



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

in Scienze e Tecnologie Farmaceutiche

Ciclo XXIII

TITOLO TESI

**Materia medica e prodotti naturali nella Chimica
Farmaceutica**

Settore scientifico disciplinari di afferenza

Chimica Farmaceutica (CHIM 08)

Presentata da: Dott.ssa Maria Novella Solinas

Coordinatore Dottorato Prof. Elias Maccioni

Relatori Dott.ssa Laura Casu

Dott. Marco Leonti

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

*...E il mio maestro mi insegnò com'è difficile
trovare
l'alba dentro l'imbrunire...*

Tratto da: Prospettiva Nevski di Franco Battiato (Patriots 1980)

*A Maria Novella
e Oliviero*

Indice analitico

SUMMARY	1
SOMMARIO	3
1 Introduzione	5
1.1. Le piante come risorse di agenti medicinali	5
1.2. Breve storia delle farmacopee	8
1.3. Varie strategie nella ricerca di molecole con attività biologica	14
2 IL GENERE <i>SESELI</i>	22
2.1 Sistematica	22
2.1.1 Introduzione	22
2.1.2 Caratteristiche del genere <i>Seseli</i>	23
2.1.3 Distribuzione in Italia	23
2.2 Fitochimica del genere <i>Seseli</i>	24
2.2.1 I cromoni	24
2.1.2 Fenilpropanoidi	25
2.1.3 Lignani	26
2.1.4 Cumarine	27
2.1.5 Terpeni	33
2.1.6 Sesquiterpeni	33
2.1.7 Poliacetileni	36
3. <i>Seseli praecox</i> (Gamisans) Gamisans	43
3.1. Caratteristiche della pianta	43
3.2. Luogo di raccolta	45
3.3. Risultati fitochimici della <i>Seseli praecox</i> (Gamisans) Gamisans	47
3.4. Estrazione e isolamento	49
3.4.1. Frazionamento dell'estratto diclorometanico (Figura 3.6)	49

3.4.2. Frazionamento dell'estratto metanolico (Figura 3.7)	52
3.4.3. Frazionamento bioguidato del falcarinolo (Figura 3.8)	54
3.4.4. Studio di decomposizione del falcarinolo	58
3.5. Delucidazione delle nuove strutture isolate dalla <i>Seseli praecox</i> (Gamisans)	
amisans	60
3.5.1. Composto 7:	60
3.5.2. Composto 6: il diidroseseliolo (heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol)	70
3.6. Delucidazione delle strutture note dalla <i>Seseli praecox</i> (Gamisans)	80
3.6.1. Bergaptene	80
3.6.2. Imperatorina	83
3.6.3. Phellopterina	86
3.6.4. Psolarene	89
3.6.5. Marmesina	90
3.6.6. Falcarinolo	93
3.6.7. Falcarindiolo	96
3.6.8. Ginsenone J	99
3.6.9. Falcarinone	101
3.6.10. E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol	104
3.7. Risultati biologici sui composti isolati dalla <i>Seseli praecox</i> Gamisans	
(Gamisans)	107
3.7.1. Citotossicità del 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3 hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone	107
3.7.2. Falcarinolo	108
3.7.2.1. Test sui ligandi dei recettori CB	109
3.7.2.2. Interazione di legame del falcarinolo con I recettori CB ₁ and CB ₂	110
3.7.2.3 Il Falcarinolo è un agonista del recettore CB ₁ di tipo selettivo inverso	114
3.7.2.4 Espressione dei recettori CB nei cheratinociti e potente modulazione di IL-8 e chemochine CCL2/MCP-1 da parte del falcarinolo	117
3.7.2.5 Il falcarinolo inverte l'effetto inibitorio di anandamide sull'espressione di chemochine indotta da TNF-alpha.	120

3.7.2.6 Il Falcarinolo aggrava le reazioni di edema nella pelle umana indotte da istamina	121
3.7.2.7 Discussione dei risultati	122
APPENDICE A	133
A1. Il sistema endocannabinoide, generalità	133
A2. Cannabinoidi endogeni	133
A3. Fitocannabinoidi	135
A4. Cannabinoidi sintetici	138
4 GENERE <i>SECURIDACA</i>	144
4.1 Sistematica	144
4.1.1 Introduzione	144
4.1.2 Caratteristiche del genere <i>Securidaca</i>	144
4.2 Fitochimica del genere <i>Securidaca</i>	145
4.2.1 Alcaloidi	146
4.2.1.1Alcaloidi indolici	147
4.2.2 Benzofenoni	148
5 <i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S. F. Blake	158
5.1 Caratteristiche della pianta	158
5.2.1 Luogo di raccolta	161
5.3 Studi fitochimici della <i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S. F. Blake	162
5.4 Risultati fitochimici della <i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S. F. Blake	164
5.5 Estrazione e isolamento	165
5.5.1 Frazionamento dell'estratto diclorometanico (Figura 5.10)	165
5.6Delucidazione delle nuove strutture isolate dalla <i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S. F. Blake	168
5.6.1 Delucidazione del composto 2: 2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone	168
5.6.2 Delucidazione del composto 2: 2,4-diidrossi-3,3'-dimetossi-benzofenone	177

5.6.3 3'-4'-methylenedioxy-2,4-dihidroxy-6-methoxybenzoate	186
5.7 Delucidazione delle strutture note della <i>Securidaca diversifolia</i>	194
5.7.1 Benzil 2-hydroxy-6-methoxybenzoate	194
5.7.2 Benzil 2,6-dimetossibenzoato	198
5.7.3 Isovanillina	201
5.8 Risultati biologici sui composti isolati dalla <i>Securidaca diversifolia</i> (L.) Blake	202
5.8.1 Preliminare screening biologico	202
APPENDICE B	205
B1 Introduzione	205
B.2 Informazioni storiche, geografiche ed antropologiche	205
B.3 Cenni storici	210
B.4 Miti e leggende Popoluca	211
Il Gattino Stregato(Jem Xunujti o El Gatito Encantado)	211
L'albero Ceiba (Ceiba pentandra) (Jem Pixtyin o La Ceiba)	212
Sierra Santa Marta, Los Tuxtlas, il rifugio dei "Rayos" (fulmini)	213
B.5 Etnomedicina	213
B.6 Esempio di cura tradizionale	216
6 MATERIALI E METODI	220
6.1 Metodi di isolamento e tecniche usate nell'isolamento dei composti	220
6.1.1 Percolazione	220
6.1.2 Cromatografia	220
6.1.2.1 Cromatografia su strato sottile (TLC)	221
6.1.2.2 Cromatografia liquida sotto vuoto (VLC)	221
6.1.2.3 Cromatografia a colonna aperta classica (CC)	222
6.1.2.4 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)	224
6.2 Delucidazione dei composti isolati; strumenti impiegati per l'identificazione dei composti	224

6.2.1 La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (RMN), generalità:	225
6.2.1.1 La spettroscopia RMN unidimensionale (1D)	225
6.2.1.2 La spettroscopia RNM bidimensionale (2D)	226
6.2.2 La spettroscopia Infrarossa (IR)	226
6.2.3 La spettroscopia UV:	227
6.2.4 La spettrometria di massa (MS)	227
6.2.5 HPLC-MS Q-TOF Analysis.	228
6.3 Metodi e strumenti per la determinazione dell'attività biologica	229
6.3.1 Linee Cellulari per i test di citotossicità	229
6.3.1.1 Linea cellulare MCF-7	229
6.3.1.2 La linea cellulare Jurkat	231
6.3.1.3 La linea cellulare PC3	232
6.3.1.4 La linea cellulare HL-60	232
6.3.1.5 La linea cellulare HeLa	232
6.3.2.1 Linea virale HSV-1	235
6.3.2.2 Linea virale 1S.	237
6.3.3 Prodotti chimici	239
6.3.4 Receptor screen	240
6.3.5 FACS analysis of CB receptor expression	240
6.3.6 Radioligand displacement assays on CB ₁ and CB ₂ receptors	241
6.3.7 cAMP measurements	242
6.3.8 Measurement of [Ca ²⁺] _i	242
6.3.9 HaCaT keratinocyte cell culture	243
6.3.10 Quantifications of chemokines IL-8 and CCL2/MCP-1	243
6.3.11 Skin prick tests	244
6.3.12 Statistical analysis	244
PUBBLICAZIONE I	250
PUBBLICAZIONE II	293
PUBBLICAZIONE III	305

Indice delle figure

Figura 1.1 Nuove droghe provenienti da prodotti naturali (Newman et al. 2003)	8
Figura 1.2 Interno dell'opera del Mattioli. Immagine tratta dal sito badigit.comune.bologna.it13	
Figura 1.3 Copertina dell'opera di Mattioli. Tratto dal sito della Biblioteca nazionale Centrale di Roma.....	13
Figura 2.1 Distribuzione della <i>Seseli</i> in Italia.....	24
Figura 2.2. Seselirin	25
Figura 2.3 Peucenin-7-methylether	25
Figura 2.4 2-Epideacyllaserine (1) e Laserine (Treo-1-acetoxy-2-angeloioloxo-3',4'-methylendioxy-1-phenilpropan (2).....	26
Figura 2.5 Lignani citotossici isolati dalla <i>Seseli annuum</i> . Eudesmina (1), magnone A (2), hernone (3) e seselidone (4)	27
Figura 2.6 a Coumarine isolate dal Genere <i>Seseli</i>	30
Figura 2.6 b Coumarine isolate dal Genere <i>Seseli</i>	31
Figura 2.7 Furocoumarine angolari isolate dal Genere <i>Seseli</i>	31
Figura 2.8 Furocoumarine lineari isolate dal Genere <i>Seseli</i>	32
Figura 2.9 Alcune piranocoumarine isolate dal Genere <i>Seseli</i>	32
Figura 2.10 Artemisinina	34
Figura 2.11 Alcuni Sesquiterpeni isolati dal Genere <i>Seseli</i>	35
Figura 2.12 Seselidiolo, un poliacetilene isolato dalla <i>Seseli mairei</i>	37
Figura 3.1.Particolari della <i>Seseli praecox</i> (Gamisans) Gamisans.....	44
Figura 3.2. Luogo di raccolta della pianta.(in Blu).....	45
Figura 3.2a Particolare della località la Guglia, Baunei (OG) Sardegna	46
Figura 3.3 Coumarine isolate dalla <i>Seseli praecox</i> (Gamisans) Gamisans: 1. Bergaptene.; 2.	

Marmesina; 3. Phellopterina; 4. Psolarene; 5. Imperatorina	47
Figura 3.4 Strutture dei poliacetileni naturali e loro prodotti di decomposizione (1–6) isolati dalla <i>Seseli praecox</i> (Gamisans) Gamisans	48
Figura 3.5 Composto 7: Struttura del nuovo cromone isolato dalla <i>Seseli praecox</i> (Gamisans) Gamisans: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	49
Figura 3.7 Schema di Frazionamento dell'estratto metanolico.....	53
Figura 3.8 Schema del frazionamento bioguidato	54
Figura 3.9 L'analisi dello spiazzamento del ligando [3H]-CP55,940 dal recettore CB2 dei composti isolati 1-3 (5 µg/ml) e del falcarinolo (20 µM)	56
Figura 3.10 Schema dell'isolamento del Falcarinolo dalla frazione 2 della VLC dell'estratto in DCM.....	57
Figura 3.11 Stabilità del falcarinolo.....	59
Figura 3.12 Correlazioni Cosy (in grassetto) e Roesy del composto 7.....	62
Figura 3.13 Correlazioni HMBC del composto 7.....	62
Figura 3.14 Spettro ¹ HNMR del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	63
Figura 3.15 Spettro ¹³ CNMR del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	64
Figura 3.16 Spettro HSQC del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	65
Figura 3.17 Spettro Cosy del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	66
Figura 3.18 Spettro HMBC del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromon.....	67
Figura 3.19 Spettro Roesy del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	68

Figura 3.20 Spettro di massa con il Q-TOF HRMS del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.	69
Figura 3.21 Alcune correlazioni HMQC del composto 6.	71
Figura 3.22 Spettro ¹ HNMR del composto 6.	72
Figura 3.23 Spettro ¹³ CNMR del composto 6.	73
Figura 3.24 Spettro Cosy del composto 6.	74
Figura 3.25 Espanso dello spettro Cosy del composto 6 (tra 4.5 a 7 ppm).	75
Figura 3.26 Espanso dello spettro Cosy del composto 6 (tra 0.5 a 4 ppm).	76
Figura 3.27 Spettro HSQC del composto 6.	77
Figura 3.28 Spettro HMBC del composto 6.	78
Figura 3.29 Spettro di massa EI del composto 6.	79
Figura 3.30 Spettro ¹ HNMR del Bergaptene.	81
Figura 3.32 Spettro ¹ HNMR dell'Imperatorina.	84
Figura 3.33 Spettro ¹³ CNMR dell'Imperatorina.	85
Figura 3.34 Spettro ¹ HNMR della Phellopterina.	87
Figura 3.35 Spettro ¹³ CNMR della Phellopterina.	88
Figura 3.36 Spettro ¹ HNMR della Marmesina.	91
Figura 3.37 Spettro ¹³ CNMR della Marmesina.	92
Figura 3.37 Spettro ¹ HNMR del Falcarinolo.	94
Figura 3.38 Spettro ¹³ CNMR del Falcarinolo.	95
Figura 3.39 Spettro ¹ HNMR del Falcarindiolo.	97
Figura 3.40 Spettro ¹³ CNMR del Falcarindiolo.	98
Figura 3.41 Spettro ¹ HNMR del Ginsenone J (o (4E,9Z)-1,4,9-heptadecatriene-6-yn-3-ol o 4,5-dihydropanaxynol).	100

Figura 3.42 Spettro ¹ HNMR del Falcarinone.....	102
Figura 3.43 Spettro ¹³ CNMR del Falcarinone.....	103
Figura 3.44 Spettro ¹ HNMR dell' E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol.....	105
Figura 3.45 Spettro ¹³ CNMR dell' E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol.....	106
Figura 3.46 Displacement of selective radioligands from different membrane proteins	110
Figura 3.47 CB receptor binding affinities of falcarinol.....	112
Figura 3.48 20 μM of falcarinol and rimonabant (SR141716) were incubated with CB1 or CB2 receptor membrane preparations for 3 h at 37 °C.....	113
Figura 3.49 Analisi Dixon del falcarinolo.....	114
Figura 3.50 Functional effects in CB1/CB2 receptor transfected CHO and HL60 cell lines..	116
Figura 3.51 Quantification of CB1 and CB2 receptor surface expression in primary human and HaCaT keratinocytes.....	118
Figura3.52 Effect of falcarinol, rimonabant (SR1441716) and anandamide on IL-8 and CCL2/MCP-1 expression in HaCaT keratinocytes (10 ⁶ cells).....	119
Figura 3.53 Falcarinol (10 μM) and rimonabant (10 μM) reverse anandamide-induced blockage of TNF-alpha (50 ng/ml) stimulated IL-8 and CCL2/MCP-1 expression from HaCaT cells (10 ⁶ cells). Falcarindiol (10 μM) had no effect. Data show mean values ± SEM of at least three independent experiments. * <i>p</i> < 0.05.....	120
Figura 3.54 In vivo effects of falcarinol, rimonabant and histamine on induction of oedema in human forearm skin after prick.....	122
Figura A.1 Strutture dell'Anandamide e del 2-Arachidonylglycerol.....	134
Figura A.2 Alcuni dei più importanti cannabinoidi ritrovati nella Cannabis: Cannabidiolo (1), Δ9.THC (2) e cannabinolo (3).....	137
Figura A.3 Struttura del SR 144528.....	137
Figura A.4 Struttura del Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoic acid isobutylamide (1) e Dodeca 2E,4E-dienoic acid isobutylamide (2).....	138
Figura A.5 Stuttura dell'(Struttura dell' E)-β-cariofillene.....	138

Figura A.6 Struttura del Nabilone.....	139
Figura A.7 Strutra del Rimonobant.....	140
Figura A.8 Struttura del Cannabinor.....	140
Figura 4.1 Dehydroelymoclavine e Elymoclavine ed un nuovo alcaloide ergolinico isolati dalla <i>S. longipedunculata</i> (Wrobel et al. 1996).....	149
Figura 4.1a Alcaloidi Harman e Pertolyn isolati dalla <i>S. longipedunculata</i> (Wrobel et al. 1996).....	149
Figura 4.2 Acidi organici isolati dal genere <i>Securidaca</i> (Mahmood et al. 1993).....	150
Figura 4.3 Zuccheri derivati isolati dal genere <i>Securidaca</i> (De Tommasi et al. 1993) (Yang et al. 2001).....	151
Figura 4.4 Xantoni isolati dalla <i>Securidaca longipedunculata</i> (Meyer et al. 2008; Galeffi et al. 1989; Meli Lannang et al. 2006).....	152
Figura 4.5 Xantoni isolati dalla <i>Securidaca inappendiculata</i> (Galeffi et al. 1989; Meyer et al. 2008).....	153
Figura 4.6 Benzofenoni isolati dalla <i>Securidaca inappendiculata</i>	154
Figura 5.1 Immagine della <i>S. diversifolia</i> raccolta.....	158
Figura 5.2 Particolare dei fiori e delle foglie della <i>S. diversifolia</i>	159
Figura 5.3 Distribuzione della <i>Securidaca diversifolia</i>	160
Figura 5.4 Particolare della distribuzione nel Centro America.....	161
Figura 5.5 Sierra de Santa Marta, habitat Popoluca della Sierra. Da Foster (1966).....	162
Figura 5.6 Flavonoidi glicosidici della <i>S. diversifolia</i>	163
Figura 5.8 Struttura dei nuovi benzofenoni isolati dalla <i>Securidaca diversifolia</i> : 1. 2,4- dihydroxy-3-methoxy-benzophenone 2. 2,4-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone; 3. 3',4'-Methyendioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone.....	164
Figura 5.9 Benzofenoni e isovanillina isolati dalla <i>Securidaca diversifolia</i> : 4. Benzyl 2- hydroxy-6-methoxybenzoate; 5. Benzil 2,6-dimetossibenzoato; 6. Isovanillina.....	165

Fig. 5.10 Schema di isolamento dell'estratto Diclorometanico.....	167
Figura 5.11 ¹ HNMR del composto1 in CHCl ₃	171
Figura 5.12 Spettro ¹³ CNMR del composto 1.	172
Figura 5.13 Spettro HSQC del composto 1 e relativo espanso.....	173
Figura 5.14 Spettro HMQC del composto 1 con relativo espanso.....	174
Figura 5.15 Spettro DQF-COSY del composto 1 e relativo espanso.....	175
Figura 5.16 Spettro di massa esatta del composto 1.....	176
Figura 5.17 Alcune delle correlazioni HMBC del composto1.....	176
Figura 5.18 Spettro ¹ HNMR del composto 2 con relativo espanso.	179
Figura 5.19 Spettro ¹³ CNMR del composto 2.	180
Figura 5.20 Spettro HSQC del composto 2.....	181
Figura 5.21 Spettro di massa esatta (Q-TOF MS) del composto 2.....	182
Figura 5.22 Spettro DQF-COSY del composto 2.....	183
Figura 5.23 Spettro HMBC del composto 2e relativo espanso.....	184
Figura 5.24 Alcune correlazioni HMBC del composto 2.	185
Figura 5.25 Spettro ¹ HNMR del composto 3.	188
Figura 5.26 Spettro ¹³ CNMR del composto 3.....	189
Figura 5.27 Spettro HSQC del composto 3.....	190
Figura 5.28 Spettro Cosy del composto 3 e relativo espanso.....	191
Figura 5.29 Spettro HMQC del composto 3.....	192
Figura 5.30 Spettro di massa esatta (Q-TOF MS) del composto 3.....	193
Figura 5.31 Alcune correlazioni HMBC del composto 3.	193
Figura 5.31 Spettro ¹ HNMR del Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate.....	196
Figura 5.32 Spettro ¹³ CNMR del Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate.....	197

Figura 5.32 Spettro ¹ HNMR del Benzil 2,6-dimetossibenzoato	199
Figura 5.33 Spettro ¹³ CNMR del Benzil 2,6-dimetossibenzoato	200
Figura B.1 Tipica capanna popoluca.....	206
Figura B.2 Sierra Santa Marta.....	207
Figura B.3 Habitat dello Xunujti. Vegetazione attorno alle cascate del fiume Huazuntlàn, Soteapan.....	211
Figura B.4 Ceiba pentandra	212
Figura B.5 Rituale di purificazione “limpia” in una caverna presso "Laguna encantada" San Andres Tuxtlas.....	215
Figura B.6 Preparazione del cataplasma per la cura tradizionale dell'erisipela.....	217
Figura 6.1 Rappresentazione schematica dell'apparato per la VLC (da Coll et al 1986).....	222
Figura 6.2 Rappresentazione di una colonna cromatografica (CC) e di un collettore di frazioni (da Pavia et al. 1994).....	223
Figura 6.3 Immagini delle cellule MCF-7. Copyright immagine da altogen.com. Riprodotto con il permesso di Altogen Biosystems.	231
Figura 6.4 Immagini di cellule HeLa viste attraverso la microscopia elettronica a scansione. Tratto da Wikipedia.	234
Figura 6.5 Immagine di cellule HeLa tramite microscopio a contrasto di fase. Tratto da Wikipedia.....	234
Figura 6.6 Micrografia TEM del virus herpes simplex 1.(Tratto da Wikipedia).	236
Figura 6.7 Microfotografia TEM del Poliovirus 1S. (Tratto da Wikipedia).	239
Fig. 1 Overview of the study sites of the eight Campanian articles on medicinal plant use. ..	256
Fig. 3 Medicinal plant species used in Campania, Sardinia and Sicily and their overlap, based on the ethnobotanical publications of the regions.....	266
Fig. 4 Citations of plants in publications on recent medicinal plant use in Campania. In brackets average number of citations per species.....	267

Fig. 5 Number of use citations of the 27 most often documented taxa.....	268
Fig. 6 Importance of use categories based on the 27 most frequently documented taxa.....	269
Fig. 7 Correlation for the 27 most often mentioned taxa between Matthioli's (1568) recommendations and the plant uses in the Campanian literature..	271
Fig. 8 Overall Matthioli effect. Posterior distribution of Matthioli's (1568) influence, along with its mean value and the 95% credible interval showing the average increment of the probability of finding a taxon mentioned for a certain use category indicated before by Matthioli.	272
Fig. 9 Posterior distribution of Matthioli's influence μ for each taxon. Matthioli's influence on each taxon reported by means of box plots (indicating the median as well as the 50 and 95% credible intervals) showing the average increment of the probability of finding the taxa mentioned for a certain use category indicated before by Matthioli.	273
Fig. 10 Posterior distribution of Matthioli's influence μ for each use category (for an explanation of the abbreviations see Table 1).	274
Fig. 1: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone	295
Fig. 2: Marmesin.....	296
Fig. 1. Structures of compounds 1–4.....	310

Indice delle tabelle

Tabella 3.1: Citotossicità del composto 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3 hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone	107
Tabella 5.1 Dati biologici relativi all'attività antivirale dei tre nuovi benzofenoni isolati dalla <i>S. diversifolia</i>	203
Tabella 6.1 Sistematica dei virus Herpes simplex 1 e 2.....	237
Tabella 6.2 Sistematica dei Poliovirus.....	239

PUBBLICAZIONE I

Table 1 Categories from the analys.	284
--	-----

PUBBLICAZIONE II

Table 1: Cytotoxicity of compound 1 against four cancer cell lines (N=3 ± S.D.).	298
--	-----

PUBBLICAZIONE III

Table 1 ¹ H(300MHz) and ¹³ C (75 MHz) NMR data of compound 1-3	308
--	-----

ABBREVIAZIONI:

- ACD Dermatite allergica da contatto
- ACN Aceto nitrile
- ATCC American Type Culture Collection
- BART Bayesian Additive Regression Tree
- BSA
- BMI Index Body Mass
- C Carbon Atom
- CBC Cannabicromene
- CBD Cannabidiol
- CBG Cannabigerolo
- CBN Cannabinol
- CC Column Chromatography
- CDCl₃ Deuterated Chloroform
- CNS Central Nervous Sistem
- d Doublet
- dd Double Doublet
- DCM Dichloromethane
- δ Chemical Shift
- DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfert
- DQF-COSY Double-quantum Filtered Correlation Spectroscopy
- EC Endocannabinoidi
- EtOAc
- eV Elettron volt
- FAAH Fatty Acid Amide Hydrolase
- Fr Fraction
- H Proton
- 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
- mg Milligram

- MCF-7 Michigan Cancer Foundation 7
- MHz Megahertz
- μ l Microliter
- μ M Micromolar
- MS Mass Spectrometry
- NEEA Non Essential Amminoacid
- ppm Part per Million
- ROESY Rotatung Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
- RP Reverse Phase
- s Singolet
- SF Foetal Serum
- sp. Species
- spp. Species (plural)
- ssp. Subspecies
- SPE Solid Phase Extraction
- TLC Thin Layer Chromatography
- TNF Tumoral Necrosis Factor
- VLC Vacuum Liquid Chromatograpie

SUMMARY

It has been suggested, that the evaluation of drugs and diets described in ancient texts as well as those used by indigenous populations with modern biomedical methods and targets could be a promising approach for the discovery of new drugs and biochemical tools. Following this working hypothesis in this PhD thesis we focused on Dioscorides' *De Materia Medica* as well as on the ethnopharmacopoeia of the Popoluca, who are descendents of the Olmecs and live in the state of Veracruz (Mexico). In a preliminary screening at the beginning of this project the extract of *Seseli praecox* has shown interactions with the cannabinoid (CB) receptor *in vitro*. The genus *Seseli* is cited various times in Matthioli's translation of the *De Materia Medica* (1568) where the indication against dysuria, respiration problems and chronic cough are mentioned. The isolation of the secondary metabolites was conducted with the help of chromatographic techniques such as VLC, CC, HPLC, SPE, while the structure elucidation of the pure compounds was achieved by the studying of mono- (^1H , ^{13}C) and bidimensional (ROESY, COSY, HMBC, HSQC) NMR spectra as well as with the help of Q-TOF HRMS and UV spectroscopy. The phytochemical study of *S. praecox* (Apiaceae), an endemic species from Sardinia, led to the isolation and characterization of one new chromone and one new polyacteylene. 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone showed interesting cytotoxic properties against Jukat T and HL60 cancer cell lines. The new polyacteylene was identified as heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol (dihydrosesolidio). Moreover, previously isolated compounds like linear furocoumarins (psoralene, phellopterina, imperatorina, bergaptene, marmesina) and polyacteylenes such as falcarinol and falcarindiol were obtained. We found that falcarinol, well-known for its allergenic, cytotoxic, antifungal as well as antibacterial properties showed antagonistic CB_1 receptor binding affinity *in vitro*, while it aggravates histamine induced oedema formation in skin. In order to better understand the proallergenic role of falcarinol we also studied its degradation products (4,5-dihydrofalcarinolo (ginsenoyne J), falcarinone e l'*E*-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diolo). We conclude that falcarinol acts as a proallergenic agent in skin via its antagonistic affinity towards CB_1 receptors thereby preventing the constitutive antiinflammatory action of anandamide.

In a second study focussing on the farmacopoeia of the Popoluca our attention fell upon a species showing antiviral activity *in vitro*: *Securidaca diversifolia* (Polygalaceae). The Popoluca use in fact a maceration of the root bark for the

SUMMARY

treatment of fevers, including measles and to a minor extent also against diarrhoea. From this species we obtained three new benzophenones (2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone, 2,4-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone, benzophenone 3',4'-methylendioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone). The first two showed moderate inhibitory activity against *Herpes simplex* virus type 1 *in vitro*. Moreover, previously isolated compounds such as benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate, benzyl 2,6-dimethoxybenzoate and isovanilline were obtained.

SOMMARIO

Viene considerato che la valutazione dei farmaci e delle diete descritte in testi antichi, così come quelle utilizzate da popoli indigeni con metodi moderni biomedici e target biochimici potrebbe essere un approccio promettente per la scoperta di nuovi farmaci e agenti biochimici.

Partendo da questa ipotesi di lavoro in questi anni di dottorato si è investigato sulla *De Materia Medica* di Dioscoride e sulla etnofarmacopea dei Popoluca, discendenti degli Olmechi, ubicati nello stato messicano di Veracruz.

In uno screening preliminare, base di questo progetto, l'estratto della *Seseli praecox* ha mostrato interazione con il recettore cannabinoide (CB) *in vitro*. Il genere *Seseli* è stato citato varie volte nella traduzione della *De Materia Medica* di Matthioli (1568), indicandola per il trattamento della disuria, nel respiro affannoso e contro la tosse cronica.

L'isolamento dei metaboliti secondari è stato effettuato mediante tecniche cromatografiche quali VLC, CC, HPLC, SPE mentre la delucidazione dei composti isolati è stata determinata attraverso lo studio degli spettri NMR mono (^1H , ^{13}C) e bidimensionali (ROESY, COSY, HMBC, HSQC), di massa esatta Q-TOF HRMS e attraverso la spettroscopia UV.

Lo studio fitochimico della *S. praecox* (appartenente alla famiglia delle Apiaceae) una specie endemica sarda, ha portato all'ottenimento di un nuovo cromone e di un nuovo poliacetilene. Il 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone, ha dimostrato possedere interessanti proprietà citotossiche verso le linee tumorali Jurkat T e HL60. Il nuovo poliacetilene è stato delucidato come l'heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol (dihydroseselidio). Inoltre abbiamo isolato composti già noti come furocumarine lineari (psoralene, phellopterina, imperatorina, bergaptene, marmesina) e i poliacetileni falcarinolo e falcarindiolo. Abbiamo trovato che il falcarinolo, conosciuto per le sue proprietà allergeniche, citotossiche, antifunginee e antibatteriche, mostra attività di binding recettoriale verso i recettori CB₁ *in vitro* (come antagonista), mentre *in vivo* aggrava la formazione di edema nella pelle indotta dall'istamina.

Per meglio capire il ruolo proallergenico del falcarinolo abbiamo studiato anche i prodotti di degradazione (4,5-dihydrofalcarinolo (ginsenoyne J), falcarinone e l'E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diolo). Concludiamo che il falcarinolo agisce come proallergenico nella pelle attraverso una sua azione antagonista verso i

recettori CB₁ impedendo che l'anandamide eserciti la sua costitutiva proprietà antinfiammatoria.

In un secondo lavoro, che riguarda la farmacopea dei Popoluca, la nostra attenzione si è rivolta ad una specie che, in uno studio preliminare, aveva mostrato attività antivirale *in vitro*: la *Securidaca diversifolia* (appartenente alla famiglia delle Polygalaceae). Infatti i Popoluca utilizzano il macerato della corteccia radicale per curare le malattie febbrili, incluso il morbillo e in misura minore, la diarrea.

Da questa specie abbiamo isolato tre nuovi benzofenoni (2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone, 2,4-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone, benzophenone 3',4'-methylenedioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone). I primi 2 hanno mostrato di possedere una moderata attività di inibizione verso l' Herpes simplex virus di tipo 1, *in vitro*. Sono stati inoltre isolati i composti noti benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate, benzyl 2,6-dimethoxybenzoate e l'isovanillina.

1 Introduzione

1.1. Le piante come risorse di agenti medicinali

Il regno vegetale costituisce da sempre una fonte inesauribile di risorse, da cui, nel corso dei secoli, l'uomo ha potuto attingere per soddisfare necessità di vario ordine, in molteplici campi di applicazione: necessità che, dai primordi ai giorni nostri, sono divenute più numerose e variegata e la cui importanza sempre più spesso non risulta strettamente attinente ai fini della sopravvivenza.

Attraverso i secoli, le piante hanno provveduto a soddisfare i bisogni fondamentali della specie umana: a partire dal cibo, per passare ai materiali da costruzione, ai tessuti per la fabbricazione degli indumenti, fino ad arrivare agli agenti medicinali per la cura delle malattie.

Le virtù medicamentose di molte erbe erano già note agli uomini dell'età della pietra e del bronzo, seppur in modo superficiale; di ciò si ha conferma dai molteplici ritrovamenti di piante, frutti e semi medicinali avvenuti in diverse grotte, caverne e palafitte sparse in vari siti archeologici del pianeta.

Le piante che oggi vengono utilizzate in campo terapeutico, in tutto il mondo, sono circa 13000 (Tyler 1993); quelle utilizzate nei paesi industrializzati, ivi compreso il Giappone, sono circa 1200, mentre quelle utilizzate nei paesi europei e negli USA sono molto di meno. Questo lascia intendere che l'impiego delle piante medicinali assume un'importanza diversa nelle varie parti del mondo (Capasso et al. 2006).

Nei paesi in cui si pratica prevalentemente la medicina tradizionale (Africa, Sud America e Asia) le piante medicinali costituiscono la base di ogni terapia (il 96% del bagaglio terapeutico della medicina africana, l'80% circa della medicina indiana, il 90% circa di quella cinese, praticata in tutto l'estremo oriente) (Capasso et al. 2006).

Nei paesi in cui si pratica la medicina scientifica (Europa, USA, Canada, Giappone, Australia), l'impiego delle piante medicinali è invece limitato alle malattie croniche.

Esistono comunque paesi nei quali si pratica una medicina tradizionale regolamentata (India, Cina, Giappone) e paesi, viceversa, dove si pratica una medicina tradizionale non regolamentata (Africa). Nel primo caso la medicina popolare non è completamente empirica, perché si basa su conoscenze mediche che provengono da osservazioni secolari e da studi sperimentali e clinici (Capasso et al. 2006). Le piante utilizzate in questi paesi sono tutte riportate nelle rispettive Farmacopee, dove, oltre alla descrizione delle piante è riportato l'uso terapeutico, il dosaggio e la preparazione. Nel secondo caso (Africa) la medicina popolare è quasi completamente empirica, perché si basa su conoscenze che si tramandano di padre in

figlio. Questa medicina viene praticata dai guaritori. Inoltre le piante utilizzate non sono riportate in alcun testo ufficiale (Capasso et al. 2006).

Si calcola che le piante sono state la principale fonte di farmaci per almeno l'80% della popolazione mondiale (Cordell et al. 1995).

Dopo l'uso empirico delle preparazioni medicinali a base di erbe, all'inizio del 19° secolo, prendono forma degli studi su estratti derivati da piante. Il rapido sviluppo scientifico, le importanti scoperte tecnologiche, fra le quali l'energia elettrica, il miglioramento di tutte le tecniche estrattive e l'affermazione della chimica pura che si ebbero dal XVI al XVIII secolo sfociarono, nel 1803, nel raggiungimento del traguardo perseguito per secoli dagli scienziati di mezzo mondo: l'ottenimento del primo principio attivo in forma pura. Proprio nel 1805 Sertürner (1783–1841 d.c.), un farmacista tedesco, isolò la morfina dall'oppio (nel 1817 pubblicò la sua celebre opera: *Über das Morphium, eine neue salzfähige Grundlage und die Mekonsäure, als Hauptbestandteile des Opiums*) (Huxtable et al. 2001).

Sull'onda di questo entusiasmo tendente all'esaltazione delle qualità delle molecole in forma pura, si assistette ad una progressiva riduzione dell'impiego in terapia delle piante tali e quali (in forma di droga) e dei loro semplici derivati estrattivi.

Iniziò a partire da questa data, e continuerà fino al 1980 circa, la tendenza che vedrà progressivamente decrescere il numero e la varietà terapeutica delle preparazioni farmaceutiche contenenti droghe vegetali, le quali, in questo periodo di tempo, verranno per lo più utilizzate come materiale di partenza per l'ottenimento delle molecole pure.

Oggi 119 molecole, incluse diosgenina, digossina, atropina, codeina, pilocarpina, isolate da circa 90 specie diverse di piante, costituiscono il 25% dei farmaci utilizzati in clinica (Dowiejua et al. 1993).

Non tutte le piante sono state una fonte diretta di sostanze farmacologicamente attive, ma molte strutture sono servite come modello per molecole di sintesi o emi-sintesi. In questo modo, gli alcaloidi della belladonna, fisostigmina, quinina, oppiacei, papaverina e acido salicilico sono stati usati come modello e per sintesi totale, rispettivamente di farmaci anticolinergici, anticolinesterasi, antimalarici, benzocaina, metadone, verapamil e aspirina.

Altro ottimo esempio è la Khellin, un furanocromone a basso peso molecolare che è il principio attivo della *Ammi visnaga*. Khellin ha fornito le basi per programmi chimici che hanno portato a due importanti medicine, l'antiasmatico sodium chromoglycate e l'antiaritmico amiedarone (O'Neil et al. 1993).

Oggi le maggiori aree di interesse verso le quali si è concentrato l'isolamento e lo studio di molecole bioattive, riguardano gli antitumorali, anti AIDS e le malattie cardiovascolari. Nel periodo compreso tra il 1960 e il 1986, il programma del NCI (National Cancer Institute), ha studiato oltre 35000 piante per l'attività antitumorale ed il processo di acquisizione consta di circa 20000 specie tropicali (Hamburger et al. 1991, Cordell et al. 1993 a).

Oggigiorno sono più di 100 i farmaci che derivano da estratti di piante superiori, utilizzati a livello mondiale nel settore della medicina allopatica. Circa il 74% di queste molecole sono state scoperte dai chimici attraverso studi per l'identificazione di sostanze a partire dalle piante medicinali e prodotte a partire da circa 90 specie di piante superiori. Dal momento che esistono almeno 250.000 specie di piante superiori sulla terra, è presumibile che ancora oggi molte nuove droghe utili ai fini terapeutici si possano trovare nel regno vegetale.

Farnsworth, 1990). Nonostante l'aumento della chimica combinatoria come parte integrante del processo di scoperta principale di nuove droghe, i prodotti naturali giocano ancora un ruolo importante, come materiale di partenza per la sintesi di nuove molecole e farmaci (Feher et al. 2003).

Newman et al. (2003) in uno studio svolto dal 1981 al 2002 hanno descritto il contributo delle molecole con diversa provenienza nello sviluppo di nuove droghe e farmaci. Delle 974 nuove molecole prese in esame, il 63% erano di derivazione naturale o semi-sintetica (Figura 1.1). Le droghe antimicrobiche, le antitumorali, le antiipertensive e le antiinfiammatorie sono le più numerose e trovano applicazione in molti ambiti terapeutici (Newman et al. 2007; Newman 2008).

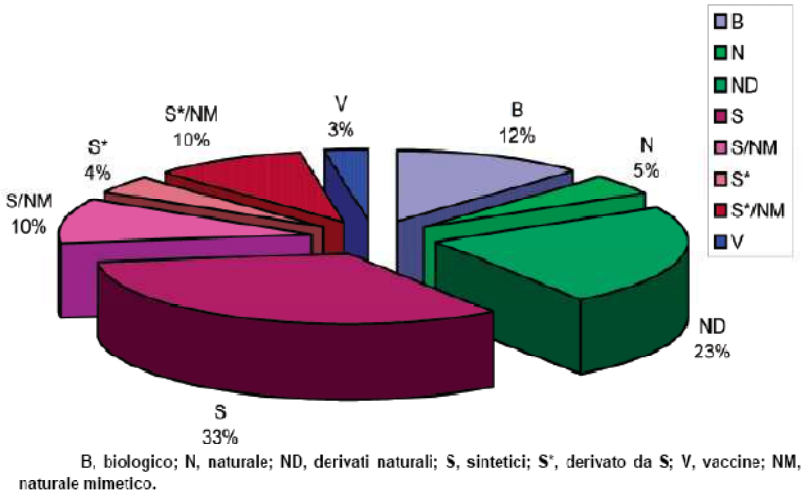


Figura 1.1 Nuove droghe provenienti da prodotti naturali (Newman et al. 2003)

Sebbene la medicina tradizionale dei paesi industrializzati si basi su farmaci di sintesi, in varie regioni del mondo la maggior parte della popolazione si basa per la cura delle malattie su medicine tradizionali, principalmente a base di piante medicinali (WHO 2003).

1.2. Breve storia delle farmacopee

Sulla base del discorso appena affrontato è logico dedurre che sin dai primordi della sua storia l'uomo ha usato le piante per la cura delle patologie da cui veniva affetto. Da qui l'esigenza di catalogare le proprietà delle piante e valutare effettivamente le loro potenzialità.

Le più antiche informazioni originano dai Sumeri e dagli Akkadi (Samuelsson . 1992). I Sumeri usavano un ideogramma tradotto come hul, che significa gioia e tripudio, per rappresentare l'oppio, che era usato come anestetico e narcotico (Blakemore 1988).

Il più importante scritto indiano di fitoterapia è il *Susruta* (1300 a.c.). Il Samhita Sushruta è un testo sanscrito redatto su tutti i principali concetti della medicina ayurvedica con capitoli innovativi sulla chirurgia, attribuita a Sushruta; in esso sono riportate nientedimeno che 798 droghe medicinali; ciò a conferma della grande

conoscenza e della ricchezza che gli indiani avevano già in passato nel settore delle erbe medicinali e delle spezie (Dwivedi et al. 2007).

La medicina indiana (in sanscrito: *Ayurveda*), fin dai tempi più remoti ha impiegato, quali rimedi terapeutici, molte piante: lo zenzero, considerato una panacea per tutti i mali, l'elleboro nero, usato come purgante e come calmante, la radice della *Rauwolfia serpentina*, fonte del primo tranquillante-sedativo della storia (reserpina), la genziana come rinvigorente, ed altre ancora come la noce vomica, il cardamomo e la canapa.

Tuttavia, i più antichi documenti scritti relativi all'uso e alle proprietà dei medicinali e dei veleni appartengono alla civiltà cinese: tra questi è assai noto l'*Erbario di Shên Nung* (circa 2700 a. C.), che annovera 360 droghe. Altri importanti documenti sono i papiri egiziani di *Ebers* e di *Smith* (ca. 1600 a. C.) che descrivono 160 droghe e piante medicamentose tra cui l'oppio, il giusquiamo e il ricino.

Molto importanti sono anche le tavolette della civiltà assiro-babilonese (1000-800 a. C.), che elencano oltre 800 droghe medicinali; infatti alcune tavolette cuneiformi prodotte da queste civiltà, tra cui quella di Assurbanipal, menzionano l'uso di piante medicinali tra cui: la canapa indiana, la coloquintide, l'oppio, la cassia, ecc.

La stessa Bibbia ci tramanda l'uso, da parte degli ebrei, di alcune piante, come l'issopo e il cedro, per curare le malattie.

Gli egizi conoscevano più di 700 forme di medicinali, di natura sia vegetale che animale.

I Greci ereditarono l'arte della medicina dai Persiani e dagli Egizi; infatti, il primo trattato sistematico di botanica farmaceutica, *De historia plantarum*, è del periodo greco e fu scritto da Teofrasto. Un testo di difficile lettura, in quanto i nomi delle 500 piante sono completamente diversi dagli attuali, anche se si basano sul tipo di fusto e sulla possibilità di coltivare o meno la specie vegetale. Un celebre medico dell'antichità greca fu Ippocrate di Cos (460-377 circa a. C.), un medico greco di fondamentale importanza, fu il primo a utilizzare la fitoterapia in maniera razionale, con i suoi aforismi, le sue ricette, i suoi metodi di dosaggio e le sue diete, influenzò il mondo romano e parte di quello medievale. Fu lui a classificare per la prima volta in modo organico 300 specie di piante medicinali.

In seguito arrivarono i Romani, che furono fortemente influenzati dalla cultura e dal sapere Greco. In quest'ambiente si colloca il lavoro che ha maggiormente determinato la forma e la struttura delle moderne Farmacopee, quest'opera è certamente il *De Materia Medica* di Pedanio Dioscoride (40-90 D.C.), fisico greco appartenente all'esercito romano (Leonti et al. 2010).

Il *De Materia Medica* è un trattato di medicina e botanica che contiene circa 1000 agenti farmaceutici naturali per 4740 applicazioni terapeutiche diverse; per 1600 anni è stato considerato un testo molto importante ed utilizzato, che ha dato ispirazione a molti altri testi successivi. Non sono molte le notizie riguardanti il medico Dioscoride, che fu il primo ad usare la parola "botanike" nei suoi scritti. Sicuramente egli proveniva da Anazarbos vicino a Taros, la capitale della Cilicia (oggi Turchia). Studiò probabilmente nelle città di Taros ed Alessandria. Viene definito medico militare nelle legioni di Nerone.

Nel prologo dell'opera è presente la dedica ad Areios (amico e collega di Dioscoride) l'autore dichiara semplicemente che la sua partecipazione a campagne militari è ben nota. Certo è che egli dovette viaggiare molto perché conosceva direttamente molto bene le piante ed i preparati utilizzati in Asia Minore, in Egitto, Grecia e Italia.

In questo egli si differenzia chiaramente da altri autori del suo tempo, come Plinio il Vecchio, che si dedicarono a un mero classificare e ordinare scritti e conoscenze altrui, pubblicando le così dette compilazioni.

A differenza dei suoi predecessori, Dioscoride ordinò la sua opera sistematicamente secondo la provenienza delle piante, degli animali e dei minerali e secondo il loro effetto, non dunque in ordine alfabetico. Come già Aristotele e il suo discepolo Teofrasto circa 300 anni prima, Dioscoride preferì la descrizione minuziosa delle piante alle illustrazioni, cercando di evitare così incertezze nel riconoscimento, ad esempio quelle possibili nei vari stadi di sviluppo (Tratto da Wikipedia).

Una delle più antiche e belle copie del manoscritto di Dioscoride, è certamente il Codice Bizantino Juliana Anicia (circa 512 D.C.), noto anche come Dioscoride di Vienna dove è conservato con firma «Ms.Med.gr.I» e in origine preparato come regalo per la figlia dell'Imperatore Romano d'occidente, Clavius Anicius Olybrius (Arber 1938, Riddle 1985). Il testo consta di circa 400 miniature ed espone oltre 600 tipi di piante.

Gli erboristi e i fisici di tutto il mondo hanno disegnato e preso ispirazione dalle tavole e dagli insegnamenti contenuti nel *De Materia Medica*, questo sta significare la grande importanza che, in passato, ha rivestito questo trattato (Madaus 1938; Mann 1984; Riddle 1985).

Un erbario di origine greca, comparabile al lavoro di Dioscoride e che addirittura lo ha copiato in modo estensivo, è certamente il *De simplicium medicamentorum facultatibus, libri XI*, scritto da Claudio Galeno (circa 131-201 D.C.; Mann 1984). Nel 15° secolo la stampa e la diffusione dei libri incontra un boom, questo non solo

per i testi di origine sacro-religiosa, ma anche e soprattutto per gli erbari, che diventano dei veri e propri best sellers dell'epoca (Madaus 1938; Mann 1984; Adams et al. 2009).

La nascita della stampa in Germania, innesca una nuova coscienza botanica, che si manifesta in Italia e anche in altre nazioni europee, si diffondono così, attraverso l'uso della stampa molti testi a carattere botanico. Per esempio il manoscritto *Antidotarium Nicolai*, scritto durante il 13° secolo presso la Scuola di Salerno, viene stampato per la prima volta a Venezia nel 1471, ad opera di Nikolaus Jenson (1420-1480), questo manuale è stato considerato come la prima guida per la composizione dei medicinali (Goltz 1976).

Il *Ricettario Fiorentino*, stampato nel 1498, viene generalmente visto come la prima farmacopea ufficiale (Corradi 1887). Molti altri testi a carattere botanico videro la luce a cavallo tra il 15° e il 16° secolo. Il *De Materia Medica* di Dioscoride, vide per la prima volta la stampa in latino nel 1478 e nel 1499 in Grecia, ad opera dello stesso tipografo Aldus Manuntius (1449-1515, Venezia) (Arber 1938).

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 dal greco del *De Materia Medica* di Dioscoride, 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 annotazioni, 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 (Tratto da Wikipedia).

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 (Tratto da Wikipedia).

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 (Tratto da Wikipedia).

Secondo Osbaldeston (2000), Mattioli, nei suoi commentari del *De Materia Medica* prende spunto dall'opera Codice Bizantino Juliana Anicia (Leonti et al. 2010).

I *Discorsi* del Mattioli riscossero un grande successo fra gli addetti ai lavori dell'epoca, per questo motivo l'opera subì diverse ristampe sino al 1563 vendendo 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 Andreàs 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* (Leonti et al. 2010).

Sulla scia di questa nuova ventata 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 (Przybylo 2001).



Figura 1.2 Interno dell'opera del Mattioli. Immagine tratta dal sito badigit.comune.bologna.it



Figura 1.3 Copertina dell'opera di Mattioli. Tratto dal sito della Biblioteca nazionale Centrale di Roma.

1.3. Varie strategie nella ricerca di molecole con attività biologica

Si stima che sulla terra siano presenti dalle 250000 alle 500000 piante superiori, che vanno ad aggiungersi alle restanti, per un totale di circa 30 milioni di specie in totale (Waterman 1993).

Il contributo per la scoperta delle droghe fatta da farmacologi, in collaborazione con botanici, chimici e gli antropologi nel loro tentativo di cercare di comprendere le basi farmacologiche delle piante culturalmente importanti ha una ricca storia (Lewin, 1973; Bruneton, 1995;. Heinrich et al, 2004; McClatchey et al, 2009;. Gertsch, 2009).

In generale si ritiene che negli ultimi 20-30 anni non sono stati sviluppati nuovi farmaci da leads etnobotanici (McClatchey, 2005) e che sono difficilmente prevedibili risultati importanti perché " le cose più semplici e/o evidenti sono già state scoperte" (Gertsch, 2009).

Questo non è tuttavia del tutto vero, poiché l'alcaloide galanthamina, isolato per la prima volta dal *Galanthus spp.* (Amaryllidaceae) è stato lanciato come trattamento della malattia di Alzheimer nel 1996 sotto il nome di Nivalin® (Heinrich et al. 2004). A quanto pare, nel 1960 è stato osservato che tra le montagne del Caucaso un decotto dei bulbi di *Galanthus woroncwii* Los (caucasica bucanave) è stato somministrato a bambini affetti da poliomielite. I successivi studi fitochimici e farmacologici sono stati condotti in Bulgaria e nell' URSS durante il periodo della guerra fredda (Heinrich et al. 2004).

E' vero tuttavia, che l'obiettivo della ricerca degli etnofarmacologi e di alcuni etnobotanici, è quello di comprendere le basi molecolari e la validazione delle etnofarmacopee e delle specie vegetali per le loro proprietà medicinali e tossicologiche (Rivier e t al. 1979; Heinrich 2003; Gertsch, 2009).

Viene considerato che la valutazione dei farmaci e delle diete descritte in testi antichi, così come quelle utilizzate da popoli indigeni con metodi moderni biomedici e target biochimici potrebbe essere un approccio promettente per la scoperta di nuovi farmaci e agenti biochimici.(Holland, 1994;. Rollinger et al, 2004 ; Ichikawa et al, 2007;. Appendino et al, 2009;. Adams et al, 2011).

La chimica farmaceutica relativa ai prodotti naturali ha spostato anche la sua attenzione verso risorse biologiche provenienti dagli ecosistemi marini parecchio tempo fa (Cox, 2000). Entità chimiche derivanti da specie marine hanno evidenziato attività biologiche e, rispetto ai metaboliti secondari isolati dai

vegetali, sono risultate più complesse offrendo diversi scaffolds (Verdine, 1996; Proksch et al, 2003; Blunt et al, 2010). Sono generalmente riconosciuti cinque diversi approcci per la scelta delle piante che possono contenere nuovi agenti biologici:

- i) Nell'*approccio random locale* tutte le specie disponibili in un particolare sito o siti, vengono raccolte indipendentemente da una precedente conoscenza sugli usi di una determinata pianta. Un'approccio di tipo random consente di raccogliere ciecamente ogni specie vegetale incontrata, senza nessun tipo di criterio; questo genere di approccio non si presenta molto pratico (Soejarto 1993).
- ii) Nel *percorso etnobotanico* le credenze popolari forniscono informazioni orali o scritte sugli usi medicinali indigeni di quella pianta che, viene raccolta sulla base di queste informazioni. Questo approccio per la selezione delle piante, basato sulla cultura popolare è da ritenersi valido, specialmente per quelle società dove la medicina tradizionale rappresenta la maggior parte delle forme medicinali presenti, come ad esempio per il sistema medicinale Cinese o per l'Ayurveda.
- iii) Nell'*approccio tassonomico* vengono considerate delle famiglie o dei generi di piante considerate interessanti dal punto di vista fitochimico; le piante vengono cercate e raccolte in diversi territori.
- iv) Nell'*approccio chemiotassonomico* (o *fitochimico*) Una determinata famiglia di composti (ad esempio alcaloidi isoquinolinici) viene scelta per l'investigazione. In questo approccio, differenti tipi di piante, vengono raccolte, sulla base di una precedente conoscenza della presenza di quella determinata famiglia di composti, non riveste particolare importanza l'uso nella medicina popolare. Se la distribuzione dei metaboliti secondari non è casuale, questo approccio fornisce un aiuto validissimo sulle informazioni chemio tassonomiche relative alle differenti classi di composti delle differenti specie di piante (Waterman 1993).
- v) Nel quinto tipo di approccio, detto *approccio gestito dalle informazioni*, le informazioni di tipo etnomedicale, biologico e chimico, vengono raccolte in databases computerizzati, come NAPRALERT (Natural Products Alert), CA (Chemical Abstract) o

BA (Biological Abstract), questi dati sono sviluppati in modo da poter avere una collezione di specifiche liste di piante (Cordell et al 1993a).

Esiste anche un sesto tipo di approccio, non di tipo sistematico, ma basato sulla *fortuna*, le piante vengono collezionate o per l'uso etnomedicale o per una determinata proprietà e poi si scopre che ne possiedono un'altra attività molto più forte e più importante. Un caso famoso di fortuna è quello degli alcaloidi del *Catharantus*, che trovavano uso come antidiabetico, successivamente, si sono scoperte le loro proprietà antileucemiche che oggi vengono ampiamente sfruttate. Un'altro caso riguarda i ginkolidi e l'acido betulinico che forniscono degli esempi interessanti di questo tipo di approccio.

BIBLIOGRAFIA (Capitolo 1)

Adams M., Althera W., Kessler M., Kluge M., Hamburger M., (2011). Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*. In press. doi:10.1016/j.jep.2010.10.060.

Adams M., Berset C., Kessler M., Hamburger M., (2009). Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 121; pp. 343–359.

Appendino G., Pollastro F., Verotta L., Ballero M., Romano A., Wyrembek P., Szczuraszek K., Mozrzyms J. W., Tagliatalata-Scafati O., (2009). Polyacetylenes from sardinian *Oenanthe fistulosa*: a molecular clue to risus sardonius. *Journal of Natural Products* vol. 72; pp. 962–965.

Arber A., (1953) (1938). *Herbals, their origin and evolution. A chapter in the history of botany 1470–1670*. Reprinted 1953, Cambridge University Press, Cambridge; pp. 272.

Blakemore C., (1988). *The Mind Machine*, BBC Books, London.

Blunt JW., Copp BR., Munro MH., Northcote PT., Prinsep MR., (2010). Marine natural products. *Natural Products Report* vol. 27; pp. 165–237.

Bruneton J., (1995). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Limited. Andover, England, UK.

Capasso F., Grandolini G., Izzo AA., (2006). *Fitoterapia impiego razionale delle droghe vegetali*. Springer-Verlag Italia; pp. 19-21.

Cordell GA., Kinghorn AD., Pezzuto JM., (1993a) *Bioactive Natural Products. Detention, Isolation and Structural Determination (SM. Colegate, RJ.Molyneux, Eds.)*, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo; pp. 195-220.

Corradi A., (1966) (1887). *Le prime farmacopee Italiane ed in particolare dei ricettari fiorentini*. Fratelli Rechiedei Editori, Milano. Reprinted 1966 by Ferro Edizioni S.p.A., Milano.

Cox PA., (2000). Will tribal knowledge survive the millennium? *Science* vol. 287; pp. 44–45.

Duwiejua M., Zeitlin IJ., Waterman PG., Chapman J., Mhango GJ., Provan GJ., (1993). Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. *Planta Med.* vol. 59 No. 1; pp. 12-16.

Dwivedi G., Dwivedi S., (2007). *History of Medicine: Sushruta—the Clinician–Teacher par Excellence*. National Informatics Centre (Government of India).

Farnsworth NR., (1990). The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba Found Symp.* vol. 154; pp. 2-11. Discussion 11-21. Review.

Feher M., Schmidt JM., (2003). "Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry". *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* vol. 43; pp. 218.

Font Quer P., (1999). *Plantas medicinales. El Dioscorides renovado*. Ediciones Peninsula, 9th edition 2008 Barcelona.

Gertsch J., (2009). How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 122; pp. 177–183.

Goltz D., (1976). *Mittelalterliche Pharmazie und Medizin. Dargestellt an Geschichte und Inhalt des Antidotarium Nicolai*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart.

Hamburger M., Hostettman K., (1991). Bioactivity in plants. The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* vol. 30; pp. 3864-3874.

Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson EM., (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, London.

Heinrich M., Teoh HL., (2004). Galanthamine from snowdrop - The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 92; pp. 147–162.

Heinrich M. (2003). Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Curr.Top Med. Chem.* vol. 3 No. 2; pp. 141-54. Review.

Holland BK., (1994). Prospecting for drugs in ancient texts. *Nature* vol. 369; pp. 702.

Huxtable RJ., Schwarz SKW., (2001). The Isolation of Morphine—First Principles in Science and Ethics. *Molecular interventions* vol. 4; pp. 189-191.

Ichikawa H., Nakamura Y., Kashiwada Y., Aggarwal BB., (2007). Anticancer Drugs Designed by Mother Nature: Ancient Drugs but Modern Targets. *Current Pharmaceutical Design* vol. 13; pp. 3400–3416.

Leonti M., Cabras S., Caroline S., Weckerle CS., Solinas MN., Casu L., (2010). The causal dependence of present plant knowledge on herbals—Contemporary medicinal plant use in Campania (Italy) compared to Matthioli (1568). *Journal of Ethnopharmacology* vol. 130; pp. 379–391.

Lewin L., (1973). *Phantastica. Die Betäubenden und erregenden Genussmittel. Für Ärzte und Nichtärzte.* (Reproduction of the edition by Georg Stilke, Berlin 1927). Gerstenberg, Hildesheim.

Madaus G., (1987) (1938). *Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Band 1.* Reprint of the Leipzig edition by Georg Thieme from 1938. Mediamed Verlag, Ravensburg; pp. 52.

Mann RD., (1984). *Modern drug use: An Enquiry on Historical Principles.* MTP Press Limited, Lancaster; pp. 112, 184.

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

McClatchey WC., (2005a). Medicinal Bioprospecting and Ethnobotany Research. *Ethnobotany Research and Applications* vol. 3; pp. 189–190.

McClatchey WC., (2005b). Exorcizing misleading terms from ethnobotany. *Ethnobotany Research and Application* vol. 3; pp. 1–4.

McClatchey WC., Mahady GB., Bennett BC., Shiels L., Savo V., (2009). Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. *Pharmacology & Therapeutics* vol. 123; pp. 239–254.

Newman DJ., Cragg G., (2007). "Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years". *J. Nat. Prod.* vol. 70; pp. 461

Newman DJ., (2008). Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J. Med. Chem.* vol. 51 No. 9; pp. 2589-2599.

Newman DJ, Cragg GM., Snader KM., (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* vol. 66 No. 7; pp. 1022-1037. Review.

O'Neil MJ., Lewis JA., (1993). *Human Medicinal Agents from Plants* (A.D. Kinghorn, M.F. Balandrin Eds.), American Chemical Society, Washington; pp 48-55.

Osbaldeston TA., (2000). *Dioscorides De Materia Medica—Five Books in One Volume: New Modern English Translation*. Ibis Press, Johannesburg.

Proksch P., Ebel R., Edrada RA., Wray V., Steube K., (2003). Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* vol. 37; pp. 117–142.

Przybylo M., (200/2001). "Dioskurides, de materia medica", Seminararbeit im Rahmen der Werkstoffkundevorlesung (Studiengang/Lehrstuhl Restaurierung, Kunsttechnologie und Konservierungswissenschaft), Technische Universität, München.

Riddle JM., (1985). *Dioscorides on Pharmacy and Medicine*. University of Texas Press, Austin.

Rivier L., Bruhn J., (1979). "Editorial." *Journal of Ethnopharmacology* vol. 1 No. 1.

Rollinger J., Haupt S., Stuppner H., Langer T., (2004). Combining Ethnopharmacology and Virtual Screening for Lead Structure Discovery: COX-Inhibitors as Application Example. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* vol. 44; pp. 480–488.

Samuelsson G., (1992). *Drug of Natural Origin, a Textbook of Pharmacognosy*. Svedish Pharmaceutical Press. Stockholm; pp.11.

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

Soejarto DD., (1993). *Human Medicinal Agents from Plants* (A.D. Kinghorn, M.F. Balandrin Eds.), American Chemical Society, Washington; pp 96-111.

Tyler VE., (1993). *Human Medicinal Agents from Plants* (A.D. Kinghorn, M.F. Balandrin Eds.), American Chemical Society, Washington; pp 25-37.

Verdine GL., (1996). The combinatorial chemistry of nature. *Nature* vol. 384 (6604 Suppl.); pp. 11–13.

Waterman PG., (1993). *Drugs from Natural Products, Pharmaceuticals and Agrochemicals* (E.Harvey, Ed.), Ellis Horwood, New York, London, Toronto, Sydney, Tockio, Singapore; pp. 7-17.

WHO=World Health Organization

www.wikipedia.com.

2 IL GENERE *SESELI*

2.1 Sistematica

2.1.1 Introduzione

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

Al genere *Seseli* appartengono un ristretto numero di specie; infatti circa 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. Infatti 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).

2.1.2 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 fiorale 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).

2.1.3 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 sono degli endemismi (*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 Apiacee si riscontra maggiormente nell'Italia del Centro-Nord (Figura 2.1).



Figura 2.1 Distribuzione della *Seseli* in Italia.

2.2 Fitochimica del genere *Seseli*

Nel genere *Seseli* si riscontra la produzione di un gran numero di cumarine semplici, ma anche di pirano e furocumarine lineari e angolari (Austin 1968; Tosun et al. 2007), sesquiterpeni, fenilpropanoidi, lignani e poliacetileni (Tosun et al. 2003; Egan et al. 1990; Vuckovic et al. 2007).

2.2.1 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 derivati del cromone sono conosciuti con il nome di cromoni. Presentano uno scheletro di base del tipo C_6C_3 . 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.

Finora solo un cromone è stato isolato da un membro del genere *Seseli*, si tratta di un derivato contenente zolfo che è stato ottenuto da *S. sessilifolium* Schrenk (Savina et al. 1970)(Figura 2.2).

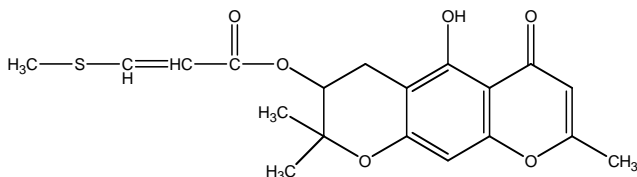


Figura 2.2. Seselirin.

Altri cromoni con struttura simile al 5-idrossi-6-(2-Z-butenil-3-idrossimetil)-7-metossio-2-metilcromone (nuovo composto naturale da noi isolato), sono stati ottenuti da altri membri della famiglia delle Apiaceae, come *Daucus carota* L. (Czepa et al. 2003), *Angelica archangelica* L., e *Archangelica litoralis* Fries. (Cisowski et al. 1988. Harkar et al. 1984). Mentre da *Ammi visnaga* (L.) Lam sono stati isolati furocromoni (Kuster et al. 1994).

Inoltre, peucenin-7-metilether, un composto strutturalmente simile al composto 5-idrossi-6-(2-Z-butenil-3-idrossimetil)-7-metossio-2-metilcromone, è stato isolato dalla famiglia delle Rutaceae (Razdan et al. 1987) . (Figura 2.3).

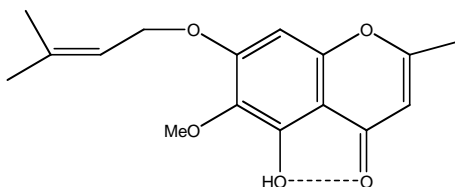


Figura 2.3 Peucenin-7-methylether.

2.1.2 Fenilpropanoidi

I fenilpropanoidi (C₆-C₃) rappresentano un gruppo molto numeroso di prodotti naturali ampiamente diffusi nelle piante, che derivano dagli amminoacidi fenilalanina e tirosina o da intermedi del metabolismo dell'acido scikimico.

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 a un'unità fenilica (C₆) legata a un'unità C₃ (propanoica) (Capasso et al 2008).

Le classi di composti più importanti a cui danno luogo, per aggiunta di unità funzionali, sono, gli acidi idrossicinnamici e le cumarine. Tra le polimerizzazioni si ricorda la formazione della lignina (Capasso et al 2008).

Tra gli acidi idrossicinnamici quelli più frequentemente ritrovati sono gli acidi caffeico, universalmente diffuso nelle piante superiori, p-cumarico, ferulico e sinapico. 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 fenilpropanoidi come il 2-Epideacyllaserine ed il Laserine (Figura 2.4) (Barrero et al 1992; Barrero et al. 1994, Tosum et al. 2003).

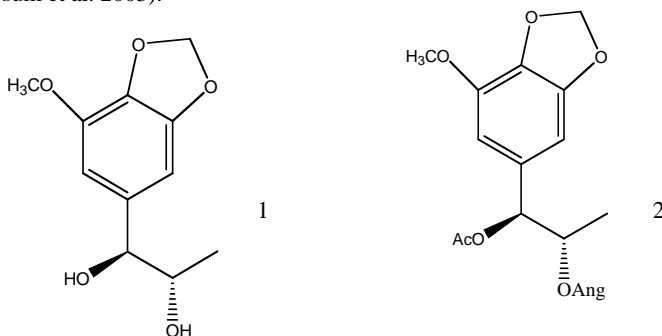


Figura 2.4 2-Epideacyllaserine (1) e Laserine (Treo-1-acetoxy-2-angeloiloxy-3',4'-methylenedioxy-1-phenilpropan) (2)

2.1.3 Lignani

I lignani (C₆-C₃)₂, sono un ampio gruppo di metaboliti secondari presenti nei tessuti legnosi delle piante, strutturalmente derivano dal fenilpropano (Capasso et al. 2008).

Nelle piante edibili sono presenti come glucosidi strettamente associati ai costituenti della fibra; nelle parti legnose sono principalmente presenti come agliconi (Baiano et al. 2010).

I lignani esplicano attività antitumorale (particolarmente nei confronti del tumore al colon e al seno) (Baiano et al. 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 et al. 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 et al 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, mirtilli e pappa reale. (Tratto da: www.farmasalute.it). In una recente comunicazione del 2007 (Vuckovic et al.) 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 (Figura 2.5).

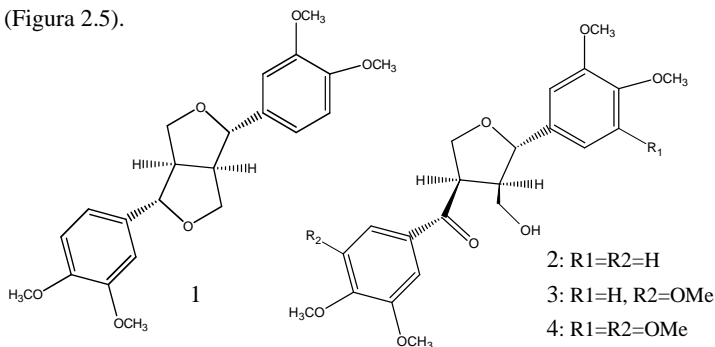


Figura 2.5 Lignani citotossici isolati dalla *Seseli annuum*. Eudesmina (1), magnone A (2), hernone (3) e seselidone (4).

2.1.4 Cumarine

Le cumarine rappresentano un gruppo eterogeneo di eterocicli naturali caratterizzati da un'elevata chemio diversità, che vantano la presenza di oltre 1800 strutture e una

varietà di attività farmacologiche molto diverse (Murray et al. 2005. Herz et al. 2002). Il prototipo di questa famiglia di composti è rappresentato dalla cumarina (nome IUPAC: 1-benzopirano-2-one), una sostanza isolata per la prima volta nel 1820 dai semi *Dipteryx odorata*, una leguminosa tropicale originaria del Sud America, nota anche con il nome di *Coumarouna odorata*, che fornisce la fava tonka ed un tipo di legno “coumaru”, da cui il nome della cumarina (Ricciuti et al. 2004). Questa cumarina è presente in più di 27 famiglie di vegetali, ed è responsabile dell'odore dolce dell'erba appena tagliata.

Le cumarine vengono sfruttate in vari farmaci per la loro importante azione anticoagulante; per questa azione trovano inoltre impiego come raticidi e inoltre come antifungini. Per quanto concerne l'utilizzo in ambito industriale, questi derivati trovano impiego come aromatizzanti nella produzione dei profumi e del tabacco. In passato venivano adoperate per edulcorare bevande alcoliche come il rum, ma attualmente l'uso nell'industria alimentare è stato vietato soprattutto a causa della loro epatotossicità, del potenziale cancerogeno e dell'interazione con molti farmaci (Ricciuti et al. 2004).

Attualmente le cumarine sono state isolate da più di 700 specie diverse. Le famiglie più ricche di questi composti sono le Apiacee, le Rutaceae, le Fabaceae e le Poaceae (Ricciuti et al. 2004). Un buon numero di cumarine sono fitoalessine e vengono sintetizzate *de novo* dalla pianta in seguito a infezioni dovute a batteri o funghi; le fitoalessine posseggono anche attività antimicrobica (Henrich et al. 2004).

Tutte le cumarine presenti in natura derivano dal 5,6-benzo-2 pirone e sono presenti sia in forma libera che glicosidica (eterosidi). Sono contenute in diverse parti della pianta, le ritroviamo soprattutto nelle foglie, nei frutti, nei semi e nelle radici. Da un punto di vista biosintetico derivano dai fenilpropanoidi, prodotti naturali che contengono un gruppo $C_6H_5-(CH_2)_3$, che derivano a loro volta da intermedi del metabolismo dell'acido scikimico o dall'introduzione, in opportuni precursori, di residui di acido cinnamico o di amminoacidi fenilalanina e tirosina. Sono molecole che non presentano atomi di azoto. Inoltre quasi tutte le cumarine presentano un ossidrilico in posizione 7. Alcune cumarine si presentano prenilate e per ciclizzazione possono dare origine a pirano e furo cumarine. In base alla loro struttura chimica possiamo classificare le cumarine in 4 gruppi (Ricciuti et al. 2004):

- Cumarine semplici: esempio la cumarina, mostrano spiccate proprietà flebo toniche e anti edematose.

Idrossi-cumarine: possono essere o meno metossilate, i principali rappresentanti di questo gruppo sono l'umbelliferone, l'esculentina, la scopoletina e il dicumarolo. 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 psolarene) 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, anch'esse inducono fotosensibilizzazione (Ricciuti et al. 2004).

Lo psolarene e composti analoghi (xantotossina, bergaptene, imperatoria, trimetilpsolarene) causano fotosensibilizzazione. Infatti il consumo o il diretto contatto con la pelle di piante contenenti psolareni (diverse Apiaceae e Rutaceae), se seguito da esposizione al sole, può causare delle dermatiti. Gli psolareni sono cumarine che posseggono un anello furanico, da qui anche il loro nome furocumarine (Henrich et al. 2004).

A causa dell'esteso gruppo cromoforo, assorbono la luce ultra violetta in un range compreso tra 320-380 nm. Questi composti vengono prodotti dalle piante per un meccanismo di protezione dalla luce solare, grazie a questa proprietà alcune cumarine trovano utilizzo nella formulazione di filtri solari per cosmetici (Henrich et al. 2004).

Gli psolareni trovano utilizzo nella fotochemioterapia, trattamento che consiste nella somministrazione *per os* (o nell'applicazione topica) di uno psolare, 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

IL GENERE SESELI

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 et al. 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 et al. 2008).

