



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE  
DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE E TERRITORIO

Dottorato di Ricerca

in

SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE ED AMBIENTALI

XXVII CICLO

**“Analisi dei metaboliti secondari da fonti naturali: isolamento,  
caratterizzazione strutturale e attività biologiche”**

Settore Scientifico Disciplinare **CHIM/06**

TUTOR:

Chiar.ma

Prof.ssa Maria IORIZZI

COORDINATORE:

Chiar.mo

Prof. Claudio CAPRARI

DOTTORANDA

Antonella NINI

146211

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>CAPITOLO I: INTRODUZIONE</b>	
- 1.1 METABOLITI SECONDARI	5
- 1.1.1 COMPOSTI FENOLICI	9
- 1.1.2 ALCALOIDI	10
- 1.1.3 TERPENOIDI	11
- 1.2 METODICHE DI ISOLAMENTO DEI METABOLITI SECONDARI	12
- 1.3 TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE	15
- 1.4 COSY SPECTRUM (CORrelation SpectroscopY)	17
- 1.5 ESPERIMENTI HSQC-HMBC	18
- 1.6 TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA STEREO CHIMICA	18
- 1.7 DETERMINAZIONE CONFIGURAZIONE ASSOLUTA	20
- 1.8 SPETTROMETRIA DI MASSA	21
<b>CAPITOLO II: <i>Olea europea</i> L.</b>	
- 2.1 MORFOLOGIA	24
- 2.2 DISTRIBUZIONE	25
- 2.3 PRINCIPI ATTIVI DELLE FOGLIE DI <i>Olea europea</i> L.	25
- 2.4 SECOIRIDOIDI	26
- 2.5 FLAVONOIDI	30
- 2.6 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE METABOLITI SECONDARI DA <i>Olea europea</i> L.	31
- 2.7 ATTIVITA' BIOLOGICA <i>Olea europea</i> L.	70
- 2.7.1 ANTIOSSIDANTI	71
- 2.7.2 VALUTAZIONE DELLE ATTIVITA' ANTIOSSIDANTI DEGLI ESTRATTI DI <i>Olea europea</i> L.	72
- 2.7.3 ATTIVITA' BIOLOGICA DEI COMPOSTI PURI	73
- 2.7.4 CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)	74
- 2.7.5 INIBIZIONE DELL'ENZIMA XANTINA OSSIDASI	75
- 2.7.6 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTILIPOPEROS- SIDASICA (ALP)	76
- 2.8 DATI SPETTROSCOPICI	79
<b>CAPITOLO III: <i>Gentiana lutea</i> L.</b>	
- 3.1 MORFOLOGIA	90
- 3.2 DISTRIBUZIONE	91
- 3.3 PRINCIPI ATTIVI E PROPRIETA'	91
- 3.4 IRIDOIDI	92
- 3.4.1 IRIDOIDI GLICOSIDICI E NON GLICOSIDICI	92
- 3.5 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI METABOLITI SECONDARI ISOLATI DA <i>Gentiana lutea</i> L.	93
- 3.6 DATI SPETTROSCOPICI	107

<b>CAPITOLO IV: <i>Allium cepa</i> L.</b>	
- 4.1 DESCRIZIONE	119
- 4.2 DISTRIBUZIONE	120
- 4.3 INDAGINI FITOCHIMICHE	120
- 4.4 COMPONENTE CHIMICA E PRINCIPI ATTIVI	121
- 4.5 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI METABOLITI SECONDARI ISOLATI DA <i>Allium cepa</i> L.	122
<b>CAPITOLO V: MATERIALI E METODI</b>	
- 5.1 PREPARAZIONE DECOTTO <i>Olea europea</i> L.	136
- 5.1.1 PURIFICAZIONE ESTRATTO <i>n</i> -BUTANOLICO	136
- 5.1.2 ESTRAZIONE DELLE FOGLIE DI <i>Olea europea</i> L.	137
- 5.2 ESTRATTO DELLE RADICI DI <i>Gentiana lutea</i> L.	138
- 5.2.1 PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO BUTANOLICO E CLOROFORMICO	138
- 5.3 ESTRATTO <i>Allium cepa</i> L.	139
- 5.4 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE	140
- 5.5 ATTIVITA' CHIMICO-BIOLOGICHE	141
- 5.5.1 CONTENUTO TOTALE DI FENOLI (TPC)	141
- 5.5.2 ATTIVITA' SCAVENGER (DPPH)	142
- 5.5.3 CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)	143
- 5.5.4 ATTIVITA' ANTILIPOPERROSSIDASICA (ALP)	143
- 5.5.5 INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA XANTINA OSSIDASI	143
<b>CAPITOLO VI: ANALISI ChemGPS</b>	
- 6.1 ChemGPS	145
- 6.2 ChemGPS - NP	146
- 6.2.1 COME REALIZZARE UN GRAFICO ChemGPS-NP	147
- 6.2.2 VALUTAZIONE CHEMOGRAFICA DELLE EVENTUALI ATTIVITA' BIOLOGICHE DEI COMPOSTI ISOLATI DA <i>Olea</i> <i>europea</i> L. e <i>Gentiana lutea</i> L.	151
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	154

## **Analisi dei metaboliti secondari da fonti naturali: isolamento, caratterizzazione strutturale e attività biologiche**

### **Abstract:**

L'attività di ricerca del Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Biologiche, XXVII ciclo, si inserisce nell'ambito della chimica delle sostanze naturali ed è rivolta all'isolamento e alla caratterizzazione strutturale dei metaboliti secondari provenienti da matrici vegetali. Le specie oggetto di studio sono piante, utilizzate nella medicina popolare per le loro caratteristiche fitoterapiche, oppure sono impiegate anche nell'alimentazione. L'indagine chimica si è concentrata sulle seguenti specie vegetali: *Olea europea* L., *Gentiana lutea* L. e su una varietà autoctona del Molise appartenente alla specie *Allium cepa* L. Il decotto di foglie di *Olea europea*, viene utilizzato nella medicina popolare per la nota attività ipotensiva e ipoglicemica. L'estratto delle radici di *Gentiana lutea* è impiegato per alleviare i disturbi gastrici, inoltre le radici vengono impiegate anche per la realizzazioni di bevande utilizzate come aperitivo e amaro. La specie *Allium cepa* è nota per l'attività antibatterica che esplica sull'apparato digerente. La purificazione e l'isolamento dei metaboliti secondari è stata realizzata mediante l'utilizzo di tecniche cromatografiche quali: cromatografia su colonna, cromatografia su strato sottile, HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), DCCC (Droplet Countercurrent Chromatography). La caratterizzazione strutturale di tutti i composti isolati è avvenuta attraverso tecniche spettroscopiche di Risonanza Magnetica Nucleare con esperimenti monodimensionali ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) e bidimensionali (COSY, HSQC, HMBC, ROESY). L'analisi ha condotto all'isolamento di diversi metaboliti secondari. Molti composti isolati sono stati sottoposti a test di valutazione dell'attività biologica. Alcuni prodotti hanno mostrato una notevole attività antiossidante e una potenziale capacità di inibire l'enzima xantina ossidasi. Infine alcuni dei composti isolati sono stati analizzati *in silico*, mediante l'utilizzo di una tecnica innovativa, la ChemGPS. La ChemGPS, ha consentito di realizzare uno studio predittivo sulle eventuali attività biologiche.

## **Analysis of secondary metabolites from natural sources: Isolation, structural characterization and biological activities**

### **Abstract:**

The research activity in Biological Sciences and Technology, PhD XXVII cycle, is focused on the chemistry of natural substances. The main aim is isolation and structural characterization of secondary metabolites from plants. The plant species used in this study are useful in folk medicine due to their herbal medicinal properties and edible food plants.

The chemical investigation is mainly focused on the following plant species: *Olea europea* L., *Gentiana lutea* L. and *Allium cepa* L., a local variety found in Molise region. The decoction of the leaves of *Olea europea*, is widely used in folk medicine for hypotensive and hypoglycemic activities. The extract of *Gentiana lutea* roots is used to relieve an upset stomach. However, the roots are also used for the preparation of beverages. The species *Allium cepa* is known for its antibacterial activity in the digestive system.

The purification and isolation of secondary metabolites was achieved by using chromatographic techniques such as column chromatography, thin layer chromatography (TLC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC). The structural characterization of all isolated compounds was based on spectroscopic techniques using both mono-dimensional and two-dimensional experiments such as, NMRs (Nuclear Magnetic Resonance, i.e.  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and COSY, HSQC, HMBC, ROESY, respectively). The analysis led to the isolation of several secondary metabolites. Many compounds were tested for biological activity and some of them showed a remarkable antioxidant activity and a potential inhibition of xanthine oxidase enzyme. Finally, some of the isolated compounds were analyzed *in silico*, by using a novel technique called ChemGPS. A predictive study on the biological activities was of the isolated test compounds was possible due to this analysis.

## 1.1. METABOLITI SECONDARI

La vita dell'uomo sulla terra è stata sempre caratterizzata dalla presenza di una maggioranza di specie appartenenti al Regno Vegetale che, nel corso degli anni, hanno subito un percorso evolutivo fino a costruire un grande patrimonio di biodiversità vegetale. Le piante sono state da sempre una fonte di sostentamento primaria per gli animali erbivori ed onnivori inclusa la specie umana. L'uomo però non si è limitato all'utilizzo della biomassa vegetale solo per il nutrimento, ma con il tempo ha intuito che, dalle piante, poteva ricavare dei rimedi dotati di una certa efficacia, da utilizzare come medicinali.

Alle origini della cultura medica occidentale possiamo far risalire le tavolette sumeriche di Nipur del 3000 a.C. sulle quali sono riportati i nomi delle droghe vegetali e il famoso papiro, del 1600 a.C., che in circa 20 metri di lunghezza riporta numerose formule erboristiche basate su più di 500 piante, di cui quasi un terzo compare ancora oggi nelle farmacopee occidentali.

Fino ad arrivare a Ippocrate (460-377 a.C.), il più celebre tra i grandi medici greci, a lui si deve la prima raccolta sistematica di circa 300 specie di piante medicinali, poi ampliata a circa 600 specie con circa 4000 formulazioni erboristiche con il titolo "*De Materia medica*". Ancora oggi il principale scopo delle ricerche nel campo dei prodotti naturali continua ad essere quello di trovare nuove molecole (metaboliti secondari) che abbiano un impiego medico-farmaceutico. I metaboliti secondari sono prodotti del metabolismo delle piante sintetizzati utilizzando zuccheri, amminoacidi e numerosi intermedi del metabolismo primario. Sono caratterizzati da due peculiarità: variabilità nella struttura chimica ed elevata interazione intraspecifica. Queste caratteristiche in passato sono state viste come una dimostrazione dell'origine casuale dei metaboliti secondari tanto da portare a definirli una funzione di scarto, detossificazione, accumulo o eccesso di produzione in vie metaboliche primarie. Oggi sappiamo che hanno un ruolo fondamentale in diverse fasi della vita vegetale, partecipano per lo più a meccanismi ecologici di interazione con altri organismi e con tutto l'ambiente circostante e consentono alle piante di far fronte alle avversità che sono costrette ad affrontare in quanto organismi sessili. Per questo i composti del metabolismo secondario possono essere considerati come molecole "dispensabili" per la crescita e lo sviluppo, ma "indispensabili" per la sopravvivenza delle specie (Maffei, 1999).

È noto che le piante interagiscono con altre piante, microrganismi ed animali attraverso il rilascio di messaggeri chimici, quali metaboliti noti come allelochimici che si suddividono in allomoni e kairomoni. Il termine allelopatia fu introdotta dal fisiologo vegetale Molish intendendo con esso “l’azione benefica o dannosa di una pianta sull’altra o su un animale vivente presente nello stesso habitat” che avviene mediante la liberazione di composti chimici nell’ambiente.

Invece, secondo la classificazione di Harborne, i metaboliti secondari sono prodotti organici di origine naturale che rappresentano le più importanti categorie di interazione chimica:

1. interazione animale-animale
2. interazione pianta-animale
3. interazione pianta-microrganismo
4. interazione pianta-pianta

L’interazione animale-animale può essere intraspecifica e interspecifica. L’interazione intraspecifica si verifica tra organismi appartenenti alla stessa specie attraverso il rilascio di diverse categorie di feromoni:

- feromoni di allarme, secreti in situazioni di pericolo;
- feromoni sessuali, prodotti per attrarre gli insetti nella fase di accoppiamento.

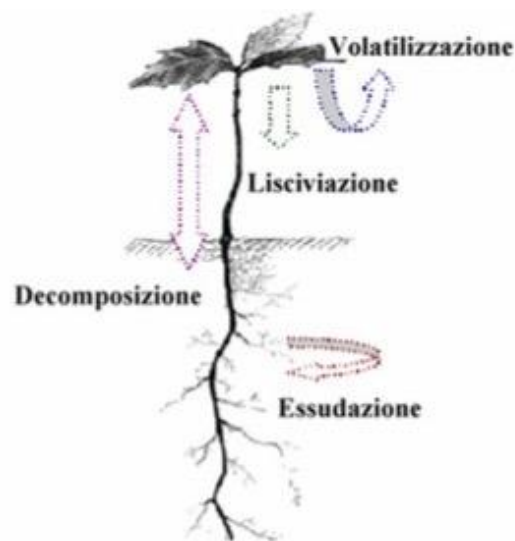
L’interazione interspecifica si instaura tra specie diverse, ad esempio gli organismi marini secernono composti alogenati o sesquiterpenoidi utilizzati come meccanismi di difesa contro eventuali predatori.

L’interazione pianta-animale, avviene attraverso la sintesi di sostanze quali: tannini, sistemi polifenolici che inibiscono la crescita di altre piante o attraverso la produzione di tossine che interferiscono con il metabolismo degli organismi erbivori.

Invece l’interazione pianta-microrganismo si realizza mediante la produzione di composti come ad esempio le fitoalexine, in risposta a microrganismi patogeni o ad infezioni batteriche. Ad esempio la famiglia delle *Solanaceae*, in seguito ad un’infezione fungina produce fitoalexine come la riscitina (Tomiyana, K., 1968).

L’ultimo tipo di interazione che si può considerare è l’interazione pianta-pianta. Tutti gli organismi per crescere e riprodursi hanno bisogno di sintetizzare e trasformare un gran numero di composti organici.

I metaboliti secondari possono essere liberati nell'ambiente esterno attraverso diversi meccanismi: volatilizzazione, essudazione, lisciviazione e decomposizione. Ad esempio la volatilizzazione consiste nella liberazione di sostanze volatili come l'etilene o sesquiterpeni che possono essere assorbiti dalle piante vicine direttamente dall'atmosfera o dal suolo. La lisciviazione invece è il processo che porta alla perdita di sostanze dalla parte aerea della pianta per mezzo dell'idrosolubilizzazione operata dalla pioggia o dalla nebbia. I prodotti rilasciati con questo meccanismo comprendono zuccheri, aminoacidi, alcaloidi, acidi grassi, terpenoidi e acidi fenolici.



**Figura 1.1** Rilascio di metaboliti secondari nell'ambiente

L'attività delle sostanze rilasciate dipende sia dalla specie vegetale produttrice, come lo stato fisiologico e nutrizionale della pianta, e sia dai fattori ambientali abiotici quali luce, pioggia e temperatura (Rovira, A.D., 1969).

A volte, si osservano fenomeni di autotossicità causati dall'accumulo dell'allelochimico nell'organismo produttore. I metaboliti secondari una volta liberati nell'ambiente esterno, possono subire modificazioni chimiche dovute ad agenti fisici o ad interazioni con microrganismi presenti nel suolo. Le modificazioni subite possono influenzare l'attività del metabolita, incrementando o riducendo la citotossicità, anche se l'attività microbica non necessariamente può determinare una diminuzione dell'attività allelopatica.

In alcuni casi la differenza tra metabolita primario e secondario si esprime in termini funzionali più che strutturali, in quanto uno stesso composto chimico può avere qualità sia di metabolita primario che secondario.



Pichersky definisce come metabolita secondario un composto la cui biosintesi è limitata a determinati gruppi di piante. Infatti, tra le caratteristiche più evidenti dei metaboliti secondari, oltre all'enorme diversità strutturale e all'elevata variabilità intraspecifica, troviamo la loro presenza ristretta. La capacità di sintetizzare metaboliti secondari è stata selezionata nel corso dell'evoluzione quando questi composti sono stati in grado di dare delle risposte a specifiche esigenze degli organismi vegetali (Pichersky & Gang, 2000). Ad esempio, le fragranze e i colori dei vari fiori si sono evoluti per attirare gli insetti impollinatori e, quindi, aumentare l'efficienza dell'impollinazione (Mol, J., 1998).

Ad esempio i metaboliti secondari presenti nei frutti ne prevengono il deterioramento e segnalano (grazie ai colori, aromi e profumi) la presenza di possibili nutrienti (zuccheri, vitamine ed amminoacidi) per gli animali che, mangiando i frutti, assicurano la dispersione dei semi. Alcuni composti chimici del metabolismo secondario sono coinvolti in funzioni cellulari caratteristiche di alcune piante, come la resistenza alla salinità e alla siccità (Nuccio et al., 1999).

I geni coinvolti nel metabolismo secondario possono essere derivare da eventi di duplicazione e divergenza che interessano geni del metabolismo primario, ma anche da semplice divergenza allelica, quindi senza duplicazione genica, che coinvolge geni del metabolismo secondario. In questo caso geni ortologhi in specie correlate possono codificare per proteine aventi funzioni differenti (Pichersky e Gang, 2000).

L'elevata diversità strutturale che caratterizza i metaboliti secondari non è dovuta al caso ma è frutto di un'armoniosa regolazione delle varie vie biosintetiche che sono perfettamente integrate nel metabolismo primario. Le piante, infatti, utilizzano poche vie metaboliche di base dalle quali divergono tante altre vie responsabili dell'elevato numero di molecole diverse che caratterizzano il metabolismo secondario.

L'isolamento e l'identificazione strutturale di nuove sostanze naturali rappresenta anche un importante contributo per l'incremento di conoscenze nell'ambito chimico e biologico. La caratterizzazione di particolari scheletri molecolari può essere inoltre utile per studi chemo-tassonomici, ecologici, di biologia evolutiva e di biologia molecolare.

I metaboliti secondari possono essere classificati sia da un punto di vista chimico che biosintetico. Se consideriamo le caratteristiche chimiche, per la maggior parte appartengono al gruppo dei fenoli e a quello dei composti contenenti azoto (come alcaloidi e glucosinolati), mentre nella classificazione basata sull'origine biosintetica il gruppo dei

terpeni è sicuramente quello più rappresentativo. A questo gruppo appartengono tutti quei composti che si originano tramite il pathway biosintetico degli isoprenoidi che usa building block di C5 per costruire catene di C10 (monoterpeni), C15 (sesquiterpeni), C20 (diterpeni), C30 (triterpeni) e di C40 (tetraterpeni).

Altre due vie biosintetiche molto utilizzate per la sintesi di metaboliti secondari sono quella dei fenilpropanoidi, e la via dei polichetidi che, invece, usano building block di fenilalanina/tirosina (C9) e acetato (C2) rispettivamente.

Nel corso dell'evoluzione, gli scheletri ottenuti dai singoli pathway hanno subito ulteriori modifiche negli organismi vegetali. L'introduzione di gruppi funzionali, le isomerizzazioni, l'apertura di un anello e la sua successiva chiusura, i legami tra più unità strutturali hanno determinato la sintesi di una grande varietà di composti.

Questa enorme varietà strutturale e la possibilità di utilizzare i metaboliti in diverse applicazioni industriali hanno determinato un crescente interesse nei confronti dei prodotti naturali del metabolismo secondario delle piante.

Abbiamo, dunque, tre grandi gruppi di metaboliti secondari:

fenoli: derivano dalla via metabolica dell'acido scichimico o dalla via dell'acido malonico;

alcaloidi: vengono sintetizzati a partire da amminoacidi;

terpeni: derivano dall'isopentenil pirofosfato.

### **1.1.1 COMPOSTI FENOLICI**

I composti fenolici si dividono in diverse classi, dai fenoli semplici come acidi benzoici, acidi cinnamici, cumarine, a quelli più complessi come flavonoidi e antocianidine. Gli acidi benzenici rappresentano le molecole più semplici, sono costituiti da un anello benzoico con un gruppo acido in posizione 1 e possono avere diversi sostituenti, tra cui l'ossidrile (-OH) e il metossile (-OCH<sub>3</sub>).

Gli acidi cinnamici sono particolarmente importanti in quanto costituiscono le molecole di base per la costruzione di strutture fenoliche complesse, oltre ad essere i costituenti della lignina, uno dei polimeri più diffusi nel regno vegetale. L'acido *trans*-cinnamico è una molecola base per la costruzione di diverse strutture fenoliche. Le cumarine, sostanze

biologicamente attive presenti in varie famiglie, derivano proprio dall'acido *trans*-cinnammico in seguito a idrossilazione e glucosilazione del gruppo ossidrilico con successiva lattonizzazione. Gli stilbeni sono costituiti da due anelli aromatici e da un ponte di etene o etano. Nelle piante vanno a regolare la crescita e sono coinvolti nella risposta di difesa dall'attacco dei patogeni. I flavonoidi, sono composti fenolici complessi, costituiscono una classe di metaboliti secondari comuni tutte le piante. In base al numero di ossidazione i flavonoidi si suddividono in diverse sottoclassi: flavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, isoflavoni e antocianine. Gli anelli aromatici possono presentare diversi sostituenti come gruppi ossidrilici su cui possono avvenire reazioni di glucosilazione e ramnosilazione. Le antocianidine derivano dal diidroflavonolo ed è una delle sottoclassi di fenoli più importanti. Sono presenti nelle piante, in particolare nei fiori e nei frutti, in forma glicosilata (antocianine) e sono responsabili dei colori rosso, porpora e blu. Sia i composti fenolici semplici che quelli complessi possono polimerizzare in strutture ad elevato peso molecolare note come tannini.

### 1.1.2 ALCALOIDI

Gli alcaloidi costituiscono un grande gruppo di composti azotati, appartenenti al regno vegetale e sono caratterizzati da una grande eterogeneità dal punto di vista chimico. La maggior parte di questi composti sono incolore, poco solubili in acqua e abbastanza solubili nei solventi organici. Vengono sintetizzati a partire da amminoacidi (ornitina, arginina, lisina, triptofano, fenilalanina e tirosina) e sono, probabilmente, degli intermediari della sintesi di altri composti.

Gli alcaloidi possono essere raggruppati in base a diversi criteri di classificazione:

- botanico, a seconda delle piante che li sintetizzano;
- farmacologico, sulla base dei principi attivi o sull'attività tossicologica del composto;
- chemiotassonomico, in base agli aspetti botanici e chimici;
- chimico, a seconda del nucleo, eterociclo o carbociclo, che è alla base della struttura.

### 1.1.3 TERPENOIDI

I terpenoidi sono prodotti del metabolismo secondario e comprendono un vasto numero di composti. Questa classe di prodotti ha origine da due vie biosintetiche, la via dell'acido mevalonico e la via piruvato/gliceraldeide 3-fosfato, dalle quali deriva il precursore di base rappresentato dall' isopentenil pirofosfato (IPP). L'IPP è un composto a 5 atomi di carbonio, definito, isoprenoide, che funge da unità di base per la costruzione di molecole più complesse e caratterizzate da un numero di atomi di carbonio sempre multipli di cinque.

L'interesse della ricerca scientifica nei confronti dei metaboliti di origine vegetale deriva dal fatto che molte sostanze naturali trovano importanti applicazioni in diversi settori:

- in ambito alimentare come coloranti e conservanti;
- in ambito cosmetico come profumi e oli essenziali;
- in ambito zootecnico e agrario come potenziali erbicidi e insetticidi;
- in ambito farmacologico come antinfiammatori, potenziali antitumorali etc.

Ad esempio una delle prime molecole di origine naturale ad essere stata isolata ed utilizzata ancora oggi in campo medico è la morfina che fu identificata nel 1804 da Friedrich Sertürner. Questo diede inizio allo studio e alla purificazione dei farmaci e alla loro somministrazione in dosi precise.

Un altro esempio è la cumarina, che è un metabolita secondario ed è il principale responsabile dell'odore di fieno appena tagliato. La fonte naturale da cui si estrae la cumarina è il trifoglio dolce *Melilotus alba*. Quando la pianta viene tagliata l'acido cinnammico glicosilato viene de-glicosilato, per azione dell'enzima glucosidasi, quindi l'acido forma un estere dando origine ad un composto ciclico, la cumarina. La cumarina è stata identificata nel 1820 ed ha effetti sul drenaggio linfatico. Sempre in ambito farmaceutico si utilizzano alcuni derivati della cumarina quali: umbelliferone, dicumarolo, psoralene. Il dicumarolo, presente nelle foglie e nelle infiorescenze delle *Fabaceae*, viene utilizzato come anticoagulante nella profilassi e nel trattamento delle trombosi venose e degli edemi polmonari. Gli psoraleni sono utilizzati nella fotochemioterapia per il trattamento della psoriasi e delle micosi della pelle. L'utilizzo di composti naturali però è limitato dalla loro tossicità, invece promettenti sono i derivati semisintetici che risultano efficaci per la cura di numerose malattie.

