni dei metileni CH_2 sono spostati a $\delta= 20-50$, gli atomi elettronegativi (ossigeno o alogeni) spostano i carboni legati a $\delta= 40-80$, i carboni degli alchini sono spostati a $\delta= 70-90$, i carboni degli alcheni si trovano a $\delta= 100-150$, i carboni aromatici a $\delta= 120-170$, infine i carboni più fortemente spostati sono quelli dei carbonili, con valori di $\delta= 180-220$ ppm. Il numero di segnali fornisce le informazioni sul numero di nuclei della molecola in esame. Un'ulteriore caratteristica del $^1\text{H-NMR}$ è il fatto che l'intensità del segnale è proporzionale al numero di idrogeni che generano il segnale; ovvero, l'area sotto un certo picco (l'integrale) è direttamente proporzionale al numero di quel tipo di idrogeni nella molecola. Nella spettrometria $^{13}\text{C-NMR}$, invece, l'area dei picchi non è correlata al numero di carboni che producono quel segnale a causa del modo stesso con cui viene raccolto il segnale, quindi nell'interpretazione dello spettro non si tiene conto di questo dato. Nel caso del protone la molteplicità di un segnale è dovuta all'effetto generato dai

nuclei vicini; ovviamente l'accoppiamento di spin può avvenire solo tra idrogeni non equivalenti, che hanno quindi un diverso spostamento chimico, mentre gli idrogeni equivalenti non si accoppiano tra loro. La distanza tra i picchi che compongono un multipletto semplice prende il nome di costante di accoppiamento J . Questa costante si misura sulla stessa scala dello spostamento chimico, non dipende dal campo applicato e viene espressa in Hertz (Hz). L'esperimento DEPT (Distortionless Enhancement by polarization Transfer) rappresenta il metodo maggiormente utilizzato per determinare il numero di protoni direttamente legati ad un carbonio. In particolare il DEPT-135 (che usa un angolo finale di impulso di 135°), mostra il segnale del carbonio con risonanza di CH e di CH_3 che è positiva, mentre i segnali CH_2 sono negativi. Il DEPT-90 (che usa un angolo finale di impulso di 90°), mostra la risonanza positiva dei CH mentre i segnali dei CH_3 e dei CH_2 non sono visibili.

6.2.1.2 La spettroscopia NMR bidimensionale (2D)

Gli esperimenti NMR bidimensionali (2D) danno molte informazioni sull'interazione dei nuclei. Tali esperimenti possono essere suddivisi in due gruppi principali: metodi mono-nucleari e metodi etero-nucleari. I primi correlano nuclei dello stesso atomo (^1H) (come nella COSY e nella ROESY), i secondi correlano l'accoppiamento tra ^1H e l'atomo di ^{13}C (come nella HSQC e HMBC).

Metodi mono-nucleari 2D NMR:

- DQF-COSY (Double Quantum Correlation Spectroscopy) mostra i protoni vicinali e geminali correlati via l'accoppiamento scalare.
- TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) un esperimento con il relè multiplo del protone, mostra le correlazioni di tutti i protoni all'interno dello stesso sistema di rotazione via accoppiamento scalare.
- ROESY (Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) contribuisce ad identificare gli accoppiamenti dei protoni abbastanza vicini che interagiscono attraverso lo spazio.

Heteronuclear 2D RMN metodi:

- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) correla un protone con i carboni separati da due o tre legami attraverso la loro costante di accoppiamento (2J, 3J).
- HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) mostra le correlazioni tra un protone il carbonio a cui è direttamente legato.

6.2.2 La spettroscopia Infrarossa (IR)

La spettroscopia vibrazionale o anche spettroscopia infrarossa (IR) dà informazioni dirette sui gruppi funzionali presenti in una molecola tramite il loro caratteristico spettro di assorbimento. La radiazione IR è la radiazione che cade tra il visibile e la regione delle microonde. Di grande interesse pratico è la zona tra 4.000 e 400 cm^{-1} . La radiazione IR tra 10.000 e 100 cm^{-1} è assorbita e convertita dalla molecola organica in energia di moto vibrazionale. Questo assorbimento è quantizzato, ma gli spettri vibrazionali appaiono come bande piuttosto che come linee e ciò è dovuto al fatto che il cambiamento nell'energia vibrazionale è accompagnato da variazioni nello stato rotazionale. Le bande sono quindi in realtà bande rotovibrazionali. L'assorbimento di una radiazione infrarossa, provoca l'eccitazione delle molecole ad uno stato energetico più elevato, anche questo processo è quantizzato, solo determinate frequenze possono venir assorbite da una molecola (Stradi et al. 1981). L'assorbimento di una radiazione infrarossa corrisponde a un salto di energia di $2-10\text{ Kcal/mol}$, corrispondente alle frequenze vibrazionali di stretching (stiramento) e di bending (piegamento) dei legami covalenti della maggior parte delle molecole. Dato che ogni legame diverso, ha una differente frequenza di assorbimento, e dato che lo stesso tipo di legame in due composti diversi si trova in un ambiente leggermente differente, in pratica, non esistono due molecole di struttura diversa che mostrino il medesimo andamento di assorbimento infrarosso. Confrontando gli spettri infrarossi di due sostanze supposte identiche, si può stabilire o meno la loro effettiva identità, solo se i loro spettri infrarossi coincidono, picco per picco (banda su banda), si può dire con una certa sicurezza che i composti sono identici. Un altro più importante compito dello spettro infrarosso, è quello di fornire informazioni sulla struttura della molecola. Le bande di assorbimento associate a ciascun tipo di legame (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O, C-O, C-C, C=C, etc) si trovano regolarmente in ben determinate zone dello spettro vibrazionale infrarosso (figura 6.4). Per ogni tipo di legame si possono delimitare piccoli intervalli di assorbimento, al di fuori dei quali l'assorbimento è attribuibile ad un altro tipo di legame (Ugo et al. 1972).

CHARACTERISTIC INFRARED ABSORPTION FREQUENCIES		
Bond	Compound type	Frequency range cm ⁻¹
C—H	Alkanes	2850–2960
		1350–1470
C—H	Alkenes	3020–3080
		675–1000
C—H	Aromatic rings	3000–3100
		675–870
C—H	Alkynes	3300
C=C	Alkenes	1640–1680
C≡C	Alkynes	2100–2260
C=C	Aromatic rings	1500, 1600
C—O	Alcohols, ethers, carboxylic acids, esters	1080–1300
C=O	Aldehydes, ketones, carboxylic acids, esters	1690–1760
O—H	Monomeric alcohols, phenols	3610–3640
	Hydrogen-bonded alcohols, phenols	3200–3600
	Carboxylic acids	2500–3000
N—H	Amines	3300–3500
C—N	Amines	1180–1360
C≡N	Nitriles	2210–2260
—NO ₂	Nitro compounds	1515–1560
		1345–1385

Fig 6.4 Frequenze di assorbimento caratteristiche.

6.2.3 La spettroscopia UV

Il principio della spettroscopia UV e Visibile è la misurazione della interazione tra le molecole ed una radiazione elettromagnetica nel range di 200-380 nm per l'ultravioletto e 380-800 per il visibile (Jaffè et al. 1962, Ugo et al. 1972). L'assorbimento molecolare dipende dalla struttura elettronica della molecola, i tipi di elettroni principalmente interessati nelle transizioni, sono gli elettroni π . Quando una radiazione elettromagnetica interagisce con la materia possono verificarsi diversi fenomeni, tutti riconducibili al succedersi, più o meno rapido, di due fondamentali eventi: un trasferimento di energia dalla radiazione alla materia (assorbimento) cui segue la completa restituzione di energia sotto diverse forme (emissione). La radiazione incidente di intensità I_0 viene in parte assorbita dal campione. La radiazione uscente I_1 ha intensità minore. Nelle analisi quantitative si lavora, in linea di principio, con una radiazione monocromatica, di cui si

misura l'intensità in uscita dal campione, confrontandola con quella in entrata. Il risultato ottenuto può essere correlato alla quantità di sostanza che ha dato luogo all'assorbimento. La trasmittanza esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita, e può assumere valori compresi tra 0 e 1, e tale rapporto è tanto più piccolo quanto maggiore è stato l'assorbimento.

In genere la trasmittanza viene espressa come Trasmittanza percentuale, $\%T = 100 T$

La radiazione assorbita detta assorbanza (A) è rapportata alla radiazione trasmessa dalla seguente relazione

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{\%T}$$

E' evidente che le due grandezze sono utili in contesti diversi: se stiamo trattando il caso in cui gran parte della luce è assorbita, converrà parlare di assorbanza, se viceversa gran parte della luce è trasmessa, parliamo di trasmittanza. La legge di Lambert-Beer esprime l'assorbanza A di una soluzione in funzione del coefficiente d'estinzione molare ϵ (L/mole.cm), della lunghezza del cammino ottico b (in cm), e della concentrazione c della soluzione (in mole/L)

$$A = \epsilon b c$$

La Legge di Beer è di fondamentale importanza per l'analisi quantitativa, poiché evidenzia una dipendenza lineare dell'assorbanza dalla concentrazione dell'analita. Conoscendo l'assorbanza di alcuni standard, si può risalire alla concentrazione del campione in esame. Tale metodica, da quindi informazioni sulla presenza di sistemi coniugati insaturi. La spettroscopia UV viene inoltre utilizzata per analisi qualitative (UV come detector in HPLC) e quantitative (saggi colorimetrici). Dal punto di vista concettuale uno spettrofotometro segue il seguente schema di principio:

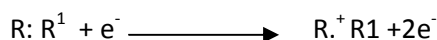
- 1) sorgente di radiazione
- 2) selezionatore di lunghezze d'onda o monocromatore
- 3) cella
- 4) rivelatore
- 5) lettore.