Nel genere *Seseli* sono state isolate numerose curarine semplici come il sesebrinol, il sibirisin il seselinal, l'ostolo (Figura 2.6 a/b); numerose furanocumarine angolari e lineari (Figure 2.7/2.8)

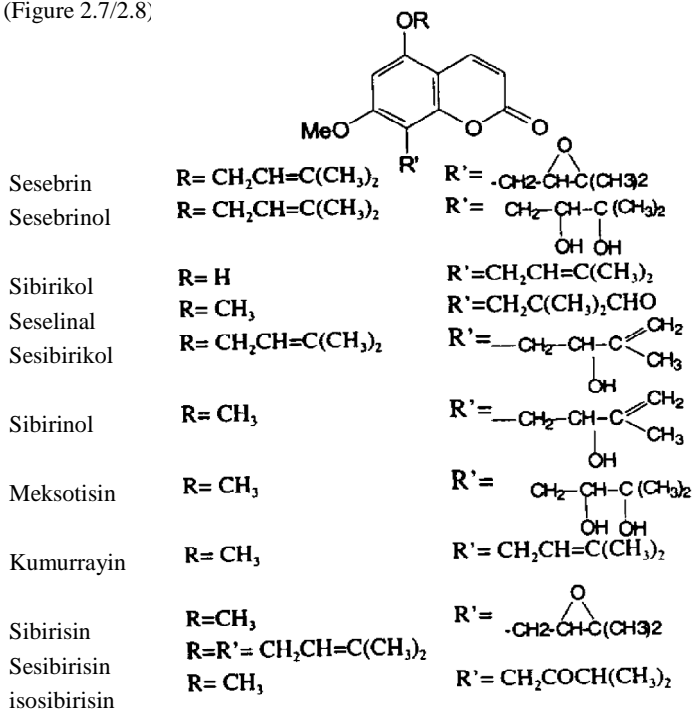
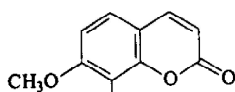


Figura 2.6 a Cumarine isolate dal Genere *Seseli*

Ostolo



Tortosuid

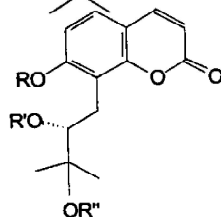
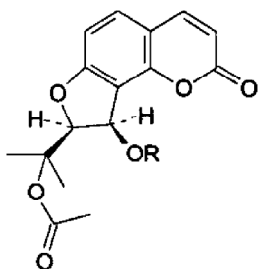
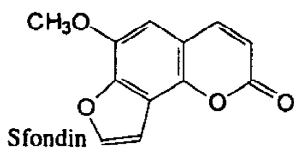
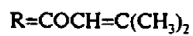


Figura 2.6 b Cumarine isolate dal Genere *Seseli*

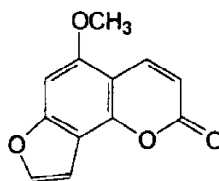


Izopösenidin

Libanotin



Sfondin



isobergaptene

Figura 2.7 Furocumarine angolari isolate dal Genere *Seseli*

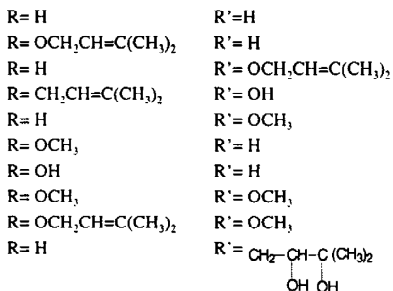
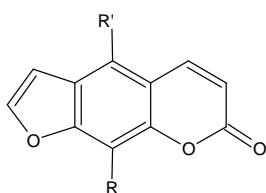
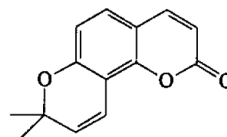
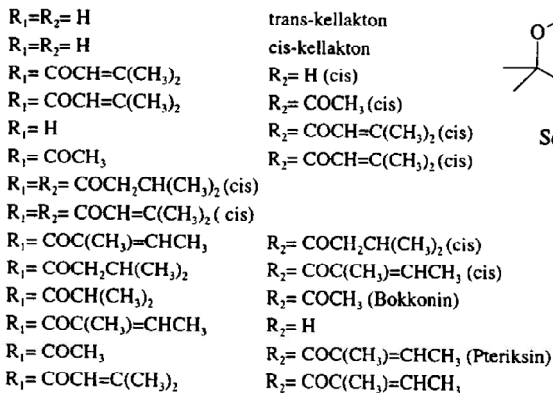
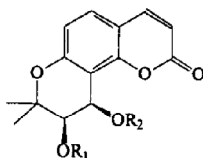


Figura 2.8 Furocumarine lineari isolate dal Genere *Seseli*



Seselin

Figura 2.9 Alcune pironocumarine isolate dal Genere *Seseli*

2.1.5 Terpeni

I terpeni o terpenoidi sono composti prevalentemente di origine vegetale; sono derivati dalla condensazione di unità isopenteniliche a cinque atomi di carbonio, strettamente correlate all'isoprene e possono essere lineari, ciclici o entrambi.

Le unità isopreniche risultano legate in modo testa-coda nella struttura terpenoidica; a seconda del numero di queste unità si ha la classificazione (Tabella 3.1)

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 isopentenil pirofosfato, che rappresenta l'isoprene "attivo", cioè il nucleo di base presente nelle strutture terpeniche.

I terpeni sono biosintetizzati dagli organismi, attraverso i gruppi acetilici dell'acetilcoenzima A (AC-CoA) attraverso la via metabolica HMG-CoA reduttasi (Capasso et al. 2008). I terpenoidi, di cui sono state isolate circa 20000 strutture, comprendono il gruppo più vasto di prodotti naturali presenti nelle piante, dove sembrano svolgere un ruolo importante nelle varie interazioni a cui una pianta è sottoposta.

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

2.1.6 Sesquiterpeni

I sesquiterpeni sono dei terpeni a 15 atomi di carbonio e possono essere classificati in tre gruppi principali: aciclici, monociclici e biciclici (Capasso et al. 2008). Questi prodotti naturali sono costituenti di un gran numero di oli volatili, dalle proprietà antimicrobiche e antiinsetticidiche e costituiscono i prodotti di difesa della pianta (Henrich et al. 2004). Alcuni sono semplici idrocarburi insaturi, altri sono alcoli, chetoni, aldeidi ed esteri. 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 Composite, 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. I sesquiterpeni sono presenti, oltre che nelle piante superiori anche nei microrganismi, animali marini e negli insetti, dove svolgono la funzione di ferormoni (Capasso et al. 2008). Uno tra i più importanti sesquiterpeni è sicuramente l'artemisina (Figura 2.10), dalle interessanti proprietà antimalariche (Henrich et al. 2004).

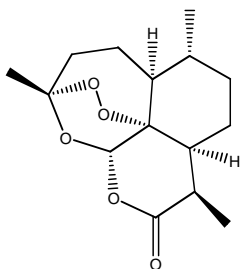
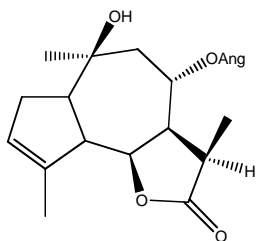


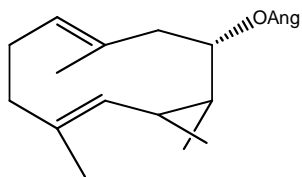
Figura 2.10 Artemisinina

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

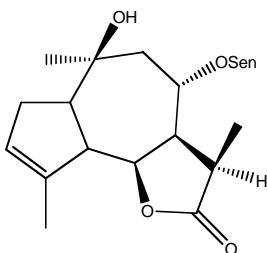
Nel genere *Seseli* sono stati isolati numerosi sesquiterpeni, alcuni dei quali vengono riportati in Figura 2.11. (Tosun et al. 2003; Barrero et al. 1992; Barrero et al. 1994).



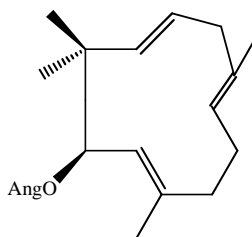
8 α -angeloxy-10 β -hydroxy-slov-3-en-6,12-olite



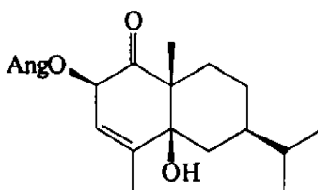
8 α -angeloxybicyclogermacrene



8 α -Senesioloxy-10 β -hydroxy-slov-3-en-6,12-olite



10 angeloyloxy- α -humulene



2 α -angeloiloxy-5 β -hydroxy-7 α H, 10 β Me-eusdem-3-en-1-one

Figura 2.11 Alcuni Sesquiterpeni isolati dal Genere *Seseli*

2.1.7 Poliacetileni

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

I poliacetileni sono interessanti marcatori chemosistematici per un certo numero di famiglie di piante superiori come ad esempio Apiaceae, Araliaceae e Asteraceae (Bohlmann et al., 1973; Hansen et al 1986) e sono noti per i loro effetti nematodici, i quali possono essere utilizzati con successo in agricoltura biologica (Chitwood, 2002).

I poliacetileni, inoltre dimostrano avere potente attività antifungina (Muir et al., 1982; Rollinger et al., 2003) e antibatterica (Kim, et al. 2003); sono noti per essere inibitori di una serie di enzimi come ad esempio il diacilglicerolo aciltransferasi (Lee et al., 2004), induttori di ossido di azoto sintasi (Wang et al. 2000; Bae, et al. 2001), colesteril estere e di trasferimento di proteine (Kwon et al. 1996) così come enzimi microsomiali e mitocondriali (Kim et al. 2003).

Esperimenti in vitro indicano che alcuni poliacetileni potrebbero avere attività antiallergenica (Wang, et al. 2001) ed antinfiammatoria (Resch, et al., 2001).

Inoltre, i poliacetileni hanno dimostrato di essere citotossici nei confronti di una serie linee cellulari di cancro solidi e leucemici (Kim, et al. 1989, Matsunaga, et al. 1990, Ito, et al. 2001, Zidorn et al. 2005) e di potenziare la citotossicità di altre droghe anti-cancro (Matsunaga, et al. 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, et al. 1987). 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, et al. 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 fotodecomposizione se esposti alla luce del sole.

Un certo numero di piante che contengono C₁₇-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.

IL GENERE SESELI

In precedenti lavori dalle radici della *Seseli gummiferum* è stato isolato il falcarinolo (Larsen PK. et al. 1969).

Dalla *Seseli mairei* è stato isolato il Seselidiolo studiato per la sua attività antitumorale (Hu et al. 1990) (Figura 2.12).

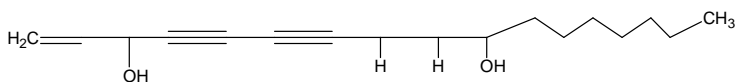


Figura 2.12 Seselidiolo, un poliacetilene isolato dalla *Seseli mairei*

BIBLIOGRAFIA (Capitolo 2)

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.

Bae EA., Han MJ., Kim DH., (2001). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of panaxytriol isolated from ginseng. Arch Pharm Res. vol. 24 No.4; pp. 297-299.

Baiano A., Terracone C., (2010). I composti fenolici negli alimenti Classificazione, distribuzione, metodi di estrazione ed analisi. ARACNE editrice S.r.l. via Raffaele Garofalo, 133/A-B 00173 Roma.

Barrero A., Herrador MM., Arteaga P., (1990). Cumarinas en especies del genero *Seseli* (Fam. Umbrelliferae). Ars Pharmaceutica tomo XXXI No. 34; pp. 241-256.

Barrero A., Herrador MM., Arteaga P., (1994). Sesquiterpene lactones and other costituents of *Seseli vayredanum*. Phytochemistry vol. 37 No. 5; pp. 1351-1358.

Bohlmann F., Ehlers D., Zdero C., (1978). Einige neue furanoeremophilane aus *Senecio*-Arten. Phytochemistry vol. 17; pp. 467-470.

Capasso F., De Pasquale R., Grandolin G., Mascolo N., (2008). Farmacognosia, Farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico. Springer-Verrlag Milano Italia; pp.189-190, 201-203, 241-243, 244, 454.

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

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.

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.

Egan D., O'Kennedy R., Moran E., Cox D., Prosser E., Thornes D., (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. Marcel Dekker inc. pp. 504-529.

Ito A., Cui B., Chávez D., Chai HB., Shin YG., Kawanishi K., Kardono LB., Riswan S., Farnsworth NR., Cordell GA., Pezzuto JM., Kinghorn AD., (2001). Cytotoxic polyacetylenes from the twigs of *Ochanostachys amentacea*. *J. Nat. Prod.* vol. 64 No. 2; pp. 246-248.

Hansen L., Hammershoy O., Boll PM., (1986). Allergic contact dermatitis from falcarinol isolated from *Schefflera arboricola*. *Contact Dermatitis* vol. 14; pp. 91-93.

Harker S., Razdan TK., Waight ES., (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* vol. 23; pp. 419- 426.

Hausen BM., Bro'han J., Ko'nig WA., Faasch H., Hahn H., Bruhn G., (1987). Allergic and irritant contact dermatitis from falcarinol and didehydrofalcarinol in common ivy (*Hedera helix* L.). *Contact Dermatitis* vol. 17:1-9.

Henrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E., (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone; pp. 73-75, 81-82.

Herz W., Falk H., Kirby GW., Moore RE., (2002). Eds. Springer-Verlag: Wien vol. 83, pp 1-529

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.

Karniol IG., Shirakawa I., Takahashi RN., Knobel E., Musty RE., (1975). Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinal in man. *Pharmacology*. vol. 13 No. 6; pp. 502-512.

Kim JM., Lee P., Son D., Kim H, Kim SY., (2003). Falcarindiol inhibits nitric oxide-mediated neuronal death in lipopolysaccharide-treated organotypic hippocampal cultures. *Neuroreport*. vol. 14 No. 15; pp. 1941-1944.

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.

Kwon BM., Nam JY., Lee SH., Jeong TS., Kim YK., Bok SH., (1996). Isolation of cholesteryl ester transfer protein inhibitors from *Panax ginseng* roots. *Chem. Pharm. Bull.* vol. 44 No. 2; pp. 444-445.

Larsen PK., Nielsen BE., Lemmich J., (1969). Constituents of Umbelliferous plants . XII. The absolute configuration of Falcarinol, an acetylenic compound from the roots of *Seseli gummiferum* Pall. *Acta Chem Scand.* vol. 23 No. 7; pp. 2552-2554.

Lee SW., Kim K., Rho MC., Chung MY., Kim YH., Lee S., Lee HS., Kim YK., New Polyacetylenes, DGAT inhibitors from the roots of *Panax ginseng*. *Planta Med.* vol. 70 No. 3; pp. 197-200.

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., Sanna F., Bonsignore L., (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited? *J Ethnopharmacol.* vol. 121 No. 2; pp. 255-267.

Matsunaga H., Katano M., Yamamoto H., Fujito H, Mori M., Takata K., (1990). Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) vol. 38 No. 12; pp. 3480-3482.

Muir AD., Cole AL., Walker JR., (1982). Antibiotic compounds from New Zealand plants. I. Falcarindiol, an anti-dermatophyte agent from *Schefflera digitata*. Planta Med. vol. 44 No. 3; pp. 129-133.

Murray RDH., (2005). In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Journal of Natural Products vol. 68 No. 11.

Razdan TK., Qadri B., Harkar S., Waight ES., (1987) Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. Phytochemistry vol. 26; pp. 2063- 2069.

Resch M., Heilmann J., Steigel A., Bauer R., (2001). Further phenols and polyacetylenes from the rhizomes of *Atractylodes lancea* and their anti-inflammatory activity. Planta Med. vol. 67 No. 5; pp. 437-442.

Ricciuti S., Cardini C., (2004). Le cumarine. Il Policlinico Sez. Prat. vol. 111; pp. 181-194.

Rollinger JM., Zidorn C., Dobner MJ., Ellmerer EP., Stuppner H., (2003). Lignans, phenylpropanoids and polyacetylenes from *Chaerophyllum aureum* L. (Apiaceae). Z. Naturforsch C. vol. 58 No. 7-8; pp. 553-557.

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.

Tosun A., Ozkal N., (2003). Ankara Ecz. Fack. Derg. vol. 32 No. 4; pp. 269-284.

Vučković I., Trajković V., Macura S., Tesčević V., Janačković P., Milosavljević S., (2007). A novel citotoxic lignan from *Seseli annuum* L. *Phytotherapy Research* 21; pp. 790-792.

Wang CN., Shiao YJ., Kuo YH., Chen CC., Lin YL., (2000). Inducible nitric oxide synthase inhibitors from *Saposhnikovia divaricata* and *Panax quinquefolium*. *Planta Med.* vol. 66 No. 7; pp. 644-647.

Wang N., Yao X., Ishii R., Kitanaka S., (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.* vol. 49 No. 8; pp. 938-942.

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.

www.sardegnaambiente.it

www.farmasalute.it

3. *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans

3.1. Caratteristiche della pianta

Pianta endemica di Sardegna e Corsica (in Corsica è presente solo nel Golfo di Porto, mentre in Sardegna è più diffusa, soprattutto sulle coste orientali), che cresce su substrati calcarei in prossimità del mare ad altitudini comprese tra 0 e 600 metri. Morfologicamente presenta le caratteristiche tipiche del genere a cui appartiene, anche se si discosta per essere più gracile. 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) (Figura 3.1).

Come tipo biologico appartiene ai piccoli cespuglietti suffruticosi, perenni sempreverdi, legnosi alla base (camefita). Per quanto riguarda l'ecologia della specie, essa è rupicola, vive sulle scogliere spruzzate dai marosi delle zone litoranee. Nelle zone interne preferisce le pareti calcaree e le sole eccezioni sono quelle della Corsica (dove cresce su porfidi), e dell'isola di S. Pietro (dove vive su trachiti e andesiti).



Figura 3.1.Particolari della *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans.

3.2. Luogo di raccolta

La pianta è stata raccolta nel territorio di Baunei (OG), in località Perdalonga, nell'ottobre 2006 (Figura 3.2/3.2a).

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 600) presso l'Università di Zurigo e l'ETH (Z/ZT) di Zurigo.

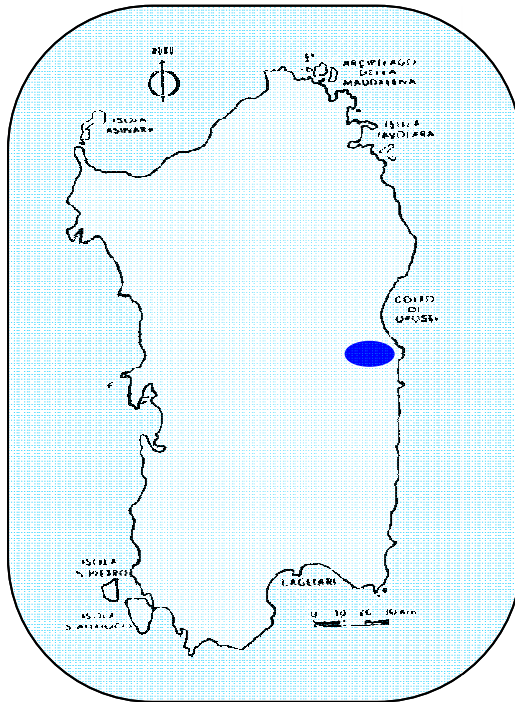


Figura 3.2. Luogo di raccolta della pianta.(in Blu)



Figura 3.2a Particolare della località la Guglia, Baunei (OG) Sardegna

3.3. Risultati fitochimici della *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans

Nel presente studio sono stati isolati e delucidati due nuovi composti naturali (il primo appartenente alla famiglia dei cromoni: il *5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone* ed il secondo appartenente alla famiglia dei poliacetileni il *dihydroseselidiol* o *heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol*), 4 furocumarine lineari conosciute (*psoralene*, *phellopterina*, *imperatorina*, *bergaptene*) ed il loro precursore naturale *marmesina*, 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 3.3- 3.4 - 3.5).

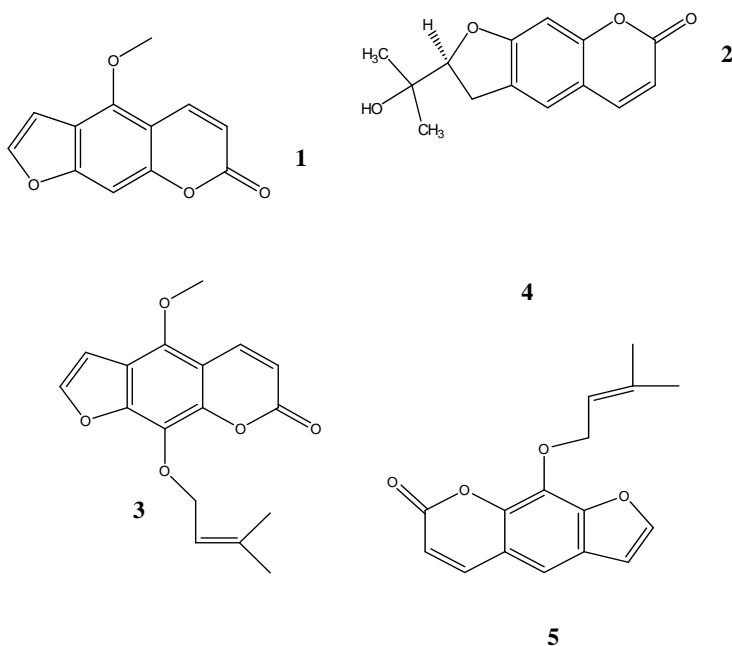


Figura 3.3 Coumarine isolate dalla *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans: 1. Bergaptene.; 2. Marmesina; 3. Phellopterina; 4. Psolarene; 5. Imperatorina .

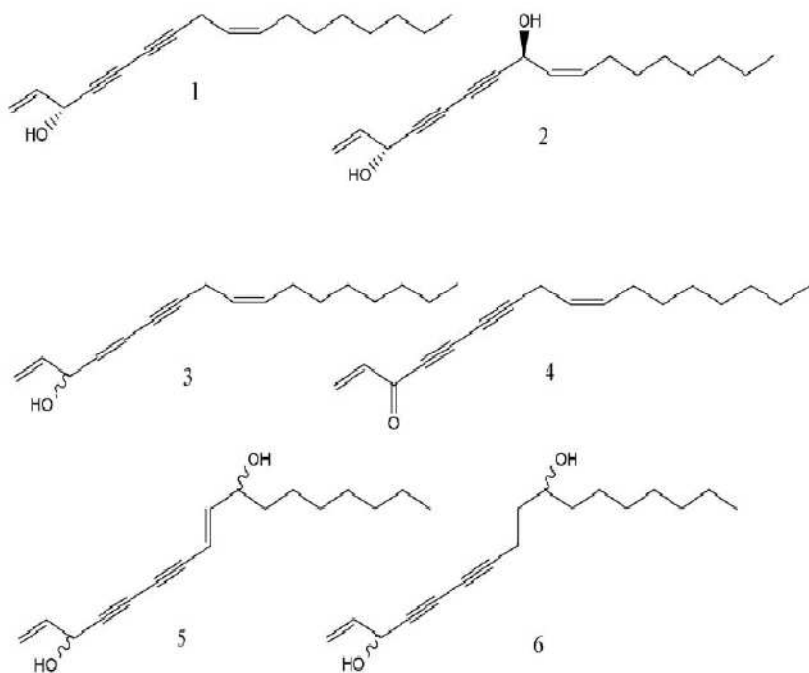


Figura 3.4 Strutture dei poliacetileni naturali e loro prodotti di decomposizione (1–6) isolati dalla *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans

1. (R)-Falcarinolo (Z)-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyn-3-ol) 3(R),8(S)-falcarindiolo
2. ((Z)-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyn-3,8-diol)
3. (4E,9Z)-1,4,9-heptadecatriene-6-yn-3-ol o 4,5-dihydropanaxynol o ginsenoyne J
4. falcarinone ((Z)-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyn-3-one)
5. E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol
6. diidroseselioliolo (heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol) (6).

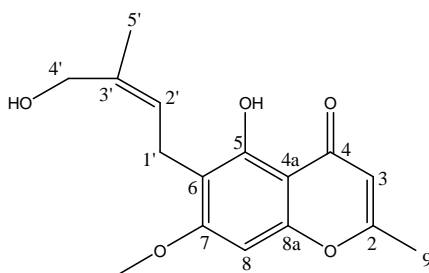


Figura 3.5 Composto 7: Struttura del nuovo cromone isolato dalla *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

3.4. Estrazione e isolamento

1 kg di fusti essiccati e polverizzati di *S. praecox* (Gamisans) Gamisans, sono stati fatti percolare estensivamente, inizialmente con diclorometano (DCM) e successivamente con Metanolo (MeOH). Dalla percolazione con solventi si sono ottenuti rispettivamente 40 e 30 grammi di estratto crudo.

3.4.1. Frazionamento dell'estratto diclorometanico (Figura 3.6)

Un'aliquota di 10 g dell'estratto in DCM è stata frazionata attraverso una cromatografia liquida sotto vuoto (VLC) usando 115 g di gel di silice (0.040–0.063 mm) come fase stazionaria e approssimativamente 50 mL di miscela toluene/acetato di etile (EtOAc) per ciascuna frazione, (9.3:0.7 per le frazioni 1–19 e 8:2 per le frazioni 20–28). Dopo la comparazione in cromatografia su strato sottile (TLC) delle 28 frazioni ottenute e viste le similarità visive, le abbiamo riunite in un set di 12 distinte frazioni.

La frazione 9, del peso di 200 mg, viene cromatografata in colonna aperta, utilizzando circa 30 grammi di gel di silice, come fase stazionaria e una miscela di DCM/Acetato di Etile (9.7 Hex: 0.3 EtOAc) come fase mobile. Ne risultano 14 subfrazioni, di queste, la più polare, la 9.14, del peso di 10,4 mg, viene iniettata e purificata in HPLC NP, ottenendo il nuovo composto naturale **Heptadeca 1-ene-4,6-diene-3-10-diolo**,

del peso di 4 mg (tempo di ritenzione 34 minuti, flusso 3.0 mL/minuto, miscela eluente DCM/Acetato di Etile 9.5:0.5). La frazione 8, del peso di 320 mg, viene cromatografata in colonna aperta, utilizzando circa 50 grammi di gel di silice, come fase stazionaria, e una miscela di Esano/Acetato di Etile (7,0 Hex: 3.0 EtOAc) come fase mobile. Ne risultano 12 subfrazioni, di queste, la 8.8 viene presa in esame. Questa subfrazione, del peso di 320 mg, viene iniettata e purificata in HPLC NP, ottenendo il composto **Falcarindiolo**, del peso di 23 mg (tempo di ritenzione 29 minuti, flusso 2.5 mL/minuto, miscela eluente Esano/Acetato di Etile 8:2). La pubblicazione 2 prende in considerazione il lavoro svolto su alcune frazioni dell'estratto diclorometanico e dell'estratto metanolico. Si è presa in esame la frazione 6, del peso di 350 mg, che è stata cromatografata in colonna, utilizzando 40 grammi di gel di silice e come solventi della fase mobile una miscela di Esano/Acetato di Etile (8,0 Hex: 2.0 EtOAc).

Dopo che l'esano è evaporato, dalla frazione 6.4 si è separato un precipitato cristallino del peso di 15 mg (Parte A). I restanti 44 mg di composto solubile e non cristallizzato (Parte B) sono a loro volta eluiti in colonna cromatografica utilizzando come fase stazionaria 10 grammi di gel di silice e come fase eluente DCM al 100%; si sono così ottenute 3 subfrazioni. La subfrazione 6.4.B.1, del peso di 9 mg, è stata iniettata e purificata in HPLC, ottenendo il composto **Psolarene**, del peso di 1.1 mg (tempo di ritenzione 17 minuti, flusso 2.5 mL/minuto, miscela eluente DCM 100%).

Anche la sub frazione 6.4.B.2 è stata iniettata e purificata in HPLC, si è ottenuto il composto **Phelloterina**, del peso di 8 mg (tempo di ritenzione 24 minuti, flusso 2.5 mL/minuto, miscela eluente DCM 100%). La parte A della frazione 6.4 (il cristallo) è stata anch'essa purificata in HPLC, nelle condizioni di flusso 2.2 mL/minuto e con miscela eluente DCM 100%; la frazione ottenuta, denominata 6.4.A.2 (tempo di ritenzione 21 minuti), è stata confrontata in TLC con la subfrazione 6.4.B.2.2, è apparso evidente che la subfrazione 6.4.A.2 non fosse pura; è stata quindi nuovamente sottoposta a purificazione in HPLC ma in condizioni differenti e cioè con miscela eluente Esano/Acetato di Etile (6 Hex: 4 EtOAc), flusso 2.2 ml/minuto, questa nuova purificazione ha permesso di isolare due componenti e cioè: composto **Imperatorina**, se ne sono ottenuti 3.3 mg (tempo di ritenzione 18 minuti) e il composto **Bergaptene**, 5,2 mg (tempo di ritenzione 19 minuti).

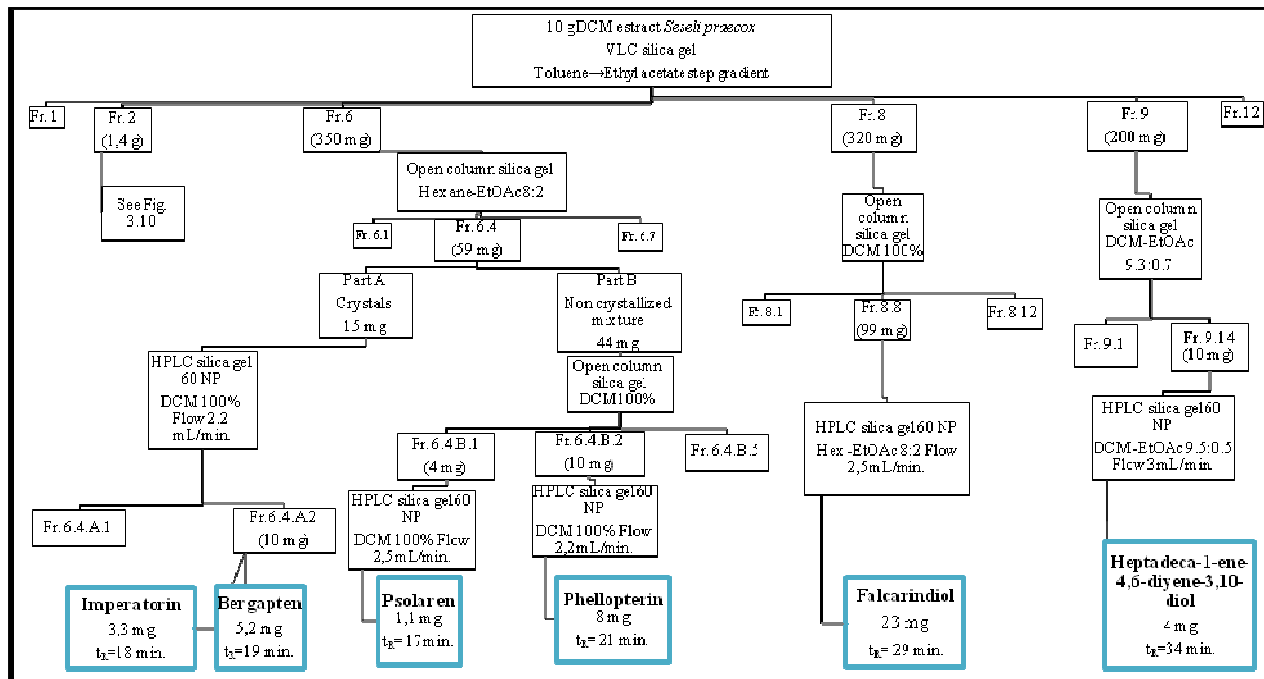


Figura 3.6 Schema di Frazionamento dell'estratto diclorometanico.

—

3.4.2. Frazionamento dell'estratto metanolico (Figura 3.7)

Un'aliquota dell'estratto metanolico (MeOH), pari a 10 grammi, è stata frazionata attraverso una VLC in fase inversa. L'estratto è stato disciolto in 40 mL di soluzione Metanolo/Acqua (3MeOH: 7 H₂O). Il gradiente dei solventi è stato crescente in polarità: si è partiti da una miscela 4 MeOH: 6 H₂O, fino ad arrivare a MeOH al 100%, la VLC ha portato all'ottenimento di 10 frazioni.

La frazione 8 della VLC, del peso di 126 mg, è stata purificata in colonna cromatografica in fase normale, con miscela eluente Esano/Acetato di Etile (6Hex: 4 EtOAc), si sono ottenute 9 subfrazioni, di cui la numero 2, composto 1, del peso di 4 mg e con l'aspetto di gomma rosso-bruna, è risultato essere un nuovo composto naturale: **5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2 methyl chromone**.

La frazione 6 della VLC, del peso di 220 mg, è stata caricata in colonna cromatografica, con fase stazionaria normale e con fase eluente Esano/Acetato di Etile (7Hex: 3 EtOAc), si sono ottenute 7 subfrazioni.

La subfrazione 2, del peso di 7 mg era costituita dal composto **Marmesina**.

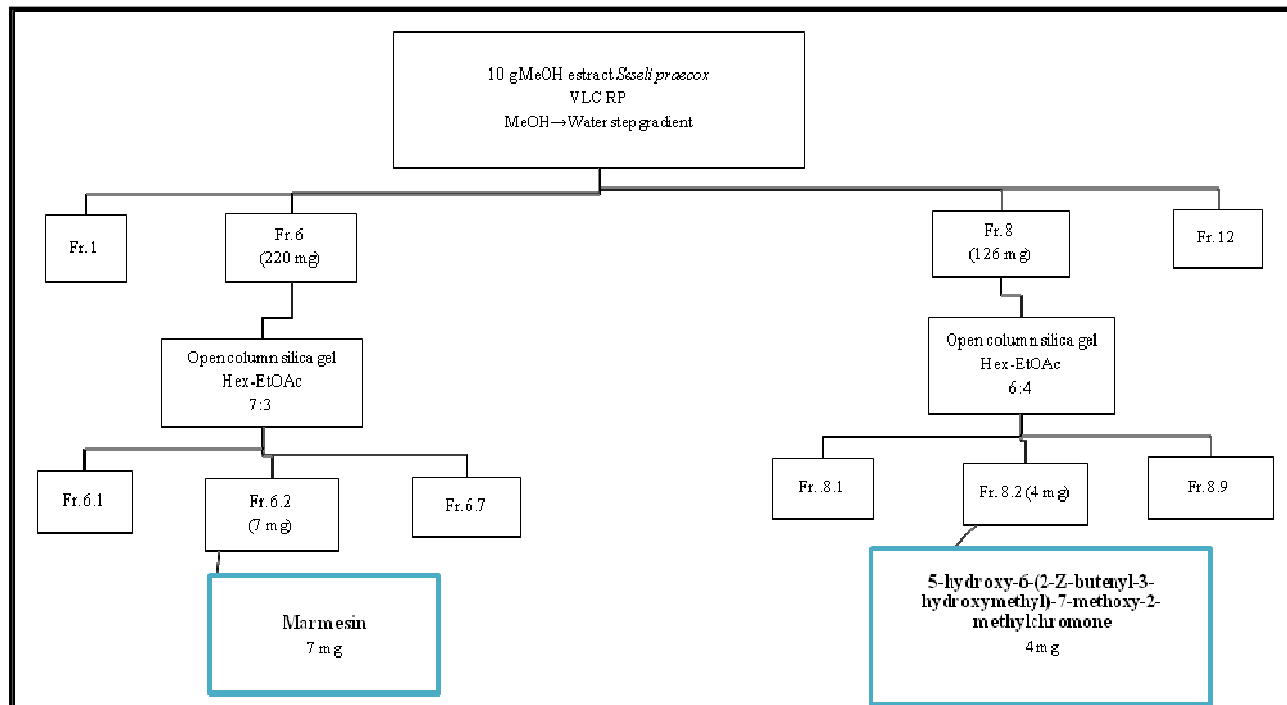


Figura 3.7 Schema di Frazionamento dell'estratto metanolico

3.4.3. Frazionamento bioguidato del falcarinolo (Figura 3.8)

L'estratto DCM (10 µg/ml) dei fusti della *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans ha spostato dell'81% il radioligando [³H]-CP55,940 dal recettore CB₂ e del 64% dal recettore CB₁. Per identificare i composti responsabili dello spiazzamento del CB₂, l'estratto è stato cromatografato in 12 frazioni, tutte testate per il loro legame con il recettore CB₂.

La frazione 4 ha mostrato il più alto spostamento da CB₂ (91.2%), ma non è stata ulteriormente frazionata a causa della piccola quantità di materiale in nostro possesso (Figura 3.8).

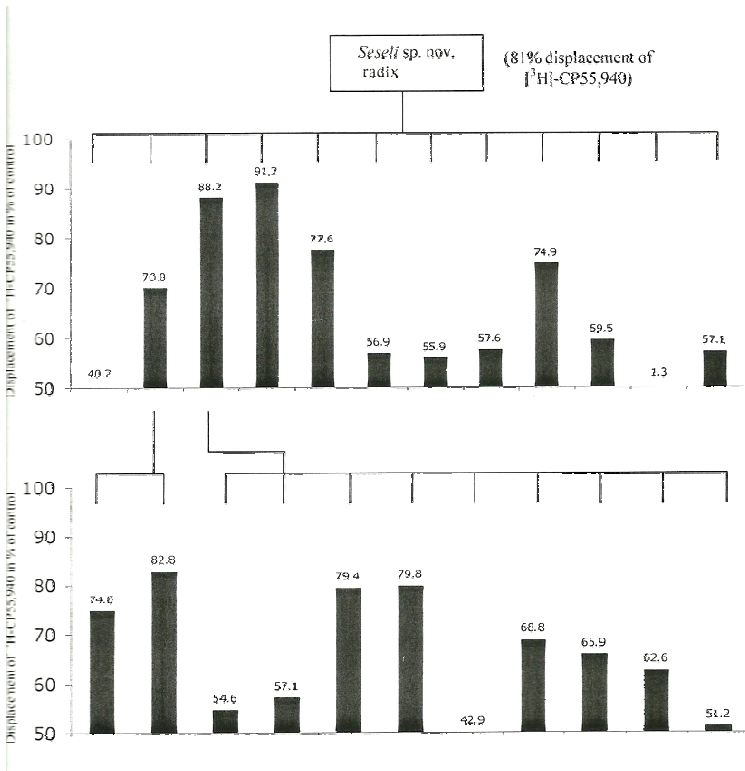


Figura 3.8 Schema del frazionamento bioguidato

—

Anche la frazione 2 ha mostrato un alto spostamento del radioligando, per questo motivo si è proceduto alla sua purificazione. La frazione 2 VLC, del peso di 1,4 grammi, è stata cromatografata in colonna aperta, utilizzando circa 150 grammi di gel di silice come fase stazionaria e una miscela di Esano/Acetato di Etile (8,5 Hex: 1.5 EtOAc) come fase mobile; risultano 11 subfrazioni. Di queste, la subfrazione 2.9, del peso di 186 mg, rappresenta il composto puro **Falcarinolo**, di cui una parte viene utilizzata per degli screening, mentre la restante parte viene conservata in freezer a -20 °C.

Da un punto di vista della stabilità, abbiamo visto che il falcarinolo tende velocemente a decomporsi alla luce; per questo motivo, un campione di falcarinolo, disciolto in acetonitrile è stato analizzato cromatograficamente, subito dopo estrazione e dopo averlo conservato in DMSO per 1 mese a -20°C (Figura 3.11). Grazie alle analisi cromatografiche abbiamo osservato che il falcarinolo si decompone completamente, durante tale conservazione, dando 4 prodotti di decomposizione che sono stati isolati in HPLC NP.

L'analisi dello spiazzamento del ligando [³H]-CP55,940 dal recettore CB₂ dei composti isolati 1-3 (5 µg/ml) e del falcarinolo (20 µM) evidenzia che solo il falcarinolo spiazza in modo marcabile il radioligando (76% di spiazzamento), contro il 50% per i composti 2 and 3, e l'11% per il composto 1 (Figura 3.9).

I dati relativi all'attività sui recettori cannabinoidi sono riportati di seguito.

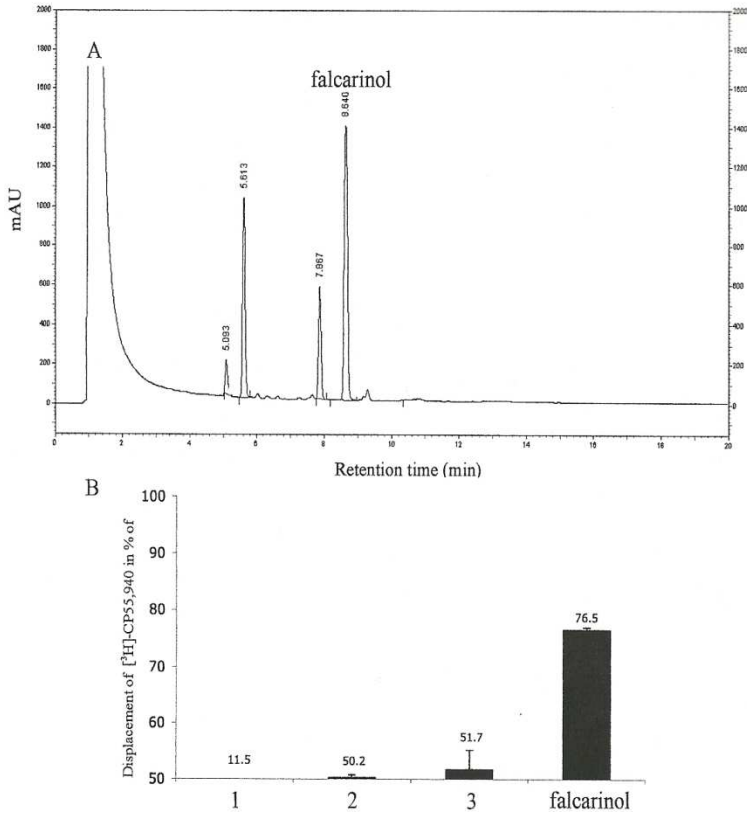


Figura 3.9 L'analisi dello spiazzamento del ligando [3H]-CP55,940 dal recettore CB₂ dei composti isolati 1-3 (5 µg/ml) e del falcarinolo (20 µM).

A. Cromatogramma in HPLC della frazione 2.9. e spiazzamento del ligando [³H]-CP55,940 dei 4 composti sul CB₂ (di cui il 4 è risultatato essere il falcarinolo). Cromatogramma rivelato a 206 nm. Il tempo di ritenzione in minuti è riportato in verticale sopra ogni corrispondente picco.

B. 20 µM di falcarinolo spiazzano il 76% del ligando [³H]-CP55,940 sul recettore CB₂, mentre lo spiazzamento dei composti 1-3 è inferiore al 55% alla concentrazione di 5 µg/ml (n = 6 ± SEM). mAU = milli absorption units.

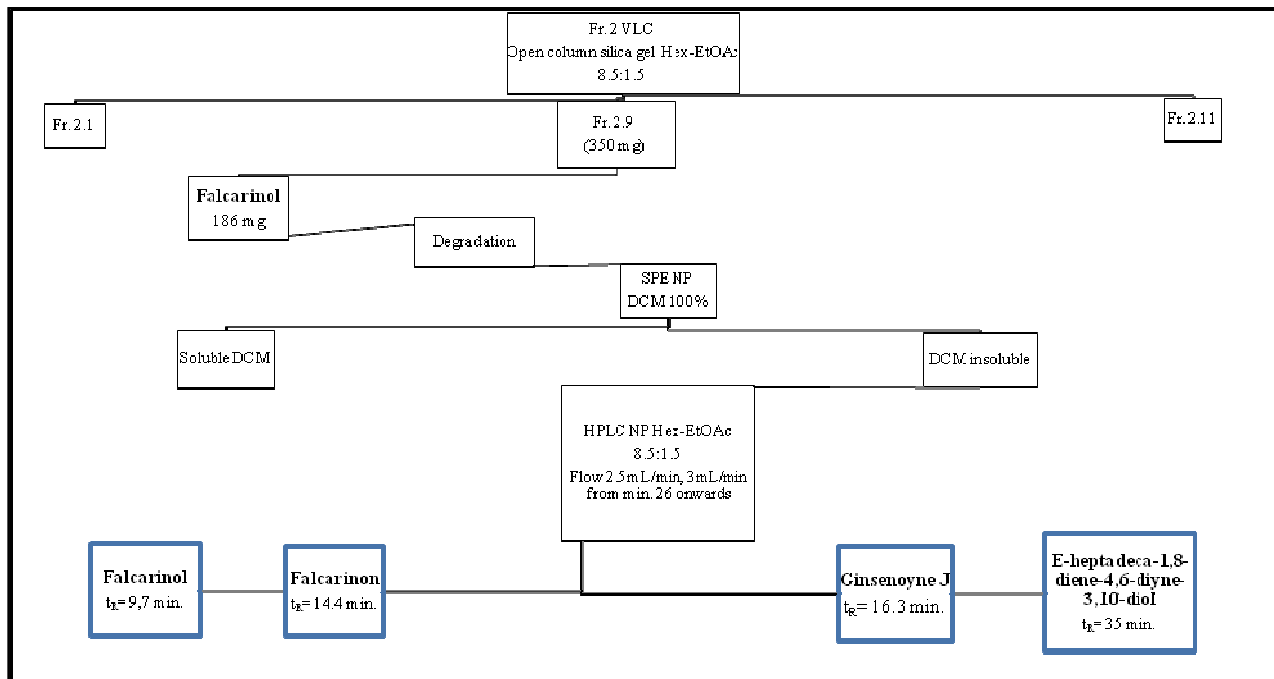


Figura 3.10 Schema dell'isolamento del Falcarinolo dalla frazione 2 della VLC dell'estratto in DCM..

3.4.4. Studio di decomposizione del falcarinolo

Il falcarinolo è un poliacetilene che si degrada con facilità.

Per poter testare biologicamente il falcarinolo è necessario valutarne il tempo di emi-vita in DMSO, che è il solvente utilizzato come medium nelle culture cellulari e monitorare la sua stabilità costantemente attraverso HPLC.

In DMSO l'emi-vita apparente del falcarinolo è di 24 h, mentre nelle colture cellulari la sua emi-vita si abbassa a 5-6 h.

I prodotti di degradazione del falcarinolo sono stati isolati in HPLC e si sono mostrati stabili.

La decomposizione del falcarinolo, seppur conservato in freezer a -20 °C, ha mostrato in TLC di controllo, la presenza di 5 composti di decomposizione oltre a tracce dello stesso falcarinolo (di cui 3 predominanti e 2 in tracce) (Figura 3.11) .

Si è quindi effettuata una purificazione in HPLC NP (Hex/ EtOAc 8.5:1.5; flusso 2.5 ml/min; 3 ml/min dal 26° minuto in poi) che ha portato all'isolamento del **4,5-dihydrofalcarinol (ginsenyne J)** (tR 14.4 min); del **falcarinone** (tR 16.3min); dell'**E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol** (tR 35 min).

I composti presenti in tracce non sono stati delucidati.

Fondamentalmente nessuno dei prodotti di degradazione è in grado, spontaneamente di spostare il radioligando [3H] CP55,940 da entrambi i recettori CB.

Inoltre, il falcarinolo fatto decomporre a diverse condizioni di temperatura, perde completamente la sua abilità di spostare il radioligando [3H]CP55,940 dai recettori CB, in questo modo è evidente che il falcarinolo non degradato, è il principale responsabile dell'attività cannabinomimetica dei composti presenti nell'estratto.

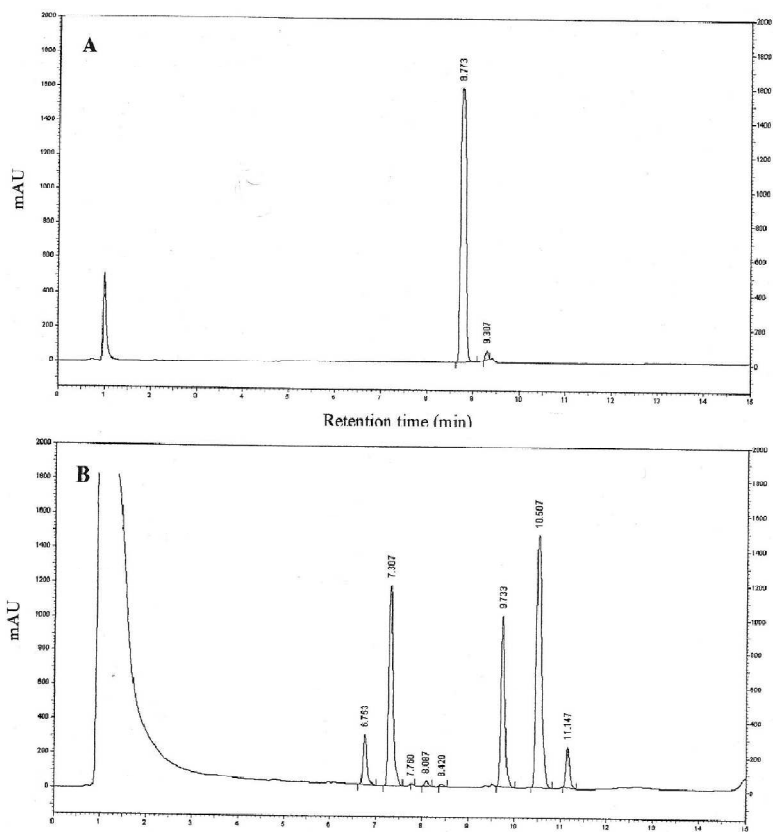


Figura 3.11 Stabilità del falcarinolo.

- A. Cromatogramma in HPLC a 206 nm del falcarinolo dopo isolamento in HPLC preparativo.
- B. Cromatogramma in HPLC a 206 nm del falcarinolo dopo 1 mese a -20°C .
mAU = milli absorption units

3.5. Delucidazione delle nuove strutture isolate dalla *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans

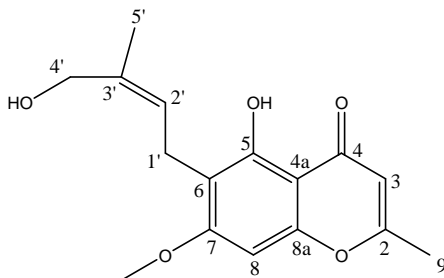
La struttura dei composti isolati è stata determinata attraverso lo studio degli spettri NMR mono (^1H , ^{13}C) e bidimensionali (ROESY, COSY, HMBC, HSQC), di massa esatta (ESI) e attraverso la spettroscopia UV.

I dati analitici e spettroscopici dei composti noti sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura.

Di seguito verranno delucidati i nuovi composti isolati e riportati i dati spettroscopici ed analitici dei composti noti.

3.5.1. Composto 7:

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



Il campione si presenta come una gomma rosso bruna.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) 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, H-4'), 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 (CH_3), 21 (CH_2), 22 (CH_3), 56 (OCH_3), 61.7 (CH_2), 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 [$\text{M}+\text{H}^+$] calcd. for $\text{C}_{16}\text{O}_5\text{H}_{19}$: 291.1204; found: 291.1232.

Il campione è stato ottenuto in una percentuale del 0,0012% rispetto al materiale vegetale estratto.

Lo spettro al protone ($^1\text{H NMR}$) del composto 7 (Figura 3.14) mostra la presenza di un gruppo idrossi (δ 13.06), un gruppo metossi (δ 3.91), due metili terziari (δ 2.35, 1.75), una funzione ossimetilenica (δ 4.27), una funzione metilenica (δ 3.42), e tre protoni metinici (δ 5.34, 6.05, 6.39).

Lo spettro al carbonio ($^{13}\text{C NMR}$) (Figura 3.15) del composto 7 contiene sedici segnali che includono: tre metili (δ 20.5, 22, 56 ppm), due metileni (δ 21, 61.7 ppm), tre metinici (δ 89.9, 108.9, 125.1 ppm) e otto carboni quaternari (δ 105.3, 111.7, 135.2, 156.6, 158.2, 162.8, 166.6, 182.5 ppm). Questi segnali corrispondono alla formula molecolare: $\text{C}_{16}\text{O}_5\text{H}_{18}$, congruente con un peso molecolare $[\text{M}+\text{H}^+]$ a m/z 291.1204, nell'analisi nell'analisi Q-TOF HRMS.

Lo spettro HSQC (Figura 3.16) ci permette di accoppiare i protoni ai propri carboni. La presenza del carbonile a δ 182.5 e la risonanza del segnale CH_3 in posizione 9 (δ_{C} 20.5 e δ_{H} 2.35) mostrato dalla correlazione COSY (Figura 3.17) con il protone H-3 a δ 6.05, suggerisce la presenza di un nucleo del tipo 2-metilcromone (Cisowski et al. 1988. Harkar et al. 1984. Razdan et al. 1987).

Lo spettro HMBC (Figura 3.18) mostra correlazioni tra i protoni metilici H_3 -9 a δ 2.35 e il carbonio a 108.9 ppm, tra il protone H-3 a δ 6.05 e il carbonio quaternario C_2 a 166.6 ppm, dimostrando un cross-peak che è reso ben evidente dallo spettro di tipo ROESY, dandone ulteriore prova.

Infatti, nello spettro al protone ($^1\text{H NMR}$) è ben evidente l'accoppiamento tra H-3 (6.05 δ) con H_3 -9, nonostante il segnale intermittente del carbonio quaternario (166.6 ppm), dando un piccolo doppietto con valore di J rispettivamente di 0.6 Hz e 0.3 Hz. I

Il protone in posizione H-8 (δ 6.39) mostra, nello spettro HMBC, cross-peak con il carbonio in posizione 7 (162.8), in posizione 8_a (156.6), in posizione 6 (111.7) e infine, con quello in posizione 4_a (δ 105.3); mentre nello spettro ROESY (Figura 3.19) è rilevata la vicinanza spaziale tra il protone in posizione H-8 con il gruppo metossi (δ 3.91).

Il caratteristico spostamento verso campo bassi (13,06 ppm) del segnale idrossi conferma la proposta sostituzione del modello di sistema di anelli aromatici.

Lo spettro COSY mostra un sistema continuo di spin confinato al carbonio 1'a δ 21.0 e al gruppo metilico (posizione 5'a δ 22.0).

Nello spettro al protone ($^1\text{H NMR}$) si rivela che il protone H_2 -1' (δ 3.42) accoppia con H-2'a δ 5.34 ($J = 6, 0.9\text{Hz}$) mostrando un doppietto ed un trippletto con valori di 5.7 e 6 HZ rispettivamente, mentre H-2' accoppia anche con H_3 -5 a δ 1.75 ($J=0.9\text{ Hz}$).

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Lo spettro HMBC mostra correlazione tra il protone H₂-1' e i carboni in posizione 7 (162.8 ppm), 6 (111.7 ppm), 5 (158.2 ppm), 2 (125.1 ppm) e 3' (135.2 ppm). Sempre nello spettro HMBC il segnale del protone H₂-4' a δ 4.27 accoppia con il C-5', C-3' e C-2' e vi sono correlazioni Roesy con il protone H₃-5'.

Il fatto che le correlazioni dello spettro ROESY indicano cross-peak tra H₃-5' con H₂-4' così come con H-2' ci fa concludere che il doppio legame tra C-2' e C-3' risulta essere in configurazione *cis* perchè altrimenti sarebbe dovuta osservare una correlazione tra H-2' e H-4'.

Nella Figura 3.12 è possibile evidenziare le correlazioni Cosy (in grassetto) e Roesy del composto 7 mentre nella figura 3.13 è possibile evidenziare le correlazioni HMBC del composto 7.

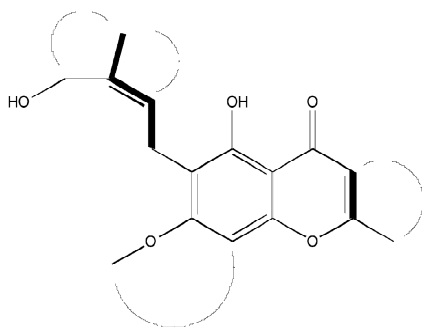


Figura 3.12 Correlazioni Cosy (in grassetto) e Roesy del composto 7.

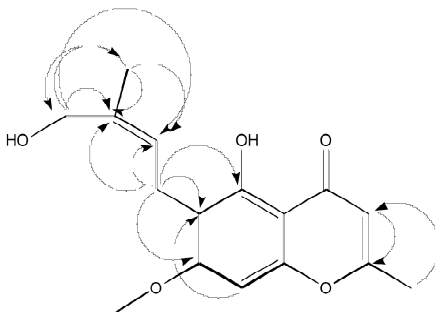


Figura 3.13 Correlazioni HMBC del composto 7.

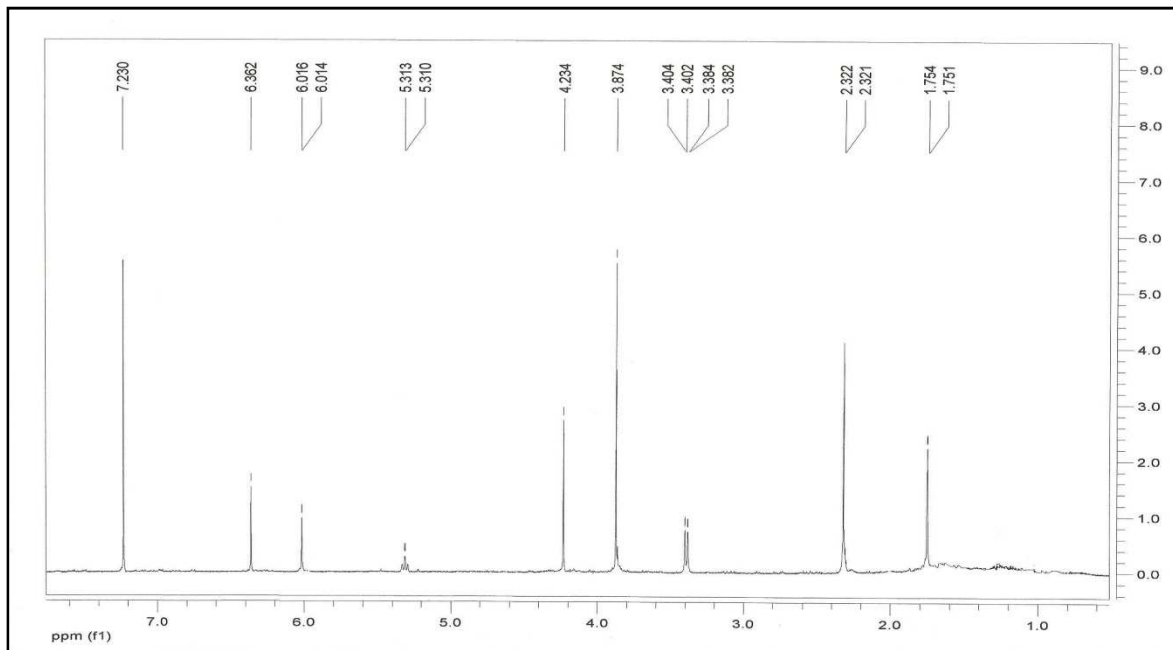


Figura 3.14 Spettro ¹HNMR del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

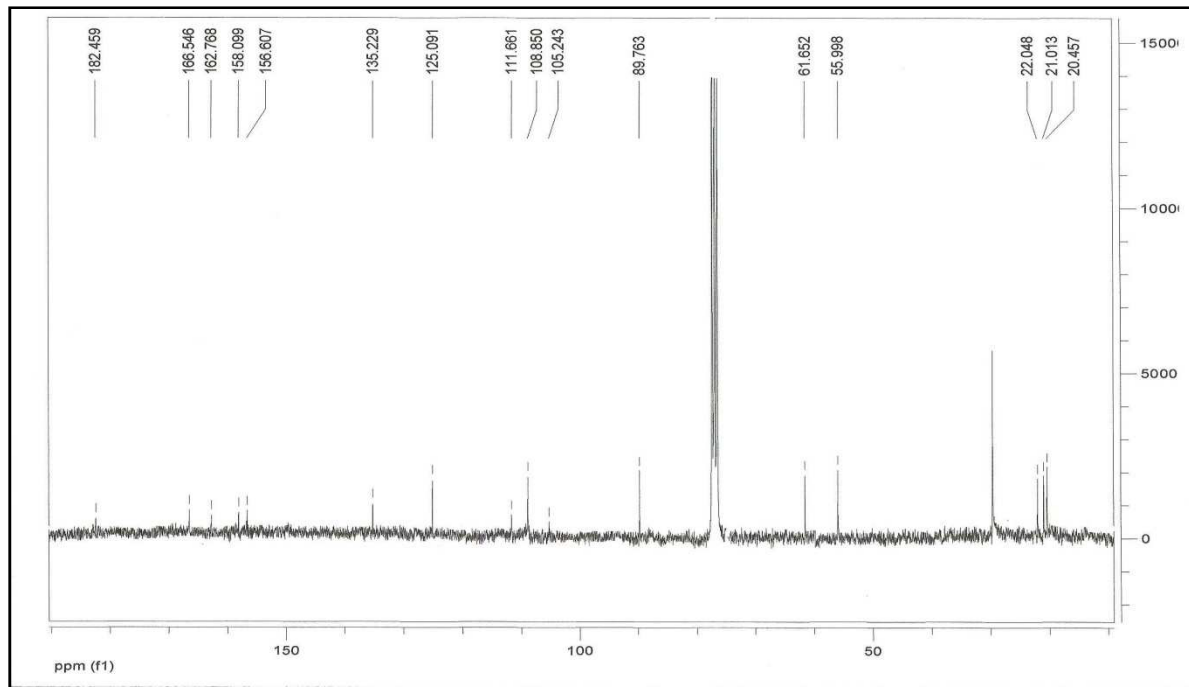


Figura 3.15 Spettro ^{13}C NMR del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

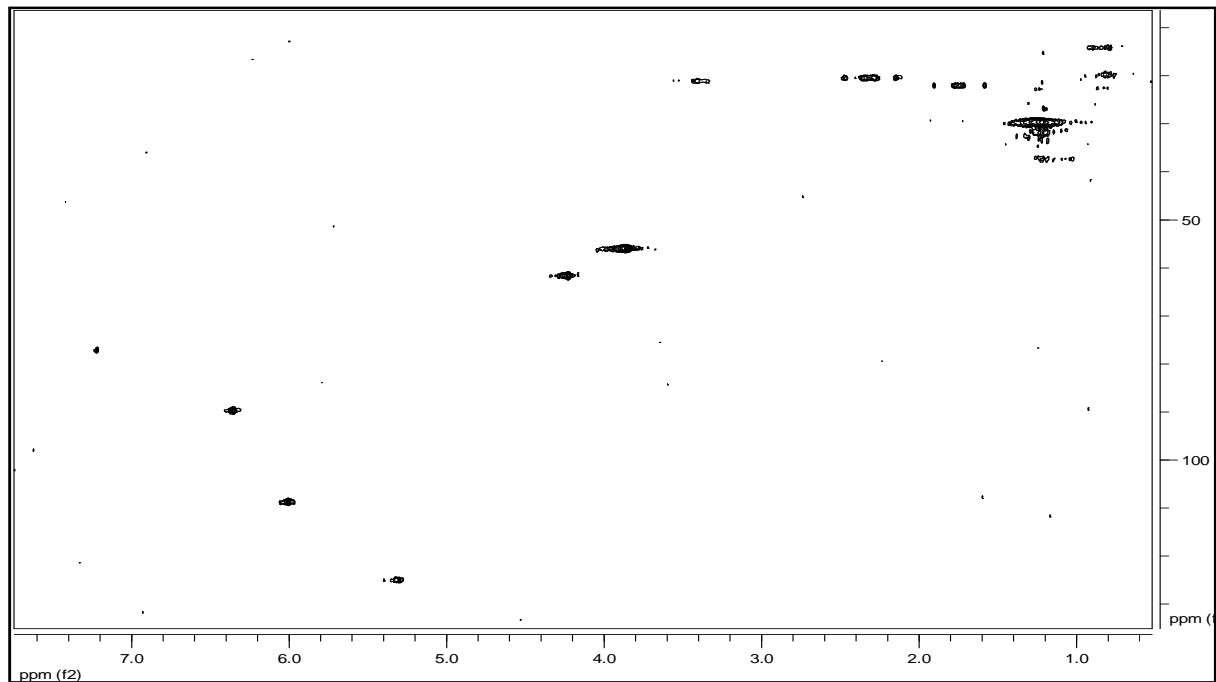


Figura 3.16 Spettro HSQC del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

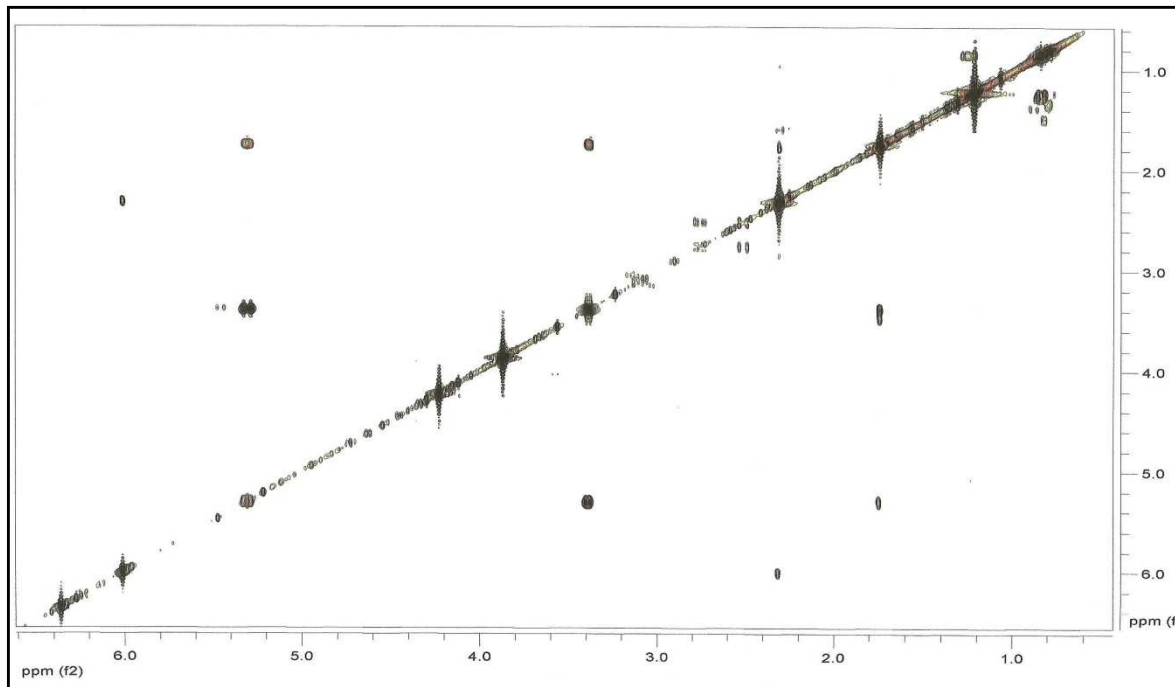


Figura 3.17 Spettro Cosy del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

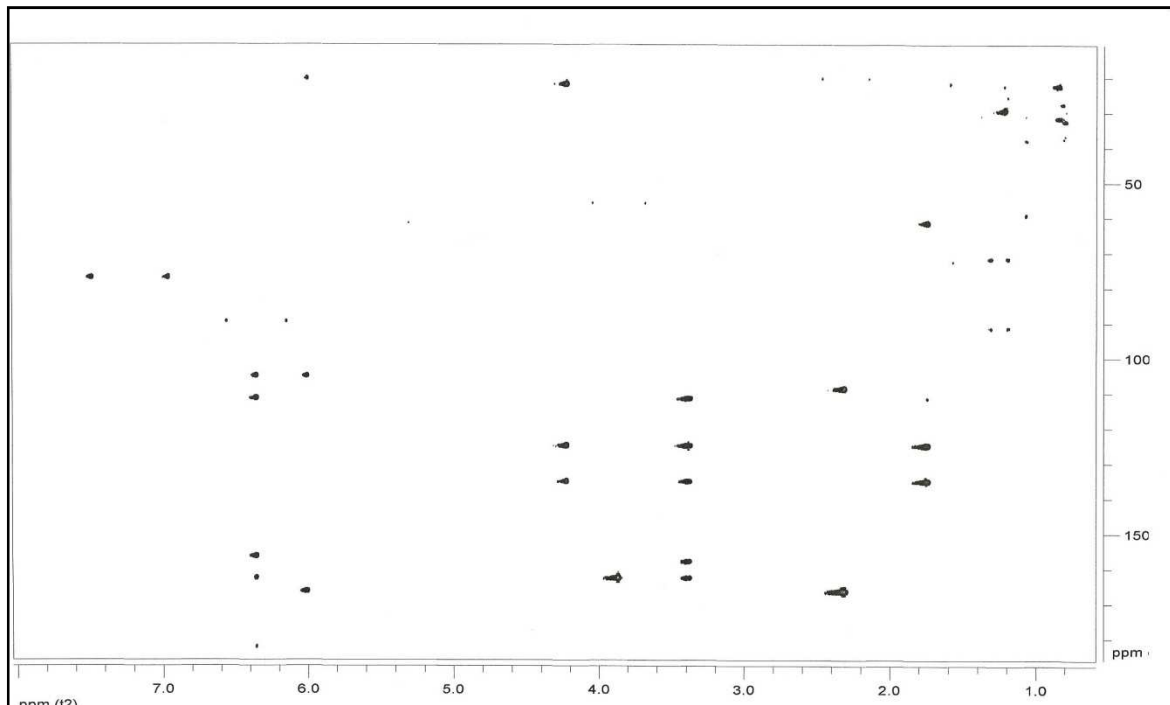


Figura 3.18 Spettro HMBC del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromon

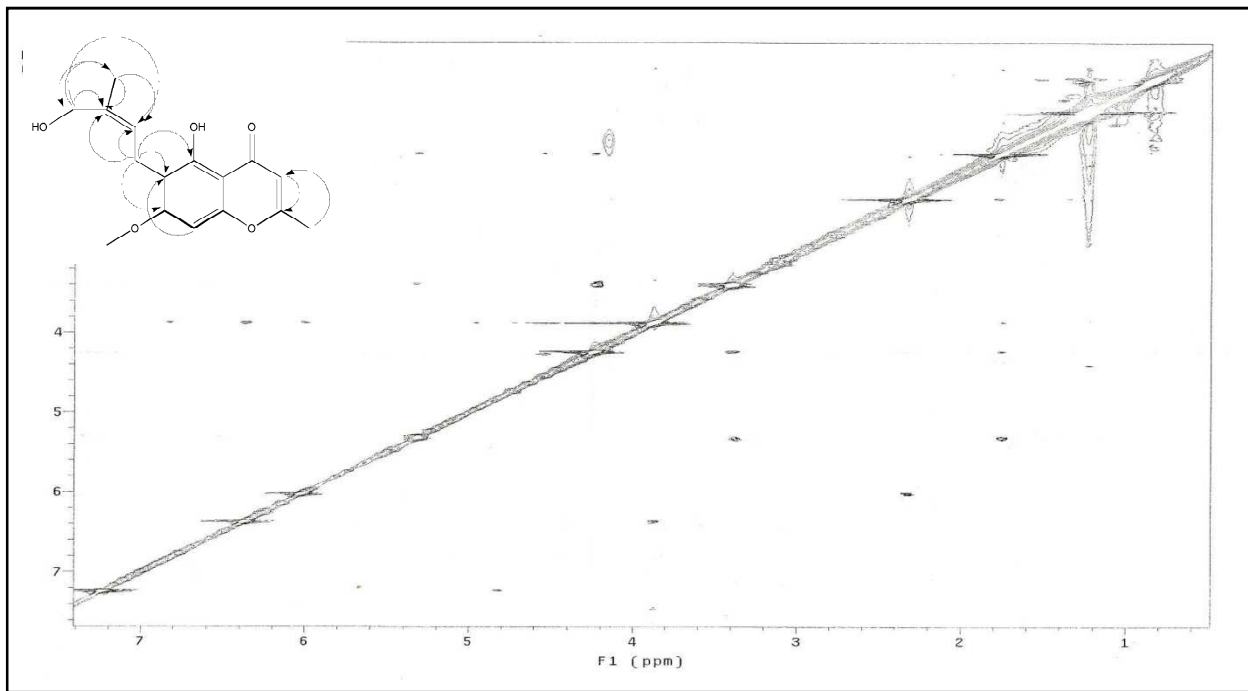


Figura 3.19 Spettro Roesy del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

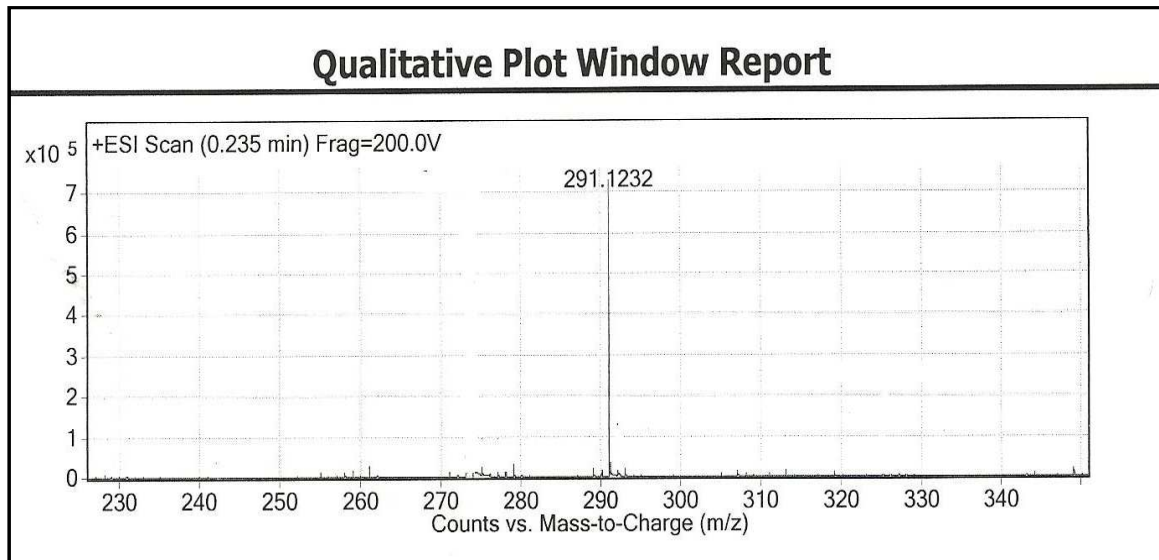
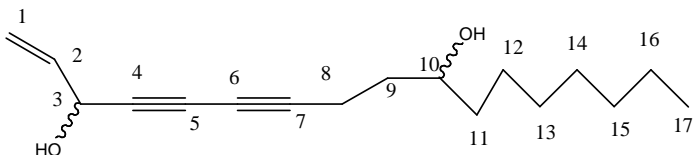


Figura 3.20 Spettro di massa con il Q-TOF HRMS del composto 7: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone.

3.5.2. Composto 6: il diidroseseliolo (heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol)



Dihydroreseseliolo (heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol): MW 262 EI-MS (m/z) 261 [M - H]⁺. ¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz) δ : 14.09 (C-17), 15.828 (C-8), 22.8 (C-16), 25.554 (C-12) 29.234, 29.569 (C-13, C-14), 31.7 (C-15), 35.367 (C-9), 37.470 (C-11), 63.551 (C-3), 64.5 (C-6), 70.618 (C-10), 71.9 (C-5), 74.1 (C-4), 81.87 (C-7), 117.056 (C-1), 136.128 (C-2).

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz) δ : 0.867 (3H, t, $J = 6.9$, H-17), 1.265 (10H, m, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16) 1.426 (2H, m, H-11), 1.645 (2H, m, H-9), 2.425 (2H, t, $J = 6.9$, H-8), 3.68 (1H, m, H-10) 4.90 (1H, $J = 5.4$, H-3), 5.24 (1H, $J = 10.2$, H-1a), 5.46 (1H, $J = 16.8$ H-1b), 5.94 (1H, m, H-2).

Il composto è stato isolato come un olio giallino.

Osservando lo spettro ¹HNMR (Figura 3.22) del composto **6**, si nota subito la rassomiglianza con i poliacetileni falcarinolo e falcarindiolo.