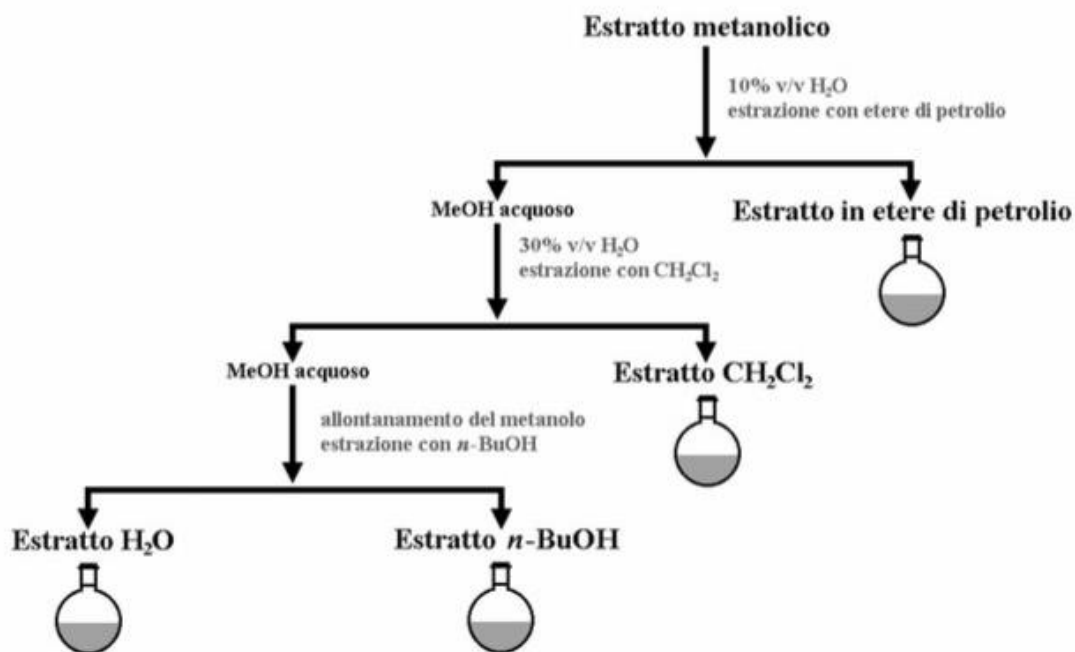
## **1.2. METODICHE DI ISOLAMENTO DEI METABOLITI SECONDARI**

L'isolamento e la purificazione dei metaboliti secondari rappresentano una fase cruciale della parte di analisi sperimentale; è di fondamentale importanza fare attenzione nell'utilizzo di solventi o ambienti acidi/basici per conservare il composto integro nella sua struttura chimica, in quanto trattamenti drastici potrebbero dare origine ad artefatti. Gli estratti hanno composizioni diverse, ciò dipende, dal solvente utilizzato, dal rapporto tra il volume del solvente e la matrice da estrarre, lo stato fisico della droga, il livello di frantumazione, il tempo di contatto tra droga e solvente, la temperatura di estrazione ed eventuali fattori fisici di processo.

La Farmacopea Ufficiale definisce gli estratti come : “Preparazioni concentrate liquide o solide di consistenza intermedia, ricavate da materie prime vegetali”. Le tabelle stilate dalla Farmacopea Ufficiale prevedono che gli estratti siano ottenuti utilizzando opportuni solventi attraverso due passaggi: la percolazione e la macerazione e successivamente il liquido viene concentrato fino a raggiungere la consistenza desiderata. L'obiettivo di queste tecniche è quello di ottenere in forma pura i principi attivi delle piante, in modo tale da ottenere un prodotto con una buona biodisponibilità.

Prima di iniziare l'estrazione è opportuno ridurre la matrice vegetale finemente in modo da facilitare la penetrazione del solvente nelle cellule, permettendo la solubilizzazione dei metaboliti secondari e la loro diffusione dalle cellule stesse.

Al fine di recuperare tutti i metaboliti con caratteristiche chimiche diverse è necessario utilizzare solventi con polarità diversa. Una delle tecniche di estrazione maggiormente utilizzata è la metodica di Kupchan. (Kupchan, S.M., 1973).



**Figura 1.2** Metodica di ripartizione secondo Kupchan modificata

I singoli estratti vengono analizzati tramite TLC (Thin Layer Chromatography; Cromatografia su Strato Sottile) che è una tecnica cromatografica di tipo qualitativo e sfrutta il concetto della ripartizione. La TLC è una tecnica cromatografica costituita da una fase stazionaria ( $\text{SiO}_2$  supportata da alluminio) immobilizzata su una superficie piana su cui viene fatta scorrere la fase mobile. È un'analisi di tipo qualitativo che consente di visualizzare la composizione di un estratto o di una miscela dei composti analizzati. Nei singoli estratti è possibile individuare una serie di spot distanziati tra loro in base alla selettività del sistema. Come riferimento viene utilizzato il valore dell' $R_f$  (Fattore di Ritenzione Ritardo) che è un parametro che permette di calcolare il percorso effettuato da ciascun composto lungo la TLC e quindi consente di paragonare uno standard con un composto incognito ( $R_f$ : distanza composto incognito/distanza fronte dell'eluente). Non sempre gli spot sulla TLC sono visibili in quanto la maggior parte è incolore oppure assorbe nella zona dell'ultravioletto. In questi casi, dopo la migrazione della miscela incognita, si osserva la TLC con una lampada UV a lettura alle seguenti lunghezze d'onda 264 nm oppure 366 nm. Per la visualizzazione degli analiti incolore e che non possiedono assorbimento all'UV, si utilizzano reattivi di sviluppo. Questi reagenti, vaporizzati sulle sostanze eluite, formano con esse dei composti colorati. Ci sono reagenti specifici che sono selettivi solo per alcuni gruppi di composti organici. La ninidrina consente di visualizzare

composti amminoacidici; mentre una prima soluzione al 5% di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in etanolo e una seconda soluzione al 5% in peso di vanillina in etanolo vanno ad evidenziare la presenza di composti che carbonizzano.

Il frazionamento degli estratti avviene poi attraverso l'utilizzo di tecniche quali: DCCC, cromatografia su colonna (CC), cromatografia ad alta prestazione (HPLC) a fase diretta e inversa.

La DCCC (cromatografia controcorrente a gocce), è una tecnica cromatografica di ripartizione liquido-liquido, introdotta per la prima volta nel 1970 (Tanimura et al., 1970); nella DCCC la fase stazionaria liquida viene attraversata da una fase mobile immiscibile sulla base della densità relativa. Al contrario delle moderne tecniche cromatografiche, che sfruttano campi di forza centrifughe molto più forti rispetto alla forza di gravità, la DCCC è caratterizzata da velocità di flusso molto basse ( i tempi di ritenzione sono di giorni ) ed è limitata soltanto all'utilizzo di sistemi di solventi bifasici, anche se costituiti da miscele ternarie. Nella cromatografia su colonna (CC), è presente la fase mobile e la fase stazionaria, l'analita in esame si distribuisce tra le due fasi secondo un coefficiente di ripartizione definito K<sub>d</sub>. La fase stazionaria è fissata ad una matrice inerte e insolubile ed è impaccata in una colonna di vetro, mentre la fase liquida defluisce attraverso essa per capillarità. Le matrici maggiormente utilizzate sono dei polimeri di agarosio e di silice. Le colonne in genere sono preparate aggiungendo una quantità di silice in rapporto 1:20 rispetto all'estratto da cromatografare e impaccate con opportuno solvente applicando una pressione dall'alto. I singoli composti vengono separati dal continuo passaggio della fase mobile attraverso una eluizione a gradiente realizzata aumentando progressivamente la polarità del solvente. La separazione degli analiti viene monitorata dalla formazione delle bande colorate nella colonna e tramite analisi TLC.

Come si può osservare la fase di isolamento è molto delicata, le difficoltà maggiori sono dovute alla purificazione dei composti e alle quantità minime che si ottengono.

L'HPLC è un tipo di cromatografia che utilizza una fase mobile liquida e una fase stazionaria finemente suddivisa in cui grazie alle alte pressioni applicate si raggiungono elevate velocità di flusso. Ci sono diverse colonne per HPLC, possono variare da 10 a 30 cm di lunghezza, 4-10 mm di diametro, costituite da tubi di acciaio inossidabile, impaccate in genere con particelle di gel di silice oppure C<sub>18</sub> con diametro dai 3 ai 5 micron. Nell'HPLC a fase diretta la fase stazionaria è polare, mentre la fase mobile è costituita da un solvente non polare, in questo caso il primo composto ad essere eluito sarà quello a polarità più bassa.

Mentre nell'HPLC a fase inversa, che è la tecnica più utilizzata, la fase stazionaria non polare è formata da polimeri ottadecil silossanici, mentre la fase mobile è generalmente costituita da solventi polari come l'acqua, acetonitrile e metanolo. Questa tecnica ha numerosi vantaggi quali: dimensioni ridotte della colonna, velocità di eluizione costante e regolabile, utilizzo di piccole quantità di campione per l'analisi (dell'ordine di nano/micromolare) e velocità di esecuzione ridotta.

Alla fine della colonna è presente un rivelatore, in genere U.V. o Indice di Rifrazione, che consente l'analisi in continuo dell'eluato e l'identificazione e la quantificazione delle sostanze iniettate. Dal rivelatore si ottiene il cromatogramma che rappresenta l'eluizione degli analiti in funzione del tempo di ritenzione; mentre la loro quantificazione avviene sulla base dell'area del picco.

### **1.3. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE**

La caratterizzazione strutturale delle molecole isolate viene realizzata attraverso tecniche spettroscopiche quali, Risonanza Magnetica Nucleare, spettroscopia IR e spettrometria di massa.

La spettroscopia RNM è una tecnica non degradativa e consente di recuperare il campione intatto dopo l'indagine. Ciò permette non solo di avere informazioni sulla struttura chimica ma anche di riutilizzare il campione per le indagini successive sia di tipo spettroscopico che biologico/farmacologico.

La spettroscopia NMR è una tecnica basata sulla perturbazione del livello di energia del nucleo della materia per mezzo dell'effetto di un campo magnetico esterno. Nel dettaglio, l'energia viene assorbita dalla sostanza quando è soggetta ad un'azione combinata di due campi magnetici, uno forte e costante e l'altro debole e variabile, in particolare di una radiofrequenza. Poiché l'effetto combinato dei due campi causa una perturbazione nello stato di energia dei nuclei, che dipende sia dal tipo dei nuclei atomici contenuti nella sostanza che dal loro stato chimico, la risonanza magnetica nucleare è uno strumento valido per lo studio delle interazioni tra nucleo e substrato.

L'NMR è dunque una tecnica in cui un campione viene immerso in un campo magnetico e irradiato con onde radio, che determinano transizioni solo dei nuclei come quello del protone  $^1\text{H}$  o del carbonio  $^{13}\text{C}$  in cui il numero di spin  $I$  vale  $1/2$ . Solo alcuni atomi sono in



grado di dare il fenomeno della Risonanza, in particolare che possiedono numero quantico di spin =  $1/2$ . Sono attivi i nuclei:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ .

Nella realtà i nuclei attivi sono immersi in un intorno chimico e quindi il campo magnetico applicato incide sull'intorno elettronico di ogni nucleo, provocando una modificazione del campo iniziale detta schermatura. Lo spostamento chimico si ricava mettendo in relazione il "chemical shift" dei vari nuclei, con quelli del composto di riferimento tetrametilsilano (TMS), che ha tutti gli idrogeni chimicamente equivalenti ed emette un unico tipo di segnale che cade a campi molto alti dello spettro. Poiché la maggior parte dei composti organici è costituito di idrogeno e carbonio, questa tecnica risulta particolarmente efficiente.

La spettroscopia NMR offre numerose possibilità di utilizzo ed è considerata uno degli strumenti fisici a disposizione del chimico organico; nella sua evoluzione si è rivelata un efficace aiuto nei campi della biologia, biochimica e farmacologia. L'NMR permette di distinguere i diversi nuclei atomici sulla base delle loro proprietà magnetiche mediate dall'intorno chimico; permette di misurare le distanze inter-protoniche e di misurare gli angoli diedri dei legami covalenti. L'obiettivo dell'interpretazione degli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -NMR, è sostanzialmente quello di ricavare informazioni sul numero e tipo di idrogeni e carboni presenti all'interno di una molecola. Nello spettro  $^1\text{H}$ -NMR i valori dei chemical shift entro i quali avviene l'assorbimento degli idrogeni sono compresi tra 0 e 12 ppm. Lo schermaggio è funzione del grado di densità elettronica presente sull'atomo di carbonio a cui sono legati gli idrogeni: se la densità elettronica sul carbonio è alta, l'assorbimento del protone avverrà a campi alti; nel caso in cui la densità del carbonio è bassa, l'assorbimento è a campi bassi. I segnali compresi tra 10 e 12 ppm rivelano la presenza di protoni aldeidici o acidi carbossilici; tra i 7 e 9 ppm la presenza di protoni aromatici; tra 6 e 7 ppm composti carbonilici  $\alpha$ - $\beta$  insaturi; intorno a 3 ppm si rileva la presenza di protoni metossilici, e segnali a campi molto alti, tra 1-2 ppm rivelano la presenza di protoni alchilici.

Lo spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR registra i segnali dei carboni presenti, disaccoppiando le interazioni spin-spin tra i nuclei  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , ottenendo spettri in cui le risonanze dei carboni appaiono tutte come singoletti, in un intervallo che va da 0 a 250 ppm. Segnali intorno a 40 ppm sono imputabili alla presenza di carboni alchilici, tra 50-90 ppm di alcoli o eteri; a campi molto bassi tra 160-200 ppm la presenza di carboni di acidi carbossilici, aldeidi esteri o chetoni.

Per avere altre informazioni in merito alla molecola da caratterizzare si ricorre all'utilizzo di esperimenti bidimensionali quali: COSY (COrrelation SpettroscopY), HMBC (Heteronuclear Multi Bond Cprrelation), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpettroscopY), NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpettroscopY). Gli esperimenti bidimensionali si distinguono in omodimensionali, COSY, TOCSY e NOESY ed eteronucleari, HSQC e HMBC.

Lo spettro  $^1\text{H}$  è un grafico costruito sull'intensità del segnale e la frequenza. L'asse delle frequenze deriva dall'asse dei tempi (tempo di acquisizione) del FID attraverso il processo matematico detto "trasformata di Fourier". Quindi, da un punto di vista sperimentale, la variabile dell'ascissa in un esperimento 1-D è il tempo. Il cosiddetto spettro NMR bidimensionale 2-D è in realtà un grafico a tre dimensioni; in tutti gli esperimenti NMR la dimensione omessa è sempre l'intensità.

Per quanto riguarda l'esperimento 2-D NMR si fa riferimento ad entrambi gli assi delle frequenze. Un esperimento di questo tipo richiede due trasformate di Fourier ortogonali tra di loro su due assi dei tempi indipendenti, per arrivare a due assi dei tempi indipendenti, per arrivare a due assi delle frequenze perpendicolari. Nell'esperimento a singolo impulso vi è un unico fattore tempo che influenza lo spettro, cioè il tempo di acquisizione  $t_2$ . In una sequenza multi-impulso invece, il periodo di calibrazione è seguito da due impulsi, tra i quali è interposto un intervallo di tempo, l'ultimo dei quali è l'impulso di acquisizione a  $\pi/2$ . Le informazioni ottenute mediante spettroscopia NMR, insieme a studi di modellistica molecolare, consentono sia l'analisi conformazionale dettagliata.

#### **1.4. COSY SPECTRUM (COrrelation SpettroscopY)**

Una delle tecniche NMR bidimensionali è l'esperimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, questo esperimento consente di osservare accoppiamenti scalari tra i protoni. È un'esperimento di correlazione omonucleare di chemical shift attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin attraverso due ( $^2J_{\text{H-H}}$ ) o tre legami ( $^3J_{\text{H-H}}$ ). Nello spettro COSY appaiono due tipi principali di segnali:

1. picchi diagonali che rappresentano lo spettro originale, come in un esperimento monodimensionale;
2. picchi di correlazione, che mostrano la presenza di accoppiamento scalari tra i nuclei.

I segnali accoppiati possono essere individuati tracciando linee orizzontali e partendo dal picco di correlazione fino ad intersecare la diagonale. La sequenza ordinata delle correlazioni è utilizzata per definire sistemi di spin; tuttavia nello spettro COSY gli accoppiamenti scalari di spin si interrompono qualora sia presente un eteroatomo (ad es. ossigeno, zolfo etc.).

## 1.5. ESPERIMENTI HSQC- HMBC

Gli esperimenti HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) (Palmer III, A.G.,1991) danno informazioni sulla correlazione dei nuclei  $^{13}\text{C}$  con i protoni direttamente accoppiati ad essi, lo spettro HSQC rileva i carboni direttamente legati agli idrogeni. Si tratta di un accoppiamento tramite un solo legame  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ . L'asse  $F_1$ , che deriva dall'intervallo di tempo incrementale  $t_1$  costituisce l'asse dei protoni. L'asse  $F_2$ , che deriva da  $t_2$  è l'asse del carbonio. Durante l'acquisizione viene applicato un disaccoppiamento a banda larga nel canale del protone, in modo che i segnali del carbonio ottenuti in ciascun FID siano dei singoletti. Essendo in presenza di esperimenti con accoppiamenti eteronucleari non esiste una diagonale, né simmetria. Lo svantaggio degli esperimenti HSQC e HMQC è che, a causa della scarsa abbondanza isotopica del  $^{13}\text{C}$  (1,1%), si riescono ad individuare solo i protoni direttamente legati ad un carbonio  $^{13}\text{C}$ .

L'esperimento HMBC (Bax, A.,1986) (*Heteronuclear Multi Bond Correlation*) si basa su correlazioni eteronucleari  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  attraverso due legami ( $^2\text{J}$ ) o tre legami ( $^3\text{J}$ ) (*longe range*) offrendo uno spettro che consente di connettere tra di loro le subunità della struttura molecolare individuate attraverso l'analisi degli altri spettri bidimensionali. Quindi è possibile ottenere delle correlazioni tra carboni quaternari (non visibili negli esperimenti HSQC e HMQC) con i protoni ad essi vicini.

## 1.6. TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA STEREOCHIMICA

La determinazione della configurazione relativa ed assoluta di un composto naturale rappresenta una tappa indispensabile per la caratterizzazione strutturale. La stereochimica di una molecola ci consente di ricostruirne l'aspetto tridimensionale, ciò è utile per studiare

in seguito le eventuali attività biologiche e le interazioni farmaco-recettore della molecola stessa. Di solito, nella determinazione della stereochimica, si procede prima con lo stabilire la configurazione relativa dei centri chirali.

Attraverso la spettroscopia NMR è possibile ottenere importanti informazioni sull'assetto tridimensionale delle molecole, soprattutto in merito ai sistemi rigidi. I parametri più significativi nella determinazione della configurazione relativa attraverso l'NMR sono: i valori dei chemical shift ( $\delta$ ), le costanti di accoppiamento (J) e gli effetti NOE. I chemical shift dei protoni sono influenzati dal loro intorno chimico, pertanto i protoni di due diastereoisomeri risentono di un intorno chimico differente .

Nell'ambito della spettroscopia NMR, possono essere ottenute numerose informazioni sulla stereochimica relativa di una molecola organica dallo studio dei valori delle costanti di accoppiamento ( $J_{H-H}$ ). Ciò viene determinato attraverso la legge di Karplus:

$${}^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$

che va a calcolare il valore delle costanti, sia omonucleari,  ${}^3J_{H-H}$ , che eteronucleari,  ${}^3J_{C-H}$ , dipende dall'angolo diedro  $\theta$  tra gli atomi accoppiati (Karplus, 1959). I valori di  ${}^3J_{H-H}$  sono molto piccoli, circa 0-1,5 Hz, quando l'angolo  $\theta$  è all'incirca di  $90^\circ$ , mentre i valori aumentano notevolmente quando  $\theta$  ha valori intorno a  $0^\circ$  o  $180^\circ$ . Inoltre è possibile distinguere facilmente una relazione assiale-assiale tra due protoni di un ciclo a sei termini,  ${}^3J_{a-a} \sim 7-9$  Hz, rispetto a quella assiale-equatoriale  ${}^3J_{a-e} \sim 3$  Hz e a quella equatoriale-equatoriale  ${}^3J_{e-e} \sim 2,5$  Hz. Di conseguenza è possibile determinare la relazione cis-trans tra i protoni di un doppio legame *cis-trans* tra i protoni di un doppio legame,  ${}^3J_{cis} \sim 6-12$  Hz,  ${}^3J_{trans} \sim 14-20$  Hz.

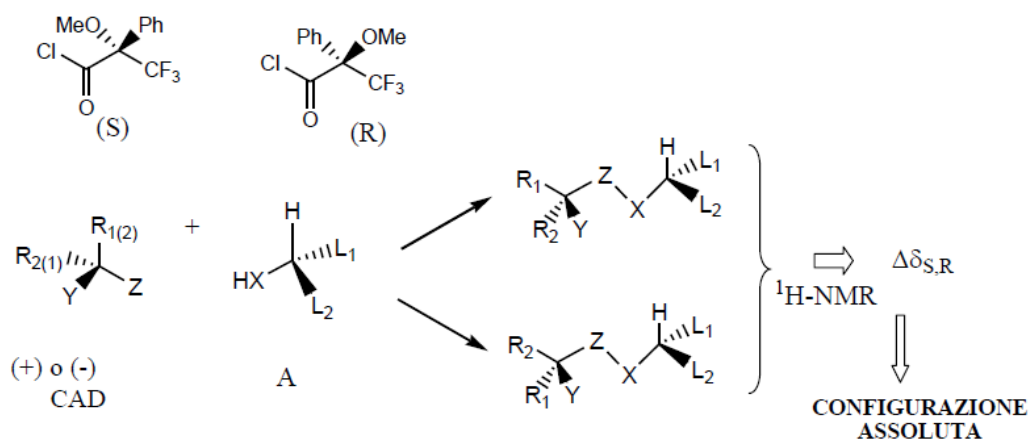
Altre importanti informazioni in merito alla stereochimica, in particolare la configurazione relativa dei centri stereogenici di una molecola, possono essere ottenute dallo studio degli accoppiamenti omonucleari tra protoni spazialmente vicini (accoppiamento dipolare) e non necessariamente accoppiati attraverso i legami (accoppiamento scalare). Inoltre per stabilire una relazione spaziale tra i sostituenti di una molecola si può ricorrere anche all'effetto NOE (Sanders, J., K., M., 1982). Le intensità delle interazioni dipolari NOE dipendono dalla dimensione della molecola, infatti all'aumentare delle dimensioni delle molecole gli accoppiamenti NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) sono difficilmente evidenziabili, perché prossimi allo zero.

## 1.7. DETERMINAZIONE CONFIGURAZIONE ASSOLUTA

Un metodo efficiente per determinare la configurazione assoluta di composti organici in soluzione, è basato proprio sulle tecniche NMR. Il metodo definito di Mosher consiste nella derivatizzazione di un substrato chirale (A) del quale si vuole determinare la configurazione assoluta o la purezza enantiomerica, con i due enantiomeri di un agente derivatizzante chirale (CAD) e nell'analisi NMR dei due risultanti diastereoisomeri (Dale, J., 1968).

La configurazione del composto è stabilita sulla base di un modello conformazionale che mette in correlazione tale configurazione con il segno delle differenze osservate per i chemical shifts protonici ( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ) dei sostituenti direttamente legati al centro stereogenico. Di solito la reazione di derivatizzazione utilizzata è una reazione di acilazione e quindi il substrato chirale è un alcol secondario (caso più comune) o, un alcol primario con un centro stereogenico in  $\alpha$ , o un'ammina o un acido carbossilico. L'agente derivatizzante chirale deve invece presentare i seguenti requisiti: a) deve contenere un gruppo funzionale (Z) in grado di reagire quantitativamente con il gruppo funzionale (HX); b) deve contenere un sostituito (Y) a forte carattere anisotropico (di solito un anello aromatico), in modo da influenzare i chemical shifts dei sostituenti L1 e L2; c) dovrebbe contenere un gruppo polare (W) che possa fissare una conformazione preferenziale.

L'agente CAD di gran lunga più utilizzato è il reattivo di Mosher, cioè il cloruro dell'acido 2- metossi-2-fenil-2-trifluorometil acetico o MTPA).



**Figura 1.3** Metodo generale di determinazione della configurazione assoluta attraverso NMR

Sulla base delle osservazioni sperimentali accumulate su diversi alcoli secondari a configurazione nota, Mosher osservò che era presente un andamento sistematico dei valori dei chemical shifts protonici dei corrispondenti esteri derivatizzati con il reattivo di Mosher (Dale, J.A., 1969). I dati ottenuti potevano essere interpretati considerando l'esistenza in soluzione di una conformazione preferenziale, in cui il protone carbonilico, il carbonile estereo ed il gruppo trifluorimetilico si trovano sullo stesso piano dell'MTPA. Se l'MTPA si trova nella conformazione supposta, Mosher osservò che i valori dei protoni H<sub>A</sub> vicini al centro carbonilico chirale, nell'(S)-MTPA devono essere più alti dei corrispondenti valori osservati per l'(R)-MTPA.

Successivamente il metodo di Mosher subì delle modifiche da parte di Kakisawa e Kahman, ed è quello che viene utilizzato attualmente per la determinazione della configurazione assoluta di alcol secondari chirali. Il metodo modificato cerca di assegnare il maggior numero possibile di risonanze protoniche dei gruppi adiacenti al centro carbonilico. Una volta assegnate le risonanze, per ciascuno dei due esteri diastereoisomerici si calcolano i valori di  $\Delta$ , riportati per convenzione  $\Delta_S - \Delta_R$ . Se l'estere assume la conformazione preferenziale, tutti i protoni localizzati alla sinistra del piano dell'MTPA avranno valori di  $\Delta \leq 0$ , mentre quelli a destra avranno valori di  $\Delta > 0$ .

## 1.8. SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente di determinare il peso molecolare di un composto e si basa sulla ionizzazione di una molecola e sulla successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica ( $m/z$ ). La molecola viene ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma in parte si frammenta dando origine a molecole e/o radicali neutri ed in parte generando cationi e/o radicali cationi. Gli ioni che si originano per frammentazione, vengono differenziati sulla base del loro rapporto massa/carica rilevati attraverso un detector. Questa tecnica consiste nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione degli ioni prodotti e nella loro rivelazione e a differenza delle altre tecniche spettroscopiche è un metodo di tipo distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi).

La ionizzazione elettrospray (*ElectroSpray Ionization* ESI) prevede l'applicazione di una tensione ionizzante lungo l'ago nebulizzatore. Si ha una nebulizzazione molto fine, da cui

il solvente può essere rimosso. Le particelle vengono ionizzate e trascinate verso un magnete analizzatore. Questa tecnica è utilizzata per biomolecole idrosolubili come peptidi, proteine e carboidrati. Il risultato è uno spettro che evidenzia il picco dello ione molecolare, che rappresenta il peso molecolare del composto analizzato.

## **CAPITOLO 2**

*Olea europea L.*



# *Olea europea* L.

Famiglia

**Oleaceae**

Nome italiano

**Olivo**



**Figura 2.1** Foglie *Olea europea* L.

## **2.1. MORFOLOGIA**

L'olivo (*Olea europea* L.) appartiene alla famiglia delle Oleaceae, che comprende circa trenta generi, a portamento arboreo o arbustivo e distribuiti nelle regioni temperate e subtropicali, alcuni dei quali di notevole valore ornamentale. È un albero sempreverde che può raggiungere i 15 metri di altezza. Le foglie sono opposte e vanno da lanceolate a ovali e orbicolari, talora troncate. I fiori sono piccoli e bianchi, riuniti in brevi pannocchie ascellari. Il frutto è una drupa (olivo) polposa. L'olivo presenta, a differenza delle altre specie coltivate, un vasto patrimonio genetico rappresentato da più di 1200 varietà, oltre che da un esteso numero di piante selvatiche; il germoplasma italiano rappresenta il 48% del di tutto il germoplasma conosciuto, essendo costituito da circa 600 cultivar tra cui molti esemplari antichi (Bartolini, 2005). Numerosi sono i fenomeni che hanno portato a una

grande variabilità genetica: prima di tutto l'olivo è una specie allogama con elevato grado di etero-impollinazione che conduce ad un elevato polimorfismo tra gli individui (Rallo, 2000).