6.2.4 La spettrometria di massa (MS)

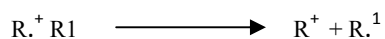
La spettrometria di massa (Gioia et al. 1987; Baldwin et al. 1995) è fondamentalmente diversa dalle tecniche illustrate precedentemente. Queste, infatti, trattano dell'interazione della radiazione elettromagnetica con le molecole, cioè sono misure fisiche, le molecole dei composti investigati vengono eccitate, dalla radiazione elettromagnetica, a seconda dei

gruppi funzionali presenti nelle molecole, sono assorbite soltanto le radiazioni di energia ben definita; la misura avviene su queste energie; dopo, il composto può essere recuperato immutato. In spettrometria di massa le molecole sono sempre eccitate, ma per mezzo di elettroni. Se un elettrone passa attraverso una molecola, la sua energia viene trasferita, la molecola viene ionizzata e spesso anche eccitata in modo da rompersi in frammenti. Quindi il composto originale può non essere recuperato intatto (tecnica distruttiva). Nella sua forma più semplice lo spettrometro di massa attua tre funzioni essenziali:

1. La sostanza, ridotta allo stato gassoso, viene bombardata da un flusso di elettroni ad elevata energia ottenendo degli ioni positivi (EI-MS). Avviene generalmente la rimozione di un singolo elettrone con la formazione di uno ione di tipo radicalico, chiamato ione molecolare.



Questi ioni sono instabili e, a volte, si degradano in un tempo molto breve per dare, nel caso più semplice, un frammento carico positivamente ed un radicale.



2. Gli ioni vengono accelerati da un campo elettrico e successivamente deviati da un campo elettrico o magnetico ortogonale al loro moto. La deviazione maggiore o minore dipende dalla loro massa, o meglio dal rapporto massa/carica (m/e). A parità di carica la deviazione aumenta con il diminuire della massa, mentre a parità di massa gli ioni aventi carica maggiore vengono più deviati.
3. Un particolare detector registra l'intensità di questi frammenti positivi in funzione del rapporto m/e , fornendoci così degli spettri che vengono successivamente interpretati. Tale tecnica, quindi, ci dà delle informazioni importanti, non solo relative alla massa del composto e conseguentemente alla sua formula bruta ma, permette anche di identificare la struttura, in base allo studio dei frammenti formati.

La ionizzazione ad Electrospray (ESI) rappresenta un metodo alternativo di ionizzazione per le molecole ad alto peso molecolare non volatili. Il campione è iniettato in un flusso del liquido corrente, frequentemente metanolo-acqua o acetonitrile-acqua (acidificato con acido acetico). L'applicazione di un alto campo elettrico interrompe la superficie liquida e produce delle goccioline altamente caricate (positivamente o negativamente). Il solvente è volatilizzato e gli ioni vengono generati.

6.2.5 HPLC-MS Q-TOF Analysis

Gli estratti della pianta sono stati analizzati mediante HPLC in fase inversa su un sistema di Agilent serie 1200 HPLC dotato di tecnologia microchip utilizzando un Agilent Zorbax 300 SB-C18 5 micron, 43 mm x 75 micrometri (Agilent, Santa Clara, CA). Le condizioni dell'HPLC sono state le seguenti: portata: 0,4 μL / min; solvente A: acido formico 0.1% in acqua; solvente B: acetonitrile e sfumatura: solvente B 5100% in 10 min. I campioni (1 μL) sono stati poi analizzati da ESI in modalità positiva con un 6.520 Agilent Time of Flight (TOF) MS. I dati spettrali di massa sono stati acquisiti nella gamma, m / z 100-1,000 con un tasso di acquisizione di 1,35 spettri / s, in media di 10.000 transienti. I parametri sono stati adeguati come segue: essiccazione temperatura dei gas di 250 ° C, l'essiccazione del flusso del gas di 5 L / min, pressione nebulizzatore 45 psi, e voltage fragmentor 150 V. L'acquisizione ed l'elaborazione dati sono stati effettuati mediante software di Acquisizione Agilent Mass Hunter Workstation v. B. 02.00.

6.3 Metodi e strumenti per la determinazione dell'attività biologica

6.3.1 Analisi del calcio intracellulare

I transienti intracellulari di calcio sono stati misurati utilizzando il lettore di piastre di imaging fluorimetrico (FLIPR[®], Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) come descritto in precedenza (Schühly et al., 2011). Le cellule sono state messe su piastra ad una densità di 30.000 cellule / pozzetto in piastre a 96 pozzetti col fondo dei pozzetti trasparenti e le pareti scure (*clear bottom black walled plates*) (Corning Costar, New York, NY, USA) e lasciate incubare 24 ore a 37 ° C in 5% di CO₂. Successivamente viene aspirato il media e le cellule sono incubate per 0,75 h con calcio Dye NoWash (100 microl / pozzetto, calcio 5 kit di analisi, le Molecular Devices) sciolto in tampone PBS di Dulbecco contenente 2 mM Ca₂Cl. Dopo aver raggiunto l'equilibrio con il colorante, le cellule sono state collocate nel FLIPR[®] (preiscaldato a 37 ° C), dove sono stati aggiunti 50 μl di 3 x concentrazione stock dei composti di prova preparati nello stesso tampone utilizzato per il colorante di caricamento. La modulazione del rilascio del calcio da parte dei composti di prova è stato testato aggiungendo 5 μl di 20 x soluzione madre dei composti da testare o di thapsigargin o il veicolo di controllo appropriato in una prima aggiunta con successiva incubazione per 5 min. I dati di fluorescenza ottenuti sono stati corretti per sottrazione dei valori di fluorescenza ottenuti nei pozzetti con solo tampone aggiunto.

6.3.2. Saggio di efflusso delle Pgp transfettate nelle cellule MDCK tramite Rhodamine123

L'attività delle Pgp è stata determinata mediante rhodamine123 (Rh123)-efflusso, tramite un substrato di Pgp fluorescente, utilizzando le Pgp umane MDR-1 transfettate nelle cellule MDCK (gentilmente ottenute dal Dr. Stefanie Krämer, ETH Zurigo, Svizzera). Le cellule (1×10^6 cellule / tube) sono state incubate con rhodamine123 (Sigma, St. Louis, USA) ad una concentrazione finale pari a 500 pM per 20 min a 37 ° C. Dopo centrifugazione, le cellule sono state lavate e incubate con Rh123-libero medium, in assenza o in presenza dei composti di prova alle concentrazioni finali di 5 uM, o nelle concentrazioni indicate, per 1,5 h, a 37 ° C. La fluorescenza è stata misurata usando un FACScan (Beckton Dickinson, USA) e il software CellQuest. Il verapamil e la vinblastina (entrambi da Fluka, Svizzera) sono stati utilizzati come controlli positivi. Per convalidare il saggio, sono state utilizzate cellule MDCK non transfettate con Pgp, ciò ha dimostrato un efflusso significativamente minore di Rh123 oltre 1,5 h.

6.3.2.1 Linea cellulare MDR1-MDCK

Le cellule MDCK (Madin Darby canine kidney) sono una linea cellulare epiteliale di origine renale canina. In condizioni standard di coltura, le cellule MDCK sviluppano giunzioni strette e formano monostrati di cellule polarizzate. La confluenza viene raggiunta dopo 3-5 giorni. Questo tipo di cellule hanno una bassa espressione delle proteine di trasporto e un'attività metabolica bassa, per questo si prestano per essere transfettate con geni che codificano per proteine di trasporto per investigare, per esempio, sull'efflusso di farmaci. Le cellule MDCK transfettate con il gene umano MDR1 che codifica per la proteina di efflusso P-glicoproteina (P-gp) sono tra le più utilizzate. Infatti l'aumento dell'espressione delle P-gp è responsabile della resistenza da parte delle cellule tumorali ad alcune droghe per esempio agli alcaloidi della vinca e alla doxorubicina (Gottesman e Pastan 1988), per questo la linea cellulare MDR1-MDCK è utilizzata per studiare farmaci che possano bloccare le P-gp. Le P-gp sono altamente espresse e omogeneamente distribuite sullo strato cellulare già pochi giorni dopo la semina; al contrario di quello che avviene nella linea cellulare Caco-2 che esprimono le P-gp dopo 2-3 settimane, ma in quantità inferiori e limitate alla patch di strato di cellule (Braun 2000; Hammerle 2000; Tang 2002). Le P-gp sono localizzate principalmente nel plasma apicale della membrana, che si arricchisce di colesterolo, glicosfingolipidi (GSLs) e sfingomieline (SM) (Kamau 2005). Siccome le cellule MDCK esprimono comunque la P-glicoproteina canina bisogna sempre effettuare il saggio

anche con le cellule MDCK non transfettate in modo da calcolare il flusso netto cioè quello dipeso dalla P-glicoproteina umana.