Infatti, tale spettro mostra il tipico sistema di spin di un gruppo vinilico terminale a δ 5,24-5,46 (2H da integrazione), i protoni metilenici di una catena idrocarburica lunga a δ 1,265 (12H da integrazione) ed il corrispondente gruppo terminale metilico a δ 0,86 (3H da integrazione).

Sempre nello spettro del protone (per confronto con quello del falcarindiolo) mancano i due protoni implicati nel doppio legame 9-10 (δ 5,50) mentre è presente un tripletto a δ 2,425 ed un multipletto a δ 1,645 che nella COSY (Figura 3.24) accoppiano tra loro (corrispondenti alle posizioni 8-9).

Lo spettro al ¹³CNMR mette in evidenza la presenza di 17 carboni (Figura 3.23) di cui un CH₃, 8 CH₂, 3 CH e 4 quaternari.

I segnali al ¹³CNMR dei quattro carboni quaternari a δ 81.87, 74.1, 71.9 e 64.5 ppm sono indicativi di un prodotto naturale poliacetilenico che possiede due tripli legami.

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Questo è confermato dai picchi di assorbimento all'IR a circa 2235 caratteristici di un alchino (Williams et al. 1995).

Lo spettro HSQC (Figura 3.27) ci permette di accoppiare i protoni ai propri carboni. Lo spettro al carbonio mostra inoltre i tipici carboni metilenici alifatici a 22.6, 22.23, 29.23, 29.56 ppm, il carbone metilico terminale di una lunga catena alifatica a 14.09 ppm, i due carboni del gruppo vinilico terminale a 117,05 e 136,128 ppm ed il carbonio allilico di un gruppo vinilico terminale a 63.55 ppm.

Gli esperimenti HSQC del composto **6** hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone (Figura 3.27).

Lo spettro HMBC (Figura 3.28) ha permesso di evidenziare una serie di cross peak di correlazione tra le varie parti della molecola (alcune delle quali sono evidenziabili in Figura 3.21).

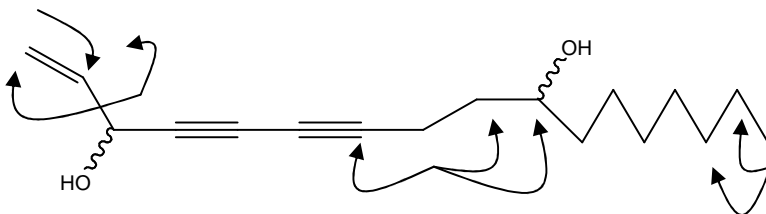


Figura 3.21 Alcune correlazioni HMBC del composto 6.

Lo spettro di massa del composto **6** mostra lo ione molecolare a M/z 261 $[M-H]^+$ (Tecnica EI) (Figura 3.29) ma non definisce bene i picchi di frammentazione.

Probabilmente il composto tende facilmente a decomporsi in colonna e bisognerebbe ricaratterizzarlo con tecniche più soft come l'ESI (Electron Spray).

Il composto così delucidato è il nuovo composto naturale Heptadec-1-ene-4,6-diyne-3,10-diol

Ovviamente manca da delineare la configurazione dei due centri chirali con il calcolo del potere rotatorio specifico e magari con una sintesi stereoselettiva (non essendoci dati di riferimento in bibliografia). Purtroppo non abbiamo ancora questi dati perché il poco composto isolato si è decomposto velocemente.

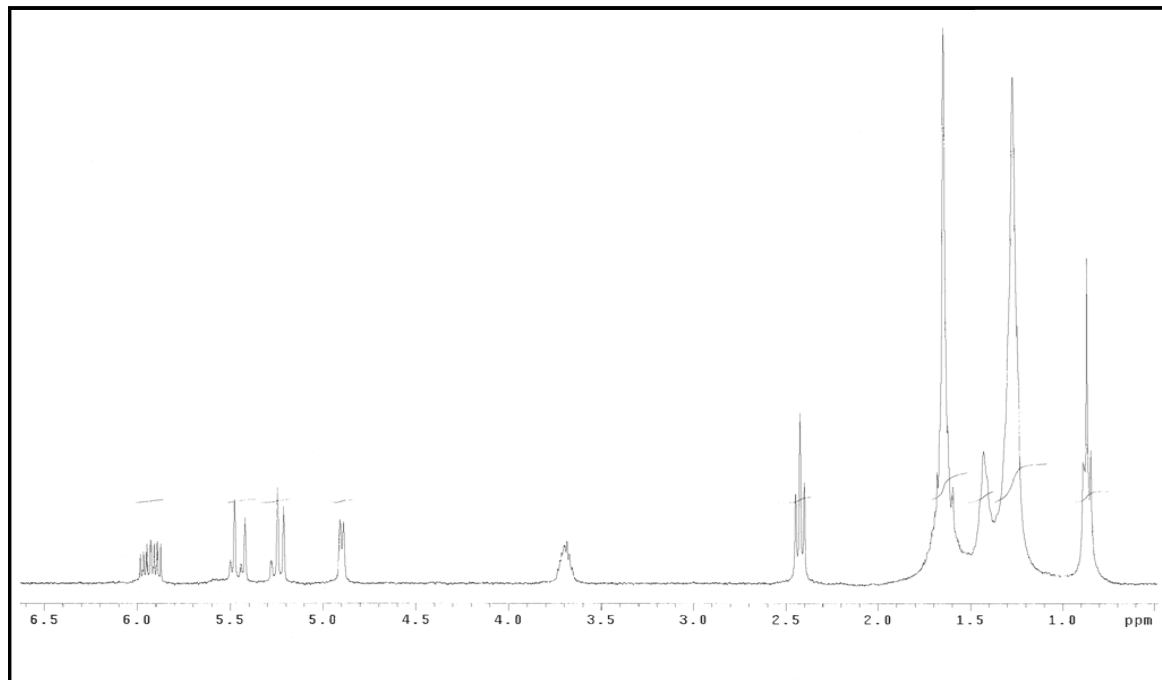


Figura 3.22 Spettro ^1H NMR del composto 6.

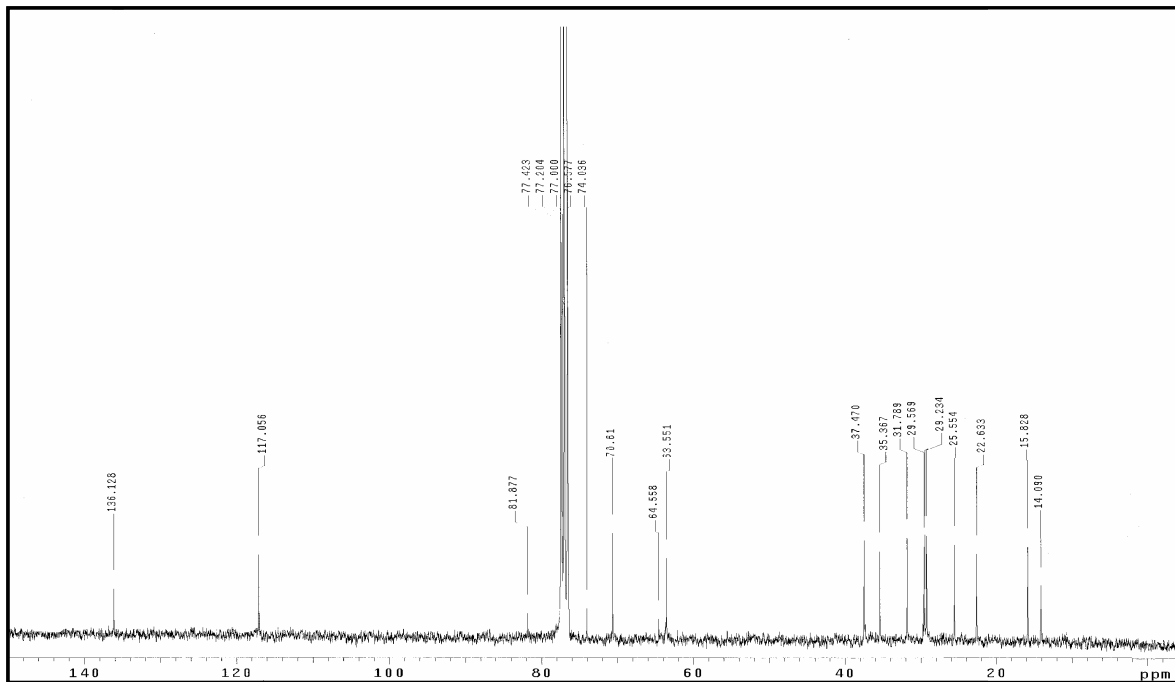


Figura 3.23 Spettro ^{13}C NMR del composto 6.

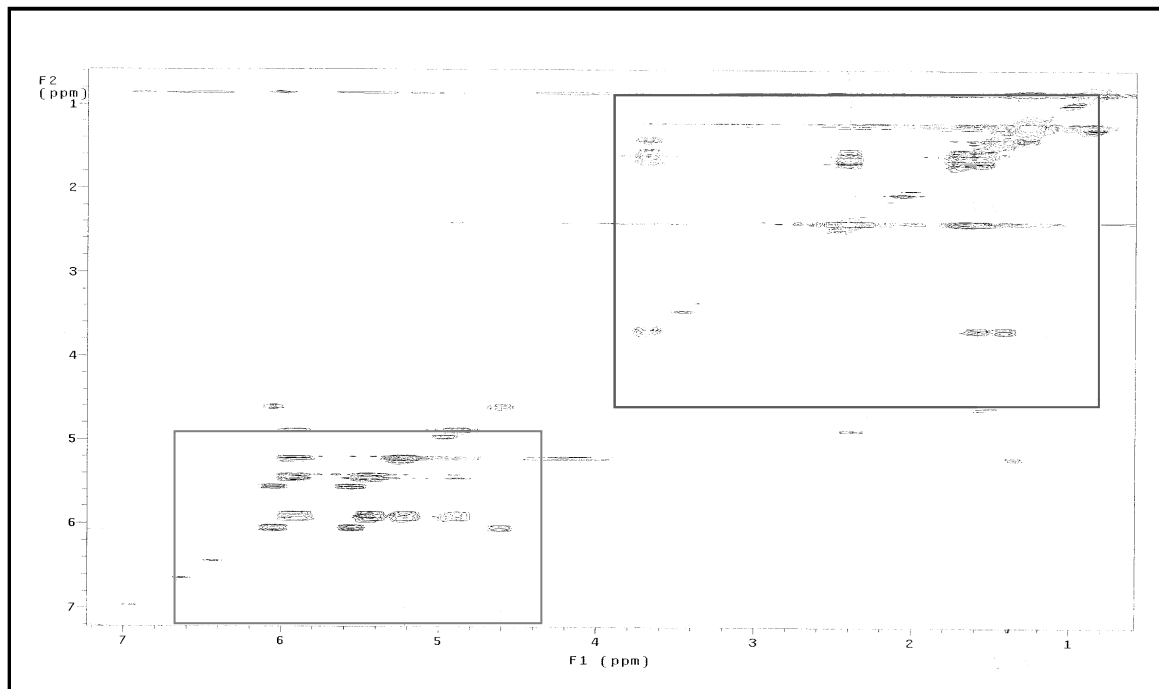


Figura 3.24 Spettro Cosy del composto 6.

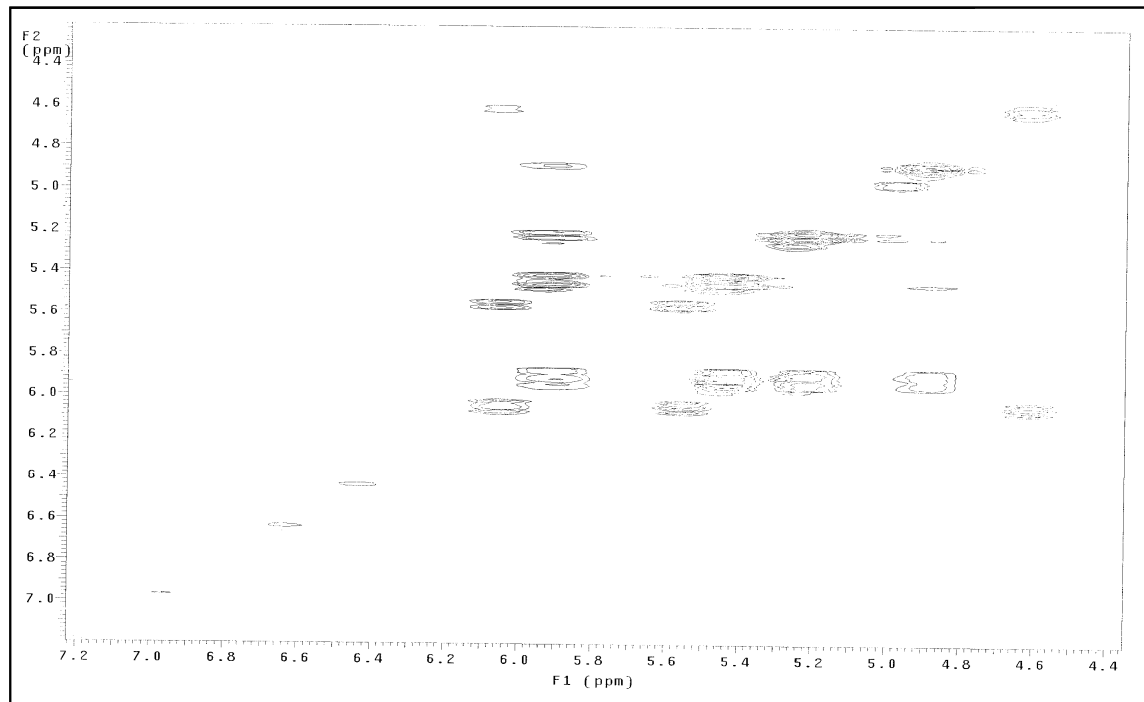


Figura 3.25 Espanso dello spettro Cosy del composto 6 (tra 4.5 a 7 ppm).

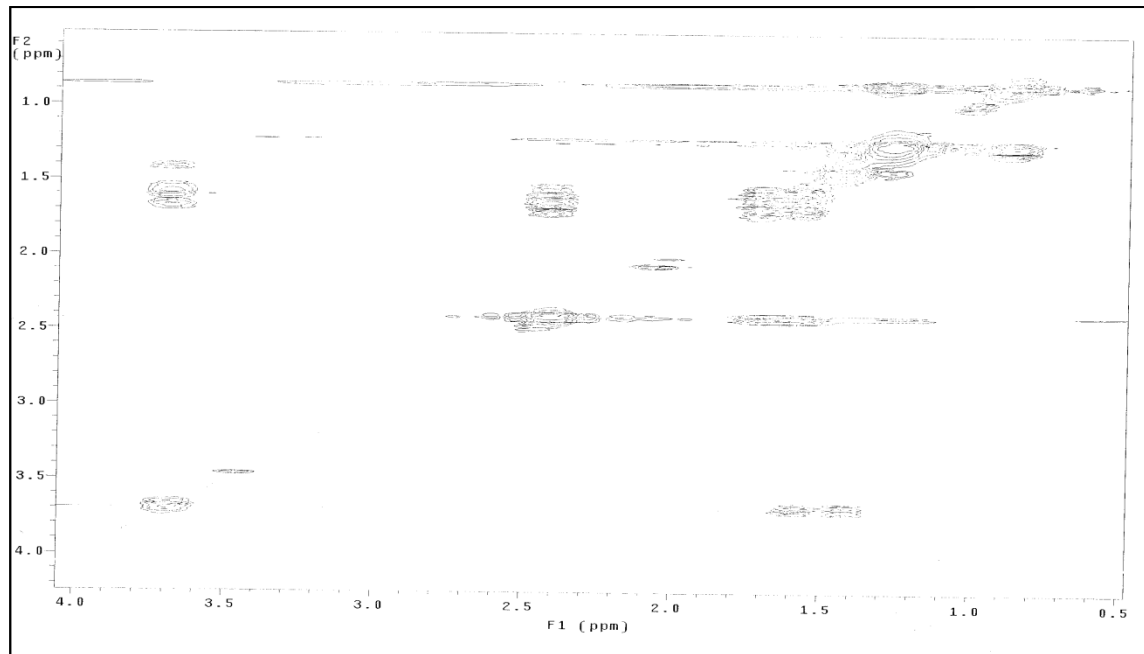


Figura 3.26 Espanso dello spettro Cosy del composto 6 (tra 0.5 a 4 ppm).

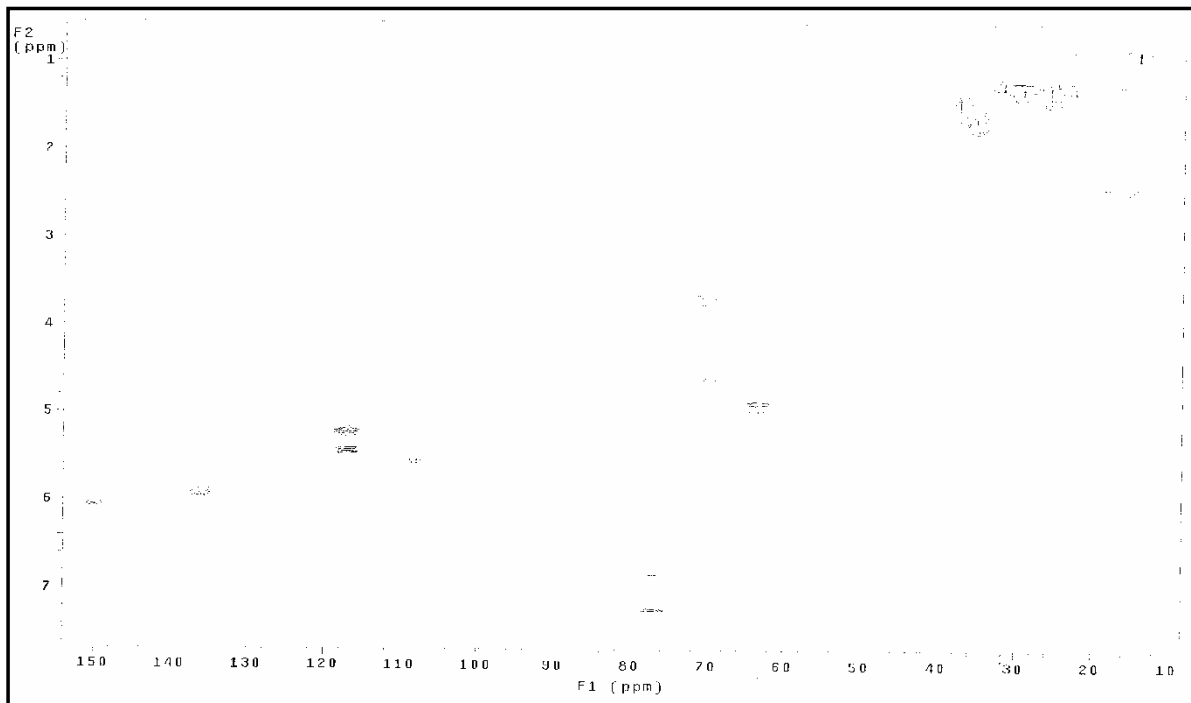


Figura 3.27 Spettro HSQC del composto 6.

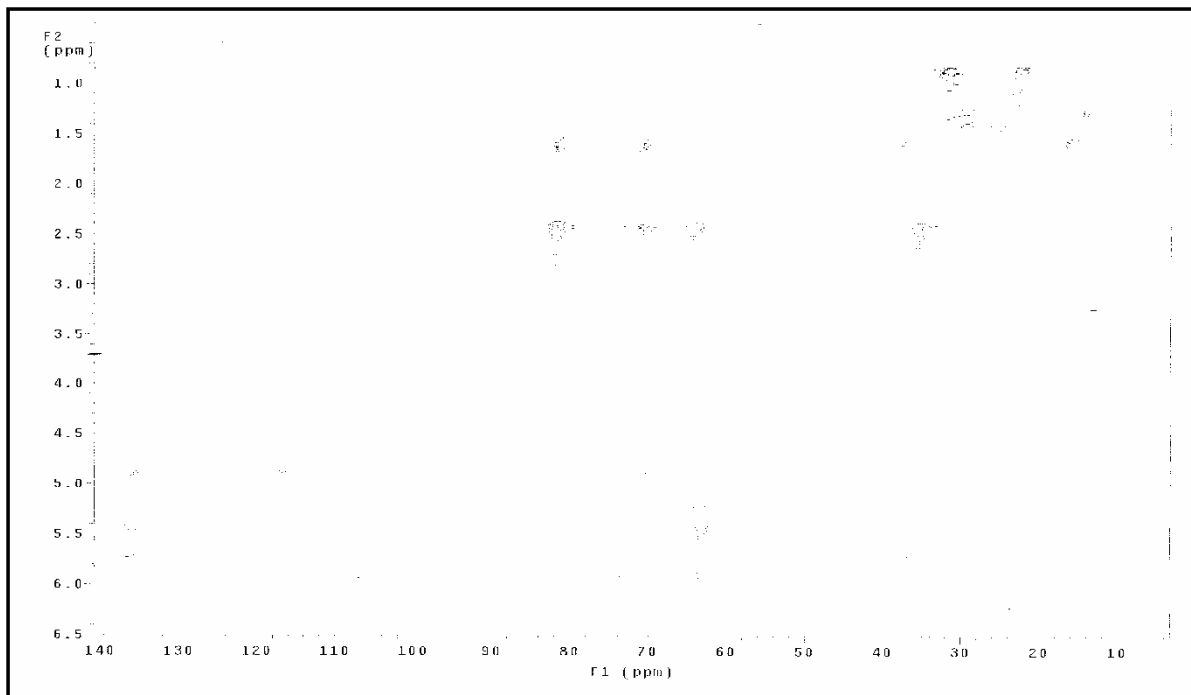


Figura 3.28 Spettro HMBC del composto 6.

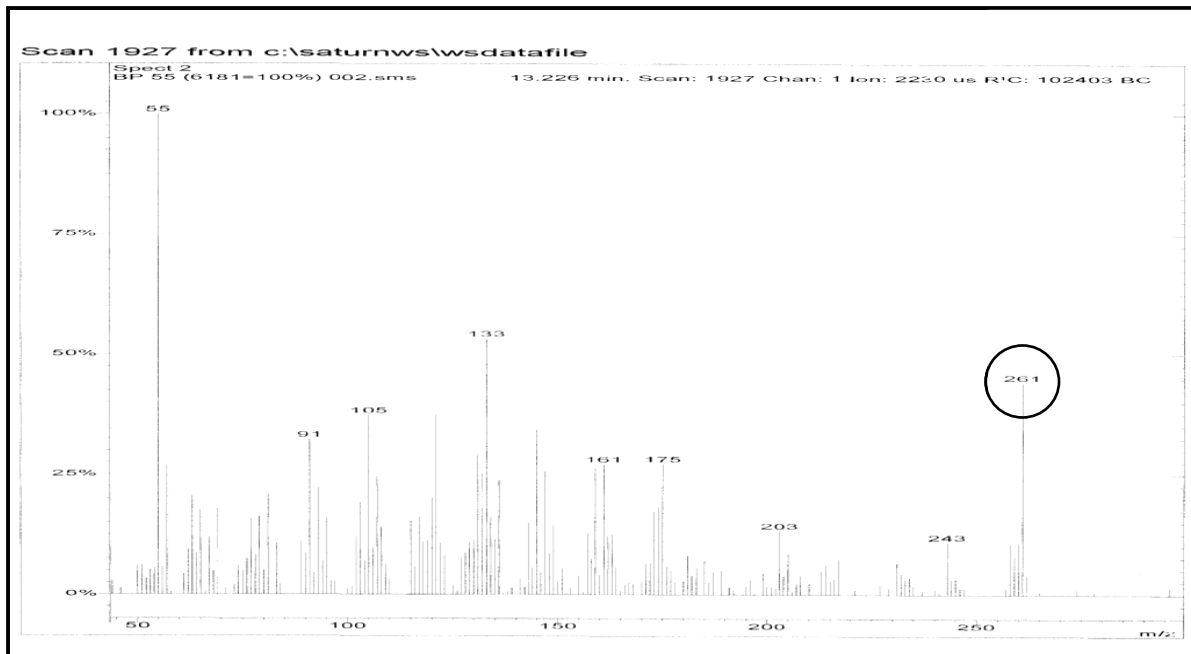


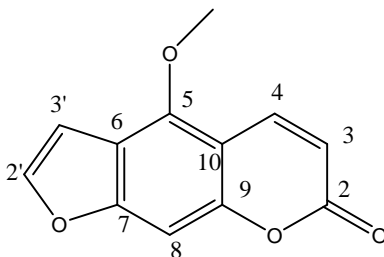
Figura 3.29 Spettro di massa EI del composto 6.

3.6. Delucidazione delle strutture note dalla *Seseli praecox* (Gamisans) Gamisans

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.

3.6.1. Bergaptene



Bergaptene $[\text{M}]^+$ m/z 216.0416 (calc. for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$). Mp 180° (lit. mp 188°), ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.27 (1H, *s*, H-5-OMe), 6.27 (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). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 60.0 (*q*, C-5-OMe), 93.8 (*d*, C-8), 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).

Note bibliografiche:

Bergendorff O., Dekermendjian K., Nielsen m., Shan R., Witt R., Ai J., Sterner O., (1997). *Phytochemistry*, vol. 44, No 6, p 1121-1124.

Harkar. S., Radzan TK., Waight ES., (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* vol. 23, No 2; pp. 419-426.

Razdan T.K., Qadri B., Harkar S., Waight E., (1987). *Phytochemistry*, vol. 26, No 7, p 2063-2069.

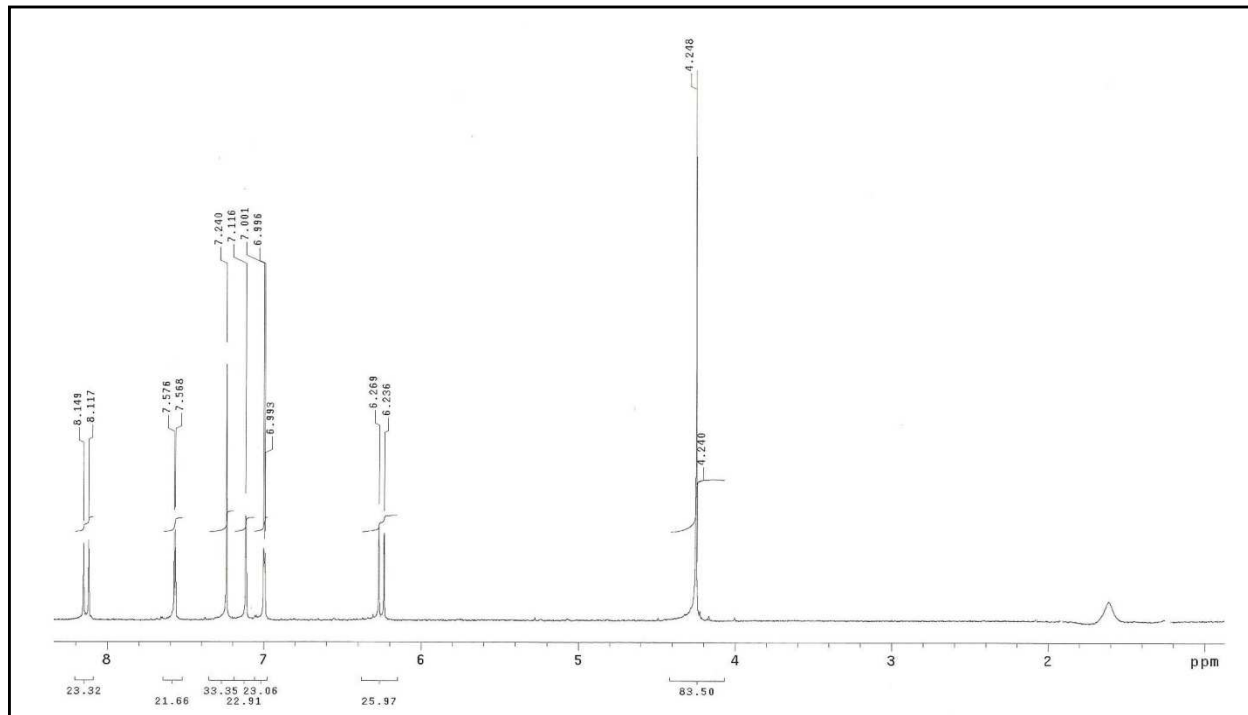


Figura 3.30 Spettro ¹HNMR del Bergaptene.

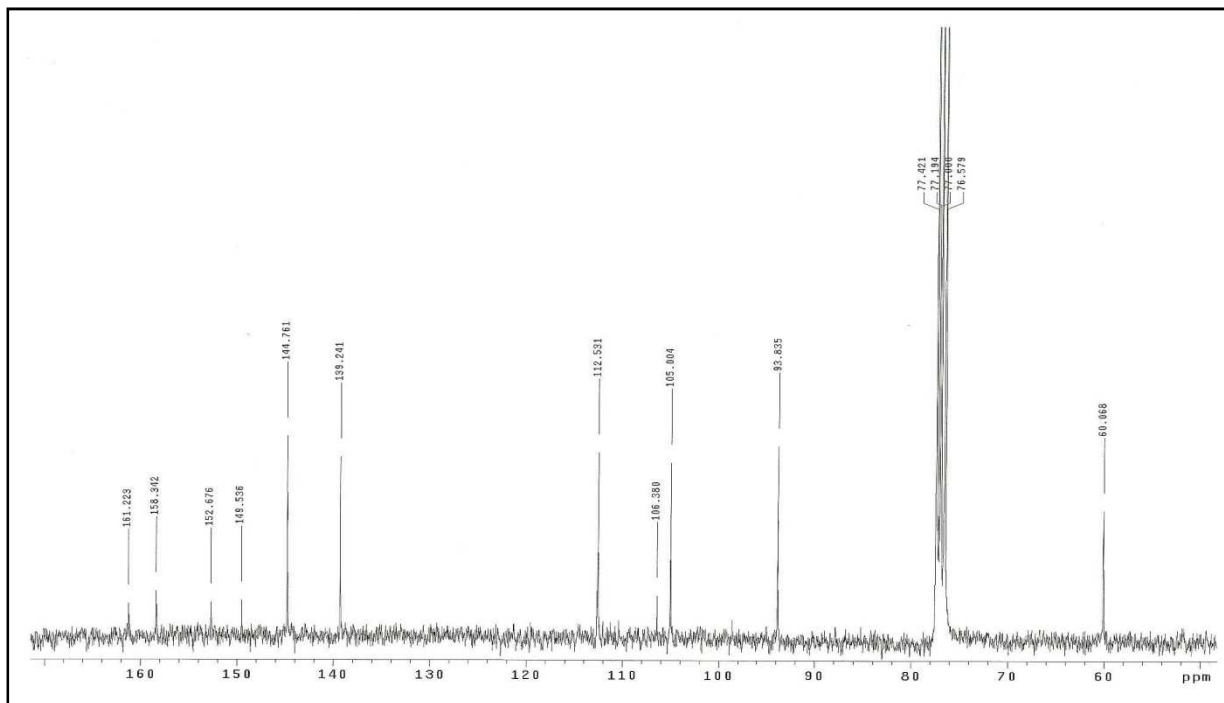
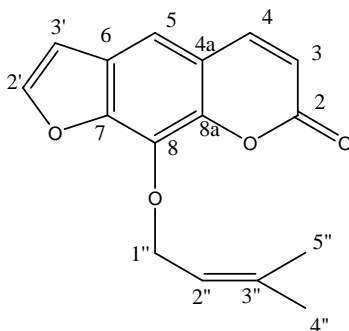


Figura 3.31. Spettro ^{13}C NMR del Bergaptene.

3.6.2. Imperatorina



Imperatorina $[M]^+$ m/z 270.0882 (calc. for $C_{16}H_{14}O_4$). Mp 102° (lit. mp 102-103°), 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.69 (1H, s, H-5''), 1.72 (1H, s, H-4''), 4.98 (1H, d, J = 7.1 Hz H-1_a''), 4.98 (1H, d, J = 7.1 Hz H-1_b''), 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). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 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, C-3''), 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).

Nota Bibliografica :

Bergendorff O., Dekermendjian K., Nielsen m., Shan R., Witt R., Ai J., Sterner O., (1997). *Phytochemistry*, vol. 44, No 6, p 1121-1124.

Zhoung P., Takaishi Y., Duan H., Chen B., Honda G., Itoh M., Takeda Y., Kodzhimatov OK., Lee KH., (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* vol.53; pp. 689-687.

Harkar. S., Radzan TK., Waight ES., (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* vol. 23, No 2; pp. 419-426.

Razdan T.K., Qadri B., Harkar S., Waight E., 1987. *Phytochemistry*, vol. 26, No 7, p 2063-2069.

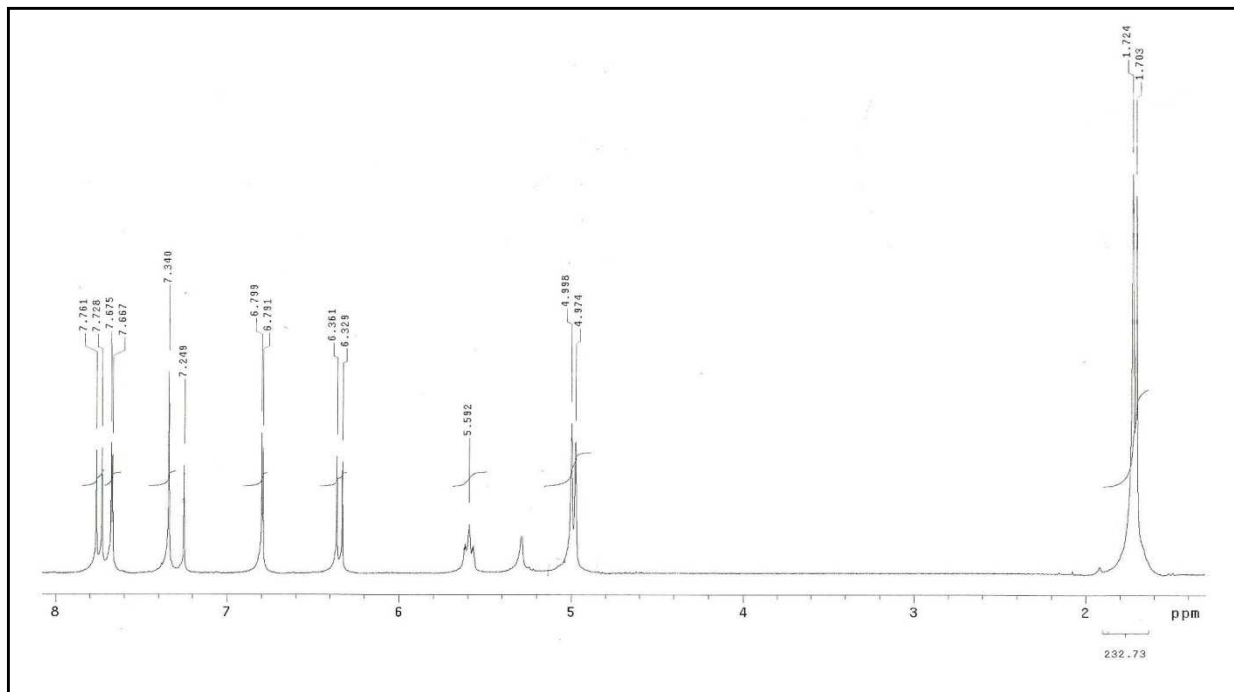


Figura 3.32 Spettro ¹H NMR dell'Imperatorina.

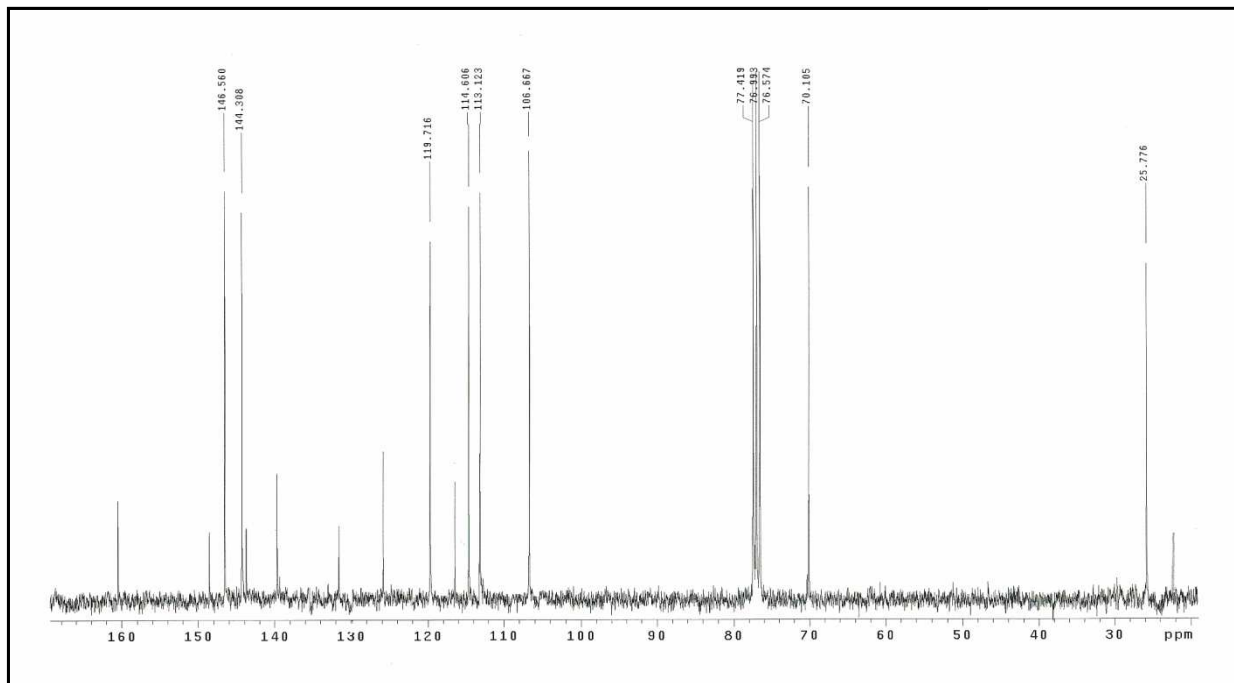
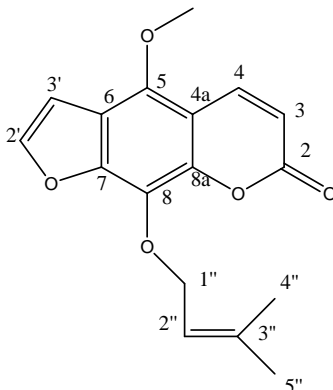


Figura 3.33 Spettro ^{13}C NMR dell'Imperatorina.

3.6.3. Phellopterina



Phellopterina $[M]^+$ 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-1_a''), 4.83 (1H, *d*, $J = 7.3$ Hz H-1_b''), 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).

Nota Bibliografica:

Bergendorff O., Dekermendjian K., Nielsen m., Shan R., Witt R., Ai J., Sterner O., 1997. *Phytochemistry*, vol. 44, No 6, p 1121-1124.

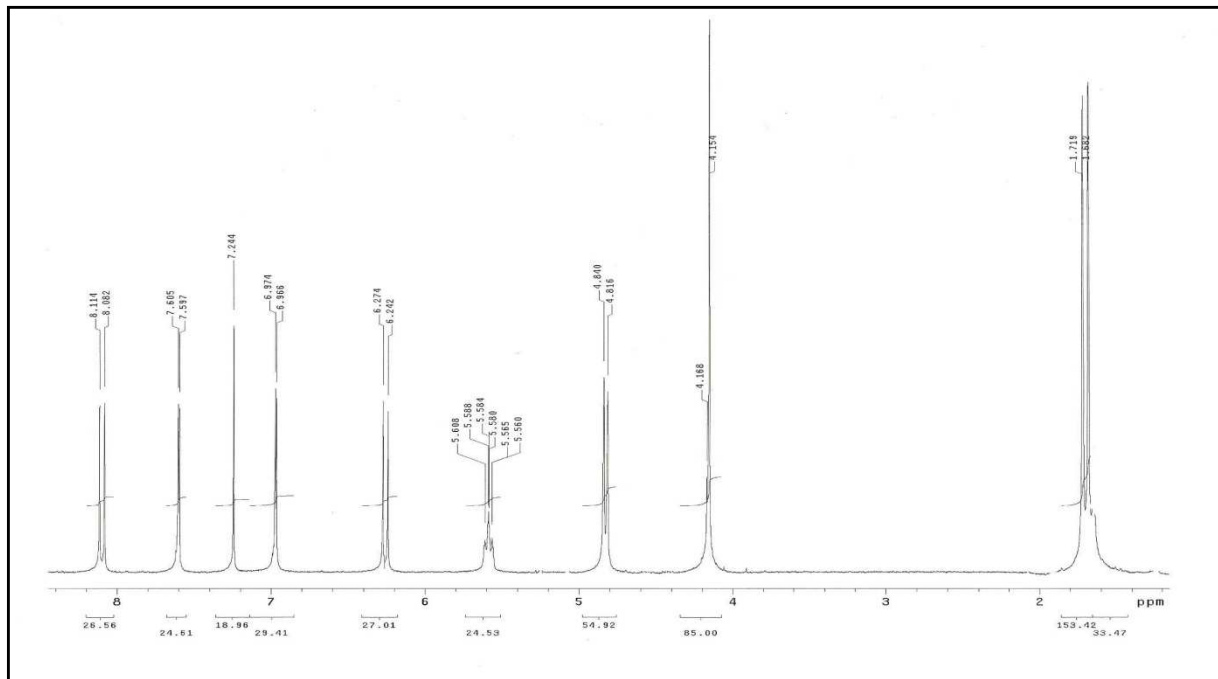


Figura 3.34 Spettro ¹HNMR della Phellopterina.

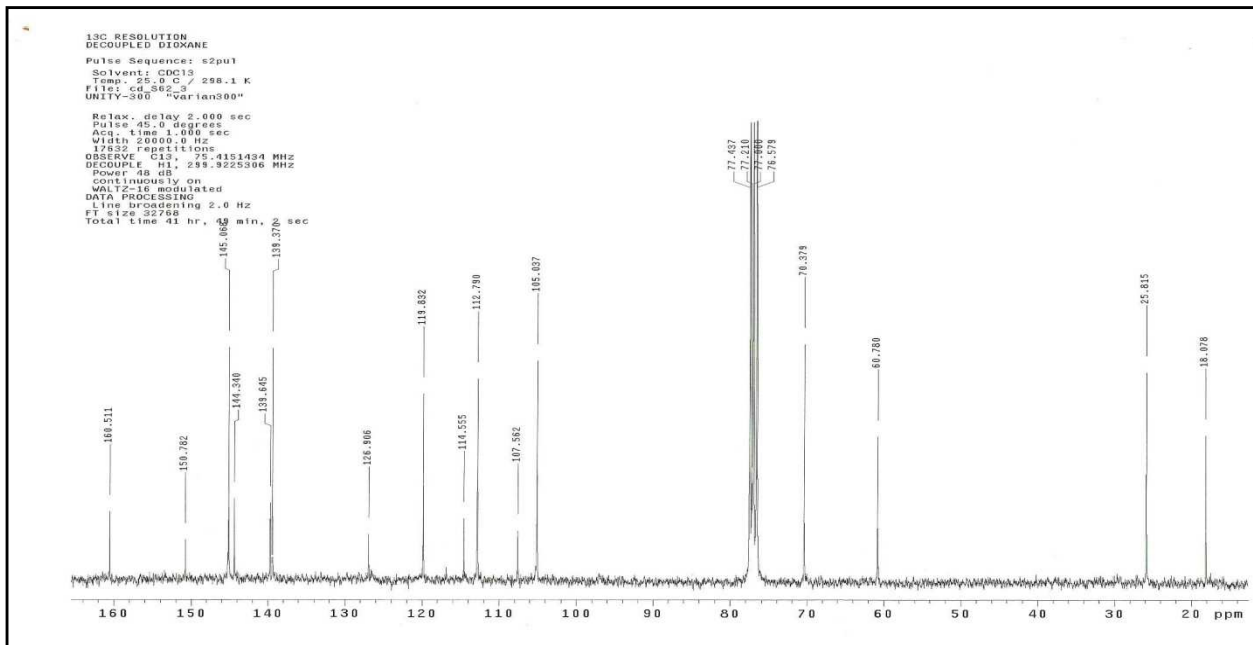
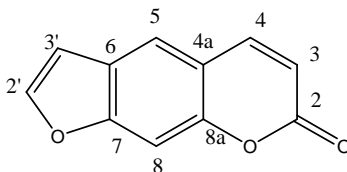


Figura 3.35 Spettro ^{13}C NMR della Phellopterina.

3.6.4. Psolarene



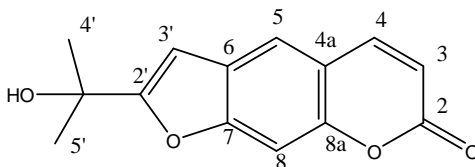
Psolarene $[M]^+$ m/z 186.0310 (calc. for $C_{11}H_6O_3$) mp 156° . UV λ_{\max} nm: 240, 245, 289, 327. 1H NMR(300MHz, $CDCl_3$): δ = 6.33 (1H, d , J = 9.0 Hz, H-3), 6.80 (1H, d , J = 2.2 Hz, H-3'), 7.29 (1H, s , H-8), 7.46 (1H, s , H-5), 7.60 (1H, d , J = 2.2 Hz, H-2'), 7.76 (1H, d , J = 9.0 Hz H-4). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 99.5 (d , C-8), 106.6 (d , C3'), 114.7 (d , C-3), 115.6 (s , C-10), 120.0 (s , C-5), 125.5 (s , C-6), 142.2 (d , C-4), 147.0 (d , C-2'), 152.2 (s , C-9), 156.2 (s , C-7), 161.1 (s , C-2).

Nota Bibliografica:

Razdan T.K., Qadri B., Harkar S., Waight E., (1987). *Phytochemistry*, vol. 26, No 7, p 2063-2069.

Harkar. S., Radzan TK., Waight ES., (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* vol. 23, No 2; pp. 419-426.

3.6.5. Marmesina



Marmesina $[M]^+$ m/z 246.263 (calc. for $C_{14}H_{14}O_4$). Mp 192-193°, 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.22 (3H, s), 1.35 (3H, s), 2.20 (1H, s, OH), 3.20 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2'), 4.71 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-3'), 6.14 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 6.66 (s, H-5), 7.16 (s, H-8), 7.56 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 24.80 (C-4'), 25.80 (C-5'), 28.70 (C-3'), 70.00 (d, C-2'), 91.00 (C-2'), 96.70 (C-8), 111.20 (C-3), 121.10 (C-4a), 123.80 (C-5), 125.60 (s, C-6), 144.60 (s, C-4), 155.10 (C-8a), 160.50 (C-2), 163.30 (C-7).

Nota Bibliografica:

Ishii H., Sekiguchi F., Ishikawa T., (1981). Studies on the chemical constituents of Rutaceous plants -XLI. Absolute configuration of rutaretin methyl ether. *Tetrahedron* vol. 37/2; pp. 285-290.

Jiménez B., Grande MC., Anaya J., Torres P., Grande M., (2000). Coumarins from *Ferulago capillar* and *F. brachyloba*. *Phytochemistry* vol. 53 No. 8; pp. 1025-101.

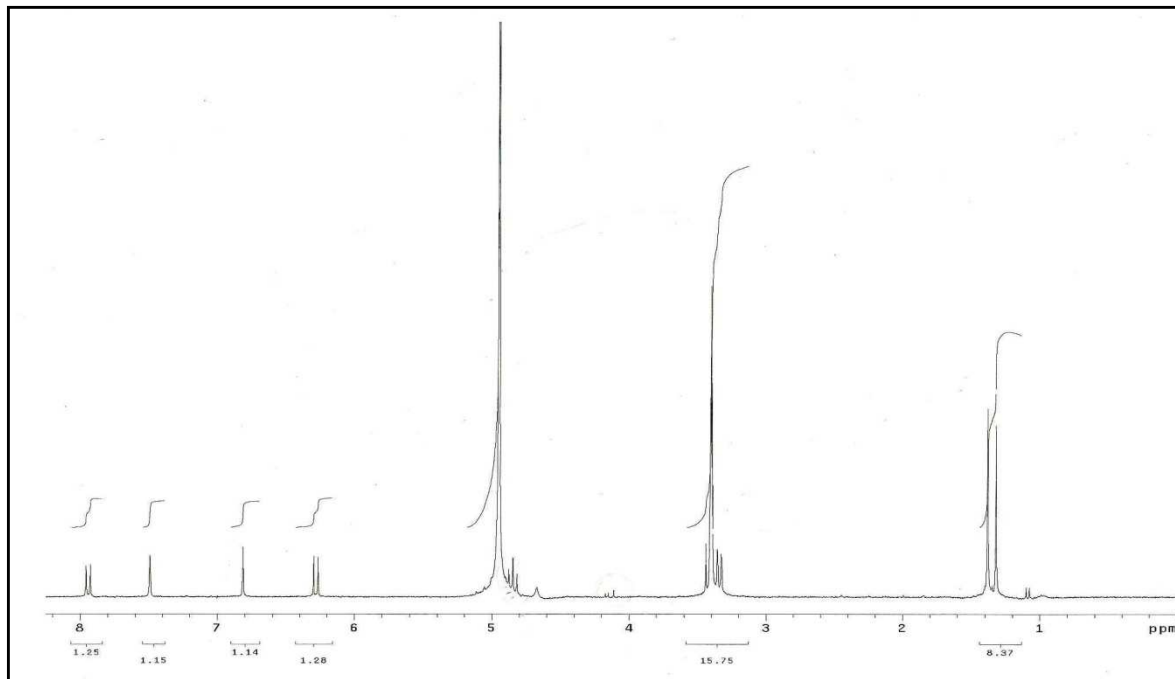


Figura 3.36 Spettro ^1H NMR della Marmesina.

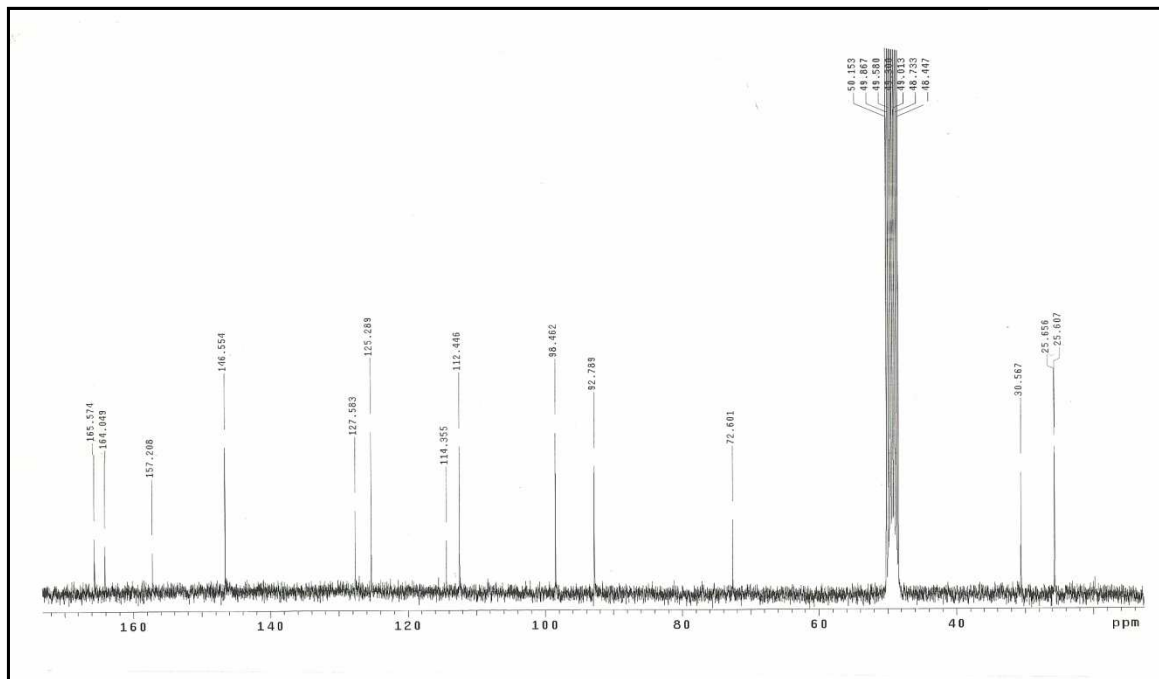
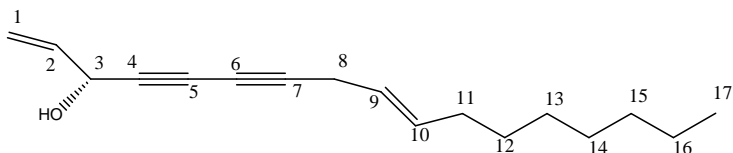


Figura 3.37 Spettro ^{13}C NMR della Marmesina.

3.6.6. Falcarinolo



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

1H NMR (400 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, H-9), 5.37 (*dtt*, J = 10.6, 7.0, 1.2 Hz, H-9), 5.46 (1H, *dt*, J = 17.2, 1.1 Hz, H-1), 5.51 (*dtt*, 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 (100 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).

Nota Bibliografica:

Seger C., Godejohann M., Spraul M., Stuppner H., Hadacek F., (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.

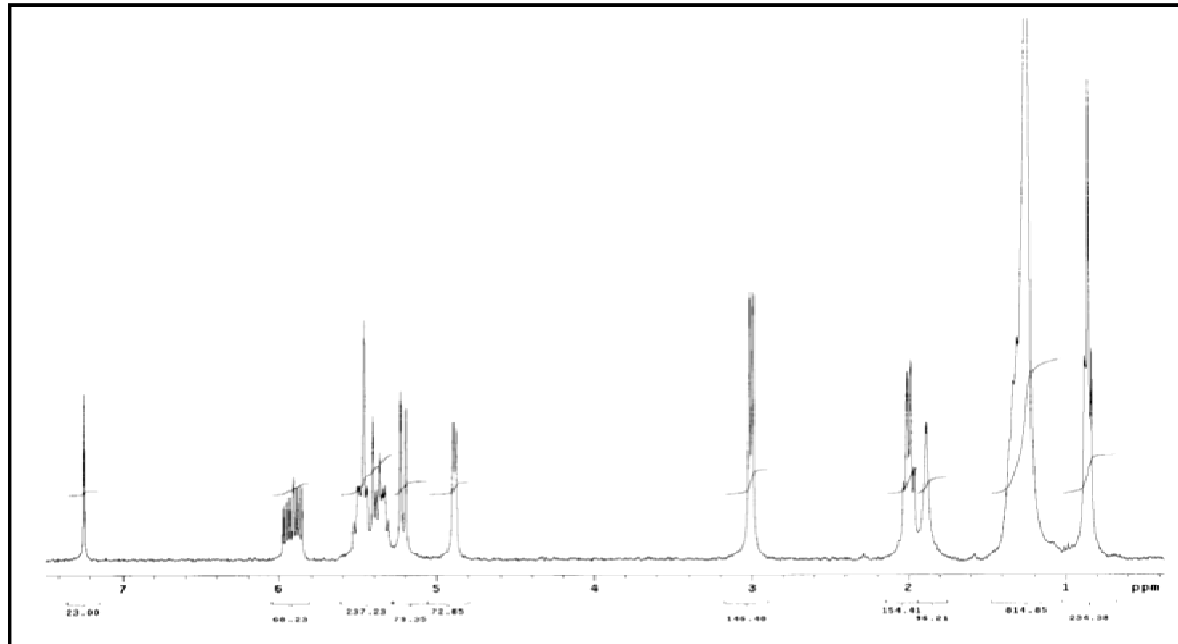


Figura 3.37 Spettro 1HNMR del Falcarinolo.

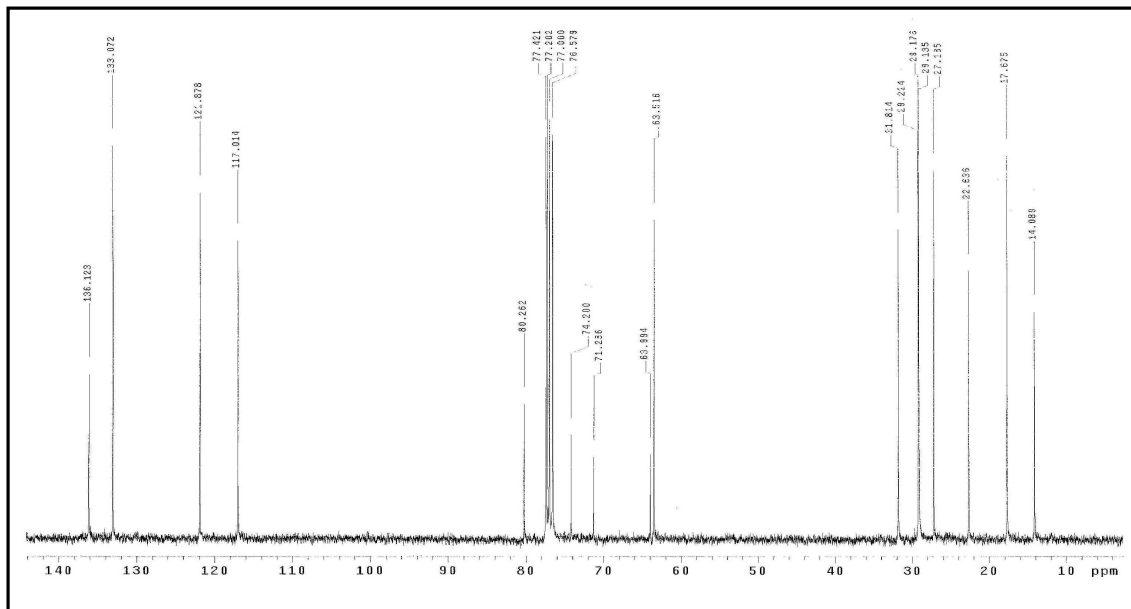
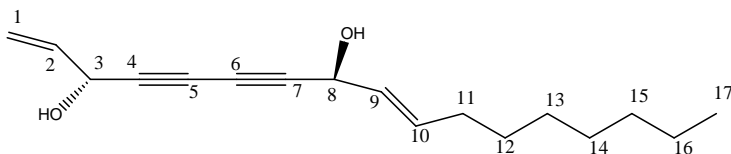


Figura 3.38 Spettro ^{13}C NMR del Falcarinolo.

3.6.7. Falcarindiolo



Falcarindiolo $[M]^+$ m/z 260.24 (calc. for $C_{17}H_{24}O_2$). 1H NMR (400 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 (*dtd*, 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 (100 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).

Nota Bibliografica:

Seger C., Godejohann M., Spraul M., Stuppner H., Hadacek F., (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.* Vol. 51; pp. 507-516.

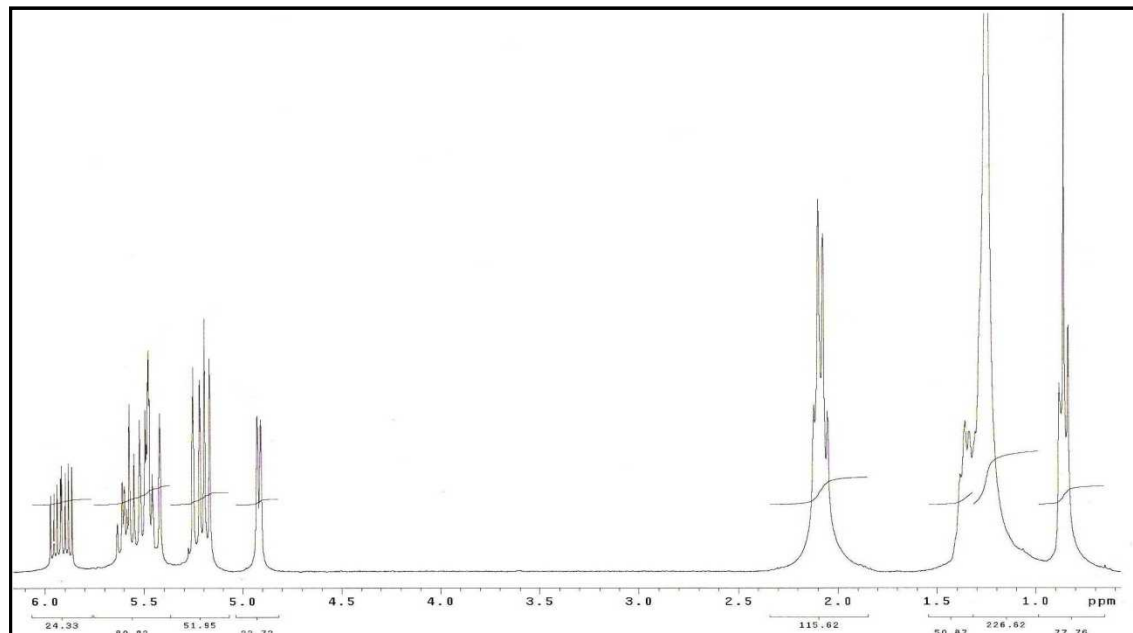


Figura 3.39 Spettro ^1H NMR del Falcarindiolo.

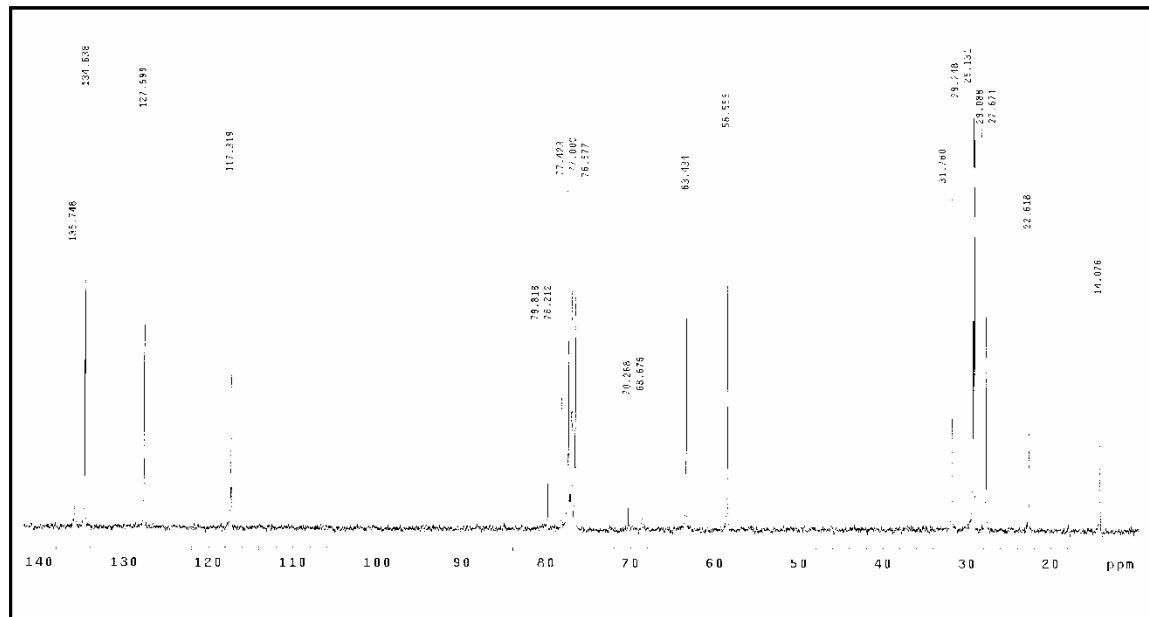
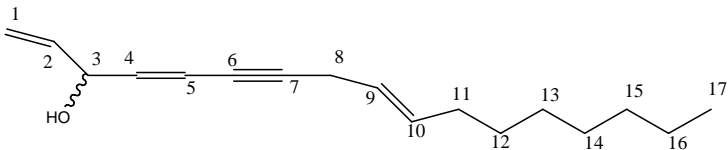


Figura 3.40 Spectro ^{13}C NMR del Falcarindiol.

3.6.8. Ginsenone J



Ginsenone J $[M]^+$ m/z 246.3918 (calc. for $C_{17}H_{26}O$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.88 (3H, *brt*, J = 7.0 Hz, H-17), 1.22 (2H, *m*, H-13), 1.22 (2H, *m*, H-14), 1.32 (2H, *m*, H-15), 1.32 (2H, *m*, H-16), 1.37 (2H, *br qui*, J = 7.0, H-12), 2.04 (2H, *qdt*, J = 6.0, 1.4, 0.7 Hz, H-11), 3.05 (2H, *d*, J = 6.0, Hz, H-8), 4.64 (1H, *brt*, J = 6.0 Hz H-3), 5.16 (1H, *dt*, J = 10.3, 1.3 Hz, H-1a), 5.28 (1H, *dt*, J = 17.2, 1.3 Hz, H-1b), 5.41 (*dt*, J = 10.7, 6.3, 1.4, Hz, H-9), 5.48 (1H, *dt*, J = 10.7, 7.2, 1.6, Hz, H-10), 5.72 (1H, *dtd*, J = 15.9, 2.3, 1.5 Hz, H-5), 5.85 (1H, *ddd*, J = 17.2, 10.3, 5.9 Hz, H-2), 6.06 (1H, *ddt*, J = 15.9, 6.4, 0.7 Hz, H-4). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.1 (C-17), 17.8 (C-8) 22.7 (C-16), 27.2 (C-11), 29.1 (C-14), 29.2 (C-13), 29.4 (C-12), 31.9 (C-15), 73.3 (C-3), 77.9 (C-7), 90.0 (C-6), 111.2 (C-5), 115.8 (C-1), 123.7 (C-9), 132.1 (C-10), 138.5 (C-2), 142.1 (C-4).

Nota Bibliografica:

Hirakura K., Morita M., Yukinobu I., Mitsuhashi H., (1992). Three acetylenic compounds from roots of *Panax ginseng*. *Phytochemistry* vol. 31 No. 3; pp. 899-903.

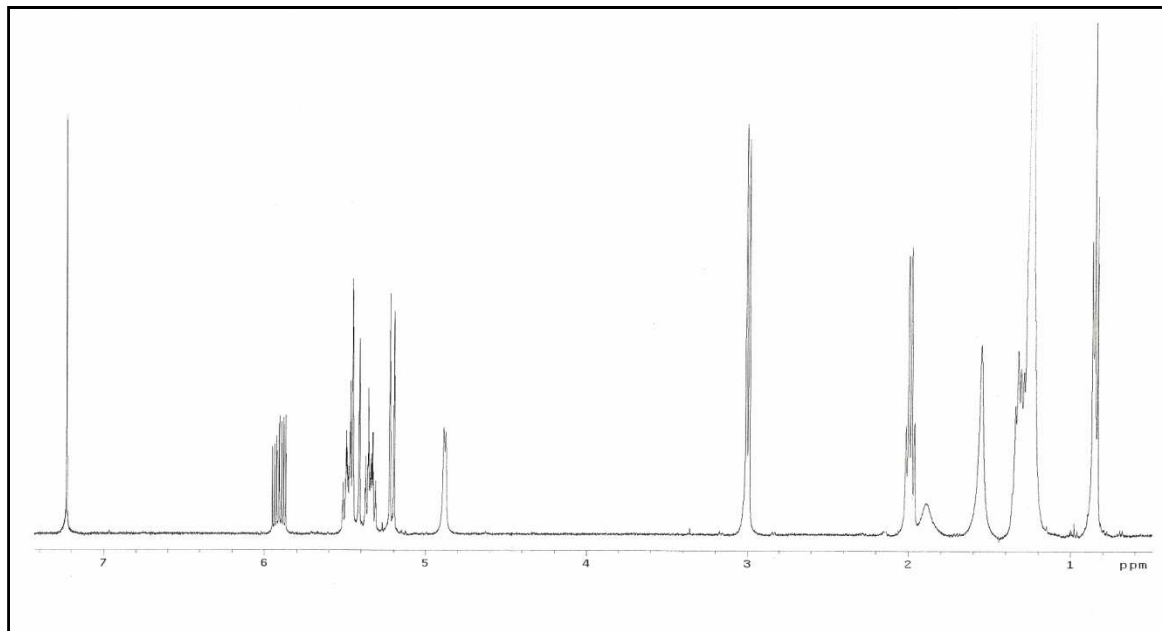
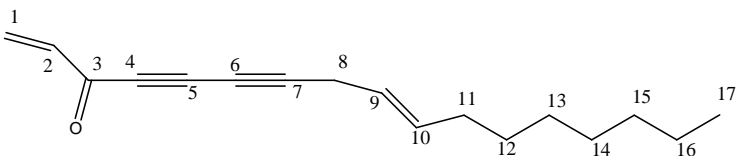


Figura 3.41 Spettro ¹HNMR del Ginsenone J (o (4E,9Z)-1,4,9-heptadecatriene-6-yn-3-ol o 4,5-dihydropanaxynol).

3.6.9. Falcarinone



Falcarinone $[M]^+$ m/z 242.36 (calc. for $C_{17}H_{22}O$) 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.88 (3H, *t*, J = 6.9 Hz, H-17), 1.31 (2H, *m*, H-13), 1.31 (2H, *m*, H-14), 1.31 (2H, *m*, H-15), 1.31 (2H, *m*, H-16), 1.31 (2H, *m*, H-12), 2.05 (2H, *t*, J = 13.2 Hz H-11), 3.12 (2H, *d*, J = 5.5 Hz, H-8), 5.20-5.40 (1H, *m*, J = 9.0 Hz H-1a-1b), 5.30-5.50 (1H, *m*, J = 7.0 Hz, H-9), 5.50 (1H, *m*, J = 7.0 Hz, H-9), 5.83-5.98 (*m*, C-2). 4.83 (*d*, H-4). ^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 14.08 (C-17), 17.67 (C-8), 22.63 (C-16), 27.18 (C-11), 29.21 (C-14), 29.16 (C-13), 29.14 (C-12), 31.8 (C-15), 63.53 (C-3), 74.18 (C-7), 85.75 (C-6), 111.81 (C-5), 117.04 (C-1), 121.87 (C-9), 133.08 (C-10), 136.78 (C-2), 184 (C-4).

Nota bibliografica:

Schulte KA., Pötter B., (1977). Polyacetylene aus *Pituranthus tortuosus* (Desf.) Bnth. u. Hook. Archiv der Pharmazie vol. 310; 945-863.

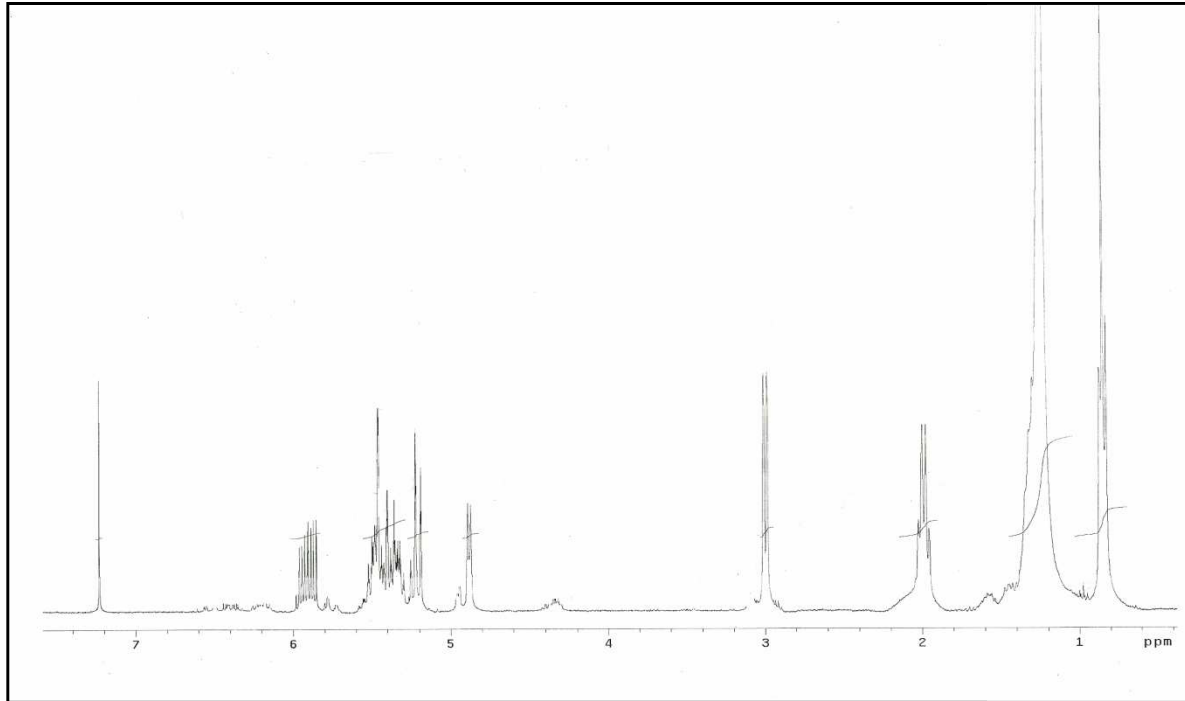


Figura 3.42 Spettro ^1H NMR del Falcarinone.