## **2.2. DISTRIBUZIONE**

È molto diffuso nelle regioni temperate e subtropicali. In Italia è diffuso su tutto il territorio. Si trova nelle leccete, negli arbusteti e nelle macchie delle aree costiere. In Molise l'olivo coltivato, invece, è presente in tutto il territorio regionale fino a 800 m s.l.m.

## **2.3. PRINCIPI ATTIVI DELLE FOGLIE DI *Olea europea* L.**

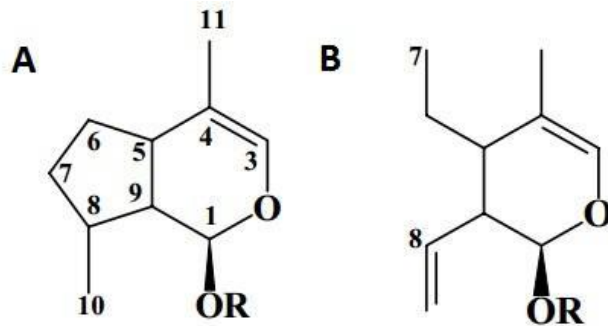
Studi epidemiologici hanno dimostrato che la prevenzione del rischio di malattie croniche, come il cancro e le malattie cardiovascolari, è correlata al consumo regolare di frutta e verdura nella dieta, in quanto sono prodotti ricchi di polifenoli. L'aumento dello stress ossidativo è una delle concause dell'insorgenza di malattie croniche (Birt, D.F., 2001; Benetou, V., 2008). Numerosi studi scientifici ed epidemiologici hanno dimostrato che un regolare consumo di frutta e verdura potrebbe ridurre o prevenire il rischio di malattie croniche correlate allo stress ossidativo (Owen, R.W). Frutta, verdura, olio di oliva e grano integrale sono delle componenti base della dieta mediterranea, ricchi di composti fito-chimici che svolgono una notevole attività antiossidante. Molti di questi composti naturali sono: carotenoidi, fenoli, alcaloidi, composti che contengono azoto e zolfo. Il consumo di tali composti "nutraceutici" possono diminuire il rischio di incidenza di malattie degenerative e prevenire il danneggiamento del DNA causato dall'azione dei radicali liberi (Stanner, S.A., 2004, Djuric, Z., 1998).

Le antichissime origini dell'olivo coltivato sono testimoniate da reperti del neolitico, che attestano l'uso di olive come alimento e l'utilizzo delle foglie di olivo come medicamento. Queste tracce storiche confermano che l'utilizzo di questa pianta risale almeno al 5000 a.C. (Zohary e Hopf. 1994). L'olivo è uno dei più importanti alberi da frutta nell'area del mediterraneo, dove la coltivazione delle drupe ha un forte valore storico, culturale ed economico. Nella medicina popolare, il decotto o l'infuso di foglie di olivo, viene utilizzato per la cura di diverse malattie infiammatorie quali: coliche epatiche,

gastroenteriti, nefriti, cistiti, febbre e malaria, inoltre viene impiegato per il trattamento topico di ferite, ustioni ed ulcere. (Cecchini, T., 1992; Leporatti, M.L., 1985). Le foglie di olivo sono una ricca fonte di metaboliti secondari come i secoiridoidi e i fenoli. I secoiridoidi sono composti chimici che contribuiscono all'abbassamento della pressione arteriosa e della glicemia in soggetti diabetici (Gonzalez, M., 1992). Studi eziologici hanno dimostrato che il decotto di foglie di olivo è molto efficace per la riduzione dei livelli di colesterolo nel sangue (De Pasquale, R., 1991). L'Oleuropeina è uno dei metaboliti isolati più abbondante nelle foglie di ulivo, il quale va a migliorare il metabolismo dei lipidi e quindi riduce le cause correlate all'obesità, è un agente antitumorale in quanto agisce sul citoscheletro ed ha una notevole attività antivirale contro l'HIV. Inoltre il decotto viene adoperato per abbassare i livelli di uricemia, in quanto alcuni dei composti in esso contenuti vanno ad inibire l'azione dell'enzima xantina ossidasi (De Marino, S., 2012). Le foglie di olivo sono state recentemente inserite nella Farmacopea Europea (estratto etanologico 80%). Nell'olio d'oliva è stata rilevata un'elevatissima attività antiossidante, dovuta alla presenza anche in questo caso di flavonoidi, fenoli e derivati dell'oleuropeina (Japon-Lujan, R., 2008). Recentemente, l'attenzione della ricerca si è focalizzata sugli estratti (tisane o infusi) di origine vegetale, in modo da individuare delle molecole con una potenziale attività antiossidante ed utilizzarle in sostituzione dei composti di sintesi (Stone, W.L., 2003).

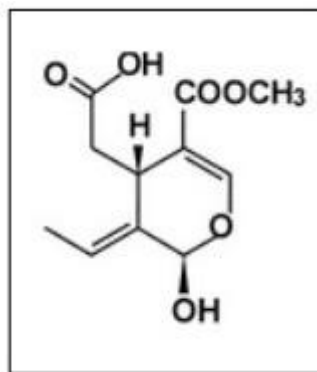
## **2.4. SECORIDOIDI**

I secoiridoidi sono i composti prevalenti nelle foglie di olivo, la loro particolare struttura chimica deriva dagli iridoidi. Gli iridoidi sono dei monoterpeni basati su uno scheletro ciclopentano-[C]-pirano che può essere costituito da dieci, nove, o raramente otto atomi di carbonio. La scissione del legame in posizione C7-C8 della struttura del ciclopentano, comporta la formazione del secoiridoide (Sampaio-Santos e Kaplan, 2001).



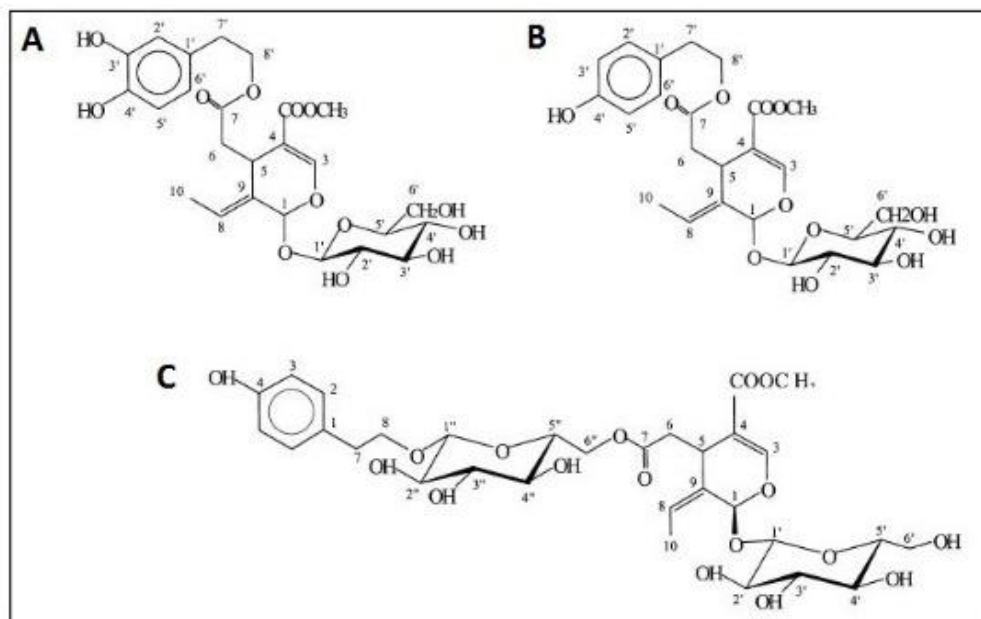
**Figura 2.2** A) Struttura base iridoide B) Struttura base secoiridoide

Le caratteristiche principali di classificazione dei secoiridoidi si basano sia sulla struttura chimica che su postulati biosintetici (Pérez, J. A., 2005). Infatti, la biosintesi potrebbe procedere attraverso due vie metaboliche differenti e, sebbene la struttura dei secoiridoidi è simile, queste molecole possono dividersi in due gruppi principali: quelli contenenti un doppio legame in posizione C-8,C-9 e gli altri contenenti un doppio legame C-8,C-10. Entrambe le vie biosintetiche si basano sullo stesso precursore l'acido deossiiloganico, il quale si origina dall'acido mevalonico formatosi dal metabolismo dell'acetato. Le vie biosintetiche 1 e 2 procedono separatamente alla formazione dei due isomeri strutturali secologanin e oleoside-11-metil estere, come è illustrato nella figura 2.5. I secoiridoidi che derivano dalla via biosintetica 1 non sono stati identificati nelle drupe dell'olivo, ad eccezione dell'oleuroside che è stato isolato nelle foglie di olivo. Invece, i secoiridoidi derivati dalla seconda via biosintetica, insieme a numerosi derivati fenolici, sono stati identificati nelle foglie di olivo e denominati oleosidi (Ryan, D. 2002). Lo scheletro dell'oleoside è costituito dall'acido elenolico. (Figura 2.3)



**Figura 2.3** Acido elenolico

La presenza dei secoiridoidi, derivati dall'oleoside, all'interno delle drupe subisce delle variazioni in base alla maturazione del frutto; la più alta concentrazione di secoiridoidi è stata valutata nel frutto immaturo, mentre si riscontra una notevole diminuzione durante la fisiologica maturazione. Questo, probabilmente è dovuto all'aumento dell'attività di enzimi idrolitici durante il processo di maturazione (Ryan, D., 2002). I secoiridoidi più abbondanti nella specie *Olea europea* sono l'oleuropeina (nella forma glicosilata e non) e la ligstroside e la nuzhenide (Servilli e Montedoro, 2002). (Figura 2.4)



**Figura 2.4** Strutture: A oleuropeina, B Ligstroside, C Nuzhenide

Gli iridoidi e i secoiridoidi mostrano un'elevata attività biologica e farmacologica. L'oleuropeina, il secoiridoide più abbondante nell'estratto di foglie di olivo, ha mostrato una notevole attività antiossidante e proprietà antinfiammatorie come si evince dai dati di letteratura (Visioli, F., 2002; Visioli, F., 1998); previene l'insorgere di malattie cardiache proteggendo la membrana lipidica, migliora il metabolismo dei lipidi e aiuta a mantenere inalterata la tonicità dei vasi sanguigni (Andreadou., I., 2002). Inoltre, sono state riscontrate attività antimicrobiche, antivirali e proprietà antitumorali (Tripoli, E., 2005; Owen, R.W., 2000). L'Oleuropeina isolata dalle foglie di *O.europea* non è tossica, quindi può essere somministrata senza particolari effetti collaterali. Non ha un'elevata biodisponibilità, ciò dipende dalla grandezza della molecola e dal suo assetto planare; tuttavia la glicosilazione

in posizione C-1 potrebbe aumentare l'assorbimento da parte delle cellule epiteliali presenti nell'intestino tenue (El and Karakaya, 2009).

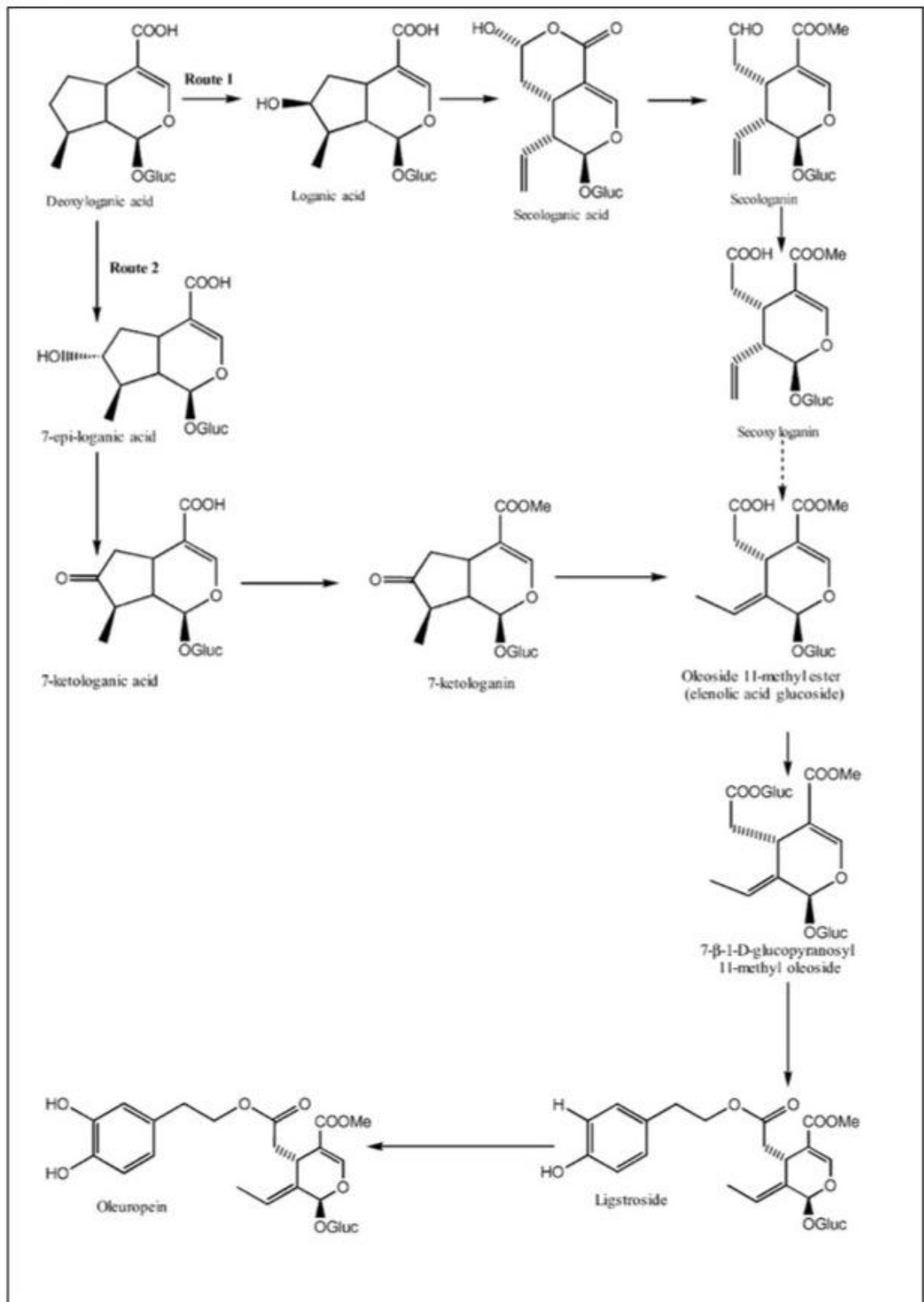
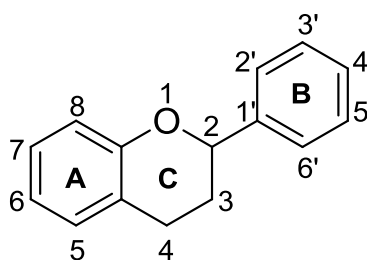


Figura 2.5 Biosintesi dei secoridoidi

## 2.5. FLAVONOIDI

I flavonoidi fanno parte dei polifenoli a basso peso molecolare che derivano dalle piante, derivano dal benzo- $\gamma$ -pirano costituito da 15 atomi di carbonio, che vanno a formare due anelli fenolici, legati da una catena alifatica condensata che va a formare un'anello piranico, o raramente furanico.

I flavonoidi sono sintetizzati a partire dagli amminoacidi aromatici quali la fenilalanina e la tirosina, e dal malonato. Le modificazioni che si verificano sulla struttura di base, con l'aggiunta o la rimozione di sostituenti, comporta la formazione delle diverse classi di flavonoidi. Le modifiche consistono principalmente nella formazione di doppi legami, e nell'aggiunta di gruppi carbonili e idrossili sull'anello C. I flavonoidi si suddividono in quattro gruppi principali: flavoni, flavonoli, flavanoni e flavanoli, anche se esistono gruppi minori.



**Figura 2.6** Struttura di un benzo- $\gamma$ -pirano

I flavonoidi appartengono alla classe di polifenoli, e dai dati di letteratura si evince che svolgono una notevole attività antiossidante, ciò dipende probabilmente dai gruppi idrossili presenti sulla struttura di base. Il gruppo idrossile sull'anello B è il principale responsabile della capacità *scavenger* dei flavonoidi all'attacco delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In particolare, l'unità catecolica 3' - 4' dell'anello B, ha una notevole capacità di inibizione della perossidazione lipidica. I flavonoidi sono presenti in quasi tutte le specie vegetali, anche dall'*Olea europea* sono stati identificati differenti tipi di flavonoidi: flavoni (luteolina-7-glucoside, apigenina-7-glucoside), flavonoli (rutina, quercetina), flavanoli (catechina) e flavanonoli (taxifolina). Come è stato osservato nei secoiridoidi, anche i flavonoidi hanno un'elevata attività antiossidante, antinfiammatoria, antimicrobica e antivirale (Cushnie and Lamb, 2005).

## 2.6. CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE METABOLITI SECONDARI DA *Olea europea* L.

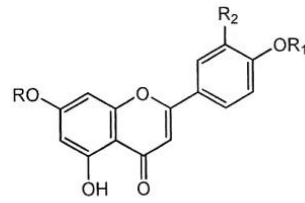
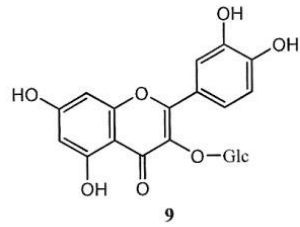
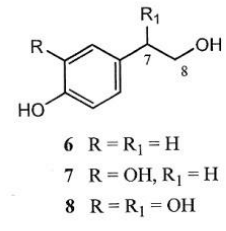
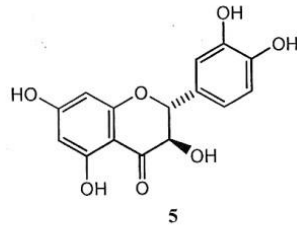
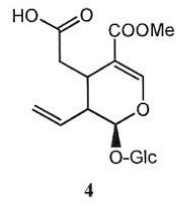
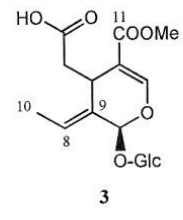
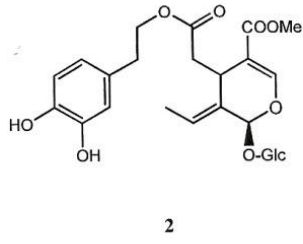
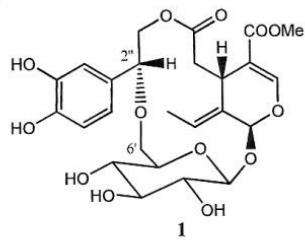
Le foglie di olivo campionate sono state trattate in due modi differenti: 250 g sono state utilizzate per la preparazione del decotto (OELD) e 250 g sono state estratte con metanolo (OEL). I composti chimici preservati durante il decotto sono stati confrontati con quelli isolati dall'estratto metanolico.

Entrambi gli estratti OELD e OEL sono stati ripartiti tramite metodica di Kupchan (Kupchan, 1973) utilizzando solventi a polarità crescente. La frazione *n*-butanolica dell'estratto OELD è stata frazionata mediante DCCC e successivamente purificata tramite HPLC. I dati forniti dagli esperimenti NMR (Varian Inova 500 MHz) hanno consentito la caratterizzazione dei seguenti composti: fraxamoside (**1**), oleuropeina (**2**), oleoside 11-metil estere (**3**), secoxiloganina (**4**), taxifolina (**5**), tirosolo (**6**), idrossitirosolo (**7**), 3,4 diidrossi-fenil glicole (**8**), quercetina-3-O-glucoside (**9**), luteolina-7-O-glucoside (**10**), luteolina-4'-O-glucoside (**11**), apigenina-7-O-neohesperidoside (**12**), apigenina-7-O-rutinoside (**13**).

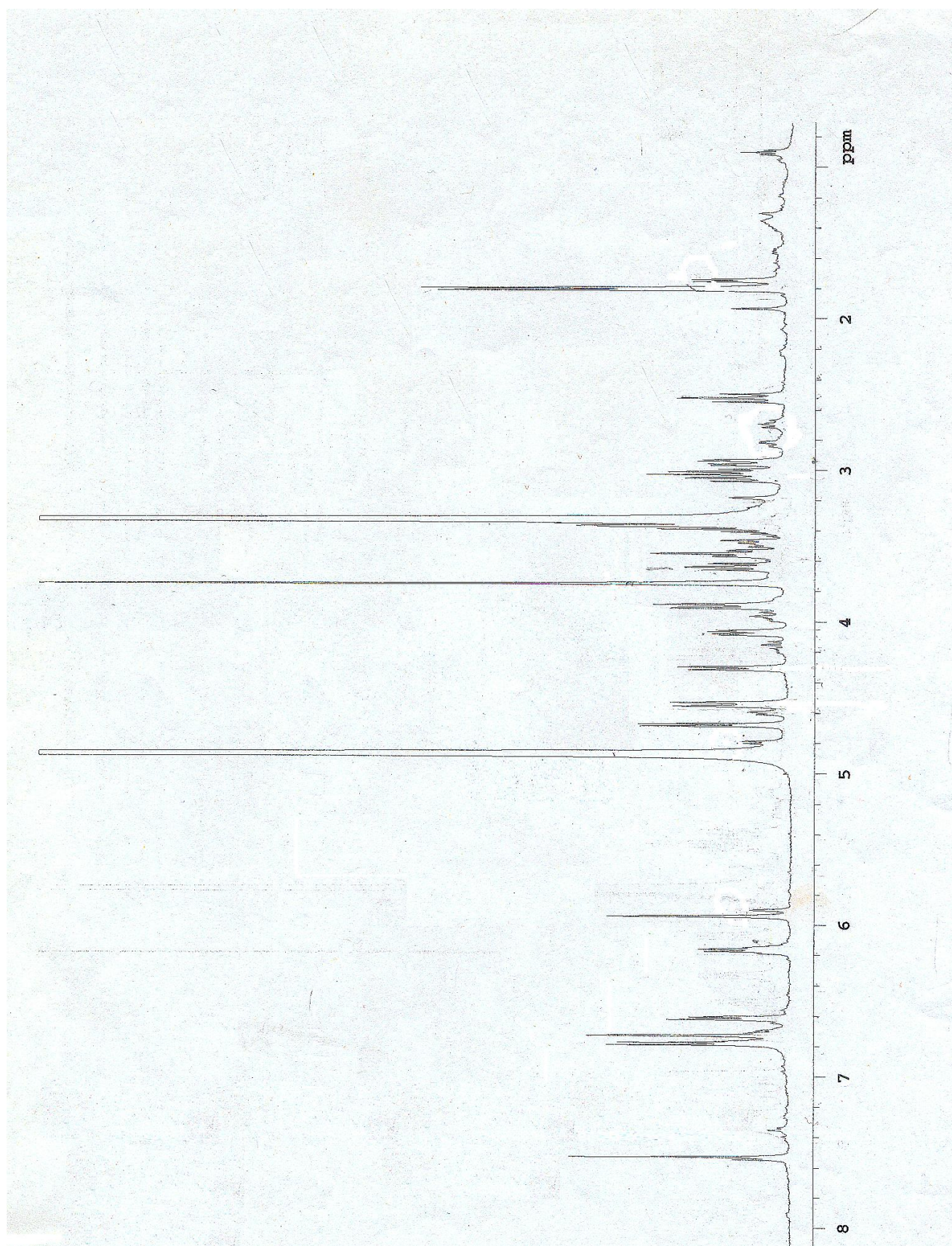
Dalla frazione *n*-butanolica dell'estratto metanolico (OEL) sono stati frazionati i seguenti metaboliti secondari: oleuropeina (**2**), oleoside 11-metil estere (**3**), tirosolo (**6**), idrossitirosolo (**7**), luteolina-7-O-glucoside (**10**).

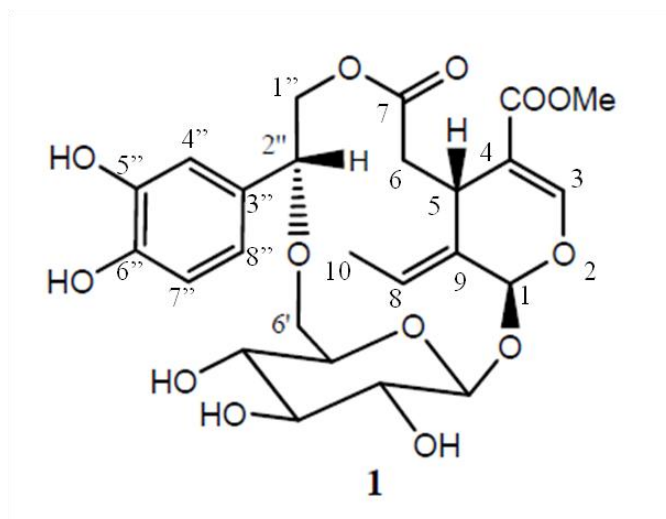
I seguenti composti, fraxamoside, taxifolina e apigenina-7-O-neohesperidoside, sono stati isolati ed identificati per la prima volta nell'estratto di foglie della specie *Olea europea* L. La diversità osservata nella composizione chimica dei due estratti, è giustificata dai diversi metodi estrattivi applicati; la frazione ottenuta dal decotto è stata sottoposta ad un'elevata temperatura, inoltre l'estratto acquoso è caratterizzato da una polarità maggiore rispetto all'estratto metanolico.