6.3.3 Analisi dell'attività antimicrobica

I campioni sono stati testati su *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. I test sono stati effettuati utilizzando piastre a 96 pozzetti (Sigma Aldrich), come controllo positivo si è utilizzato rispettivamente il cloramfenicolo (Sigma Aldrich) e il miconazolo (Sigma Aldrich). 4,1 mg di campione o controllo sono solubilizzati in 1 mL di dimetilsolfossido; in questo modo si ha una concentrazione iniziale di 512 µg/mL, questo perché il primo pozzetto è riempito con 25 µL di composto, 75 µL di brodo sterile e 100 µL di inoculo. 100 µL della soluzione dei pozzetti della prima colonna vengono trasferiti nei pozzetti della seconda colonna e poi vengono aggiunti 100 µL di inoculo in questo modo nella seconda colonna si ha una concentrazione di 256 µg/mL, si procede in questo modo fino ad arrivare alla decima colonna con una concentrazione di 1 µg/mL. La piastra viene messa in stufa per 24 ore a 37° C. Dopo incubazione gli effetti dei composti in esame vengono determinati mediante reazione colorimetrica con MTT (*bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*) (Sigma Aldrich). Questo saggio sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali di scindere l'anello tetrazolico della molecola di MTT (sale di tetrazolio) di colore giallo per dare un sale di formazano di colore violetto. La quantità di formazano è proporzionale al numero di cellule vive. In ogni pozzetto si aggiungono 20 µL di MTT ad una concentrazione di 1mg/ mL in acqua distillata sterile; la piastra viene poi messa in stufa per 30 minuti a 37°C. Dopo incubazione i valori di assorbimento sono rilevati con il lettore automatico di piastre.

BIBLIOGRAFIA

- Baldwin MA. (1995). Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. *Natural Product Reports*, 11; pp. 33-34.
- Braun A. et al (2000). Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur. J. Pharm. Sci. II(Suppl. 2)*. pp. 51-60.
- Byrne L., (1993). Nuclear magnetic resonance spectroscopy, strategies for structural determination, In: Colegate SM, Molyneux RJ (eds) *Bioactive Natural Products*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo; pp. 75-104.
- Coll JC., Bowden BF., (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49, pp. 934-936.
- Gioia B., Stradi R., Rossi E.;(1987). Guida al corso di Metodi fisici in chimica organica, Vol. II Massa.
- Gottesman M.M and Pastan I. (1988). Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Trends in pharmacological science*, 9, pp. 54-58.
- Hammerle S. P et al 2000. P-Glycoprotein in cell cultures: a combined approach to study expression, localisation, and functionality in the confocal microscope. *Eur. J. Pharm. Sci*, 12, pp. 69-77.
- Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M., (1986). Preparative chromatography techniques: Applications in natural product isolation; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York vol. 1.
- Jackman LM., Sternhell S., (1969). Applications of NMR in Organic Chemistry 2a ediz., Pergamon Press.
- Kamau S. et al (2005). Effect of the modulation of the membrane lipid composition on the localization and function of p-glycoprotein in mdr1-mdck cells, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 41, pp. 207-216.
- Kalinowsky HO., Berger S., Braun S., (1984). ¹³C-NMR Spektroskopie. Thieme, Stuttgart, New York; pp. 224-237.
- Kowalska T., (1996). Theory and mechanism of thin-layer chromatography Marcel Dekker, Inc., New York; pp. 49-99.

Morelli I. et al. (2005). Manuale dell'erborista. Casa editrice: Teniche nuove.

Nyredy S. et al. (1988). The Prisma optimization system in planar chromatography, *Journal of Planar Chromatography* , 1, pp. 336-342.

Pavia DL., Lampman GM., Kriz GS., (1994). Il laboratorio di Chimica Organica, ediz. Sorbona, Milano; pp. 593-640.

Sanders JKM., Hunter BK., (1988). Modern NMR spectroscopy: A guide for Chemists, 2a ed., Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto.

Stradi R., Ballabio M., Rossi E.,(1981). Guida al corso di Metodi fisici in chimica organica, Vol. III: NMR.

Stradi R., Ballabio M., Rossi E., (1981). Guida al corso di Metodi fisici in chimica organica, Vol. I : IR .

Tang, E et al (2002). Are MDCK cells transtected with the human MDR1 gene a good model of the human intestinal mucosa? *Pharm. Res.* 19, pp. 765-772.

Wilson K, Walker J. (2000). Principles and techniques of practical biochemistry. *Fifth edition. Cambridge University press, Cambridge.*

PUBBLICAZIONE I

A Chromone from *Seseli praecox* (Apiaceae)

Marco Leonti^{a*}, Laura Casu^a, Maria Novella Solinas^a, Filippo Cottiglia^a, Pierluigi Caboni^b, Costantino Floris^c, Juerg Gertsch^d and Anna Rita Saba^a.

a Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università di Cagliari, Facoltà di Farmacia, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari (CA), Italy

b Dipartimento di Tossicologia, Università di Cagliari, Facoltà di Farmacia, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari (CA), Italy

c Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Cagliari, Complesso di Monserrato, 09042 Monserrato (CA), Italy

d Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, Bülhstrasse 28, CH-3012 Bern, Switzerland

marcoleonti@netscape.net; mleonti@unica.it

Received: January 9th, 2010; Accepted: March 4th, 2010

Abstract

Chemical investigation of the stems of *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans, an endemic Apiaceae from Sardinia, afforded an isopropenylated chromone (5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone), along with four known linear furocoumarins and their natural precursor. For biological characterization the new compound was screened against four cancer cell lines in vitro and showed differential μM antiproliferative effects between suspension and adherent cells.

Keywords:

Seseli praecox, chromone, furocoumarin, NMR, cytotoxicity.

Introduction

The Apiaceae is one of the most widely utilized plant families in the Old World. Included are vegetable crops, wild gathered vegetables, and medicinal species (Leonti et al. 2009. Leonti et al. 2006). Species of the genus *Seseli* do not actually play an important role as medicinal plants in Europe but have been included and identified in translations of Dioscorides' *De Materia Medica*. The stems and seeds were indicated for the treatment of dysuria, shortness of breath and chronic cough (Berendes et al. 1902). Matthioli 1967). The genus *Seseli* is a prolific producer of simple coumarins, as well as angular and linear pyrano and furocoumarins (Austin et al. 1968. Bellino et al. 1986. Kumar et al. 1978. Lemmich et al. 1966. Tosun et al. 2007). Here we report on the isolation and structure elucidation of 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methyl-chromone (1), a new chromone, which was achieved by means of spectroscopic and spectrometric analysis including 1D and 2D NMR, as well as HPLC-MS Q-TOF analysis. For biological characterization compound 1 was screened against four cancer cell lines in vitro.

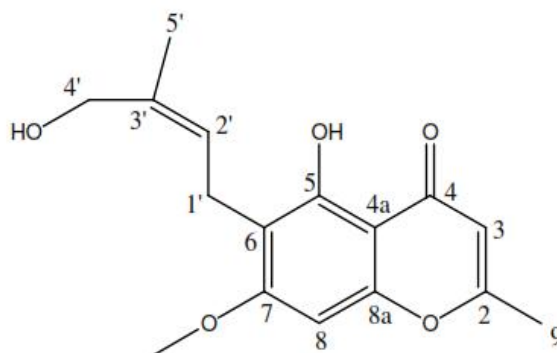


Fig. 1: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone

Additionally, four known linear furocoumarins (psoralen, phellopterin, imperatorin, bergapten), along with their natural precursor marmesin (2), were also obtained from *S. praecox*. The analytical and spectroscopic data of the known compounds were consistent with those reported in the literature (Bergendorff et al. 1997. Elgamal et al. 1979. Kuster et al. 1994. Ishii et al. 1981).

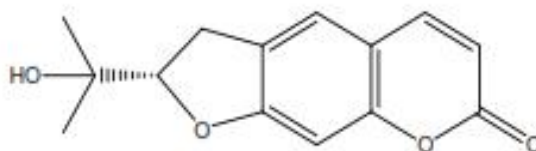


Fig. 2: Marmesin

The only chromone so far isolated from a member of the genus *Seseli* is a sulfurcontaining derivative obtained from *S. sessilifolium* Schrenk (Savina et al. 1970). Chromones with a similar structure to 1 have been isolated from other members of the Apiaceae, like *Daucus carota* L. (Czepa et al. 2003), *Angelica archangelica* L., and *Archangelica litoralis* Fries. (Cisowski et al. 1988. Harkar et al. 1984). From *Ammi visnaga* (L.) Lam furochromones are reported (Kuster et al. 1994). Intriguingly, peucenin-7-methylether, a compound structurally related to 1, has been isolated from the Rutaceae (Razdan et al. 1987). Another compound class, which characterizes the spectrum of secondary metabolites of the Apiaceae, are polyacetylenes (Hu et al. 1990. Zidorn et al. 2005). The polyacetylenic compounds of *S. praecox* and their molecular binding interaction with human cannabinoid receptors in vitro and pro inflammatory effects in vivo were the subject of a previous study (Leonti et al. 2010).