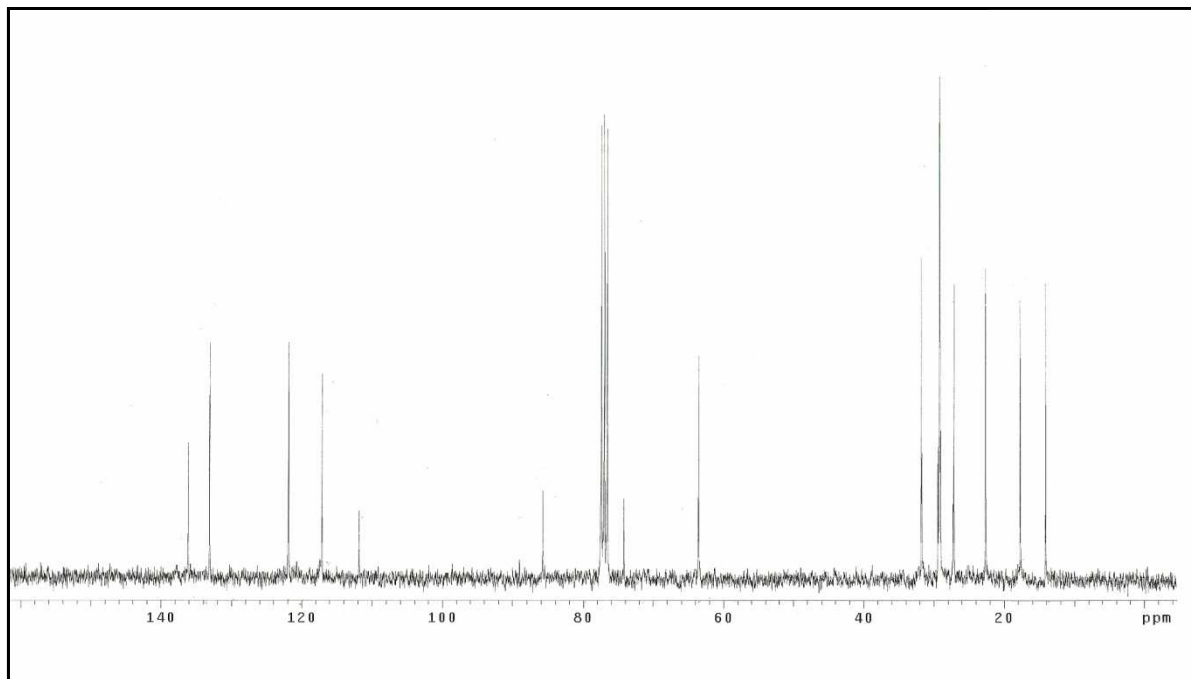
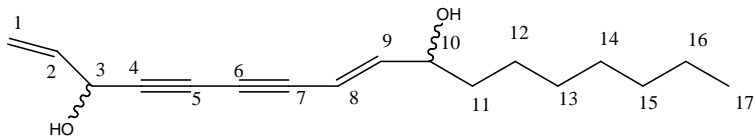


Figura 3.43 Spettro ^{13}C NMR del Falcarinone.

3.6.10. E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol



E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol $[M]^+$ m/z 260,3754 (calc. for $C_{17}H_{24}O_2$). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.81 (3H, *t*, H-17), 1.39 (2H, *m*, H-13), 1.39 (2H, *m*, H-14), 1.39 (2H, *m*, H-15), 1.39 (2H, *m*, H-16) 4.12 (1H, *dt*, $J = 5.6, 2.0$ Hz, H-10), 4.91 (1H, *d*, $J = 5.4$ Hz, H-3), 5.19 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, H-1b), 5.41 (1H, *d*, $J = 17.1$ Hz, H-1a), 5.70 (1H, *d*, $J = 15.9$, Hz, H-8), 5.89 (1H, *ddd*, $J = 17.2, 9.6, 5.4$ Hz, H-2), 6.27 (1H, *dd*, $J = 15.9, 5.6$ Hz, H-9). ^{13}C NMR (50,32 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.06 (C-17), 22.61 (C-15), 25.12 (C-12), 29.07 (C-13), 29.4 (C-14), 31.72 (C-16), 32.17 (C-11), 63.6 (C-3), 71.0 (C-6), 72.8 (C-10), 73.7 (C-5), 85.7 (C-4), 11.8 (C-8), 117.3 (C-1), 135.8 (C-2), 145.9 (C-9).

Nota Bibliografica:

Shim SC., Chang SK., Hur CW., Kim CK., (1987). A polyacetylenic compound from *Panax ginseng* roots. *Phytochemistry* vol. 26 No. 10; pp. 2849-2850.

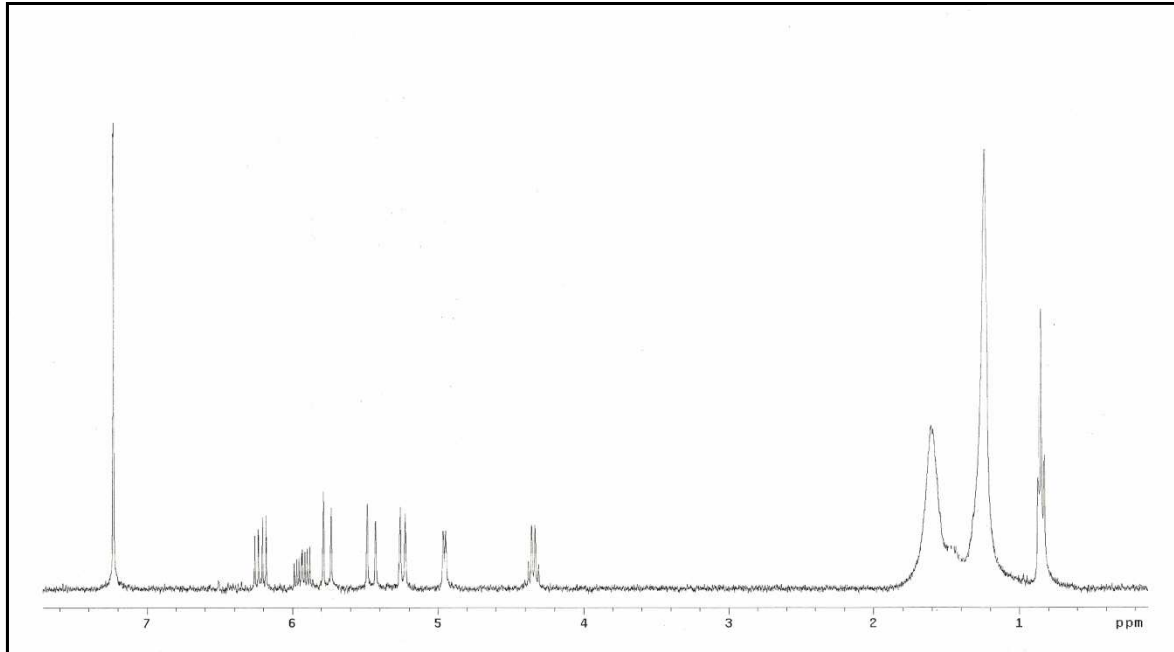


Figura 3.44 Spettro ¹HNMR dell' E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol.

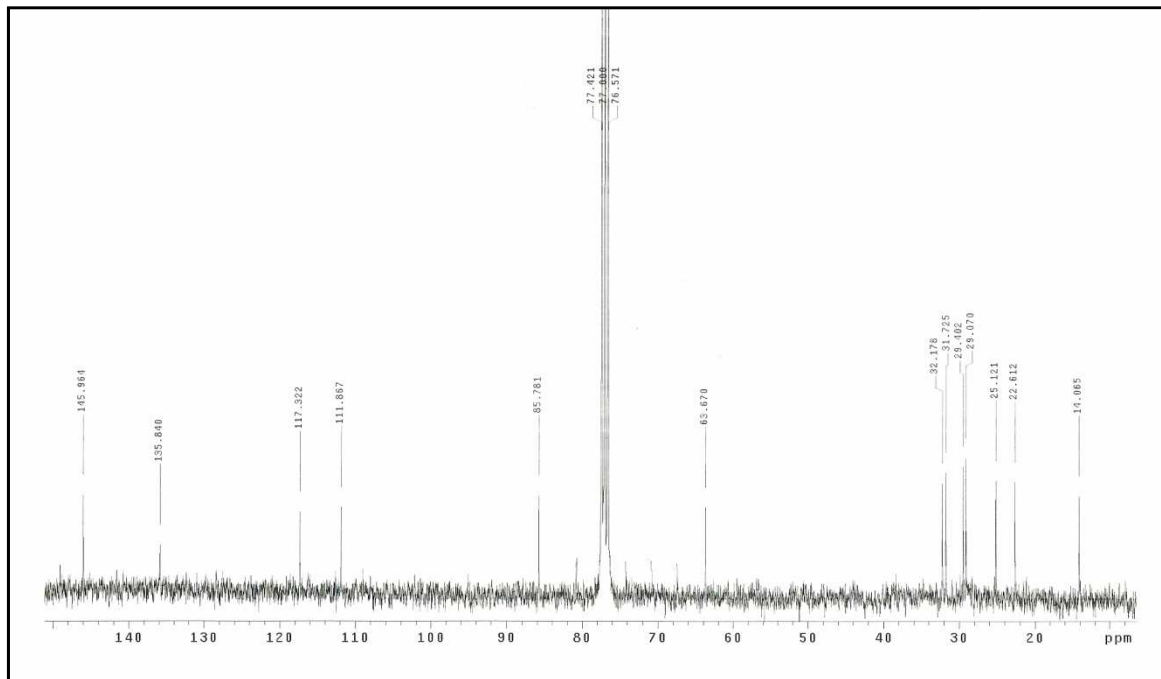


Figura 3.45 Spettro ^{13}C NMR dell' E-heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol.

3.7. Risultati biologici sui composti isolati dalla *Seseli praecox* Gamisans (Gamisans)

3.7.1. Citotossicità del 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3 hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone

Il nuovo cromone da noi isolato, ha mostrato attività citotossica verso diversi tipi di linee cellulari. In particolare è stato testato su cellule Jurkat T (ATCC TIB-152), cellule HL-60 (ATCC CCL-240), cellule MCF-7 (ATCC HTB-22) e cellule PC₃ (ATCC CRL- 1435) dal gruppo di ricerca del Prof. Jürg Gertsch dell'Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern, Svizzera.

I dati relativi sono riportati in Tabella 3.1.

E' da notare innanzitutto che, in uno studio biologico preliminare, il nostro nuovo cromone, a concentrazioni intorno a 10 µM, non ha mostrato livelli di citotossicità associata ad effetti antiproliferativi apprezzabili.

Tipo cellulare	Citotossicità (µM)	Tipo di cultura
Jurkat (cellule T leucemiche)	12.9 ± 0.8	sospensione
HL60 (leukemia promielotica)	14.2 ± 1.3	sospensione
MCF7 (tumore al fegato)	> 50	aderente
PC3 (tumore prostatico)	> 50	aderente

Tabella 3.1: Citotossicità del composto 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3 hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone verso 4 linee di cellule tumorali (N=3 ± S.D.).

E' stato utilizzato un controllo positivo con paclitaxel (tassolo) che presenta valori di IC₅₀, per tutte le linee cellulari, pari a < 50 nM.

E' inoltre interessante notare come nelle cellule Jurkat T e nelle cellule leucemiche HL60 questo composto presenta una IC₅₀ di circa 20 µM, mentre nelle cellule MCF-7 (tumore al fegato) e PC₃ (tumore prostatico) si evidenziano segni di citotossicità con valori al di sopra di 50 µM. Questo dimostra che la crescita di colture di cellule a sospensione, che si riscontra in cellule tumorali del tipo Jurkat T e HL60, è

maggiormente suscettibile all'inibizione rispetto alle cellule tumorali con coltura di tipo aderente come quelle MCF-7 e PC₃.

Sono auspicabili in futuro degli studi atti ad evidenziare le proprietà immuno modulatorie di questo nuovo cromone

Per quanto riguarda gli esperimenti di citotossicità, questa è stata verificata, per il composto puro, sulle linee cellulari Jurkat T (ATCC TIB-152), cellule HL-60 (ATCC CCL-240) dopo 72 h di esposizione, come descritto nel lavoro di Hilmi (Hilmi et al. 2003). Mentre, per quanto riguarda le linee di tipo MCF7 (ATCC HTB-22) e PC3 (ATCC CRL- 1435), queste sono state coltivate e fatte assestare, successivamente dopo 72 h, si sono seguite le procedure del protocollo descritto da Feyen (Feyen et al. 2006).

Il 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl)-3 hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone è stato testato in un range di concentrazione espresso tra 0.5 and 60 µM. La deviazione standard massima è stata del 10% (assoluta).

3.7.2. Falcarinolo

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 (Hansen et al.1986), un effetto dose-dipendente bifasico (Calabrese 2003) del falcarinolo su cellule epiteliali. 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, una biodisponibilità di falcarinolo dalle carote, 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.

3.7.2.1. Test sui ligandi dei recettori CB

Nella nostra continua ricerca di nuovi ligandi dei recettori CB da librerie di estratti di piante (Gertsch et al 2008), l'estratto in DCM dei fusti della *S. praecox* (sciolto in DMSO) è stato identificato per la capacità ad alta affinità (concentrazione-dipendente) di spostare il ligando [3H] CP55,950 recettoriale non-selettivo dei cannabinoidi (Gertsch et al 2008) dai recettori CB.

Il positivo "hit rate" (spostamento > 50% a 10 µg / ml), alle condizioni di screening utilizzate è stato di circa 1 a 80.

L'estratto della *S. praecox Gamisans* (Gamisans) ha prodotto valori riproducibili di K_i a bassa concentrazione (µg/ml) per entrambi i recettori per CB_1 ($K_i = 1.2$ µg/ml) e CB_2 ($K_i = 985$ ng/ml) rispettivamente.

Successivi frazionamenti cromatografici bio-guidati dell'estratto grezzo lipofilo hanno evidenziato una maggiore frazione vincolante il recettore CB (frazione 2.9). Questa frazione è stata purificata mediante HPLC, portando all'isolamento e alla delucidazione del falcarinolo (composto **1**), che è stato identificato come il principale responsabile per l'interazione con i recettori CB della *S. praecox* con valori di K_i per i recettori CB_1 e CB_2 di 590 nM e 4 nM, a seconda delle condizioni di radioligante e del dosaggio utilizzato (vide infra).

È importante sottolineare che il falcarinolo non era in grado di spostare in modo significativo i radioligandi ($\geq 50\%$ a 10 µM) da canali transient receptor potential vanilloide 1 (TRPV1), il formil peptide-tipo1 (FPR1), recettori serotonina 1A (5-HT1A) e canali 5-HT3 (Fig. 3.46), indicando così che l'interazione di legame con i recettori CB rilevata non era dovuta ad effetti non specifici della membrana. Inoltre, il falcarindiol (composto **2**), un analogo naturale del falcarinolo non ha mostrato affinità rilevabili verso i recettori CB.

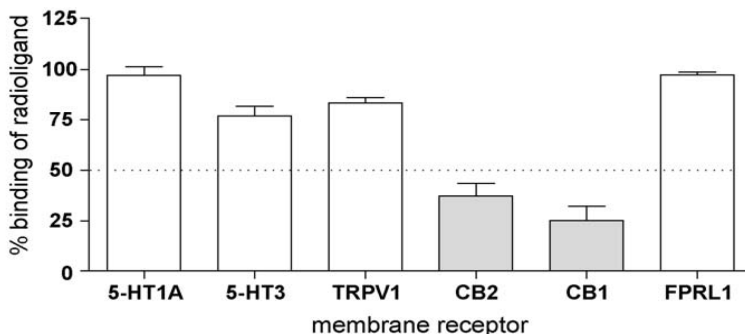


Figura 3.46 Displacement of selective radioligands from different membrane proteins (serotonin 5-HT1A receptor (3%); 5-HT3 (24%) ion channel, transient receptor potential vanilloid-1; TRPV1 channel (16%), cannabinoid type-2; CB2 (63%); cannabinoid type-1; CB1 (75%), formyl-peptide like-1 (FPRL-1) receptor (3%) by falcarinol (10 mM), Data are mean values of three independent experiments _ SD.

3.7.2.2. Interazione di legame del falcarinolo con I recettori CB₁ and CB₂

Sulla base dei risultati precedenti, studi dettagliati sui ligandi recettoriali sono stati possibili solo dopo aver isolato il falcarinolo e ed successivamente monitorato la sua stabilità mediante ¹H NMR e HPLC.

La curva di spostamento del ligando sintetico [3H] CP55,940 dai recettori CB, stabilmente espressi in cellule HEK293, ottenuta con il falcarinolo era quasi identica per i recettori CB₁ e CB₂ (Fig. 3.47) con analoghi valori K_i calcolati con il Hill-plots (*h*CB₁ K_i = 3,78 ± 0,23 μM *h*CB₂ K_i = 2.36 ± 0.04 μM).

Abbastanza curioso è il fatto che quando si utilizza il radioligante [3H]anandamide, i valori di K_i ottenuti sono stati significativamente più bassi e selettivi per il recettore CB₁ (*h*CB₁ K_i = 594 ± 37 nM; *h*CB₂ K_i = 2,1 ± 0,16 μM). Sulla base di questo risultato abbiamo ipotizzato che il falcarinolo possa formare un legame covalente (cioè potenzialmente irreversibile) del recettore CB₁, ma non nel recettore CB₂, coinvolgendo l'acililazione di gruppi mercapto e amminici e che il presunto addotto nel recettore CB₁ si sovrappone più da vicino con il ligando [3H]anandamide del ligando [3H] CP55940.

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Per avvalorare questa domanda abbiamo sperimentalmente incubato 20 μM di falcarinolo e rimonabant con membrane recettoriali CB_1 per 3 ore a 37 ° C, quindi lavate bene le membrane con tampone di lavaggio e, infine, saturato le membrane con alte concentrazioni di $[3\text{H}]$ anandamide (50 nM) prima di un lavaggio finale. Come mostrato in Figura 3.48, utilizzando questo protocollo le membrane trattate con falcarinolo non potevano essere completamente saturate con un eccesso di $[3\text{H}]$ anandamide (34% del controllo), mentre le membrane trattate con rimonabant sono risultate saturate (96% del controllo).

Quando lo stesso esperimento è stato effettuato con le membrane dei recettori CB_2 transfettate questo effetto è stato molto meno pronunciato (Figura 3.48) cosa che suggerisce il blocco selettivo del sito di legame dell'anandamide del recettore CB_1 . L'analisi Dixon ha inoltre indicato che il falcarinolo interagisce competitivamente con il sito di legame dell'anandamide del recettore CB_1 (Figura 3.49).

Sebbene non sia una prova definitiva, questi risultati insieme al relativo potente effetto in vivo (vide infra) suggeriscono fortemente l'interazione covalente e potenzialmente irreversibile con il recettore CB_1 .

In particolare, il falcarindiolo, che ha un ulteriore gruppo idrossile nel carbonio 8 non sposta $[3\text{H}]$ CP55, 940 dai recettori CB (Figura 3.47).

Inoltre, l'introduzione di un gruppo ossidrilico in posizione 8 (Figura 3.4) ha portato alla perdita di affinità per il recettore CB e anche il composto 3 (Figura 3.4) con un legame C4-C5 doppio al posto del triplo legame ricco di elettroni e l'ossidazione dell'alcool secondario a chetone (Figura 3.4) non si lega ai recettori CB.

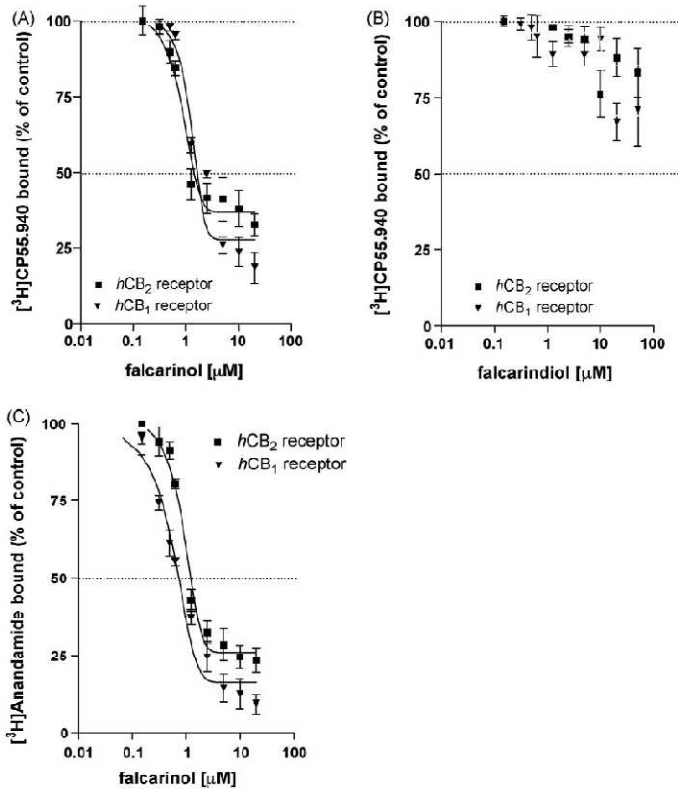


Figure 3.47 CB receptor binding affinities of falcarinol. Falcarinol (A) but not falcarindiol (B) displaces $[^3\text{H}]\text{CP-55,940}$ from $h\text{CB}_1$ and $h\text{CB}_2$ receptors expressed in HEK293 cells. Sigmoidal displacement curves ($R^2 > 0.95$ for CB_2 and CB_1) showing overall displacement (65% and 75%) of $[^3\text{H}]\text{CP55940}$ with K_i values of $2.36 \mu\text{M}$ and $3.78 \mu\text{M}$, respectively. Using $[^3\text{H}]\text{anandamide}$ as the radioligand the K_i values were determined as 594 nM (CB_1) and $2.1 \mu\text{M}$ (CB_2), respectively. Data show mean values of six measurements from three independent experiments.

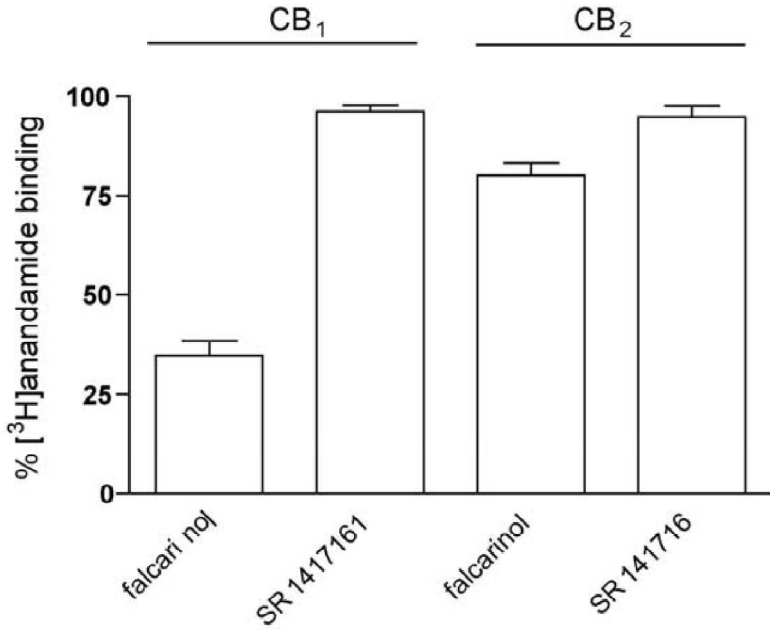


Figura 3.48 20 μ M of falcarinol and rimonabant (SR141716) were incubated with CB₁ or CB₂ receptor membrane preparations for 3 h at 37 °C. After thorough washing of the membranes with cold buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) the membranes were saturated with high concentrations of [³H]anandamide (50 nM) prior to a final washing. The % [³H]anandamide binding relative to vehicle control is 34% in CB₁ versus 81% in CB₂ for falcarinol and 97% in CB₁ and 95% in CB₂ for rimonabant. Data are mean values \pm SD of three independent experiments.

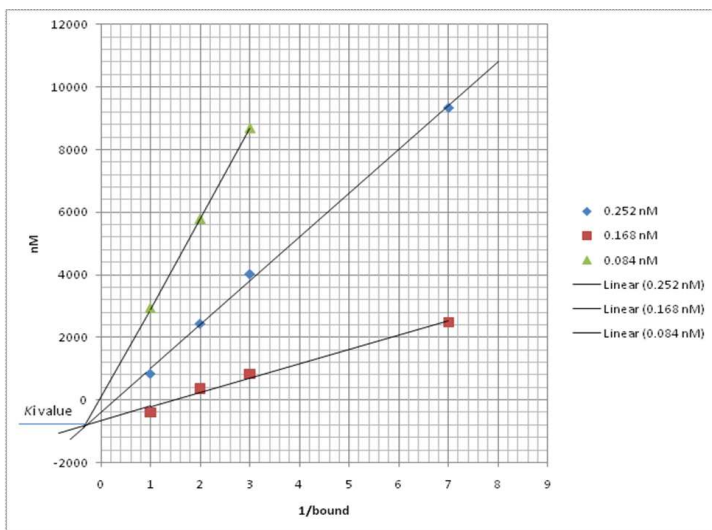


Figura 3.49 Analisi Dixon del falcarinolo.

3.7.2.3 Il Falcarinolo è un agonista del recettore CB₁ di tipo selettivo inverso

Lo spostamento significativo di [3H] CP55,940 e [3H]anandamide da parte del falcarinolo è una chiara indicazione che il composto potrebbe essere in grado di attivare o bloccare i recettori CB in generale ed, in particolare, del recettore CB₁. Abbiamo poi studiato se il falcarinolo è in grado di modulare i livelli di cAMP nelle linee cellulari CHO transfettate CB₁ e CB₂.

Quando le cellule sono state incubate con il falcarinolo, l'equilibrio del cAMP costitutivo è stato spostato verso un aumento dei livelli di cAMP in modo concentrazione-dipendente solo nelle cellule transfettate CB₁ (Figura 3.50).

Al fine di confrontare la potenza di questo effetto con un controllo noto abbiamo usato l'agonista selettivo inverso rimonabant del recettore CB₁.

Degno di nota, mentre il rimonabant ha dato una risposta completa a basse concentrazioni nM, il falcarinolo ha dato una risposta analoga a concentrazioni più elevate nM, che riflette la sua circa 100 volte più debole affinità di legame, con una

curva di risposta quasi identica spostata sul lato destrolaterale di due unità di log (Figura 3.50).

Dal momento che gli agonisti inversi in genere agiscono come antagonisti abbiamo co-incubato il potente agonista del recettore CB WIN55,212-2 (CB₁ K_i <20 nm) con il falcarinolo in condizioni in cui viene stimolata l'adenilatocylase da forskolina. In questa configurazione del test, basse concentrazioni di falcarinolo non bloccano l'effetto inibitorio di WIN55,212-2 (Figura 3.50). D'altra parte, 5-20 µM di falcarinolo potentemente inibiscono l'effetto di WIN55,212-2 (Figura 3.50), fornendo così un'ulteriore prova della natura antagonista di questo prodotto naturale sul recettore CB₁.

Per contro, il falcarinolo non interferisce con cAMP costitutivo (Figura 3.50) o forskoline-stimolata (non mostrato) in cellule transfettate CB₂, suggerendo così che falcarinolo non è un ligando funzionale del recettore CB₂, o, in alternativa, che non segnala attraverso cAMP.

Siccome i veri agonisti del recettore CB₂ portano tipicamente a transienti di calcio intracellulare in cellule HL60 (che può essere bloccato dal SR144528 antagonista del recettore CB₂ selettivo (Raduner et al. 2006)), abbiamo testato anche il falcarinolo in cellule HL60.

Come mostrato in Figura 3.50, il falcarinolo porta a risposte di calcio debole, che potevano essere bloccate da SR144528. Pertanto, il falcarinolo può anche agire come un agonista parziale molto debole a livello del recettore CB₂ solo esclusivamente via Go o con segnali sconosciuti, simili all'attività delle alchilammidi sul recettore CB₂ riportato precedentemente da Echinacea (Raduner et al. 2006).

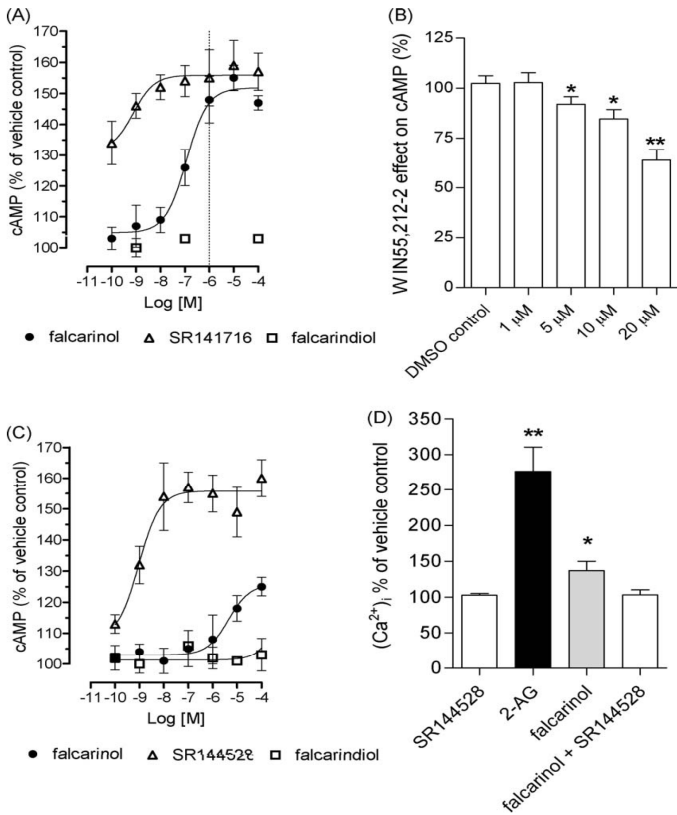


Figure 3.50 Functional effects in CB1/CB2 receptor transfected CHO and HL60 cell lines. (A) Concentration-dependent effect of falcarinol and falcarindiol on cAMP in CB1 receptor transfected CHO cells. Rimonabant (SR141716) is shown as positive control (B) Blockage of cAMP inhibition by WIN55,212-2 (0.5 μM) in forskolin-stimulated CHO cells by falcarinol (1–20 μM). (C) Concentration-dependent effect of falcarinol and falcarindiol on cAMP in CB2 receptor transfected CHO cells. The inverse agonist SR144528 is shown as positive control. (D) Effect of falcarinol (10 μM) on intracellular Ca²⁺ in CB receptor expressing HL60 cells. SR144528 (1 μM) and 2-AG (10 μM) were used as controls. 2-AG induces 256% and falcarinol induces 137%. Data show mean values ± SEM of at least 3 independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01.

3.7.2.4 Espressione dei recettori CB nei cheratinociti e potente modulazione di IL-8 e chemochine CCL2/MCP-1 da parte del falcarinolo

Precedentemente il falcarinolo è stato riportato come causa di effetti pro-allergenici nella pelle umana (Hansen et al. 1986; Hausen et al. 1987; Murdoch et al. 2000) ed il recettore CB₁ ha mostrato di essere criticamente coinvolto nella dermatite sperimentale in pelle di topo (cfr. sezione 1). Abbiamo quindi testato l'ipotesi che il prodotto naturale falcarinolo pro-allergenico fosse in grado di modulare l'espressione delle chemochine nei cheratinociti (Figura 3.51). Questa ipotesi si basava sul presupposto che falcarinolo potesse agire attraverso i recettori CB presenti nei cheratinociti, che è il tipo cellulare più abbondante nella pelle.

Abbiamo effettuato esperimenti di immunofluorescenza FACS su entrambi i cheratinociti primari e su cellule umane HaCaT per misurare l'espressione dei recettori CB superficie.

Una significativa espressione di CB₁ e CB₂ sulla superficie di cheratinociti primari e cheratinociti epidermici HaCaT è stata trovata (Figura 3.51).

L'espressione di superficie del recettore CB₂ è stata più forte nei cheratinociti primari rispetto alle cellule HaCaT. In particolare, la quantità di recettore non può necessariamente fornire informazioni circa il numero dei recettori completamente funzionali.

Abbiamo poi incubate falcarinolo (5 µM) con le cellule HaCaT (106 celle) per 8 ore e analizzato il rilascio della chemochine IL-8 e CCL2/MCP-1 in terreni di coltura di cellule in quanto tali chemochine, giocano un ruolo cruciale nella infiammazione della pelle (Matsubara et al 2005) e (Pastore et al. 2005).

Mentre IL-8 è stata fortemente up-regolata da falcarinolo (750 pg / ml), CCL2/MCP-1 era solo debolmente indotto (35 pg / ml), molto probabilmente riflette i gradi relativi di espressione in queste cellule indotta dopo stimolazione con TNF-alfa (Figura 3.52). Lo stesso è stato osservato con rimonabant, che è stato utilizzato come controllo positivo (Figura 3.52 A). Così, il falcarinolo e il rimonabant stimolano l'espressione di chemochine da cheratinociti HaCaT in misura analoga a quella pro-infiammatoria di citochine TNF-alfa, anche se in modo molto meno potente. L'aumento di concentrazione-dipendente di IL-8 e CCL2/MCP-1 del falcarinolo potrebbe essere parzialmente annullato dalla co-incubazione di anandamide in eccesso (Figura 3.52 B), così chiaramente da suggerire un meccanismo recettore CB₁-dipendente alla base della modulazione delle chemochine IL -8 e CCL2/MCP-1.

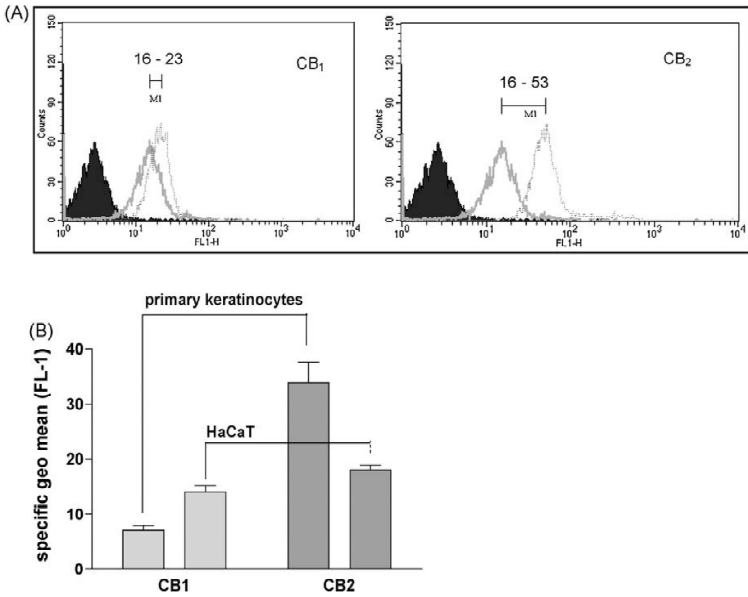


Figure 3.51 Quantification of CB1 and CB2 receptor surface expression in primary human and HaCaT keratinocytes. (A) FL-1 shows autofluorescence (black population), non-specific binding of secondary antibody (dark grey population) and specific immunofluorescence obtained with CB1 (Ab3558) and CB2 (Ab3561) receptor antibodies, respectively (light grey population). Histogram shows representative measurement (5000 cells counted). (B) Differences in CB receptor expression between primary and HaCaT keratinocytes, showing marked increased expression of CB2 in primary keratinocytes (geo mean corrected for non-specific binding of secondary Ab). Data show mean values \pm SEM obtained with two human primary keratinocyte samples and HaCaT cells, each measured three times.

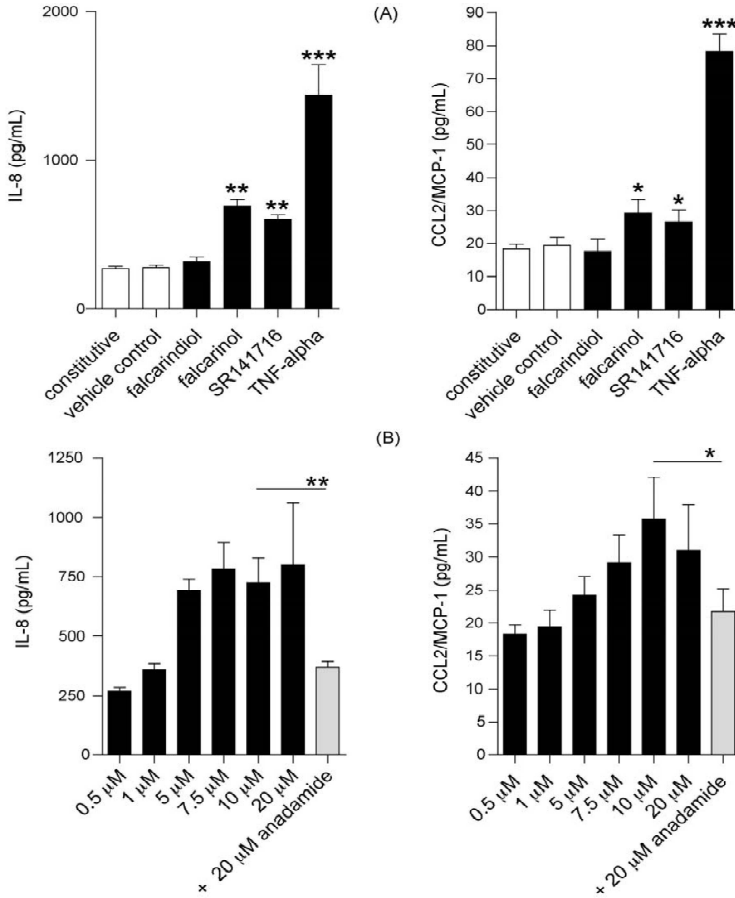


Figura3.52 Effect of falcarinol, rimonabant (SR1441716) and anandamide on IL-8 and CCL2/MCP-1 expression in HaCaT keratinocytes (10^6 cells). (A) falcarinol (5 μM) and rimonabant (5 μM) stimulate IL-8 and CCL2/MCPL-1 expression from HaCaT cells (10^6 cells). TNF-alpha (50 ng/ml) was used a positive control. (B) Concentration-dependent effects of falcarinol on IL-8 and CCL2/MCPL-1 stimulation from HaCaT cells (10^6 cells) are blocked by anandamide (20 μM). Data show mean values \pm SEM of at least 3 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.7.2.5 Il falcarinolo inverte l'effetto inibitorio di anandamide sull'espressione di chemochine indotta da TNF- α .

Sulla base delle precedenti relazioni che evidenziano come i cannabinoidi sono in grado di inibire l'espressione di chemochine in seguito all'esposizione a stimoli pro-infiammatori (Gallily et al 2000; Chang et al. 2001) e che l'anandamide modula lo sviluppo della pelle in particolare attraverso CB₁ e l'inibizione del fattore di trascrizione AP-1 (Maccarone et al. 2003), abbiamo studiato l'effetto del falcarinolo sull'azione dell'anandamide. Come mostrato in Figura 3.53, l'anandamide (10 μ M) ha ridotto l'effetto del TNF- α sull'espressione delle chemochine di circa il 70%.

L'effetto anti-infiammatorio di anandamide (inibizione di espressione delle chemochine indotta da 50 ng / ml di TNF- α) è stata significativamente invertita (bloccata) dal falcarinolo e dal rimonabant, ma non dal falcarindiolo (Figura 3.53), fornendo ancora una volta una forte evidenza degli effetti antagonisti del falcarinolo a livello del recettore CB₁.

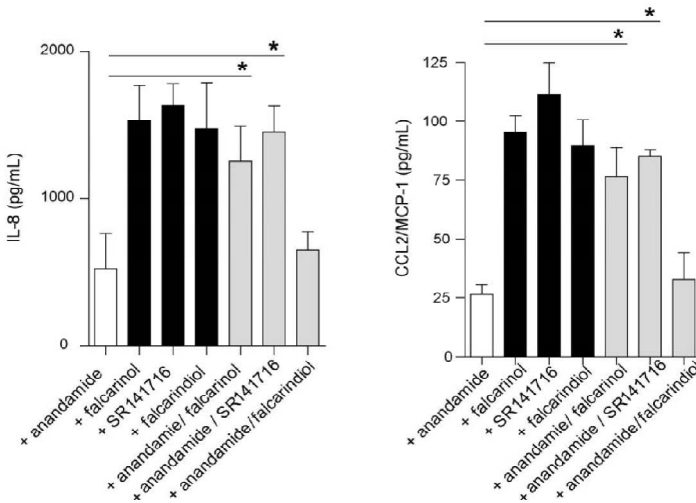


Figura 3.53 Falcarinolo (10 μ M) and rimonabant (10 μ M) reverse anandamide-induced blockage of TNF- α (50 ng/ml) stimulated IL-8 and CCL2/MCP-1 expression from HaCaT cells (106 cells). Falcarindiolo (10 μ M) had no effect. Data show mean values \pm SEM of at least three independent experiments. * p < 0.05.

3.7.2.6 Il Falcarinolo aggrava le reazioni di edema nella pelle umana indotte da istamina

Poiché l'esposizione al falcarinolo con le verdure e fonti vegetali può facilmente produrre concentrazioni superficiali nel campo μM , abbiamo esposto la pelle umana al falcarinolo usando il rimonabant come controllo positivo (0,5 mg) (Figura 3.54).

In quattro esposizioni indipendenti sulla pelle, usando il prick test sulla parte interna dell'avambraccio di individui sani né il falcarinolo né il rimonabant hanno prodotto segni di irritazione spontanea sulla pelle (Figura 3.54). In 2 casi l'esposizione è stata ripetuta dopo una settimana senza però provocare irritazione della pelle.

D'altra parte, l'esposizione dei composti (0,5 mg) prima di pungere la pelle (wealing) con istamina (0,05 mg) ha portato in modo significativo ad un aggravamento sulla formazione di edema prodotto da istamina ((Figura 3.54). Possiamo concludere che questo effetto può essere basato sull'effetto sinergico irritante di IL-8 ed istamina precedentemente riportati (Matsubara et al. 2005; Kohda et al. 2002).

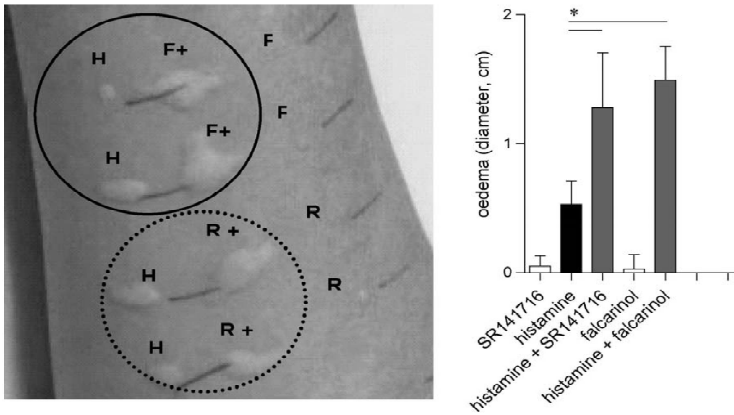


Figura 3.54 In vivo effects of falcarinol, rimonabant and histamine on induction of oedema in human forearm skin after prick. 0.5 mg of falcarinol (F), rimonabant (R), and 0.05 mg histamine hydrochloride (H) were applied alone or in combination for skin prick test analysis. In the combination experiments the size of the weal (oedema) was clearly increased from approximately 0.6 cm to approximately 1.2 cm with both falcarinol (circle) and rimonabant (dashed circle). Neither falcarinol nor rimonabant showed reproducible wealing when applied alone. The image shown is the nicest example but representative of experiments obtained with 4 different individuals (see quantification showing mean values \pm SD, $*p < 0.05$).

3.7.2.7 Discussione dei risultati

Come dimostrato in questo studio, il poliacetilene falcarinolo possiede una impalcatura molecolare che non distingue tra i recettori CB_1 e CB_2 , simile al Δ^9 -THC, agli endocannabinoidi ed alcuni polyacetylenes sintetici (ketoalkenes) (Egger et al. 2008).

L'endocannabinoide anandamide ed il 2-AG, così come i metaboliti secondari vegetali cannabimimetici N-alchilammidi sono derivati della filiera di acidi grassi o derivati da polichetidi, rispettivamente (Di Marzo 2006; Gertsch 2008). Solo pochi studi farmacologici sono stati condotti sui lipidi polyacetylenici da piante (Gertsch 2008); Siddiq et al. 2008).

Qui segnaliamo che il diffuso prodotto naturale falcarinolo si lega sul sito di legame del recettore CB_1 dell'anandamide e potentemente inibisce l'azione della stessa

agendo come agonista inverso covalente e potenzialmente irreversibile (cioè antagonista).

Il Falcarinolo, il più bioattivo dei poliacetileni a 17 carboni (C₁₇) (Young et al. 2007), è già 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). Il Falcarinolo è anche una fitoalessina comune ed è stata isolata per la prima volta da *Panax ginseng* CA Meyer da Takashi et al. e nominato panaxynol (Takashi et al. 1964). Ignari del contributo da parte dei loro colleghi giapponesi, Bohlmann et al. (Bohlmann et al. 1966) hanno riportato lo stesso composto da *Falcaria vulgaris* L. (Apiaceae) e chiamandolo falcarinolo in coerenza con il falcarinone (prodotto di ossidazione discusso in precedenza) (Bohlmann et al 1961).

Un certo numero di comuni ortaggi sono stati esaminati per i loro effetti tossici, contro *Daphnia magna* Straus, da Crosby (Crosby et al. 1967) e hanno scoperto che l'estratto di carote è tra i più potenti.

La Carotatoxin è stata isolata come il principio attivo (Crosby et al. 1967), e successivamente, risultato essere identico al falcarinolo e panaxynol.

Il Falcarinolo e i polyacetylenes in generale, sono noti per la loro instabilità verso condizioni atmosferiche, in particolare verso la luce del sole (Jones et al. 1966; Koh et al. 1986; Christensen et al. 2006).

Abbiamo scoperto che il falcarinolo purificato solo di recente esercita una significativa affinità di legame al recettore CB e che il valore di Ki aumenta di conseguenza con il corso del degrado.

In accordo con i risultati ottenuti da Hansen et al. (Hansen et al. 1986), abbiamo scoperto che era altamente instabile una volta purificato. Una volta avvertito il problema della decomposizione abbiamo cercato di caratterizzare il prodotto principale della degradazione del falcarinolo che è risultato essere il 4,5-dihydrofalcarinol (ginsenoynone J) dal quale si possono essere spontaneamente generate dalle reazioni di dismutazione.

Il controllo in TLC del falcarinolo posto alla luce del sole rivela sostanziali quantità di prodotti di ossidazione come il falcarinone e E-heptadeca-1 ,8-diene-4 ,6-diyne-3 ,10-diol 4,5-dihydromentre mentre il falcarinolo non era più rilevabile.

Sorpresa delle sorprese, la maggior parte degli studi precedenti sulla attività biologica del falcarinolo purificato non affrontano la pronunciata instabilità di questo prodotto naturale. Tuttavia, eccezioni degne di nota sono gli studi da parte di Hansen et al. (Hansen et al. 1986), Hausen et al. (1987) e Gafner et al. (1988), dove

anche i prodotti di ossidazione strettamente correlati (falcarindiolo, falcarinone, 16,17-dehidrofalcarinol, 11,12-16,17 e 11,12-didehidrofalcarinol-dehidrofalcarinol) sono stati testati in prove di massimizzazione su patch Guinea-pig.

In conclusione, i loro risultati hanno mostrato che solo il falcarinolo ha suscitato forti reazioni sulla pelle (dermatiti), mentre il didehidrofalcarinol ed il 11,12-dehidrofalcarinol hanno mostrato potenziale allergenico molto debole e le altre forme ossidate sono rimaste inattive (Hansen et al. 1986; Hausen et al. 1987; Gafner et al. 1988).

Curiosamente la maggior parte degli individui che mostrano patch tests positivi alla carota sono in grado di mangiare verdure contenenti falcarinolo senza segni di reazioni allergiche (Murdoch et al. 2000).

In particolare il falcarinolo (ed il falcarindiolo) contenuto in vegetali quali la carota (*Daucus carota* L.), il sedano (*Apium graveolens* L.), il finocchio (*Foeniculum vulgare* Mill.), e la pastinaca (*Pastinaca sativa* L.) sono responsabili dell'ingestione e dell'esposizione a questo agente fitochimico nella vita quotidiana (Zidorn et al. 2005).

E' già stato suggerito che l'allergenicità del falcarinolo potrebbe essere dovuta alla sua capacità di formare un carbocatione, agendo in qualità di agente alchilante reattivo verso i gruppi mercapto e amminoacidi in proteine (Hansen et al. 1986).

Altri hanno proposto che questo meccanismo putativo potrebbe spiegare la bioattività del falcarinolo in generale (Christensen et al. 2006). Tuttavia, nessuna prova sperimentale è stata pubblicata per verificare questa ipotesi.

Nel presente studio, mettiamo a disposizione una evidenza sperimentale preliminare di una interazione selettiva covalente e potenzialmente irreversibile del falcarinolo con il recettore CB₁.

I nostri dati indicano che il falcarinolo ed il rimonabant conducono in vitro ad una espressione pro-allergenica delle chemochine (IL-8 e CCL2/MCP-1) da cheratinociti in maniera apparentemente CB₁ recettore-dipendente.

In vivo, l'up-regolazione dell'espressione di chemochine può essere responsabile dell'azione sinergica con istamina.

È interessante notare che il rimonabant, che è molto più potente in vitro, non ha prodotto una più forte irritazione rispetto al falcarinolo, nonostante la sua forte affinità di legame con il recettore CB₁. Ciò può essere spiegato attraverso l'interazione covalente e perciò potenzialmente irreversibile con il recettore CB₁ nella pelle, sebbene la farmacologia esatta del recettore di fondo rimane ancora da

chiarire. In alternativa, il falcarinolo potrebbe anche bersagliare altri recettori che portano all'aggravamento ulteriore dell'effetto.

È stato dimostrato che la pelle umana è coinvolta nel ECS periferico soprattutto attraverso i cheratinociti, che hanno dimostrato di esprimere entrambi i recettori CB₁ e CB₂ (Karsak et al. 2007; Maccarrone et al. 2003).

L'espressione dell'anandamide è stata precedentemente mostrata nella pelle di topo (Dobrosi et al. 2008). L'espressione dei recettori CB è stata ulteriormente riportata in cellule epiteliali dei follicoli piliferi, sebociti e le ghiandole sudoripare eccrine (Ständer et al. 2005).

Un marcato aumento della risposta allergica è rilevabile in topi privi di entrambi i recettori dei cannabinoidi CB₁ e CB₂ rispetto agli animali wild-type, dopo l'intervento con l'allergene da contatto 2,4-dinitrofluorobenzene (Karsak et al. 2007).

Curiosamente, i topi trattati con l'antagonista del recettore CB₁ rimonabant hanno mostrato una risposta più forte verso una induzione sperimentale di ipersensibilità cutanea da contatto (CHS) (il modello murino per ACD negli esseri umani) mentre l'agonista specifico HU-308CB₂ applicato per via sottocutanea o topica non ha mostrato alcun effetto o aumenta anche la risposta allergica (Karsak et al. 2007).

Al contrario, la somministrazione per via sottocutanea dell'agonista del recettore CB₁ Δ9-THC e l'inibizione farmacologica della degradazione dell'anandamide ha ridotto significativamente l'infiammazione indotta CHS (Karsak et al. 2007).

Altri studi hanno dimostrato che il rimonabant amministrato intraperitonealmente in modo dose-dipendente provoca lo strofinamento e le contrazioni della testa nei topi naïve, mentre il Δ9-THC è in grado di attenuare lo stordimento della testa indotto da rimonabant a dosaggi più alti (Darmani et al. 2000) e che l'amministrazione del non-selettivo agonista dei recettori dei cannabinoidi HU210 ha ridotto significativamente l'infiammazione ed il prurito indotto dall'istamina in volontari umani (Dvorak et al. 2003). Questo è in ottimo accordo con i nostri dati.

Abbiamo dimostrato che sia il falcarinolo che il Rimonabant bloccano gli effetti dell'anandamide a livello del recettore CB₁ e quindi modulano l'espressione delle chemochine IL-8 e CCL2/MCP-1, che sono coinvolte nella dermatite da contatto. IL-8 è una chemochina con potenti proprietà chemiotattiche dei neutrofili e l'attivazione è attivante in condizioni infiammatorie. Ad esempio IL-8 è stata individuata in condizioni infiammatorie della pelle umana in cui è probabile che sia responsabile per il reclutamento dei neutrofili dalla circolazione (Douglass et al. 1996).

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Dal momento che i cheratinociti sono coinvolti nella eziologia della dermatite e che l'IL-8 è nota anche per agire in sinergia con l'istamina (Matsubara et al. 2005; Kohda et al. 2002), i nostri dati suggeriscono che gli effetti pro-allergenici riportati precedentemente per il falcarinolo possano essere collegati all'agonismo inverso (cioè antagonistico) degli effetti del falcarinolo a livello del recettore CB₁ nei cheratinociti.

Anche se non è stata effettuata la caratterizzazione biochimica della pelle, ad es determinazione dei livelli di IL-8 con l'esposizione di falcarinolo e rimonabant, i nostri risultati *in vivo* con il prick test istamina lo confermano ulteriormente.

Sia il rimonabant che il falcarinolo aggravano la formazione di edema indotta da istamina negli esseri umani, quindi indicativo di un meccanismo mediato dal CB₁ recettore.

Anche se i tempi di esposizione del falcarinolo e del rimonabant erano significativamente più brevi rispetto a quelli applicati in saggi cellulari, l'espressione delle chemochine e dell'anandamide potrebbero essere più rapide nella pelle. Pertanto, i nostri dati suggeriscono che il falcarinolo potrebbe facilitare la sensibilizzazione ad altri allergeni, bloccando l'ECS, invece di essere esso stesso un allergene, fornendo così una spiegazione razionale per l'irritazione della pelle causata da falcarinolo.

Inoltre, questo studio conferma anche i dati precedenti sul ruolo del recettore CB₁ nella infiammazione della pelle.

Sono necessari ulteriori studi per chiarire il meccanismo molecolare (thiol trapping) dell'interazione covalente del falcarinolo con il recettore CB₁ e se altre coniugazioni potenzialmente reversibili di Michael-tipo, ad es con il glutatione, possono influenzare questa reazione differenziata in diversi tessuti come la pelle ed il tratto gastrointestinale.

BIBLIOGRAFIA (Capitolo 3)

Bergendorff O., Dekermendjian K., Nielsen M., Shan R., Witt R., Ai J., Sterner O., (1997). Furanocumarins with affinity for brain benzodiazepine receptors *in vitro*. *Phytochemistry* vol. 44; pp. 1121-1124.

Bohlmann F., Niedballa U., Rode KM., (1966). New polyines with a C17-chain. *Chem. Ber.* vol. 99; pp. 3552–3558.

Bohlmann., Arndt C., Bornowski H., Kleine KM., (1961). Polyacetylenverbindungen. XXXI. U^{ber} Polyine aus der Familie der Umbelliferen. *Chem. Ber.* vol. 94; pp. 958–967.

Brandt K., Christensen LP., Hansen-Møller J., Hansen SL., Haraldsdóttir J., Jespersen L., Purup S., Kharazmi A., Barkholdt V., Frøkiær H., Kobæk-Larsen M.,(2004). Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends Food Sci. Technol.* vol. 15; pp. 384–393.

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

Chang YH., Lee ST., Lin WW., (2001). Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J. Cell. Biochem.* vol. 81; pp. 715–723.

Christensen LP., Brandt K., (2006). Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* vol. 41; pp. 683–693.

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

Crosby DG., Aharonson N., (1967). The structure of carotatoxin, a natural toxicant from carrot. *Tetrahedron* vol. 23; pp. 465–472.

Darmani NA., Pandya DK., (2000). Involvement of other neurotransmitters in behaviours induced by the cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR 141716A in naive mice. *J. Neural. Transm.* vol. 107; pp. 931–945.

Di Marzo V., (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol. Sci.* vol. 27; pp. 134–140.

Dobrosi N., Tóth BI., Nagy G., Dòzsa A., Géczy T., Nagy L., (2008). Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* vol. 10; pp. 3685–3695.

Douglass J., Dhami D., Bulpitt M., Lindley IJ., Shute J., Church MK., (1996). Intradermal challenge with interleukin-8 causes tissue oedema and neutrophil accumulation in atopic and non-atopic human subjects. *Clin. Ex. Allergy* vol. 26; pp. 1371137–9.

Dvorak M., Watkinson A., Mc Glone F., Rukwied R, (2003). Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. *Inflamm. Res.* vol. 52; pp. 238–245.

Egger M., Pellett P., Nickl K., Geiger S., Graetz S., Seifert R., (2008). Synthesis and cannabinoid receptor activity of ketoalkenes from *Echinacea pallida* and non natural analogues. *Chemistry* vol. 14; pp. 10978–10984.

Feyen F., Gertsch J., Wartmann M., Altmann KH., (2006). Design and synthesis of 12-aza-epothilones (azathilones) - "non-natural" natural products with potent anticancer activity. *Angewandte Chemie International Edition* vol. 45; pp. 5880-5885.

Gafner F., Epstein W., Reynolds G., Rodriguez E., (1988). Human maximization test of falcarinol, the principal contact allergen of English ivy and Algerian ivy (*Hedera helix*, *H. canariensis*). *Contact Dermatitis* vol. 19; pp. 125–128.

Gallily R., Breuer A., Mechoulam R., (2000). 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. *Eur. J. Pharmacol.* vol. 406; pp. 5–7.

Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen JZ., Xie XQ., (2008). Beta-Caryophyllene is a Dietary Cannabinoid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* vol. 105; pp. 9099–9104.

Gertsch J., (2008). Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. *Planta Med.* vol. 74; pp. 638–650.

Hansen L., Hammershoy O., Boll PM., (1986). Allergic contact dermatitis from falcarinol isolated from *Schefflera arboricola*. *Contact Dermatitis* vol. 14; pp. 91–93.

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

Harker S., Razdan TK., Waight ES., (1984). Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* vol. 23; pp. 419–426.

Hausen BM., Bröhan J., König WA., Faasch H., Hahn H., Bruhn G., (1987). Allergic and irritant contact dermatitis from falcarinol and didehydrofalcarinol in common ivy (*Hedera helix* L.). *Contact Dermatitis* vol. 17; pp. 1–9.

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*.

Hirakura K., Morita M., Nakajima K., Ikeya Y., Mitsunashi H., (1992). Three acetylenic compounds from roots of *Panax ginseng*. *Phytochemistry* vol. 31; pp. 899–903.

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.

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Jiménez B., Grande MC., Anaya J., Torres P., Grande M., (2000). Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba*. Phytochemistry vol. 53 No. 8; pp. 1025-101.

Jones ERH., Safe S., Thaller V., (1966). Natural Acetylenes. Part XXIII. A C18 polyacetylenic keto-aldehyde related to falcarinone from an Umbellifer (*Pastinaca sativa* L.). J. Chem. Soc. C. pp. 1220-1.

Karsak M., Gaffal E., Date R., Wang-Eckhardt L., Rehnelt J., Petrosino S., (2007). Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. Science vol. 316; pp. 1494–1497.

Koh HY., Chang SK., Shim C., Moon SK., Min TJ, (1986). Photooxidation of a polyacetylene compound from *Panax ginseng* C. A. Meyer. Bull. Korean Chem. Soc. vol. 7; pp. 179–182.

Kohda F., Koga T., Uchi H., Urabe K., Furue M., (2002). Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are differentially modulated by IFN-gamma and IL-4 in human keratinocytes. J. Dermatol. Sci. vol. 28; pp. 34–41.

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 pro-allergic effects in skin. Biochemical Pharmacology vol. 79; pp. 1815-1826.

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

Maccarrone M., Di Rienzo M., Battista N., Gasperi V., Guerrieri P., Rossi A., (2003). The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB₁ receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. J. Biol. Chem. vol. 278; pp. 33896–33903.

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Matsubara M., Tamura T., Ohmori K., Hasegawa K., (2005). Histamine H1 receptor antagonist blocks histamine-induced proinflammatory cytokine production through inhibition of Ca²⁺-dependent protein kinase C, Raf/MEK/ERK and IKK/ I kappa B/NF-kappa B signal cascades. *Biochem. Pharmacol.* vol. 69; pp. 433–449.

Murdoch SR., Dempster J., (2000). Allergic contact dermatitis from carrot. *Contact Dermatitis* vol. 42; pp. 236.

Pastore S., Mascia F., Mariotti F., Dattilo C., Mariani V., Girolomoni G., (2005). ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. *J. Immunol.* vol. 174; pp. 5047–5056.

Pignatti S., (1982). *la Flora d'Italia*. Ed Edagricole. Bologna.

Raduner S., Majewska A., Chen JZ., Xie XQ., Hamon J., Faller B., (2006). Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J. Biol. Chem.* vol. 281; pp. 14192–14206.

Razdan TK., Qadri B., Harkar S., Waight ES., (1987) Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry* vol. 26; pp. 2063- 2069.

Schulte KA., Pötter B., (1977). Polyacetylene aus *Pituranthus tortuosus* (Desf.) Bnth. u. Hook. *Archiv der Pharmazie* vol. 310; 945-863.

Seger C., Godejohann M., Spraul M., Stuppner H., Hadacek F., (2006). Reaction product analysis by high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance. Application to the absolute configuration determination of naturally occurring polyynes alcohols. *Journal of Chromatography A* vol. 1136; pp. 82-88.

Shim SC., Chang SK., Hur CW., Kim CK., (1987). A polyacetylenic compound from *Panax ginseng* roots. *Phytochemistry* vol. 26 No. 10; pp. 2849-2850.

Siddiq A., Dembitsky V., (2008). Acetylenic anticancer agents. *Anticancer Agents in Med. Chem.* vol. 8; pp. 132–170

Seseli praecox (Gamisans) Gamisans

Ständer S., Schmelz M., Metze D., Luger T., Rukwied R., (2005). Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB₁) and 2 (CB₂) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J. Dermatol. Sci.* vol. 38; pp. 177–188.

Takashi M., Yoshikura M., (1964). Studies on the components of *Panax ginseng* C. A. Meyer. 3. On the ethereal extract of ginseng radix alba. On the structure of a new acetylene derivative ‘panaxynol’. *Yakugaku Zasshi* vol. 84; pp. 757–759.

Williams D., Flemming I., (1995). *Spectroscopic Methods in organic Chemistry* V Ed. London.

Young JF., Duthie SJ., Milne L., Christensen LP., Duthie GG., Bestwick CS., (2007). Biphasic effect of falcarinol on caco-2 cell proliferation, DNA damage, and apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* vol. 55; pp. 618–623.

Zidorn C., Joehrer K., Ganzera M., Schubert B., Sigmund EM., Mader J., (2005). Polyacetylenes from Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley and parsnip and their cytotoxic activities. *J. Agric. Food Chem.* vol. 53; pp. 2518–2523.

Zhough P., Takaishi Y., Duan H., Chen B., Honda G., Itoh M., Takeda Y., Kodzhimatov OK., Lee KH., (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* vol.53; pp. 689–687.

APPENDICE A

A1. Il sistema endocannabinoide, generalità

Il sistema endocannabinoide è un complesso sistema endogeno di comunicazione tra cellule. Esso è composto dai recettori endocannabinoidi, i loro ligandi endogeni (gli endocannabinoidi) e le proteine coinvolte nel metabolismo e nel trasporto degli endocannabinoidi. Questo sistema è di grande importanza per il normale funzionamento dell'organismo (Tratto da Wikipedia).

La scoperta del recettore dei cannabinoidi fu un evento del tutto casuale perché avvenne nel corso di un accurato screening sul DNA di ratto per individuare i geni dei recettori per le neurochinine.

Il recettore CB₁ è stato clonato nel 1990 (Matsuda et al. 1990) mentre il recettore CB₂ è stato clonato nel 1993 (Munro et al. 1993). Il sistema endocannabinoide prende il suo nome dalla pianta di *cannabis* poiché alcuni fitocannabinoidi in essa presenti, tra cui il THC, mimano gli effetti degli endocannabinoidi legandosi ai medesimi recettori. Il nostro organismo produce i loro ligandi endogeni, chiamati, endocannabinoidi, i quali si legano proprio ai recettori cannabinoidi (CB), attivandoli. Questi recettori appartengono alla numerosa famiglia dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCR), superfamiglia della quale fa parte la maggioranza dei recettori più comuni (Tratto da Wikipedia).

A2. Cannabinoidi endogeni

Con il termine cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi si identifica una classe di messaggeri lipidici endogeni, accomunati dalla capacità di interagire con almeno uno dei recettori cannabinoidi a livello centrale o periferico, regolando alcune funzioni fisiologiche e comportamentali. Tutti gli endocannabinoidi sono derivati di acidi grassi polinsaturi (Di Marzo et al. 1994).

Gli endocannabinoidi al momento conosciuti sono i seguenti (Figura A.1):

- N-arachidonoiletanolamide (anandamide, AEA)
- 2-arachidonoilglicerolo (2-AG)
- 2-arachidonil gliceril etere (noladina, 2-AGE)
- virodamina (O-arachidonoil etanolamina)
- N-arachidonoil-dopamina (NADA).

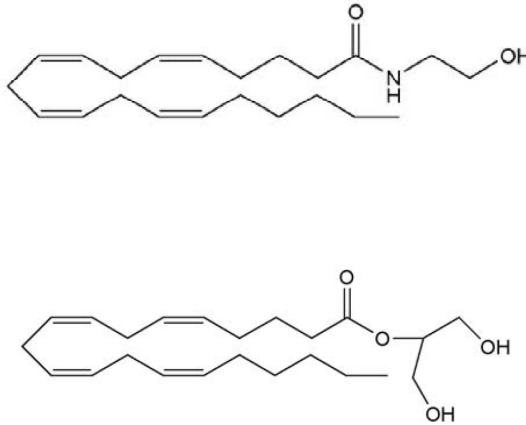


Figura A.1 Strutture dell'Anandamide e del 2-Arachidonylglycerol

L'anandamide è stata isolata ed identificata nel 1992 nel cervello di maiale (Devane et al. 1992) e rappresenta la prima molecola endogena individuata, in grado di legarsi selettivamente ai recettori CB. Si tratta di un derivato ammidico dell'acido arachidonico, componente delle membrane cellulari. Deve il suo nome alla parola in Sanscrito "ananda" che significa "beatitudine" (Tratto da Wikipedia). A causa della loro natura lipidica, gli endocannabinoidi non vengono immagazzinati nelle vescicole sinaptiche, ma sono sintetizzati all'occorrenza dai neuroni, in seguito alla depolarizzazione della membrana e all'aumento intracellulare dei livelli del calcio (Ca^{2+}) (Freund et al. 2003, Piomelli 2003).

La sintesi avviene a partire da fosfolipidi di membrana che dopo idrolisi enzimatica, ad opera di due enzimi NAPE-PLD e DAGL alfa e beta, liberano, rispettivamente, gli endocannabinoidi AEA o 2-AG dalla membrana pre o post sinaptica, nello spazio intersinaptico. Una volta rilasciati, i nuovi endocannabinoidi sintetizzati viaggiano in direzione retrograda lungo la fessura sinaptica, in quanto si legano ai recettori cannabinoidi sui terminali presinaptici (Freund et al. 2003).

I recettori CB₁ si trovano principalmente nei terminali presinaptici del SNC. La comunicazione in questa direzione, dal “post” al “pre”, viene chiamata segnalazione retrograda (Wilson et al. 2002).

Successivamente, la rimozione di AEA e 2-AG dallo spazio presinaptico avviene rapidamente attraverso un processo di ricaptazione (reuptake) selettivo che suggerisce un trasporto all'interno della cellula, mediato da un trasportatore di membrana (Beltramo et al. 1997; Piomelli et al. 1999) o per diffusione passiva degli endocannabinoidi attraverso la membrana. Una volta all'interno della cellula, gli endocannabinoidi vengono rapidamente metabolizzati con la loro conseguente disattivazione. Il metabolismo di anandamide e 2-AG avviene principalmente per idrolisi da parte di un enzima denominato FAAH specifico per l'idrolisi delle ammidi degli acidi grassi (Cravatt et al. 1996, Hillard et al. 1995, Ueda et al. 1995) e per il solo 2-AG, anche da parte della monoacilglicerol- lipasi, MAGL (Dinh et al. 2002, Goparaju et al. 1999).

L'attivazione dei recettori CB₁ con gli endocannabinoidi, diminuisce il rilascio di altri neurotrasmettitori. Gli endocannabinoidi vengono sintetizzati quando persiste un'intensa attività neuronale.

A3. Fitocannabinoidi

I fitocannabinoidi naturali sono stati isolati da vegetali; sono idrocarburi aromatici contenenti ossigeno. A differenza della maggior parte dei farmaci e delle droghe, incluso gli oppiacei, la cocaina, la nicotina e la caffeina, essi non contengono nitrogeni. I fitocannabinoidi non sono presenti unicamente nella pianta di cannabis (*Cannabis sativa* L.), recentemente alcuni bibenzili simili ai cannabinoidi sono stati trovati in alcune briofite (*Radula perrottetii* e *Radula marginata*). Oltre 60 cannabinoidi sono stati individuati nella cannabis: il cannabigerolo (CBG), il cannabicromene (CBC), il cannabidiolo (CBD), il Δ^9 -THC ed il tipo cannabinolo (CBN) sono i più rappresentati (Figura A.2). La distribuzione dei cannabinoidi varia nei differenti ceppi di cannabis ed in genere solo tre o quattro cannabinoidi si trovano in una pianta in concentrazioni superiori allo 0.1%. L'utilizzo della marijuana a scopi sia medicali sia ricreativi è riportato in diverse epoche storiche ed in differenti culture (Peters et al. 1999). Tra gli altri impieghi tramandati per via aneddotica vi era anche quello di stimolare l'appetito e di aiutare soggetti cachettici a guadagnare peso. Il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) è stato isolato ed identificato nel 1964 (Karniol et al. 1975, Bird et al., 1980; Hollister et al., 1975); esso produce nell'uomo una sensazione di benessere e rilassamento, inoltre aumenta l'appetito,

induce bradicardia e aumenta la vasodilatazione (soprattutto sui vasi della sclera e della congiuntiva, che danno gli occhi arrossati), riduce la pressione intraoculare e provoca broncodilatazione (Clementi 1999). Il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC) è considerato il cannabinoide farmacologicamente più attivo della pianta di Cannabis e dei suoi derivati, marijuana (infiorescenze) e hashish (resina). La maggior parte degli effetti del THC sono mediati da azione agonista sui recettori cannabinoidi (Grotenhermen 2006). Il THC è un composto altamente lipofilo per cui è in grado di passare o entrare facilmente nelle barriere della membrane cellulari. L'affinità del THC per i 2 recettori cannabinoidi è approssimativamente uguale.

Recentemente si è scoperto un altro gruppo di prodotti naturali capaci di legarsi al recettore cannabinoide. Si tratta delle N-alkil-amidi, che non sono così presenti come altre classi di metaboliti secondari ma che si trovano comunque in una varietà di famiglie come le Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Piperaceae e le Rutaceae (Gertsch 2008, Gertsch et al. 2004). Si è trovato che l'antagonista specifico CB₂ SR144528 (Figura A.3) inibisce potentemente la sintesi di TNF α mRNA indotta da alkilamidi mentre lo specifico antagonista CB₁-R SR147778 è rimasto senza effetto inibitivo. Si è inoltre dimostrato che l'aumento dell'mRNA di TNF α viene mediato dal recettore CB₂ e che le alkamidi (quali il Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoic acid isobutylamide ed il Dodeca 2E,4E-dienoic acid isobutylamide di Figura A.4) della echinacea sono in grado di modulare l'espressione di mRNA della TNF α in monociti/macrofagi umani attraverso il recettore CB₂ (Gertsch et al. 2004, Raduner et al. 2006). Recentemente è stata messa in evidenza un'ulteriore molecola naturale (Gertsch et al., 2008) capace di agire come agonista per i recettori CB₂ ma non per quelli CB₁: l'(E)-Beta-caryophyllene (Figura A.5). Il beta-cariofillene è una molecola conosciuta e abbastanza ubiquitaria presente nell'olio essenziale di numerose specie utilizzate nella cucina mediterranea, come l'origano, il basilico, il rosmarino ed il pepe nero. Il beta-cariofillene è strutturalmente diverso dai farmaci anti-infiammatori presenti sul mercato; non è tossico e fa parte della nostra dieta. Inoltre uno studio condotto dal nostro gruppo di ricerca ha messo in evidenza che l'estratto apolare (DCM) dei fusti di una specie del genere *Seseli* mostra attività di binding recettoriale verso i recettori cannabinoidi.

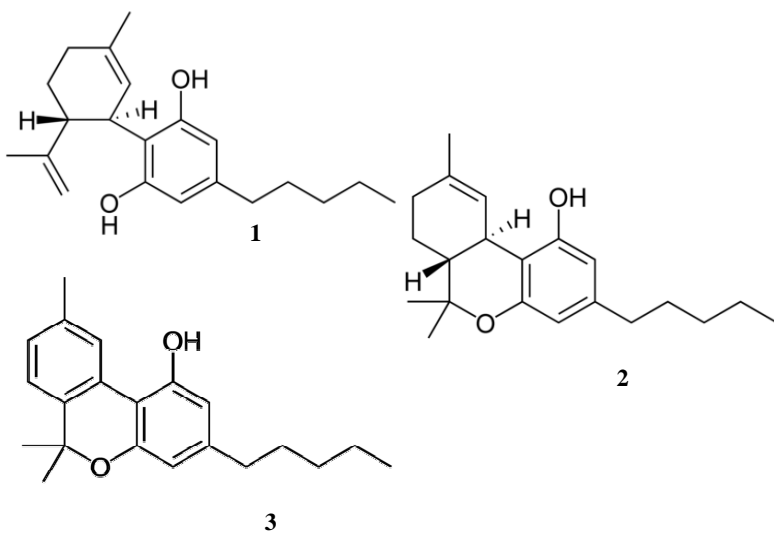


Figura A.2 Alcuni dei più importanti cannabinoidi ritrovati nella Cannabis: Cannabidiolo (1), Δ9.THC (2) e cannabino (3).

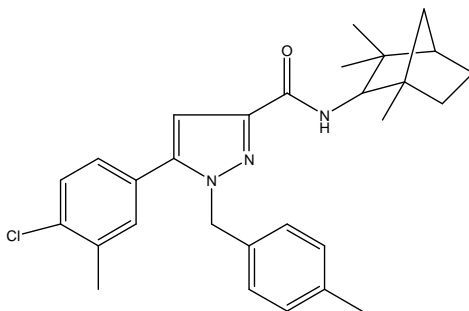


Figura A.3 Struttura del SR 144528.

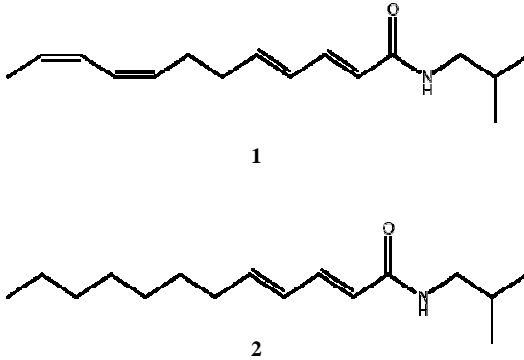


Figura A.4 Struttura del Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoic acid isobutylamide (1) e Dodeca 2E,4E-dienoic acid isobutylamide (2).