Spettro  $^1\text{H}$ -NMR,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , (500 Hz) Fraxamoside (1)





## FRAXAMOSIDE

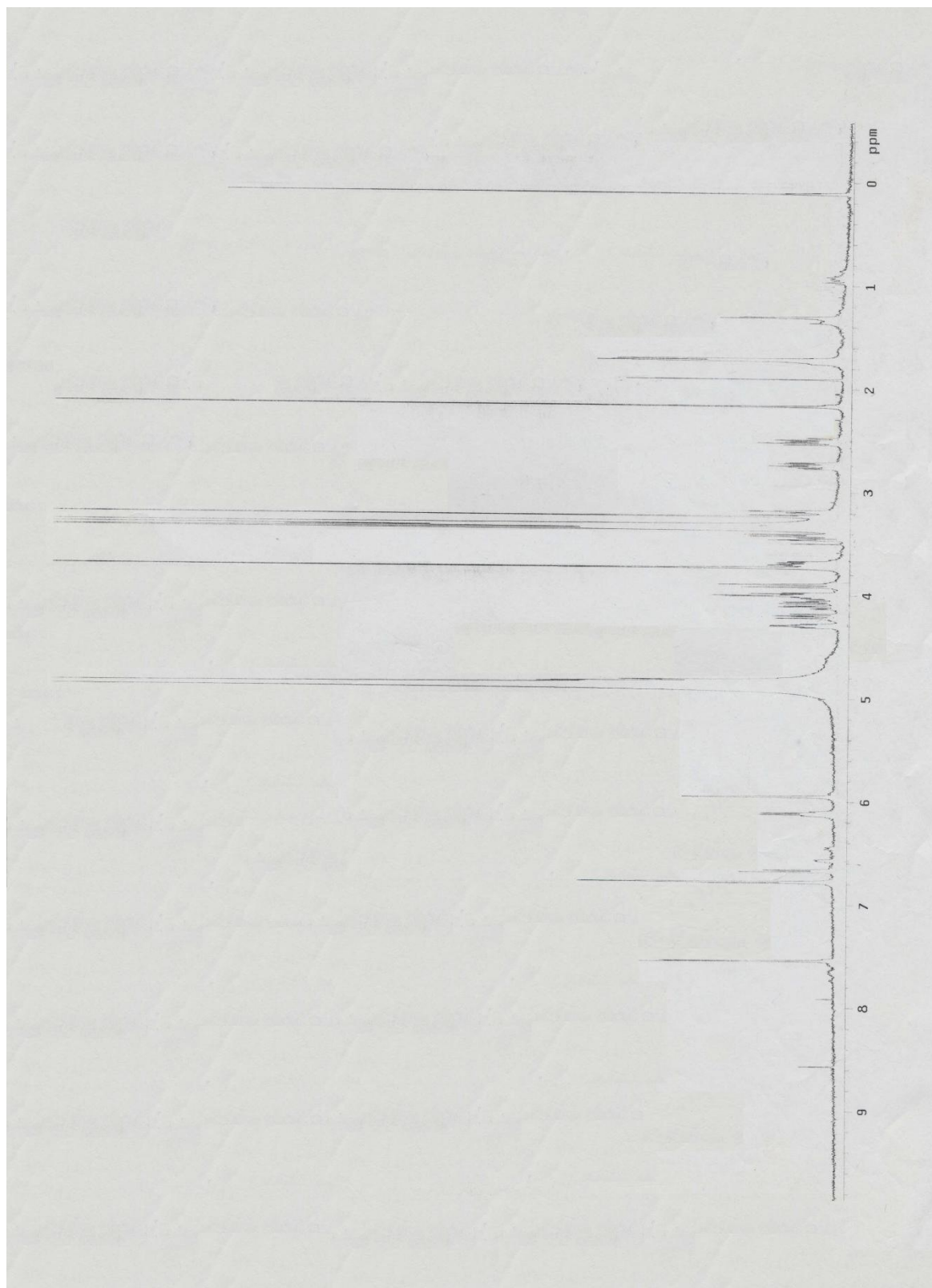
L'analisi attraverso spettrometria di massa ESI (ioni positivi) rivela che il fraxamoside ha 2 unità di massa in meno rispetto all'oleuropeina e mostra un'ione pseudomolecolare a  $m/z$  539  $[M+H]^+$ . L'analisi dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  presenta tutti i segnali distribuiti da  $\delta$  1.70 ppm a  $\delta$  7.55. Parte di questi segnali risultano simili a quelli osservati per l'identificazione dello scheletro del secoiridoide oleuropeina. Dalla molteplicità dei segnali, è evidente la presenza di un monosaccaride. Dall'analisi dello spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  sono presenti 21 segnali. Dall'esperimento COSY è possibile individuare i segnali inerenti allo scheletro del secoiridoide dall'H-1 all'H-10, tuttavia alcuni segnali risultano spostati rispetto a quanto osservato nell'oleuropeina, in particolare H-1 risuona a campi più bassi  $\delta$  5.93 rispetto al valore di  $\delta$  5.86 osservato nell'oleuropeina. Lo stesso comportamento si osserva per gli idrogeni legati al C-6 che risuonano a  $\delta$  2.50 e a  $\delta$  2.94 shiftati rispetto ai valori di  $\delta$  2.4 e  $\delta$  2.65 osservati nell'oleuropeina. Dall'esperimento COSY, si denota la presenza di un sistema aromatico 1,3,4 trisostituito ed imputabile ad un residuo di idrossitiroso, ma anche in questo caso si denota una variazione nei chemical shift dei protoni 4'', 7'' e 8'' che risuonano rispettivamente a  $\delta$  6.71 (d),  $\delta$  6.76 (dd) e  $\delta$  6.60 (d). Una sensibile variazione di chemical shift si nota per i protoni H-1'' e H-2'' che costituiscono la catena laterale dell'idrossitiroso. Questi sono accoppiati tra loro e risuonano rispettivamente a  $\delta$  4.53 e  $\delta$  4.29 sensibilmente shiftati a campi bassi rispetto a quanto osservato nell'oleuropeina. Sempre attraverso l'esperimento COSY è stata definita la sequenza dei protoni del monosaccaride. Partendo dal protone anomero a  $\delta$  4.67 è possibile assegnare il protone H-2' ( $\delta$  3.35), H-3' ( $\delta$  3.37), H-4' ( $\delta$  3.01), H-5' ( $\delta$  3.35) e i due protoni in C-6' che risuonano a  $\delta$  3.03 e  $\delta$  3.88 (Tabella 2.1) Dai valori assegnati si evince che l'H-4'

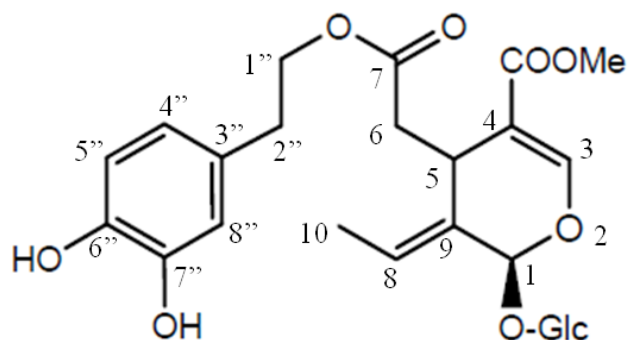
subisce un notevole shift a campi alti assieme ad uno dei protoni in C-6' ( $\delta$  3.03), mentre l'H-2' si osserva spostato a  $\delta$  3.35. Attraverso l'esperimento HSQC ciascun protone è stato correlato con il corrispondente atomo di carbonio. In particolare si è osservato che H-2'' ( $\delta$  4.29) correla con il corrispondente carbonio a  $\delta$  83.9, mentre i protoni H<sub>2</sub>-6' dell'unità di glucosio correlano con il corrispondente C-6 a 69.7 ppm. Una leggera variazione, in merito ai valori dei chemical shifts, si osserva anche per C-1'' (67.7 ppm) a campi più bassi rispetto all'oleuropeina. Al fine della definizione della struttura è stato effettuato l'esperimento HMBC che ha consentito di connettere i vari frammenti individuati dagli esperimenti COSY e HSQC. Particolarmente significative sono risultate alcune correlazioni. In posizione C-1 del secoiridoide è legata l'unità di glucosio in quanto è presente una correlazione <sup>3</sup>J tra l'H-1 ( $\delta$  4.43) e il C anomero a 103.5 ppm. Il residuo di idrossitirosolo va ad esterificare la funzione carbossilica come risulta dalla correlazione <sup>3</sup>J tra l'H-1'' ( $\delta$  4.53) con la funzione carbonilica a 171.7 ppm. Di particolare rilievo è la correlazione <sup>3</sup>J osservata il protone H-2'' a  $\delta$  4.29 con il C-6' dell'unità di glucosio a 69.7 ppm. Questi dati lasciano presupporre che la funzione alcolica primaria del glucosio al C-6' vada a legare con il C-2'' dell'idrossitirosolo formando un sistema etero a 14 atomi che è stato individuato una sola volta in precedenza da *Fraxinus americana* e al quale è stata assegnata la denominazione fraxamoside. La configurazione al C-2'' è stata assegnata come 2R sulla base dell'esperimento ROESY. In quanto il protone a  $\delta$  4.29 mostra un effetto ROE con H-6' ( $\delta$  3.03) e con uno dei protoni in C-1'' a  $\delta$  3.63. Sempre dall'esperimento ROESY inoltre si osservano delle correlazioni dipolari tra H-1  $\delta$  5.93 e uno degli H-6 ( $\delta$  2.50) e il protone anomero a  $\delta$  4.67 che quindi devono trovarsi sulla faccia  $\alpha$  del macrociclo rigido. È interessante notare che l'anomalo spostamento a campi alti del H-6' a  $\delta$  3.03 e H-4' a  $\delta$  3.01 dell'unità di glucosio è imputabile all'effetto di schermo generato dal sistema aromatico. Una inusuale struttura con la configurazione in C-2 di tipo 2S è stata isolata in precedenza solamente dalle olive da tavola *Throuba thassos* ed è stato denominato fraxamoside B (Zoidou, E., 2008).

**Tabella 2.1** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Fraxamoside (1)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1	5.93 s	98.8	C1'
2			
3	7.51 s	154.3	C5 C1 C4
4		108.4	
5	4.06 dd (12.0,4.5)	31.3	C1 C4 C8 C3 C6
6	2.50 dd (13.5,12.0) 2.94 dd (13.5,4.5)	38.8	
7		171.7	
8	6.16 qd (7.0,1.0)	124.4	C10 C5 C1
9		129.4	
10	1.80 dd (7.0,1.5)	12.7	
OMe	3.76 s	51.0	
Glucosio			
1'	4.67 d (7.5)	103.5	C1
2'	3.35 dd (9.5,7.5)	73.4	C3'
3'	3.37 dd (9.5,9.0)	76.8	C4'
4'	3.01 dd (9.5,9.0)	71.9	C5'
5'	3.53 dd (9.5,2.0)	76.5	
6'	3.03 dd (12.0,9.5) 3.88 dd (12.0,2.0)	69.7	
1''	3.63 dd (12.0,1.5) 4.53 dd (12.0,9.0)	67.7	C7
2''	4.29 dd (9.0,1.5)	83.9	C1''
3''		129.6	
4''	6.71 d (2.0)	113.5	C8'' C5'' C2''
5''		145.0	
6''		145.4	
7''	6.76 d (8.0)	116.5	C3'' C6'' C8''
8''	6.60 dd (8.0,2.0)	118.2	C6'' C4''

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz Oleuropeina (2)**





2

## OLEUROPEINA

Da una prima indagine lo scheletro del secoiridoide dell'oleuropeina è legato ad un'unità saccaridica ed è esterificato con un residuo di idrossitirosolo. Cio' si evince anche dai dati della spettrometria di massa ESI (ioni positivi) in cui compare uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  541  $[M+H]^+$ .

Dall' esperimento COSY è possibile seguire le sequenza di spin che individua il monosaccaride, il residuo del secoiridoide e la parte aromatica. Per quanto riguarda il secoiridoide si osservano due sequenze di spin e due segnali isolati a  $\delta$  4.14 e l'altro, inerente a un sistema olefinico, a  $\delta$  6.10. Dalla prima sequenza di spin il metile che risuona a  $\delta$  1.80 (d,  $J= 6.8$  Hz) risulta accoppiato con H-1 a  $\delta$  5.86. La seconda sequenza di spin coinvolge il protone in posizione 5 a  $\delta$  4.01 (dd) che risulta scalarmente accoppiato con i protoni a  $\delta$  2.48 e  $\delta$  2.65, i quali, dalla valutazione del loro chemical shift, sono posizionati in  $\alpha$  ad una funzione carbonilica. Il protone che risuona a  $\delta$  7.46 è legato al C-3 del secoiridoide ed è indicativo di una insaturazione. Dall'esperimento COSY inoltre è ben evidente un monosaccaride che, dai chemical shift e dalle costanti di accoppiamento, risulta essere una unità di glucosio. Partendo dal protone anomero a  $\delta$  4.90 è possibile individuare H-2' a  $\delta$  3.12, H-3' ( $\delta$  3.31), H-4' ( $\delta$  3.19), H-5' ( $\delta$  3.40) e due protoni H-6' che risuonano a  $\delta$  3.49 e  $\delta$  3.81. Il sistema aromatico si evince dai segnali a  $\delta$  6.65 (d,  $J= 8.0$  Hz),  $\delta$  6.80 (dd,  $J= 8.0, 1.2$  Hz) e  $\delta$  6.81 (d,  $J= 1.2$  Hz), i quali indicano la presenza di un sistema aromatico 1-3-4 trisostituito. (Tabella 2.2)

Lo spettro COSY mostra la presenza dei quattro segnali accoppiati fra loro a  $\delta$  4.37 e 4.14 e la coppia  $\delta$  2.82 e 2.43. Il primo sistema è assegnabile agli idrogeni adiacenti all'atomo di ossigeno della funzione esterea; la seconda coppia di protoni è collocabile in  $\alpha$  al sistema aromatico.

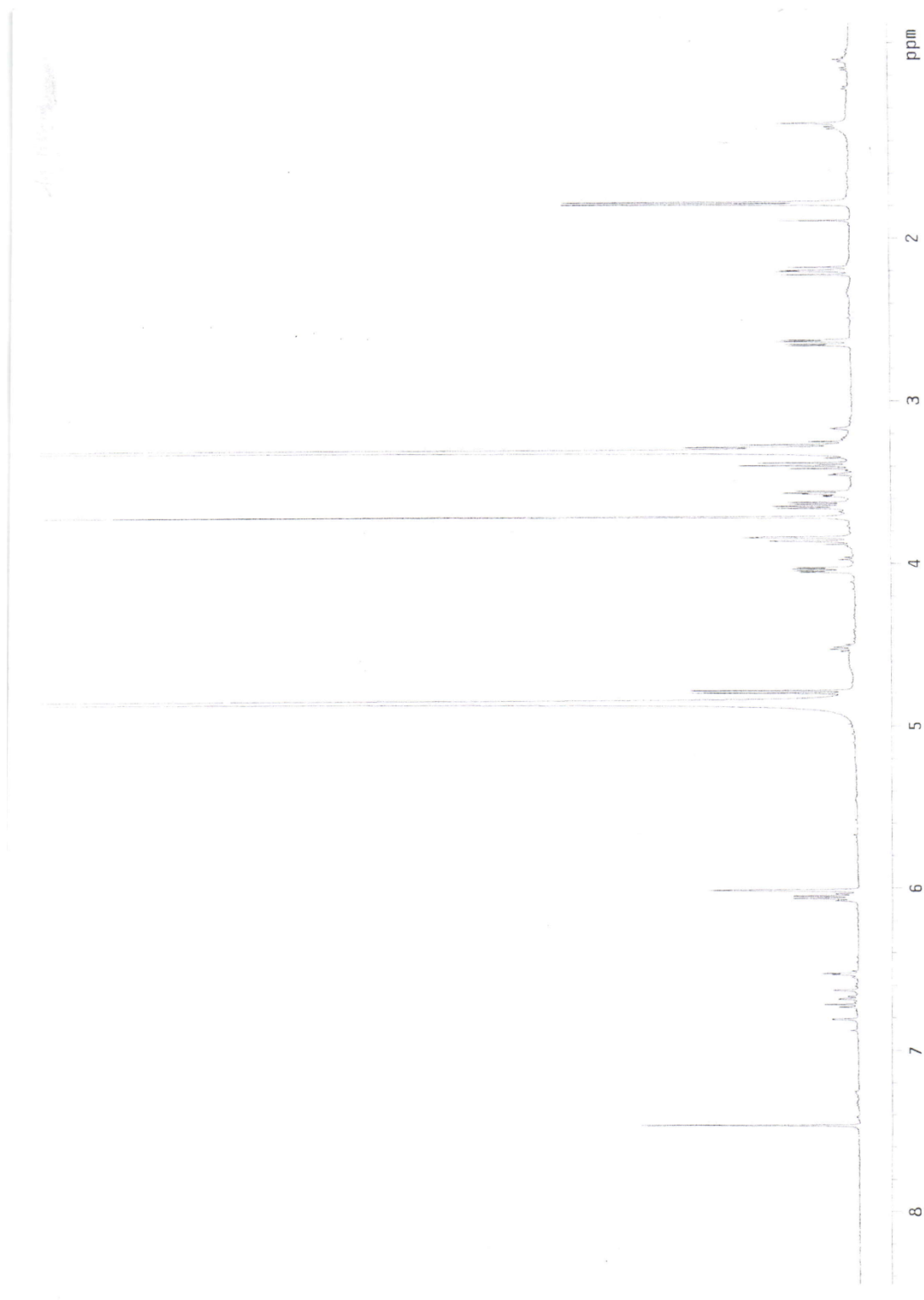
Dall'esperimento HSQC è stato possibile correlare i protoni con i corrispondenti atomi di carbonio, attraverso il successivo esperimento HMBC è stata determinata la struttura del composto ipotizzato dai dati ottenuti dal COSY. In particolare il protone a  $\delta$  5.86, assegnabile al H-1, mostra una correlazione  $^3J$  con il carbonio anomero del glucosio 99.4 ppm. Il protone olefinico a  $\delta$  7.46 mostra correlazioni  $^3J$  con il segnale a 166.7 che è assegnabile alla funzione esterea collocata al C-4 del secoiridoide. Il protone a  $\delta$  4.04 assegnabile al H-5 mostra moltissime correlazioni  $^2J$  e  $^3J$ ; in particolare con la funzione esterea (-COOMe, 166.7 ppm) con la funzione carbonilica (-COO-, 171.8 ppm), con il C-1 (93.8 ppm) e con il carbonio olefinico C-9 (129.9 ppm). Il residuo di tirosolo va ad esterificare la funzione carbossilica in C-7. In effetti ciò si evince dalle correlazioni HMBC tra i protoni in H-1'' con la funzione carbonilica a  $\delta$  171.8 ppm. Il gruppo OCH<sub>3</sub> mostra correlazioni  $^3J$  con la funzione carbossilica a  $\delta$  166.7 ppm. L'esperimento ROESY ha consentito di definire la stereochimica relativa al carbonio 5, infatti si osserva una interazione dipolare tra H-5 ( $\delta$  4.01, dd; J= 9.1, 4.5) con il metile in posizione 10 ( $\delta$  1.80) e uno dei protoni in C6 ( $\delta$  2.7) che quindi risultano essere spazialmente vicini. (Damtoft, S., 1992)

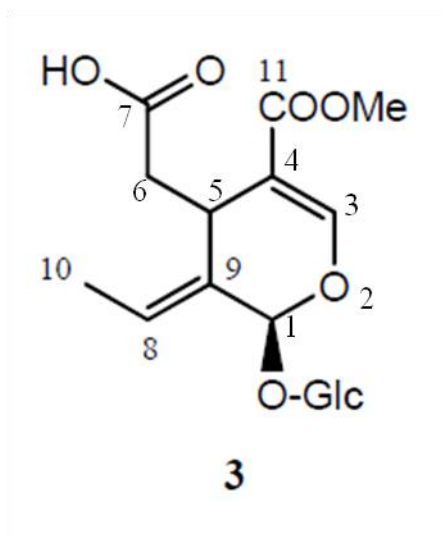
**Tabella 2.2** Dati  $^1H$ -NMR e  $^{13}C$ -NMR, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Oleuropeina (2)

POSIZIONE	$\delta_H$ /ppm (J in Hz)	$\delta_C$ /ppm
1	5.86 s	93.8
2		
3	7.46 s	153.4
4		108.5
5	4.01 dd (9.1,4.5)	30.7
6	2.70 dd (14.1,4.4)	40.0
7		171.8
8	6.10 q (7.2)	123.6
9		129.9
10	1.68 d (6.8)	12.8
1''	4.14, 4.37 dd ovl	66.8
2''	6.81 d (1.2)	35.3
3''		130.7
4''	6.65, d, (8.0)	116.4
5''		144.9
6''		146.2
7''	6.65 d (8.0)	117.0
8''	6.80 dd (8.0, 1.2)	121.3
COOMe	3.68 s	
Glucosio		
1'	4.90 (8.0)	99.4
2'	3.12 (3.31)	73.2
3'	3.31 ovl	76.6
4'	3.19 ovl	69.9
5'	3.40 ovl	76.5
6'	3.49, 3.81 (12.0,9.5)	61.6



**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Oleoside 11-Metil-Estere (3)**





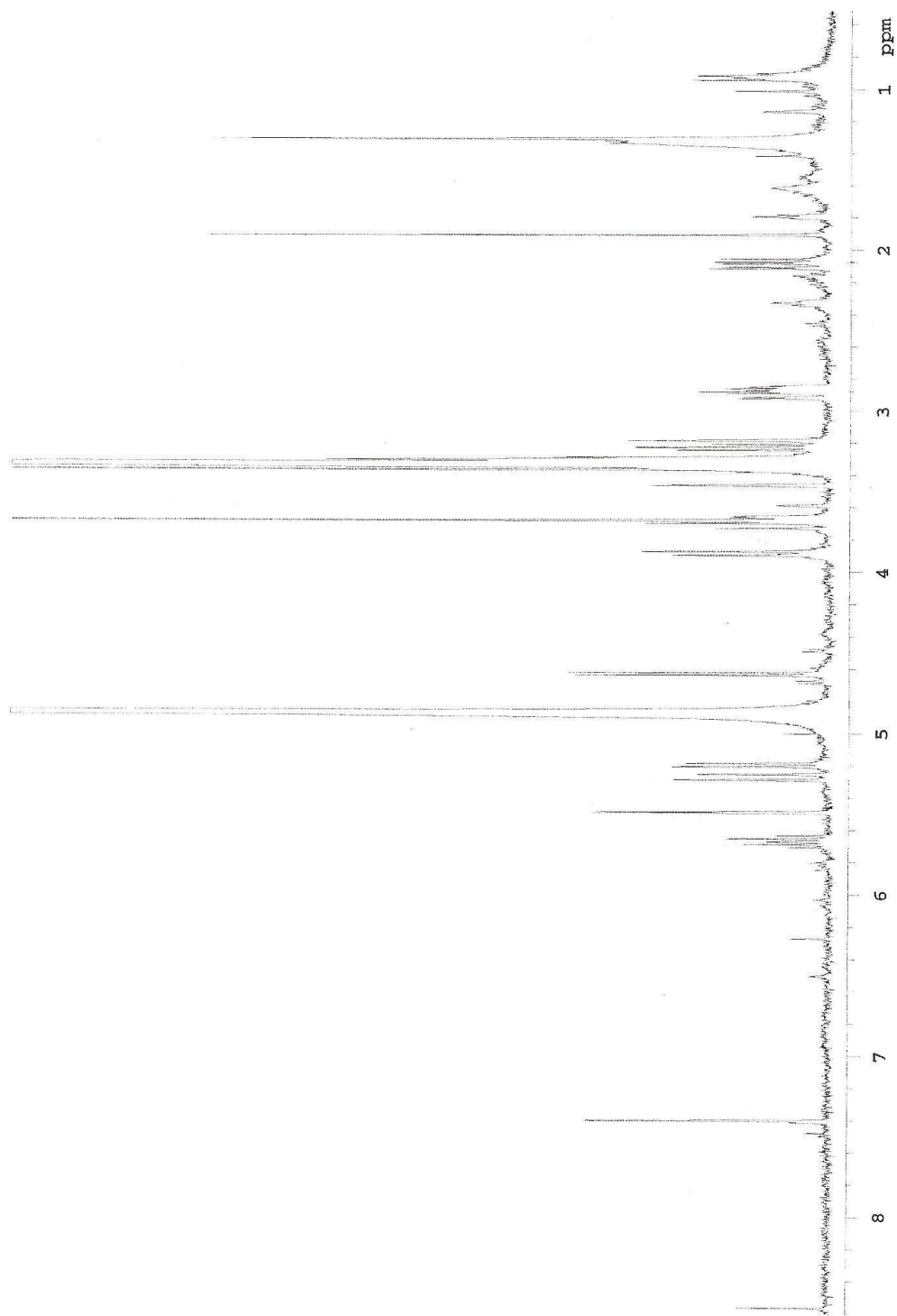
### OLEOSIDE-11-METIL ESTERE

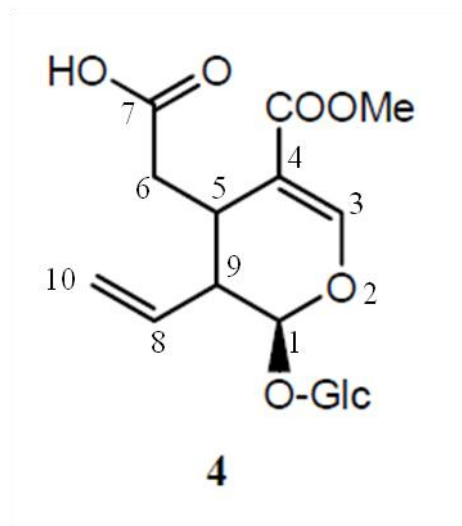
Il composto numero 3 fa parte del gruppo degli iridoidi. Dai dati ottenuti dalla spettrometria di massa ESI-MS (ioni positivi) si denota un'ione pseudomolecolare a  $m/z$  405  $[M+H]^+$ . Dallo spettro  $^1H$ -NMR si evidenzia la presenza di un singoletto corrispondente all'insaturazione in posizione 3 ( $\delta$  7.48) e un altro protone olefinico in posizione C-8 a  $\delta$  6.07 della struttura base dell'iridoide. Il singoletto che risuona a  $\delta$  3.73 evidenzia la presenza della funzione  $-OCH_3$  legata al carbonio in posizione C-4. È inoltre presente una seconda funzione carbossilica in C-7. I protoni adiacenti in H-6 che risuonano a  $\delta$  2.23 (dd) e  $\delta$  2.65 (dd) risultano, nel COSY, accoppiati con l'H-5 a  $\delta$  4.04 (dd). E' inoltre presente un gruppo metilico ( $CH_3$ ) legato al C-10 che risuona  $\delta$  1.80 (d;  $J=7.1$  Hz) e che è accoppiato con il protone olefinico H-8 ( $\delta$  6.07). L'esperimento HMBC va a confermare la presenza di una funzione carbossilica in posizione C-7 e una funzione esterea in posizione C-4. Inoltre nella regione dello spettro compresa tra 5.0 e 3.0 ppm si nota la presenza di un'unità saccaridica in cui il protone anomero risuona a  $\delta_H$  4.81 ppm (d;  $J=7.71$  Hz). L'esperimento ROESY ha consentito di definire la stereochimica relativa, infatti si osserva un roe tra H-5 ( $\delta_H$  4.04 ppm) con il metile in posizione 10 ( $\delta_H$  1.80 ppm). I protoni H-1 ( $\delta_H$  6.02 ppm), H-1' del glucosio ( $\delta_H$  4.81 ppm) e H-6 ( $\delta_H$  2.23 ppm) si trovano sulla faccia  $\alpha$  dell'iridoide. Dai dati NMR mono e bi-dimensionali possiamo constatare che siamo in presenza dell'Oleoside-11-metil estere. (Tabella 2.3)