The ^1H NMR spectrum of 1 (Figure 1) showed the presence of a hydroxy group (δ 13.06), a methoxy group (δ 3.91), two tertiary methyls (δ 2.35, 1.75), one oxymethylene function (δ 4.27), one methylene function (δ 3.42), and three methane protons (δ 5.34, 6.05, 6.39).

The ^{13}C NMR spectrum contained sixteen signals that included three methyl (δ 20.5, 22.0, 56.0), two methylene (δ 21, 61.7), three methine (δ 89.8, 108.9, 125.1), and eight quaternary carbons (δ 105.3, 111.7, 135.2, 156.6, 158.2, 162.8, 166.6, 182.5).

Altogether this corresponded to a molecular formula of $\text{C}_{16}\text{O}_5\text{H}_{18}$, congruent with a $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion at m/z 291.1204 in the Q-TOF HRMS analysis. The presence of a carbonyl at δ 182.5 and the resonance signals of CH₃-9 (δC 20.5 and δH 2.35) showing COSY correlation with H-3 at δ 6.05 suggested the presence of a 2-methylchromone nucleus [15,17]. HMBC correlations between H₃-9 and C-3 at δ 108.9, and between H-3 and C-2 at δ 166.6 sustained by a cross-peak in the ROESY spectrum, bore further evidence. In fact the ^1H NMR spectrum showed coupling of H₃ with H₃-9 despite the intermittent quaternary carbon by small doublets with a J of 0.6 Hz and 0.3 Hz, respectively. H-8 at δ 6.39 showed cross peaks with C-7 at δ 162.8, C-8a at δ 156.6, C-6 at δ 111.7 and C-4a at δ 105.3 in the HMBC spectrum, while the ROESY spectrum revealed spatial vicinity of H-8 with the methoxy group at δ 3.91. The characteristic down field shift (13.06 ppm) of the hydroxy signal confirms the proposed substitution pattern of the aromatic ring system. The COSY spectrum showed a continuous spin system confined by C-1' at δ 21.0 and C-5' at δ 22.0. The ^1H NMR spectrum revealed that H₂-1' at δ 3.42 coupled with H-2' at δ 5.34 ($J = 6, 0.9$ Hz) showing a doublet and a triplet with J values of 5.7 and 6 Hz, respectively, while H-2' coupled as well with H₃-5' at δ 1.75 ($J = 0.9$ Hz). The HMBC spectrum showed cross-peaks of H₂-1' with C-7, C-6, C-5 at δ 158.2, C-2' at δ 125.1 and C-3' at δ 135.2. H₂-4' at δ 4.27 showed HMBC cross-peaks with C-

5', C-3' and C-2' and a ROESY correlation with H3-5'. The fact that ROESY correlation showed cross-peaks between H3-5' and H2-4', as well as with H-2' let us conclude that the double bond between C2' and C-3' had a cis configuration because otherwise a correlation between H-2' and H2-4' should have been observable.

A preliminary biological evaluation showed that this compound does not exhibit general cytotoxicity, with antiproliferative effects only observed above 10 μM (Table 1).

Cells	Cytotoxicity (μM)	Culture type
Jurkat (T cell leukemia)	12.9 ± 0.8	suspension
HL60 (promyelocytic leukemia)	14.2 ± 1.3	suspension
MCF7 (breast cancer)	< 50	adherent
PC3 (prostate cancer)	< 50	adherent

Table 1: Cytotoxicity of compound 1 against four cancer cell lines (N=3 \pm S.D.).

As a positive control paclitaxel (taxol) was used, which showed IC_{50} values for all cell lines < 50 nM.

Interestingly, however, while in Jurkat T cells and HL60 leukemia cells this compound showed IC_{50} values below 20 μM , in MCF-7 and PC3 cells no sign of cytotoxicity was detected up to 50 μM . Thus, immune suspension cells may be more susceptible to growth inhibition by this compound than adherent cells. Further studies are underway looking into potential immune-modulatory effects of this chromone.

Experimental

Plant material: The stems of *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans, which grows on calcareous substrates, were collected near Baunei (Ogliastra) in October 2006. A herbarium specimen (Leonti 600) has been deposited at the University of Zürich and ETH (Z/ZT).

Isolation: HPLC was conducted by means of a Hewlett- Packard 1050 instrument. The column was a 250 x 10 mm Spherisorb silica, particle size 5 μm (Waters), and the UV detection wavelength was 254 nm.

Spectroscopy: NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300 MHz, and Varian Unity INOVA 400 MHz spectrometers.

HPLC-MS Q-TOF analysis: Compounds 1 and 2 were analyzed by reverse-phase HPLC on an Agilent 1200 series HPLC system fitted with microchip technology using an Agilent Zorbax 300 SB-C18 5 μm , 43 mm x 75 μm (Agilent, Santa Clara, CA). The HPLC conditions were as follows: flow rate: 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$; solvent A: 0.1% formic acid in water; solvent B: acetonitrile; and gradient: solvent B 5–100% over 10 min. The samples (1 μL) were then analyzed by ESI in positive mode using an Agilent 6520 Time of Flight (TOF) mass spectrometer. MS data were acquired in the range m/z 100– 1,000, with an acquisition rate of 1.35 spectra/s, averaging 10,000 transients. The source parameters were adjusted as follows: drying gas temperature 250°C, drying gas flow rate 5 L/min, nebulizer pressure 45 psi, and fragmentor voltage 150 V. Data acquisition and processing were accomplished with Agilent MassHunter Workstation Acquisition v. B.02.00 software.

Cytotoxicity (antiproliferative activity): The cytotoxicity of the pure compound against CD4+ Jurkat human leukemia T-cells (ATCC TIB-152) and HL-60 cells (ATCC CCL-240) was determined after 72 h in a WST-1-based cell viability assay, as described in [21], and the MCF7 (ATCC HTB-22) and PC3 (ATCC CRL- 1435) cells were cultured and assessed after 72 h, as described previously (Feyen et al. 2006). Compound 1 was tested in a concentration range between 0.5 and 60 μM . Maximal standard deviation was 10% (absolute).

Extraction protocol and compound isolation: Dried and milled *S. praecox* stems (1 Kg) were percolated extensively with dichloromethane (DCM) and subsequently with methanol (MeOH) to afford 40 and 30 g of crude extract, respectively. An aliquot of 10 g of crude DCM extract was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) using 115 g silica gel (0.040- 0.063 mm Merck) stationary phase and approximately 50 mL toluene/ethyl acetate (EtOAc) for each fraction (9.3: 0.7 for fractions 1-19 and 8: 2 for fractions 20-28). After comparison of the 28 fractions by TLC they were, according to visual similarities, united, resulting in a set of 12 distinct fractions. Fraction 6 (350 mg) was chromatographed over 40 g Si60 with n-hexane (Hex)/EtOAc (8: 2). When the n-hexane evaporated, fraction 6.4 showed a precipitate of 15 mg of crystals (part A). The 44 mg soluble and non-crystallized mixture (part B) was eluted with pure DCM over 10 g of Si60 affording 3 subfractions. Psoralen was obtained by purifying 9 mg of subfraction 6.4.B.1 by HPLC (100% DCM, flow

of 2.5 mL/min, t_R = 17 min, 1.1 mg). Subfraction 6.4.B.2 (12.8 mg) was subjected to HPLC (100% DCM, flow of 2.2 mL/min), which resulted in the isolation of phellopterin (t_R = 24 min, 8 mg). The crystallized fraction of 6.4 (part A) was purified by HPLC (100% DCM flow of 2.2 mL/min). The fraction obtained at t_R = 21 min (6.4.A.2) was not pure and after TLC observation unified with fraction 6.4.B.2.2. This mixture was subjected to HPLC (Hex/EtOAc 6: 4, flow 2.2 mL/min) and afforded imperatorin (t_R = 18 min, 3.3 mg) and bergapten (t_R = 19 min, 5.2 mg). For reversed phase (RP-18, Merck) VLC an aliquot of 10 g crude methanolic (MeOH) extract was dissolved in a mixture of 40 mL of MeOH/H₂O (3: 7). The crude MeOH extract was separated into 10 fractions using step gradient solvent mixtures of MeOH/H₂O beginning with 4: 6 until 100% MeOH. RP-VLC fraction 6 (220 mg) was subjected to open column chromatography in normal phase with Hex/EtOAc (7: 3) as eluent. Fraction 2 (out of 7) afforded 7 mg of compound 2 (marmesin).

Fraction 8 of RP-VLC (126 mg) was chromatographed on open column in normal phase with EtOAc/Hex (4: 6) as eluent. Fraction 2 (out of 9) afforded 4 mg of the new compound 1: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2methylchromone).