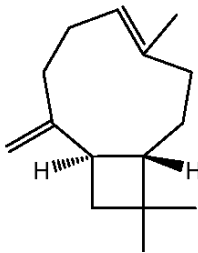


Figura A.5 Struttura dell' (Struttura dell' E)- β -cariofillene

A4. Cannabinoidi sintetici

Attualmente gli studi sui recettori cannabinoidi sono volti alla ricerca di nuovi farmaci, non solo dalla marijuana stessa, ma anche verso la scoperta di composti sintetici o semisintetici in grado di manipolare i recettori e gli enzimi coinvolti nel sistema endocannabinoide. Il primo farmaco moderno, a base di Cannabis, è il dronabinolo, il trans-isomero del Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC) prodotto semisinteticamente dalla Bionorica Ethics e THC Pharm (D) e commercializzato dalla Unimed Pharmaceuticals (USA) come Marinol.

APPENDICE A

Il dronabinolo è molto utile nella profilassi della nausea da chemioterapia antitumorale e AIDS e come stimolante dell'appetito, quando gli altri farmaci risultano inefficaci. Il Nabilone (Figura A.6) invece è una cannabinoide sintetica commercializzato sotto il nome di Cesamet nel Canada, UK, Messico e nei US. Viene usato in terapia come antiemetico ed analgesico e nel trattamento di dolori neuropatici. La struttura di nabilone mima quella del THC mentre gli effetti collaterali sono più prevedibili causando meno euforia. Il FDA ha approvato il nabilone nel 1985 per il trattamento della nausea e del vomito causato dalla chemioterapia quando gli anti-emetici convenzionali non hanno effetti soddisfacenti, inoltre è approvato per il trattamento dell'anoressia della perdita di peso nell'HIV. Viene largamente usato nel trattamento di dolori cronici soprattutto in condizioni come fibromialgia e MS. Il primo farmaco sintetico ad azione antagonista per i CB₁ è il rimonabant prodotto dall'impresa farmaceutica Francese Sanofi-Aventis. Il rimonabant (Figura A.7) è un farmaco anti-obesità e viene indicato in associazione ad una dieta appropriata e ad esercizio fisico per pazienti con un indice di massa corporea (BMI) oltre 30Kg/m² o pazienti con un BMI oltre 27Kg/m² con fattore di rischio associato come diabete II e dislipidemia (LDL). Dal 2007 rimonabant è disponibile in 38 paesi. Inoltre è in corso di valutazione se questo farmaco è in grado di aiutare i fumatori e gli alcool-dipendenti nel controllo delle loro dipendenze (craving disorders). Il cannabinor (Figura A.8) è l'unico farmaco sintetico ad azione agonista specifico del CB₂ che si trova nella fase II di test clinici. Cannabinor è stato sviluppato da Pharmos Ltd. e viene testato come analgesico con dolori generali e specificamente associati con infiammazioni. In modelli pre-clinici; il cannabinor si è dimostrato efficace contro i sintomi della MS, artrite reumatica e danneggiamento infiammatorio del fegato.

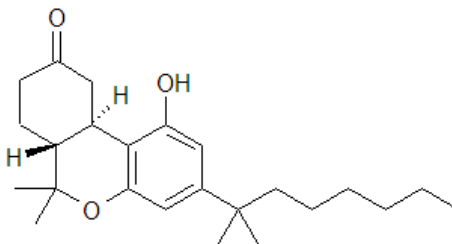


Figura A.6 Struttura del Nabilone.

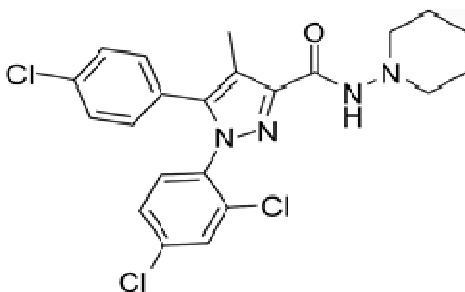


Figura A.7 Struttura del Rimonobant.

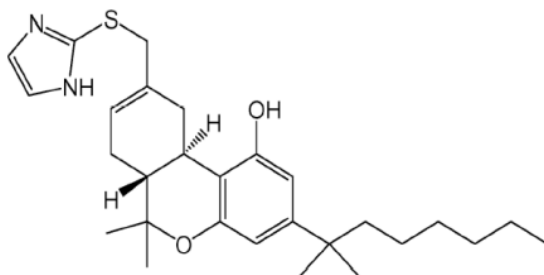


Figura A.8 Struttura del Cannabinor.

BIBLIOGRAFIA (Appendice A)

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D., 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277, 1094-1097.

Bird KD., Boleyn T., Chesher GB., Jackson DM., Starmer GA., Teo RK., (1980). Intercannabinoid and cannabinoid-ethanol interactions on human performance. *Psychopharmacology (Berl)*. vol. 71 No. 2; pp. 181-188.

Cravatt BF., Giang DK., Mayfield SP., Boger DL., Lerner RA., Gilula NB., (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* vol. 384; pp. 83-87.

Devane WA., Manus L., Breuer A., Pertwee RG., Stevenson LA., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R., (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* vol. 258; pp. 1946-1949.

Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz JC., Piomelli D., (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* vol. 372; pp. 686-691.

Dinh TP., Carpenter D., Leslie FM., Freund TF., Katona I., Sensi SL., Kathuria S., Piomelli D., (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* vol. 99; pp. 10819-10824.

Freund TF., Katona I., Piomelli D., (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* vol. 83; pp. 1017-1066.

Gertsch J., Schoop R., Kuenzle U., Suter A., (2004). Echinacea alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* vol. 577 No. 3; pp. 563-569.

APPENDICE A

Gertsch J., (2008). Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. *Planta Med.* vol. 74; pp. 638–650.

Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen JZ., Xie XQ., (2008). Beta-Caryophyllene is a Dietary Cannabinoid. *Proc Nat Acad Sci USA* vol. 105; pp. 9099–104.

Goparaju SK., Ueda N., Taniguchi K., Yamamoto S., (1999). Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* vol. 57; pp. 417-423.

Grotenhermen F., (2006). *Cannabinoids* vol 1, No 1.

Hillard CJ., Wilkison DM., Edgemond WS., Campbell WB., (1995). Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim Biophys Acta* vol. 1257 No.3; pp. 249-256.

Hollister LE., Gillespie H., (1975). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556647> Interactions in man of delta-9-tetrahydrocannabinol. II. Cannabinol and cannabidiol. *Clin Pharmacol Ther.* vol. 18 No.1; pp. 80-83.

Hollister LE., Overall JE., (1975). Dimensions of marijuana experience. *Drug Alcohol Depend.* vol. 2; pp. 155-164.

Karniol IG., Shirakawa I., Takahashi RN., Knobel E., Musty RE., (1975). Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabinol in man. *Pharmacology* vol. 13 No. 6; pp. 502-512.

Matsuda LA., Lolait SJ., Brownstein MJ., Young AC., Bonner TI., (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* vol. 346; pp. 561-564.

Munro S., Thomas KL., Abu-Shaar M., (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* vol. 365; pp. 61-65.

Peters H., Nahas GG., Sutin K., Harvey D., Agurel S., (1999). A brief History of four millennia (B.C. 2000-A.D. 1974) Marihuana and medicine. Totowa (NJ): Humana Press Inc. pp. 3-7.

Piomelli D., (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* vol. 4; pp. 873-884.

Piomelli D., Beltramo M., Glasnapp S., Lin SY., Goutopoulos A., Xiang-Qun Xie., Makriyannis A., (1999). Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *PNAS* vol. 96 No. 10; pp. 5802-5807.

Raduner S., Majewska A., Chen JZ., Xie XQ., Hamon J., Faller B., (2006). Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J Biol Chem.* vol. 281; pp. 14192–14206.

Ueda N., Kurahashi Y., Yamamoto S., Tokunaga T., (1995). Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J. Biol. Chem.* vol. 270; pp. 23823-23827.

Wilson RI., Nicoll RA., (2002). Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Science* vol. 296 No. 5568; pp. 678-682

www.wikipedia.com

4 GENERE *SECURIDACA*

4.1 Sistematica

4.1.1 Introduzione

Regno	Plantae
Sottoregno	Tracheobinta
Superdivisione	Spermatophita
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sottoclasse	Rosidae
Ordine	Polygalales
Famiglia	Polygalaceae
Genere	<i>Securidaca</i> L.

Il genere *Securidaca* appartiene alla famiglia delle *Polygalaceae*, questa famiglia è costituita da circa 700 specie, riunite in 12 generi, propri delle regioni temperato-calde, particolarmente numerose nelle Americhe e rappresentate in prevalenza da piante erbacee, più di rado legnose (Campbell et al. 2007).

Nella flora italiana è presente unicamente il genere *Polygala* con diverse specie legate, per lo più, ai luoghi aperti, quali praterie steppiche, prati umidi, torbiere, ecc.(Pignatti 1982).

4.1.2 Caratteristiche del genere *Securidaca*

Le specie appartenenti al genere *Securidaca* hanno foglie che si presentano spirali, più raramente opposte o verticillate, le foglie portano alla base una guaina cilindrica che avvolge il fusto (ocrea), che deriva dalla fusione delle stipole. I fiori sono ermafroditi e zigomorfi; inoltre presentano una struttura molto tipica: con 5 sepalì di cui 2 molto grandi, chiamati appunto ali che, hanno aspetto petaloide e sono poste lateralmente, racchiudendo completamente tutto il fiore. La corolla è formata originariamente da 5 petali, di cui l'inferiore ha la forma di una carena sfrangiata nella parte terminale che racchiude gli stami, i 2 laterali sono spesso assenti per riduzione e i 2 superiori sono liberi posteriormente ma saldati in avanti con gli altri;

GENERE *SECURIDACA*

l'androceo è costituito di norma da 8 stami saldati in un tubo, concesiuto più o meno alla corolla. Il gineceo presenta generalmente 2 carpelli riuniti in un ovario supero e infiorescenza in racemo. Perianzio con segmenti petaloidi, impollinazione di tipo entomogama. Il frutto è generalmente una capsula. L'impollinazione è per lo più entomogama e la dispersione dei semi è mirmecora, affidata cioè alle formiche (Tratto da: *Agendae Florae Reipublicae Popularis Sinicae* (1997)).

La formula florale più comune è la seguente:

K 5, [C 3, A (8)], G (2) (Judd et al. 2007) in cui:

K = Calice	A cui viene fatto seguire il numero dei sepali
C = Corolla	Numero dei petali
P = Perigonio	Numero dei tepali
A = Androceo	Numero degli stami
G = Gineceo	Numero carpelli o ovari

4.2 Fitochimica del genere *Securidaca*

In linea con le attuali classificazioni di carattere chemiotassonomico possiamo dire che nel genere *Securidaca* si riscontrano comunemente flavonoidi (Hamburger et al. 1985)(vedasi capitolo 5 Figura 5.7) alcaloidi (Costa et al. 1992; Scandola et al. 1994) (Figura 4.1), saponine (Davreux et al. 1971), acidi organici (Mahmood et al. 1993) (Figura 4.2) e zuccheri derivati (De Tommasi et al. 1993) (Xue-Dong Yang et al. 2001) (Figura 4.3).

Alcune specie del genere *Securidaca* sono state ampiamente studiate, tra queste sono da ricordare la *S. longipedunculata* Fresen e la *Securidaca inappendiculata* Hassk. Dal punto di vista fitochimico numerose informazioni sono riportate in letteratura sulla specie *S. longipedunculata* Fresen, che è stata usata come veleno per i pesci e come cimento da diverse tribù dell'Africa Centrale (Neuwinger 1997).

Lenz (1913) cita l'uso contro la sifilide ed il mal di pancia da parte degli abitanti della West-Usambara ed identifica alcune saponine come componente principale della frazione polare sospettando la presenza di metilsalicilati attraverso test organolettici.

Prista (1958), nonché Moers (1966) menzionano il suo uso contro le malattie reumatiche e contro il mal di denti in Angola Katanga. Inoltre è comune presso queste tribù indigene l'uso della *S. longipedunculata* come purgante e abortivo e

l'autosomministrazione a scopo suicida. Le donne indigene usano introdurre per via vaginale la corteccia delle radici per suicidio e proprio questa eclatante proprietà ha motivato ulteriori studi farmacognostici della *S. longipedunculata* (Prista et al. 1958; Moes 1966). Prista et al. (1958) hanno individuato, oltre le saponine due glucosidi metilsalicilati (monotropitina e gaultherina), ma ne loro, ne Lenz (1913) sono stati in grado di ritrovare alcaloidi.

La presenza di alcaloidi indolici è stata successivamente confermata da Costa et al. (1992) rivelando la presenza di elimoclavina e deidroelimoclavina nonché un altro alcaloide ergolinico.

Wrobel et al (1996) hanno trovato nella *S. longipedunculata* numerosi derivati dell'acido cinnamico.

Sono stati isolati differenti xantoni da Galeffi et al. (1989) quale il 2-idrossi-1,7-dimetossixantone, in particolare, e da Meyer et al. (2008) il 1,3,6,8-tetraidrossi-2,5-dimetossixantone e il 1,6,8-triidrossi-2,3,4,7-tetrametossixantone (Figura 4.4).

Questi ultimi sono stati testati su preparati di corpi cavernosi ottenuti dal pene di coniglio della Nuova Zelanda, ed è stata verificata l'attività di rilassamento dei corpi cavernosi, quindi la capacità di facilitare l'erezione, raffrontando l'attività per il controllo positivo con le stesse concentrazioni di Viagra (sildenafil). Ciò ha confermato un possibile uso nel trattamento della disfunzione erettile (Meyer, et al. 2008). Diversi xantoni sono stati ritrovati nelle radici di un'altra specie affine, la *Securidaca inappendiculata* Hassk. originaria del sud della Cina e utilizzata nella medicina tradizionale cinese come antinfiammatorio, antireumatico e antibatterico (Yang et al. 2001).

Per quanto riguarda la *S. diversifolia* gli studi fitochimici riportati in letteratura sono limitati ad un unico studio sui flavonoidi glicosidici ottenuti dalle foglie (Hamburger et al. 1985)(vedasi capitolo 5).

4.2.1 Alcaloidi

Nessun altro gruppo di composti naturali ha contribuito in maniera tanto significativa alla produzione di prodotti farmaceutici come gli alcaloidi (Heinrich et al. 2004). Con il termine alcaloide si intende una sostanza organica di origine vegetale e in misura minore anche animale o microbica (Dewick 2001), formata da ossigeno, idrogeno, carbonio e azoto (gruppi amminici tali da impartire alla struttura un carattere basico); inoltre, questa categoria di composti, possiede forti azioni fisiologiche su esseri umani e animali (Wikipedia).

Queste molecole sono caratterizzate dalla presenza di uno o più atomi di azoto (normalmente come ammine primarie, secondarie o terziarie) e ciò conferisce loro una certa basicità che, è spesso utilizzata per l'isolamento e la purificazione, poiché consente di formare sali insolubili in presenza di acidi minerali (Dewick 2001).

In Germania, nel 1818, il farmacista Karl Friederich Wilhelm Meissner, coniò per la prima volta il termine alcaloide, descrivendo una sostanza dalle proprietà alcaline (Heinrich et al. 2004). Gli alcaloidi costituiscono una numerosissima famiglia di composti azotati, che risultano alquanto eterogenei sia per struttura chimica che per attività farmacologica (Capasso et al. 2008). Gli alcaloidi conosciuti sono circa 5500, distribuiti in circa 4000 specie vegetali (Bruni 1999). Gli alcaloidi sono quasi del tutto assenti nelle Gimnosperme, sono diffusi nelle Dicotiledoni e in misura minore nelle Monocotiledoni (Bruni 1999). In particolare, per quanto riguarda le Dicotiledoni, li ritroviamo nelle famiglie: *Apocinaceae*, *Asteraceae*, *Berberidaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Lauraceae*, *Loganiaceae*, *Magnoliaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, mentre, nell'ambito delle Monocotiledoni, ritroviamo gli alcaloidi, soprattutto, nelle famiglie: *Liliaceae* e *Amaryllidaceae* (Capasso et al. 2008).

Gli alcaloidi si possono trovare in varie parti (organi) della pianta, ma di solito, uno o più organi hanno un contenuto più alto rispetto ad altri (Capasso et al. 2008). Nella cellula, gli alcaloidi, di solito, si accumulano nei vacuoli e non nel protoplasma o nella parete cellulare; inoltre, una volta sintetizzati essi vengono trasportati e immagazzinati in luoghi differenti da quelli di produzione (Capasso et al. 2000). Gli alcaloidi rappresentano un'alternativa chimica funzionale, rispetto alle numerose sostanze a reattività acida, quali gli acidi carbossilici e i composti fenolici, ampiamente presenti nelle piante (Bruni 1999). Gli alcaloidi si formano a partire dagli amminoacidi ed incorporano l'azoto grazie ad uno scheletro costruito da una serie di reazioni biochimiche (Capasso et al. 2008). In funzione della struttura che contiene l'azoto, gli alcaloidi possono essere divisi in diverse famiglie qui di seguito indicate.

Nel genere *Securidaca* sono stati isolati principalmente diversi alcaloidi (alcuni dei quali dalla *Securidaca longepedunculata* Fres) che vengono riportati nelle figure seguenti.

4.2.1.1 Alcaloidi indolici

Come gli alcaloidi isochinolinici, gli alcaloidi indolici rappresentano un'importante fonte di composti bioattivi (Heinrich et al. 2004). Questo vasto gruppo di alcaloidi,

che va dai semplici derivati della triptamina, ai più complessi derivati monoterpenici, ha come precursore il triptofano; inoltre presenta diverse e molteplici azioni biologiche (Capasso et al. 2004). Per secoli le radici della *Rauwolfia serpentina* sono state usate nel continente indiano; infatti nel sistema medicinale Ayurvedico questa pianta è stata usata come una sorta di panacea, i suoi usi spaziavano dalla cura per i morsi di serpente all'uso come sedativo e tranquillante (Heinrich et al. 2004). Gli alcaloidi indolici presentano attività vasocostrittoria antitumorale, psicoattiva. Tra i composti appartenenti a questo gruppo ricordiamo: la reserpina della già citata *Rauwolfia serpentina*, fisostigmina, fisovenina, eseramina, genesernia isolate dal seme di *Physostigma venenosum*, yoiombe e yoimbina estratti dalla corteccia di *Pausinystalia yohimbe*, stricnina, brucina, vomicina dal seme di *Strychnos nux-vomica*, ergometrina, ergotamina, diidroergotossina dalla *Claviceps purpurea*, infine, ma non meno importante, gli alcaloidi vinblastina e vincristina estratti dal *Catharanthus roseus* (Henrich et al. 2004).

4.2.2 Benzofenoni

I Benzofenoni non sembrano essere molto comuni nelle piante ed in natura in genere, ma sono stati isolati da una gamma di famiglie indipendenti di piante superiori come: Clusiaceae (*Garcinia subelliptica* Merr., Minami et al. 1994, *Hypericum annulatum* Moris, Kitanov et al. 2001), Lauraceae (*Lindera fruticosa* Hemsl, Song et al. 2007), Anacardiaceae (*Mangifera indica* L. Tanaka et al. 1983) e Thymelaeaceae (*Gnidia involucrata*. Steud ex A. Rich. Ferrari et al. 2000). I benzofenoni sono stati riportati per *Securidaca inappendiculata* Hassk., una pianta medicinale cinese (Kang et al. 2005; Yang et al. 2003)(Figura 4.6).

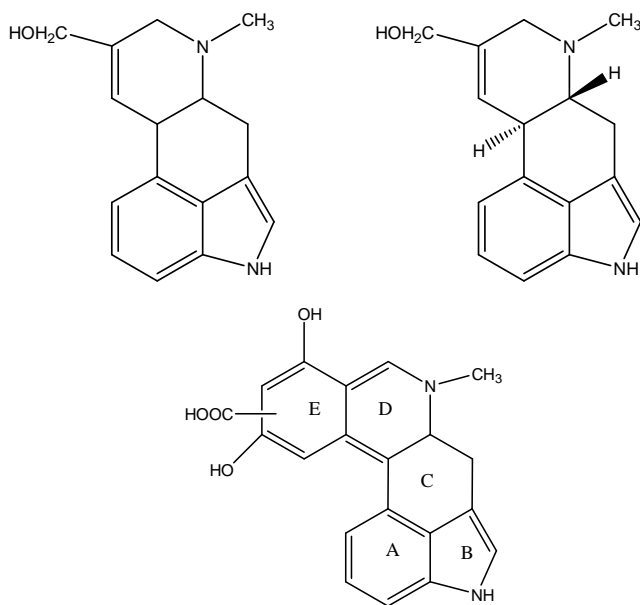


Figura 4.1 Dehydroelymoclavine e Elymoclavine ed un nuovo alcaloide ergolinico isolati dalla *S. longipedunculata* (Wrobel et al. 1996)

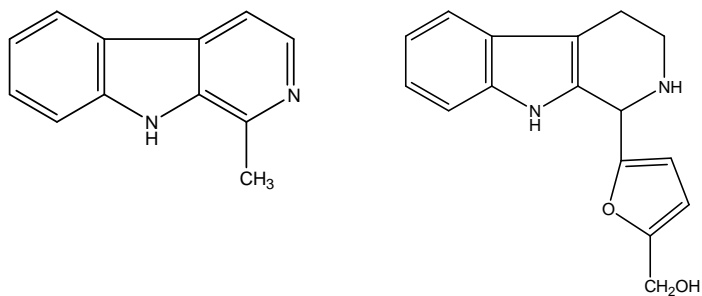


Figura 4.1a Alcaloidi Harman e Pertolyn isolati dalla *S. longipedunculata* (Wrobel et al. 1996)

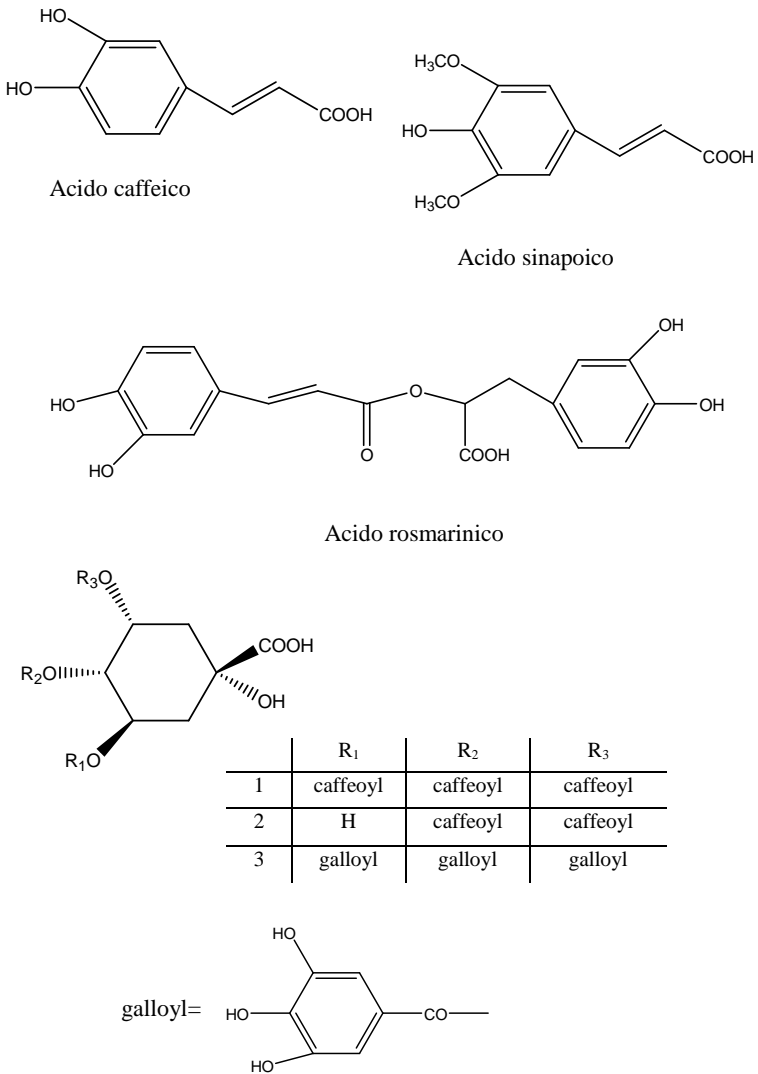
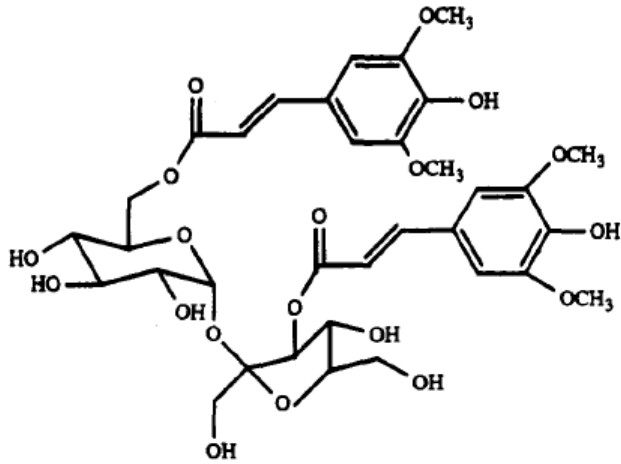
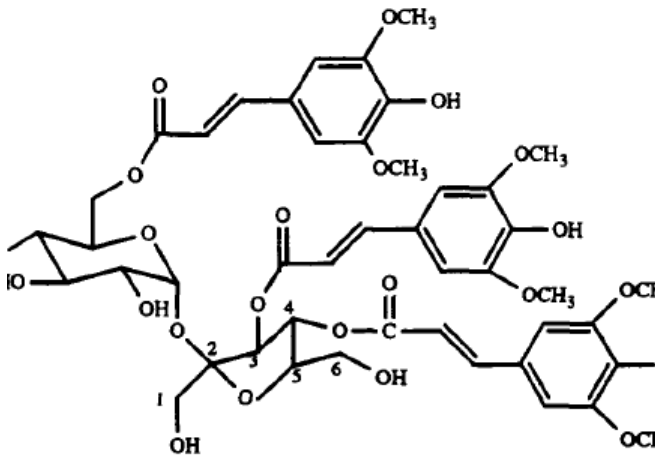


Figura 4.2 Acidi organici isolati dal genere *Securidaca* (Mahmood et al. 1993)

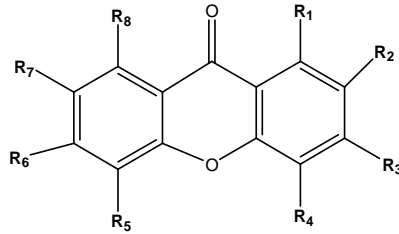


1



2

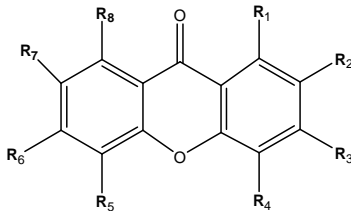
Figura 4.3 Zuccheri derivati isolati dal genere *Securidaca* (De Tommasi et al. 1993) (Yang et al. 2001)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1,2,7-trimethoxyxanthone	OMe	Me	H	H	H	H	OMe	H
1,4-dihydroxy-7-methoxy-xanthone	OH	H	H	OH	H	H	OMe	H
1,5-dihydroxy-2,3,6,7,8-pentamethoxy-xanthone	OH	OMe	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe
1,7-dihydroxy-4-methoxyxanthone	OH	H	H	OMe	H	H	OH	H
1,3,6,8-tetrahydroxy-2,5-dimethoxyxanthone	OH	OMe	OH	H	OMe	OH	H	OH
1,6 dihydroxy-xanthone	OH	H	H	H	H	OH	H	H
1,6,8-trihydroxy-2,3,4,7-tetramethoxyxanthone	OH	OMe	OMe	OMe	H	OH	OMe	OH
1,7dimethoxy-2hydroxy-xanthone	OMe	OH	H	H	H	H	OMe	H
2-hydroxy-1,7-dimethoxyxanthone	OMe	OH	H	H	H	H	OMe	H

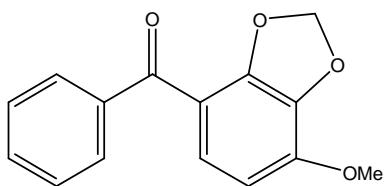
Figura 4.4 Xantoni isolati dalla *Securidaca longepedunculata* (Meyer et al. 2008; Galeffi et al. 1989; Meli Lannang et al. 2006)

GENERE *SECURIDACA*

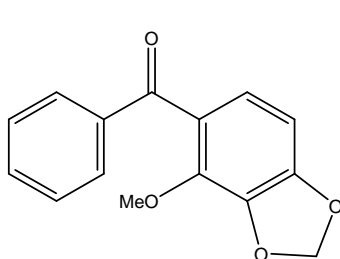


Nomi	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1,3,6-tri-hydroxy-2,7-dimethoxyxanthone	OH	OMe	OH	H	H	OH	OMe	H
1,3,7-tri-hydroxy-2-methoxyxanthone	OH	OMe	OH	H	H	H	OH	H
1,3,8-tri-hydroxy-2methoxyxanthone	OH	OMe	OH	H	H	H	H	OH
1,7dihydroxy-3,4-dimethoxyxanthone	OH	H	OMe	OMe	H	H	OH	H
1,7-dihydroxyxanthone	OH	H	H	H	H	H	OH	H
2-hydroxy-1,7-dimethoxyxanthone	OMe	OH	H	H	H	H	OMe	H
1,3,7-trihydroxy-2,8-dimethoxyxanthone	OH	OMe	OH	H	H	H	OH	OMe
1,3,7-tri-hydroxyxanthone	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
1,6-dihydroxyxanthone	OH	H	H	H	H	OH	H	H
1,7-dihydroxy-4-methoxyxanthone	OH	H	H	OMe	H	H	OH	H
2,7-dihydroxy-1-methoxyxanthone	OMe	OH	H	H	H	H	OH	H
3,7-dimethoxy-4-hydroxyxanthone	H	H	OMe	OH	H	H	OMe	H

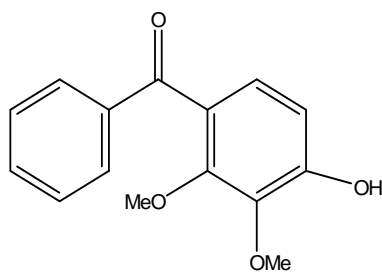
Figura 4.5 Xantoni isolati dalla *Securidaca inappendiculata* (Galeffi et al. 1989; Meyer et al. 2008)



2,3-methylenedioxy-4-methoxybenzophenone⁽¹⁾



2-methoxy-3,4-(methylenedioxy)benzophenone⁽²⁾



4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzophenone⁽²⁾

Figura 4.6 Benzofenoni isolati dalla *Securidaca inappendiculata*

⁽¹⁾ Yang et al. 2003

⁽²⁾ Kang et al. 2005

BIBLIOGRAFIA (Capitolo 4)

Agendae Academiae Sinicae Edita (1997) Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 43 (3) (Science Press, Beijing), pp 138–198.

Bruni A., (1999). Farmacognosia generale e applicata-I farmaci naturali- Piccin Nuova Libreria S.p.A. Padova Italia; pp. 98-100, 105-107.

Campbell J., Kellogg SD., (2007). Botanica Sistemática - Un approccio filogenetico, Padova, Piccin Nuova Libreria; pp. 69.

Capasso F., De Pasquale R., Grandolin G., Mascolo N.. Farmacognosia, Farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico (2008). Springer-Verlag Milano Italia; pp. 231-237, 245-252, 269-317.

Costa C., Bertazzo A., Allegri G., Curcurutu O., Traldi P., (1992). Indole Alkaloids from the Roots of an African Plant *Securidaca longipedunculata*. I. Isolation by Column Chromatography and Preliminary Structural Characterization by Mass Spectrometry. J. Heterocyclic Chem. vol. 29; pp. 1641-1647.

De Tommasi N., Piacente S., (1993). New sucrose derivatives from the bark of *Securidaca longipedunculata*. J. Nat. Prod. vol. 56; pp. 134-137.

Dewick PM., (2001). Chimica, biosintesi e bioattività delle sostanze naturali. Piccin Nuova Libreria S.p.A. Padova Italia; pp.270-271.

Dvreux M., Delaude C., (1971). Saponins of the Polygalaceae: Identification of the saponin extracted from *Securidaca welwitschii*. Bull. Soc. Roy. Sci. Liege vol. 40; pp. 498-501.

Galeffi E., Federici E., Msonthi JD., Marini-Bettolo GB., Nicoletti M., (1989). New Xanthones from *Ectiadiopsis oblongifolia* and *Securidaca longipedunculata*. Fitoterapia vol. 16;pp. 79-81.

Ferrari J., Terreaux C., Sahpaz S., Msonthi JD., Wolfender JL., Hostettmann K., (2000). Benzophenone glycosides from *Gnidia involucrata*. *Phytochemistry* vol. 54; 883-889.

Hamburger M., Gupta M., Hostettmann K., (1985). Flavonol glycosides from *Securidaca diversifolia*. *Phytochemistry* vol. 24; pp. 2689-2692.

Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E., (2004), *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone.

Kang WY., Ji ZQ., Wang JM., (2005). A new xanthone from the roots of *Securidaca inappendiculata*. *Chemical Papers* vol. 63, No. 1; pp. 102-104.

Kitanov GM., Nedialkov PT., (2001). Benzophenone O-glucoside, a biogenic precursor of 1,3,7-trioxygenated xanthenes in *Hypericum annulatum*. *Phytochemistry* vol. 57(8); pp. 1237-43.

Lenz W., (1913). Untersuchung der Wurzelrinde von *Securidaca longipedunculata*. *Arbeiten aus dem Pharm. Inst. D. Univ. Berlin* vol.10; pp. 177-180.

Mahmood N., Moore PS., Tommasi ND., Simone FD., (1993). *Antiviral Chemistry Chemotherapy* vol. 4; pp. 235-240.

Meli Lannag A., Lontsi D., Ngounou FN., Sondengam BL., Nkengfack AE., van Heerden FR., Assob JCN., (2006). Securidacaxanthone A, a hepta-oxygenated xanthone from *Securidaca longepedunculata*. *Fitoterapia* vol. 77; pp. 199-202.

Meyer JJ., Rakuambo NC., Hussein AA., (2008). Novel xanthenes from *Securidaca longipedunculata* with activity against erectile dysfunction. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 119; pp. 599-603.

Minami H., Hamaguchi K., Kubo M., Fukuyama Y., (1998). A benzophenone and a xanthone from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry* vol. 20;49(6); pp. 1783-1785.

GENERE *SECURIDACA*

Moers A., (1966). Étude parallèle de la composition chimique de *Polygala senega* et de *Securidaca longipedunculata* Fres. var. *parviflora*, une Polygalacée congolaise. Journal de Pharmacie de Belgique vol. 21; pp. 347-362.

Neuwinger (1997). Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte. *Securidaca longipedunculata*; pp. 681-690.

Pignatti S., (1982). La Flora d'Italia . Ed. Edagricole. Bologna.

Prista LN., Correira Alves A., (1958). Estudo farmacognóstico da *Securidaca longipedunculata*. Fresen. Garcia de Orta vol. 6; pp. 131-147.

Scandola M., Games DE., (1994). J. Heterocyclic Chem. vol. 31; pp. 219-224.

Song MC., Nigussie F., Yang HJ., Kim HH., Kim JY., Chung DK., Baek NI., (2008). Phenolic glycosides from *Lindera fruticosa* root and their inhibitory activity on osteoclast differentiation. Chem Pharm Bull (Tokyo). Vol. 56(5); pp. 707-710.

Tanaka T., Sueyasu T., Nonaka G., Nishioka I., (1984). Petiolins F-I, benzophenone rhamnosides from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. Chem. Pharm. Bull. vol. 32; pp. 2676-2686.

Judd WS., Campbell CS., Kellogg EA., Stevens PF., Donoghue MJ (2008). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, Mass.

Wróbel JT., Matuszewska M., Szychowski J., Bertazzo A., Traldi P., Costa CV., Allegri G., (1996). Indole alkaloids and other constituents from the plant *Securidaca longipedunculata* Fres. Adv Exp Med Biol. vol. 398; pp. 685-6.

Yang XD., Xu LZ., Shi-Lin Yang (2001). Xanthones from the stems of *Securidaca innappediculata*. Phytochemistry vol. 58; pp. 1245-1249.

Yang XD., Ning AN, Xu LZ., Yang SL., (2002). New xanthone glycosides from *Securidaca innappediculata*. Journal of Asian Natural Products Research. vol. 4 No. 2; pp. 141-145.

5 *Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake

5.1 Caratteristiche della pianta

La *Securidaca diversifolia*, nota anche col nome *Elsota diversifolia* (L.) S. F. Blake, è una pianta originaria dell'America centrale, in particolare del Messico. I Popoluc, nella loro lingua d'origine, chiamano questa specie "Ki pats ay" mentre in spagnolo è denominata "Balsamillo" (Leonti et al. 2001).

Si presenta come pianta rampicante, lunga fino a 10 m, con brevi rami laterali alternati, foglie coriacee, strettamente ovate, o oblunghie, con apice ottuso o leggermente acuminato.

La superficie inferiore delle foglie è minuziosamente striata con una nervatura prominente. L'infiorescenza è un racemo terminale; ogni fiore ha un calice dimorfo con cinque sepali rosa-lavanda: i tre esterni sono arrotondati, con lunghezza di circa 3 mm, mentre quelli interni sono di 8-10 mm di lunghezza con aspetto petaloide.

Il colore della corolla varia dal lavanda al viola. Il frutto è una samara d'aspetto irsuto e lunghezza di circa 3,5-4 centimetri (Acevedo- Rodriguez 2005) (Figura 5.1, 5.2).



Figura 5.1 Immagine della *S. diversifolia* raccolta.



Figura 5.2 Particolare dei fiori e delle foglie della *S. diversifolia* .

5.2 Distribuzione

La *Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake è una pianta nativa del Messico, ma la possiamo ritrovare anche nel Sud America e in particolare (Figura 5.3,5.4):

- Mesoamerica (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panama). Caraibi (Barbados, Dominica, Grenada, Guadeloupe, Martinique, St. Lucia, St. Vincent e Grenadines).
- Brasile.
- Sud America settentrionale (French Guiana, Guyana, Suriname, Venezuela).
- Sud America occidentale (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perù).
- Sud America meridionale (Argentina).



● *Securidaca diversifolia*

Figura 5.3 Distribuzione della *Securidaca diversifolia*.



Figura 5.4 Particolare della distribuzione nel Centro America.

5.2.1 Luogo di raccolta

Le radici della *Securidaca diversifolia* sono state raccolte, con il permesso N°. DOO. 02.-1750 ottenuto dall'Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), nella Sierra di Santa Marta, vicino al villaggio di Soatepan, a circa 350 m sul livello del mare, nell'anno 2000 (Figura 5.5). Dopo la raccolta la pianta è stata mondata e ripulita da tutte le impurità e dai corpi estranei; successivamente, per consentirne 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, un campione della pianta (*Leonti 263*) è stato depositato nell'Erbario Nazionale Messicano MEXU (UNAM, México, D.F.), inoltre presso "The School of Pharmacy" dell' Università di Londra e all' ETH di Zurigo (CH).

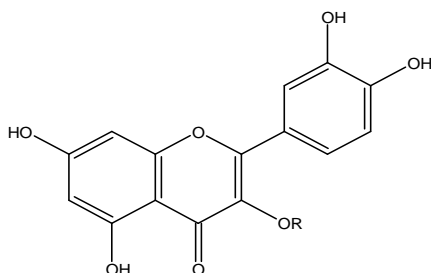


Figura 5.5 Sierra de Santa Marta, habitat Popoloca della Sierra. Da Foster (1966).

5.3 Studi fitochimici della *Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake

Per quanto riguarda la *S. diversifolia* gli studi fitochimici riportati in letteratura sono limitati ad un unico studio sui flavonoidi glicosidici ottenuti dalle foglie (Hamburger et al. 1985) in questo studio sono stati isolati dodici flavonoidi glicosidici, dieci quercetina-3-glicosidi e due camferolo-3-glicosidi. (Figura 5.6).

E' stata rilevata inoltre la presenza di uno zucchero di interesse chemiotassonomico, l'apiosio (Figura 5.7), che si ritrova spesso in numerose Polygalaceae, ma meno frequentemente come glicoside dei flavonoidi (Hamburger et al. 1985).



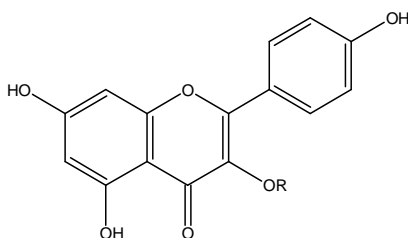
Quercetina

R=3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-galactopyranoside);

3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside);

3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosyl-α-L-arabinopyranoside);

3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosyl-β-D-xilopyranoside);



Kaemferolo

R=3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosyl-β-D glucopyranoside);

Figura 5.6 Flavonoidi glicosidici della *S. diversifolia*.

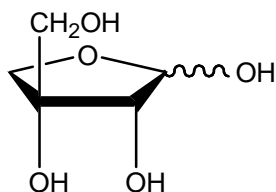


Figura 5.7 Molecola dell' Apiosio.

5.4 Risultati fitochimici della *Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake

Il Dott. Marco Leonti, durante il suo periodo di studi in Messico, ha potuto evidenziare l'uso popolare del macerato della corteccia e della radice di questa pianta rampicante, diffusa esclusivamente in America Centrale, per curare le malattie febbrili, incluso il morbillo e in misura minore, la diarrea (Leonti 2002).

Nel presente studio sono stati isolati e delucidati tre nuovi composti naturali (appartenenti alla famiglia dei benzofenoni: *2,4-Dihydroxy-3-methoxy-benzophenone* (1), *2,4-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone* (2), *3',4'-Methylenedioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone* (3), due benzofenoni noti (*Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate* (4) e *Benzil 2,6-dimetossibenzoato* (5)) e l'isovanillina (6) (Figura 5.8, 5.9).

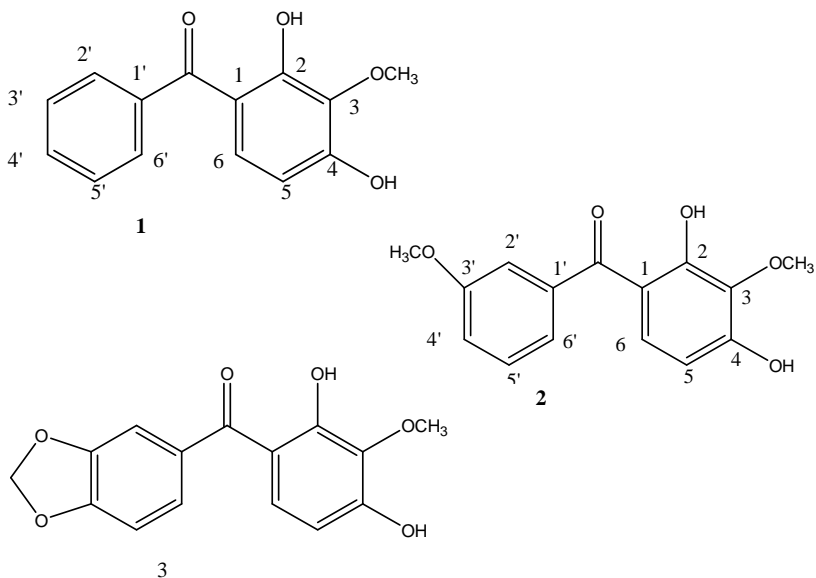


Figura 5.8 Struttura dei nuovi benzofenoni isolati dalla *Securidaca diversifolia*: 1. 2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone 2. 2,4-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone; 3. 3',4'-Methylenedioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone.

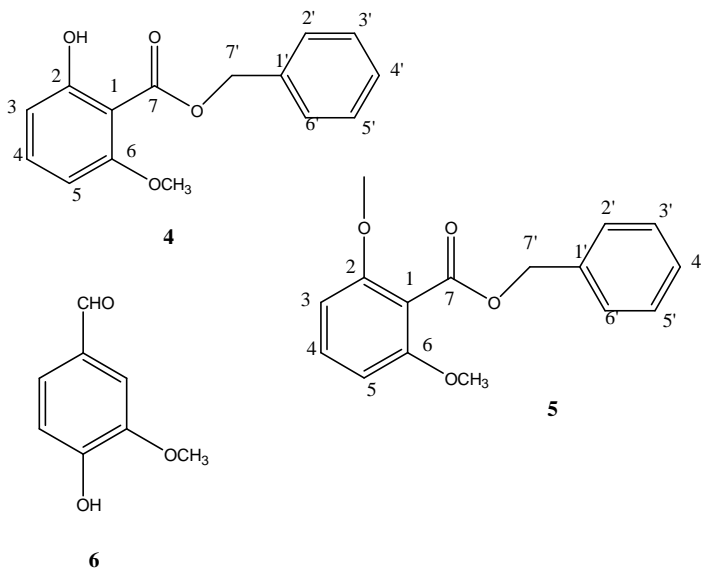


Figura 5.9 Benzofenoni e isovanillina isolati dalla *Securidaca diversifolia*: 4. Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate; 5. Benzil 2,6-dimetossibenzoate; 6. Isovanillina.

5.5 Estrazione e isolamento

1kg di radici essiccate e frantumate della *Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake sono state fatte percolare estensivamente inizialmente, con diclorometano (DCM) e successivamente con Metanolo (MeOH). Gli estratti sono stati concentrati a pressione ridotta, alla temperatura di 32°C; si sono così ottenuti rispettivamente 16,4 g e 50 g di estratto crudo.

5.5.1 Frazionamento dell'estratto diclorometanico (Figura 5.10)

Otto g dell'estratto in toto è stato disposto in una colonna cromatografica sottovuoto (VLC) con 104 g di Gel di Silice ed eluito con diversi gradienti della miscela di solventi Esano-Acetone: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 100% Acetone e infine Metanolo-Acetato d'Etile 5:5 per esaurire la colonna. Sono state così ottenute 28 frazioni riunite e combinate in 11 frazioni, in base ai risultati della TLC (Fr .1- Fr. 12). La frazione 6 (424 mg) è stata sottoposta a cromatografia su colonna aperta (CC), caricata con 70

g di gel di silice ed eluita con 100% di DCM, e ha portato all'ottenimento di 11 subfrazioni. La subfrazione 6.8 corrisponde al nuovo composto naturale **2,4-Dihydroxy-3-methoxy-benzophenone** (1) (13,5 mg).

La subfrazione 6.9 (12 mg) è stata sottoposta ad HPLC NP (DCM 100%, con flusso di 3 mL/min) dando il nuovo composto naturale **2,4-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone** (2) ($t_R = 22$ min, 7,8 mg). Un'aliquota della frazione 7 VLC (367 mg) è stata purificata mediante HPLC NP (Esano-EtOAc 7:3 flusso di 2,5 mL/min) permettendo l'ottenimento del nuovo benzofenone naturale, il **3',4'-Methylendioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone** (3) ($t_R = 16$ min, 9,3 mg) e del composto **isovanillina** (6) ($t_R = 22$ min, 3,2 mg).

La frazione 3 della VLC (800 mg) è stata frazionata con una ulteriore VLC, utilizzando 33 g di gel di silice e gradienti di Esano-DCM (a partire dalla 6:4 e terminando con 100% DCM). La subfrazione 3.3 è stata purificata su cartuccia SPE (Esano-DCM 6:4) risultando nel composto **Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate** (4) (44 mg). La frazione 5 VLC (476 mg) è stata sottoposta a cromatografia su CC caricata con 75 g di gel di silice utilizzando come solvente eluente DCM 100%.

La subfrazione 5.2 corrisponde al composto **Benzil 2,6-dimetossibenzoato** (5) (4,5 mg).

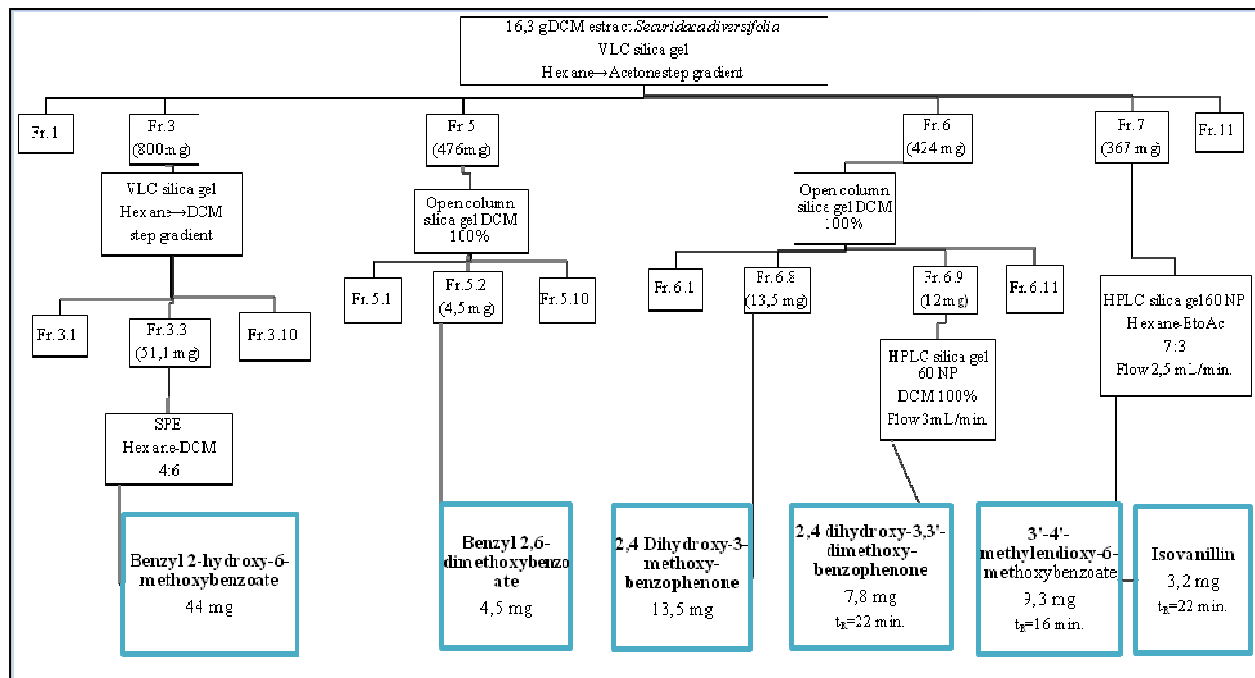


Fig. 5.10 Schema di isolamento dell'estratto Diclorometanico.

5.6 Delucidazione delle nuove strutture isolate dalla *Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake

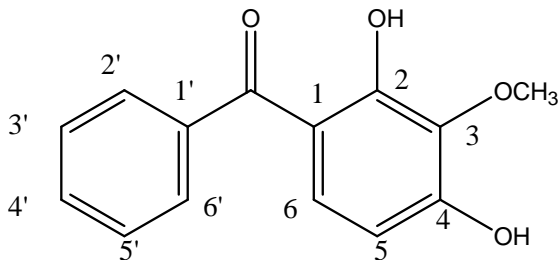
La struttura dei composti isolati è stata determinata attraverso lo studio degli spettri NMR mono (^1H , ^{13}C , $^{135}\text{DEPT}$) e bidimensionali (ROESY, COSY, HMBC, HSQC), di massa esatta (ESI) e attraverso la spettroscopia UV.

I dati analitici e spettroscopici dei composti noti sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura.

Verranno delucidati i nuovi composti isolati e riportati i dati spettroscopici ed analitici dei composti noti.

5.6.1 Delucidazione del composto 2: 2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone

Il composto si presenta come una gomma giallastra (CH_2Cl_2).



UV (CH_2Cl_2) λ_{max} nm (log ϵ): 225 (1.7), 228 (1.5), 295 (1.7); Q-TOF HRMS m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ m/z 245,0807 (calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.02 (s, 3-OCH₃), 6.38 (s, 4-OH), 6.45 (d, $J = 9$, H-5), 7.26 (d, $J = 9$, H-6), 7.45 (m, H-2'), 7.45 (m, H-6'), 7.52 (m, H-4'), 7.59 (m, H-3'), 7.59 (m, H-5'), 12.74 (s, 2-OH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 60.8 (q, 3-OCH₃), 106.3 (d, C-5), 114.0 (s, C1), 128.2 (d, C-2'), 128.2 (d, C-6'), 128.8 (d, C-3'), 128.8 (d, C-5'), 130.4 (d, C-6), 131.6 (d, C-4'), 134.2 (s, C-3), 138.1 (s, C-1'), 155.2 (s, C-4), 157.2 (s, C-2), 200.7 (s, C=O).

Lo spettro Q-TOFHRMS (Figura 5.16) mostra uno ione quasimolecolare a $[M+H]^+$ a m/z 245,0807 (calcolato 245,0814) suggerendo una formula molecolare di $C_{14}H_{12}O_4$.

Lo spettro ^{13}C NMR (Figura 5.12) mostra 14 segnali di carboni assegnabili a un gruppo metossi (δ_c 60.8) sette metini (δ_c 106.3, 130.4, 128.2, 128.2, 128.8, 128.8, 131.6) e 6 quaternari (δ_c 114.0, 134.2, 138.1, 155.2, 157.2, 200.7).

I segnali del carbonio a δ_c 128.2 e 128.8 corrispondono a 2 carboni tipici di un sistema benzenico monosostituito. I due carboni quaternari a δ_c 155.2 e 157.2 mostrano il tipico modello di un carbonio aromatico idrossilato mentre il carbonio quaternario a δ_c 207 mostra il tipico segnale di un gruppo carbonilico.

Gli esperimenti HSQC del composto 1 hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone come riportato in Figura 5.13.

Lo spettro 1H NMR (Figura 5.11) rivela i segnali di un gruppo metossi a δ_H 4.02 (3H, s), 7 protoni aromatici a δ_H 6.45 (1H, d, $J = 9$ Hz), δ_H 7.26 (1H, d, $J = 9$ Hz), δ_H 7.45 (2H, m), δ_H 7.52 (1H, m) e δ_H 7.59 (2H, m) e due protoni fenolici a δ_H 6.38 (1H, s) e δ_H 12.74 (1H, s) i secondi che partecipano a forti legami a idrogeno.

La presenza di un gruppo carbonile e due funzioni feniliche ci ha portato a pensare che il composto in esame fosse un benzofenone.

Lo spettro DQF-COSY (Double Quantum Correlation Spectroscopy) mostra iprotoni vicinali e geminali correlati via l'accoppiamento scalare (Figura 5.15) che confermano la posizione dei sostituenti sull'anello benzenico.

Le correlazioni COSY hanno rivelato che i segnali a δ_H 6.45 (d, H-5) e a δ_H 7.26 (d, H-6) sono correlati tra di loro con un valore di costante di accoppiamento di 9Hz indicativo di accoppiamento orto.

Il protone metossilico a δ_H 4.02 mostra cross peak di correlazione nell'HMBC con il carbonio quaternario a δ 134.2 (C-3).

Lo spettro HMBC ha permesso di evidenziare una serie di cross peak di correlazione tra le varie parti della molecola (alcune delle quali sono evidenziabili in Figura 5.17).

H-5 mostra correlazione in HMBC con C-3 e C-4 (155.2).

Inoltre H-6 mostra correlazioni HMBC con il gruppo carbonilico a 200.7 e con i carboni C-2 (157.2) e C-4.

Le correlazioni COSY suggeriscono che il protone a δ_H 7.45 (2H, m, H-2' e H-6'), a δ_H 7.59 (2H, m, H-3' and H-5') e il protone a δ 7.52 (1H, m, H-4') appartengono ad un sistema d'anello B.

I protoni a H-2' e H-6' mostrano correlazioni HMBC con il carbonio quaternario a δ_c 138.1, mentre i protoni H-3' e H-5' rivelano correlazioni HMBC con il carbonio C-4' a 131.6.

Securidaca diversifolia (L.) S. F. Blake

Correlazioni HMBC sono osservate per il segnale a δ_{H} 7.59 (2H, m, H-3' and H-5') con il gruppo carbonilico.

Addizionalmente il protone idrossilico a δ_{H} 12.74 nell'anello A mostra correlazioni HMBC con il gruppo carbonilico, che conferma la presenza di un sistema di benzofenone.

Il protone idrossilico a δ 12.74 è stato diagnosticato per la sostituzione dell'anello aromatico A e basandoci su questi dati la struttura del composto 1 è stata delucidata come il 2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone.

Lo spettro IR mette in evidenza la presenza dei picchi caratteristici del gruppo chetonico (1717 cm^{-1}) e di gruppi idrossilici (3515 cm^{-1}). Le bande di assorbimento leggermente superiori e leggermente inferiori ai 3000 cm^{-1} sono dovute rispettivamente allo stretching dei C-H aromatici. A 1450 e a 1600 cm^{-1} si hanno le bande caratteristiche degli areni (tre bande affilate di media intensità).

Lo spettro UV del composto mostra un assorbimento forte nella zona 270–370 nm indicando sistemi aromatici con sostituenti polari, che danno luogo a bande di trasferimento di carica. Le bande si spostano verso il visibile quanto maggiore è la coniugazione, oppure quando sono presenti più sostituenti con elettroni mobili.

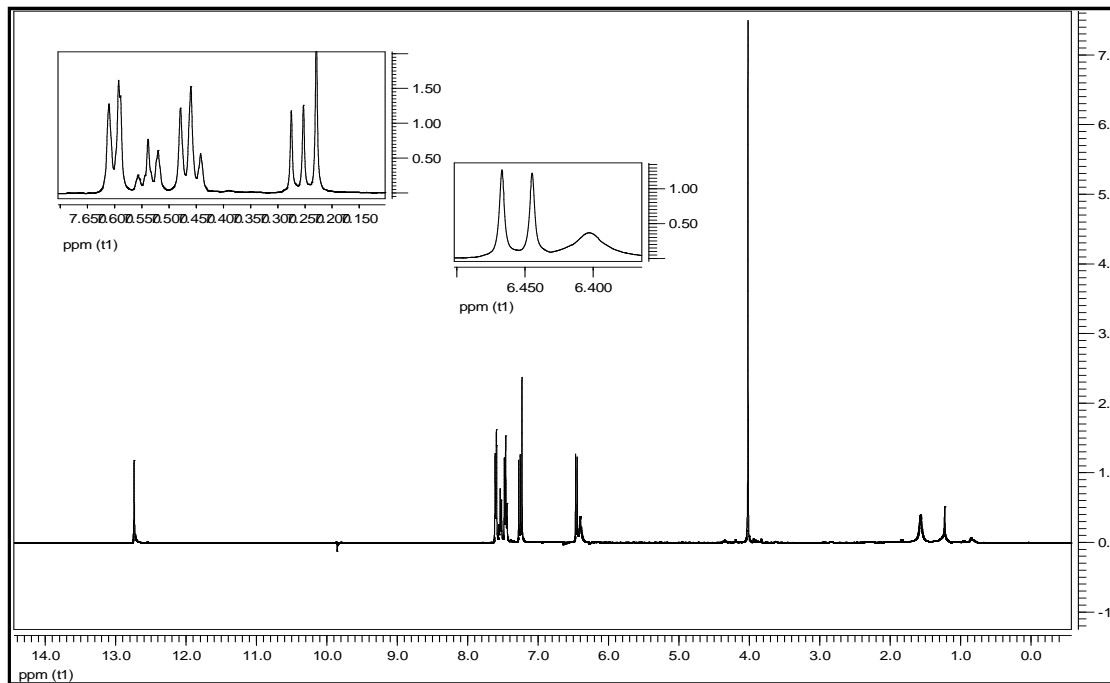


Figura 5.11 ^1H NMR del composto1 in CHCl_3

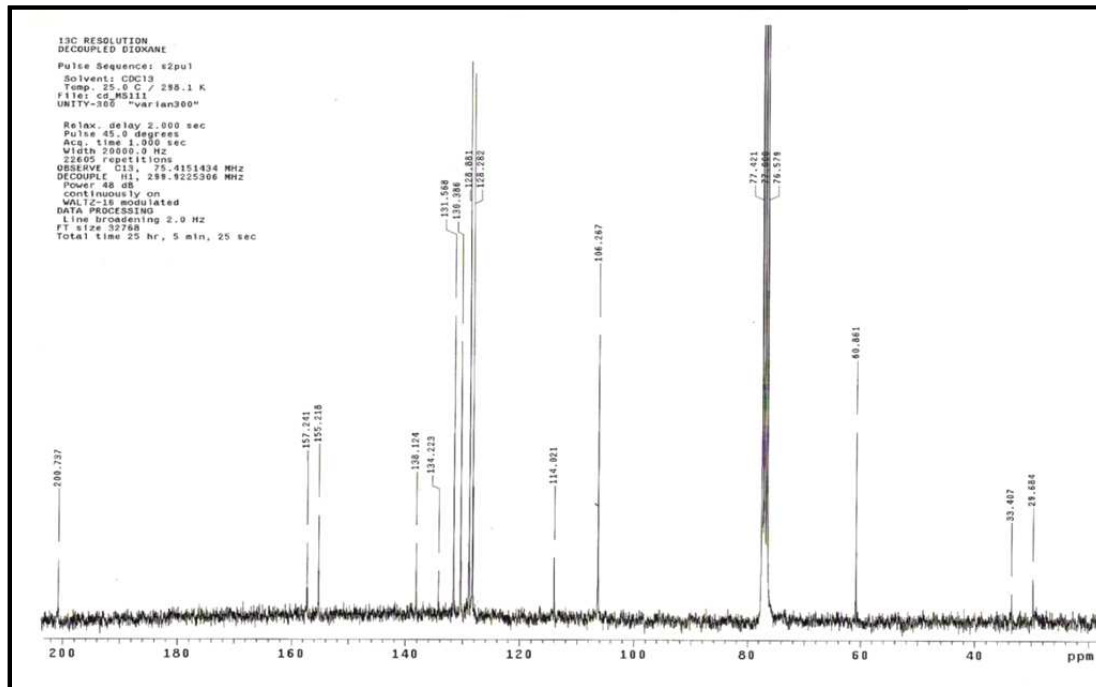


Figura 5.12 Spettro ^{13}C NMR del composto 1.

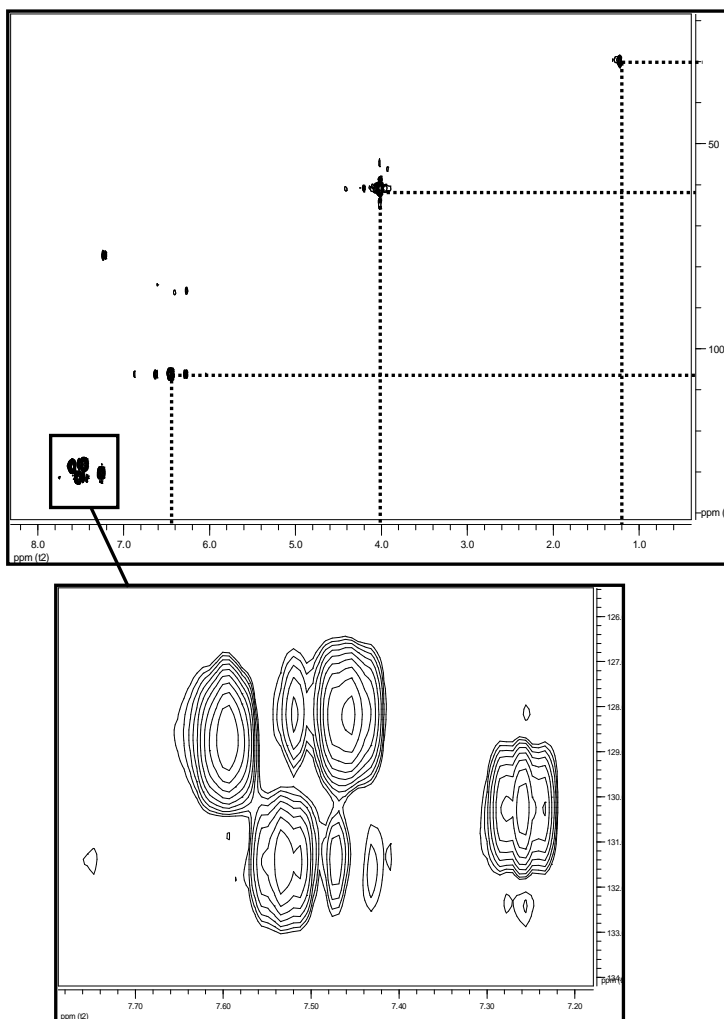


Figura 5.13 Spettro HSQC del composto 1 e relativo espanso.

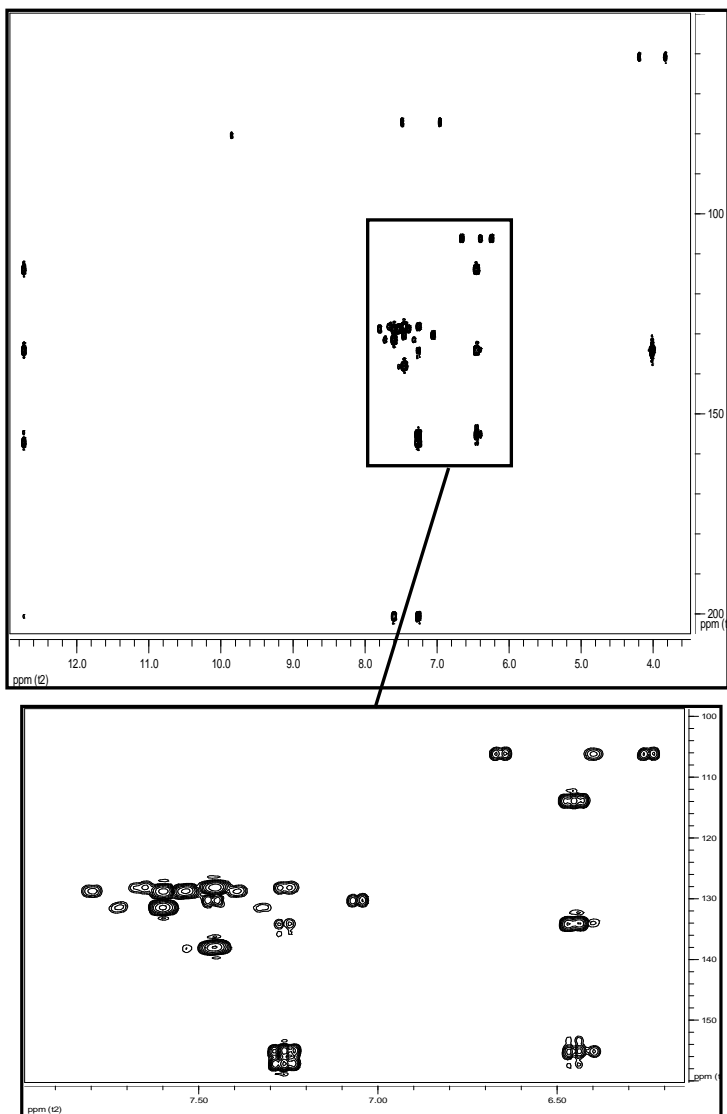


Figura 5.14 Spectro HMQC del compuesto 1 con relativo espanso.

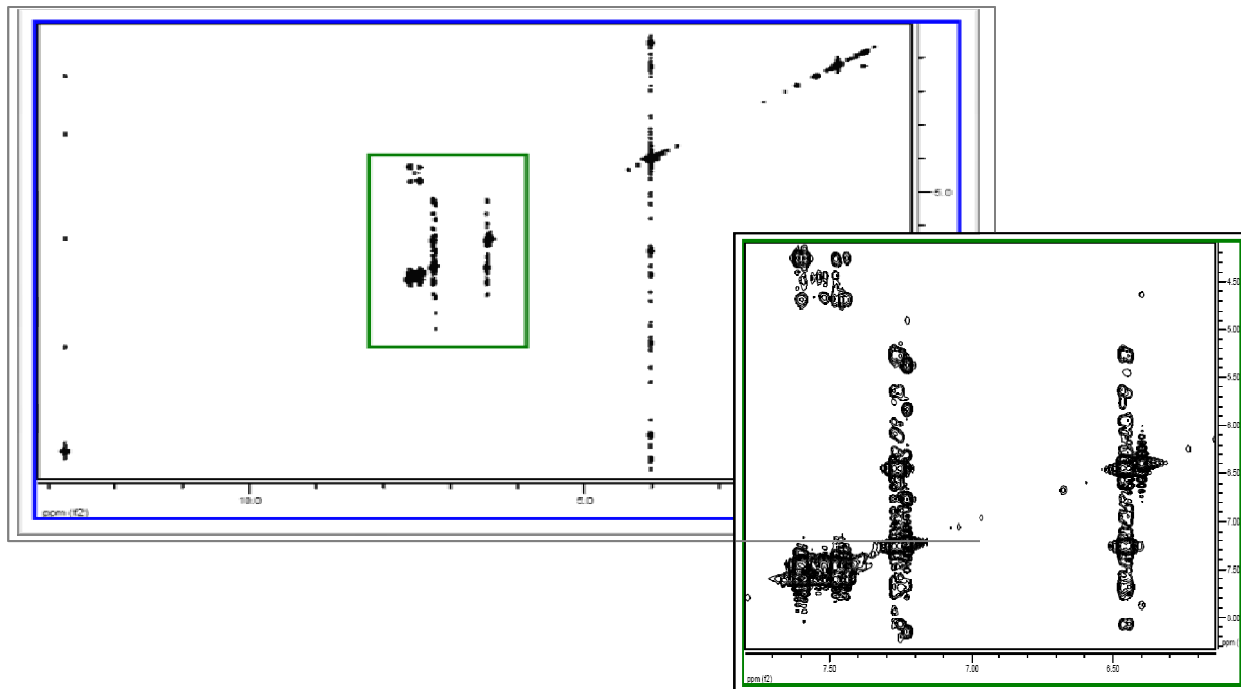


Figura 5.15 Spettro DQF-COSY del composto 1 e relativo espanso.

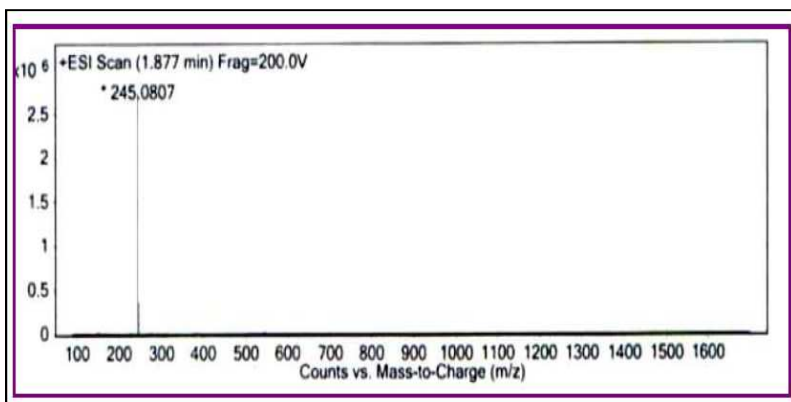


Figura 5.16 Spettro di massa esatta del composto 1

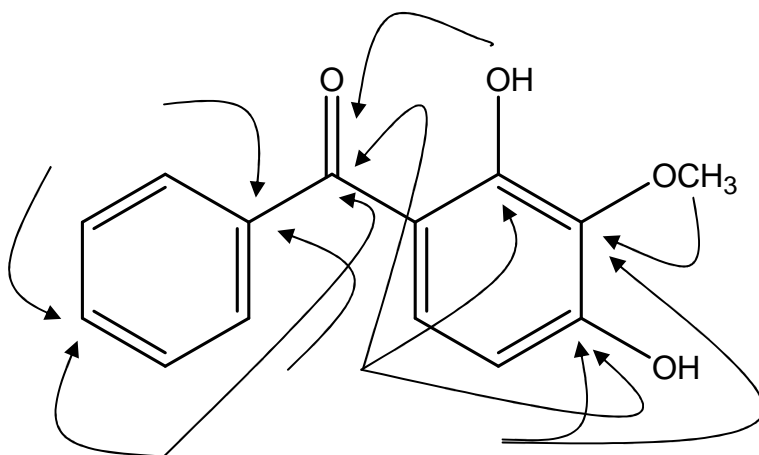
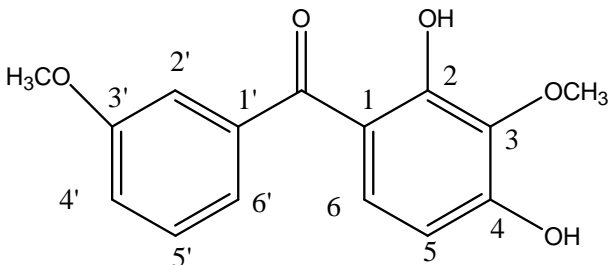


Figura 5.17 Alcune delle correlazioni HMBC del composto 1

5.6.2 Delucidazione del composto 2: 2,4-diidrossi-3,3'-dimetossi-benzofenone



2,4-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-benzophenone.

Il composto si presenta come gomma giallastra (CH₂Cl₂);

UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 225 (1.5), 228 (1.4), 295 (1.5); Q-TOF HRMS *m/z* [M + H]⁺ *m/z* 275.0916 (calc. for C₁₅H₁₄O₅). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.82 (*s*, 3'-OCH₃), 4.01 (*s*, 3-OCH₃), 6.39 (*s*, 4-OH), 6.44 (*d*, *J* = 8.8, H-5), 7.07 (*ddd*, *J* = 8.1, 2.4, 0.9, H-4'), 7.11 (*dd*, *J* = 2.4, 1.5, H-2'), 7.15 (*ddd*, *J* = 7.5, 1.5, 0.9, H-6'), 7.27 (*d*, *J* = 8.8, H-6), 7.36 (*m*, H-5'), 12.74 (*s*, 2-OH).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 55.5 (*q*, 3'-OCH₃), 60.7 (*q*, 3-OCH₃), 106.3 (*d*, C-5), 113.7 (*d*, C-2'), 114.0 (*s*, C1), 117.6 (*d*, C-4'), 121.4 (*d*, C-6'), 129.3 (*d*, C-5'), 130.4 (*d*, C-6), 134.2 (*s*, C-3), 139.4 (*s*, C-1'), 155.3 (*s*, C-4), 157.2 (*s*, C-2), 159.5 (*d*, C-3'), 200.5 (*s*, C=O).