**Tabella 2.3** Dati <sup>1</sup>H-NMR, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Oleoside-11-Metil-estere (3)

POSIZIONE	$\delta_H$ (J in Hz) (3)	$\delta_C$ /ppm
1	6.02 ovl	95.6
2		
3	7.48 ovl	155.1
4		
5	4.04 dd (9.0,5.0)	32.9
6	2.23 dd (14.0,5.0) 2.65 dd (14.0,9.0)	42.2
7		173.4
8	6.07 m	124.8
9		130.7
10	1.80 d (7.1)	13.8
11		168.4
OMe	3.73 s	51.9
Glucosio		
1'	4.81 d (7.8)	101.0
2'	3.70 m	78.8
3'	3.95 dd (2.1,9.5)	72.2
4'	3.65 ovl	77.5
5'	3.54 ovl	78.3
6'	3.72,3.41 m (5.3,12.1)	62.3

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Secoxiloganina (4)**





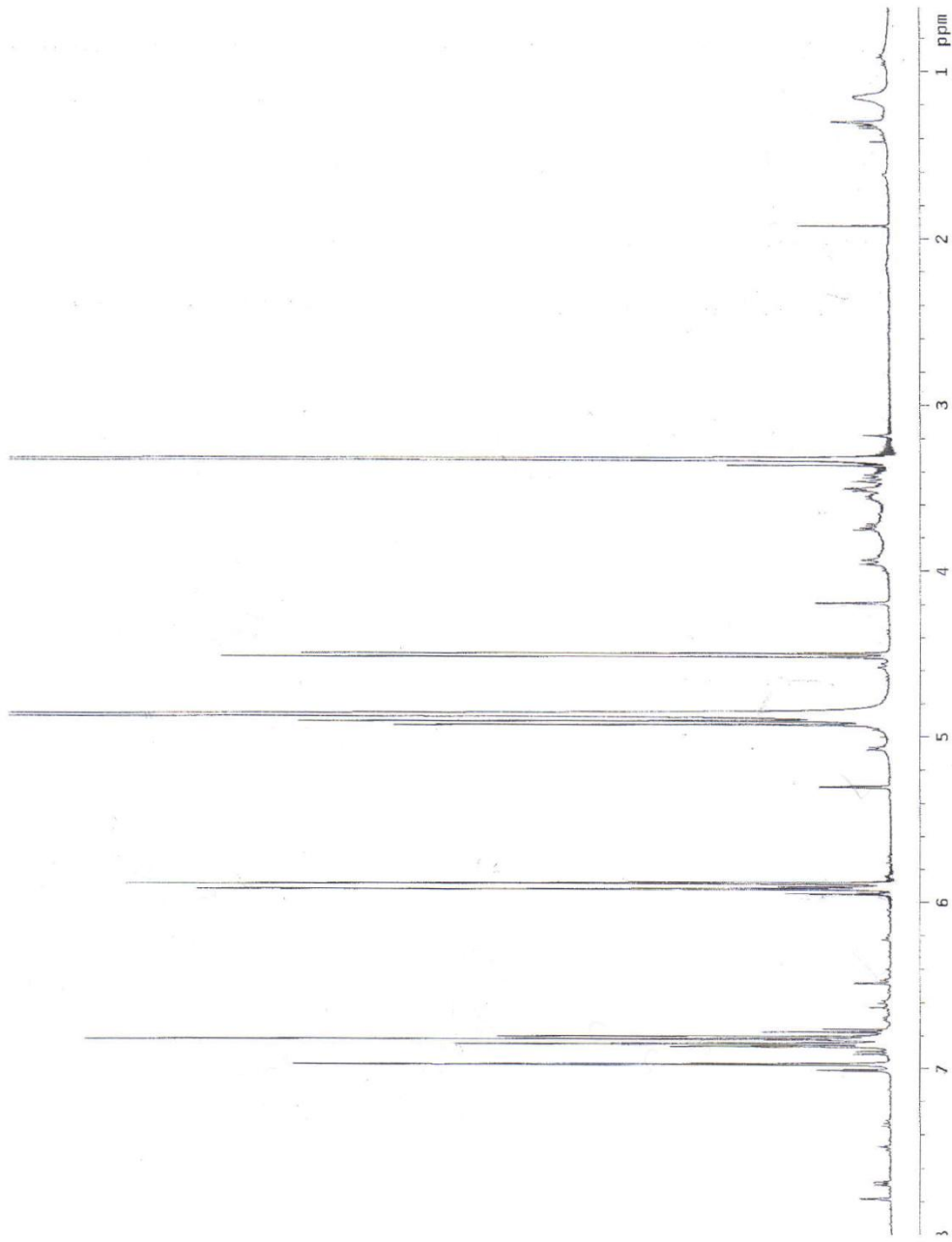
### SECOXILOGANINA

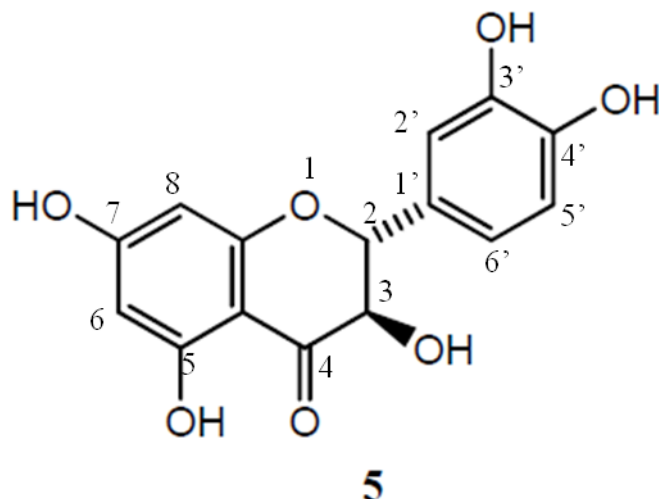
Il composto 4 fa parte della classe dei secoiridoidi e dall'analisi allo spettrometro di massa ESI-MS (ioni positivi) si evidenzia un picco pseudomolecolare con  $m/z$  405  $[M+H]^+$ . E' un isomero strutturale dell'Oleoside-11-metilestere e una prima differenza si evidenzia dalla posizione terminale del doppio legame olefinico (C-8 e C-10) rispetto al proprio diastereoisomero. Ciò è stato rilevato dallo spettro  $^1H$ -NMR dalla presenza dei segnali protonici H-8 a  $\delta$  5.67 (dt,  $J=16.5, 10.0$  Hz), H-10a a  $\delta_H$  5.27 ppm (d,  $J=16.5$  Hz, accoppiamento geminale) e  $\delta$  5.20 H-10b (dd,  $J=10.0, 1.6$  Hz). L'esperimento COSY va a confermare le sequenze di spin tra il protone H-8 ( $\delta$  5.67) e i protoni H-10 che risuonano rispettivamente a  $\delta$  5.27 e  $\delta$  5.20 e con il protone H-9 a  $\delta$  2.86. I protoni in posizione H-6 a  $\delta$  2.09 e  $\delta$  2.87 risultano accoppiati con H-5 a  $\delta$  3.33. Inoltre si evince dallo spettro la presenza di un monosaccaride legato all'iridoide, ciò è confermato dalla presenza del protone anomero ( $\delta$  4.63) dell'unità di glucosio che correla con il carbonio in posizione 1 dai dati dell'esperimento HMBC. Dai dati NMR e dai dati di letteratura (Damfort, S., 1993; Rastrelli, L., 1998) possiamo affermare che siamo in presenza della Secoxiloganina. (Tabella 2.4)

**Tabella 2.4** Dati  $^1\text{H-NMR}$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Secoxiloganina (4)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}$ (4)
1	5.50 d (3.9)
2	
3	7.40 d (1.6)
4	
5	3.33
6	2.87 m 2.09 dd (15.7,9.6)
7	
8	5.67 td (16.5,10.0)
9	2.86
10	5.27 d (16.5) 5.20 dd (10.0,1.6)
11	
OMe	3.68 s
Glucosio	
1'	4.63 d (7.5)
2'	3.35 dd (9.5,7.5)
3'	3.37 t (8.8)
4'	3.27 m
5'	3,29 m
6'	3.88 dd (12.0,9.5)

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Taxifolina (5)**





## TAXIFOLINA

Dai segnali presenti nello spettro protonico il composto numero 5 mostra le caratteristiche di flavonoide. La molecola isolata è la taxifolina, definita anche diidroquercetina . L'analisi dello spettro di massa ESI (ioni positivi) mostra uno pseudomolecolare a  $m/z$  305  $[M+H^+]$ . Nella regione aromatica dello spettro  $^1H$ -NMR si individuano i protoni legati ai carboni dell'anello A. Nell'anello A del flavonoide si evidenziano i segnali dell'H-6 a  $\delta$  5.92 e dell' H-8 ( $\delta$  5.90), accoppiati tra loro ( $J= 1.2$  Hz); nell'anello B si osservano i segnali dell'H-2' a  $\delta$  6.96 (d,  $J= 2.0$  Hz), H-5' a  $\delta$  6.80 (d,  $J= 9.6$ ), H-6'  $\delta$  6.83 (dd,  $J=2.0$ ; 9.6 Hz). Nella taxifolina sono presenti due stereocentri in posizione 2 e 3 quindi è possibile la presenza di due coppie di enantiomeri, una prima coppia con configurazione assoluta 2R,3R e 2S,3S (isomeri *trans*) e la seconda coppia 2R,3S e 2S,3R (isomeri *cis*). La configurazione 2R,3R è stata assegnata sulla base delle costanti di accoppiamento, tra il protone legato al C-2 e il protone legato al C-3 e dai dati presenti in letteratura (Sakushima, A., 2002). Infatti, nello spettro protonico, sono stati osservati i protoni H-2 ( $\delta$  4.71) e H-3 ( $\delta$  4.51) con costante di accoppiamento di 11.4 Hz che stanno ad indicare l'esistenza di una geometria di tipo *trans*. Il lavoro riportato in letteratura sull'isomero 2S,2R della taxifolina, indica che i protoni H-2 e H-3 si trovano entrambi in posizione assiale, originando una conformazione con maggiore stabilità in cui gli anelli A, C e B sono coplanari. La struttura planare viene ulteriormente stabilizzata dalla formazione di 3 ponti idrogeno tra: 3'-OH e 4'-OH, tra 3-OH e 4-Oxo e tra 4-Oxo e 6-OH. Dall'esperienza COSY è stato possibile determinare gli accoppiamenti scalari tra i protoni, il protone H-6' è accoppiato con entrambi i protoni H-2' e H-5', mentre il protone H-5' è accoppiato solo con H-6'.

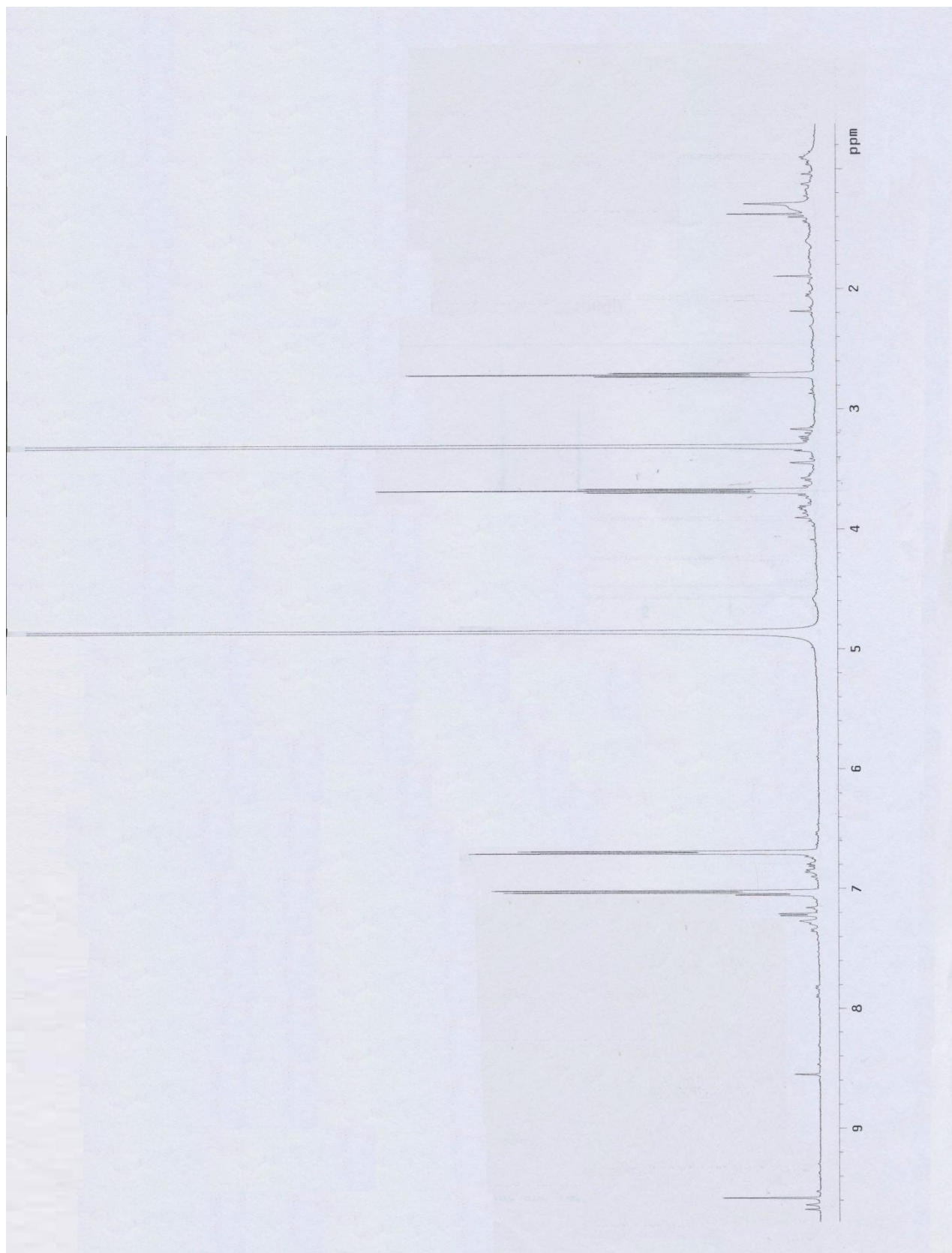


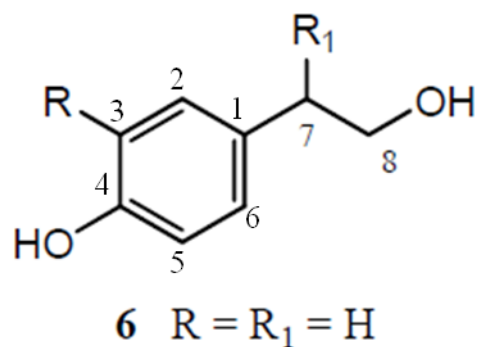
Attraverso l'esperimento HMBC è stato possibile stabilire le correlazioni tra i protoni e i carboni. La geometria e le proprietà elettroniche della struttura della taxifolina sono state ulteriormente chiarite da un lavoro di modelling che è stato anche in grado di spiegare la correlazione tra struttura planare e la capacità antiossidante (Trouillas, P., 2004). (Tabella 2.5)

**Tabella 2.5** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Taxifolina (5)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1			
2	4.91, d (J= 11.4 Hz)	83.9	C3 C8a C6' C1' C4
3	4.51, (J= 11.4 Hz)	72.8	C2 C8a C1' C4
4		197.0	
5		163.5	
6	5.92	96.5	C8 C4a C8a C5 C7
7		168.2	
1'		128.8	
2'	6.96	116.3	C2 C5' C6' C1' C3'
3'		145.3	
4'		145.9	
5'	6.80 (J= 7.9 Hz)	114.7	C4' C1' C3' C2'
6'	6.83 (J= 9.6 Hz)	119.7	C2 C5' C4'

**$^1\text{H}$ -NMR,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Tirosole (6)**

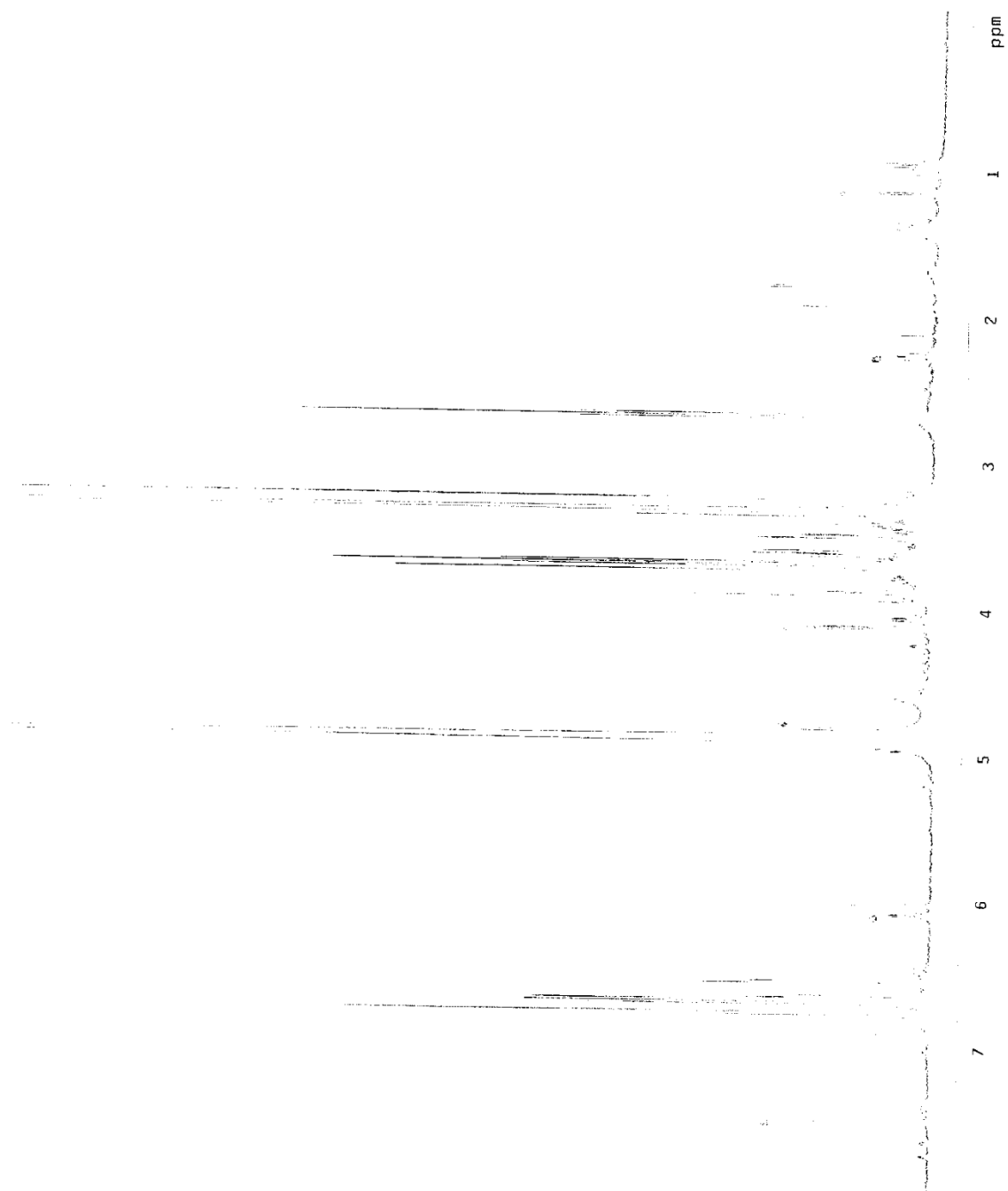


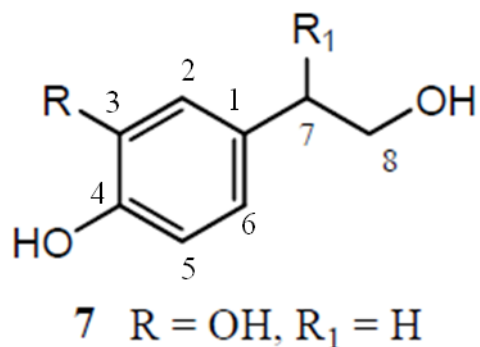


## TIROSOLO

Dall'analisi dei dati NMR il composto numero 6 è un fenolo a basso peso molecolare. Infatti nell'ESI-MS (ioni positivi) è presente uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  149  $[M+H^+]$ . Dallo spettro protonico è possibile individuare la presenza di due tripletti nella regione alifatica riconducibili ai protoni H-7 e H-8 che risuonano a  $\delta$  2.6 e  $\delta$  3.6 rispettivamente. Nella parte aromatica dello spettro si individuano dei chemical shift imputabili alla presenza di un sistema aromatico. I segnali protonici a  $\delta$  6.7 e a  $\delta$  7.0 risuonano come segnali di doppietti. Ciascun doppietto indica la presenza di due protoni; H-2 e H-6 che risuonano a  $\delta$  7.0 ( $J = 6.0$  Hz) e H-3 e H-5 a  $\delta$  6.7 ( $J = 6.0$  Hz). In posizione C-1 della struttura fenolica è legata una catena etanolica, evidenziata dal tripletto dello spettro protonico a  $\delta$  3.6. Dall'analisi dei dati ottenuti e dal confronto con i dati presenti in letteratura, il composto isolato è il tirosolo. (Choe, K. I., 2012) (Tabella 2.6)

**H-NMR, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Idrossitirosolo (7)**

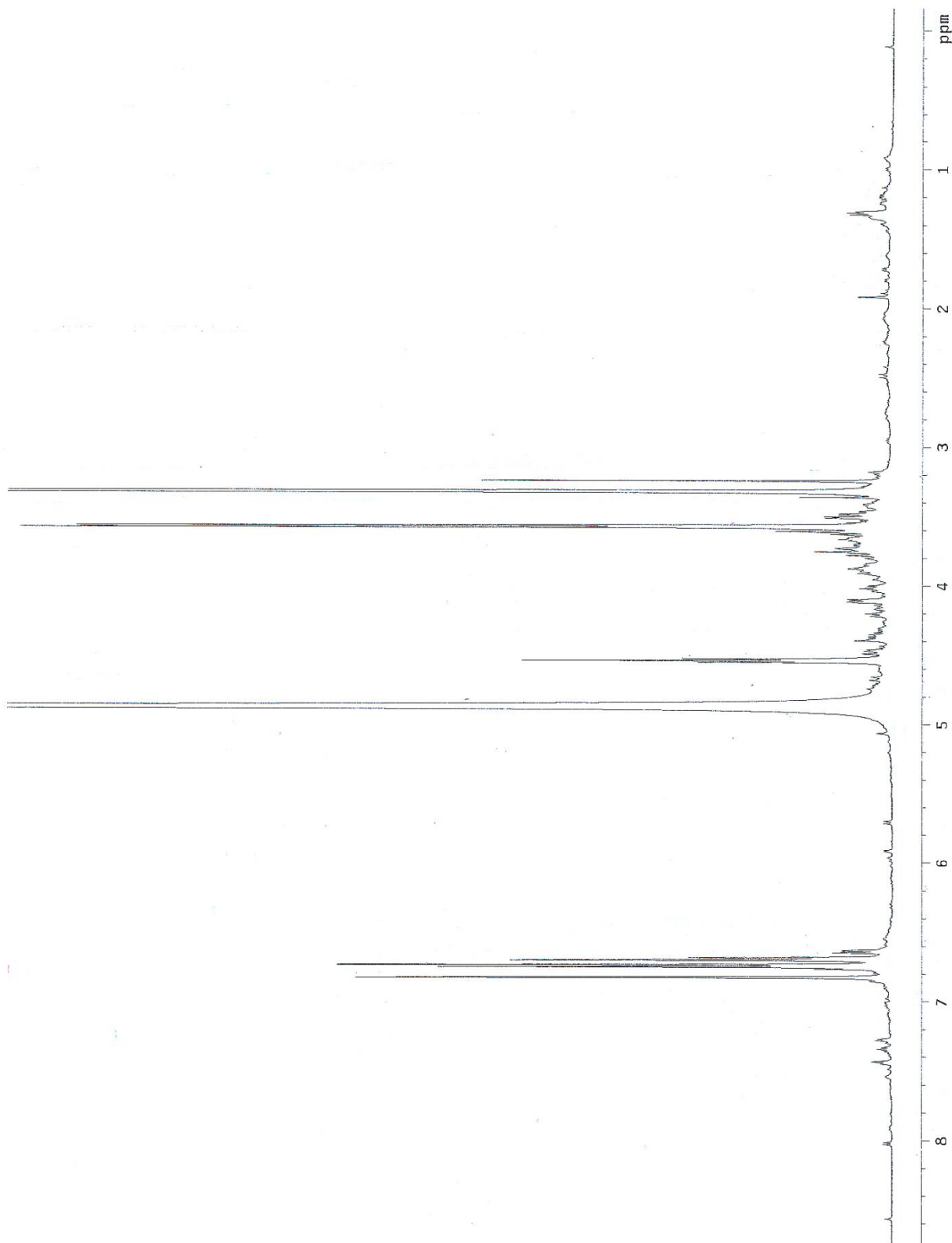


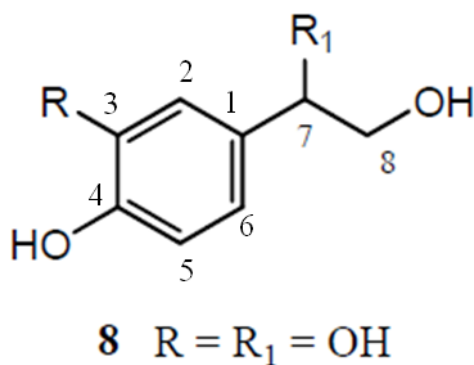


### IDROSSITIROSOLO

Il composto numero 7 è simile al tirosolo. La differenza è evidenziata dall'ossidrile in posizione C-6. Nella regione aromatica sono stati riscontrati tre protoni a  $\delta$  6.7 (d),  $\delta$  6.68 (dd) e  $\delta$  6.54 (d) che corrispondono a H-2, H-6 e H-5 rispettivamente. Dall'esperimento COSY è possibile individuare gli accoppiamenti tra i protoni. Il protone H-2 ( $\delta$  6.7) è accoppiato con H-6 ( $\delta$  6.68), H-5 ( $\delta$  6.54) si accoppia con H-6 ( $\delta$  6.68) mentre il protone H-6 è accoppiato ad entrambi i protoni H-2 e H-5. Nella regione alifatica dello spettro protonico sono presenti dei tripletti a  $\delta$  3.5 (t) e a  $\delta$  2.63 (t) imputabili alla presenza della funzione etanolica in posizione C-1. I due tripletti vanno ad evidenziare l'accoppiamento dei protoni legati in posizione C-7 e C-8. Dall'analisi dei dati NMR il composto caratterizzato è l'idrossitirosolo (Dalla Greaca, M., 2004). (Tabella 2.6)