5 Hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7- methoxy-2 methylchromone (1) Red-brownish gum.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 1.75 (3H, d, J = 0.9 Hz, Me (H-5')), 2.35 (3H, d, J = 0.3 Hz, Me (H-9)), 3.42 (2H, d, J = 5.7 Hz, H-1'), 3.91 (3H, s, OMe), 4.27 (2H, s, H-4'), 5.34 (1H, dt, J = 6, 0.9 Hz, H-2'), 6.05 (1H, d, J = 0.6 Hz, H-3), 6.39 (1H, s, H-8), 13.06 (1H, s, OH).

¹³C NMR (CDCl₃ 75 MHz): 20.5 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.0 (CH₃), 56.0 (OCH₃), 61.7 (CH₂), 89.8 (CH), 105.3 (C), 108.9 (CH), 111.7 (C), 125.1 (CH), 135.2 (C), 156.6 (C), 158.2 (C), 162.8 (C), 166.6 (C), 182.5 (C).

Q-TOF HRMS: m/z [M+H⁺] calcd. for C₁₆O₅H₁₉: 291.1232; found: 291.1204.

Compound 1 was obtained in a proportion of 0.0012% with respect to the extracted plant material.

Acknowledgments

This study was financially supported by a grant from the Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (MIUR – progetto “rientro cervelli”).

References

- Austin PW., Seshadri TR., Sood MS., Vishwa P., (1968). Components of *Seseli sibiricum*. Constitution and synthesis of sibiricin, a new coumarin. *Tetrahedron* vol. 24; pp. 3247-3253.
- Bellino A., Venturella P., Marino ML., Servettaz O., Venturella G., (1986). Coumarins from *Seseli bocconi*. *Phytochemistry* vol. 25; pp. 1195-1199.
- Berendes J., (1902) Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre in Fünf Büchern. Book 3, Chap. 53. F. Enke, Stuttgart.
- Bergendorff O., Dekermendjian K., Nielsen M., Shan R., Witt R., Ai J., Sterner O., (1997). Furanocoumarins with affinity for brain benzodiazepine receptors in vitro. *Phytochemistry* vol. 44; pp. 1121-1124.
- Czepa A., Hofmann T., (2003). Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 51; pp. 3865-3873.
- Cisowski W., Grimshaw J., (1988). Glucoside of chromone from *Angelica archangelica* L. and *Archangelica litoralis* Fries. herbs. *Polish Journal of Chemistry* vol. 62; pp. 135-140.
- Elgamal MHA., Elewa NH., Elkhisy EAM., Duddeck H., (1979). ¹³C NMR chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones. *Phytochemistry* vol. 18; pp. 139-143.
- Feyen F., Gertsch J., Wartmann M., Altmann KH., (2006). Design and synthesis of 12-azapothilones (azathilones) - "non-natural" natural products with potent anticancer activity. *Angewandte Chemie International Edition* vol 45; pp. 5880-5885.
- Harker S., Razdan TK., Waight ES., (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* vol. 23; pp. 419- 426.
- Hilmi F., Gertsch J., Bremner P., Valovic S., Heinrich M., Sticher O., Heilmann J., (2003). Cytotoxic versus anti-inflammatory effects in HeLa, Jurkat T and human peripheral blood cells caused by guaianolide-type sesquiterpene lactones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* vol. 11; pp. 3659-3663.

Hu CQ., Chang JJ., Lee KH., (1990). Antitumor agents, 115. Seselidiol, a new cytotoxic polyacetylene from *Seseli mairei*. Journal of Natural Products vol. 53; pp. 932-935.

Kumar R., Gupta B., Banerjee SK., Atal CK., (1978). New coumarins from *Seseli sibiricum*. Phytochemistry vol. 17; pp. 2111-2114.

Kuster RM., Bernardo RR., Da Silva AJR., Parente JP., Mors WB., (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. Phytochemistry vol. 36; pp. 221-223.

Ishii H., Sekiguchi F., Ishikawa T., (1981). Studies on the chemical constituents of Rutaceous plants – XLI. Absolute configuration of rutaretin methyl ether. Tetrahedron vol. 37; pp. 285-290.

Lemmich J., Lemmich E., Eichstedt-Nielsen B., (1966). Constituents of Umbelliferous plants. Acta Chimica Scandinavica vol. 20; pp. 2497-2507.

Leonti M., Casu L., Sanna F., Bonsignore L., (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily – De Materia Medica revisited? Journal of Ethnopharmacology vol. 121; pp. 255-267.

Leonti M., Nebel S., Rivera D., Heinrich M., (2006). Wild gathered food plants in the European Mediterranean: A comparative analysis. Economic Botany vol. 60; pp. 130-142.

Leonti M., Casu L., Raduner S., Cottiglia F., Floris C., Altmann KH., Gertsch J., (2010). Falcarinol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces proallergic effects in skin. Biochemical Pharmacology vol. 79; pp. 1815–1826.

Matthioli A., (1967). I Discorsi di M. Pietro Andrea Matthioli. Sanese, Medico Cesareo, et del Serenissimo Principe Ferdinando Archiduca d’Austria & c.Nelli Sei Libri Di Pedacio Dioscoride Anazarbeo della Materia Medica. Vincenzo Valgrisi, Venezia. Book 3, Chap. 55. Anastatic reproduction of the edition from 1568 in 6 volumes, Rome.

Razdan TK., Qadri B., Harkar S., Waight ES., (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. Phytochemistry vol. 26; pp. 2063- 2069.

Savina AA., Perel’son ME., Ban’kovskii AI., Nikonov GK., (1970). The structure of seselirin: A new chromone from the roots of *Seseli sessilifolium*. Chemistry of Natural Compounds vol. 6; pp. 419-422.

Tosun A., Baba M., Okuyama T., (2007). Coumarins from *Seseli hartvigii* roots. Natural Product Communications vol. 2; pp. 653-658.

Zidorn C., Joehrer K., Ganzera M., Schubert B., Sigmund EM., Mader J., Greil R., Ellmerer EP., Stuppner H., (2005). Polyacetylenes from Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley and parsnip and their cytotoxic activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry vol. 53; pp. 2518-2523.

PUBBLICAZIONE II

Benzophenones from the roots of the Popoluca Amerindian medicinal plant *Securidaca diversifolia* (L.) S.F.Blake

Laura Casu^a, Maria Novella Solinas^a, Anna Rita Saba^a, Filippo Cottiglia^a, Pierluigi Caboni^b, Costantino Floris^c, Samuela Laconi^d, Raffaello Pompei^d, Marco Leonti^{a*}.

a Dipartimento FarmacoChimicoTecnologico, Università di Cagliari, Facoltà di Farmacia, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari (CA), Italy

b Dipartimento di Tossicologia, Università di Cagliari, Facoltà di Farmacia, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari (CA), Italy

c Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Cagliari, Complesso di Monserrato, 09042 Monserrato (CA), Italy

d Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Sezione di Microbiologia Applicata, Università di Cagliari, Via Porcell 4, 09124 Cagliari.

marcoleonti@netscape.net; mleonti@unica.it

Received 8 July 2010 Received in revised form 13 August 2010 Accepted 17 August 2010

Abstract

Three novel benzophenones (1–3) were obtained from the roots of *Securidaca diversifolia* (L.) S.F.Blake along with known benzylbenzoates and isovanilline. Compound 2 (2,4-dihydroxy-3,30-dimethoxy benzophenone) showed moderate inhibitory activity on Herpes simplex virus type 1 proliferation in vitro. The structures of compounds 1–3 were established by the interpretation of their spectroscopic and spectrometric data.

Keywords:

Securidaca diversifolia, Polygalaceae, Benzophenones, Antiviral activity Herpes simplex.

Introduction

In our ongoing phytochemical investigation on medicinal plants traditionally used by the Sierra Popoluca in southern Veracruz (Mexico) (Leonti et al., 2004; Cottiglia et al., 2004) we now focused on *Securidaca diversifolia* (L.) S.F. Blake (Polygalaceae). *S. diversifolia* is native to Meso- and South America with a distribution area ranging from southern Mexico to Brazil (data.gbif.org). A maceration of the root bark of this facultative climber is traditionally used to treat feverish diseases, including measles and, to a lesser extent, also diarrhoea (Leonti et al., 2001; Leonti, 2002). The Popoluca treat fever mainly with a shower bath using a maceration of different fresh or “cold” leaves, supposed to cool the body (Leonti et al., 2002; Leonti, 2002). The systemic application of *S. diversifolia* represents an exception to this procedure (Leonti, 2002). The phytochemical literature concerning *S. diversifolia* is limited to a study on flavonolglycosides obtained from the leaves (Hamburger et al., 1985). From the related Chinese medicinal plant *Securidaca inappendiculata* Hassk., xanthenes and benzophenones, which by cyclization give way to xanthenes (Beerhues and Liu, 2009) have been isolated (Yang et al., 2001; Kangetal., 2005). Benzophenones are mainly reported from families belonging to the Rosids such as the Polygalaceae, Rosaceae (*Coleogyne ramosissima* Torr. (Ito et al., 2000)), Clusiaceae (*Garcinia subelliptica* Merr. (Minami et al., 1994) and *Pentadesma butyracea* Sabine (Wabo et al., 2010)), Moraceae (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudich. ex Benth. & Hook. f. (Jefferson and Scheinmann, 1965)), Anacardiaceae (*Mangifera indica* L. (Tanaka et al., 1984)), Myrtaceae (*Psidium guajava* L. (Shu et al., 2010)), and the Thymelaeaceae (*Gnidia involucreta* Steud. ex A. Rich. (Ferrari et al., 2000) and *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg (Qi et al., 2009)), as well as from the taxonomically unrelated Lauraceae (*Lindera fruticosa* Hemsl. (Song et al., 2006)) and Iridaceae (*Iris florentina* L. (Arisawa et al., 1973) and *Belamcanda chinensis* (L.) DC. (Monthakantirat et al., 2005)). Here we describe the isolation, structure elucidation and the antiviral activity of three novel benzophenones (1–3) obtained from *S. diversifolia*.