Il composto 2 mostra uno spettro di massa Q-TOF HMRS (Figura 5.21) con uno ione molecolare [M+H]⁺ a *m/z* 275.0916 (calcolato .275.0919) suggerendo la formula molecolare di C₁₅H₁₄O₅.

Gli spettri ¹HNMR (Figura 5.18) e ¹³CNMR (Figura 5.19) sono simili al composto 1.

Lo spettro ¹³CNMR del composto 2 mostra un carbonio metossilico a 55.5 ed un carbonio quaternario a 159.5 in più e in concomitanza mostra un segnale di carbonio metinico in meno.

Lo spettro ¹HNMR mostra un segnale metossilico a δ_H.82 (3H,*s*) mentre i segnali del protone del sistema AB nell'anello A (δ_H 6.44 (*d*, *J* = 8.8Hz), δ_H 7.27 (*d*, *J* = 8.8Hz) sono identici a quelli del composto 1.

L'integrazione dei picchi permette di evidenziare la presenza di ben 12 protoni e gruppi ossidrilici

Gli esperimenti HSQC (Figura 10.12) del composto **2** hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone come riportato in Figura 5.20.

Lo spettro DQF-COSY (Double Quantum Correlation Spectroscopy) mostra i protoni vicinali e geminali correlati via l'accoppiamento scalare che confermano la posizione dei sostituenti sull'anello benzenico (Figura 5.22).

Le correlazioni COSY mostrano un sistema di spin per i segnali a δ_{H} 7.07 (ddd, $J = 8.1, 2.4, 0.9 \text{ Hz}$, H-4') a δ_{H} 7.36 (m, H-5') e a δ_{H} 7.15 (ddd, $J = 7.5, 1.5, 0.9$, H-6').

Il protone a δ_{H} 7.11 (dd, $J = 2.4, 1.5$, H-2') mostra un accoppiamento in meta con H-4' e H.6'.

Le correlazioni HMBC sono state osservate per i protoni metossilici a δ_{H} 3.82 con il C-3' (δ_{C} 159.5) e per H-5' con C-1' (δ_{C} 139.4) e C-3'.

Questi dati portano al 2,4-dihydroxy-3,30-dimethoxy-benzophenone.

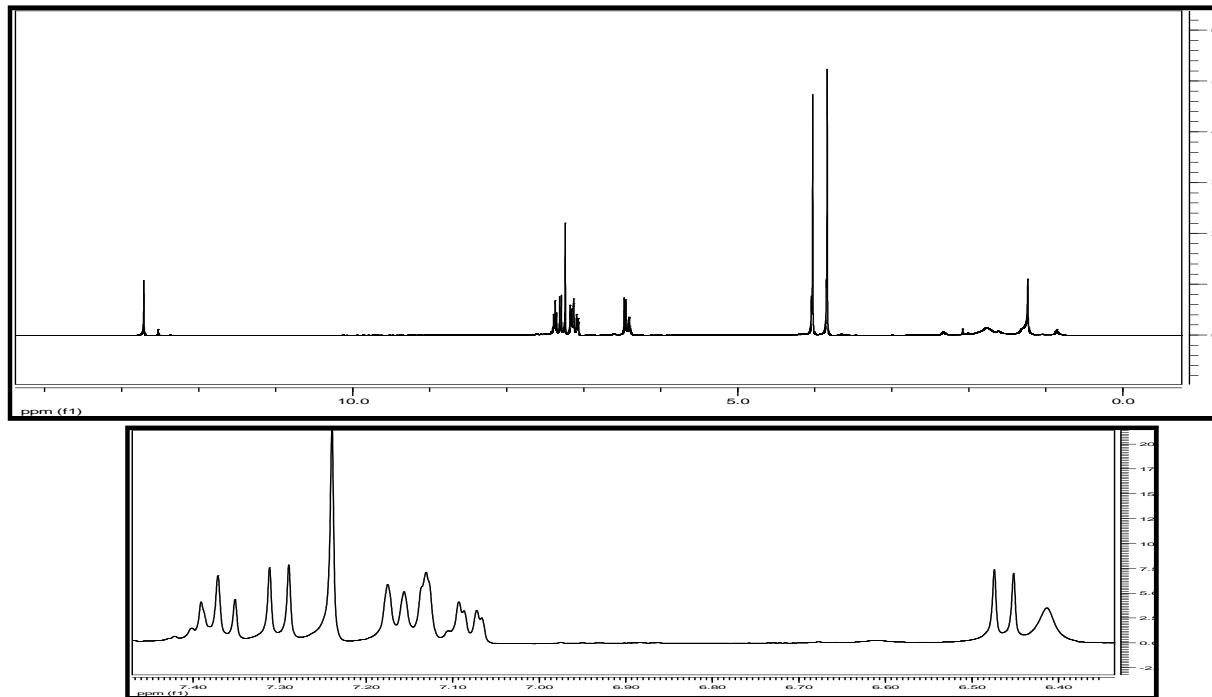


Figura 5.18 Spettro ¹H NMR del composto 2 con relativo espanso.

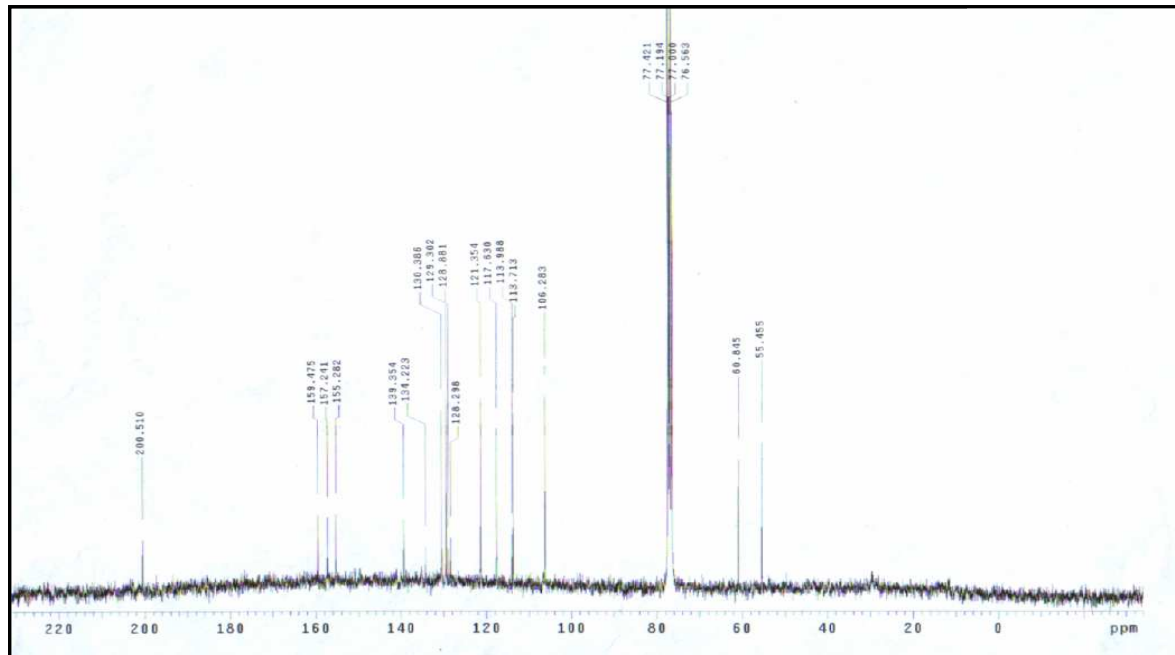


Figura 5.19 Spettro ^{13}C NMR del composto 2.

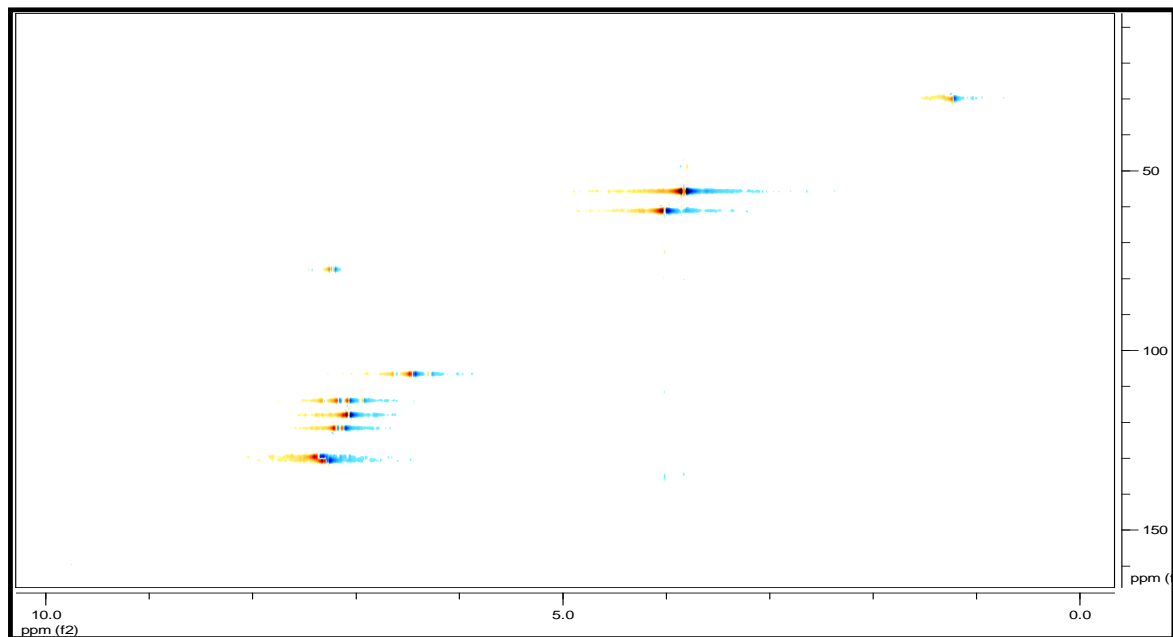


Figura 5.20 Spettro HSQC del composto 2.

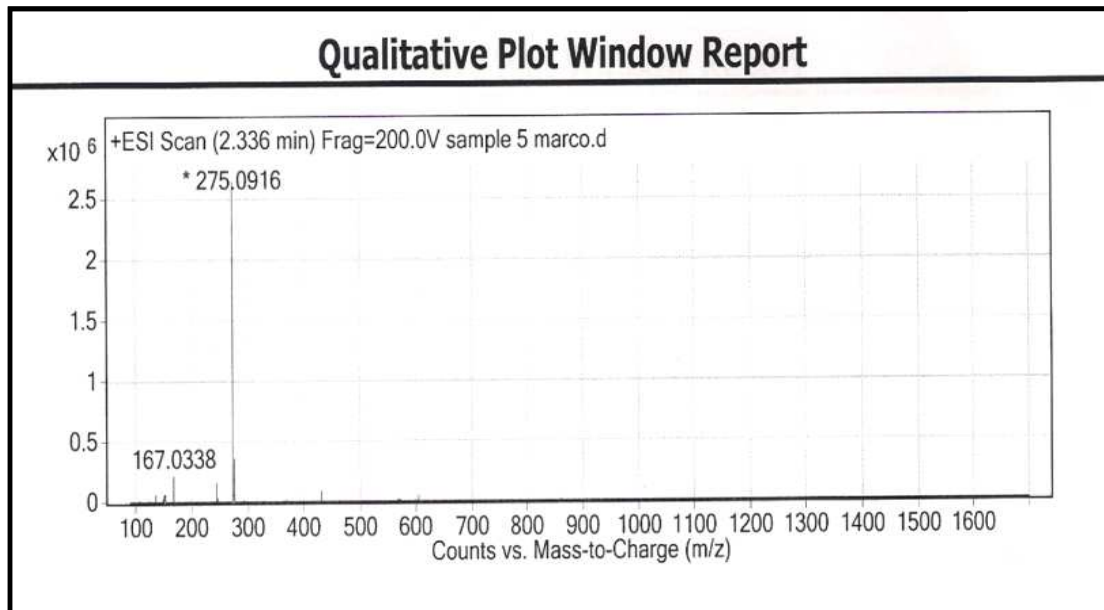


Figura 5.21 Spettro di massa esatta (Q-TOF MS) del composto 2

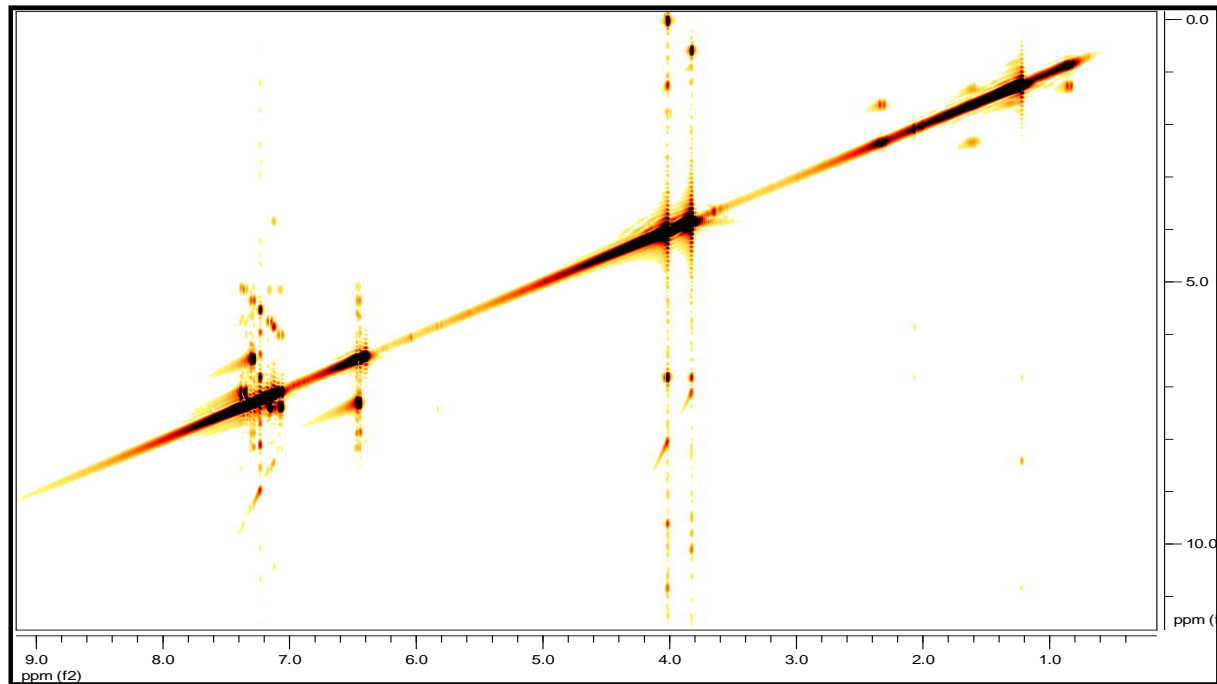


Figura 5.22 Spettro DQF-COSY del composto 2.

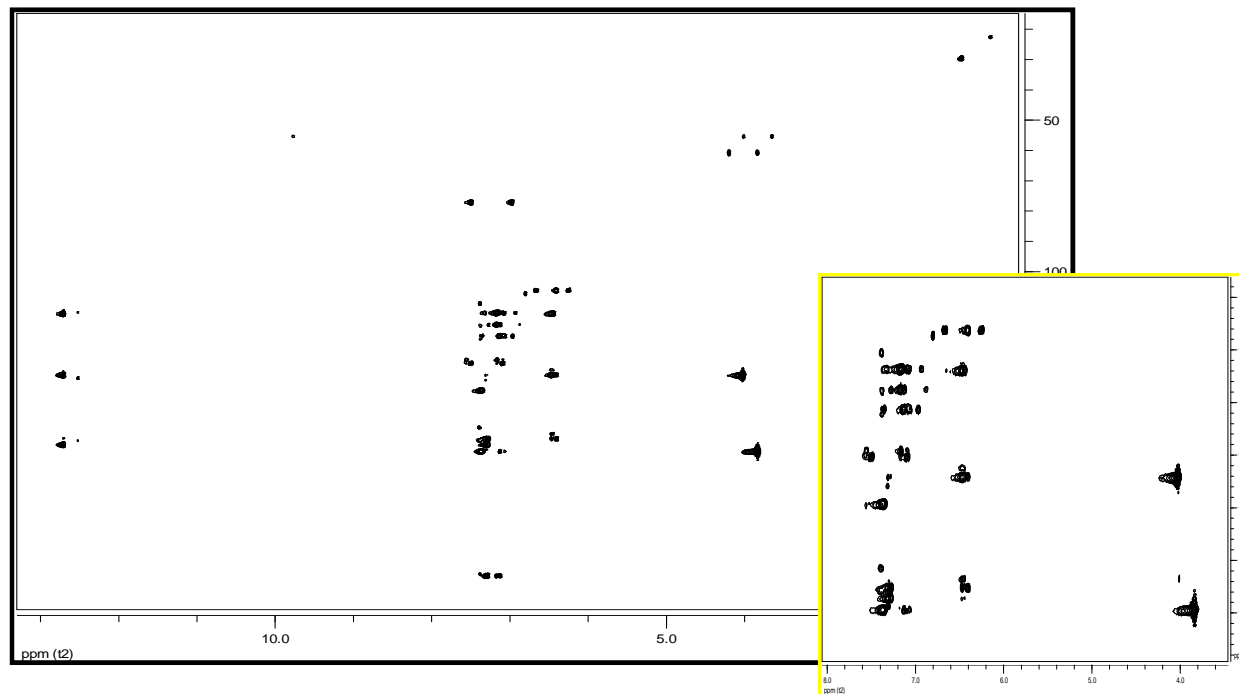


Figura 5.23 Spettro HMBC del composto 2e relativo espanso.

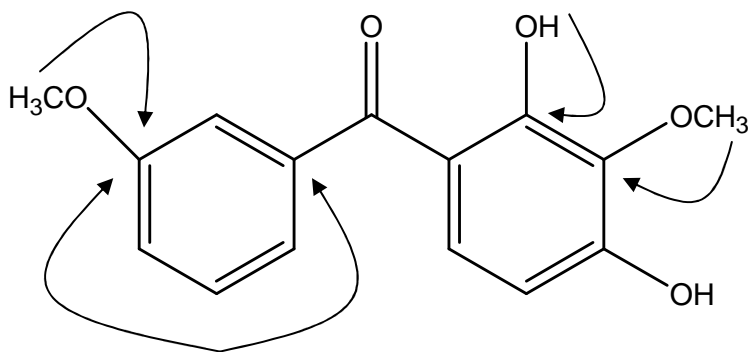
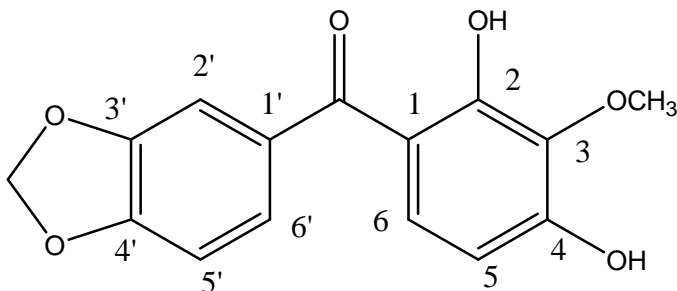


Figura 5.24 Alcune correlazioni HMBC del composto 2.

5.6.3 3'-4'-methylenedioxy-2,4-dihidroxy-6-methoxybenzoate



3',4'-Methylenedioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy benzophenone.

Yellowish needles (CH₂Cl₂); m.p. 154°C; UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 236 (2.2). 296-325 sh. (2); Q-TOF HRMS *m/z* [M + H]⁺ *m/z* 289.0693 (289,0712 calc. for C₁₅H₁₂O₆). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 4.01 (*s*, 3-OCH₃), 6.05 (*s*, OCH₂O), 6.39 (*s*, 4-OH). 6.50 (*d*, *J* = 9, H-5), 6.90 (*d*, *J* = 7.8, H-5'), 7.18 (*d*, *J* = 1.5, H-2'), 7.23 (*dd*, *J* = 7.8, 1.5, H-6'), 7.35 (*d*, *J* = 9, H-6), 12.61 (*s*, 2-OH).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 60.8 (*q*, 3-OCH₃), 101.8 (*t*, OCH₂O), 106.1 (*d*, C-5), 107.9 (*d*, C-5'), 109.5 (*d*, C-2'), 114.0 (*s*, C1), 125.1 (*d*, C-6'), 130.0 (*d*, C-6), 132.1 (*s*, C-1'), 134.3 (*s*, C-3), 147.8 (*d*, C-4'), 150.8 (*d*, C-3'), 155.0 (*s*, C-4), 157.0 (*s*, C-2), 198.9 (*s*, C=O).

Lo spettro di massa Q-TOF HRMS (Figura 5.30) del composto 3 evidenzia uno ione quasimolecolare [M+H]⁺ at *m/z* 289.0693 (calcolato 289.0712) in accordo con la formula molecolare C₁₅H₁₂O₆.

Gli spettri al protone (¹HNMR- Figura 5.25) ed al carbonio (¹³CNMR- Figura 5.26) del composto 3 sono molto simili a quelli del composto 2 con l'eccezione di un gruppo addizionale a δ_H 6.05 (2H,*s*).

Gli esperimenti HSQC del composto 3 hanno permesso di assegnare ad ogni carbonio il relativo protone, come riportato in Tabella 10.3 (Figura 5.27).

Nello spettro HSQC il segnale a δ_H 6.05 mostra correlazione con il carbonio a δ_C 101.8 che è diagnostico di una funzione diossimetilica.

Lo spettro Cosy (Figura 5.28) mostra un sistema di spin per i segnali a δ_H 6.90 (*d*, *J* = 7.8Hz,H-5') e a δ_H 7.23 (*dd*, *J* = 7.8,1.5Hz,H-6') nell'anello B.

***Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake**

Il protone a δ_{H} 7.18 (d, $J = 1.5\text{Hz}$, H-2') mostra un accoppiamento meta con H-6'.

Sono state osservate correlazioni HMBC (Figura 5.29) tra la funzione diossimetilica ed il carbonio quaternario a δ_{C} 150.8 (C-3') e a δ_{C} 147.8 (C-4').

Le correlazioni HMBC sono osservabili in Figura 5.31.

Il composto 3 concludendo risulta essere il 3',4'-methylenedioxy- 2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone

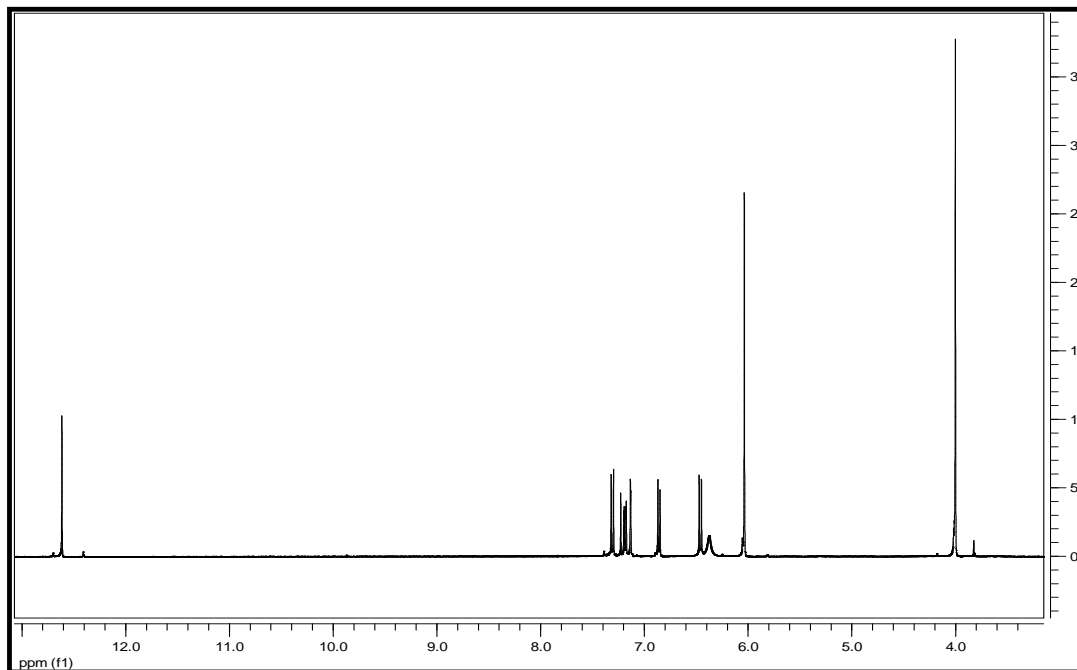


Figura 5.25 Spettro ¹HNMR del composto 3.

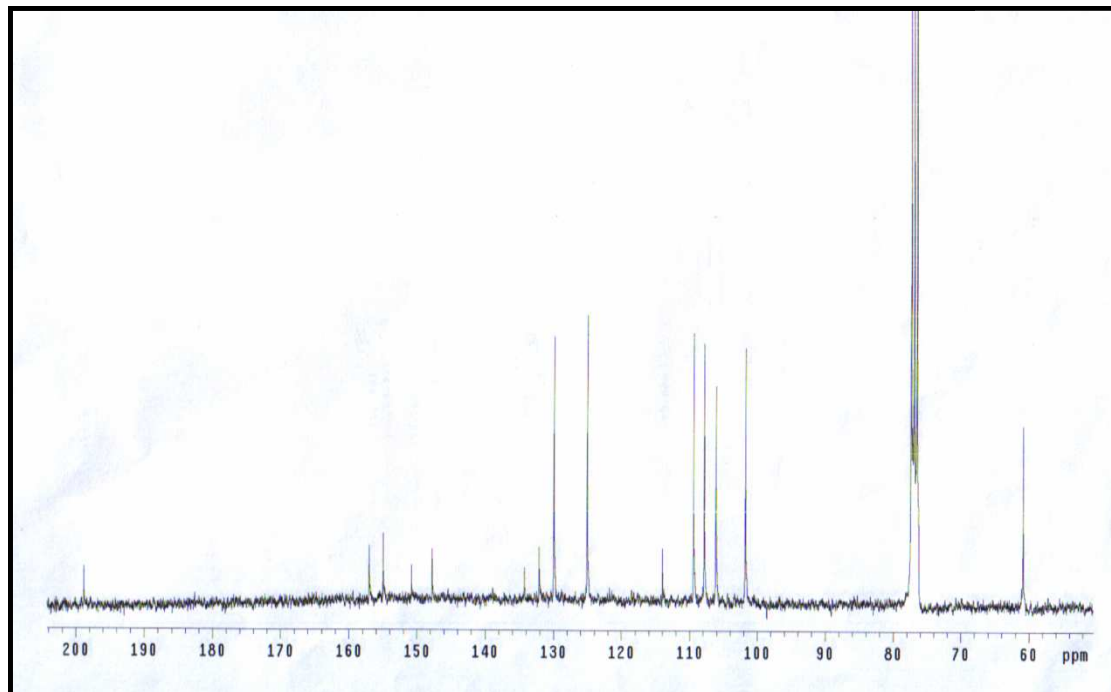


Figura 5.26 Spettro ^{13}C NMR del composto 3.

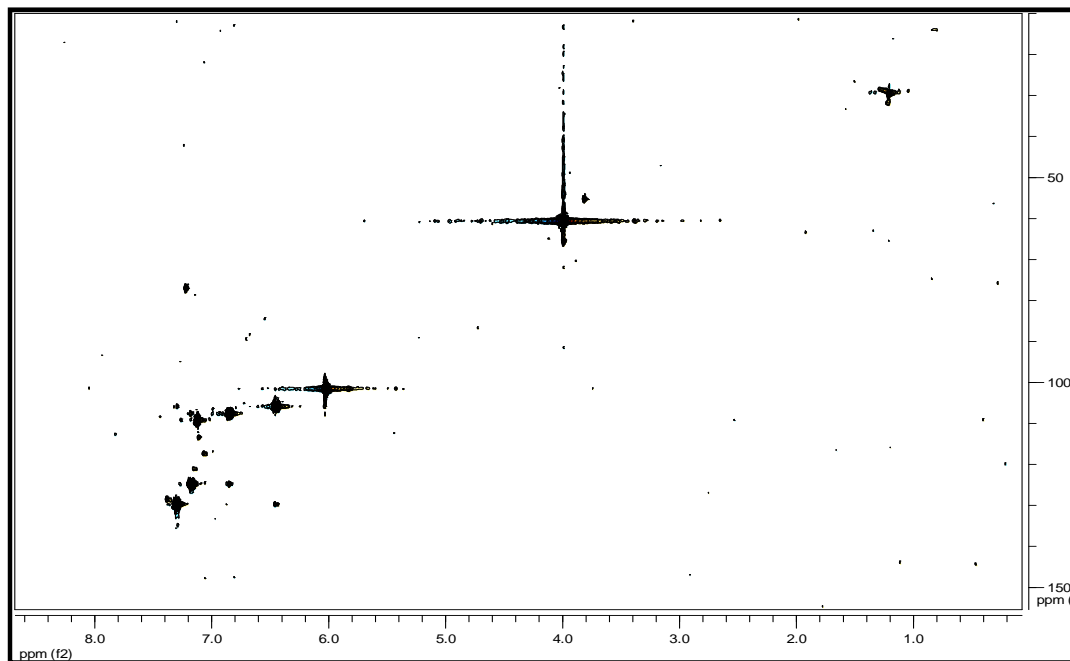


Figura 5.27 Spettro HSQC del composto 3.

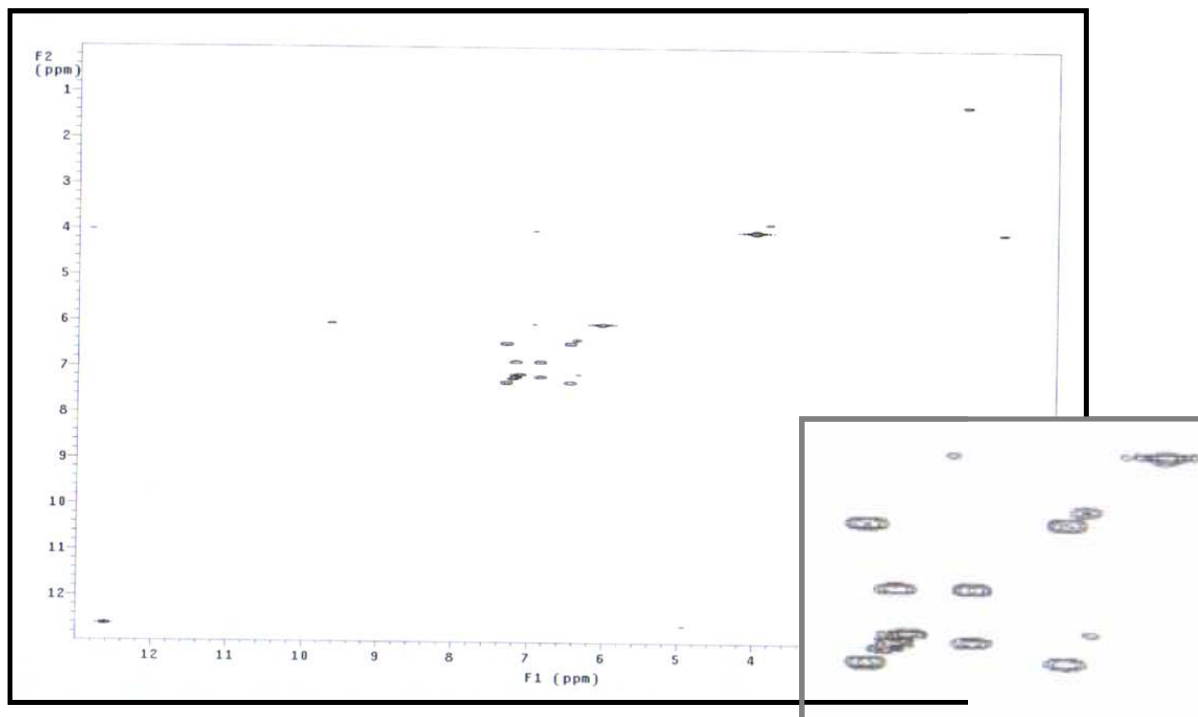


Figura 5.28 Spettro Cosy del composto 3 e relativo espanso

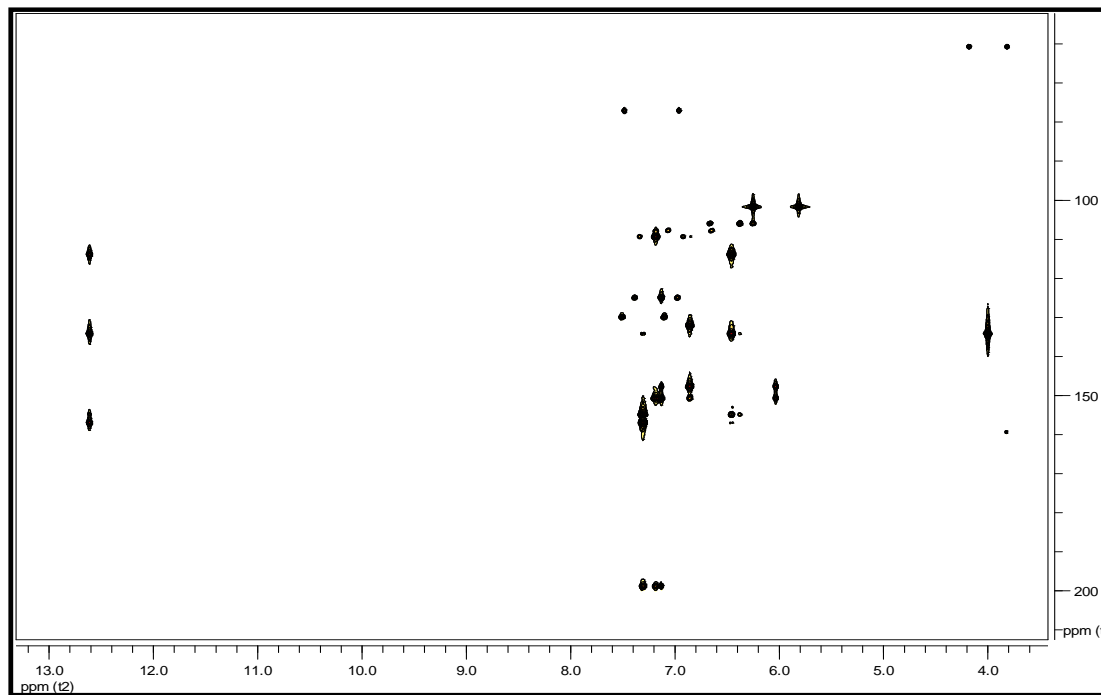


Figura 5.29 Spettro HMQC del composto 3.

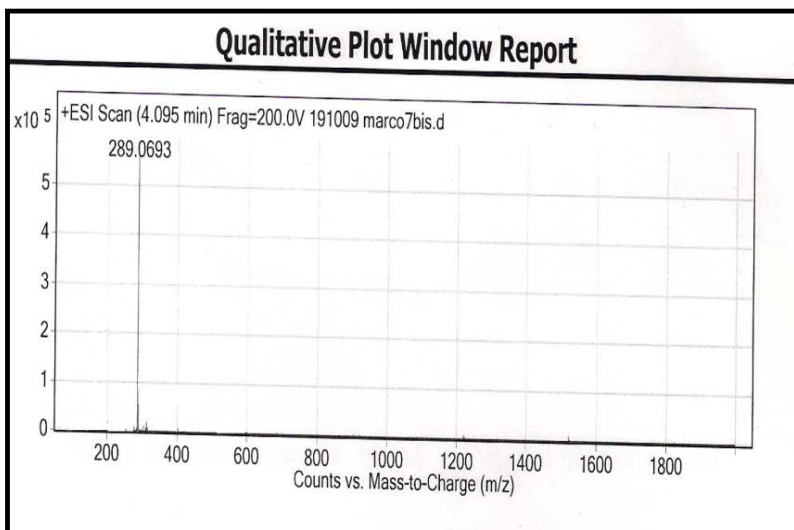


Figura 5.30 Spettro di massa esatta (Q-TOF MS) del composto 3.

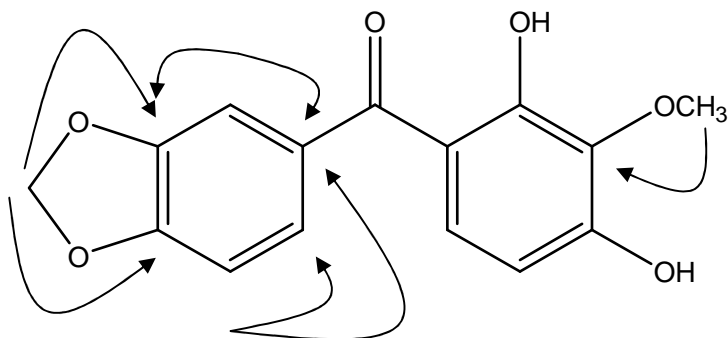


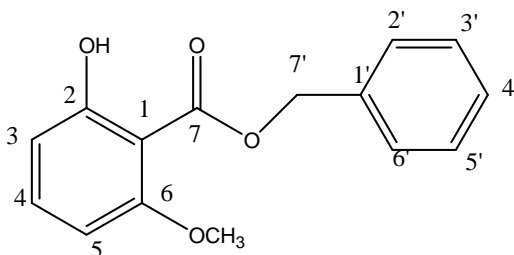
Figura 5.31 Alcune correlazioni HMBC del composto 3.

5.7 Delucidazione delle strutture note della *Securidaca diversifolia*

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.

5.7.1 Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate



Il composto si presenta sotto forma di cristalli di color bianco sporco.

$[\text{M}]^+$ m/z 258.2516 (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.86 (3H, s, OCH_3), 5.43 (2H, s, H-7'), 6.42 (1H, dd, $J = 8.4, 0.6$ Hz H-3), 6.60 (1H, dd, $J = 8.4, 0.9$ Hz, H-5), 6.60 (1H, dd, $J = 8.4, 0.9$ Hz, H-5), 7.35 (1H, m, H-3'), 7.35 (1H, m, H-5'), 7.36 (1H, m, H-4), 7.40 (1H, m, H-4'), 7.45 (2H, m, H-2'), 7.45 (2H, m, H-6'), 11.41 (1H, s, OH).

***Securidaca diversifolia* (L.) S. F. Blake**

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 56.12 (q, OMe), 66.83 (q, C-7'), 102.4 (d, C-3), 103.2 (s, C-1), 110.0 (d, C-5), 127.5(d, C-2'), 127.5(d, C-6'), 128.0(d, C-4'), 128.5 (d, C-3'), 128.5 (d, C-5'), 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).

Nota bibliografica:

Kodpint M., Sadavongvivad C., Thebtaranonth C., Thebtaranonth Y., (1983). Phytochemistry vol.23; pp.199-200.

Lu T., Vargas D., Fischer N., (1993). Phytochemistry vol. 30; pp. 253-258.

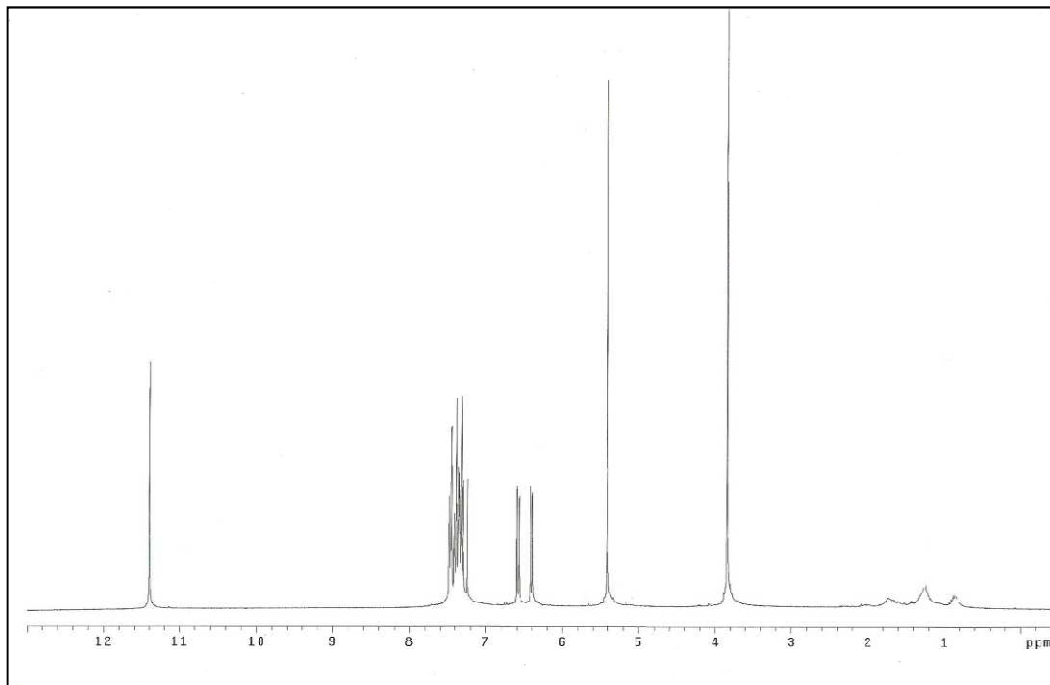


Figura 5.31 Spettro ¹H NMR del Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate

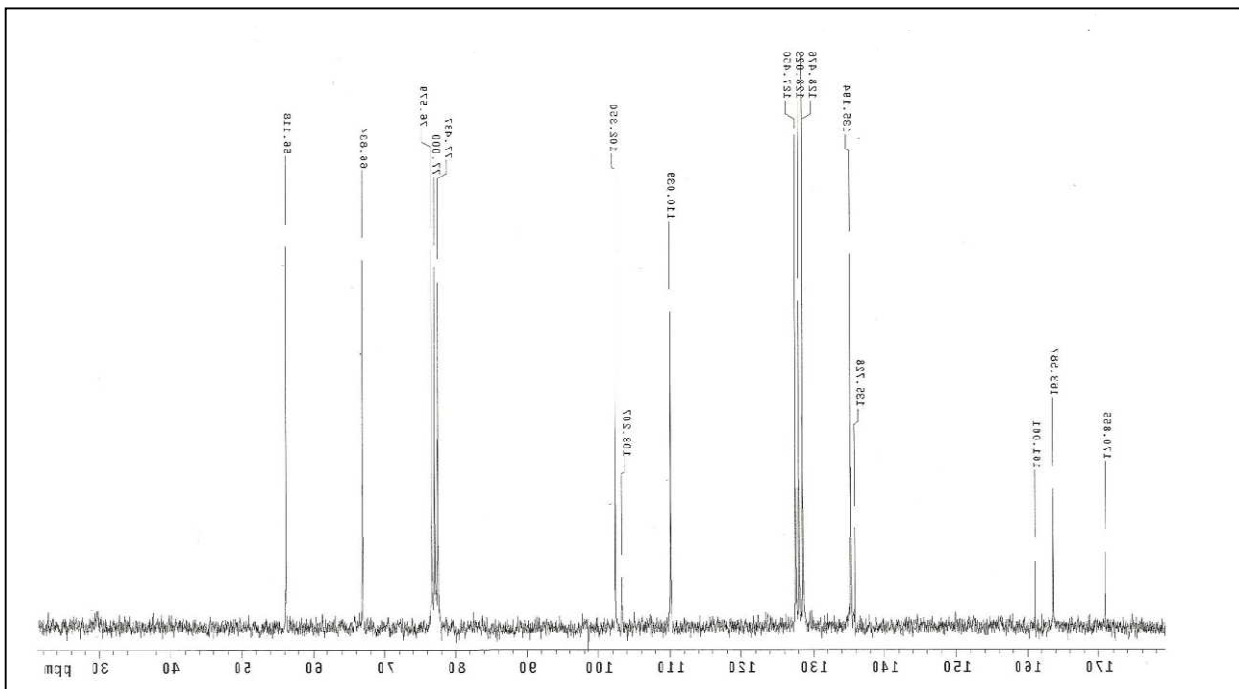
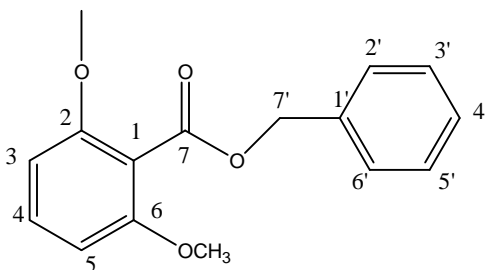


Figura 5.32 Spettro ^{13}C NMR del Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate

5.7.2 Benzil 2,6-dimetossibenzoato



$[M]^+$ m/z 272.3 (calc. for $C_{16}H_{16}O_4$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.80 (6H, *s*, OCH_3), 5.38 (2H, *s*, H-7'), 6.55 (2H, *d*, $J = 8.3$ Hz, H-3), 6.55 (2H, *d*, $J = 8.3$ Hz, H-5), 7.27 (1H, *t*, $J = 8.3$ Hz, H-4), 7.34 (1H, *m*, H-4'), 7.35 (2H, *m*, H-3'), 7.35 (2H, *m*, H-5'), 7.44 (2H, *brd*, $J = 7.0$, H-2'), 7.44 (2H, *brd*, $J = 7$, H-6'). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 56.0 (*q*, OMe (2)), 56.0 (*q*, OMe (6)), 66.8 (*t*, C-7'), 104.0 (*d*, C-3), 104.0 (*d*, C-5), 113.1 (*s*, C-1), 127.9 (*d*, C-4'), 128.1 (*d*, C-2'), 128.1 (*d*, C-6'), 128.3 (*d*, C-3'), 128.3 (*d*, C-5'), 131.10 (*d*, C-4), 136.2 (*s*, C-1'), 157.5 (*s*, C-2), 157.5 (*s*, C-6), 166.4 (*s*, C=O).

Note bibliografiche:

Kodpint M., Sadavongvivad C., Thebtaranonth C., Thebtaranonth Y., (1983). *Phytochemistry* vol.23; pp.199-200.

Lu T., Vargas D., Fischer N., (1993). *Phytochemistry* vol. 30; pp. 253-258.

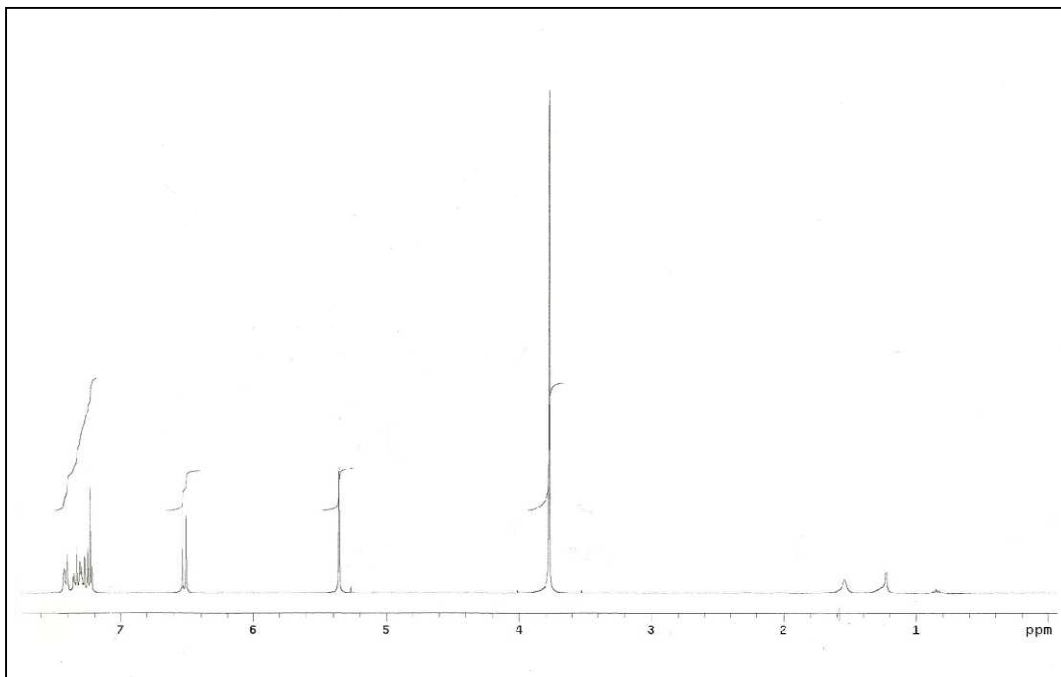


Figura 5.32 Spettro ¹HNMR del Benzil 2,6-dimetossibenzoato

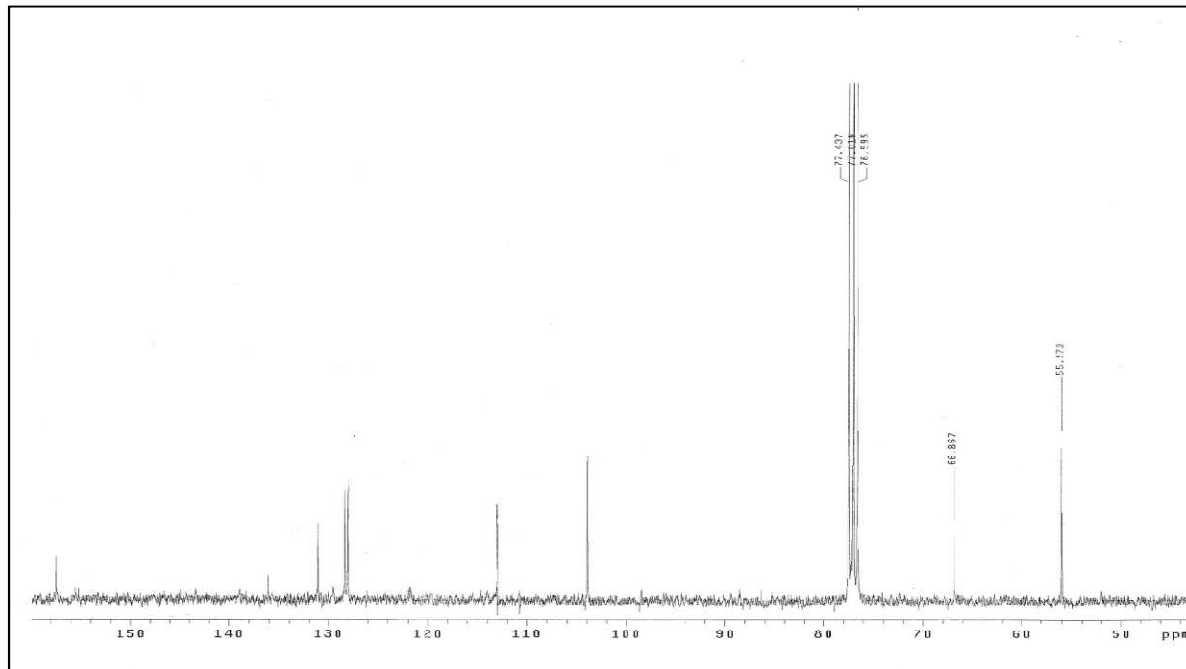
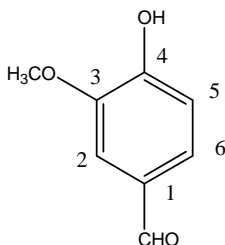


Figura 5.33 Spettro ^{13}C NMR del Benzil 2,6-dimetossibenzoato

5.7.3 Isovanillina



4-hidroxy-3-metoksi-1-benzaldeid Isovanillina $[M]^+$ m/z 152.1494 (calc. for $C_8H_8O_3$). $M]^+$. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.001 (3H, OCH_3), 5.92 (1H, OH), 7.001 (1H, H-5), 7.461 (1H, H-6), 7.473 (1H, H-2), 9.869 (1H, CHO). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 57.66 (OCH_3), 112.29 (C-5), 114.94 (C-6), 125.44 (C-2), 131.99 (C-1), 148.30 (C-3), 154.19 (C-4), 191.88 (CHO).

Note bibliografiche:

Kolehmainen E., Laihia K., Knuutinen J., Hyötyläinen J., (1992). 1H , ^{13}C and ^{17}O NMR Study of Chlorovanillins and some related compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry* vol. 30; pp. 253-258.

5.8 Risultati biologici sui composti isolati dalla *Securidaca diversifolia* (L.) Blake

5.8.1 Preliminare screening biologico

Un preliminare screening sull'estratto in CH₂Cl₂ delle radici, ha dimostrato avere, *in vitro* attività antagonista nei confronti dell'Herpes simplex virus di tipo (HSV-1).

Tenuto conto di questa attività si è proceduto all'isolamento dei composti a probabile attività antivirale. Inoltre questa proprietà è stata verificata nei confronti di cellule di tipo Hela; i valori ottenuti sono stati poi confrontati con l'Aciclovir e il Pirodavidir, i più importanti farmaci contro l'Herpes virus di tipo 1.

I composti che sono stati testati sono i tre nuovi benzofenoni naturali da noi isolati. Le cellule di tipo Hela (Tumore umano. Ohiostrain, NIH) sono state coltivate con un medium di tipo Dulbecco, contenente l'1% di amminoacidi non essenziali (NEAA), il 10% di siero fetale (SF), 100U/mL di penicillina ti tipo G e 100 mg/mL di streptomycina. le cellule sono state incubate tenendo conto di una densità di 104/mL, a 37 8^C e con un livello del 5% di CO₂ per 24-48h, in piastre che consentano la crescita cellulare in monostrato. I composti da testare, cioè 2,4-Dihydroxy-3-methoxy-benzophenone; 2,4-Dihydroxy-3,30-dimethoxy-benzophenone; 3',4'-Methylendioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxy-benzophenone e Benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (1-4) sono stati disciolti in DMSO e incubattiii per 48h. L'attività citotossica è stata determinata attraverso l'osservazione in microscopio. In parallelo alla determinazione dell'attività citotossica, le cellule sui monostrato sono state infettate con il virus 1(NIH) e 1S virus(NIH, Bethesda USA) alla concentrazione di 400,000 unità virali/mL. La valutazione dell'attività citopatica è stata eseguita nelle stesse modalità di quella citotossica. Anche l'attività antivirale è stata determinata grazie all'ausilio del microscopio. L'attività antivirale del composto 2,4-Dihydroxy-3,30-dimethoxy-benzophenone (2) è stata confermata con il saggio di riduzione della piastra, modificato da Burlson et al.(1992).

Le cellule Hela sono state fatte crescere in monostrato in sei diverse piastre, con medium Dulbecco modificato da MEM (DMEM, GIBCO Laboratories Inc.) che contiene l' 1% di NEAA e il 10% di SF. i monostrati cellulari sono stati incubati per 1 h con lisati cellulari alla temperatura ambiente. le piastre sono state successivamente colorate con un colorante rosso neutrale (1 mL/100 mL) e dopo 48 h alla temperatura di 37 8^C e poi osservati al microscopio.

Securidaca diversifolia (L.) S. F. Blake

Composto	Citotossicità IC ₅₀ µg/mL		Attività antivirale IC ₅₀ µg/mL		
	Cellule Hela	1S	PI	HSV-1	PI
1	>337	>337	1	168.5±	2
2	64±6	64±2	1	4±1	16
3	25±2	25±1	1	25±2	1
4	81±4	81±6	1	81±3	1
Acyclovir^a	12.5±4	0.75± 0.2	16.6	n.t. ^b	n.t. ^b
Pirodavis^a	7±1	n.t. ^b	n.t. ^b	0.085±0.03	82.3

Tabella 5.1 Dati biologici relativi all'attività antivirale dei tre nuovi benzofenoni isolati dalla *S. diversifolia*

^aControllo positivo, ^b n.t.: non testato

BIBLIOGRAFIA (Capitolo 5)

Acevedo-Rodríguez P., (2005). Vines and climbing plants of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Contr. U.S. Natl. Herb.* vol.51; pp. 347.

Burleson FG., Chambers TM., Wiedbrank DL., (1992). *Virology, A Laboratory Manual.* Academic Press, San Diego

Hamburger M., Gupta M., Hostettmann K., (1985). Flavonol glycosides from *Securidaca diversifolia*. *Phytochemistry* vol. 24; pp. 2689–2692

Kodpint M., Sadavongvivad C., Thebtaranonth C., Thebtaranonth Y., (1983). *Phytochemistry* vol.23; pp.199-200.

Kolehmainen E., Laihia K., Knuutinen J., Hyötyläinen J., (1992). ^1H , ^{13}C and ^{17}O NMR Study of Chlorovanillins and Some Related Compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry* vol. 30;pp. 253-258.

Leonti M., (2002). *Moko / La Rosa Negra*, Ethnobotany of the Popoluca, Veracruz, México. *Dissertation. Diss. ETH No.* 14922.

Leonti M., Heilmann J., Heinrich M., Sticher O., (2004). Bioactive Natural Products from the Popoluca Indian Medicinal Plant *Mosquitoxylum jamaicense* (Anacardiaceae). *Revista Latinoamericana de Química* vol. 32; pp. 87-93.

Leonti M., Vibrans H., Sticher O., Heinrich M., (2001). Ethnopharmacology of the Popoluca, México: An Evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* vol. 53; pp. 1653-1669.

Lu T., Vargas D., Fischer N., (1993). *Phytochemistry* vol. 30; pp. 253-258.

Appendice B

I POPOLUCA

B1 Introduzione

Parallelamente al lavoro sulla materia medica europea si è svolto quello sull'etnobotanica dei Popoloca. Questa popolazione che vive a sud di Veracruz discende dai primi popoli che abitarono il sud America. La loro tradizione culturale in ambito farmacognosico è molto importante, anche perché ritenuta lontana da infiltrazioni europee dovute ai Conquistadores. Infatti, essi abitano una zona montagnosa e poco accessibile e questo a fatto in modo che essi preservassero la loro cultura. Sono state individuate circa 600 piante medicinali. La selezione culturale di piante medicinali è strettamente legata alle loro qualità organolettiche. Infatti, fiori e frutti rossi vengono utilizzati per problemi legati al sangue; mentre invece fiori e frutti gialli si utilizzano per morsi di serpente. I Popoloca utilizzano preferenzialmente le piante Oloartiche rispetto a quelle Neotropicali, che ormai sono relegate nelle zone più impervie. Le molecole isolate confermano l'uso medicinale che i Popoloca hanno di quella determinata pianta.

B.2 Informazioni storiche, geografiche ed antropologiche

La maggior parte degli abitanti Popoloca dimora in venticinque villaggi distribuiti alle pendici sud e ovest della Sierra Santa Marta, una zona vulcanica vicino al lago Catemaco nel Golfo del Messico a sud di Veracruz (Figura B.2). Nella Sierra Santa Marta abitano, vicino ai Popoloca, anche Nahuatl, Zapoteci e Mestizi. Usualmente i Popoloca occupano zone collinari prossime a corsi d'acqua dai quali dipende l'approvvigionamento delle risorse idriche per il villaggio, quest'ultimo pertanto assume una forma serpeggiante con altezze differenti dall'inizio alla fine. Il villaggio principale è Soteapan che ospita circa 4.000 persone. Le case tipiche Popoloca sono costruite con tronchi di legno o canne di bamboo (*Bambusa* sp.) e la copertura, tradizionalmente in paglia, è stata odieramente sostituita da tetti in ferro ondulato (Figura B.1).



Figura B.1 Tipica capanna popoluca.

I Popolucua sono principalmente coltivatori di mais e ciò si riflette anche nel loro culto per il dio del mais: "Homshuk", una fede ora compromessa dalla cristianizzazione. Per un Popolucua la milpa (campo di granturco) è uno dei contesti di vita più importanti. I Popolucua si cibano maggiormente di mais (*Zea mais*) e fagioli (*Phaseolus vulgaris*) come succede in tutto il Messico e in Mesoamerica. Il mais viene preparato facendo bollire un impasto di acqua e gesso con un metodo chiamato "nixtamal". La presenza del gesso migliora l'apporto degli aminoacidi essenziali, liberando inoltre la niacina, un componente del complesso vitaminico B (Coe 1999; Wolters 1996). Se il mais non venisse trattato in questo modo, si svilupperebbe la pellagra, senza questo metodo di cottura, quindi, non sarebbe stata possibile la vita in un villaggio stabile (Coe 1999). Il mais viene successivamente preparato in questo modo: i chicchi gonfi vengono schiacciati con un utensile di pietra (mano) e ridotti in forma rettangolare (metate). Il risultato di questo impasto può essere sia grigliato che tostato (in passato veniva usato un piano d'argilla, oggi giorno un piatto d'acciaio) se la focaccia viene ridotta in forma rotonda e piatta prende il nome di tortillas oppure l'impasto morbido può essere cotto a vapore o bollito avvolto nelle foglie di *Calathea lutea* "Po bay" per la preparazione delle tamales. Per quanto riguarda i fagioli, questi vengono cotti in acqua salata e insaporiti con foglie di *Teloxys ambrosioides* (Epazote) e successivamente mangiati accompagnati dalle tortillas. L'allevamento di animali domestici per il successivo consumo di carne riguarda solo le galline e i maiali, nonostante questo la carne è un alimento raro, questo si è riscontrato soprattutto nel decennio passato. I Popolucua, accompagnati dai cani, si dedicano anche alla caccia, le prede preferite sono gli armadilli (*Dasypus novemcinctus*), il cervo (*Odocoileus virginianus*), il capriolo (*Mazama americana temama*), il pecari, una sorta di cinghiale, (*Pecari tayacu crassus*) e un grosso roditore notturno (*Agouti paca nelsoni*). I teschi degli animali cacciati vengono preparati e conservati in una costruzione a loro dedicata, le ossa invece vengono allontanate, nella speranza che i Chanecos (Gli dei della Natura) li riportino in vita. Se durante la caccia, capita che un cane muoia, questo viene sepolto insieme ai teschi degli animali cacciati. Questa sembra essere una pratica molto arcaica che testimonia come i popolucua credano in un'altro mondo dove i Chanecos regnano e fanno tornare in vita gli animali. (Baéz-Jorge 1973). Nonostante l'influenza della civilizzazione occidentale, la Sierra Popolucua resta per molti aspetti legata alla tradizione. In molte famiglie la lingua Popolucua rappresenta il solo ed unico linguaggio utilizzato, i bambini che frequentano la scuola, vengono però educati al bilinguismo, e le istituzioni governative del Messico hanno istituito programmi mirati alla tutela e all'uso del linguaggio nativo, tuttavia la lingua

istituzionale resta lo Spagnolo (Rice et al.1998). L'economia dei Popolucà è di sostentamento ed è basata sulla produzione di mais e di caffè come unica fonte di reddito, per questo motivo molti giovani uomini sono costretti a migrare verso centri più grandi e a trovare impiego nelle industrie, nelle fabbriche o nelle istituzioni militari.

Il nome Popolucà in origine era un nome comune sommario, usato dai Nahuatl (Aztechi), prima della conquista, per indicare un numero diverso di gruppi di popolazioni che, con accezione dispregiativa, venivano denominati come “quelli che parlano farfugliando”. Inizialmente gli etnologi utilizzarono questo vocabolo per specificare il nome proprio delle tribù locali. I Sierra Popolucà, pur accettando questo termine per indicare la propria cultura, utilizzano per designare la loro lingua la parola “Nuntajŷyi”¹. Tuttavia Foster (1943) riferisce che i Popolucà chiamano la loro lingua “angmati” che in realtà è un termine generico con il significato di “parola” o “linguaggio”. E' pertanto più indicata l'espressione “Nuntajŷyi” (il vero rumore), derivata da “nunta” (vero) e “ŷyi” (rumore), ciò indica altresì quello che con tutta probabilità è anche il loro vero nome. Foster (1943) fu il primo a descrivere le quattro lingue Popolucà: “Sayula”, “Oluta”, “Texistepec” e “Sierra Popolucà”, su una base di 116 parole e a constatare che derivano da una radice comune, quella Mixe e Zoque. Le prime due sono più vicine all'antica lingua Mixe mentre “Texistepec” e “Sierra” derivano dalla lingua Zoque. In accordo con gli studi condotti da I.N.I. (Istituto Nacional Indigenista) nel 1990 a Soatepan, il 13% della popolazione era monolingue, parlava quindi solo il Popolucà, il restante 87% parlava entrambe le lingue, Spagnolo e Popolucà (I.N.I. 1994). Soprattutto i gruppi “Sierra Popolucà”, grazie al fatto che occupavano una zona relativamente povera ed inaccessibile, sono rimasti meno influenzati dalla civilizzazione europea e pertanto hanno conservato meglio le loro tradizioni originarie. Due sono le cause storiche che in un breve lasso di tempo hanno condizionato il cambiamento nello stile di vita dei Sierra Popolucà: la collocazione di una piantagione di caffè nel 1890 e la Rivoluzione Messicana, che iniziò a Soatepan nel 1906 circa. Tuttavia la lingua istituzionale resta lo Spagnolo.

¹ Oltre alle comuni vocali e consonanti la lingua Popolucà contiene una sesta vocale, una [o] chiusa scritta [ŷ], e gli stop linguistici ['] come nelle parole t'un t'un (astringente) o na'a (gomma).

B.3 Cenni storici

Il primo villaggio “stabile” in Mesoamerica risale al 3000-2000 a.C. situato nelle coste del pacifico tra Chiapas e Guatemala. Il periodo Formativo o pre-classico datato 1800 a.C. circa è indicato con la nascita della cultura Olmeca nel sud-est del Messico ed è rappresentato dallo sviluppo dell’agricoltura e dei manufatti in ceramica. La civiltà olmeca si stabilì al sud di Veracruz e a Tabasco e perdurò fino al 300 a.C. Fu proprio qui che gli olmecchi costruirono complessi templari, fra cui San Lorenzo, La Venta, Tres Zapotes, Laguna de los Cerros e La Mojarra. Una teoria derivata dall’interpretazione iconografica ci spinge a credere che gli olmecchi pensassero che la loro civiltà fosse nata dall’unione di una donna con un giaguaro, dando alla luce una creatura zoo-antropomorfa, mezzo uomo e mezzo giaguaro (Coe 1994). I loro più importanti e antichi monumenti rintracciabili includono colossali teste di pietra, altari e sculture antropomorfe e zoomorfe in basalto. Oggi le colline meridionali delle montagne di Los Tuxtlas, la fonte di basalto usata dagli olmecchi, sono la terra natia dei Sierra Popolucos. I Popolucos dividono molti aspetti della vita culturale e della cosmovisione con i Maya, Mixe, Zoque, e gli altri gruppi indigeni della regione. Le somiglianze possono essere scoperte in esempi singolari ed interessanti. I Popolucos usano la parola “cang” per indicare sia vagina che giaguaro, in considerazione di ciò si rafforza l’ipotesi che gli olmecchi credessero nella loro genitura felina. Foster (1945) scoprì somiglianze impressionanti tra la leggenda di “Homshuk” (il dio del Mais) e “Popol Vuh” il mito di creazione della civiltà dei Maya. Foster (1945) stabilisce infatti che certi episodi riferiti nel “Popol Vuh” suggeriscano che gli elementi che compongono il folclore dei Popolucos sono in parte derivati da fonti Maya, o da fonti comuni alle due aree. Nella spedizione di Juan de Grijalva, da cui prese il nome il fiume che attraversa questa zona, nel 1518, un soldato di nome Martin, fu il primo a scorgere il vulcano nord-orientale della Sierra Tuxtlas, che da allora venne chiamato San Martin in onore del suo scopritore europeo (Baez-Jorge 1973, e riferimenti ivi). Nel 1522 è stata fondata la Villa del Espiritu Santo proprio accanto all’odierna Coatzacoalcos (Baez-Jorge 1973). Una relazione del 1580 afferma che l’area che si estende dal versante sud del vulcano San Martin Pajapan verso il fiume Coatzacoalcos è stata la più popolata della regione. Il cacao veniva utilizzato come moneta, equivalente al sistema monetario delle comunità maya. I tributi da parte della popolazione del villaggio oltre che in chicchi di cacao venivano versati anche con cotone, mais, uccelli selvatici, barre di rame e piccole quantità di oro. Tra il 1522 e il 1580 la popolazione della regione Coatzacoalcos, che contava circa 76 villaggi, scese da 50.000 a 3.000 anime a causa delle richieste tributarie eccessive degli spagnoli e a

causa di malattie epidemiche come il morbillo e la varicella (Chevalier e Fibbie 1995 e ref. Ivi, Baez - Jorge 1973 e ref. ivi).

B.4 Miti e leggende Popoluca

Il Gattino Stregato(Jem Xunuji o El Gatito Encantado)

Leggenda raccontata da: Don Leopoldo Martinez Lazaro, Santa Rosa Loma Larga, Hueyapan de Ocampo 1999.

Questo animale mitologico è una creatura simile ad un gatto che abita in prossimità delle cascate nella foresta imperturbata (Figura B.3). Lo Xunuji è uno dei molti guardiani della moralità e della vita sociale della comunità Popoluca. Il padrone dello Xunuji è la vecchia strega “Chichiman”. Lo Xunuji annusa le creature umane scopre se una persona ha recentemente avuto un contatto sessuale. Tutti i cacciatori devono



stare molto attenti per quanto riguarda la presenza di uno Xunuji pertanto il comportamento sociale, precedente ad un evento di caccia, include un periodo di astinenza che riguarda le relazioni sessuali.

Figura B.3 Habitat dello Xunuji. Vegetazione attorno alle cascate del fiume Huazuntlàn, Soteapan.

Il suono di un Xunuji che miagola incute paura di notte ai gruppi di cacciatori che in questo caso hanno tempo per decidere se ritornare tutti insieme al villaggio o fare una sessione di caccia attraverso la quale può essere rivelato il malfattore. La procedura

comporta la combustione di vecchi pezzi tortilla e l'interpretazione della luce del fuoco. Sorprendentemente lo Xunujti inizia ad aggirare la sua preda, il primo segno è il naso del colpevole che inizia a colare, mentre lo Xunujti diventa più grande con ogni miagolio. Infine il mascalzone si squaglia come crema di mais che viene prontamente leccata dallo Lottare contro lo Xunujti è inutile perché l'animale, mentre viene colpito col machete, moltiplica i pezzi che gli vengono recisi formando tanti piccoli Xunujti. Il metodo migliore per imbrogliare lo Xunujti è lavarsi completamente con sapone dopo le pratiche sessuali.

L'albero Ceiba (Ceiba pentandra) (Jem Pixtyin o La Ceiba)

Leggenda raccontata da: Don Leopoldo Martínez Lázaro, Santa Rosa Loma Larga, Hueyapan de Ocampo 1999.

Ceiba pentandra (Figura B.4) e altre specie Ceiba sono alberi leggendari per i Maya, i Mixe e i Popoluc. Quest'albero cresce fino a raggiungere enormi altezze e in questa cultura ha una lunga tradizione, forse è stato anche di grande importanza presso gli antichi Olmechi.



Figura B.4 Ceiba pentandra

Nella cultura Popoluc avere un corpo robusto e una pancia bella grossa rappresentano uno status-symbol. Viceversa se una persona è magra e vuole aumentare di peso dovrà abbracciare un giovane albero di *Ceiba* dicendo la preghiera adeguata. Poi, quando l'albero avrà raggiunto l'estensione e la dimensione desiderata, dovrà essere abbattuto.

Qualora si trascurasse il taglio dell'albero al momento opportuno, la persona rischierebbe di crescere in modo sproorzionato fino ad esplodere.

Sierra Santa Marta, Los Tuxtlas, il rifugio dei “Rayos” (fulmini)

Storia narrata da: Dona Teresa Reyes Martinez, Santa Rosa Loma Larga, Hueyapan de Ocampo 1999.

I Rayos del Guatemala sono nemici storici e invidiosi della regione di Los Tuxtlas perché in questo luogo il grano cresce più rigoglioso. Questi Rayos Guatemaltesi sono alleati con il Rayo del “Cavallo Nero”. Questo Rayo, viene ogni anno, nei mesi di luglio e agosto dalla regione costiera di Coatzacoalcos fino alla regione Tuxtlas. Il suo arrivo è annunciato dai nitriti del suo cavallo. Il Rayo del Cavallo Nero è di colore rosso e arriva senza nuvole e quando scende dal cavallo porta venti forti e acquazzoni al fine di distruggere le giovani piante di mais. Il Rayo collabora con le tartarughe spirituali bianche che cercano di scavare un canale dal mare alla Sierra con lo stesso obiettivo. Ma i “Centellos Rayos” (spiriti dei defunti che si uniscono ai fulmini) di Soteapan, insieme ai “Centellos Rayos” di Oaxaca, lottano uniti contro gli spiriti cattivi del Guatemala. I Centellos di Soteapan si celano in una cascata nei pressi del “Monte Cerro Platano nel sottodistretto di Soteapan. I guatemaltesi vogliono inondare la Sierra perché sono invidiosi, mediocri e poveri. È per questo che la loro terra si chiama “Guate” - “mala” (“Guate” - “cattivo”).