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, 3,4 diidrossi-fenil glicole (8)**





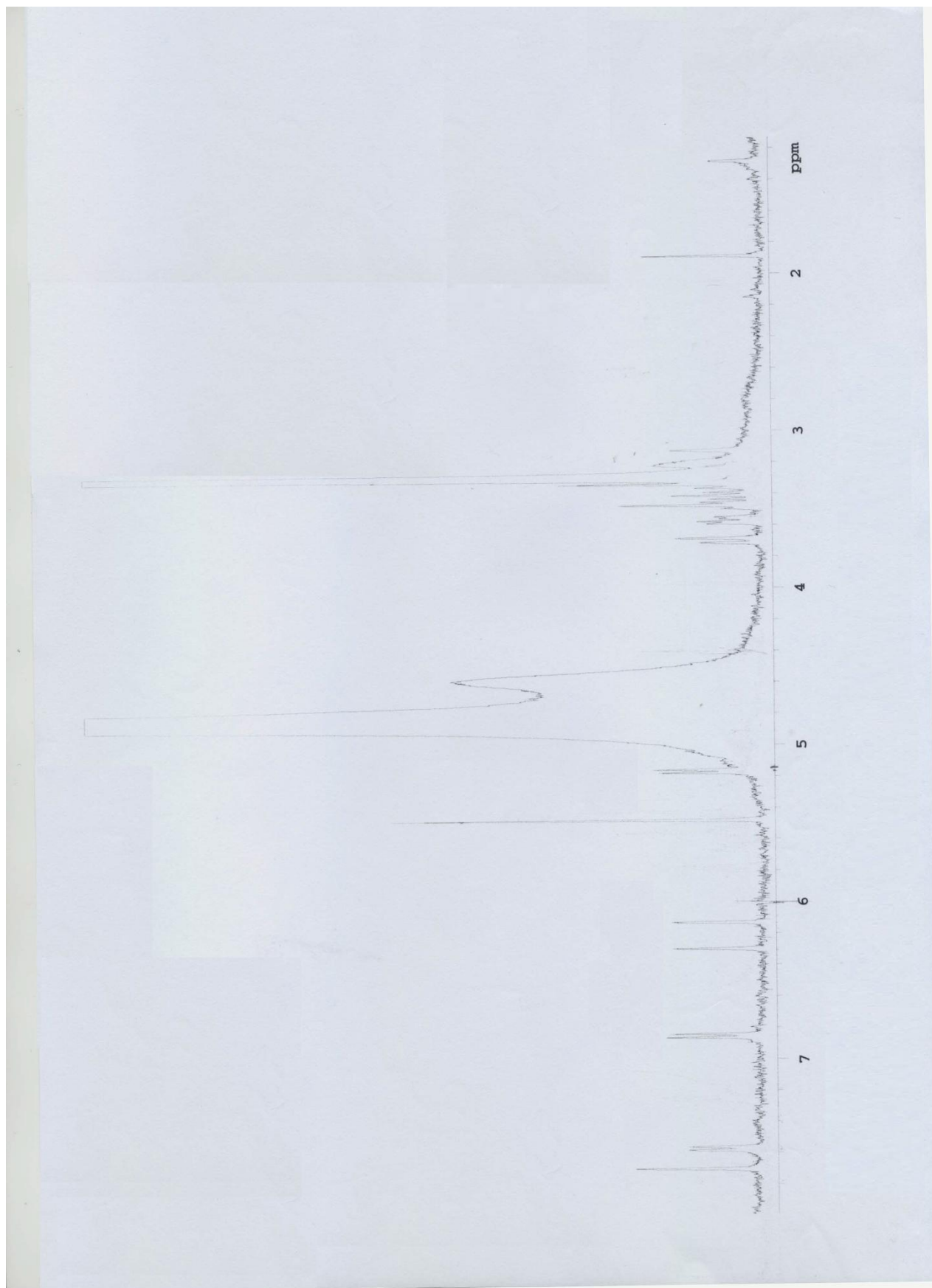
### 3,4 DIIDROSSIFENIL GLICOLE

Il composto numero 8 è un composto fenolico a basso peso molecolare il 3,4 diidrossifenil-glicole. Dallo spettro di massa si evince la presenza di uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  171  $[M+H]^+$ . Dallo spettro protonico, nella regione a campi bassi si evince a  $\delta$  6.8 la presenza di un protone in posizione C-2 il quale risuona come doppietto ed è accoppiato con il protone H-6, il quale risuona a 6.7 (d) ed è accoppiato con H-5 e H-2. Il protone H-2 è accoppiato con H-6. Sempre dallo spettro protonico i protoni H-7 e H-8 risuonano a  $\delta$  4.54 (t,  $J=6.2$  Hz) e a  $\delta$  3.57 (d,  $J=6.2$  Hz) rispettivamente. Il DHPG è correlato strutturalmente all'idrossititosolo e possiede un OH in più in posizione C-7. Il DHPG ha dimostrato una notevole attività antiossidante, dovuta alla presenza dei gruppi ossidrilici ed è stato isolato anche nelle olive da tavola (Lama-Munoz, A., 2013). (Tabella 2.6)

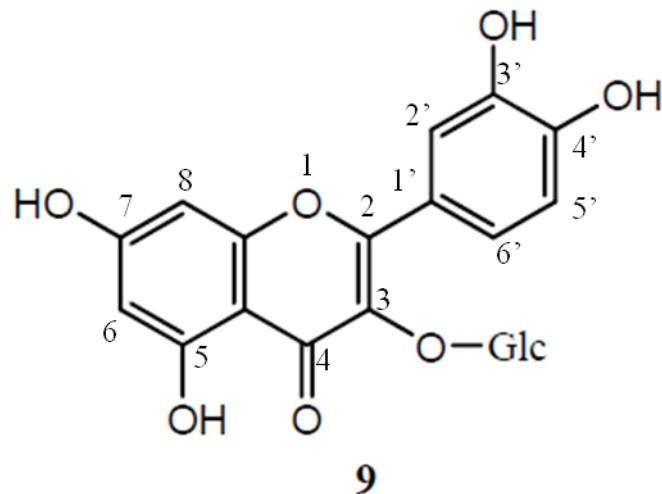
**Tabella 2.6** Dati  $^1\text{H-NMR}$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Tirosolo (6), Irossitirosolo (7), 3,4 Diidrossifenil glicole (8)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (6)	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (7)	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (8)
2	7.0 d (6.0)	6.7 d (6.0)	6.8 d (6.0)
3	6.7 d (6.0)		
5	6.7 d (6.0)	6.5 d (6.0)	6.7 d (6.0)
6	7.0 d (6.0)	6.6 d (6.0)	6.7 d (6.0)
7	2.7 t (6.0)		4.54 t (6.2)
8	3.6 t (6.0)		3.57 d (6.2)

**<sup>1</sup>H-NMR, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Quercetina-3-O-Glucoside**







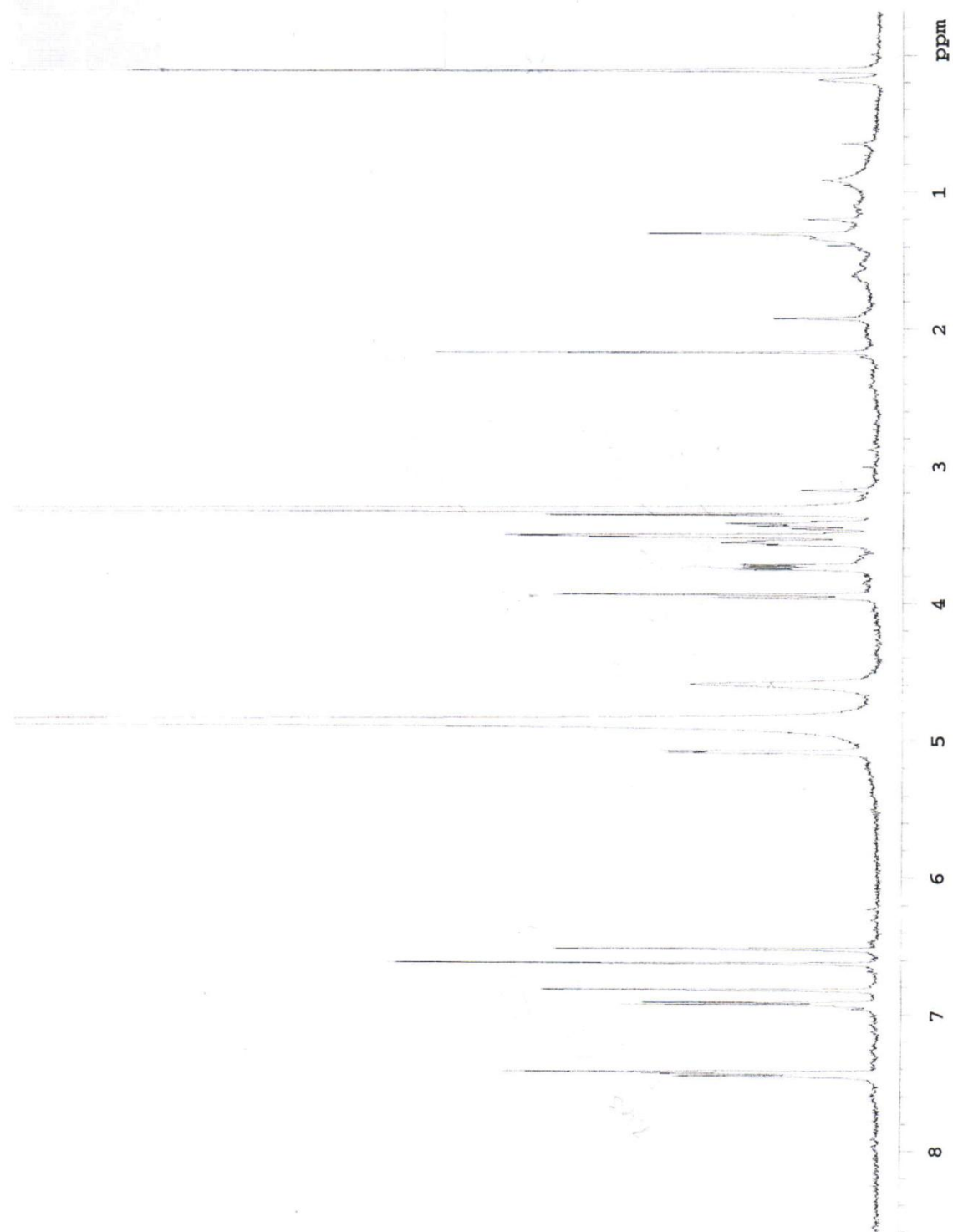
### QUERCETINA-3-O-GLUCOSIDE

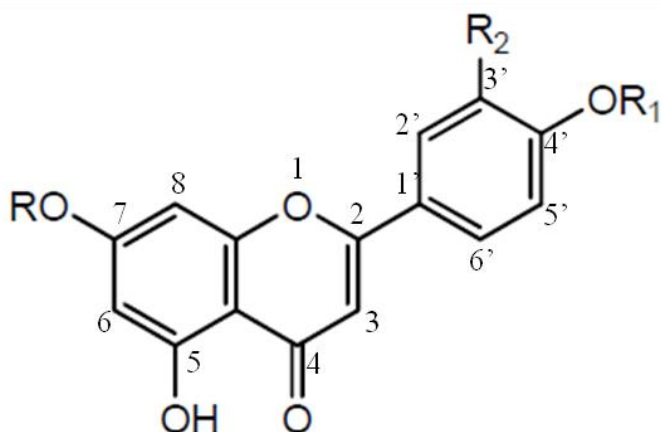
Il composto numero 9 fa parte del gruppo dei flavonoidi. Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  conferma la presenza di cinque protoni. Si rileva sull'anello A il protone H-6 a  $\delta$  6.20 e H-8  $\delta$  6.30, i due protoni che risuonano come doppietti. A frequenze più basse si individuano i protoni legati all'anello B del flavonoide. Il protone in posizione H-2' mostra un doppietto a  $\delta$  7.7. I protoni H-5' e H-6' hanno un doppietto a  $\delta$  6.9 e un doppietto a  $\delta$  7.6, in orto rispettivamente. Dall'esperimento COSY si evince che il protone H-6' è accoppiato con entrambi i protoni H-2' e H-5', mentre il protone H-5' correla con il protone H-6'. Dalla regione alifatica dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  si rileva la presenza di un protone anomero  $\delta$  5.20 imputabile alla presenza di una unità di glucosio che è stata determinata attraverso le sequenze dell'esperimento COSY. (Tabella 2.7) Come si evince dai dati degli esperimenti bi-dimensionali e dai dati di bibliografia la struttura isolata è la quercetina-3-O-glucoside (Eun-Ju, Y., 2012).

**Tabella 2.7** Dati  $^1\text{H-NMR}$  , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Quercetina-3-O.glucoside (9)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$
1		
2		159.0
3		135.6
4		179.4
5		163.0
6	6.20 d (2.0)	100.1
7		166.7
8	6.30 d (2.0)	94.9
9		158.5
10		105.5
Glucosio		
1'		123.1
2'	7.71 d (2.0)	116.0
3'		145.9
4'		149.9
5'	6.91 d (8.0)	117.5
6'	7.6 dd (8.0,2.0)	123.2
1''	5.21 (8.0)	104.5
2''	3.48 t (8.0)	75.7
3''	3.42 t (8.5)	78.1
4''	3.35 m	71.3
5''	3.22 ddd (10.0,5.0,2.0)	78.3
6''	3.58 dd (12.0,5.0)	62.6

**<sup>1</sup>H-NMR, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Luteolina-7-O Glucoside (10)**





**10** R = Glc, R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH

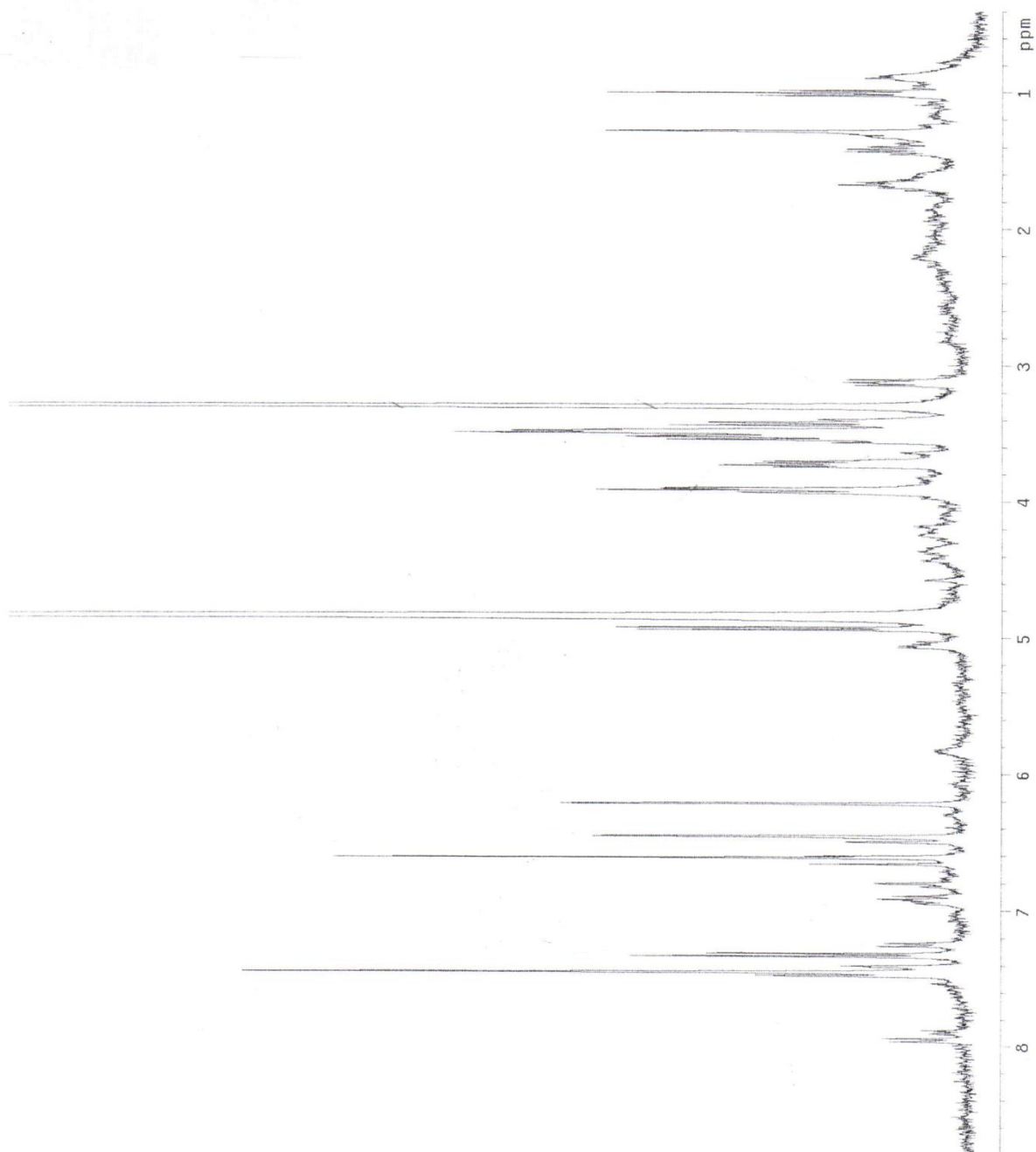
### LUTEOLINA-7-O GLUCOSIDE

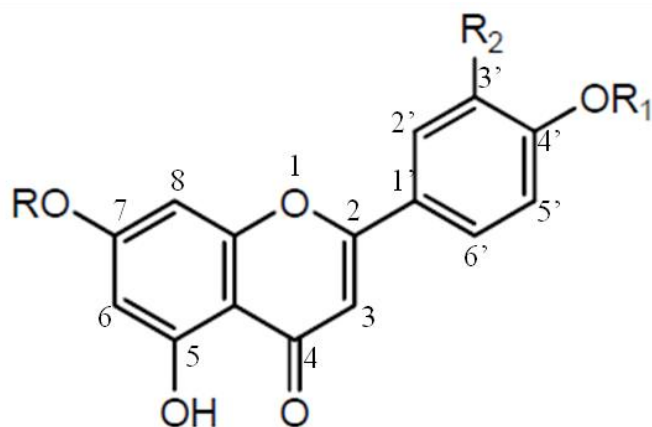
Lo spettro <sup>1</sup>H-NMR evidenzia una serie di segnali che lasciano intuire la presenza dello scheletro di un flavone, a cui è legata un'unità saccaridica; si osservano infatti i segnali dei protoni aromatici, Nell'anello A si osservano 2 singoletti, H-6 (δ 6.51 ) e H-8 (δ 6.81) , nella stessa regione dello spettro compare anche il segnale relativo al protone H-3 (δ<sub>H</sub> 6.61) adiacente al gruppo carbonilico presente sull'anello C dello scheletro del flavone. Per quanto riguarda l'anello B, si possono evidenziare i protoni H-2' (δ 7.47, d, J=2.5 Hz), H-3' (δ 6.92, d, J=8.0 Hz) e H-6' (δ 7.43, dd, J=2.5, 8.0 Hz) e dal confronto dei dati di letteratura , si è stabilito che lo scheletro del flavone in questo caso è la Luteolina. Nello spettro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY si osserva che il protone H-8 (δ 6.81) è accoppiato con H-6 (δ 6.51), il protone H-2' (δ 7.43) è accoppiato con H-6' (δ 7.43). È inoltre presente il segnale del protone anomero (δ 6.08; J=7.2) che risuona come doppietto, che rivela la presenza di un legame di tipo β- glucosidico. Dallo spettro COSY e HSQC è stato possibile determinare la sequenza e le risonanze dei protoni e dei rispettivi atomi di carbonio del glucosio. Il monosaccaride è legato al carbonio 7 dello scheletro della Luteolina in quanto nello spettro HMBC si evince un picco di correlazione tra il protone anomero (δ 5.07) e il carbonio C-7 (164.5), che risulta shiftato a campi bassi per effetto della glicosilazione. Dai dati ottenuti dagli spettri NMR possiamo confermare che la struttura in questione è la luteolina-7-O-glucoside. (Tabella 2.8)

**Tabella 2.8** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Luteolina-7-O-Glucoside (10)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1			
2		165.5	
3	6.61 s	103.9	C1' C2 C4a
4		183.9	
4a		106.8	
5		162.7	
6	6.51 s	100.9	C4a C5 C7 C8
7		164.5	
8	6.81	95.7	
8a		158.7	
1'		123.1	
2'	7.43, d, (2.5)	113.9	
3'	6.92, d (8.0)	146.8	
4'		151.0	
5'		116.5	
6'	7.43,dd (2.5)	120.1	
Glucosio			
1''	5.07, d, (7.9)	101.4	
2''	3.49, m, (8.3)	74.5	
3''	3.50, m, (8.5)	77.6	
4''	3.41, m (9.4)	71.3	
5''	3.55	78.1	
6''	3.93-3.73	62.2	

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Luteolina-4'-O Glucoside (11)**





**11** R = H, R<sub>1</sub> = Glc, R<sub>2</sub> = OH

### LUTEOLINA-4'-O GLUCOSIDE

Attraverso la spettrometria di massa ESI-MS è stato evidenziato uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  447  $[M+H]^+$ . I dati spettroscopici del composto sono quasi simili al precedente, infatti i segnali dello spettro protonico evidenziano anche in questo caso la presenza della Luteolina e di una unità di glucosio, rilevata dalla presenza del protone anomero a  $\delta$  4.93, (d,  $J= 7.2$  Hz). Anche in questo caso dall'analisi dell'esperimento COSY il protone H-8 ( $\delta$  6.46) è accoppiato con il protone H-6 ( $\delta$  6.22), il protone H-6' ( $\delta$  7.48) è accoppiato con H-5' ( $\delta$  7.33). Dallo spettro HMBC si sono osservate molte correlazioni simili alla Luteolina-7-O-glucoside; la differenza tra le due molecole è determinata dal protone anomero del glucosio ( $\delta$  4.93;  $J= 7.2$  Hz) correla con il C-4' (149.7 ppm) del secondo sistema aromatico della Luteolina. Dai dati ottenuti dagli spettri NMR e dal confronto con quelli presenti in letteratura si è stabilito che si tratta di un legame  $\beta$ -glucosidico. In effetti C-4' subisce uno shift a campi bassi (149.7 ppm) di 2.9 ppm rispetto al corrispondente carbonio della luteolina a seguito della glicosilazione. Dai dati dagli esperimenti NMR possiamo confermare che la molecola isolata è la luteolina-4'-O-glucoside. (Tabella 2.9)

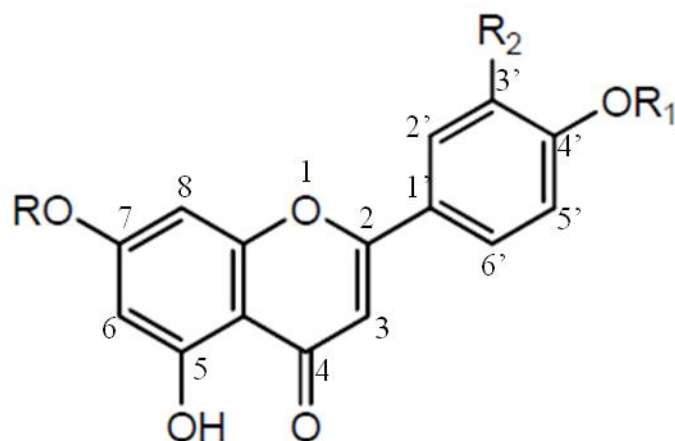
**Tabella 2.9** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Luteolina-4'-O-Glucoside (11)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1			
2		165.2	
3	6.62 s	104.4	C1' C2 C4a
4		183.6	
4a		105.4	
5		163.8	
6	6.22 s	100.2	C4a C5 C7 C8
7		169.5	
8	6.46	95.1	
8a		159.2	
1'		127.1	
2'	7.48 d (2.5)	119.7	
3'	7.33 d (8.0)	117.8	
4'		149.7	
5'		148.5	
6'	7.47 dd (2.5)	114.8	
Glucosio			
1''	4.93 d (7.2)	101.4	
2''	3.49 m (8.3)	74.5	
3''	3.50 m (8.5)	77.6	
4''	3.41 m (9.4)	71.3	
5''	3.55 m (1.9,5.9)	78.1	
6''	3.93,3.73 m (4.2,12.2)	62.2	



**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Apigenina-7-O neohesperidoside (12)**





**12** R = Rha (1→2) Glc, R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H

### **APIGENINA-7-O NEOHESPERIDOSIDE**

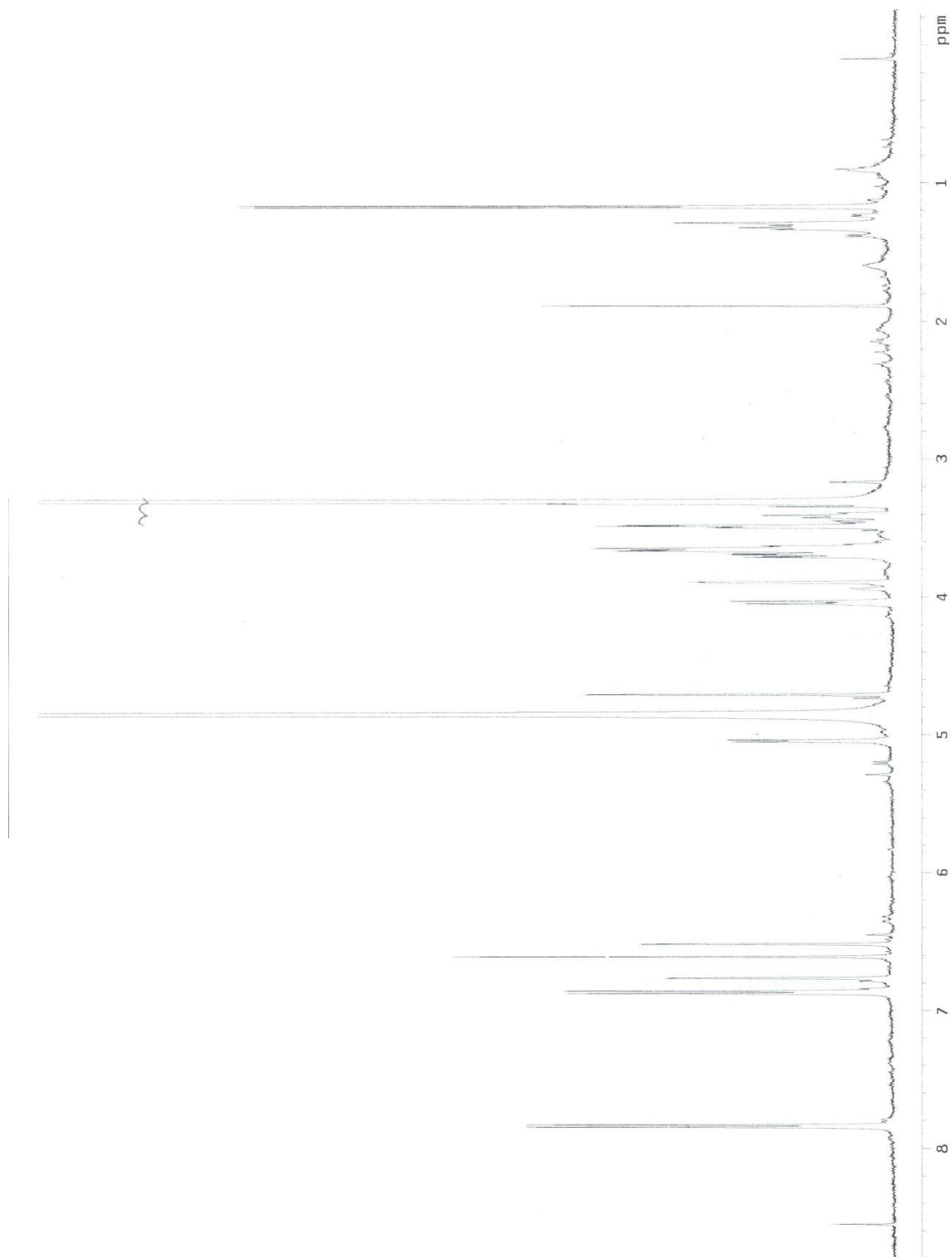
I segnali dello spettro protonico del composto 12 evidenziano ancora una volta la presenza dello scheletro dell'Apigenina. Dallo spettro <sup>1</sup>H-NMR mostra comunque la presenza di due unità saccaridiche. Il segnale del protone anomero ( $\delta$  5.20) ( $J= 8.0$  Hz) indica la presenza di una unità di glucosio, il segnale singoletto del protone anomero  $\delta$  5.28 ( $J= 1.2$  Hz), con una piccola  $J$ , rivela la presenza di una unità di ramnosio. Attraverso lo spettro COSY si individuano le due sequenze di spin imputabili alla presenza di due unità saccaridiche.