Results and discussion

In a preliminary screening the crude CH₂Cl₂ extract of the roots showed activity against Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro. The separation and isolation processing using vacuum liquid chromatography (VLC), column chromatography (CC) and HPLC yielded 2,4-dihydroxy-3-methoxy-3,30-dimethoxy benzophenone (2), 3,4-methylenedioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone (3) along with benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (4), benzyl 2,6-dimethoxybenzoate and isovanillin. The structures of the new compounds were established by means of ¹D and ²D spectroscopic data and Q-TOF HRMS analysis,

while the structure of the known compounds were confirmed by the comparison of the spectroscopic data with that reported in literature.

No.	1		2		3	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		114.0 (s)		114.0 (s)		114.0 (s)
2		157.2 (s)		157.2 (s)		157.0 (s)
3		134.2 (s)		134.1 (s)		134.3 (s)
4		155.2 (s)		155.2 (s)		155.0 (s)
5	6.45 (d, 9)	106.3 (d)	6.44 (d, 8.8)	106.3 (d)	6.50 (d, 9)	106.1 (d)
6	7.26 (d, 9)	130.4 (d)	7.27 (d, 8.8)	130.4 (d)	7.35 (d, 9)	130.0 (d)
1'		138.1 (s)		139.4 (s)		132.1 (s)
2'	7.45 (m)	128.2 (d)	7.11 (ddd, 2.4, 1.5)	113.7 (d)	7.18 (d, 1.5)	109.5 (d)
3'	7.59 (m)	128.8 (d)		159.5 (s)		150.8 (s)
4'	7.52 (m)	131.6 (d)	7.07 (ddd, 3.1, 2.4, 0.9)	117.6 (d)		147.8 (s)
5'	7.59 (m)	128.8 (d)	7.36 (m)	129.3 (d)	6.90 (d, 7.8)	107.9 (d)
6'	7.45 (m)	128.2 (d)	7.15 (ddd, 7.5, 1.5, 0.9)	121.4 (d)	7.23 (ddd, 7.8, 1.5)	125.1 (d)
3'-OCH ₃	4.02 (s)	60.8 (q)	4.01 (s)	60.7 (q)	4.01 (s)	60.8 (q)
3'-OCH ₃			3.82 (s)	55.5 (q)		
O=C ₂ O					6.05 (s)	101.8 (t)
2-OH	12.74 (s)		12.74 (s)		12.61 (s)	
4-OH	6.38 (s)		6.39 (s)		6.39 (s)	
C=O		200.7 (s)		200.5 (s)		198.9 (s)

Table 1 ¹H(300MHz) and ¹³C (75 MHz) NMR data of compound 1-3 (CDCl₃, d in ppm).

Compound 1 was obtained as yellowish gum. The Q-TOF H RMS spectrum exhibited a quasi molecular ion peak [M+H]⁺ at m/z 245.0807 (calcd. 245.0814) suggesting a molecular formula of C₁₄H₁₂O₄ for compound 1. The ¹³C-NMR spectrum of compound 1 showed 14 carbon signals specifiable in one methoxy (δ_{C} 60.8) seven methines (δ_{C} 106.3, 130.4, 128.2, 128.2, 128.8, 128.8, 131.6) and 6 quaternary carbons (δ_{C} 114.0, 134.2, 138.1, 155.2, 157.2, 200.7). Carbon signals at δ_{C} 128.2 and 128.8 corresponded to 2 carbons each and are typical for symmetric mono substituted benzene systems.

The two quaternary carbons at δ_{C} 155.2 and 157.2 showed the typical pattern of hydroxylated aromatic carbons while the quaternary carbon at δ_{C} 200.7 showed the typical signal of a carbonyl group. The ¹H NMR revealed signals for one methoxy group at δ_{H} 4.02 (3H, s) seven aromatic protons at δ_{H} 6.45 (1H, d, J = 9Hz), 7.26 (1H, d, J = 9Hz), 7.45 (2H, m), 7.52 (1H, m) and 7.59 (2H, m) and two phenolic protons at δ_{H} 6.38 (1H, s) and 12.74 (1H, s) the latter of which participating in strong hydrogen bonding (Table 1). The presence of a carbonyl group and two phenyl moieties led us suspect that the compound under examination was a benzophenone. COSY correlations revealed that the signal at δ_{H} 6.45 (d, H-5) and at δ_{H} 7.26 (d, H-6) correlated to each other with a coupling constant value of 9 Hz indicative of ortho coupling. The methoxylic protons at δ_{H} 4.02 showed hetero nuclear multiple bond connectivity (HMBC) with the quaternary carbon at δ_{C} 134.2 (C-3). H-5 showed HMBC correlations with C-3 and C-4 (δ_{C} 155.2). Furthermore, H-6 showed HMBC correlations with the carbonyl group at δ_{C} 200.7 and the hydroxyl bearing C-2 (δ_{C} 157.2) and C-4. COSY correlations suggested that the proton at δ_{H} 7.45 (2H, m, H-2' and H-6'), at δ_{H} 7.59 (2H, m, H-3' and H-5') and the proton at δ_{H} 7.52 (1H, m, H-4') belonged to the spin system of ring B. The protons H-2' and H-6' showed HMBC correlations with the

quaternary carbon C-10 at δ_c 138.1, while protons H-3' and H-5' revealed HMBC correlations with carbon C-4' at δ_c 131.6. HMBC correlations were observable for the signal at δ_H 7.59 (2H, m, H-3' and H-5') with the carbonyl group. Additionally, the hydroxyl proton at δ_H 12.74 in ring A showed HMBC correlation with the carbonyl group, which confirmed the presence of a benzophenone system.

The hydroxyl proton at δ_H 12.74 was diagnostic for the proposed substitution pattern of the aromatic system in ring A and based on this data the structure of compound 1 was elucidated as 2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone (Fig. 1). Compound 2 was obtained as yellowish oil. The Q-TOFHRMS spectrum exhibited a quasi molecular ion peak $[M+H]^+$ at m/z 275.0916 (calcd. 275.0919) suggesting the molecular formula of $C_{15}H_{14}O_5$ for compound 2. The 1H NMR and ^{13}C NMR were similar to that of compound 1. With respect to compound 1, the ^{13}C NMR spectrum of compound 2 showed additional methoxylic (δ_c 55.5) and quaternary carbons (δ_c 159.5) and concomitantly presented one methane carbon signal less. The 1H NMR showed an additional methoxy signal at δ_H 3.82 (3H, s) while the proton signals of the AB system in ring A [δ_H 6.44 (d, $J = 8.8$ Hz), δ_H 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz)] were almost identical to that observed for compound 1 (Table 1). The COSY spectrum showed a spin system for the signals at δ_H 7.07 (ddd, $J = 8.1, 2.4, 0.9$ Hz, H-40) at δ_H 7.36 (m, H-5') and at δ_H 7.15 (ddd, $J = 7.5, 1.5, 0.9$ Hz, H-6'). The proton at δ_H 7.11 (dd, $J = 2.4, 1.5$, H-20) showed meta-coupling with H-4' and H-6'. HMBC correlations could be observed for the methoxylic protons at δ_H 3.82 with C-3' (δ_c 159.5) and for H-5' with C-10 (δ_c 139.4) and C-3'. Altogether, this data led us to conclude that the identity of compound 2 was 2,4-dihydroxy-3,30-dimethoxy-benzophenone (Fig. 1). Compound 3 was obtained as yellow needles. The Q-TOFHRMS spectrum exhibited a quasi molecular ion peak $[M+H]^+$ at m/z 289.0693 (calcd. 289.0712) in agreement with a molecular formula of $C_{15}H_{12}O_6$ for compound 3. The 1H and ^{13}C NMR spectra of compound 3 were very similar to those of compound 2 with the exception of an additional signal at δ_H 6.05 (2H, s). In the HSQC spectra this signal (δ_H 6.05) showed correlation with the carbon at δ_c 101.8, a feature, which is diagnostic for dioxymethyl functions. The COSY spectrum showed a spin system for the signals at δ_H 6.90 (d, $J = 7.8$ Hz, H-50) and at δ_H 7.23 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, H-6') in ring B. The proton at δ_H 7.18 (d, $J = 1.5$ Hz, H-20) showed meta-coupling with H-6'. HMBC correlation was observed between the dioxymethyl function and the quaternary carbons at δ_c 150.8 (C-3') and at δ_c 147.8 (C-4').