B.5 Etnomedicina

I Chanecos non possono essere equiparati a dèi o qualcosa di simile ma sono i guardiani spirituali e i proprietari dei luoghi che essi colonizzano e in cui risiedono. Fondamentalmente sono piccoli re della natura, vivono in gruppi familiari (bisnonno, nonna, madre e padre, figli) e abitano tutti i posti immaginabili come una casa, una goccia di rugiada, una strada, un giardino di casa. Ogni località ha una sua famiglia Chaneco. Le più potenti famiglie Chaneco tuttavia sono quelle che vivono intorno alle cascate e quelle che vivono dentro la montagna, il cosiddetto Rayo-chanecos. Il Chaneco nero è il più cattivo, ma allo stesso tempo, egli è il custode dei Popoluca e si chiama San Pedro (i Mestizos invece hanno Chanecos bianchi) ed impedisce che Soteapan venga sommersa (in sostegno con i Rayos). Secondo i Popoluca, la malattia può avere cause diverse: ad esempio si può incorrere nella disapprovazione dei Chanecos e questo può tradursi in “Espanto” (anjeeki) o “susto” (z ¥ yi) e la causa di questo disturbo sta appunto nell'ignorare le norme sociali e culturali del comportamento. La malattia però non ha bisogno di colpire il

responsabile, se i genitori sono fortemente motivati, “espanto” o “susto” è molto probabile che colpisca i più deboli ovvero i bambini. Inoltre, i sintomi dell’espanto possono manifestarsi diversi giorni o settimane dopo l’avvenimento causale. Per “espanto” o “susto” si intende la paura o lo shock ed è una malattia associata alla perdita dell’anima, ancora comunemente diagnosticata dai guaritori Popoluca. Quindi la base di questo fenomeno è la credenza popolare che una persona sia composta da un corpo materiale e un’essenza immateriale che può parzialmente o totalmente perdersi (Rubel et al. 1984). Si ritiene che il paziente, consapevolmente o meno ha turbato i custodi dello spirito della terra, fiumi, stagni, boschi o una comunità di animali, uccelli o pesci (Rubel et al. 1984). Secondo Foster (1951), “uno shock improvviso, un incontro inaspettato con esseri soprannaturali, una caduta, o la paura della morte per cause puramente naturali” può causare “Espanto”. I Chanecos si pensa siano gli agenti responsabili che provocano questi incidenti e quindi catturano una parte dell’anima delle vittime e la tengono rinchiusa. Basandosi su uno studio culturale, Rubel et al. (1984) riassumono i sintomi dell’Espanto e susto come: irrequietezza durante il sonno, stanchezza, debilitazione e depressione, il disinteresse al cibo, al vestirsi e all’igiene personale. Se una persona è affetta da "Espanto" o "susto", questa ha bisogno di essere purificata. Durante un rituale di purificazione (limpia) l'anima perduta viene recuperato dall'ensalmador (esperto in perdita dell'anima). Con un pezzo d'incenso l'ensalmador spazza il corpo del paziente e lo pulisce. Ripetutamente l'incenso viene spostato dalla spalla al polso passando sopra la parte interna del braccio cercando di eliminare le palpitazioni (del sistema cardiovascolare) dal lato interno del gomito al polso. Durante questa cerimonia l'esperto in perdita dell'anima cerca di normalizzare e rasserenare il rapporto tra il paziente e il Chaneco invocando ripetutamente i Chanecos e recitando preghiere. Una persona che ha avuto un incidente ad esempio, mentre lavorava nella milpa o nel bosco viene trasportato di notte, in un Arroyo (grotta dove avvengono le purificazioni), viene purificato con diverse erbe selvatiche e acqua dell'Arroyo. Alla cerimonia di purificazione partecipa un numero ristretto di familiari i quali, successivamente, servono pollo arrosto e acquavite. Il concetto che sta dietro questo atto sociale è quello di mangiare insieme con i Chanecos, che si pensa partecipino al pasto, al fine di tranquillizzare qualsiasi tensione rimasta. Pollo e grappa non vengono però sacrificati, ma vengono consumati in un contesto sociale, al fine di vivere insieme ("convivir") con il Chanecos. I bambini, poiché hanno un’anima tenera e nuova, sono spesso disturbati da interferenze con i Chanecos e i folletti. Di conseguenza, il bambino piange sempre. Dopo una cerimonia di fumigazione il bambino viene portato in una

Appendice B

strada o un incrocio in cui viene lasciato. Un'altra persona poi prende il bambino e lascia il posto del rituale scegliendo un percorso diverso, mentre qualcun'altro fumiga e incensa l'incrocio. L'idea alla base di questo rituale è quella di confondere i folletti e i Chanecos e fare perdere loro le tracce. Il fenomeno della cerimonia di purificazione è distribuito ovunque in Messico. La Limpia viene eseguita anche in contesti in cui il paziente non è esplicitamente spaventato. Una persona malata è sempre purificata prima del trattamento con un rimedio a base di erbe; anche una persona che è particolarmente provata psicologicamente viene sottoposta ad una limpia. Durante il trattamento gli spiriti cattivi e il calore della malattia vengono risucchiati fuori dal corpo e mandati via. A questo punto viene mosso attorno al corpo un uovo crudo, con la funzione di raccogliere questo calore. Il Curandero infine, dopo aver rotto l'uovo in un bicchiere d'acqua, verificherà se il bianco d'uovo è "cotto" (diventa bianco) e quindi se la malattia è stata assorbita. Per purificare il corpo vengono utilizzate diverse piante insieme ad una fragrante lozione a base di alcool. Il basilico (*Ocimum basilicum*) è la pianta più frequentemente utilizzata in questo contesto (Figura B.5).



Figura B.5 Rituale di purificazione "limpia" in una caverna presso "Laguna encantada" San Andres Tuxtlas.

B.6 Esempio di cura tradizionale

Il trattamento del "Masan" (erisipela):

Nella comunità Popoluca i problemi dermatologici costituiscono la categoria più grande di patologie nelle quali vengono utilizzate la maggior parte delle specie vegetali. I Popolucas dimostrano essere molto virtuosi nella cura e nel trattamento delle condizioni dermatologiche. D'altra parte essi ritengono di non essere molto abili nel trattamento di disturbi scheletro-muscolari, e quindi per il trattamento delle contusioni e delle fratture, perciò frequentano gli specialisti presso i loro vicini Nahuatl. Per curare i disturbi cutanei, come varie infezioni da parte di microrganismi, cattiva guarigione delle ferite, foruncoli, emorroidi ed eruzioni cutanee, vengono utilizzati diversi metodi di trattamento. Un particolare metodo di trattamento viene attuato per curare una ferita infetta che stenta a guarire. La ferita viene pulita accuratamente con il vapore di un decotto di piante e un successivo lavaggio con questo decotto. Questo trattamento deve essere ripetuto spesso per molte settimane e presuppone quindi un lungo ed intenso lavoro. Sembra che la selezione delle piante da applicare sia di minore importanza rispetto al metodo scelto per il trattamento stesso. Il personale medico degli istituti governativi locali per la salute SSA (Secretaria de Salud y Asistencia) e l'IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) sono spesso sovraoccupati e non dispongono di tempo libero e pazienza per il trattamento di tali condizioni. Il lavoro medico dei guaritori Popoluca costituisce quindi un importante servizio sanitario per la loro comunità. Micosi ed erisipela (infezioni da *Streptococcus spp.*) sono trattati con un cataplasma di foglie talvolta con altre sostanze. Nella seguente serie di foto (Figure B.6) si nota la preparazione di un cataplasma contro l'erisipela contenente foglie di *Phoradendron quadrangulare* (Loranthaceae) e pasta di tortilla acida (mais). Probabilmente anche il basso livello di pH ha un'influenza sul successo del trattamento.

I dati riportati in questo appendice sono stati estrapolati dalla tesi di dottorato del Dr. Marco Leonti.

Leonti M., (2002). Moko / La Rosa Negra, Ethnobotany of the Popoluca, Veracruz, México. Dissertation. Diss. ETH No. 14922.



Figura B.6 Preparazione del cataplasma per la cura tradizionale dell' erisipela.

BIBLIOGRAFIA (Appendice B)

Baéz-Jorge, F., (1973). Los Zoque-Popolucas. Estructura Social. Instituto Nacional Indigenista (1st reprint of 1990), México D.F. México.

Chevalier, J.M., Buckles, D., (1995). A land without gods: Process Theory, Maldevelopment and the Mexican Nahuas, zed Books, London, new Jersey.

Coe, M.D., (1999). The Maya 6th edition, Thames and Hudson, London.

Coe, M.D., (1994). Mexico. From thevolmecs to the Aztecs. 4th edition, Thanes and Hudson, London.

Foster, G.M., (1943). The Geographical, Linguistic, and Cultural Position of the Popoluca of Veracruz. American Anthropologist 45: 531-547.

Foster, G.M., (1945). Sierra Popoluca Folklore and Beliefs. University of california Publications in American Archaeology and Ethnology 42: 177-250.

Foster GM., (1951). Some Wider Implications of Soul-loss Illness Among the Sierra Popoluca. In: Sociedad Mexicana de Antropología (eds.) Homenaje al Doctor Alfonso Caso, Mexico D.F.; pp. 167-174.

Instituto Nacional Indigenista (1994). Pueblos Indigenas de Mexico, Popolucas. I.N.i. mexico D.F. México.

Leonti M., (2002). Moko / La Rosa Negra, Ethnobotany of the Popoluca, Veracruz, México. Dissertation. Diss. ETH No. 14922.

Rice, E., Erenstein, O., Godínez, L., (1998). The Farming System of the Texizapan Watershed, Sierra Santa Martra, Veracruz, México. NRG Cpublication 98-01. México, D.F.:CIMMYT and Proyecto Sierra Santa Marta (PSSM).

Appendice B

Rubel AJ., O'Neil CW., Collado-Ardòn R., (1984). Susto, a Folk Illness. University of California Press, Berkley, Los Angeles, London

Wolters, B., (1996). Agave bis Zaubernus: Heilpflanzen der Indianer Nord- und mittelamerikas. Urs Freud Verlag, Greifenber

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. L'estrazione dipende soprattutto dal sistema di solventi impiegato. 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). 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.

6.1.2 Cromatografia

La cromatografia è una particolare tecnica di separazione, basata sulla ripartizione fra una fase in movimento ed una stazionaria della miscela delle sostanze da separare (Pavia et al. 1994). L'elevato rendimento di questa tecnica, grazie alla quale si riescono a isolare, in grado di assoluta purezza, anche i componenti minori di una miscela complessa, è dovuto a processi fisici selettivi ma sovente molto complessi e difficili da analizzare nei loro aspetti microscopici. In maniera sintetica si può dire che la migrazione differenziale dei soluti risulta regolata dall'equilibrio tra due sistemi di forze opposte: le forze motrici e le forze di resistenza. 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 5µm (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 et al. 1996; Nyredy et al. 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). La miscela del campione è disposta sulla lastrina rivestita ed è sviluppata in un alloggiamento chiuso con un eluente variabile. I componenti del campione migrano con movimento differente con la fase mobile sulla fase stazionaria. A seconda della fase stazionaria, la separazione è basata sui processi di distribuzione e/o di adsorbimento. 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 (Kowalska et al. 1996; Nyredy et al. 1988).

6.1.2.2 Cromatografia liquida sotto vuoto (VLC)

La VLC è un metodo veloce per la separazione grezza degli estratti (Figura 6.1). La tecnica è essenzialmente una cromatografia preparatoria di strato, fatta funzionare come colonna, il cui flusso è attivato dal vuoto (Coll et al. 1986; Hostettmann et al. 1986). L'apparecchio consiste di una colonna filtrante, impaccata con il materiale assorbente della TLC. L'impaccamento uniforme della colonna è importante per avere buoni risultati. Ciò si realizza, colpendo delicatamente la colonna durante l'impaccamento, ed 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.

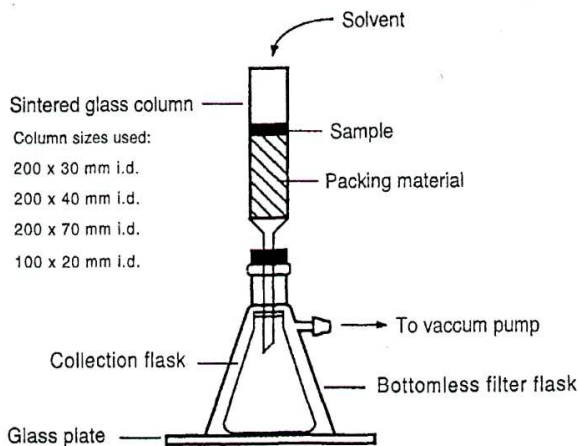


Figura 6.1 Rappresentazione schematica dell'apparato per la VLC (da Coll et al 1986).

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. La combinazione della fase stazionaria e della fase mobile è molto importante per tale cromatografia. Le separazioni sono ottenute usando o le miscele solventi in isocratica o tramite l'eluizione graduale con i solventi di polarità crescente. La colonna è costituita da un tubo di vetro alla cui estremità inferiore viene riposto un rubinetto, per regolare il flusso dell'eluato nel recipiente di raccolta (Figura 6.2). La forma e le dimensioni della colonna, sono evidentemente 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, ed esaminate separatamente con metodi chimici e fisici.

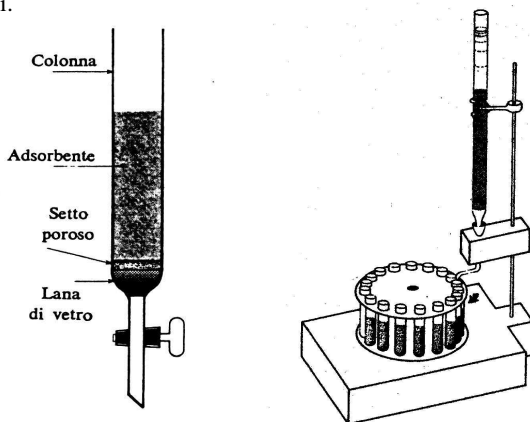


Figura 6.2 Rappresentazione di una colonna cromatografica (CC) e di un collettore di frazioni (da Pavia et al. 1994).

6.1.2.4 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

L'HPLC viene solitamente indicata come "cromatografia liquida ad alta pressione" o anche "ad alta efficienza". Dal punto di vista teorico, essa si basa sui principi fisici dell'adsorbimento, della ripartizione e dello scambio ionico, già visti in precedenza; ma, avvalendosi di tecnologie avanzate, consente di ottenere separazioni impossibili nella tradizionale cromatografia in fase liquida. Una delle caratteristiche più salienti a questo proposito, è l'impiego di fasi stazionarie molto fini e quindi ad alta superficie, che richiedono, a loro volta, l'uso di alte pressioni al fine di ottenere l'eluizione della fase liquida in tempi accettabili. Ciò costituisce una netta differenza dalla gascromatografia in cui la pressione del gas di trasporto ha valori molto bassi. Un'altra importante caratteristica, che deriva dall'impiego di fasi mobili liquide, risiede nel fatto di non dover vaporizzare il campione, consentendo di operare a temperature vicine a quella ambiente e quindi di poter procedere a separazioni di sostanze che verrebbero distrutte, o comunque alterate con il riscaldamento. 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 DQF-COSY, 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 (RMN), generalità:

La spettroscopia di risonanza magnetica si è rivelata la tecnica analitica più importante per la caratterizzazione della struttura di un composto organico (Stradi et al. 1981; Sanders et al. 1988; Byrne et al. 1993; Kalinowsky et al. 1984; Jackman et al. 1969). Essa è una tecnica strumentale che consente di individuare il numero, il tipo e le posizioni relative di certi atomi di una molecola. Questo tipo di spettroscopia, si può applicare soltanto a quegli atomi che hanno momenti magnetici nucleari, in virtù delle loro caratteristiche di spin nucleare. 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 RMN unidimensionale (1D)

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 ($\text{CH}_3)_2\text{Si}$), a cui si fa corrispondere il valore di assorbimento pari a $\delta=0$. I gruppi funzionali possono essere identificati dai valori caratteristici dello spostamento chimico del ^{13}C e del ^1H . Il numero di segnali fornisce le informazioni sul numero di nuclei della molecola in esame.

Nel caso del protone la molteplicità di un segnale è dovuta all'effetto generato dai nuclei vicini. 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 e viene espressa in Hertz (Hz) costante. 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 RNM bidimensionale (2D)

Gli esperimenti RMN bidimensionali (2D) danno molte informazioni sull'interazione dei nuclei. Tali esperimenti possono essere suddivisi in due gruppi principali: metodi mononucleari 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).

Homonuclear 2D NMR metodi:

- 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 (Rotatine 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 Bound 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)

Ogni composto che contenga legami covalenti, sia organico che inorganico, assorbe la radiazione elettromagnetica a varie frequenze, comprese quelle della regione infrarossa, la quale comprende le lunghezze d'onda coinvolte nella luce visibile (circa 400-800 nm, dove $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$), ma più brevi di quelle associate alle radioonde ($> 1\text{cm}$). La ricerca chimica è interessata alla parte vibrazionale della regione infrarossa, cioè a quella che comprende radiazioni con lunghezza d'onda (λ) tra 2,5 e 15 μm .

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 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. 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).

6.2.3 La spettroscopia UV:

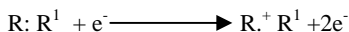
Il principio della spettroscopia UV e Visibile è la misurazione della interazione tra le molecole ed una radiazione elettromagnetica nel range di 200-380 nm per l'ultravioletto e 380-800 nm per il visibile (Jaffè et al. 1962, Ugo et al. 1972). L'assorbimento molecolare dipende dalla struttura elettronica della molecola, i tipi di elettroni principalmente interessati nelle transizioni, sono gli elettroni π . Tale metodologia, 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).

6.2.4 La spettrometria di massa (MS)

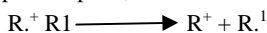
La spettrometria di massa (Gioia et al. 1987; Baldwin et al. 1995) è fondamentalmente diversa dalle tecniche illustrate precedentemente. Queste, infatti, trattano dell'interazione della radiazione elettromagnetica con le molecole, cioè sono misure fisiche, le molecole dei composti investigati vengono 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 5-100% 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 Linee Cellulari per i test di citotossicità

Per i test di citotossicità sono state utilizzate diverse linee cellulari:

6.3.1.1 Linea cellulare MCF-7

La linea cellulare denominata MCF-7 deriva da un tumore mammario, ed è stata isolata per la prima volta nel 1970 da una donna caucasica di 69anni. MCF-7 è l'acronimo di Michigan Cancer Foundation - 7 e si riferisce all'istituto di Detroit dove la linea cellulare è stata coltivata nel 1973 grazie a Herbert Soule e suoi collaboratori. Ora il Michigan Cancer Foundation è conosciuto col nome di Barbara Ann Karmanos Cancer Institute.

Sulla paziente sono state effettuate due mastectomie, la prima ha rivelato che il tessuto rimosso era benigno, la seconda, avvenuta cinque anni dopo ha rivelato l'adenocarcinoma maligno in un versamento pleurico da cui sono state isolate le cellule MCF-7. La donna, affetta da cancro della mammella, è stata trattata con radioterapia e ormonoterapia. La paziente, da cui sono state prelevate le cellule tumorali, era Frances Mallon una suora nel convento del Cuore Immacolato di Maria (Monroe, Michigan) sotto il nome di Suor Caterina Frances che morì nel 1970. Le sue cellule sono state la fonte di gran parte delle attuali conoscenze sul cancro al seno (Glodek et al. 1990. Lacroix et al. 2004. Lacroix et al. 2006).

Prima della scoperta della linea di MCF-7, non è stato possibile per i ricercatori ottenere una linea cellulare mammaria, in grado di vivere poco più di alcuni mesi

(Levenson et al. 1997). Questa linea cellulare conservato alcune caratteristiche dell'epitelio mammario differenziato, tra cui la capacità di elaborare estradiolo attraverso i recettori degli estrogeni citoplasmatici, la capacità di formare cupole e come le cellule epiteliali, la crescita in monostrato. Oltre a mantenere la loro sensibilità estrogeni, cellule MCF-7 sono più sensibili alla citocheratina; inoltre sono ricettive a desmina, endotelina, GAP, e vimentina. La crescita può essere inibita mediante un fattore di necrosi tumorale alfa (TNF alfa). Il trattamento delle cellule MCF-7 con farmaci anti-estrogeni può modulare il fattore di crescita insulino-simile, che alla fine ha l'effetto di riduzione della crescita cellulare. Per quanto riguarda la coltivazione, la coltura deve essere conservata in freezer con il 70% di medium, il 20% FBS, il 10% DMSO e una concentrazione di circa $1-2 \times 10^6$ cellule/fiala. Da un punto di vista genetico, questa linea cellulare non presenta lo stesso corredo cromosomico delle cellule di partenza. Infatti, in origine, è stata descritta come avente un cariotipo contengono 85 cromosomi, che poi è stato ridotto a 16 cromosomi. La linea cellulare odierna ha un cariotipo contenente 69 cromosomi (Ross et al. 2001. Charafe-Jauffret et al. 2006). Inoltre, vi sono differenze genetiche tra la linea delle cellule MCF-7 dal Michigan Cancer Foundation e la linea cellulare ATCC (American Type Culture Collection). Questo indica che la linea cellulare ATCC appartiene ad una fonte diversa rispetto alle altre linee MCF-7 (Ross et al. 2001).

Caratteristiche delle cellule MCF-7

- Tumore primario invasivo della mammella.
- Origine delle cellule: versamento pleurico.
- Presenza di recettori per gli estrogeni
- Presenza di recettori per il progesterone
- Gene ERBB2 (con Her2/neu sovraespressione proteica) non presente.
- Presenza di tumorigenicità nei topi, ma solo con estrogeni supplementazione.
- Fenotipo epiteliale luminale.

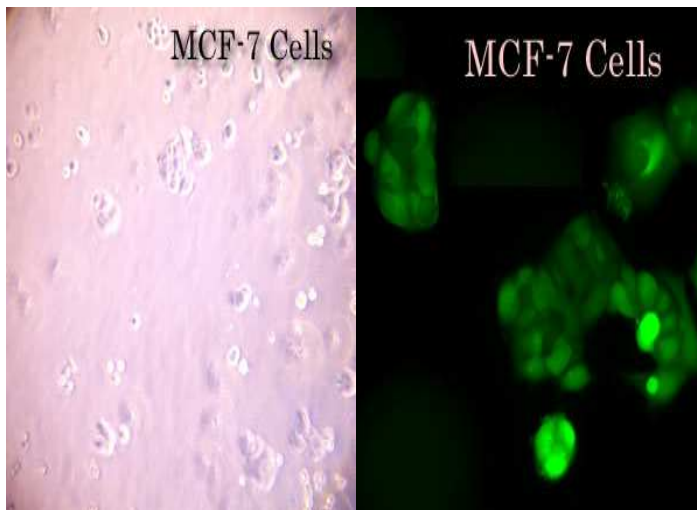


Figura 6.3 Immagini delle cellule MCF-7. Copyright immagine da altogen.com. Riprodotto con il permesso di Altogen Biosystems.

6.3.1.2 La linea cellulare Jurkat

La linea cellulare Jurkat (originariamente chiamato JM) è stata istituita alla fine del 1970, proviene dal sangue di un ragazzo di 14 anni, affetto da leucemia alle cellule linfocitarie di tipo T (Schneider et al. 1977). Le cellule Jurkat sono una linea immortale di linfociti T, che svolgono un ruolo molto importante nel sistema immunitario; sono infatti la struttura portante della nostra risposta immunitaria adattativa (ovvero specifica per un tipo di antigene). I linfociti derivano dalla linea linfoide delle cellule staminali multipotenti presenti nel midollo osseo (Wikipedia). Inoltre svolgono una funzione regolatrice tramite la produzione di linfochine, molecole che sono alla base di fenomeni di cooperazione cellulare nella risposta immunitaria. Il loro uso principale, tuttavia, è quello di determinare il meccanismo della diversa suscettibilità dei tumori ai farmaci e alle radiazioni. Derivati diversi della linea cellulare Jurkat, oggi, possono essere ottenuti attraverso l'introduzione o la soppressione di alcuni geni (Tratto da Wikipedia).

6.3.1.3 La linea cellulare PC3

Con il termine PC₃ viene identificata una linea “classica” di cellule tumorali, derivate da linee cellulari di tumore prostatico con alto potenziale metastatico (Alimirah et al. 2006). Le linee cellulari PC₃ sono state originariamente derivate da metastasi ossee derivate da un tumore alla prostata (Alimirah et al. 2006). Le cellule PC₃ presentano una bassa concentrazione di testosterone 5-alfa reduttasi e esprimono il PSA (Prostate Specific Antigen)(Pulukuri et al. 2005).

6.3.1.4 La linea cellulare HL-60

Il termine HL-60 (Cellule promielotiche umane di leucemia), si riferisce ad una varietà di cellule leucemiche che viene utilizzata a scopo di ricerca in laboratorio. Questa linea cellulare deriva da una donna di 36 anni affetta da leucemia promielotica acuta (Gallagher et al. 1979).

Le cellule HL60 (American Type Culture Collection (ATCC)), sono dei promielociti di leucemia umana, aventi un tempo di duplicazione di 12-14 ore; queste cellule crescono in sospensione e vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici e di siero fetale bovino (10%) (Breitman et al. 1980). Le colture vengono allestite in fiasche da 25 ml a 37° C, in incubatore a CO₂ (5%) (Breitman et al. 1980). La proliferazione delle cellule HL-60 avviene grazie alla presenza di transferrina e insulina che sono espresse sulla superficie delle cellule. La presenza di insulina e di transferrina è fondamentale; infatti la proliferazione di HL-60, cessa immediatamente se uno di questi residui è rimosso dai terreni di coltura (Breitman et al. 1980). Le cellule HL-60 permettono di studiare gli eventi molecolari di differenziazione mieloide e gli effetti degli elementi fisiologici, farmacologici e virologici che agiscono su questo processo (Sugimoto et al. 1998). Il modello delle cellule HL-60 inoltre, è stato usato per studiare la differenziazione e l'apoptosi cellulare (Sugimoto et al. 1998), ed è particolarmente utile negli studi di elettroforesi (Ratanachoo et al. 2002), i quale richiedono un ambiente acquoso con cellule sospese e rotonde (Tratto da cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0163.htm).

6.3.1.5 La linea cellulare HeLa

Le cellule HeLa (chiamate anche *Hela* o *hela*) sono cellule tumorali immortali altamente stabilizzate, molto utilizzate nella ricerca scientifica (Rahbari et al. 2009). Questa linea cellulare è stata isolata da una donna di 31 anni, Henrietta Lacks, di origine africana, madre di cinque figli, morta a Baltimora il 4 ottobre 1951 a causa di una forma maligna di cancro alla cervice uterina. (Capes-Davis et al. 2010; Watts

2010). Le HeLa sono state le prime cellule umane immortali e hanno rappresentato una grande risorsa per la ricerca scientifica (Sharrer 2006). Questa linea cellulare fu isolata e propagata per la prima volta da George Otto Gey nel 1951 (Washington 1994). Gey ricevette una porzione di tessuto contenente le HeLa da un medico dell'ospedale Johns Hopkins di Baltimora, che aveva ottenuto il lembo di tessuto da una biopsia, attuata a fini diagnostici, della massa tumorale della paziente, Henrietta Lacks (Washington 1994). Gey moltiplicò tali cellule tumorali *in vitro*, senza il consenso della Lacks. Si accorse di avere per le mani un tipo di cellule di particolare interesse e le rese disponibili per la commercializzazione (Skloot 2010). A quel tempo, non esistevano leggi che obbligavano il medico ad informare il paziente, su eventuali utilizzi del materiale biologico asportato durante interventi, biopsie o analisi di liquidi biologici. Negli Stati Uniti il materiale biologico proveniente da pazienti, poteva essere utilizzato a discrezione dell'istituto medico dove il prelievo era avvenuto, senza che questi potesse vantare diritti su eventuali proventi (Skloot 2010). I primi tentativi di proteggere l'anonimato della Lacks terminarono dopo la sua morte; infatti, pochi anni dopo, la stampa rivelò il nome della paziente da cui erano state prelevate le HeLa. Questa linea cellulare è oggi coltivata, per fini scientifici, nei laboratori di tutto il mondo. Inoltre, esse posseggono delle caratteristiche uniche che le differenziano dalle altre cellule di questo tipo (Skloot 2010). Le HeLa sono molto più resistenti delle altre cellule tumorali e sono in grado di sopravvivere in condizioni che, altre cellule non possono tollerare. Infatti, sono in grado di vivere per un periodo relativamente lungo anche in assenza di terreno di coltura (Sharrer 2006). Le HeLa possono dividersi molte più volte rispetto alle altre cellule e ciò dipende da una mutazione della telomerasi che previene l'accorciamento del telomero durante la replicazione, meccanismo che, nelle altre cellule provoca la morte dopo un certo numero di divisioni cellulari (Skloot 2010). Alcuni ricercatori hanno proposto le HeLa come nuova. Il nome proposto sarebbe *Helacyton gartleri* (Van Valen et al. 1991). Tale proposta, si basa principalmente sulla composizione cromosomica delle HeLa, differente da quella delle altre cellule umane. Le HeLa posseggono infatti 82 cromosomi e oltre al normale corredo umano, presentano quattro copie del cromosoma 12 e tre copie dei cromosomi 6, 8 e 17 (Macville et al. 1999). Tale differenza nel corredo cromosomico è dovuta ad una mutazione orizzontale indotta dal *Papillomavirus*, che è responsabile di quasi la totalità dei carcinomi cervicali (Macville et al. 1999). Le HeLa sono state descritte Leigh Van Valen come un esempio della possibilità di creazione di nuove specie (Van Valen et al. 1991). Le motivazioni che portarono Van Valen a dichiarare le HeLa nuova specie si possono riassumere in tre punti:

- La profonda differenza del loro genoma e corredo cromosomico con quello umano.
- La nicchia ecologica nella quale possono sopravvivere.
- La loro capacità di propagarsi e resistere là dove altre cellule non avrebbero possibilità di sopravvivere.

Per quanto concerne gli usi di questa linea cellulare, le HeLa sono state utilizzate da Jonas Salk per testare il primo vaccino antipolio (Smith 2002). Da quel momento, le cellule HeLa, sono state usate per la ricerca sul cancro, AIDS, gli effetti delle radiazioni e sostanze tossiche, la mappatura del gene, e innumerevoli altre attività scientifiche" (Sharrer 2006). A causa del loro adattamento alla crescita, in piastre di coltura, le cellule HeLa sono avolte difficili da controllare perchè causano problemi di contaminazione (Capes-Davis et al. 2010)

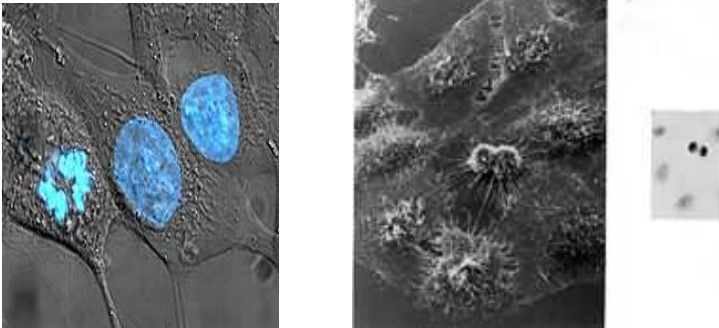


Figura 6.4 Immagini di cellule HeLa viste attraverso la microscopia elettronica a scansione. Tratto da Wikipedia.



Figura 6.5 Immagine di cellule HeLa tramite microscopio a contrasto di fase. Tratto da Wikipedia.

6.3.2 Culture Virali

I virus possono essere definiti come parassiti endocellulari obbligati, rappresentati da organizzazioni biologiche di livello sub-cellulare, formate essenzialmente da una o poche molecole “informatrici” di DNA o RNA, che a loro volta sono racchiusi in un contenitore proteico detto capside (La Placca 2008). Il capside ha la duplice funzione di proteggere il genoma del virus in ambiente extra cellulare e di mediarne la penetrazione nelle cellule bersaglio. I virus il cui genoma è costituito da DNA sono denominati deossiribovirus, i virus il cui genoma è formato da RNA sono denominati rinovirus (La Placca 2008). I virus sono parassiti intracellulari obbligati, per riuscire ad ottenere la moltiplicazione in laboratorio, è necessario disporre di cellule viventi (animali da laboratorio, embrioni di pollo o colture di cellule) (La Placca 2008). Il tipo di colture cellulari più usato in virologia, è ottenuto mediante la coltivazione di singole cellule ricavate inizialmente mediante la dissociazione del tessuto di origine, attraverso il trattamento con enzimi proteolitici (tripsina associata o meno ad agenti chelanti) (La Placca 2008). Le cellule vengono coltivate in idonei contenitori di vetro o plastica, dove crescono aderendo saldamente alla parete che costituisce il fondo del recipiente e sulla quale si moltiplicano fino a coprirlo completamente con un monostrato di cellule. In generale un terreno di coltura dovrebbe essere costituito da una soluzione isotonica, tamponata intorno a pH 7.4, contenente glucosio, amminoacidi, vitamine e coenzimi, ed arricchita di siero animale (in genere siero fetale di vitello nella proporzione del 10%), che ha la funzione, oltre che di fornire alcuni fattori indispensabili per la moltiplicazione cellulare anche di detossificare il terreno, legando eventuali molecole tossiche alle proprie proteine (La Placca 2008). Le colture cellulari preparate a partire da un organo animale, prendono il nome di colture primarie. Le sorgenti più comuni di questo tipo di colture impiegate nello studio di virus umani sono il rene di scimmia, vari organi (polmoni e reni) di feti umani e cellule amniotiche umane (La Placca 2008).

6.3.2.1 Linea virale HSV-1

Questa linea cellulare appartiene alla famiglia degli Herpes virus, il cui genoma è formato da una molecola di DNA bi catenaria e lineare (La Placca 2008). Gli herpes virus hanno un virione rotondeggiante di 150-200 nm di diametro, formato da un involucro ipoproteico (peplos), da un tegumento e da un capside icosaedrico di 100 nm di diametro, con 162 capsomeri prismatici, che contiene a sua volta un nucleotide proteico intorno al quale è avvolto il DNA (La Placca 2008). Si conoscono due tipi di virus herpes simplex: il tipo 1 (HSV 1) e il tipo 2 (HSV 2) (Ryan et al. 2004).

Materiali e Metodi

Caratteristiche importanti di questa sottofamiglia sono un ciclo replicativo breve, produzione di un'infezione litica in coltura cellulare e istituzione di latenza nei gangli sensoriali, con conseguente potenziale riattivazione (DermNet NZ 2006-2009). Questi due virus hanno una struttura molecolare simile ma, presentano delle differenze nelle proprie caratteristiche antigeniche e nella propria patogenicità. L'*HSV 1* possiede un tropismo per i tessuti orofacciali e dà manifestazioni cliniche a carico della mucosa orale, faringea, oculare e della cute del viso e del tronco al di sopra del diaframma (Gupta et al. 2007). L'*HSV 1* è diffusissimo in natura (oltre il 90% degli esseri umani ne è infetto) e viene trasmesso principalmente attraverso la saliva e il contatto con le lesioni labiali (Gupta et al. 2007). L'*HSV 2* ha un tropismo per le mucose genitali e la cute al di sotto del diaframma e viene trasmesso attraverso i rapporti sessuali (Gupta et al. 2007). Comunque esistono delle eccezioni a questa regola per cui l'*HSV 2* si reperisce nella cavità orale come conseguenza di rapporti orogenitali (circa il 10% dei casi). L'*HSV 1* raramente infetta le mucose genitali. Entrambi i virus hanno la capacità di rimanere, dopo l'infezione primaria, in uno stato di latenza nelle cellule gangliari sensitive (rispettivamente trigeminali e sacrali) (Koelle et al. 2008). La loro riattivazione periodica, che avviene a causa di vari fattori come la luce solare, lo stress, la febbre, le mestruazioni, dà origine a lesioni ulcerative ricorrenti della mucosa orale o genitale (Koelle et al. 2008). I sintomi dell'infezione da virus herpes simplex di tipo 1 includono lacrimazione, bolle nella pelle o nelle mucose delle labbra, della bocca, o genitali. (Ryan et al. 2004). Le lesioni guariscono con una crosta caratteristica della malattia erpetica. L'acyclovir e la vidarabina sono entrambi farmaci attivi nel trattamento dell'infezione da HSV-1 (Ryan et al. 2004).

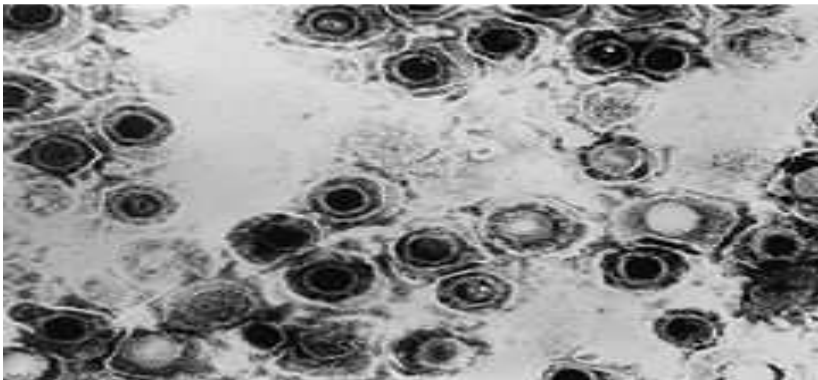


Figura 6.6 Micrografia TEM del virus herpes simplex 1. (Tratto da Wikipedia).

Regno:	Virus
Gruppo:	Gruppo I (a DNA)
Famiglia:	Herpesviridae
Sottofamiglia	Alphaherpesvirinae
Genere:	Simplex virus
Specie:	<i>Herpes simplex virus 1 (HWJ-1)</i> <i>Herpes simplex virus 2 (HWJ-2)</i>

Tabella 6.1 Sistematica dei virus Herpes simplex 1 e 2.

6.3.2.2 Linea virale 1S.

Questa linea cellulare appartiene alla famiglia dei Picornavirus, il cui genoma è formato da una molecola di RNA, monocatenario, di senso positivo e infettante (La Placca 2008). Si tratta dei più piccoli rinovirus. Il virione è sprovvisto di peplos e presenta un capsido icosaedrico di 28-30 nm di diametro. I virioni presentano quattro proteine strutturali fondamentali (La Placca 2008). La replicazione ha luogo nel citoplasma e i virioni neo formati si liberano dopo lisi della cellula infettata. I picornavirus sono in genere specie-specifici. (La Placca 2008). Il poliovirus è stato isolato per la prima volta nel 1909 ad opera di Karl Landsteiner e Erwin Popper (Paul 1971). Nel 1981, il genoma del polio virus è stato caratterizzato da due diversi team di ricercatori: Vincent Racaniello e David Baltimore al MIT (Racaniello et al. 1981) e da Naomi Kitamura e altri al State University di New York, Stony Brook (Kitamura et al. 1981). Attualmente il poliovirus è uno dei virus meglio caratterizzati ed è diventato un modello utile per la comprensione della biologia del virus a RNA (La Placca 2008). I virus hanno come bersaglio particolare i motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale, con possibilità di portare paralisi. Sono responsabili della poliomielite, una malattia molto grave che coinvolge il SNC provocando paralisi flaccida con atrofia (mancato sviluppo) muscolare (La Placca 2008).

Per quanto riguarda la cura nessun farmaco prodotto si è dimostrato veramente efficace. L'unica vera possibilità è la vaccinazione: sono disponibili due vaccini (Carosi et al. 2000):

OPV: Oral Polio Vaccine, Sabin orale

IPV: Inactivated Polio Vaccine Salk iniettabile.

Oltre all'uomo, possono essere suscettibili di infezione anche gli scimpanzé. Si riscontrano tre tipi umani (*poliovirus hominis*) (Carosi et al. 2000):

- il Brunhilde, tipo 1, è altamente paralitico, così chiamato dal nome dello scimpanzé che fece ottenere il suo isolamento;
- il Lansing, tipo 2, poco comune, che prende il nome dalla città del Michigan dove fu isolato durante una epidemia;
- il Leon, tipo 3, meno frequente, corrispondente al nome di un piccolo paziente in cui fu trovato.

Le cellule umane sono provviste di specifici recettori proteici ai quali i poliovirus possono aderire e quindi penetrare nelle cellule suscettibili. Il virus infetta le cellule dell'orofaringe, le tonsille, i linfonodi del collo e l'intestino tenue. L'infezione evolve attraverso cicli di replicazione virale, determinando la distruzione delle cellule infette (La Placca 2008). Una volta instaurata l'infezione, i poliovirus possono raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso la barriera emato-encefalica, tramite il torrente ematico o attraverso le fibre nervose (Yang et al. 1997). La moltiplicazione virale distrugge i neuroni motori che non rigenerano, provocando l'incapacità funzionale dei muscoli interessati, anche se in alcuni casi è possibile recuperare la funzionalità muscolare in modo completo (Ministero della salute, Direzione Generale della Prevenzione - Ufficio III).

Per la loro acido-resistenza riescono a rimanere intatti nel tratto gastrico, riuscendo a moltiplicarsi sia a livello della faringe, sia a livello dell'intestino. I poliovirus vengono inattivati con formaldeide o cloro libero residuo o raggi ultravioletti (Ministero della salute, Direzione Generale della Prevenzione - Ufficio III).

La velocità di inattivazione virale in natura è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. L'infettività dei poliovirus nel suolo decresce del 90% ogni 20 giorni in inverno ed ogni 1,5 giorni in estate. Una simile riduzione del 90% a temperatura ambiente avviene ogni 26 giorni nelle acque reflue, ogni 5,5 giorni nell'acqua potabile ed ogni 2,5 giorni nell'acqua di mare (Ministero della salute, Direzione Generale della Prevenzione - Ufficio III).

In condizioni di laboratorio, il virus contenuto in campioni clinici o ambientali può sopravvivere per molti anni alle temperature di congelamento, per molti mesi in condizioni di refrigerazione e per alcuni giorni a temperatura ambiente. Il virus è rapidamente distrutto dall'esposizione a temperature di 50°C o più, dall'autoclavaggio o dall'incenerimento (Ministero della salute, Direzione Generale della Prevenzione - Ufficio III).

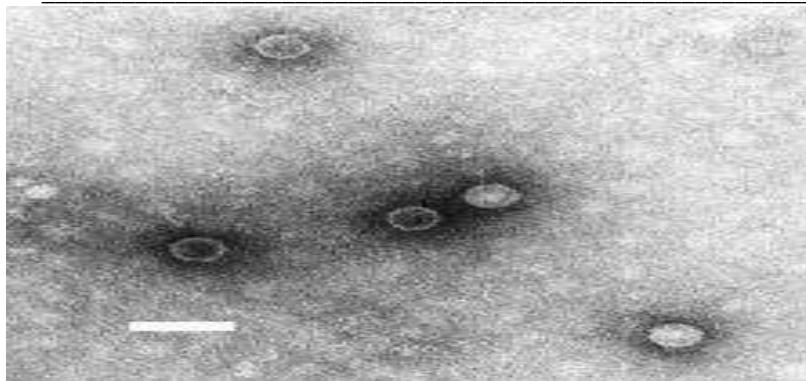


Figura 6.7 Microfotografia TEM del Poliovirus 1S. (Tratto da Wikipedia).

Regno:	Virus
Gruppo:	Gruppo IV (Virus a RNA)
Famiglia:	Picornaviridae
Genere:	<i>Enterovirus</i>
Specie:	<i>Poliovirus</i>

Tabella 6.2 Sistematica dei Poliovirus.

6.3.3 Prodotti chimici

[³H]-8-OH-DPAT (1 mCi/ml, 106–170 Ci/mmol), [³H]-GR65630 (1 mCi/ml, 77.2 Ci/mmol), [³H]-CP55,940 (1 mCi/ml, 126 Ci/mmol), [³H]-RTX (1 mCi/ml, 43 Ci/mmol), [³H]FMLP, ed I rispettivi ³H analoghi, così come the Ultima Gold scintillation cocktail sono stati ottenuti da PerkinElmer, Switzerland. [³H]Anandamide (223 Ci/mmol) è stato acquistato da NEN Life Science Products. Rimobant (SR141716) e SR144528 sono stati ottenuti come dono da Sanofi Synthelabo, France. Anandamide e WIN55,212-2 sono stati acquistati da Tocris, UK.

Histamine hydrochloride è stato ottenuto da Sigma Aldrich, Switzerland.

Silica gel (40–63 μm) e TLC plates con silica gel 60 e indicatore fluorescente a 254 nm è stato ottenuto dalla Merck.

I solventi sono stati ottenuti dalla VWR International, Germany.

Tutti gli altri composti chimici derivano dalla Fluka Chemie AG, Switzerland.

6.3.4 Receptor screen

Human CB₁, CB₂, 5-HT_{1A}, 5-HT₃, FPRL-1 sovraesprimenti le membrane HEK-293 sono stati ottenuti da PerkinElmer, Switzerland.

CHO-K1 cells esprimenti stabilmente human TRPV1 sono un dono del Dr. Zoltan Sandor, University of Debrecen, Hungary.

Preparazioni di membrana (TRA 7 e 20 mg) sono state risospese in 0,2 ml (volume finale) di tampone di legame (50 mM Tris-HCl, 2,5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml fatty acid free BSA, pH 7.4).

La concentrazione del Recettore (B_{max}) era 1.7–3.2 pmol/mg di proteina.

Il legame non specifico del radiolegante è stato determinato in presenza di ligandi in eccesso.

La preparazione di membrane saturate dal radioligando sono state incubate con 10 μ M di falcarinolo. Dopo 90 minuti di incubazione, la sospensione è stata rapidamente filtrata attraverso 0.05% polyethyleneimine presoaked GF/C glass fiber filters on a 96-well cell harvester e lavate nove volte con 0.5 ml di tampone di lavaggio ghiacciato (50 mM Tris-HCl, 2,5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 2% BSA, pH 7.4). La radioattività su filtri è stata misurata con un Beckman LS 6500.

Uno spostamento di oltre il 50% del radioligando da 10 micron di competitivo è stato considerato significativo. Usando questo setup, gli nonlabeled analoghi del rispettivo radioligando spiazzano i radioligandi di oltre il 70%.

6.3.5 FACS analysis of CB receptor expression

HaCaT and primary keratinocytes (kindly obtained from Prof. Dr. Michael Detmar, ETH Zurich, Switzerland) or positive control CB₁/CB₂-transfected CHO-K1 cells (10^6) were washed in PBS (Invitrogen) supplemented with 0.1% NaN₃ and 2% FBS and incubated (1:100) with the rabbit polyclonal CB₂-specific antibody (Ab3561) or (1:200) with rabbit polyclonal CB₁-specific antibody (Ab3558) for 45 min on ice in the dark. After two washing steps, the cells were incubated (1:32) with a monoclonal anti-rabbit fluorescein isothiocyanate labeled antibody for 45 min on ice in the dark. The cells were washed twice and resuspended in 500 μ l of PBS with 0.1% NaN₃ and 1% *p*-formaldehyde before analysis on a FACScan cytometer (BD Biosciences). Measurements were carried out with the CellQuest software, and relative expressions were compared with secondary antibody controls.

6.3.6 Radioligand displacement assays on CB₁ and CB₂ receptors

For the CB₁ receptor, binding experiments were performed in the presence of 0.39 nM radioligand [³H]CP-55,940 or 0.24 nM [³H]anandamide at 30 °C in siliconized glass vials together with 7.16 µg of membrane recombinantly overexpressing CB₁ (RBHCB1 M; PerkinElmer Life Sciences), which was resuspended in 0.2 ml (final volume) of binding buffer (50 mM Tris-HCl, 2.5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml fatty acid free BSA, pH 7.4). CB₁ receptor concentration (B_{\max}) was 2.5 pmol/mg of protein. Test compounds were present at varying concentrations, and the nonspecific binding of the radioligand was determined in the presence of 10 µM CP-55,940. After 90 min of incubation, the suspension was rapidly filtered through 0.05% polyethyleneimine presoaked GF/C glass fiber filters on a 96-well cell harvester and washed nine times with 0.5 ml of ice-cold washing buffer (50 mM Tris-HCl, 2.5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 2% BSA, pH 7.4). Radioactivity on filters was measured with a Beckman LS 6500 scintillation counter in 3 ml of Ultima Gold scintillation liquid. Data collected from three independent experiments performed in triplicate were normalized between 100 and 0% specific binding for [³H]CP-55,940 and [³H]anandamide, respectively. These data were fitted in a sigmoidal curve and graphically linearized by projecting Hill plots, which for both cases allowed the calculation of IC₅₀ values. Derived from the dissociation constant (K_D) of [³H]CP-55,940 (0.18 nM for CB₁ and 0.39 nM for CB₂) and [³H]anandamide (89 nM for CB₁ and 192 nM for CB₂) (*vide infra*) and the concentration dependent displacement (IC₅₀ value), inhibition constants (K_i) of competitor compounds were calculated by using the Cheng-Prusoff equation as reported previously (Gertsch et al. 2008). For CB₂ receptor binding studies, 3.8 µg of membrane recombinantly overexpressing CB₂ (RBXCB2 M; PerkinElmer Life Sciences) was resuspended in 0.6 ml of binding buffer (*vide supra*) together with 0.11 nM the radioligand [³H]CP-55,940. The CB₂ receptor radioligand binding assay was conducted in the same manner as for CB₁. CB₂ receptor concentration (B_{\max}) was 4.7 pmol/mg protein. One mg/ml of fatty acid free bovine serum albumin (BSA) was used to reduce nonspecific binding. B_{\max} and K_D values of [³H]CP-55,940 and [³H]anandamide and were determined by PerkinElmer, Life and Analytical Sciences, Boston, USA and were in the range of values reported previously (Gertsch et al. 2008).

6.3.7 cAMP measurements

Human CB₁ and CB₂ receptor expressing CHO-K1 cells were stably-transfected cell lines obtained as a gift from Euroscreen S.A., Belgium. The cells were checked for receptor expression by immunostaining using adequate antibodies (ab3558 and ab3561, both from Abcam) in both Western blots and FACS. Cells were cultured in the presence of 500 µg/ml G418 (Gibco) in RPMI medium 1640 supplemented with 10% FCS and plated in 96-well plates at a density of 3×10^5 cells per ml and incubated over night. The antibodies were highly selective towards hCB₁ and hCB₂, respectively, but showed some non-specific binding to cells (10–35%). After aspirating the media, the cells were chilled for 10 min at room temperature in RPMI medium 1640 (w/o supplements) containing 500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine. Cells were then treated with different concentrations of test-compounds and incubated for 30 min at 37 °C in a total volume of 100 µl. After another 30 min of incubation at 37 °C with 20 µM forskolin, intracellular cAMP levels were detected by HitHunter for adherent cells EFC chemiluminescent detection assay (Amersham; catalog no. 90000302) according to the manufacturer's instructions and measured on a Microumat *Plus* Microplate Luminometer LB 96 V (EG&G Berthold). The high-affinity CB receptor ligand WIN55,212–2 was used as positive control.

6.3.8 Measurement of [Ca²⁺]_i

HL60 CB₂-positive cells (from ATCC; CCL-240) were grown as published previously (14) washed once, and cells (10^7 cells/ml) were incubated at 37 °C for 20 min in Hanks' balanced salt solution containing fluo3/AM in a final concentration of 4 µM and 0.15 mg/ml Pluronic F-127. The cells were then diluted 1:5 in Hanks' balanced salt solution containing 1% fetal bovine serum and incubated for 40 min at 37 °C. Afterwards, the cells were washed three times and resuspended in 500 µl of Ca²⁺-free HEPES-buffered saline, containing 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM glucose, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 1 g/liter bovine serum albumin, 10 mM HEPES, pH 7.4. Prior to each measurement, the cells were incubated for 7 min in a 37 °C water bath. In some experiments the cells were pretreated for 4 min with SR144528 (1 µM). The cells were subsequently stimulated with drugs (falcarinol, falcarindiol, SR144528) and vehicle controls and analyzed with the FL1 channel on a FACScan flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser (BD Biosciences). Because the solvent (ethanol) showed an effect on [Ca²⁺]_i in vehicle controls, this solvent effect was subtracted from each value.

6.3.9 HaCaT keratinocyte cell culture

HaCaT cells were cultured in calcium-free DMEM (Sigma, Switzerland), with 10% chelexed FBS (Sigma, Switzerland), 4 mM l-glutamine (Sigma, Switzerland), and supplemented with calcium chloride at 0.03 mM or 2.8 mM and 50 IU/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin final concentration. HaCaT cells maintained in this low calcium medium for 24 h prior to experiments showed an improved response to TNF-alpha stimulation and did not require addition of trypsin inhibitor for the cells to re-attach after EDTA–trypsin treatment. FBS was calcium-depleted by incubation with Chelex 100 resin (BioRad # 142–2832) for 1 h at 4 °C according to the BioRad protocol. The Chelex was subsequently removed using a 50 mL Millipore 0.22 µm filter unit system.

6.3.10 Quantifications of chemokines IL-8 and CCL2/MCP-1

For quantification of IL-8 in cell culture medium, 96-well enzyme immunoassay plates (Nunc, Rochester, NY) were coated with 0.5 µg/ml of capture antibody (mAb 208, R&D Systems) for 24 h at room temperature. The plates were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (wash buffer) to remove unbound antibodies. Plates were then blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin, 5% sucrose, and 0.05% sodium azide for 2 h at room temperature. This was followed by the addition of 10–100 µl of culture medium or tissue extract per well in a total final volume of 100 µl and incubation at room temperature for 2.5 h. Recombinant IL-8 (R&D Systems) was used as standard. After multiple washes with wash buffer, the plates were incubated with biotinylated anti-human IL-8 antibody (BAF 208, R&D Systems) at 100 ng/ml for 2 h at room temperature. Plates were washed with wash buffer and 100 µl of diluted peroxidase-conjugated streptavidin (1:4000; Zymed Laboratories, San Francisco, CA) was aliquoted per well and incubated for 30 min at room temperature. The plates were then washed with wash buffer and incubated with 100 µl per well of substrate consisting of a 1:1 mixture of peroxidase solution and tetramethyl benzidine substrate (KPL, Gaithersburg, MD) for 15 min at room temperature. The enzymatic activity was stopped with 5 N sulfuric acid and optical density determined at 450 nm in a microplate reader. The IL-8 ELISA was linear from 60 to 2000 pg/ml. Human monocyte chemokine attractant protein 1 (CCL2/MCP-1) was quantified with a commercial ELISA kit (Bender MedSystems), according to manufacturers instructions. Quantification range was linear between 20 and 500 pg/ml.

6.3.11 Skin prick tests

The procedure was explained to the healthy volunteers participating in the prick test. Prior informed consent from volunteers was obtained according to ethical guidelines. The volunteer was symptom free and was not taking medications. The skin of the ventral forearm was clean and free of active eczema. A grid was marked with a pen at 2 cm intervals and a drop of the relevant test compound or histamine was placed on the arm at the end of each line. In our experiments, 0.5 mg of compound dissolved in ethanol (50 μ l volume) were applied to the skin and left to dry for 5 min. Depending on the experiment, 50 μ g of histamine was added. A lancet with 1 mm point was used to prick the skin through the drop. The lancet was wiped with a gauze between each prick, in order to prevent carry-over of substances. Formation of weals (oedema) typically occurred within 10–15 min after which the results were assessed by measuring the diameters (if not round most distant points were measured). A skin reaction of 3 mm was interpreted as positive response (erythema and wheal with pseudopodia). As a negative control solution ethanol (puriss, analytical grade) was used. The positive control solution was a histamine hydrochloride solution (Sigma Aldrich, Switzerland). In the combination tests, compounds were applied 5–10 min prior to application of histamine. The test was carried out by medical staff based on the approved study protocol.

6.3.12 Statistical analysis

Results are expressed as mean values \pm SD or SEM (depending on experiment) for each examined group. Statistical significance of differences between groups was determined by the Student's *t*-test (paired *t*-test) with GraphPad Prism software. Outliners in a series of identical experiments were determined by Grubb's test (ESD method) with α set to 0.05. Statistical differences between treated and vehicle control groups were determined by Student's *t*-test for dependent samples. Differences between the analyzed samples were considered as significant if $p \leq 0.05$.

BIBLIOGRAFIA (Capitolo 6)

Alimirah F., Chen J., Basrawala Z., Xin H., Choubey D., (2006). DU-145 and PC₃ human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett.* vol. 580 No. 9; pp. 2294–2300.

Baldwin MA., (1995). Modern mass spectrometry in biorganic analysis. *Natural Product Reports* vol.11; pp. 33-34.

Breitman TS., Collins BK., (1980). Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *Exp. Cell Res.* vol. 126 No.2; pp. 494–498

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.

Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* vol. 127 No.1; pp. 1–8.

Charafe-Jauffret E.; Ginestier C., Monville F., Finetti P., Adelaide J., Cervera N., Fekairi S., Xerri L., Jacquemier J., Birnbaum D., Bertucci F., (2006). Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* vol. 25 No. 15; pp. 2273–2284.

Carosi G., Castelli F., Di Nola F., (2000). *Manuale di Malattie Infettive e Tropicali*. Piccin Nuova Libreria S.p.A. Padova.

Coll JC., Bowden BF., (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products* vol. 49; pp. 934-936.

DermNet NZ. (2006). "Herpes simplex". New Zealand Dermatological Society. 2006-09-16 . <http://www.dermnetnz.org/viral/herpes-simplex.html> . Retrieved 2006-10-15.

Gallagher R., Collins S., Trujillo J., McCredie K., Ahearn M., Tsai S., Metzgar R., Aulakh G., Ting R., Ruscetti F., Gallo R., (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* vol. 54 No. 3; pp. 713-733.

Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen JZ., Xie XQ., (2008). Beta-Caryophyllene is a Dietary Cannabinoid. *Proc. Nat. Acad. Sci .USA* vol. 105; pp. 9099–9104.

Gioia B., Stradi R., Rossi E.:(1987). Guida al corso di Metodi fisici in chimica organica, Vol. II Massa.

Glodek D., Cass Ph., (1990). A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement. Michigan Cancer Foundation, Detroit ; pp. 68.

Gupta R., Warren T., Wald A., (2007). Genital herpes. *Lancet* vol. 370 No. 9605; pp. 2127–2137
Macville M., Schröck E., Padilla-Nash H.,(1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping .*Cancer Res.*vol. 59 No. 1; pp. 141–150.

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 2^a ediz., Pergamon Press.

Jaffè HH., Orchin M., (1962). Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, J. Wiley and Sons, Inc.

Kalinowsky HO., Berger S., Braun S., (1984). ¹³C-NMR Spektroskopie. Thieme, Stuttgart, New York; pp. 224-237.

Kitamura N., Semler B., Rothberg P., (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* vol. 291; pp. 547–553.

Koelle DM., Corey L., (2008). Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual Review of Medicine* vol. 59; pp. 381–395.

Kowalska T., (1996). Theory and mechanism of thin-layer chromatography. Marcel Dekker, Inc., New York; pp. 49-99.

Lacroix M., Toillon RA., Leclercq G., (2006). P₅₃ and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer* vol.13 No. 2; pp. 293–325

Lacroix M., Leclercq G., (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Research and Treatment* vol. 83 No. 3; pp. 249-289.

La Placca M., (2008). Principi di microbiologia medica. Edizioni Esculapio Bologna. p: 482-485; 490; 494-495; 505-506; 539-540.

Levenson AS, Jordan VC., (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* vol. 57 No.15; pp. 3071-3078.

Nyredy S., Dallenbach-Tölke K., Sticher O., (1988). The Prisma optimization system in planar chromatography, *Journal of Planar Chromatography* vol. 1; pp. 336-342.

Paul JR., (1971). A History of Poliomyelitis. (Yale studies in the history of science and medicine). New Haven, Conn: Yale University Press.

Pavia DL., Lampman GM., Kriz GS., (1994). Il laboratorio di Chimica Organica, ediz. Sorbona, Milano; pp. 593-640.

Pulukuri SM., Gondi CS., Lakka SS., (2005). RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator

receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J. Biol. Chem.* vol. 280 No. 43; pp. 36529–40.

Racaniello V., Baltimore D., (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proceedings of the National Academy Science USA* vol. 78 No.8; pp. 4887–4891.

Rahbari R., Sheahan T., Modes V., (2009). A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* vol. 46 No. 4; pp. 277–284.

Ratanachoo K., Gascoyne PR., Ruchirawat M., (2002). Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. *Biochim Biophys Acta* vol. 1564; No.2; pp. 449–458.

Ross DT., Perou CM., (2001). A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Diseases Markers* vol. 17 No. 2; pp. 99–109.

Ryan KJ, Ray CG., (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. McGraw Hill. pp.555–562.

Sanders JKM., Hunter BK., (1988). *Modern NMR spectroscopy: A guide for Chemists*, 2a ed., Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto.

Schneider U., Schwenk H, Bornkamm G., (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma". *Int J Cancer* vol. 19 No. 5; pp. 621–626.

Sharrer T., (2006). *HeLa Herself*. *The Scientist* vol. 20 No. 7.

Skloot R., (2010). *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. New York: Crown/Random House.

Smith V., (2002). *The Life, Death, and Life After Death of Henrietta Lacks, Unwitting Heroine of Modern Medical Science*. Baltimore City Paper. Retrieved .

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 .

Sugimoto K., Yamada K., Egashira M., Yazaki Y., Hirai H., Kikuchi A., Oshimi K., (1998). Temporal and spatial distribution of DNA topoisomerase II alters during proliferation, differentiation, and apoptosis in HL-60 cells. *Blood* vol. 91 No. 4; pp. 1407-1417.

Ugo R., (1972). *Analisi Chimica strumentale*, Editrice Scientifica L. G. Guadagni, Milano; pp. 236-302. 303-362. 593-631.

Van Valen LM., Maiorana VC., (1991). HeLa, a new microbial species. *Evolutionary Theory & Review* vol. 10; pp. 71–74.

Washington H., (1994). Henrietta Lacks: An Unsung Hero. *Emerge Magazine*.

Watts DW., (2010). HeLa Cancer Cells Killed Henrietta Lacks. Then They Made Her Immortal. *The Virginian-Pilot*; pp.1, 12–14.

Yang W., Terasaki T., Shiroki K., (1997). Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology* vol. 229 No. 2; pp. 421–428

www.wikipedia.com

Ministero della salute, Direzione Generale della Prevenzione - Ufficio III
cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0163.htm

PUBBLICAZIONE I

**The causal dependence of present plant knowledge on
herbals—Contemporary medicinal plant use in Campania
(Italy) compared to Matthioli (1568)**

Marco Leonti^{a,*}, Stefano Cabras^b, Caroline S. Weckerle^c, Maria Novella Solinas^a,
Laura Casu^a

a Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università di Cagliari, Facoltà di
Farmacia, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari (CA), Italy

b Dipartimento di Matematica e Informatica, Università di Cagliari, Via Ospedale 72,
09124 Cagliari (CA), Italy

c Institute of Systematic Botany, University of Zurich, Zollikerstrasse 107, CH-8008
Zurich, Switzerland

Abstract

Aim of the study: Plant use has been the subject of many codices, documents and books and still is the subject of many scientific articles, trivial books and brochures. These texts, both historical and recent, exert a strong influence on local plant use, a means of knowledge transmission in particular European studies neglect to consider. Therefore, we determine the causal influence of historical texts on present medicinal plant knowledge using the example of Matthioli (1568) and contemporary ethnobotanical literature from Campania.

Materials and methods: We used Bayesian statistical inference and in particular the Bayesian Additive Regression Trees (BART) model to determine the causal effect of Matthioli on contemporary medicinal plant use in Campania.

Results: The estimation of the average increment of finding a plant species mentioned for a certain use category caused by Matthioli is about 20%, conditionally on the available data. Matthioli's effect is not negligible and lies between 14 and 25% with a high probability.

Conclusions: Studies on contemporary medicinal plant use in Europe over the last two to three decades still include the knowledge of the texts from the Renaissance and the classical writers. To what extent the remaining 80% contain autochthonous knowledge is difficult to assess. Considering the long-lasting effect of Matthioli, more recent books, brochures and newspapers very likely also exerted an influence. As well, television and radio reports on the results of pharmacological and clinical studies and, more recently, the world wide web show an ever-increasing influence.

Keywords:

Causal inference, De Materia Medica, Pharmacognosy, Pharmacopoeia, Ethnobotany, History, Knowledge transmission, Statistical methods, Renaissance, Sardinia, Sicily.

Introduction

Historical background—ancient texts on materia medica

From the very beginning, plants have been studied using both, utilitarian and philosophical approaches. From the classical times onwards it is possible to track the evolution of these two points of view, which during their fertile moments converged, resulting in codices, herbals and advances in systematic botany (Arber, 1938). Philosophy and the observation of nature during the ancient Greek culture are regarded as the basis of botany and medicine in the western world (Arber, p.: 1; Mann, 1984, p.: 129). However, Greek medicine was heavily influenced by medicinal knowledge from Africa and Mesopotamia. Indeed, some of the earliest medicinal texts and writings devoted to knowledge about plants are of Sumerian and Egyptian origin (Mann, p.: 129; Johns, 1990, p.: 264). Sumerian clay tablets in cuneiform, probably written by Babylonian physicians or pharmacists (asu), contain descriptions of symptoms and recipes and are dated to the early second millennium BC (Geller and Cohen, 1995). Diseases were perceived as punishment by demons and therefore exorcism, divination and magic were the central weapon of Babylonian medicine (Schelenz, 1904, p.: 23; Mann, 1984, pp.: 20–53). In fact, another collection of tablets known as the “diagnostic handbook”, which lists symptoms of diseases from head to toe, is thought to have been used mainly by the incantation-priests (𒀭 ašipu; Geller and Cohen, 1995). Campbell Thompson (1949) published a dictionary about Assyrian botany wherein he attempts to identify the plant species discussed on a series of clay tablets from the Royal Library at Nineveh dealing with the virtues and uses of drugs. The colophon to the work was appended by order of Ashurbanipal himself (King of all, King of Assyria, ca. 685–627 BC) but unfortunately has survived only in fragments. The most interesting fact obtained from this colophon, according to Campbell Thompson, is that the monarch states that the dictionary of plants is compiled from at least four pre-existing works, titles of which are quoted. Moreover, Ashurbanipal complains about the lack of logical order and the improper explanations of the difficult [plant] names in these earlier works. The oldest Egyptian document containing a collection of recipes is the Ebers Papyrus, dated to the 16th century BC, and probably also presenting a transcription of several earlier texts (Mann, 1984, p.: 5). The German Egyptologist Georg Moritz Ebers (1837–1898) purchased the papyrus in Theben

around 1872 (Schelenz, 1904, p.: 34). According to Schelenz, the influence of the cultures of the Near East on the Ebers Papyrus is evident. More evidently, however, the Egyptian Materia Medica influenced the Greek (see below). According to Mann (1984, p.: 53) the only real achievement of pre-Greek societies were the hygienic thoughts of the Jews, while the medicines of early Egypt, Mesopotamia or Palestine were shake by gross superstition. The sanitary regulations of cleanliness such as the sterilization of utensils and the inspection of meat, as well as the measure of quarantine for infectious diseases were indie unique to the People of the Book (Preuss, 1911, p.: xvi). The emergence of scientific medicine in the West and its differentiation from supernaturalism and magical beliefs becomes apparent for the first time during the Age of Pericles (5th century BC; Mann, 1984, p.: 129) and in the work of Hippocrates (Johns, 1990, p.: 265). The collection of the Hippocratic writings (Corpus Hippocraticum) consists of about 70 distinct works and owes its origin to a number of physicians of the 5th century BC onwards, the most eminent of them being Hippocrates from Cos, who lived somewhereMbetween460and370BC (Madaus, 1938; Marzell, 1938; Cosmacini, 1997). Altogether these writings, which are acknowledged above all for having advanced the studies of clinical medicine, mention more than 200 medicinal plants, which, however, are not described very well botanically (Tschirch, 1910, p.: 539; Marzell, 1938, p.: 13). The first work that can be considered a herbal is *De Historia Plantarum* by Theophrastus of Eresos (372–297 BC; Tschirch, 1910, p.: 542; Mann, 1984, pp.: 92–97). Theophrastus describe 455 plants summarizing their medicinal properties, but is especially renowned for laying the basis of scientific and medical botany (Mann, p.: 96; Schelenz, 1904, p.: 118). The work that has determined the form of every modern pharmacopoeia as well as popular and scientific plant nomenclature is *De Materia Medica* by Pedanius Dioscorides (ca. 40–90 AD), a physician of the Roman Army. One of the earliest and most beautifully illustrated manuscript copies of Dioscorides' *De Materia Medica* is the Byzantine Juliana Anicia Codex (ca. 512 AD) now residing in the National Library of Vienna and originally prepared as a gift for the daughter of the West Roman Emperor Clavius Anicius Olybrius (Arber, 1938, pp.: 8–9; Riddle, 1985 p.: 181). Herbalists and physicians of all nations have drawn their inspiration and instructions from Dioscorides (Madaus, 1938; Mann, 1984, p.: 112; Riddle, 1985). In the preface to *De Materia Medica* Dioscorides criticizes the superficiality, the incompleteness and the wrong order of contemporary works (c.f. Berendes, 1902, pp.: 19–20). It is also in his work, that the Egyptian

influence on Greek medicine becomes obvious. *De Materia Medica* enumerates 80 plant-derived drugs as Egyptian in origin. Similarly, the use of fennel to soften clotted eyelids described in the Ebers Papyrus (Schelenz, 1904, pp.: 35–36) coincides with its use in *De Materia Medica* as an eye remedy (c.f. Berendes, 1902, Book 3, p.: 308, Chap. 74; Matthioli, 1568, Book 3, p.: 821, Chap. 76), while the use of *Artemisia* sp. against feverish diseases in the demotic papyrus from Fajjum (Westendorf, 1999, p.: 327) recalls its use against shivering (c.f. Berendes, 1902, Book 3, p.: 280, Chap. 26; Matthioli, 1568, Book 3, p.: 729, Chap. 26). Another Greek herbal comparable to that of Dioscorides and also extensively copied is *De simplicium medicamentorum facultatibus, libri XI* by Claudius Galenus (ca. 131–201 AD; Mann, 1984, pp.: 123–129). Thanks to the introduction of book printing in the 15th century, books became widely available, and apart from religious texts herbals soon became the bestselling books of their time (Madaus, 1938, p.: 52; Mann, 1984, p.: 182; Adams et al., 2009). Printed herbals appeared in the late 15th century triggering a new botanical science in Germany that spread via the art of printing to Italy and elsewhere (Mann, 1984, p.: 183; Johns, 1990, p.: 266). The manuscript of the *Antidotarium Nicolai*, written during the 12th century at the School of Salerno, was first printed in Venice by Nikolaus Jenson (1420–1480) in 1471. This manuscript is considered the first general dispensatory used as a guide for composed medicines (Goltz, 1976, p.: 11). The *Ricettario Fiorentino* of the city of Florence, printed in 1498, is generally regarded as the first official pharmacopoeia (Corradi, 1887). Opinions about which was the first herbal ever printed differs among authors. According to Arber (1938) it was printed around 1470 and is the *Liber de proprietatibus rerum* by Bartholomeus Anglicus, a monk who lived during the 13th century, while the first book to contain a woodcut illustration was “*Das puch der natur* “ (The Book of Nature) printed in Augsburg in 1475 (Arber, pp.: 13–14). According to Madaus (1938, p.: 52) the first printed herbal is the *Herbarium* of Apuleius Barbarus printed in Rome in 1483. Mann (1984, pp.: 92–93) reports that Theophrastus’ *De Historia Plantarum* was printed at Treviso in the same year. In the appendix, Arber provides an overview on the principal herbals published between 1470 and 1670, but without considering all re-editions and translations (c.f. Arber, 1938, pp.: 271–285). *De Materia Medica* was first printed in Latin in 1478 by Aldus Manutius (1449–1515, Venice) and in Greek in 1499 by the same typographer (Arber, p.: 272). The Italian botanists did pioneering work in the identification of the plants described by the classical authors, firstly because the revival

of classical culture started in Italy, and secondly because the Italian flora is related to that of Greece and to the other Mediterranean regions (Arber, p.: 92). Pietro Andrea Matthioli [Matthiolus], who was born in Siena in 1501 and died in Trieste in 1577, was the most renowned pharmacognosist and herbalist of the later Renaissance and one of the main commentators of Dioscorides' work (Schelenz, 1904, p.: 395; Arber, 1938, p.: 92). His chief work, *I Discorsi* (The Discourses), was translated into many languages and was printed in various editions and underwent several improvements. According to Osbaldeston (2000), Matthioli drew on the Byzantine Juliana Anicia Codex for his commentaries on *De Materia Medica*. Matthioli's *I Discorsi* was the most successful of all herbals and the earlier editions (until 1563) alone sold around 32,000 copies (Arber, 1938, p.: 94; Madaus, 1938, p.: 53; Marzell, 1938, p.: 25). The most recent re-edition of Dioscorides' *De Materia Medica* is that of Osbaldeston (2000). The opera by Pio Font Quer (1999) *El Dioscorides Renovado* (The Renovated Dioscorides) contains the plant species and taxa treated by Dioscorides and by the Castilian commentator Andrès Laguna (ca. 1511–1559), which on his turn was heavily influenced by Matthioli (c.f. Laguna, 1555). It is a popular scientific book edited for the first time in 1961 describing 678 medicinal species and with respect to *De Materia Medica* includes new entries such as *Digitalis* spp. So far *El Dioscorides Renovado* has sold over 25,000 copies. Also Nicholas Culpeper (1616–1654) adheres to Dioscorides in the work named after himself ("Culpeper's Complete Herbal"), while great parts of the text are translations of Dioscorides' *De Materia Medica*. The most recent edition of Culpeper's Herbal dates from 2007.

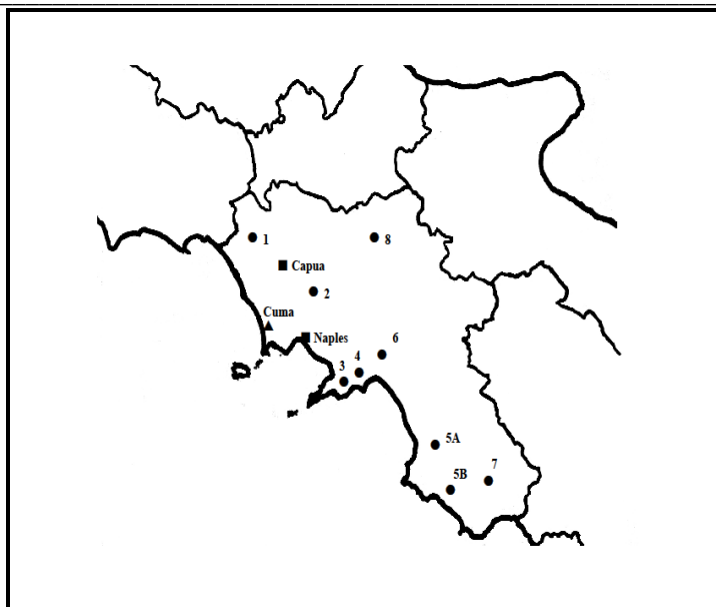


Fig. 1 Overview of the study sites of the eight Campanian articles on medicinal plant use.