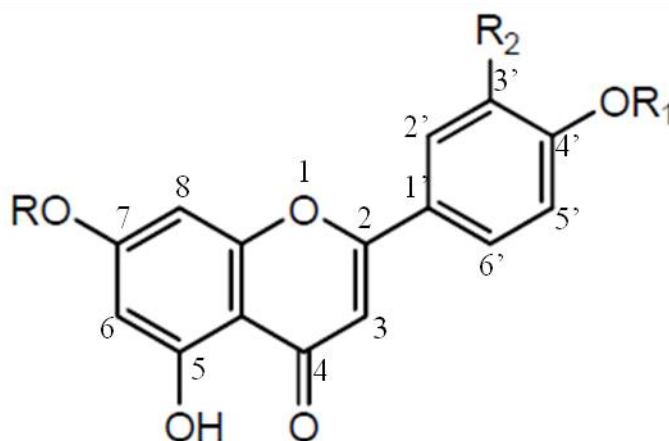
Il sito di glicosilazione è stata confermata dall'esperimento HMBC che ha consentito di determinare la posizione dei legami interglicosidici: il protone anomero del glucosio ( $\delta$  5.20) correla con il C-7 (162.1 ppm) dello scheletro dell'Apigenina, invece il protone anomero del ramnosio ( $\delta$  5.29 ) correla con il carbonio C''-2 del glucosio, ciò consente di affermare che il carbonio 1'' del ramnosio è legato al carbonio 2 del glucosio; (1 → 2). Il ramnosio è presente in forma  $\alpha$  come si osserva dal valore basso della costante di accoppiamento H1/H2 di 1.2 Hz., mentre il glucosio è presente in forma  $\beta$ , come si evince dal valore della costante di accoppiamento del protone anomero ( $J=8.0$  Hz). Il glucosio appartiene alla serie sterica D e il ramnosio alla serie L, attraverso analisi con colonna chiarale (vedi materiali e metodi) Dall'analisi dei dati degli spettri NMR possiamo determinare che siamo in presenza dell' Apigenina 7-O-neosperidoside. (Tabella 2.10)

**Tabella 2.10** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Apigenina-7-O-neoesperidoside (12)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$
1		
2		165.7
3	6.64 s	103.9
4		183.2
5		161.9
6	6.51 s	106.0
7		163.5
8	6.77	94.2
1'		122.7
2'	7.84, d, (8.9)	114.9
3'	6.90, d (8.9)	146.0
4'		150.1
5'	6.90, d (8.9)	117.1
6'	7.84,d (8.9)	119.5
Glucosio		
1''	5.20, d, (8.0)	100.0
2''	3.70, m, (8.9)	78.8
3''	3.95,dd, (2.1,9.5)	72.2
4''	3.65, m, (8.5)	77.5
5''	3.54, m, (2.5,12.1)	78.3
6''	3.72, 3.41, m (5.3, 12.1)	62.3
Ramnosio		
1'''	5.28, br s (1.2)	101.6
2'''	3.91, br s (1.8)	70.3
3'''	3.71 (1.8)	71.3
4'''	3.64, m (8.5)	74.3
5'''	3.41, m, (8.5)	71.1
6'''	1.33, d, (6.3)	17.9

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Apigenina-7-O rutinoside (13)**





**13** R = Rha (1→6) Glc, R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H

### APIGENINA-7-O RUTINOSIDE

Dallo spettro <sup>1</sup>H-NMR si evidenzia che nella regione tra 6 e 8 ppm sono presenti i segnali attribuibili a due sistemi aromatici. Sempre dallo spettro <sup>1</sup>H-NMR si evidenzia la presenza di due unità saccaridiche. I protoni H-2' e H-6' che risuonano a δ 7.88 e i protoni H-3' e H-5' risuonano entrambi come doppietti a δ 6.90 (d, J=8.8 Hz). Sono inoltre presenti nella regione aromatica tre segnali che risuonano come singoletto δ 6.64, 6.51, 6.77 attribuiti rispettivamente ai protoni H-3, H-6, H-8. Dallo spettro dell'esperimento HMBC è possibile individuare le correlazioni tra il protone H-5' (δ 6.90) e il carbonio C-1' (122.2 ppm) e con il carbonio C-3' (116.7 ppm). Nella regione dello spettro compresa tra 3 e 5 ppm sono compresi i segnali imputabile alla presenza di due unità saccaridiche, che sono evidenziabili dai segnali relativi ai protoni anomeric a δ 5.05 (d, J= 7.2 Hz) e a δ 4.71 (d, J= 1.6 Hz). Il protone anomeric dell'unità saccaridica è legata al carbonio C-7 dello scheletro dell'Apigenina. Il protone anomeric che risuona a δ 5.05 (J= 7.2 Hz), è relativo all'unità di glucosio mentre il protone anomeric che risuona a δ<sub>H</sub> 4.72 ppm è relativo all'unità di ramnosio (J= 1.6 Hz). Dall'esperimento COSY è possibile individuare due sequenze di spin una del glucosio e una del ramnosio. In particolare, l'unità di ramnosio risulta legata al C-6' del glucosio (Tabella 2.11) in quanto questo atomo che risuona a 66.2 ppm è shiftato a campi bassi per l'effetto della glicosilazione, rispetto al valore di circa 62 ppm di un glucosio non sostituito. L'esperimento HMBC ha confermato il legame (1''→6) Ramnosio-Glucosio in quanto si evince un picco di correlazione H-1'' (δ 4.71) del ramnosio con il C-6 (66.2 ppm) del glucosio. Il disaccaride risulta essere legato al C-7 dell'apigenina, ciò si evince dal picco di correlazione tra l'H-1' (δ 5.05) del glucosio e il C-

7 (164.5 ppm) dell'apigenina. Dal confronto dei dati NMR mono e bidimensionali e dal confronto dei dati di letteratura si è stabilito che il composto è l'Apigenina-7-O-rutinoside.

**Tabella 2.11** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Apigenina-7-O-neoesperidoside (13)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$
1		
2		165.7
3	6.64 s	102.8
4		183.9
5		159.2
6	6.51 s	106.0
7		163.5
8	6.77	94.2
1'		122.2
2'	7.84, d, (8.9)	128.5
3'	6.90, d (8.9)	100.0
4'		147.7
5'	6.90, d (8.9)	106.4
6'	7.84,d (8.9)	119.5
Glucosio		
1''	5.20, d, (8.0)	100.0
2''	3.70, m, (8.9)	73.1
3''	3.95,dd, (2.1,9.5)	70.7
4''	3.65, m, (8.5)	76.2
5''	3.54, m, (2.5,12.1)	75.5
6''	3.72, 3.41, m (5.3, 12.1)	66.2
Ramnosio		
1'''	4.72, br s (1.6)	101.9
2'''	3.90, br s (1.6)	70.4
3'''	3.65, br s (1.8)	70.2
4'''	3.35, m (8.2)	73.1
5'''	3.84, m, (8.2)	69.2
6'''	1.19, d, (6.1)	17.6

## 2.7. ATTIVITA' BIOLOGICA *Olea europea* L.

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. G. Raimo dell'Università degli Studi del Molise, è stato effettuato lo studio delle attività biologiche degli estratti e dei composti puri ottenuti dalla specie *Olea europea*. Numerosi studi hanno dimostrato che molte delle proprietà di questa pianta sono imputabili al contenuto di sostanze con attività antiossidante, in grado di limitare i danni causati dallo stress ossidativo.

L'ossigeno (O<sub>2</sub>) è una molecola indispensabile per la sopravvivenza dell'uomo e di tutti gli organismi aerofili; allo stesso tempo però è una molecola estremamente reattiva in grado di generare specie radicaliche. La sopravvivenza degli organismi in un ambiente ricco di ossigeno richiede una complicata interazione tra la produzione di radicali liberi e la capacità degli organismi di controllare tali sostanze. I ROS (Reactive Oxygen Species) sono composti dell'ossigeno altamente reattivi, caratterizzati da elettroni spaiati nel loro guscio elettronico di valenza. La presenza dei radicali liberi nei sistemi biologici è stata scoperta solo 50 anni fa da Commoner et al. (Commoner et al., 1954). Esistono numerosi fattori chimico-fisici esogeni capaci di indurre la formazione di radicali liberi nei tessuti biologici, quali il fumo, le radiazioni ionizzanti ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e raggi X), gli antibiotici. Oltre alle fonti esterne, i ROS sono prodotti all'interno delle cellule in diversi tipi di tessuti.

I radicali per la loro caratteristica di possedere un elettrone spaiato, sono delle specie altamente reattive; infatti tendono ad appaiare l'elettrone reagendo con molecole vicine, spesso molecole organiche. In questo modo il radicale viene convertito in una molecola stabile, mentre la molecola donatrice diviene una specie radicalica alla ricerca di un nuovo elettrone. Viene così attivata una reazione a catena che coinvolge le molecole presenti all'interno della cellula, come proteine, lipidi e acidi nucleici che ne risultano inevitabilmente danneggiati.

Il principale bersaglio dei ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle biomembrane e delle lipoproteine plasmatiche (Kowaltowski et al., 1999). Ad essere attaccati principalmente sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), i quali subiscono un processo a catena, noto come perossidazione lipidica, che comporta la formazione in idroperossidi lipidici e composti aldeidici secondari. Ciò determina una perdita dei grassi polinsaturi che comporta una diminuzione della fluidità della membrana, con conseguente alterazione della permeabilità. L'alterazione dell'integrità della membrana plasmatica e la

conseguente modifica della permeabilità può portare a danni irreversibili della cellula (Bernardi, 1992).

L'azione dei radicali liberi può coinvolgere anche le proteine (Halliwell, 1997). L'ossidazione degli amminoacidi costituenti le proteine da parte dei radicali comporta la modificazione delle proprietà fisiche e strutturali delle proteine con conseguente frammentazione e l'inattivazione enzimatica.

L'azione dannosa dei ROS può esplicarsi anche a livello del DNA sia nucleare che mitocondriale; in particolare il radicale ossidrilico ( $\text{OH}^\cdot$ ) è il principale responsabile dei danni sia alle basi puriniche e pirimidiniche, sia allo scheletro del DNA. Infatti, esso può reagire con le basi del DNA modificandole o può reagire con lo scheletro di ribosio-fosfato portando alla scissione della doppia elica.

Le attività biologiche valutate sugli estratti ottenuti dal decotto di *Olea europea* L. sono:

1. Capacità Antiossidante Totale (TAC)
2. attività *scavenger* delle specie radicaliche (DPPH)
3. Attività di inibizione dell'enzima *Xantina ossidasi* (XOI)
4. Attività anti-lipoperossidasi (ALP)

### **2.7.1 ANTIOSSIDANTI**

*“Un antiossidante è una molecola capace di inibire l'ossidazione di altre molecole. È una qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, rallenta o inibisce significativamente l'ossidazione di tale substrato”* (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Nel corso dell'evoluzione, gli organismi hanno sviluppato meccanismi biochimici per la difesa dei tessuti e delle cellule contro i danni da radicali liberi; in particolare, i mitocondri possiedono sistemi di difesa antiossidante molto efficiente. Le specie reattive dell'ossigeno fanno parte dei prodotti del normale metabolismo cellulare aerobio, dei processi infiammatori, delle reazioni catalizzate dalle ossidasi etc.

Gli agenti antiossidanti possono essere classificati in preventivi, *scavenger* e agenti di riparo. Gli antiossidanti preventivi sono agenti che, attraverso vari meccanismi, come ad



esempio la chelazione dei metalli di transizione, prevengono la formazione di specie reattive. Di questo gruppo fanno parte i seguenti enzimi: catalasi e superossido dismutasi (Lesser, 2006). Gli antiossidanti *scavengers* (spazzini) devono il loro nome al meccanismo chimico alla base della loro attività antiossidante.

È possibile distinguerli in due classi:

- molecole che possiedono dieni coniugati capaci di delocalizzare la carica positiva che si viene a formare in seguito alla reazione con il radicale (ad esempio tocoferoli, acido citrico,  $\beta$ -carotene e polifenoli);
- composti tiolici in grado di agire direttamente o tramite catalisi enzimatica dando origine a equivalenti riducenti (ad esempio glutatione e tioredossina).

Gli agenti di riparo comprendono invece enzimi che agiscono dopo che le specie reattive dell'ossigeno hanno danneggiato un tessuto biologico; di questo gruppo di enzimi fanno parte le idrolasi, le transferasi e le polimerasi.

Nell'ultimo decennio l'attenzione si è focalizzata sullo studio di molecole di origine vegetale, valutarne l'eventuale attività antiossidante, in modo tale da poter essere assunte sotto forma di integratori con la dieta, o sotto forma di infusi, compresse etc.

### **2.7.2 VALUTAZIONE DELLE ATTIVITA' ANTIOSSIDANTI DEGLI ESTRATTI DI *Olea europea* L.**

I fenoli sono metaboliti secondari presenti in tutte le specie vegetali, e hanno un vasto impiego in campo terapeutico in qualità di antiossidanti, antimutageni, anticancerogeni e vanno a prevenire le malattie cardiovascolari (Yen, G.C., 1993). Recentemente, numerosi studi hanno dimostrato che ci sono delle correlazioni tra composti fenolici e l'attività antiossidante di estratti ottenuti da matrici vegetale (Sen, S., 2011). Il contenuto di fenoli totali (TPC) è stato per tanto valutato sia sull'estratto fresco delle foglie (OEL) di *O. europea* che sull'estratto ottenuto dal decotto (OELD). Quindi è stato determinato il contenuto di fenoli totali in ogni singolo estratto ottenuto dalla ripartizione secondo la metodica di Kupchan. Il TPC è stato valutato mediante la metodica di Folin-Ciocalteu, utilizzando come standard l'acido caffeico. Il TPC viene espresso in equivalenti (nmol) di acido caffeico per mg di estratto (CAE). L'estratto che ha un contenuto maggiore in fenoli è risultato quello *n*-butanologico ottenuto dal decotto (0.96 CAE), seguito dalla

frazione cloroformica (0.89 CAE), dalla frazione *n*-esanica (0.62 CAE) e dalla frazione acquosa (0.15 CAE). Per quanto riguarda la valutazione dell'attività DPPH, l'estratto *n*-butanologico (IC<sub>50</sub> 31.2 µg/mL) ha un maggiore potere di *scavenger*, seguito dall'estratto cloroformico (IC<sub>50</sub> 89.4 µg/mL), dall'estratto *n*-esanico (IC<sub>50</sub> 185.2 µg/mL), ed infine l'estratto acquoso (IC<sub>50</sub> 256.2 µg/mL). La capacità antiossidante totale (TAC) è stata determinata per via spettrofotometrica, utilizzando come standard l'acido ascorbico. La frazione *n*-butanologica ottenuta dall'estratto del decotto mostra un'elevata attività (espressa in equivalenti di acido ascorbico (nmol) per mg di estratto).

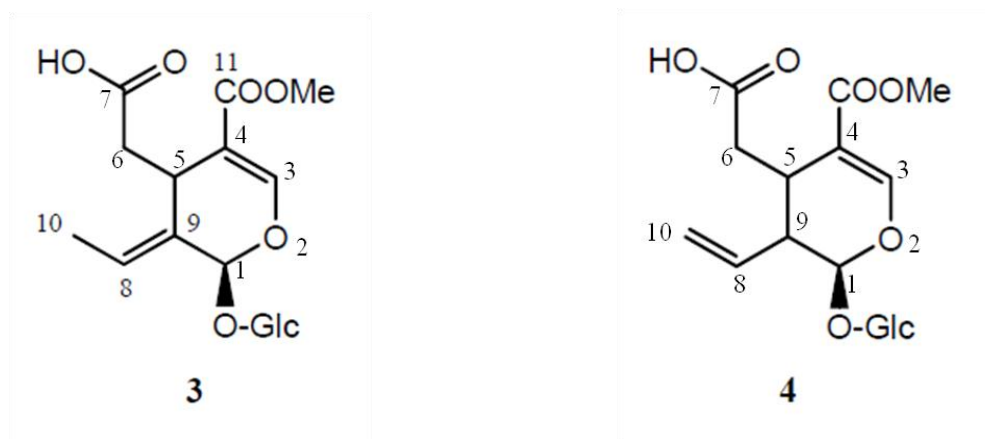
<b>ESTRATTI</b>	<b>DPPH</b> (EC <sub>50</sub> µg/mL)	<b>TAC</b> (AAE)	<b>TPC</b> (CAE)
OELD <i>n</i> -esano	185.2	0.250	0.615
OELD cloroformio	89.4	0.182	0.890
OELD <i>n</i> -butanolo	31.2	0.224	0.963
OELD residuo acquoso	256.2	0.034	0.148
OEL <i>n</i> -esano	n.d.	0.222	0.297
OELD cloroformio	155.6	0.185	0.389
OELD <i>n</i> -butanolo	38.0	0.293	0.801
OEL residuo acquoso	1215.8	0.043	0.060

**Tabella 2.12** Attività antiossidante estratti OEL e OELD

### 2.7.3 ATTIVITA' BIOLOGICA DEI COMPOSTI PURI

I dosaggi condotti per determinare la capacità *scavenger* dei metaboliti secondari isolati da OELD hanno evidenziato che alcuni dei composti testati, sono dotati di una notevole attività antiossidante. Come previsto, una significativa attività *scavenger* è stata riscontrata nei composti che presentano all'interno della molecola un gruppo *orto*-difenolico (unità catecolica), come i secoiridoidi fraxamoside (EC<sub>50</sub> 62.6 µM) e oleuropeina (EC<sub>50</sub> 32.0 µM). L'unità catecolica è presente anche nella taxifolina (EC<sub>50</sub> 50.0µM), nei flavonoidi glicosilati quali quercetina-3-O-glucoside (EC<sub>50</sub> 38.0µM) e luteolina-7-O-glucoside (EC<sub>50</sub> 13.4µM) (De Marino, S., 2012). Tra i composti fenolici (6,7,8) l'idrossitirosolo (EC<sub>50</sub> 80.4 µM) ha un attività *scavenger* minore rispetto al 3,4 diidrossi-fenil-glicole (EC<sub>50</sub> 18.2 µM), probabilmente questo è dovuto alla presenza di un gruppo idrossile in più; infatti, ciò viene confermato anche dal fatto che il 3,4 diidrossi-fenil-glicole ha una capacità *scavenger* maggiore anche rispetto al tirosolo (Rodriguez, 2007). Infatti, il tirosolo non mostra un'attività rilevabile, probabilmente per la mancanza del gruppo idrossile in posizione C-3 e C-7. Molto interessante appare la diversa attività *scavenger* evidenziata tra i due isomeri oleoside-11.metil estere e secoxiloganina, i quali

differiscono per la sola posizione di un doppio legame nella catena laterale. (Figura 2.5) Sulla base del valore di  $EC_{50}$ , si evince che l'attività scavenger del secoxiloganina ( $EC_{50}$  18.5 $\mu$ M) è 7 volte più efficiente rispetto a quella dell'oleoside-11-metil estere ( $EC_{50}$  142.9 $\mu$ M). L'elevata attività del secoxiloganina potrebbe essere correlata alla posizione in  $\Delta^{8,10}$  del doppio legame che è più disponibile per reazioni di riduzioni rispetto alla posizione  $\Delta^8$  del doppio legame presente nell'oleoside-11-metil estere.



**Figura 2.5** Oleoside-11 Metil Estere (3), Secoxiloganina (4)

I risultati complessivi mostrano che la maggior parte di questi composti hanno un'apprezzabile attività scavenger, paragonabili all'attività del Trolox ( $EC_{50}$  14.1 $\mu$ M) e del 3,5-di-tert-butil-4-idrossitoluene BHT ( $EC_{50}$  14.4 $\mu$ M), due molecole utilizzate come standard in questo specifico dosaggio.

#### **2.7.4 CAPACITA' ANTIOSSODANTE TOTALE (TAC)**

Quasi tutti i composti puri isolati hanno dimostrato una buona capacità antiossidante totale. L'oleuropeina e il suo derivato fraxamoside risultano i composti con la maggiore TAC, mostrano dei valori rispettivamente di 0.94 e 1.11 in equivalenti di acido ascorbico (AAE). Tra i composti, derivati dal fenil-etanolo, la più elevata TAC è stata riscontrata nel 3,4 diidrossifenil-glicole (0.90 AAE), seguito dall'idrossitirosolo (0.45 AAE), mentre il tirosolo ha mostrato una capacità antiossidante totale particolarmente ridotta (0.12 AAE). Una differenza è stata osservata anche tra i due isomeri strutturali oleoside-11-metil-estere e secoxiloganin, la cui attività risulta rispettivamente 0.14 e 0.26 AAE. I valori rilevati dai flavonoidi isolati, taxifolina (0.44 AAE) e quercetina-3-O-glucoside (0.40 AAE) sono più o meno simili tra loro.

I risultati ottenuti hanno quindi evidenziato che il decotto di foglie di *O. europea* (OELD) contiene un elevato contenuto di biomolecole come fraxamoside, taxifolina e 3,4-diidrossifenil-glicole caratterizzate da una capacità antiossidante totale comparabile a quella dell'acido ascorbico.

### **2.7.5 INIBIZIONE DELL' ENZIMA XANTINA OSSIDASI**

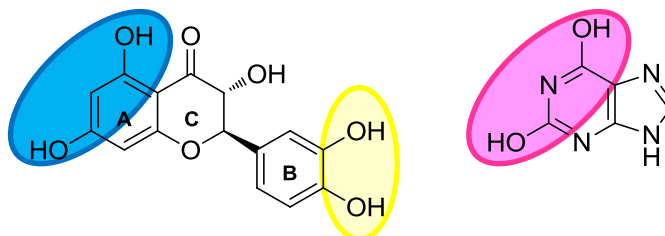
È stato dimostrato che in condizioni patologiche, l'attività dell'enzima Xantina Ossidasi (XO) è una delle principali cause dello stress ossidativo; tra l'altro, la XO è responsabile di valori elevati di uricemia che sono alla base di diverse malattie come ad esempio gotta, calcoli renali, e anche di malattie indotte dai ROS, dovute alla produzione di  $O_2^{\bullet-}$ . Quindi, una modulazione dell'enzima XO potrebbe rappresentare una potenziale cura contro diverse patologie. Numerosi studi hanno dimostrato che i flavonoidi sono in grado di inibire l'azione della xantina ossidasi (Ponce, A.M., 2000, Lin, C.M., 2002). Tra i dosaggi delle attività antiossidanti, la valutazione dell'effetto di inibizione della xantina ossidasi (XOI) rappresenta uno dei test più interessanti. I composti isolati da OELD sono stati testati per valutarne la capacità nell' inibire l'azione della xantina ossidasi.