Conclusively, we identified compound 3 as 3',4'-methylendioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone (Fig. 1). Both, benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (4, Fig. 1) and benzyl 2,6-dimethoxybenzoate have been isolated previously from the root of *Uvaria purpurea* Blume (Annonaceae) and 1H NMR data in literature are consistent with ours (Kodpinid et al., 1983). ^{13}C NMR data of benzyl 2,6-dimethoxy benzoate is reported in a work on *Brintonia discoidea* (Elliott) Greene (Asteraceae) and is consistent with our data (Lu et al., 1993).

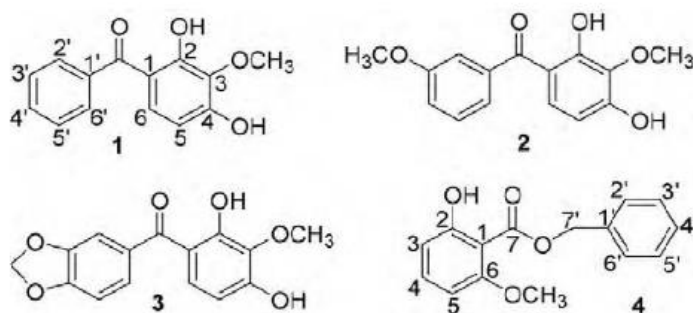


Fig. 1. Structures of compounds 1–4.

To our knowledge the ^{13}C NMR data of benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (4) have so far not been reported. Isovanilline was identified by the comparison of ^1H and ^{13}C NMR data with that reported in literature (Kolehmainen et al., 1992). 2,3',4,6-Tetra hydroxy benzophenone is regarded as the immediate precursor for xanthone biosynthesis (Beerhues and Liu, 2009). The presence of xantone is reported for that worelated species *S. inappendiculata* (Yang et al., 2001; Kangetal., 2005) and *S. longipedunculata* Fresen. (Galeffi et al., 1989; Marion Meyeretal., 2008). The apparent absence of xantone in *S. diversifolia* root could be explained by the lack of the ability in generating 6-oxygenated benzophenone precursors. Compounds 1–4 were evacuate against H. simplex virus type 1 (HSV-1) and polio virus Sabin1 (1S) in virus infected confluent Hela cell mono layer according to Burleson et al. (1992). Only compound 2 showed selective activity against HSV-1 with an IC 50 of 4 mg/mL and a protection index (PI) of 16 (16-fold more activity towards HSV-1 with respect to toxicity towards Hela cells). Compounds 1–4 showed no anti cytopathic activity towards 1S infection in vitro (Table 2).

Experimental

3.1. General experimental procedures

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 MHz and on a Varian Unity INOVA 400 MHz spectrometer in CDCl_3 (TMS as reference). HPLC-MSQ-TOF analysis was performer on can Agilent 1200 series HPLC system fitted with a microchip technology using an Agilent Zorbax 300 SB-C185 mm, 43mm 75 mm (Agilent, Santa Clara, CA). The HPLC conditions were as follows: flow-rate: 0.4 mL/min; solvent A:0.1%formic acid in water; solvent B: acetonitrile; and gradient: solvent B5–100% over 10 min. The samples (1 mL) were analyzed by ES in positive mode using an Agilent 6520 Time of Flight (TOF MS. Mass spectral data were acquired in the range, m/z 100–1000 with an acquisition rate of 1.35

spectra/s, averaging 10,000 transients. The source parameters were adjusted as follows: drying gas temperature 250 °C, drying gas flow rate 5L/min, nebulizer pressure 45 psi, and fragmentor voltage 150 V. Data acquisition and processing were done using Agilent Mass Hunter Workstation Acquisition. B. 02.00 software. HPLC was conducted by means of a Hewlett-Packard 1050 instrument. The column was a 250 mm \times 10 mm Spherisorb silica, particle size 5 μ m (Waters), and the UV detection wavelength was 254 nm. Column chromatography (CC) and vacuum liquid chromatography (VLC) was carried out on silica gel (0.040–0.063 mm, Merck). Solid phase extraction (SPE) was performed on Sep-Pak Vac 3 cc (500mg) C18 cartridges (Waters).

3.2. Plant material

The roots of *S. diversifolia* were collected in the Sierra Santa Marta near the village of Sotepan (Veracruz, Mexico) at around 350 m a. s. l. in the year 2000. Voucher specimens (Leonti 263) have been deposited at the National Mexican Herbarium MEXU (UNAM, Mexico, D.F.), The School of Pharmacy, Univ. London and at the University of Zürich and ETH (Z/ZT).

3.3. Extraction and isolation

Dried and powdered *S. diversifolia* root (1000g) was percolated extensively with CH_2Cl_2 (20 L) to afford 16.3 g crude extract. Twice an aliquot of 8 g of crude CH_2Cl_2 extract was fractionated into 28 fractions by VLC using 104 g silica gel as stationary phase (Hex–EtOAc, 9:1 (2.8L); Hex–EtOAc, 8:2 (0.5L); Hex–EtOAc, 7:3 (0.6L); Hex–EtOAc, 6:4 (0.9L); EtOAc, 100% (0.5L)). According to the visible similarities on TLC the 56 fractions were united resulting in 11 distinct fractions. Fraction 6 (424mg) was chromatographed on CC (70 g, 60 \times 3 cm) and eluted with 100% CH_2Cl_2 (0.6 L) which resulted in 11 subfractions. Fraction 6.8 corresponded to compound 1 (13.5 mg). Fraction 6.9 (12mg) was subjected to HPLC (100% CH_2Cl_2 , flow 3 mL/min) affording compound 2 (t_R = 22 min, 7.8 mg). A can aliquot of VLC fraction 7 (367 mg) was purified by HPLC (Hex–EtOAc, 7:3, flow 2.5 mL/min) yielding compound 3 (t_R = 16 min, 9.3 mg) and isovanilline (t_R = 22 min, 3.2 mg). VLC fraction 3 (800 mg) was fractionated by VLC over 33 g silica gel (Hex– CH_2Cl_2 , 6:4 (0.3 L); Hex– CH_2Cl_2 , 5:5 (0.3L); Hex– CH_2Cl_2 , 4:6(0.2L); Hex CH_2Cl_2 , 3:7 (0.1 L); 100% CH_2Cl_2 (0.1 L)). Subfraction 3.3 was purified on SPE cartridge (Hex– CH_2Cl_2 , 4:6 (0.15 L)) resulting in compound 4 (44 mg). VLC fraction 5 (476 mg) was chromatographed on CC (75 g, 60 \times 3 cm) using 100% CH_2Cl_2 as an eluent. Fraction 5.2 corresponded to benzyl 2,6-dimethoxybenzoate (4.5 mg).

3.4 2,4-Dihydroxy-3-methoxy-benzophenone (1)

Yellowish gum (CH₂Cl₂); UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 225 (1.7), 228 (1.5), 295 (1.7); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; Q-TOF HRMS m/z 245.0807 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₄H₁₂O₄, 245.0814).

3.5 2,4-Dihydroxy-3,30-dimethoxy-benzophenone (2)

Yellowish oil (CH₂Cl₂); UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 225 (1.5), 228 (1.4), 295 (1.5); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; Q-TOF HRMS m/z 275.0916 [M+H]⁺ (calcd. For C₁₅H₁₄O₅, 275.0919).

3.6 3',4'-Methylenedioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone (3)

Yellow needles (CH₂Cl₂); m.p. 154 8C; UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 236 (2.2), 296–325 sh.(2); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; Q-TOFHRMS m/z 289.0693 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₅H₁₂O₆, 289.0712).

3.7 Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (4)

Dirty-white crystals; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d = 3.86 (3H, s, OMe), 5.43 (2H, s, H-70), 6.42 (1H, dd, J = 8.4, 0.6, H-3), 6.60 (1H, dd, J = 8.4, 0.9, H-5), 7.35 (2H, m, H-30 and H-50), 7.36 (1H, m, H-4), 7.40 (1H, m, H-40), 7.45 (2H, m, H-20 and H-60), 11.41 (OH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d = 56.1 (q, OMe), 66.8 (t, C-70), 102.4 (d, C-3), 103.2 (s, C-1), 110.0 (d, C-5), 127.5 (d, C-20 and C-60), 128.0 (d, C-40), 128.5 (d, C30 and C-50), 135.4 (d, C-4), 135.7 (s, C-10), 161.1 (s, C-6), 163.6 (s, C-2), 170.9 (s, C-7).