1: Roccamonfina, Caserta (Antonone et al., 1988); **2:** Caserta, Caserta (De Feo et al., 1991); **3:** Peninsula Sorrentina, Napoli/Salerno (De Feo et al., 1992); **4:** Coast of Amalfi, Salerno (De Feo and Senatore, 1993); **5A:** Monte Vesole, Salerno, **5B:** Ascea, Salerno (Scherrer et al., 2005); **6:** Montecorvino Rovella, Salerno (De Natale and Pollio, 2007); **7:** National park of Cilento / Vallo di Diano, Salerno (La Palomenta and Grieco, 2008); **8:** Sannio area, Benevento (Guarino et al., 2008).

1.2. Research question

The above introduction shows the interrelatedness and mutual influence of historical written texts on medicinal plant use and that the very earliest writings testify to the importance of plants used in medicinal practices. The direct influence of written knowledge on local, so-called traditional and contemporary plant use, especially in Europe and the Mediterranean area remains, however, to be investigated. This topic has importance and implications for:

-
1. Understanding the importance of texts in “traditional” knowledge transmission and the evolution of medicinal plant use.
 2. Relevance of ethnobotanical studies in areas with a rich writing tradition especially in the context of ethnopharmacology, and natural product research.
 3. Strengthening the link between biosciences and traditional empirical knowledge (for a critical reflection see: Etkin, 2001).

A particular difficulty is that neither some isolated coincidences nor apparent strong correlations in plant use can prove the influence of or dependences on historical texts, as correlation does not necessarily imply causation unless we make the unsubstantiated assumption that no other influential effects occurred. Recently we reported on the influence of derivatives of Dioscorides' *De Materia Medica* on contemporary medicinal plant use in Sicily and Sardinia (Leonti et al., 2009). We concluded that *De Materia Medica* has shaped and harmonized modern plant use to a large extent in the area under investigation and hypothesized that written sources have influenced other parts of the Mediterranean more profoundly than generally acknowledged. The influence of written sources on local plant knowledge in other parts of the world has also been discussed, e.g. Central America and China (Zolla, 1980; Weckerle et al., 2009). Mann (1984) has already stressed that many plants contained in ancient herbals are components of contemporary western pharmacopoeias and Johns (1990, p.: 264) states that “Written records of oral medical traditions did not begin with modern ethnobotanical studies”. Through writing many medical traditions have been codified and thereby facilitated the progress in understanding diseases and remedies (Johns, 1990, p.: 264). Also, pharmacognostic textbooks generally include historical studies (pharmacohistoria) and acknowledge the importance of written sources for the understanding of contemporary plant use (e.g. Tschirch, 1910; Heinrich et al., 2004). Our conclusion is therefore nothing fundamentally new and others have written to this effect before (e.g.: Arber, 1938, p.: 270; Osbaldeston, 2000, p.: 7). This knowledge, however, has only scarcely influenced ethnobotanical studies, surprisingly not even those searching for a common cultural heritage (e.g. for the Mediterranean area González-Tejero et al., 2008; Leporatti and Ghedira, 2009). Therefore, we expanded the geographical range of our investigations in Italy and focus on Campania along with Sardinia and Sicily. In the present study we ask the question: Is it possible to determine

a causal influence of historical texts on present medicinal plant knowledge? Considering the total flora of the area under investigation, eight recent ethnobotanical publications, and Matthioli's (1568) *I Discorsi*, we use causal inferential statistics to answer the posed question. Furthermore, we compare historical and recent plant uses, discuss the role of the “meaning response” and with the example of *Allium sativum* L., we highlight how contemporary knowledge enters so-called “traditional plant knowledge”.

1.3. Campania—abstract of the cultural history

Naples is the capital city of Campania, a region of southern Italy. Campania is about half the size of Sardinia or Sicily with about six million inhabitants. The Greek began the colonization of southern Italy and Sicily in the 8th century BC. Cuma, the first Hellenistic colony of Magna Graecia founded around 750 BC northwest from today's Naples, has remained the most distant from the Greek heartland (Fig. 1; Palmer, 1977, p.: 61). Cumae soon dominated the region of Campania succeeding the domination of the Oscians that were a group of Oscan-speaking tribes (Italic dialect) including the Samnites and the Sabelli (Bérard, 1963, p.: 60; Palmer, 1977, pp.: 7–15). Around 600 BC, the Etruscans founded Capua northeast from Cuma and in 524 BC tried to conquer Cuma (Bérard, 1963, p.: 60). But from the mid 5th century BC onwards, Osco-Samnite populations from the Apennine highlands began to invade the lowlands of Campania, driving out the Etruscans and finally, in 421 BC, Cuma as well as Capua fell into their hands (Bérard, 1963, p.: 70; Saitta, 1967, p.: 127). In 354 BC Rome formed an alliance with the powerful federation of the Samnites and in 348 BC renewed the treaty with Carthage (Saitta, 1967, p.: 124). The alliance with the Samnites was broken when in 343 BC Rome conceded military assistance to Capua against the Samnite authority (Saitta, 1967, p.: 127). The resulting Samnite wars opened up the way for the Roman conquest of southern Italy (Saitta, 1967, pp.: 121–148). Similarly, the first Punic War (264–241 BC) was provoked when Rome lent military assistance to Messina (Sicily), and thereby violated the treaty with Carthage (Saitta, 1967, p.: 150). Initially, the Republic of Rome expanded slowly, but after the first Punic War that brought Sardinia as well as Sicily under Roman control, there was no holding back. During the rule of Trajan (53–117 AD), the Roman Empire grew to its greatest extent (5,400,000 km²), stretching from Lusitania (Portugal) in the west to Mesopotamia (today Iraq) and Armenia (today Azerbaijan) in the east and from Britannia (Britain) in the north to the

African coast in the south, comprising essentially the whole Mediterranean area (Kovaliov, 1955; Saitta, 1967, p.: 340). Vast cultural Exchange occurred during this period and the influence of the Roman Empire lasts on to the present day in science, philosophy, religion, law, architecture, and – the key for cultural exchange – language. It is proposed that Latin emerged as an amalgamation of two Indo- European languages, which arrived in the region known today as Lazio (Latium) at around 1000 BC and which originated from Central Europe (Palmer, 1977, p.: 49). During its evolution proto-Latin incorporated and interchanged with the Italic dialects, Etruscan and indirectly with Greek, mediated by the Etruscs (Palmer, 1977, pp.: 7–68). The fact that southern Italy from the 6th century BC until the 6th century AD was Greek in language and character, enabled the transition and flow of medicinal knowledge from Magna Graecia and conditioned the foundation of the School of Salerno in the 9th century (Mann, 1984, p.: 100). In 1710, about 2000 years after the beginning of the Roman Conquest, archaeological excavations started at Herculaneum in the Vesuvius area (Borgognino, 2006). During the devastating eruption of Mount Vesuvius in 79 AD, Pompeii and Herculaneum were destroyed and Pliny the Elder (23–79 AD), author of the encyclopaedia *Historia Naturalis* died. The carbonized vegetables and fruits found at Herculaneum were instantly considered precious curiosities (Borgognino, 2006). Apart from crops and fruits, including exotics like *Cocos nucifera* L., *Phoenix dactylifera* L. (both *Arecaceae*), and *Piper nigrum* L. (*Piperaceae*), carbonized artefacts from a considerable part of the natural and weedy flora of Pompeii and Herculaneum were found (Borgognino, 2006, pp.: 173 ff). Amongst the archaeobotanical artefacts many belong to plants that are considered medicinal and that were already described in Dioscorides' *De Materia Medica* such as: *Artemisia absinthium* L. (*Asteraceae*), *Hypericum perforatum* L. (*Clusiaceae*), *Marrubium vulgare* L. (*Lamiaceae*), *Papaver somniferum* L. (*Papaveraceae*) and *Sambucus nigra* L. (*Caprifoliaceae*). Archaeobotanical findings like these impart a physical component to historical texts, providing solid evidence of the historic presence of the describe species.

1.4. Common cultural background and early ethnobotany in Europe

Today, Europe is considered a multicultural melting pot and the languages spoken, with the exceptions of Basque, Hungarian and the Saamic languages, belong to the

Indo-European language stock (Cavalli-Sforza, 1996; IWGIA, 2001). By comparing a gene map with radiocarbon data of the earliest cereal records in Europe, Cavalli-Sforza et al. provide evidence that the character of the neolithization process in Europe was more demic than cultural (1996, pp.: 118). This means that the agricultural practices spread through migration triggered by the growth of a population, which upon successful colonization of new areas, migrated again and expanded in successive waves (p.: 126). Also, recurring elements and motives from European myths and folk beliefs evidenced its derivation from a common archaic substrate and pointing towards a shared cultural heritage of European peoples (Ginzburg, 1990). During the neolithization process the landscape of Europe was altered in a similar way by the introduction of agricultural practices, which created new ecological niches. Together with the contaminated seeds of agricultural crops, new weedy species invaded Europe over a vast area, occupying these anthropogenic ecological niches and thereby forming new plant associations (Zohary, 1973; Harlan, 1992). Weedy species are generally high in secondary metabolites and their selection for food and medicine promoted the evolution of the modern pharmacopoeias (Stepp and Moerman, 2001; Leonti et al., 2006). The earliest written work handed down to us that contains an ethnobotanical survey, and which captures the outcome of the above scenario, is Dioscorides' *De Materia Medica*. Dioscorides wrote his five books some time around 50–70 AD during the rule of Trajan, just when the Roman Empire was about to achieve its widest horizons (Riddle, 1985, p.: xvii). This conditioned Dioscorides to compile information for a large audience and from a wide geographical area including great parts of Europe, the Near East and Africa. Apart from its quality and comprehensiveness, *De Materia Medica* appealed to a wide audience because it mentions easily recognizable species with a wide geographical distribution, including cultivated species such as fruit trees, crops and vegetables as well as agricultural weeds and wild vegetables.

Methodology

2.1. Total flora

The total flora of the region of Campania was assessed based on the checklist of the Italian vascular flora (Conti et al., 2005). From the update of the checklist (Conti et al.,

2006) table 5 was not used because it excludes cultivated and ornamental species introduced to these regions millennia ago. The total flora of Campania was compared with the revised floras of Sardinia and Sicily (c.f. Leonti et al., 2009). Plant families follow the Angiosperm Phylogeny Website (Stevens, 2001 onwards).

2.2. Medicinal flora

We compared the medicinal plants of Campania with the precise medicinal plant lists of Sicily and Sardinia (Leonti et al., 2009) and crosschecked the species used in all three medicinal floras with their presence in Matthioli's (1568) *I Discorsi*. The medicinal plants of Campania were compiled based on eight ethnobotanical studies published by Antonone et al. (1988) Nr. 1 on map, De Feo et al. (1991) Nr. 2 on map, DeFeo et al. (1992) Nr. 3 on map, DeFeo and Senatore (1993) Nr. 4 on map, Scherrer et al. (2005) Nr. 5 on map, De Natale and Pollio (2007) Nr. 6 on map, La Palomenta and Grieco (2008) Nr. 7 on map and Guarino et al. (2008) Nr. 8 on map (Fig. 1). The uses reported in the eight studies and in Matthioli's (1568) *I Discorsi* were arranged into eleven symptom- and organ-defined use categories. The sensory organs of the head (eye, ear, and nose) were treated as separate use categories according to Matthioli (1568) and Preuss (1911, pp.: 300–341), while toothache was included together with neuropathies in one category (“NERV”) comprising the peripheral as well as the central nervous system (c.f. legend to Table 1). For the species mentioned in at least six of the eight ethnobotanical studies, the use categories were compared with the uses described in Matthioli including his commentaries (Table 1). For our analysis we excluded uses related to cultural syndromes such as magic as well as uses as antidotes (Matthioli), and those not or only rarely conceived by Matthioli (1568) like diabetes and heart problems. As in our previous study, we ignored the quantitative approaches of later works in order to facilitate the analysis. To analyse the citation frequency of species in the recent literature vs. Matthioli we counted for each publication in how many different use categories a species was mentioned (use citations) and totalled these values (Fig. 5). To analyse the importance of the use categories the number of different species mentioned for a given use category was counted for each publication (species citations) and totalled (Fig. 6). While in our last study we used Berendes (1902) as a basis for our analysis and comparison, here we use Matthioli's translation and commentaries on Dioscorides' *De Materia Medica* from 1568. This appears more pertinent to the research question since Matthioli's work was the pharmaceutical text

of reference until the 18th century in Italy (Cosmacini, 1997). It was first published in 1544 in five volumes (books 5 and 6 came in one volume). The six books from 1568 are amply illustrated with artistically impeccable iconographies. Books 1–5 contain a fairly detailed comment by Matthioli himself for almost all plants, as well as the literal translation of Dioscorides, and optional remarks and notes from other authors such as Theophrastus, Pliny the Elder, Galen and Avicenna (ca. 890–1037 AD). Moreover, Matthioli's commentaries display alleged errors committed by different translators or commentators including Jean Ruel [Ruellio] (ca. 1479–1537), Otto Brunfels [Brunfelsio] (1488–1534), Hieronymus Bock [Tragus] (1498–1554), Leonhard Fuchs [Fuchsio] (1501–1566), Adam Lonitzer [Lonicerus] (1528–1586) and others. Book 6 contains a list of the organ- and symptom-defined ailments in alphabetical order with the corresponding drugs. Matthioli's text is somewhat challenging because it is written using an old Italian and Tuscan vocabulary. However, thanks to the key in the sixth book one can, for example, find out that *schierantia* corresponds to angina and that *pontia* means pleuritis. Due to the precise iconography and the popular plant names, the identification of the discussed plants was not problematic. However, Matthioli and Berendes (and the references therein) do not agree in all cases concerning plant identification. The presumable introduction of *Borago officinalis* L. by Matthioli and the plant's absence in Berendes (1902) was discussed before (Leonti et al., 2009). Further problems concerning plant identification are evident with *Hypericum crispum* L., *Hypericum perforatum* L., *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum coris* L. (Hyperikon, Askryon, Androsaimon and Koris; Matthioli, 1568, Book 3, Chap. 165-168; Berendes, 1902, Book 3, Chap. 161–164) as well as with *Matricaria chamomilla* L., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. and *Anthemis* spp. (*Anthemis* and *Parthenion*; Matthioli, 1568, Book 3, Chap. 148–149; Berendes, 1902, Book 3, Chap. 144–145).

2.3. Statistics

We used a statistical analysis, suitable for non experimental settings in order to test the hypothesis of the causal effects of Matthioli (1568) upon contemporary Campanian data on medicinal plant use. The statistical analysis is based on data for n (27) plants and m (11) use categories. Matthioli's indications have been arranged in a table (X), with n by m cells, where the cell's value is 1 if Matthioli recommended that plant for that use, otherwise it is 0. The data extracted from 8 ethnobotanical studies were

arranged accordingly in another table (Y, with n rows and m columns), where each cell counts the number of times that a certain plant has been mentioned for a certain use category. The cell's minimum value in table Y is 0 while its maximum value is 8. Y represents the outcome, in terms of frequency of mentioned uses that we have to analyze, in order to determine the causal effect of Matthioli's recommendations. The problem formulated in this paper requires the estimation of the causal effect of Matthioli on folk knowledge gathered during the past 20 years. That is, we want to estimate the causal effect of X on Y. The first principle of causal statistical inference is: "Correlation is not causation", meaning that whatever correlation we observe between X and Y it does not necessarily describe a causal effect, unless we assume that there are no other influential variables that determined the outcome Y. Because such an assumption is not reasonable, as over the centuries other causes beside Matthioli have very probably influenced the uses of the plants, we cannot apply a regression model to estimate the causal effect of X. We statistically define the causal effect as the following expected value: $\tau = \mathbf{E}(Y(X=1) - Y(X=0))$, where **E** denotes the expectation (mean) under the unknown probability distribution of (X,Y). $Y(X=1)$ describes the outcome when Matthioli indicated the use and $Y(X=0)$ is the outcome when Matthioli did not mention its use. This implies that for each plant/use category either $Y(X=0)$ or $Y(X=1)$ is observable but not both. Therefore, we should treat one of the outcomes as the factual outcome (the observed one) and the other as the counterfactual outcome (not observable). Our main contribution to this inferential problem is to implement Bayesian inference (Lee, 2009) to estimate the counterfactual Y. The statistical model estimates the outcome we would have observed if Matthioli had indicated the contrary to what he really did. We found the Bayesian Additive Regression Trees (BART) proposed by Chipman et al. (2006, 2007) very useful for this purpose. Further details on the specific use of BART for causal inference can be found in Hill and McCulloch (2008). In particular we estimated the counterfactual response Y in a certain cell (use/plant) based on:

- (a) the number of times that Matthioli indicated that plant;
- (b) the number of times that the plant has been reported in the eight studies;
- (c) the number of times that Matthioli indicated that use;

(d) the number of times that the use has been reported in the eight studies.

The causal effect for the coincidence of rare uses and less widely utilized species is particularly high. That is, ϵ is maximal if, for instance, Matthioli indicated only one plant for a certain exclusive use and the same has been observed in the outcome Y. With the Bayesian approach we do not produce a point estimation of the counterfactual outcome, but we rather obtain the probability distribution of the counterfactual outcome conditioned on all available data (X,Y), indicated with $Pr(\epsilon|Data)$. Such a probability distribution allows us to calculate the probability of the causal effect. As ϵ measures the increase in the probability of finding a plant mentioned for a certain use category if Matthioli indicated it, we conclude that if $Pr(\epsilon > 0 | Data) > 0.99$ then Matthioli influenced the contemporary uses with a probability greater than 99%. The amount of ϵ can be estimated via its mean $E(\epsilon | Data)$. The effect ϵ can refer to specific cells or to all data comprehensively. It is an overall measure of influence and is obtained as the mean of all effects for all plants and all uses. Table 1 and Figs. 5–7 contain the data for the 27 species and folk taxa used for the statistical analysis.

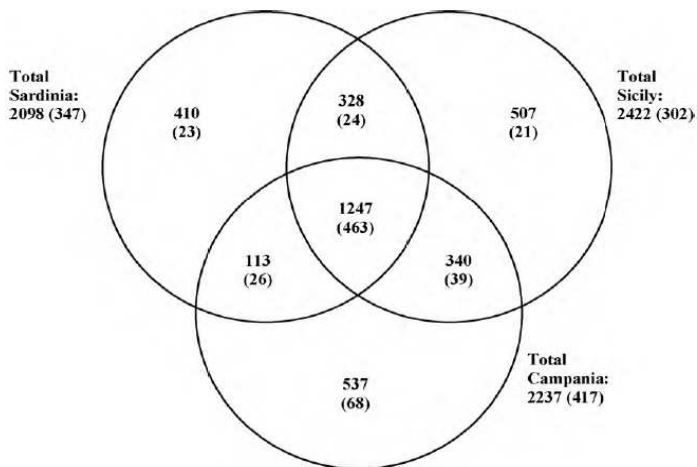


Fig. 2 Total number of species of the flora of Campania, Sardinia and Sicily (3482 spp.) and their distribution (including old world crop species and ornamentals). In brackets the number of plant species, which are used medicinally in at least one of the regions

Results

3.1. Total flora and medicinal flora

We counted 2237 species for the region of Campania including 50 pteridophyta and 10 gymnospermae. All together, Campania, Sardinia and Sicily host 3482 plant species, with 1247 of them occurring in all three regions. Considering the distribution of the species, the flora of Campania and the flora of Sardinia have more in common with the flora of Sicily than with each other (Fig. 2). However, considering the distribution of the medicinal flora, Sardinia and Campania have more in common with each other than with the medicinal flora of Sicily (Fig. 3). Further analysis is needed to find out the reason for this distribution. We use this occasion for a corrigendum to Leonti et al. (2009) where among the endemic medicinal species of Sardinia, *Polygala sardoa* Chodat (Polygalaceae) and *Thymus herba-barona* Loisel. (Lamiaceae) should also be included (c.f. Conti et al., 2005). For Campania we counted 417 medicinal species excluding neophytes but including old world crop species. The higher number of medicinal plants reported in Campania with respect to Sicily and Sardinia is due to the extensive study by Guarino et al. (2008) and to the greater homogeneity of the data from Sicily and Sardinia. The total medicinal flora of Campania, Sardinia and Sicily together comprises 664 medicinal species, and while 463 of them occur in all three regions only 120 are used in all three regions (Figs. 2 and 3; c.f. Leonti et al., 2009).

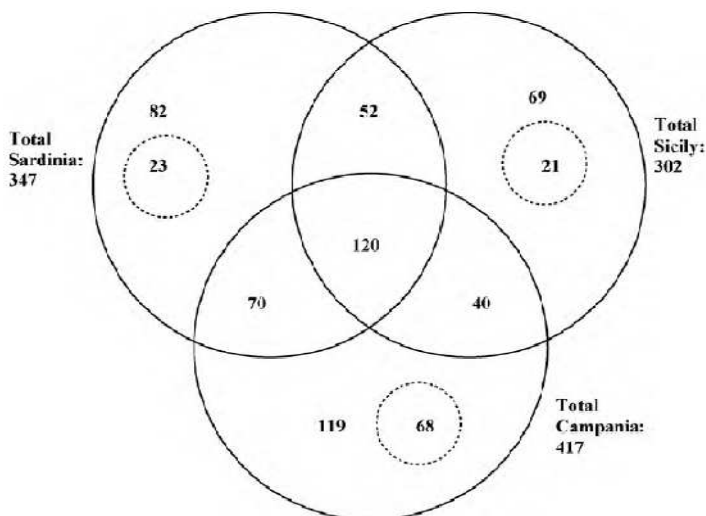


Fig. 3 Medicinal plant species used in Campania, Sardinia and Sicily and their overlap, based on the ethnobotanical publications of the regions. Dotted circles indicate the number of medicinal species not occurring in the other two floras. Dotted circles indicate the number of medicinal species not occurring in the other two floras.

For this census, closely related species were treated separately, and folk taxa were not considered (e.g. Rue, comprising *Ruta graveolens* L. and *Ruta chalepensis* L., Rutaceae). All of these 120 commonly used species, except *Ajuga iva* L. (Lamiaceae), *Centaurea calcitrapa* L. (Asteraceae), *Cerintho major* L. (Boraginaceae) and *Reseda lutea* L. (Resedaceae) were identified unambiguously in Matthioli (1568; Table 2, supplementary data) while *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter s.l. (Asteraceae) is used as a substitute for *Inula helenium* L. In Campania, with respect to the number of publications, these 120 medicinal species are the most important with an average of about three citations, while the least important in terms of the number of citations are those neither used in Sicily nor in Sardinia (Fig. 4).

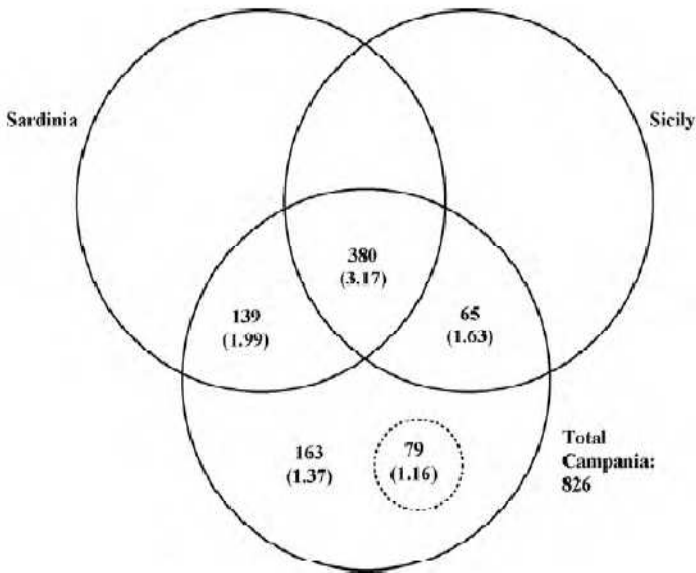


Fig. 4 Citations of plants in publications on recent medicinal plant use in Campania. In brackets average number of citations per species.

From the 1247 species common to Campania, Sardinia and Sicily, 463 are medicinal (every 2.7th species) in at least one of the three regions (Fig. 2).

3.2. Statistical analysis

Using the Bayesian statistical model for causal inference we estimated the average increment of the probability of finding a plant mentioned for a certain use category indicated before by Matthioli to be 19.7% (Fig. 8). This increment describes the mean value, which is bordered by a 95% credible interval ranging from 14 to 25.5%. In other words, one in five plant uses found in contemporary ethnobotanical literature of Campania stems from Matthioli (with a 95% credible interval ranging from every 7th to every 4th).

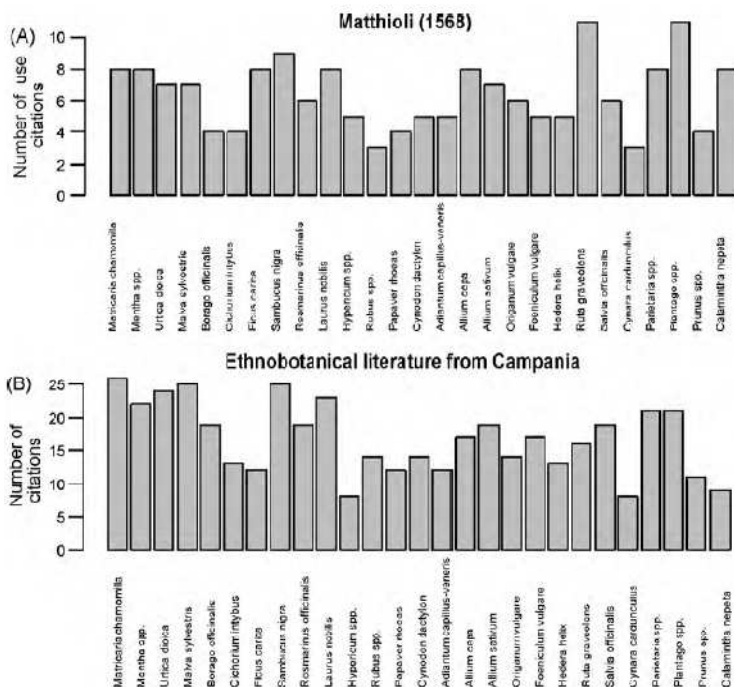


Fig. 5 Number of use citations of the 27 most often documented taxa. (A) Number of use citations per species in Matthioli (1568); (B) Number of use citations per species in the surveyed literature from Campania.

We also evaluated Matthioli's influence on each taxon and use category (Figs. 9 and 10). The corresponding posterior distribution, such as that shown in Fig. 8, are reported by means of box plots (showing the median as well as the 50 and 95% credible intervals) in Figs. 9 and 10. Matthioli exerted great influence on the indications for *Allium sativum* L. (ca. one in two uses due to Matthioli; Fig. 9) or *Ficus carica* L. (one in two uses due to Matthioli; Fig. 9) as well as on the taxa indicated for the category "NOSE" (Fig. 10). By comparing Figs. 9 and 10 we can see that Matthioli above all conditioned the uses of the plants and not the plants used for a use category. Since Matthioli recommended *Ruta* spp. as well as *Plantago* spp. for all use categories

we could not estimate the counterfactual outcome for these species (Fig. 9). However, their effect is included in the overall measure of influence (Fig. 8). *Matricaria chamomilla* is one of the most cited species in Campania (Fig. 5B), but less important with Matthioli (Fig. 5A). Fig. 6 shows that “NOSE” is a rarely mentioned use category in Matthioli (Fig. 6A) or in the Campanian literature (Fig. 6B). The number of species mentioned for gynaecological uses, however, is higher in Matthioli than in the Campanian literature. In Fig. 7 we related Matthioli’s recommendations and the observed frequency of plants and uses in the ethnobotanical literature of Campania and found a positive correlation. Furthermore, for the 27 most often mentioned taxa we can show a positive correlation between the number of use citations per taxa in the data from Campania and in Matthioli (Fig. 7A), as well as between the number of species citations per use category in the Campanian data and in Matthioli (Fig. 7B).

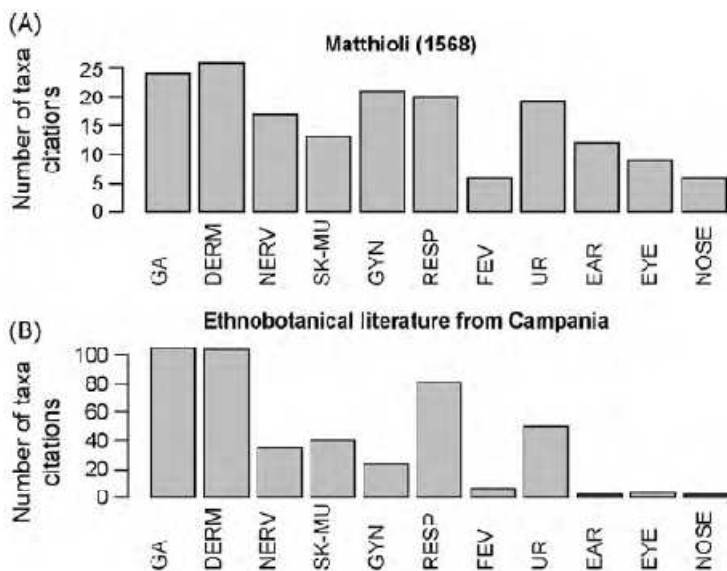


Fig. 6 Importance of use categories based on the 27 most frequently documented taxa. (A) Species citations per use category in Matthioli (1568); (B) Species citations per use category in the eight studies from Campania (for an explanation of the abbreviations see Table 1).

Discussion

4.1. Causal influence of Matthioli on present medicinal plant knowledge

The results suggest a causal correlation between Matthioli (1568) and current medicinal plant use in Campania and support our hypothesis that historical texts do have a strong influence on recent plant use. The data presented in Figs. 2–4 and in Table 2, supplementary data also confirm the positive correlation between widespread species and medicinal usage reported in Leonti et al. (2009). The quantified influence of Matthioli (1568), from the estimated statistical model, is roughly 20% on all plant uses (Fig. 8). This result does imply that the other 80% of influence stem from different sources and influences. To what extent these 80% contain autochthonous orally transmitted knowledge, new adaptations and accidental discoveries is difficult to assess. In agricultural societies the trial and error approach in the discovery of effective medicines has probably played an important role especially during devastating epidemics and after the appearance of new diseases. However at the time *De Materia Medica* was written it already contained a shared cultural heritage and the dissemination of its content again facilitated the conservation of this knowledge. Thus, texts exercise a static and conservative effect on the usage of medicinal plants. Considering the long-lasting effect of Matthioli, more recent herbal books (e.g. *Reader's Digest*, 1979), brochures, newspapers and commercials have very likely also exerted an influence. In addition, television and radio reports on the results of pharmacologic and clinical studies and, more recently, the world wide web have an ever-increasing influence. We highlight the influence of modern scientific findings on local plant use with the example of the cardiovascular uses of garlic in Section 4.4. In this analysis it is difficult to show large causal effects of Matthioli for several reasons. Firstly, we compare qualitative (Matthioli) with quantitative data (recent literature). Secondly, certain taxa are generally used for many different purposes (e.g. *Ruta spp.*), and likewise, for certain use categories, almost all species are indicated by Matthioli and in the contemporary data (e.g. gastrointestinal and dermatologic problems).

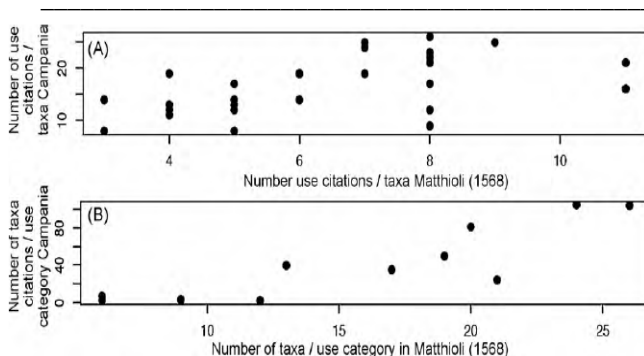


Fig. 7 Correlation for the 27 most often mentioned taxa between Matthioli's (1568) recommendations and the plant uses in the Campanian literature. (A) Correlation of then number of use citations per taxa; (B) Correlation of the number of species citations per use category.

Thirdly, the frequency of the use of a species and the importance of a use category may not exactly coincide with the indications of Matthioli due to parameters that are not possible to consider in this analysis, for example Fig. 7. the (change of the) general availability of a species or the (change in) importance of a use category. A complete dependence on the herbal of Matthioli (100% influence), would only be observable if all eight recent studies would report exactly the same use categories as Matthioli (1568) for each analyzed taxon. The more pronounced influence of Matthioli on how a taxon is used (Fig. 9) with respect to what taxa are used for a certain use category (Fig. 10) can be linked with the structure of the herbal itself, insofar as the chapters in Matthioli (1568) are organized by taxa and not by use.

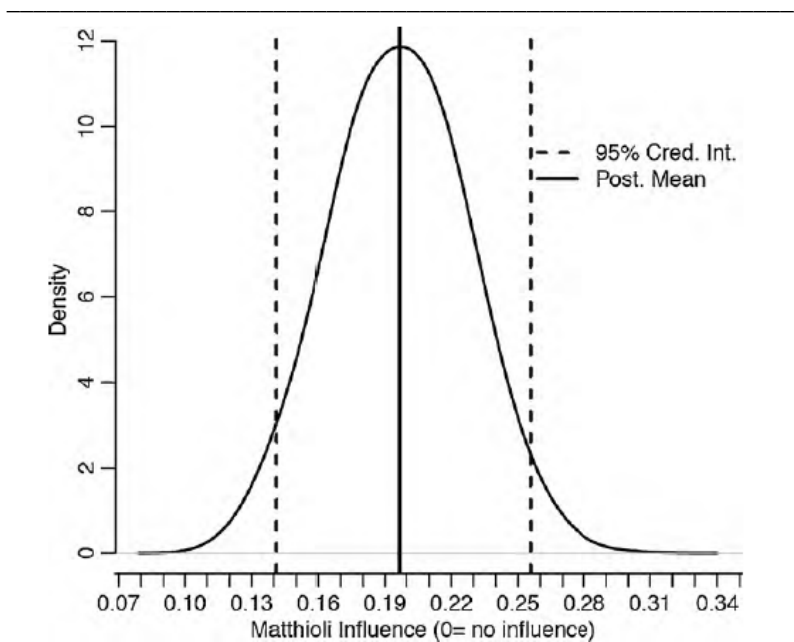


Fig. 8 Overall Matthioli effect. Posterior distribution of Matthioli's (1568) influence, along with its mean value and the 95% credible interval showing the average increment of the probability of finding a taxon mentioned for a certain use category indicated before by Matthioli.

Also, the use categories are influenced by more variables with respect to the taxa as there are more plants affecting the use categories than use categories affecting plants.

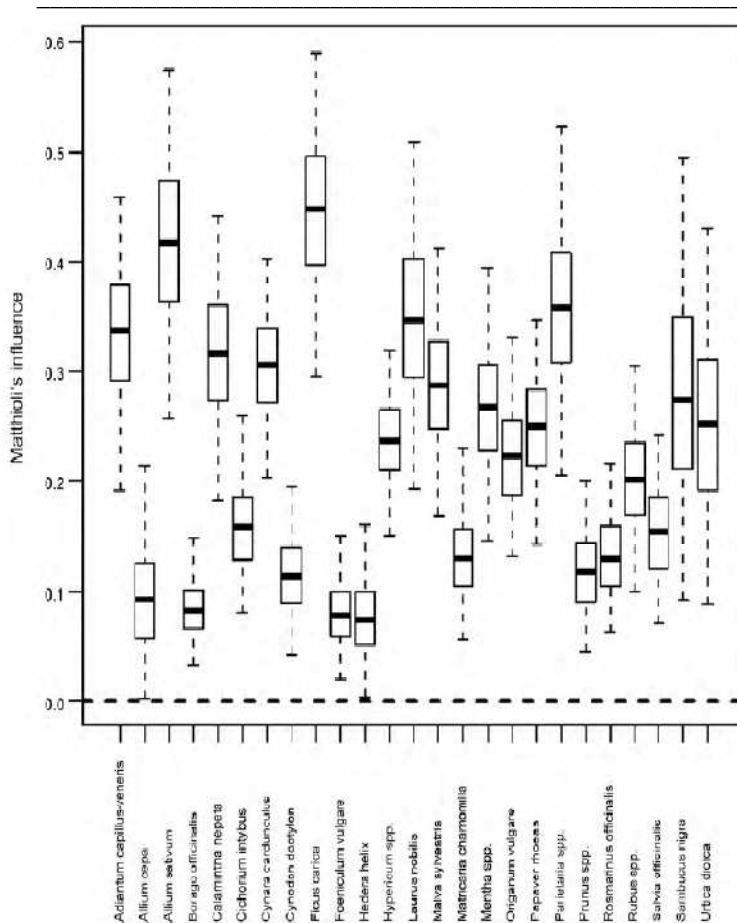


Fig. 9 Posterior distribution of Matthioli's influence for each taxon. Matthioli's influence on each taxon reported by means of box plots (indicating the median as well as the 50 and 95% credible intervals) showing the average increment of the probability of finding the taxa mentioned for a certain use category indicated before by Matthioli.

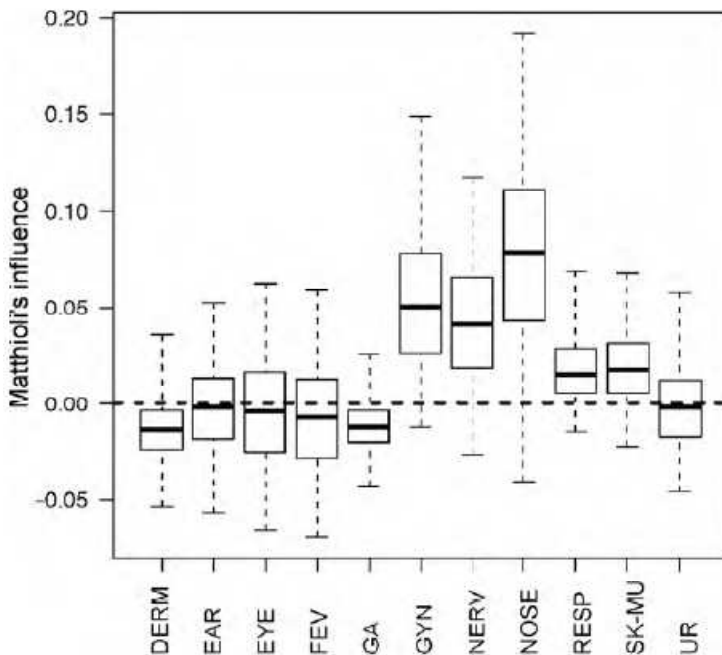


Fig. 10 Posterior distribution of Matthioli's influence λ for each use category (for an explanation of the abbreviations see Table 1). Matthioli's influence on each use category reported by means of box plots (indicating the median as well as the 50 and 95% credible intervals) showing the average increment of the probability of finding a use category mentioned for a certain taxon indicated before by Matthioli.

4.2. Plant uses in historical and recent literature

Matthioli's comments contain, apart from some repetitions and specifications, information not provided by Dioscorides (see Table 1). It can be assumed that this information derived from the knowledge and practice on the Italian peninsula in the 16th century. In this respect, the greater number of species claimed to be suitable to control respiratory ailments in the comments (nine additional species), compared to the translation of Dioscorides (eleven species), is remarkable and seems to reflect the need

for a more diverse therapeutic regime. Apparently, Matthioli noticed (consciously or unconsciously) the lack and filled the gap with the additional nine species. This is also reflected in the contemporary data on respiratory ailments, where 18 of a total of 22 species overlap with Matthioli (Table 1). A reason for the less frequent mentioning of plants suited to treat respiratory problems by Dioscorides might be due to the fact that he resided for the most of his life in more temperate regions, where respiratory disorders are perhaps generally less common. However, the relationship between low temperatures and the probability of contracting respiratory disorders is the matter of an ongoing debate (e.g. Eccles, 2002; Mäkinen et al., 2009). On the other hand it is not clear if influenza, a now common acute respiratory disease causing severe complications such as pneumonia, was already present in classic Fig. 10. time (Cartwright and Biddis, 1972, pp.: 147–149; Bray, 1996, pp.: 192–201). Based on the number of species mentioned, urological problems appear to have been more common in Dioscorides' time and setting (19 species vs. 14 species in contemporary literature; Table 1). This is a similar picture to that seen in the comparison of the uses of Sardinia and Sicily, where therapy for respiratory ailments were important in Sardinia and urological remedies very frequent in Sicily (c.f. Leonti et al., 2009). Based on a count of the species citations of the 27 most frequently documented species per use category, gastrointestinal and dermatological problems are the most frequent with 105 and 102 species citations or with about 22.5% each of all citations (Fig. 6B). Likewise Matthioli mentions the most species for these two categories, 24 for gastrointestinal and 25 for dermatological problems, respectively (Fig. 6A). The uses against “fever” in Matthioli are, with the exception for the indication of *Calamintha nepeta* (L.) Savi against shivering, in all cases against tertiary and quaternary fever, i.e. malaria, while the contemporary reports are less specific. In agreement with our previous findings (Leonti et al., 2009), plant uses related to women's diseases in the ethnobotanical studies in Campania are relatively scarce in relation to those mentioned in De Materia Medica. This might, however, reflect an artefact, as most of the recent studies have been conducted by male researchers (for a detailed discussion see Pfeiffer and Butz, 2005).

4.3. The most often mentioned species and the “meaning response

Among the contemporary data, *Allium sativum* L. (Liliaceae) and *Sambucus nigra* are both indicated for eight different use categories, while Matthioli indicates *Ruta* spp. for

eleven categories and additionally against spirits and enchantment and as an antidote against deadly poisons and serpents (Table 1). Besides the pharmacological activity, the concept of the “meaning response” or “placebo effect” may provide explanations for the broad use of these species, but also the substitution of certain plants (for details see Moerman, 2002). In short, a ceremony, organoleptic stimuli, or the skilful preparation of medicine by a respectful person in a certain social context may stimulate the self healing capacities of the patients’ body, with or without the intake of specific, pharmacologically active substances. Gubernatis (1882, pp.: 326–328) notes that rue (*Ruta spp.*) is held in high esteem by women, who attribute all sorts of magical power to it, and enumerates several rituals related to the use of this plant. Furthermore, he reports a saying from Otranto (Lecce) “La Ruta ogni male stuta” (Rue cures every suffering). It seems though, that rue is predestined to be used as a media in (magical) ceremonies and in medicine, probably because of its characteristic pungent and nauseating smell. More than its pharmacological properties, this is probably the main reason why so many different uses for this plant are reported in the literature (c.f. San Miguel, 2003; Pollio et al., 2008). An example for a substitution related to the meaning response and the doctrine of signature, are the medicinal uses of *Papaver rhoeas* L. The uses of this plant, which does not contain any opium alkaloids, seem to be influenced by the pharmacological properties of *Papaver somniferum* (cultivation of which is prohibited or strictly regulated in Europe) for which it appears to be used as a “mild” surrogate.

4.4. What is traditional?

As stated in the methods section, we did not include cardiovascular uses in the statistical analysis because they do not appear as a use category in Matthioli’s I Discorsi. In recent ethnobotanical studies, however, cardiovascular uses are often mentioned and garlic (*Allium sativum*) is the species with the most citations, which most probably reflects recently introduced knowledge. Garlic is said to be hypotensive (four times) and effective against high cholesterol levels (once). “The hypotensive effect of garlic is exploited by swallowing crushed cloves wrapped in bread crumbs or in water, or by introducing large quantities of this plant product into the diet. The essence contained in the bulb strengthens the cardiac rhythm, causes vasodilatation of the arteries and regulates the pulse; it is, therefore, a precious remedy for the treatment of hypertension and arteriosclerosis” (Guarino et al., 2008, p.: 281). Matthioli (1568,

Book 2, p.: 587, Chap. 141) does not contain any information that could be connected with such claims: the translation of Dioscorides mentions the anthelmintic and diuretic properties, the use as an antidote against snakebites and as a treatment for lice and bugs. Furthermore, Matthioli mentions the treatment of persistent cough, bruises, toothache, and various dermatological problems. A hipbath of the herb is said to promote the menses and to expel the placenta (c.f. Table 1). According to Madaus (1938, p.: 467) no other historical authority on *Materia medica* such as Hippocrates, Galen, Hildegard von Bingen (1098–1179), Paracelsus (1493–1541), or Lonicerus mentions uses related to cardiovascular problems. Neither Culpeper (1814) does make any reference to cardiovascular applications of garlic. This is because the cardiogenic and antiatherosclerotic properties of garlic have been discovered through pharmacological experiments and clinical studies in the early 20th century, by French, German and Russian scientists (Madaus, 1938, p.: 467). The earliest of the over 3000 articles indexed in Pubmed reporting garlic as a phytotherapeutic agent against hypertension, stems from Wittig and was written in 1955, while the first article reporting on the mechanism of action of garlic on the heart and on the blood vessels is from 1957 by Svechnikov, written in Russian. From the mid 1960s onwards, studies dealing with the hypertensive, blood cholesterol lowering, anti-atherosclerotic and cardio-protective effects of garlic begin to abound. The cardiovascular uses of garlic are biomedical in origin and entered so-called “traditional” medicinal plant use in Europe secondarily. Such data will eventually be surveyed by ethnobotanical field-studies and used to corroborate the validity of “traditional medicine”. This is, however, a wrong interpretation provoked by uncritical data assessment. Two things are important in this context and need to be considered when carrying out ethnobotanical studies in Europe. Firstly, it is very important to analyse and discuss the origin of the documented “traditional” knowledge. It might well be that it was not transmitted from generation to generation (which is usually implied by the term traditional), but entered the community recently, e.g. via printed media. Secondly, the term “traditional” is therefore often not appropriate to describe the documented knowledge (for a discussion of the misleading character of this term see also McClatchey, 2005). Rather, it is folk or popular plant knowledge, i.e. contemporary plant use, which is investigated, and which may or may not be traditional in nature.

Conclusions

Plant use has always been an everyday matter and therefore is a widely discussed and recorded topic. In the introduction we have delineated the general conditions that allowed for the development and the dissemination of a common cultural knowledge on material medica in Europe. Plant use continues to evolve as it is passed on between people and cultures orally and literally. Plant use has been the subject of many codices, documents and books and still is the focus of many scientific articles, trivial books and brochures as well as the subject of many controversies, conventions, treaties, laws and texts. These texts, both historical and recent, have a strong influence on local plant use. At the time *De Materia Medica* was written it already contained a shared cultural heritage and the dissemination of its content again facilitated the conservation of this knowledge. With the application of a suitable statistical method we provide evidence for the causal dependence of modern medicinal plant use in the region of Campania on the work of Matthioli (1568) and indirectly on *De Materia Medica* by Dioscorides, written in the first century AD. Based on this result we assume that studies on medicinal plant use in Europe from the last two to three decades still contain the knowledge of the texts from the Renaissance and the classic writers. Even stronger may be the influence of more recent books and media. As we have shown for garlic, biomedical knowledge easily intermingles with traditional plant knowledge. A more accurate term for the documented knowledge in recent studies may therefore be “contemporary plant use” instead of “traditional plant knowledge” and in any case, the knowledge sources need to be analysed carefully. We conclude that quantitative approaches are as essential for the understanding of the evolution of plant use as they are for the understanding of present plant use.

Acknowledgements

We express our gratitude to Dott. Giovanni Pilo, Dott. Riccardo Damasco, Giovanni Congia (Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università di Cagliari) Prof. Ettore Casu (Cagliari), Dr. Peter Taylor (Caracas) for language revision and thank Dania Grazi for her help with data input. This study was financially supported by a grant from the Ministero dell'Istruzione dell'Università e della

Ricerca (MIUR – progetto “rientro cervelli”) and the Swiss National Science Foundation (PMPD33-118635).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jep.2010.05.02](https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.02)

Plant species	Family	n° of publ.^a	Use cat. in ethnobot. publ. (N° of publ.)	Use cat. in Matth. De Mat. Med.	Use cat. in Matth. comm	Part used
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Asteraceae	8	GA (8) NERV (5) DERM (4) SK-MU (3) GYN (3) RESP (2) EAR (1)	GA, DERM, NERV, GYN, UR, EYE, FEV	RESP	Flowers
<i>Mentha aquatica</i> L. & <i>piperita</i> L. & <i>spicata</i> L. & <i>suaveolens</i> Ehrh.	Lamiaceae	8	GA (8) DERM (5) RESP (4) NERV (4) FEV (1)	GA, DERM, NERV, EAR, GYN	RESP, SK-MU, NOSE	Herb
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	8	DERM (7) SK-MU (6) UR (5) GA (3) NOSE (2) RESP (1) DIAB (2)	DERM, SK-MU, UR, GA, NOSE, RESP, GYN	-	Herb, root
<i>Malva sylvestris</i> L.	Malvaceae	8	RESP (8) DERM (7) GA (6) GYN (2) UR (2)	DERM, GA, GYN, UR	RESP, NERV, EAR	Herb, flowers,
<i>Borago officinalis</i> L.	Boraginaceae	8	GA (5) UR (5) DERM (4) RESP (3) NERV (1) SK-MU (1)	DERM, NERV, FEV	RESP CARD-VASC	Herb, flowers
<i>Cichorium intybus</i> L.	Asteraceae	7	GA (5) UR (3) DERM (3) FEV		-	Herb, root

			(1) SKMU (1) <i>CARD-VASC (1)</i>	GA, DERM, SK-MU, EYE		
<i>Ficus carica</i> L.	Moraceae	7	RESP (5) DERM (5) GYN (1) UR (1)	RESP, DERM, GYN, UR, GA, NERV, SK-MU, EAR	-	Herb, root
<i>Sambucus nigra</i> L.	Caprifoliaceae	7	GA (5) SK-MU (5) DERM (4) RESP (4) UR (3) NERV (2) GYN (1) EAR (1)	GA, SK-MU, DERM, UR, GYN	RESP, NERV, EAR, NOSE	Bark, fruits, flowers, leaf
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	7	GA (5) DERM (4) RESP (3) SK-MU (3) NERV (2) FEV (1) GYN (1) <i>DIABETES (1)</i>	GA	DERM, RESP, NERV, GYN, EYE <i>CARD-</i> <i>VASC</i>	Herb
<i>Laurus nobilis</i> L.	Lauraceae	7	GA (7) RESP (5) SK-MU (3) DERM (2) FEV (2) GYN (2) NERV (2)	GA, RESP, SK-MU, DERM, GYN, NERV, UR, EAR	-	Leaf, fruits
<i>Hypericum perforatum</i> L. & <i>H. perforatum</i> L.	Clusiaceae	6	DERM (6) SK-MU (1) RESP (1)	DERM, SK-MU, UR, GYN, FEV	-	Herb
<i>Rubus caesius</i> L. & <i>fruticosus</i> L. & <i>ulmifolius</i> Schott	Rosaceae	6	DERM (6) GA (4) UR (2) GYN (1) RESP (1)	DERM, GA, GYN, CARD-VASC	-	Root, leaf, fruit

<i>Papaver rhoeas</i> L.	Papaveraceae	6	NERV (6) RESP (4) DERM (2)	NERV, DERM, GA	RESP	Petals, capsule
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Poaceae	6	UR (5) GA (4) RESP (3) DERM (2) CARD-VASC (1)	UR, GA, DERM	NERV, EYE	Herb
<i>Adiantum capillus- veneris</i> L.	Adiantaceae	6	RESP (5) DERM (3) GYN (2) GA (1) SK-MU (1)	RESP, DERM, GYN, GA, UR	-	Root
<i>Allium cepa</i> L.	Liliaceae	6	DERM (6) UR (5) RESP (3) GA (2) GYN (1) <i>CARD-VASC (1)</i> <i>DIAB (1)</i>	DERM, UR, RESP, GA, GYN, EYE, EAR	NOSE	Bulb
<i>Allium sativum</i> L.	Liliaceae	6	GA (5) DERM (4) SK-MU (3) UR (2) RESP (2) NERV (2) FEV (1) <i>CARD-VASC (4)</i>	GA, DERM, SK-MU, UR, RESP, NERV, GYN	-	Bulb
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	6	RESP (5) GA (4) DERM (2) NERV (2) SK-MU (1) GYN (1)	RESP, GA, DERM, NERV, GYN, EAR	-	Herb
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	6	GA (5) RESP (4) NERV (2) GYN (2) UR (2) DERM (2)	GA, GYN, UR, DERM, EYE	-	Seeds, herb

			<i>CARD-VASC (1)</i>			
<i>Hedera helix</i> L.	Araliaceae	6	DERM (5) RESP (3) SK-MU (2) NERV (2) GYN (1)	DERM, NERV, GYN, EAR, GA	-	Leaves
<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae	6	SK-MU (4) GA (4) DERM (3) GYN (2) NERV (2) EYE (1) <i>CARD-VASC (2)</i>	SK-MU, GA, DERM, GYN, NERV, EYE, UR, RESP, FEV, EAR, NOSE		Herb
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	6	DERM (6) GA (4) RESP (4) GYN (2) SK-MU (1) FEV (1) NERV (1) <i>DIAB (2) CARD-VASC (1)</i>	DERM, GYN, UR	RESP, SK-MU, NERV	Leaves
<i>Cynara cardunculus</i> L. & var. <i>scolymus</i> (L.) Fiori	Asteraceae	6	GA (6) UR (2) <i>CARD-VASC (3)</i>	UR, DERM	GA	Leaves
<i>Parietaria judaica</i> L. & <i>officinalis</i> L. <i>diffusa</i> Mert. & Koch	Urticaceae	6	GA (5) UR (5) DERM (4) SK-MU (4) RESP (2) GYN (1)	SK-MU, DERM, RESP, EAR	GA, UR, GYN, NERV	Herb
<i>Plantago major</i> L. & <i>lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	6	DERM (6) GA (5) UR (4) RESP (3) EYE (2) NERV (1)	DERM, GA, UR, RESP, EYE, NERV, GYN, FEV, EAR	NOSE, SK-MU	Leaves

<i>Prunus avium</i> (L.) L. & <i>cerasus</i> L.	Rosaceae	6	RESP (4) UR (4) GA (1) SK-MU (1) GYN (1)	RESP, UR, GA, EYE	-	Petioles, seeds
<i>Calamintha nepeta</i> L.	Lamiaceae	6	RESP (3) GA (3) DERM (2) NERV (1)	RESP, GA, DERM, UR, SK-MU, FEV, GYN, EAR	-	Herb

Table 1 GA: gastrointestinal disorders (including liver and spleen); UR: urological problems; RESP: respiratory complaints (including angina, sore throat, pleurisy); DERM: dermatologic problems (including oral cavity and haemorrhoids); SK-MU: skeleto-muscular disorders (including haematoma and gout); NERV: central nervous system (including headache, toothache, analgesic uses, epilepsy, insomnia); GYN: application in women's medicine (gynaecology); FEV: fever, malaria; EYE: problems of the eye; EAR: problems of the ear; NOSE: problems of the nose not related to respiratory diseases (epistaxis, polyps), *CARD-VASC*: cardio-vascular application; *DIAB*: Diabetes. *Italicized* categories are excluded from the analys.

References

Adams M., Berset C., Kessler M., Hamburger M., (2009). Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 121; pp. 343–359.

Antonone R., De Simone F., Morrica P., Ramundo E., (1988). Traditional phytotherapy in the Roccamonfina volcanic group, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 22; pp. 295–306 (Nr. 1 on map).

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

Bérard J., (1963). *La Magna Grecia—Storia delle colonie greche dell’Italia meridionale.* (Original title: *La colonisation grecque de l’Italie méridionale et de la Sicile dans l’antiquité. L’histoire et la légende.* Presses Universitaires de France, Paris, 1957). Giulio Einaudi editore S.p.A., Torino.

Berendes J., (1902). *Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre in fünf Büchern.* F. Enke, Stuttgart.

Borgognino M., (2006). *Archeobotanica—Reperti vegetali da Pompei e dal territorio vesuviano.* Studi della Soprintendenza archeologica di Pompei 16. “L’Erma” di Bretschneider, Roma.

Bray R.S., (1996). *Armies of Pestilence. The Impact of Disease on History.* Barnes & Noble, New York.

Campbell-Thompson R., (1949). *A Dictionary of Assyrian Botany.* The British Academy, Burlington Gardens, London.

Cartwright FF., Biddis M., (2004) (1972). *Disease & History.* 2nd edition. Sutton Publishing, Phenix Mill, Thrupp, Stroud, Gloucestershire.

Cavalli-Sforza LL., (1996). *Gene, Voelker und Sprachen. Die biologischen Grundlagen unserer Zivilisation.* (Original title: *Geni, popoli e lingue.* Adelphi Edizioni S.p.A., Milano. Carl Hanser Verlag, Muenchen.

Chipman H., George, E., McCulloch, R., (2006). "BART: Bayesian Additive Regression Trees." Tech. rep., University of Chicago.

Chipman H., George E., McCulloch R., (2007). Bayesian ensemble learning. In: Scholkopf, B., Platt, J., Hoffman, T. (Eds.), *Advances in Neural Information Processing Systems* vol. 19. MIT Press, Cambridge, MA.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C., et al., (2005). An annotated checklist of the Italian Vascular Flora. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – Direzione per la Protezione della Natura, Dipartimento di Biologia Vegetale – Università degli Studi di Roma "La Sapienza". Palombi e Partner S.r.l., Roma.

Conti F., Alessandrini A., Bacchetta G., Banfi E., Barberis G., Bartolucci F., Bernardo L., Bonacquisti S., Bouvet D., Bovio M., Brusa G., Del Guacchio E., Foggi B., Frattini S., Galasso G., Gallo L., Gangale C., Gottschlich G., Grunanger P., Gubellini L., Iiriti G., Lucarini D., Marchetti D., Moraldo B., Peruzzi L., Poldini L., Prosser F., Raffaelli M., Santangelo A., Scassellati E., Scortegagna S., Selvi F., Soldano A., Tinti D., Ubaldi D., Uzunov D., Vidali M., (2006). Integrazioni alla checklist della flora vascolare Italiana. Updating of the Italian Vascular Flora. *Natura Vicentina* vol. 10; pp. 5–74.

Corradi A., (1966) (1887). *Le prime farmacopee Italiane ed in particolare dei ricettari fiorentini.* Fratelli Rechiedei Editori, Milano. Reprinted 1966 by Ferro Edizioni S.p.A., Milano.

Cosmacini G., (1997). *L'arte Lunga. Storia della medicina dall'antichità a Oggi.* Editori Laterza 6th edition 2009, Roma.

Culpeper N., (1814). *Culpeper's Complete herbal, to which is now added, upwards of one hundred additional herbs, with a display of their medicinal and occult qualities; Physically applied to the cure of all disorders incident to mankind. To which are now*

first annexed his English physician enlarged, and key to physic, to which is also added upwards of fifty choice receipts, selected from the author's last legacy to his wife. Richard Evans, No. 8, White's Row, Spitalfields, London.

Culpeper N., (2007). *Culpeper's Complete Herbal. A Book of Natural Remedies for Ancient Ills* by Nicholas Culpeper. Wordsworth Editions Limited, Ware.

De Feo V., Senatore F., (1993). Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 39; pp. 39–51 (Nr. 4 on map).

De Feo V., Ambrosio C., Senatore F., (1991). Traditional phytotherapy in Caserta province Campania, southern Italy. *Fitoterapia* vol. 61; pp. 234–257 (Nr. 2 on map).

De Feo V., Aquino R., Menghini A., Ramundo E., Senatore F., (1992). Traditional phytotherapy in the Peninsula Sorrentina, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 36; pp. 113–125 (Nr. 3 on map).

De Natale A., Pollio A., (2007). Plant species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania Italy). *Journal of Ethnopharmacology* vol. 109; pp. 295–303 (Nr. 6 on map).

Eccles R., (2002). Acute cooling of the body surface and the common cold. *Rhinology* vol. 40; pp. 109–114.

Etkin NL., (2001). Perspectives in ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 76 ; 177–182.

Font Quer P., (1999). *Plantas medicinales. El Dioscorides renovado*. Ediciones Peninsula, 9th edition 2008, Barcelona.

Geller MJ., Cohen SL., (1995). Kidney and urinary tract disease in ancient Babylon, with the translations of the cuneiform sources. *Kidney International* vol. 47; pp. 1811–1815.

Ginzburg C., (1990). Hexensabbat – Etzifferung einer naechtlichen Geschichte. (Original Title: Storia notturna. Una decifrazione del sabba. Giulio Einaudi editore S.p.A. Torino, 1989). Verlag Klaus Wagenbach, Berlin.

Goltz D., (1976). Mittelalterliche Pharmazie und Medizin. Dargestellt an Geschichte und Inhalt des Antidotarium Nicolai. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart.

González-Tejero MR., Casares-Porcel M., Sánchez-Rojas CP., Ramiro-Gutiérrez JM., Molero-Mesa J., Pieroni A., Giusti ME., Censorii E., de Pasquale C., Della A., Paraskeva-Hadijchambi D., Hadjichambis A., Houmani Z., El-Demerdash M., El-Zayat M., Hmamouchi M., Eljohrig S., (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. Journal of Ethnopharmacology vol. 116; pp. 341–357.

Guarino C., De Simone L., Santoro S., (2008). Ethnobotanical study of the Sannio area, Campania Southern Italy. Ethnobotany Research and Applications vol. 6; pp. 255–317 (Nr. 8 on map).

Gubernatis AD., 1882. La mythologie des plantes ou, les légendes du règne végétal, vol. II. C. Reinwald et Cie., Libraires-Editeurs, Paris.

Harlan JR., (1992). Crops and Man, 2nd ed. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI.

Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson EM. (Eds.) (2004). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, London.

Hill J.L., McCulloch R.E., (2008). Bayesian nonparametric modelling for causal inference. Technical report, Graduate School of Business, University of Chicago.

IWGIA (The International Work Group for Indigenous Affairs), (2001). The indigenous world 2000/2001. Eks-Skonlens Trykkeri, Copenhagen.

Johns T., (1990). With Bitter Herbs They Shall Eat it: Chemical Ecology and the Origins of Human Diet and Medicine. University of Arizona Press, Tucson.

Kovaliov SI., (1955). *Storia di Roma II. L'impero.* (Original edition by the University of Leningrad, 1948). Editori Riuniti 6th edition 1971, Roma.

La Palomenta P., Grieco C., (2008). *La flora officinale nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano.* Plast sud s.r.l. Agropoli, Salerno (Nr. 7 on map).

Laguna A., (1991) (1555). *Pedacio Dioscorides Anazarbeo, Acerca de la materia medicinal y de los venenos mortíferos.* Translated from the Greek and illustrated by Dr. Andrés de Laguna. Facsimile edition of the *Consejería de Agricultura y Cooperación de la Comunidad de Madrid, Madrid.*

Lee PM., (2009). *Bayesian Statistics: An Introduction*, 3rd edition. Wiley, New York.

Leonti M., Nebel S., Rivera D., Heinric, M., (2006). *Wild gathered food plants in the European Mediterranean: a comparative analysis.* *Economic Botany* vol. 60; 130–142.

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.

Leporatti M., Ghedira K., (2009). *Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia.* *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* vol. 5; pp. 31.

Madaus G., (1987) (1938). *Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Band 1.* Reprint of the Leipzig edition by Georg Thieme from 1938. Mediamed Verlag, Ravensburg.

Mäkinen TM., Juvonen R., Jokelainen J., Harju TH., Peitso A., Bloigu A., Silvennoinen-Kassinen S., Leinonen M., Hassi J., (2009). *Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections.* *Respiratory Medicine* vol. 103; pp. 456–462.

Mann R.D., (1984). *Modern drug use: An Enquiry on Historical Principles.* MTP Press Limited, Lancaster.

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.

Matthioli A., (1967), MDLXVIII (1568). *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. Anastatic reproduction in 6 volumes, Roma.

McClatchey WC., (2005). Exorcizing misleading terms from ethnobotany. *Ethnobotany Research and Application* vol. 3; pp. 1–4.

Moerman D., (2002). *Meaning Medicine and the “Placebo Effect”*. Cambridge University Press, Cambridge.

Osbaldeston TA., (2000). *Dioscorides De Materia Medica—Five Books in One Volume: New Modern English Translation*. Ibis Press, Johannesburg.

Palmer LR., (1977). *La lingua latina*. (Original title: *The Latin Language*. Faber and Faber, London, 1961) Giulio Einaudi editore S.p.A., Torino.

Pfeiffer JM., Butz RJ., (2005). Assessing cultural and ecological variation in ethnobiological research: the importance of gender. *Journal of Ethnobiology* vol. 25; pp. 240–278.

Pollio A., De Natale A., Appetiti E., Aliotta G., Touwaide A., (2008). Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (Rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 116; pp. 469–482.

Preuss J., (1971) (1911). *Biblich-talmudische Medizin. Beitrage zur Geschichte der Heikunde und der Kultur ueberhaupt*. Re-edited 1971. KTAV Publishing House Inc., New York.

Reader's Digest (1980) (1979). *Segreti e virtù delle piante medicinali*. Reader's Digest S.p.A. (2nd reprint), Milano.

Riddle JM., 1985. Saitta A., (1967). *Civiltà del Passato. Il mondo romano*, vol. II. Sansoni, Firenze.

San Miguel E., (2003). Rue (*Ruta L., Rutaceae*) in traditional Spain: frequency and distribution of its medicinal and symbolic applications. *Economic Botany* vol. 57; pp. 231–244.

Scherrer AM., Motti R., Weckerle C.S., (2005). Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology* vol. 97; pp. 129–143 (Nr. 5 on map).

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

Stepp JR., Moerman D.E., (2001). The importance of weeds in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 75; pp. 19–23.

Stevens PF., (2001) Onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since] <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (September 19, 2009).

Svechnikov VA., (1957). Mechanism of action of garlic on the heart and on the blood vessels. *Transactions of the Leningrad Sanitariogig Medical Institute* vol. 34; pp. 189–192.

Tschirch A., (1910). *Handbuch der Pharmakognosie. Allgemeine Pharmakognosie, Erster Band II. Abteilung. Chr. Herm. Tauchnitz. Leipzig.*

Weckerle CS., Ineichen R., Huber FK., Yang Y., (2009). Mao's heritage: medicinal plant knowledge among the Bai in Shaxi, China, at a crossroads between distinct local and common widespread practice. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 123; pp. 213–228.

Westendorf W., (1999). *Handbuch der Altaegyptischen Medizin. Handbook of Oriental Studies. Abt.1, Der Nahe und Mittlere Osten – The Near and Middle East; Bd. 36. In: Altenmueller, H., Hrouda, B., Levine, B.A., O'Fahret, R.S., Veenhof, K.R., Versteegh, C.H.M. (Eds.), Brill, Leiden, Boston, Koeln.*

Wittig HH., (1955). The systematic therapy of hypertension with a combination of garlic, mistletoe and chlorophyll. Hippocrates vol. 26; pp. 688–690.

Zohary M., (1973). Geobotanical Foundations of the Middle East. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Zolla C., (1980). Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. Journal of Ethnopharmacology vol. 2; pp. 37–41.

PUBBLICAZIONE II

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, Bühlstrasse 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.

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-methylchromone (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*.

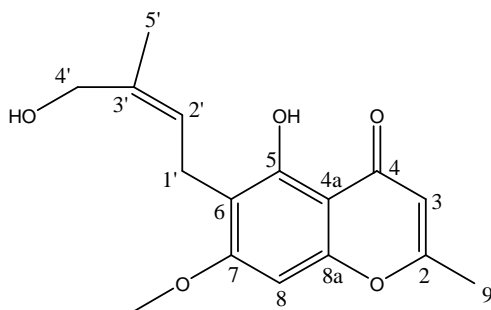


Fig. 1: 5-hydroxy-6-(2-Z-butenyl-3-hydroxymethyl)-7-methoxy-2-methylchromone

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).

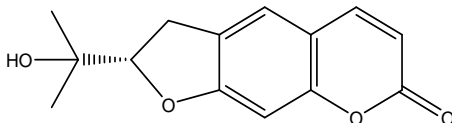


Fig. 2: Marmesin

The only chromone so far isolated from a member of the genus *Seseli* is a sulfur-containing 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 methine 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 $C_{16}O_5H_{18}$, congruent with a $[M+H]^+$ 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 (δ C 20.5 and δ H 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 H-3 with H₃-9 despite the intermittent quarternary carbon by small doublets with a J of 0.6 Hz and 0.3 Hz, respectively. H-8 at δ 6.39 showed crosspeaks 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 C-2' 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 μ M (Table 1).

Table 1: Cytotoxicity of compound 1 against four cancer cell lines (N=3 \pm S.D.).

Cells	Cytotoxicity (μ M)	Culture type
Jurkat (T cell leukemia)	12.9 \pm 0.8	suspension
HL60 (promyelocytic leukemia)	14.2 \pm 1.3	suspension
MCF7 (breast cancer)	< 50	adherent
PC3 (prostate cancer)	< 50	adherent

As a positive control paclitaxel (taxol) was used, which showed IC₅₀ values for all cell lines < 50 nM.

Interestingly, however, while in Jurkat T cells and HL60 leukemia cells this compound showed IC₅₀ values below 20 μ M, in MCF-7 and PC3 cells no sign of cytotoxicity was detected up to 50 μ M. 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 μ m (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 (tR = 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 tR = 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 (tR = 18 min, 3.3 mg) and bergapten (tR = 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-2-methylchromone).

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., Elkhrisy 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-aza-epothilones (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 pro-allergic 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 III

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

Received 8 July 2010 Received in revised form 13 August 2010 Accepted 17 August 2010

Keywords:

Securidaca diversifolia, Polygalaceae, Benzophenones, Antiviral activity, Herpes simplex.

Abstract

Three novel benzophenones (1–3) were obtained from the roots of *Securidaca diversifolia* (L.) S.F.Blake along with known benzylbenzoates and isovanillin. 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 involucrata* 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 process using vacuum liquid chromatography (VLC), column chromatography (CC) and HPLC yielded 2,4-dihydroxy-3-methoxy-3,3,0-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 isovanilline. 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)		155.3 (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 (dd, 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, 8.1, 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 (dd, 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)		
OCH 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, δ 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, $J = 9\text{Hz}$), 7.26 (1H, d, $J = 9\text{Hz}$), 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-30 and H-50) 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, $J = 8.8\text{Hz}$), δ_H 7.27 (d, $J = 8.8\text{Hz}$)] 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, $J = 8.1, 2.4, 0.9\text{Hz}$, H-40) at δ_H 7.36 (m, H-5') and

at δ_H 7.15 (ddd, $J = 7.5, 1.5, 0.9, H-6'$). 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 quasimolecular 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').

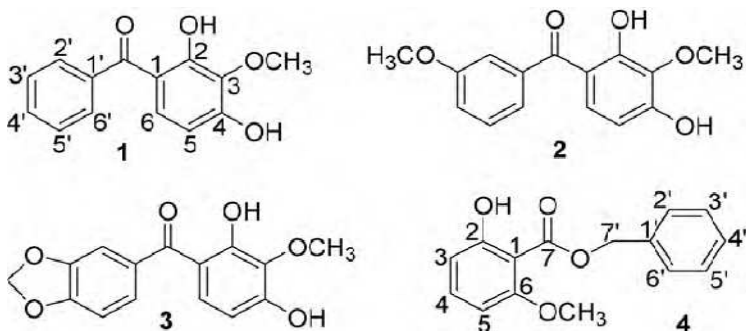


Fig. 1. Structures of compounds 1–4.

Conclusively, we identified compound 3 as 3',4'-methylendioxy-2,4-dihydroxy-3-methoxybenzophenone (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-dimethoxybenzoate is

reported in a work on *Brintonia discoidea* (Elliott) Greene (Asteraceae) and is consistent with our data (Lu et al., 1993). 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 the related species *S. inappendiculata* (Yang et al., 2001; Kangetal., 2005) and *S. longipedunculata* Fresen. (Galeffi et al., 1989; Marion Meyer et al., 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 evaluated 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 performed on an 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: flowrate: 0.4 mL/min; solvent A: 0.1% formic acid in water; solvent B: acetonitrile; and gradient: solvent B 5–100% 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 v. 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). 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): δ = 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): δ = 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, C-30 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) and 1S 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 of compound 2 was confirmed in a plaque reduction assay modified after Burleson et al. (1992). Hela cells were seeded in 6-well plates and grown into confluent cell monolayers in Dulbecco's modified MEM (DMEM, GIBCO Laboratories Inc.) adjusted to contain 1% NEAA and 10% SF. Monolayers were incubated for 1 h with cell culture medium at room temperature in the dark and then overlaid with agar. Plaques were stained with neutral red (1 mL/100 mL) 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 benzoicacid-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 involucrata*. Phytochemistry vol. 54; pp. 883–889.

Galeffi E., Federici E., Msonthi JD., Marini-Bettolo GB., Nicoletti M., (1989). New xanthones from *Ectiadiopsis oblongifolia* and *Securidaca longipedunculata*. Fito-terapia 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, ¹³C and ¹⁷O 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* (Anacar-diaceae). Rev. Latinoam.Quím. 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 again sterectile 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 leale 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 pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Chem. Pharm. Bull.* vol. 32; pp. 2676–2686.

Wabo HK., Kikuchi K., Katou Y., Tane P., Oshima Y., (2010). Xanthenes 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). Xanthenes from the stem of *Securidaca inappendiculata*. *Phytochemistry* vol. 58; pp. 1245–1249.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale va ai miei relatori: la Dott.ssa Laura Casu e il Dott. Marco Leonti, che in questi tre anni di Dottorato mi hanno supportato e sopportato, fornendomi preziosi consigli e un ambiente di lavoro sereno e incoraggiante; le loro figure sono state per me di grande importanza.

Ringrazio tutti i colleghi del mio gruppo di ricerca.

Grazie ai Professori ed ai ricercatori che hanno collaborato per la stesura di questo lavoro: Prof. Jürg Gertsch (Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern), Prof. Raffaello Pompei (Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Sez. Microbiologia, Università di Cagliari), Prof. Mariano Casu (Dip. Scienze Chimiche, Università di Cagliari), Dott. Pierluigi Caboni (Dip. Farmaco-Chimico-Tecnologico, Università di Cagliari), Prof.ssa Caroline S. Weckerle (Institute of Systematic Botany, University of Zürich) ed il Dott. Stefano Cabras (Dip. Matematica e Informatica, Università di Cagliari).

Un ringraziamento molto particolare va ai miei genitori, a Gianluca, a Sabina e a tutti i miei cari, per la loro vicinanza e per le attenzioni che mi dedicano.