3.8. Cytotoxic and antiviral activity

Hela cells (Ohiostrain, NIH) were cultivated in Dulbecco medium aduste to contain 1% non-essential aminoacid (NEAA), 10% foetal calf serum (SF), 100U/mL penicillin Gand 100 mg/mL streptomycin. Cells were incubated at a densit of 10⁴/mL at 37°C and 5% CO₂ for 24 h in 48-well plates allowing to form confluent monolayers.

Compounds 1–4 dissolved in DMSO were added and incubated for 48 h. Cytotoxic activity was determined by light microscope observation. In parallel to the determination of the cytotoxicity cell monolayers were infected with HSV-1 (NIH) and1S virus (NIH, Bethesda USA) at a concentration of 400,000 viral units/mL. For the evaluation of the cytopathic effect the same conditions as for the determination of cytotoxicity were used. Antiviral activity was determined microscopically. Antiviral activity o compound 2 was confirmed in a plaque reduction assay modified after Burleson et al. (1992). Hela cells were seed edin6-well plates and grown into confluent cell monolayers in Dulbecco's modified MEM (DMEM,

GIBCO Laboratories Inc.) aduste to contain 1% NEAA and 10% SF. Monolayers were incubated for 1 h with cellularys is at room temperature in the dark and the nover laid with agar. Plaques were stained with neutral red (1mL/100mL) after 48 h at 37°C and observed macroscopically.

Acknowledgements

The research was conducted with the permit No.DOO.02.-1750 obtained from the Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). This study was financially supported by a grant from the Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (MIUR-progetto "rientro cervelli"). We are especially grateful to the Popoluca community of the Sierra Santa Marta (Veracruz, Mexico) for sharing their knowledge.

References

Arisawa M., Morita N., Kondom Y., Takemoto T., (1973). Studies on constituents of *Iris* genus plants. IV. The constituents of *Iris florentina* L. Chem.Pharm.Bull. vol. 21; pp. 2323–2328.

Beerhues L., Liu B., (2009). Biosynthesis of biphenyls and benzophenones evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. Phytochemistry vol. 70; pp. 1719–1727.

Burleson FG., Chambers TM., Wiedbrank DL., (1992). Virology, A Laboratory Manual. Academic Press, San Diego.

Cottiglia F., Dhanapal B., Sticher O., Heilmann J., (2004). New chromanone acids with anti bacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. J. Nat. Prod. vol. 67; pp. 537–541.

Ferrari J., Terreaux C., Sahpaz S., Msonthi JD., Wolfender JL., Hostettmann, K., (2000). Benzophenone glycosides from *Gnidia involucreta*. Phytochemistry vol. 54; pp. 883–889.

Galeffi E., Federici E., Msonthi JD., Marini-Bettolo GB., Nicoletti M., (1989). New xanthenes from *Ectiadiopsis oblongifolia* and *Securidaca longipedunculata*. Fitoterapia vol. 16; pp. 79–81. data.gbif.org: <http://data.gbif.org/species/13744445>. Accessed through GBIF Data Portal, April 7, 2010.

Hamburger M., Gupta M., Hostettmann K., (1985). Flavonol glycosides from *Securidaca diversifolia*. Phytochemistry vol. 24; pp. 2689–2692.

Ito H., Nishitani E., Konoshima T., Takasaki M., Kozuka M., Yoshida T., (2000). Flavonoid and benzophenone glycosides from *Coleogyne ramosissima*. Phytochemistry vol. 54; pp. 695–700.

Jefferson A., Scheinmann F., (1965). Presence of 1,3,6,7-tetrahydroxy xanthone in maclurin from *Chlorophora tinctoria* (L) Gaud. (*Morus tinctoria* L.) (Moraceae). Nature vol. 5002; pp. 1193.

Kang WY., Wang ZM., Li ZQ., Xu XJ., (2005). Three new compounds from *Securidaca inappendiculata*. Helv. Chim. Acta vol. 88; pp. 2771–2776.

Kodpinid M., Sadavongvivad C., Thebtaranonth C., Thebtaranonth Y., (1983). Benzyl benzoates from the root of *Uvaria purpurea*. *Phytochemistry* vol. 23; pp. 199–200.

Kolehmainen E., Laihia K., Knuutinen J., Hyotylainen J., (1992). ^1H , ^{13}C and ^{17}O NMR Study of chloro vanillins and some related compounds. *Magn. Reson. Chem.* vol. 30; pp. 253–258.

Leonti M., Moko/La Rosa Negra, Ethnobotany of the Popoluca, Veracruz, Mexico [dissertation]. ETH Zurich, No.14922.doi:10.3929/ethz-a-004488669, Zurich.

Leonti M., Vibrans H., Sticher O., Heinrich M., (2001). Ethnopharmacology of the Popoluca, México: can evaluation. *J. Pharm. Pharmacol.* vol. 53; pp. 1653–1669.

Leonti M., Sticher O., Heinrich M., (2002). Medicinal plants of the Popoluca, México: organoleptic properties as indigenous selection criteria. *J.Ethnopharmacol.* vol. 81; pp. 307–315.

Leonti M., Heilmann J., Heinrich M., Sticher O., (2004). Bioactive natural products from the Popoluca Indian medicinal plant *Mosquitoxylum jamaicense* (Anacardiaceae). *Rev. Latinoam. Qui'm.* vol. 32; pp. 87–93.

Lu T., Vargas D., Fischer N., (1993). Sesquiterpenes from *Brintonia discoidea*. *Phytochemistry* vol. 34; pp. 737–742.

Marion-Meyer JJ., Rakuambo NC., Hussein AA., (2008). Novel xantone from *Securidaca longepedunculata* with activity against sterility dysfunction. *J. Ethnopharmacol.* vol. 119; pp. 599–603.

Minami H., Kinoshita M., Fukuyama Y., Kodama M., Yoshizawa T., Sugiura M., Nakagawa K., Tago H., (1994). Anti oxidant xantone from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry* vol. 36; pp. 501–506.

Monthakantirat O., De-Eknamkul W., Umehara K., Yoshinaga Y., Miyase T., Warashina T., Noguchi H., (2005). Phenolic constituents of the rhizomes of the Thai medicinal plant *Belamcanda chinensis* with proliferative activity for two breast cancer cell lines. *J. Nat. Prod.* vol. 68; pp. 361–364.

Qi J., Lu JJ., Liu JH., Yu BY., (2009). Flavonoid and a rare benzophenone glycoside from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* vol. 57; pp. 134–137.

Shu J., Chou G., Wang Z., (2010). Two new benzophenone glycosides from the fruit of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia* vol. 81; pp. 532–535.

Song MC., Nigussie F., Jeong TS., Lee CY., Regassa F., Markos T., Baek NI., (2006). Phenolic compounds from the roots of *Lindera fruticosa*. *J. Nat. Prod.* vol. 69; pp. 853– 855.

Tanaka T., Sueyasu T., Nonaka G., Nishioka I., (1984). Petiolins F–I, benzophenone rhamnosides from *Hypericum pseudopetiolatum* var. *kiusianum*. *Chem. Pharm. Bull.* vol. 32; pp. 2676–2686.

Wabo HK., Kikuchi K., Katou Y., Tane P., Oshima Y., (2010). Xanthones and a benzophenone from the roots of *Pentadesma butyracea* and their anti proliferative activity. *Phytochem. Lett.* vol. 3; pp. 104–107.

Yang XD., Xu LZ., Yang SL., (2001). Xanthones from the stems of *Securidaca inappendiculata*. *Phytochemistry* vol. 58; pp. 1245–1249.

Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale va ai miei relatori: Laura e Marco per tutto quello che mi hanno insegnato in questi anni di dottorato e ancor prima quando ero in tesi. Oltre che una guida nel lavoro sono stati per me degli esempi da seguire e una seconda famiglia. Mi avete fatto capire quanto la passione e l'amore per il lavoro siano importanti per riuscire bene ed andare avanti nonostante tutto. Questo è un insegnamento che porterò sempre con me.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori per aver gioito con me per questa opportunità e per avermi sostenuto in questi tre lunghi anni. Un grazie a Laura e Massi che non mi hanno mai fatto mancare il loro appoggio e hanno sempre creduto in me. Un ringraziamento a tutti i miei parenti per essere sempre stati presenti e interessati al mio lavoro di tesi.

Un ringraziamento speciale a Davide, mio compagno in questi ultimi mesi di dottorato, i più duri. Con le tue parole di sostegno e conforto mi sei stato vicino nelle giornate in cui tutto sembrava andar storto. Sei stato sempre pronto ad incitarmi quando c'era molto da lavorare, ma anche compagno nei momenti di relax. Sarebbe stato tutto più difficile senza di te.

Un grazie a Maria Novella, Alice e Gloria che sono state mie compagne di avventura e hanno condiviso quest'esperienza nei momenti più o meno lieti. Siete state molto importanti e avete reso questi tre anni indimenticabili.

Un grazie a tutti quelli che si sono avvicinati nel nostro gruppo di ricerca per aver creato sempre un ambiente sereno ed amichevole in cui lavorare.

Un ringraziamento a tutti i Professori, Ricercatori e Tecnici grazie la cui collaborazione è stato possibile questo lavoro di tesi, un ringraziamento particolare va al Prof. Jürg Gertsch.