I composti che hanno dimostrato un'elevato effetto di inibizione della xantina ossidasi sono la taxifolina e il fraxamoside, ( $IC_{50}$  2.7 e 5.1  $\mu$ M, rispettivamente). Per quanto riguarda i derivati fenolici solo l'idrossitirosolo ha un'elevato effetto di inibizione della XO ( $IC_{50}$  395  $\mu$ M), ciò potrebbe dipendere dall'interazione tra il sito attivo dell'enzima e il gruppo ossidrilico in posizione C-3. Come è stato osservato nei test precedenti, i due isomeri oleoside-11-metil estere e secoxiloganin hanno mostrato attività diverse; il primo è in grado di inibire la XO ( $IC_{50}$  126 $\mu$ M) con un'efficienza minore rispetto al fraxamoside, taxifolina e 3,4 diidrossifenil glicole; il secondo, il secoxiloganin si è dimostrato totalmente inefficiente nell'interazione con l'enzima.

Considerando i risultati ottenuti, l'attenzione è stata focalizzata sulla taxifolina e sul fraxamoside perché sono i composti che hanno mostrato i più bassi valori di  $IC_{50}$ . La capacità di inibizione è dovuta probabilmente alla presenza del residuo fenil-etanolico nel fraxamoside e all'esistenza di una struttura planare per la taxifolina. In particolare, la taxifolina isolata dall'estratto OELD presenta una configurazione assoluta 2*R*,3*R* che a differenza degli altri isomeri conformazionali, corrisponde ad una struttura completamente planare (Trouillas, P., 2004). La presenza di una struttura planare della molecola

rappresenta una delle caratteristiche principali per un flavonoide per garantire l'interazione con la XO. Quindi, l'interazione della taxifolina con il sito attivo della XO potrebbe avvenire attraverso l'unità catecolica presente sull'anello B o per mezzo dei gruppi idrossili in posizione C-5 e C-7 dell'anello A (Takenaka, Y., 2000). Infatti, come si evince dalla figura (figura 2.4) c'è una notevole somiglianza strutturale tra l'anello A della taxifolina e la xantina. Tra gli altri flavonoidi isolati, il composto che ha un'attività di inibizione maggiore è la luteolina-4'-O-glucoside ( $IC_{50}$  6.7  $\mu$ M), seguito dalla luteolina-7-O-glucoside ( $IC_{50}$  10.7 $\mu$ M), mentre i derivati glucosidici della quercetina e dell'apigenina mostrano una inibizione della XO paragonabile o addirittura meno efficiente rispetto a quella dell'oleuropeina (Nagao, A., 1999).

È da notare che sia il fraxamoside e sia la taxifolina presentano una capacità di inibire la xantina ossidasi, maggiore a quella dell'allopurinolo ( $IC_{50}$  29 $\mu$ M), una molecola comunemente utilizzata come farmaco per contrastare livelli elevati di uricemia. Questi due particolari composti sono presenti in quantità considerevole nel decotto di foglie di ulivo, e considerando la loro notevole attività antiossidante, associata alla loro notevole efficienza nell'inibire la xantina ossidasi, si potrebbe destinare l'utilizzo del decotto quale potenziale rimedio terapeutico contro l'iperuricemia.



**Figura 2.6** Confronto tra la struttura Taxifolina e la Xantina. I gruppi OH sull'anello A della Taxifolina hanno la stessa distribuzione di quelli dell'Xantina (Rosa). L'unità catecolica sull'anello B della Taxifolina è una caratteristica fondamentale per l'interazione con la XO (Blu)

### 2.7.6 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTILIPOPERROSSIDASICA (ALP)

I radicali liberi, in particolare gli anioni superossidi, possono produrre radicali idrossilici altamente reattivi, in grado di avviare la perossidazione lipidica, causando danni ai tessuti.

I risultati dell'ALP test hanno mostrato che tutti i composti isolati dall'estratto OELD sono in grado di abbassare il tasso di perossidazione lipidica da parte dei radicali liberi. In particolare i composti **4**, **2**, **12**, **9** e **11** mostrano una notevole attività in ordine decrescente (Tabella 2.2). Nonostante alcuni composti posseggano una struttura chimica simile, è stata comunque osservata una diversa attività anti-lipoperossidativa, come nel caso dell'oleuropeina la cui attività ( $EC_{50}$  47.5  $\mu$ M) è circa diciassette volte maggiore rispetto al fraxamoside ( $EC_{50}$  815  $\mu$ M).

Anche i due isomeri oleoside-11-metil estere ( $EC_{50}$  274.5  $\mu$ M) e secoxiloganin ( $EC_{50}$  21.5  $\mu$ M) rivelano una diversa efficienza anti-lipoperossidativa in quanto il secondo risulta circa tredici volte più efficiente del primo. Tra i derivati fenolici, i composti tirosolo e 3,4-diidrossi-fenil-glicole evidenziano un'apprezzabile attività ALP, cui corrispondono valori di  $EC_{50}$  pari a 185.4  $\mu$ M e 88.7  $\mu$ M, rispettivamente. L'attività ALP mostrata dai flavonoidi glicosilati isolati in questo lavoro, è risultata dipendere dalla loro solubilità media, proprietà conseguente alla loro particolare struttura chimica. L'abilità di ritardare la perossidazione lipidica da parte dei composti quercetina-3-O-glucoside, luteolina-4'-O-glucoside e apigenina-7-O-neohesperidoside risulta almeno sedici volte più efficiente rispetto a quella della taxifolina (Tabella 2.13), una molecola con una conformazione planare, ma priva dell'unità saccaridica laterale.

<i>Olea europea</i> L.	nr	DPPH ( $EC_{50}$ $\mu$ g/mL)	TAC (AAE)	XOI ( $IC_{50}$ $\mu$ M)	ALP ( $EC_{50}$ $\mu$ g/mL)
Fraxamoside	1	62.6	1.11	5.2	815.2
Oleuropeina	2	32.0	0.94	129.2	47.5
Oleoside- 11-metil estere	3	142.9	0.19	113.0	274.5
Secoxiliganina	4	18.5	0.45	n.d.	21.5
Taxifolina	5	50.0	0.44	2.7	811.9
Tirosolo	6	n.d.	0.12	n.d.	185.4
Idrossitirosolo	7	80.4	0.45	230.9	973.0
3,4 diidrossi-fenil glicole	8	18.2	0.90	n.d.	88.7
Quercetina-3-O-glucoside	9	38.0	0.35	54.6	50.6
Luteolina-7-O-glucoside	10	13.4 <sup>a</sup>	0.21	10.7 <sup>a</sup>	149.2 <sup>a</sup>
Luteolina-4'-O-glucoside	11	72.7 <sup>a</sup>	n.e.	6.7 <sup>a</sup>	54.6 <sup>a</sup>
Apigenina-7-O-neohesperidoside	12	98.9	0.27	64.5	48.0
Apigenina-7-O-rutinoside	13	n.d.	0.04	120.7	142.6

n.d. non rilevabile

n.e. non valutabile

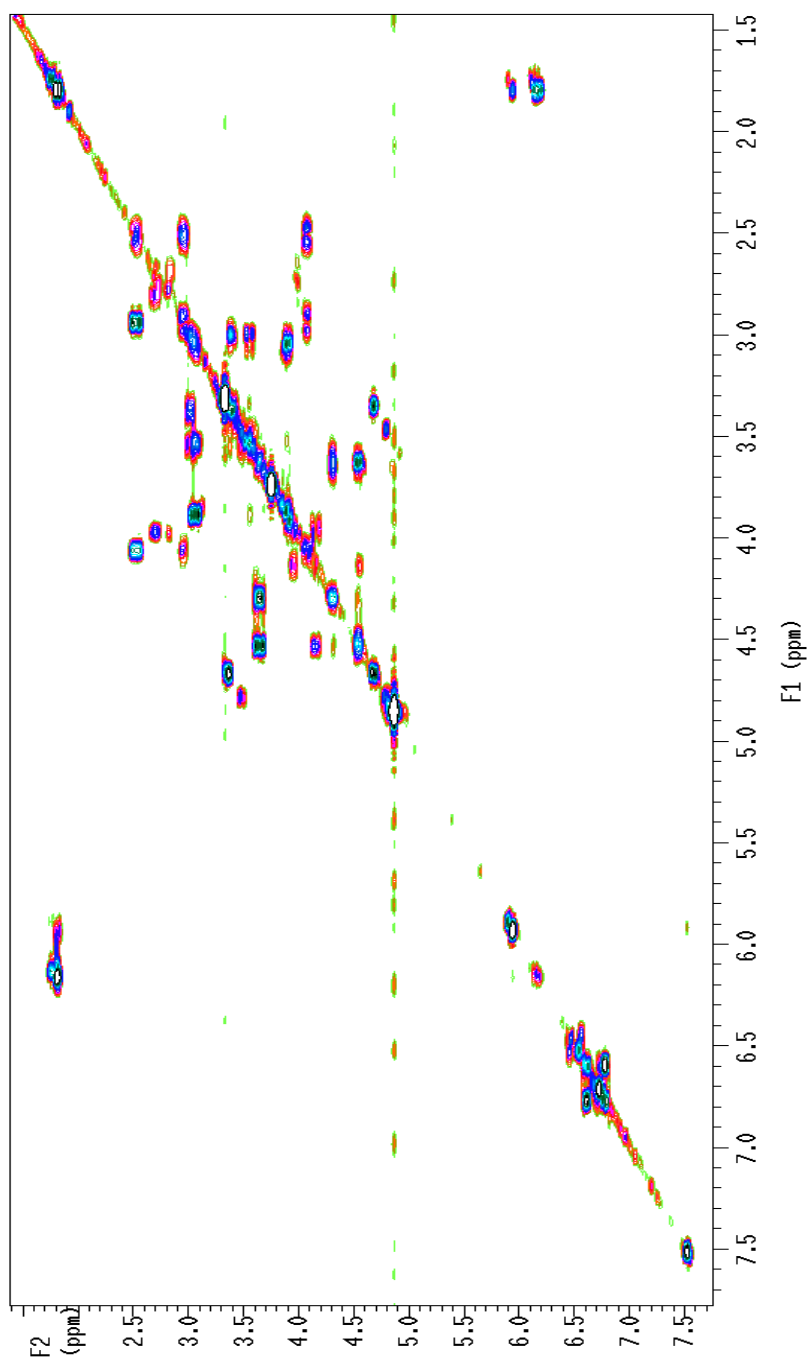
**Tabella 2.13** Attività antiossidanti dei singoli composti

In conclusione, l'estratto *n*-butanologico del decotto delle foglie di *Olea europea* L. (cv. *leccino*) presenta una notevole attività antiossidante dovuta alla presenza di composti

fitochimici bioattivi come fenoli, flavonoidi, e composti semplici o coniugati di secoiridoidi. La consistente presenza di fenoli potrebbe promuovere l'utilizzo del decotto come potenziale antinfiammatorio, collocando questo estratto tra le sostanze già in uso nella medicina popolare. L'estratto potrebbe quindi essere liofilizzato allo scopo di produrre polveri da utilizzare come ingredienti per la preparazione di cosmetici, integratori e medicinali, utile per prevenire gli effetti deleteri dello stress ossidativo, condizione riconosciuta come una delle cause dell'insorgenza di gravi malattie, anche di natura oncologica.

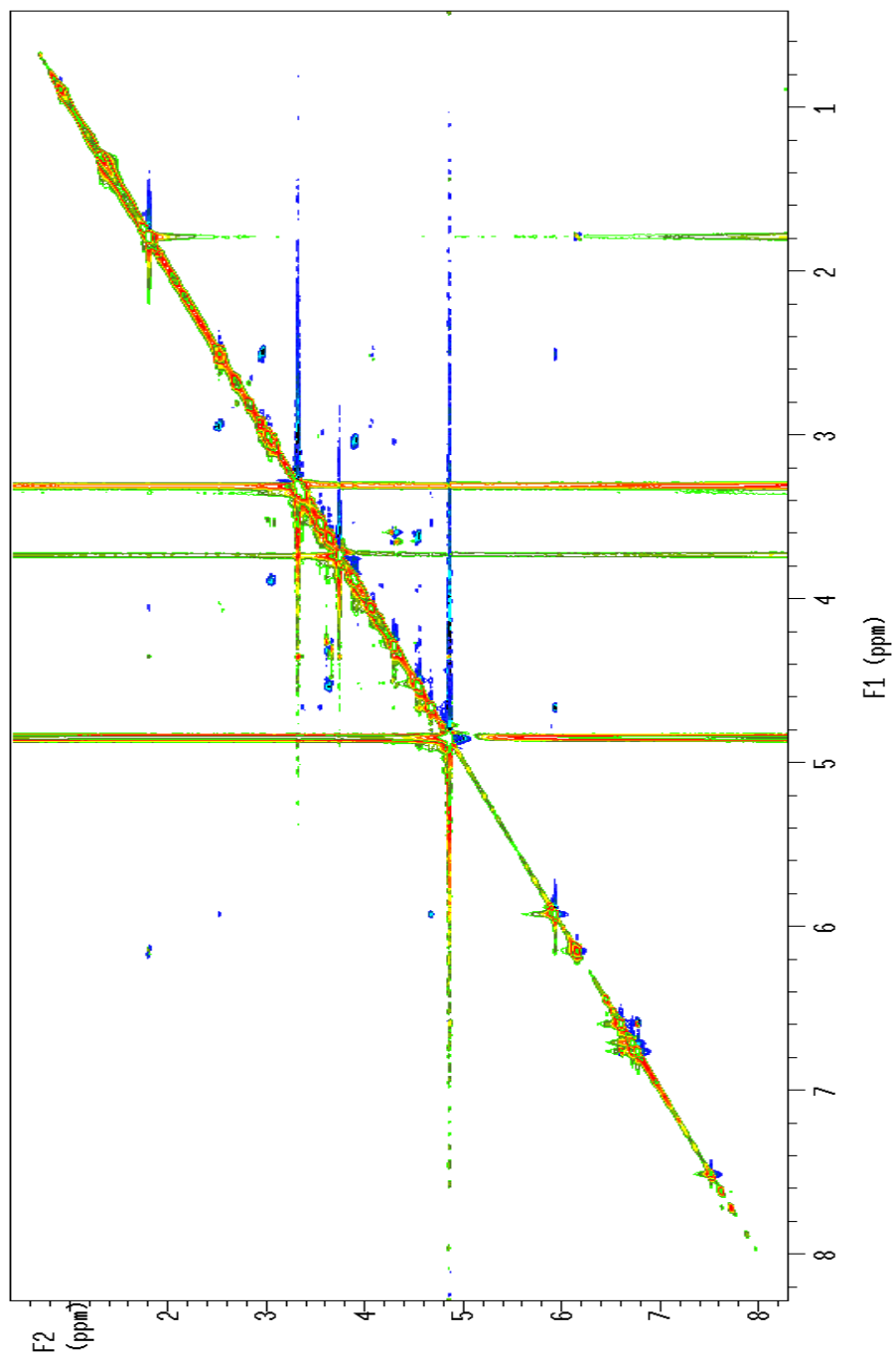
## 2.8. DATI SPETTROSCOPICI

2D NMR COSY, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Fraxamoside (1)

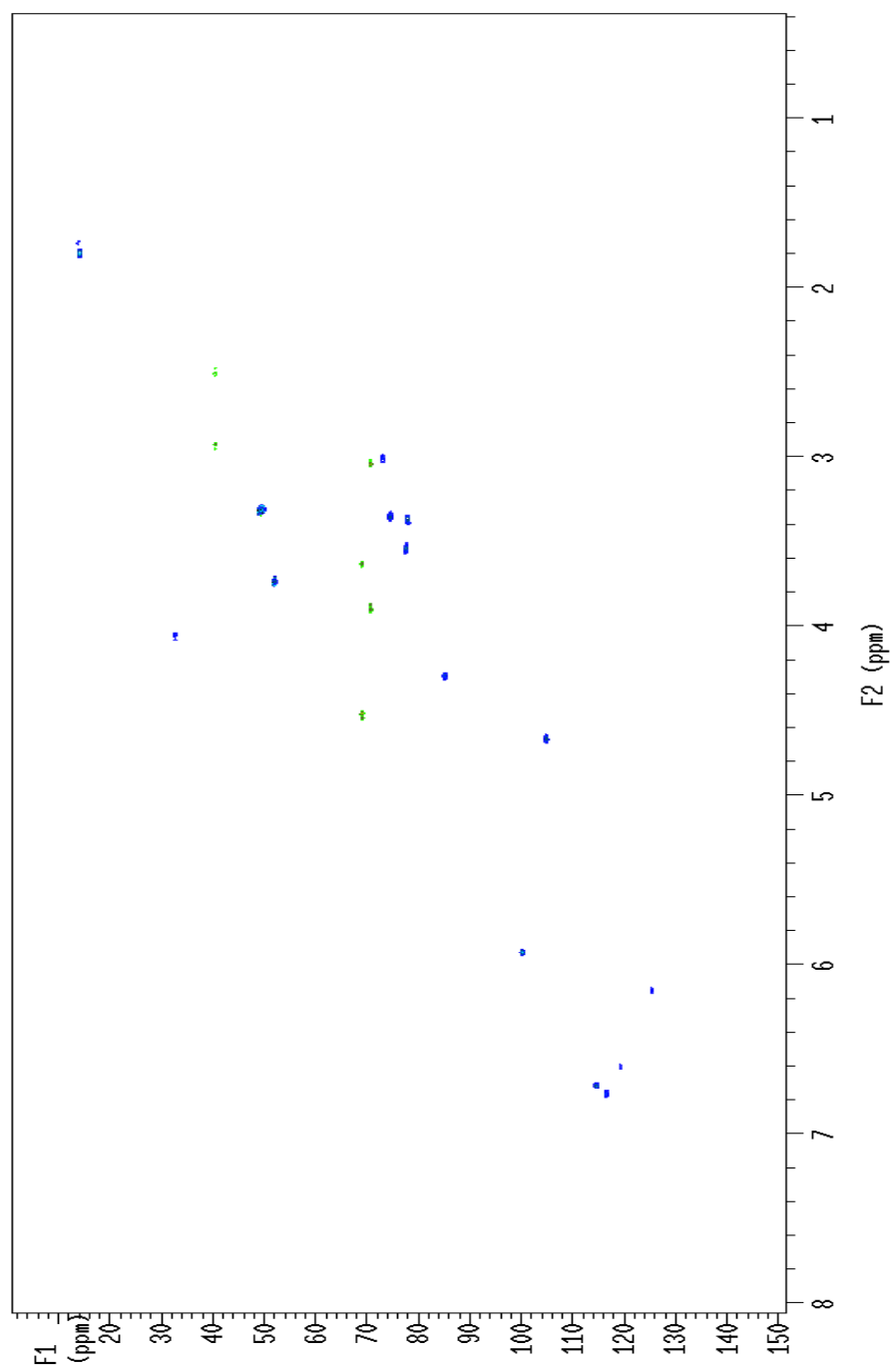




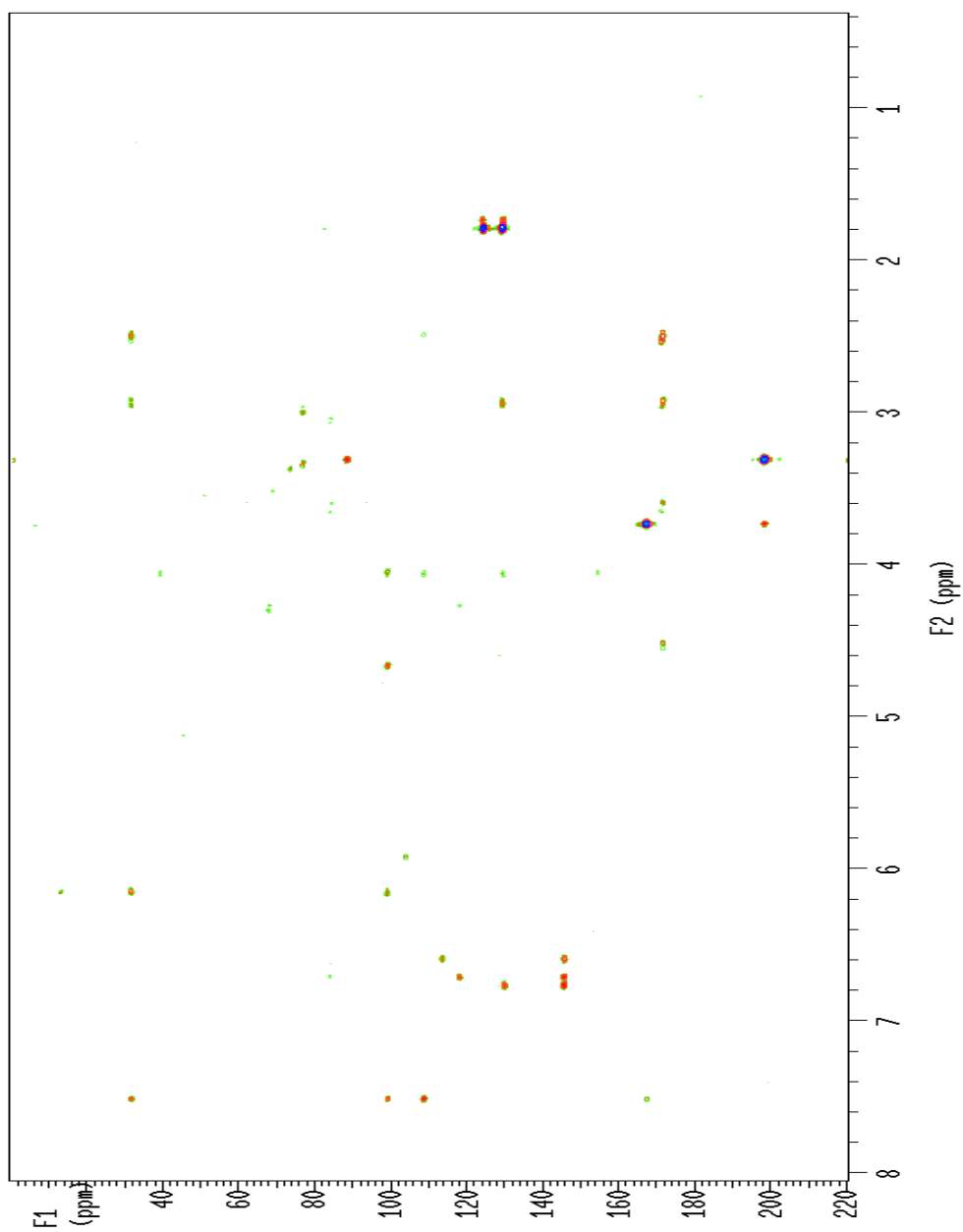
2D ROESY, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Fraxamoside (1)



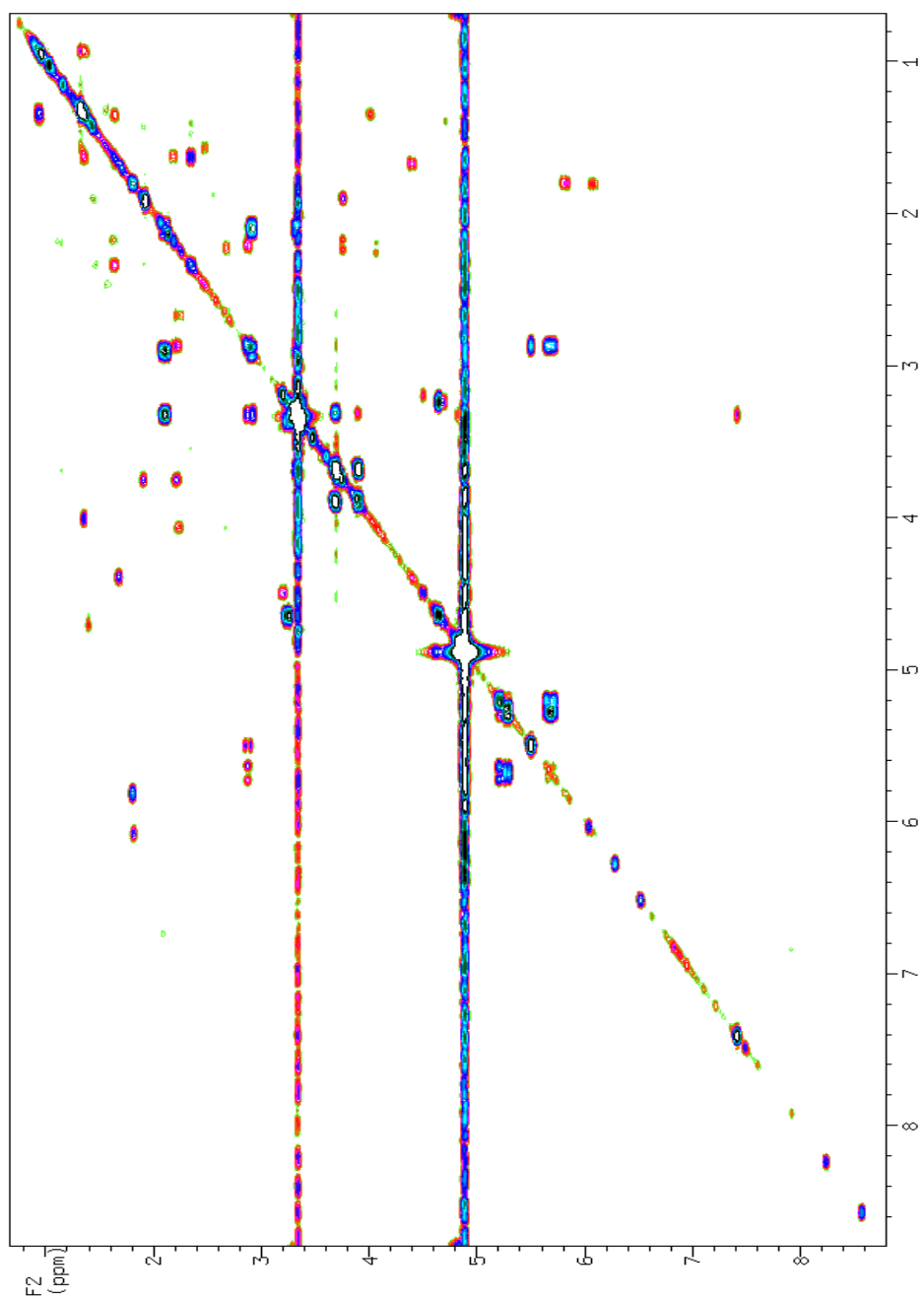
2D HSQC, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Fraxamoside (1)



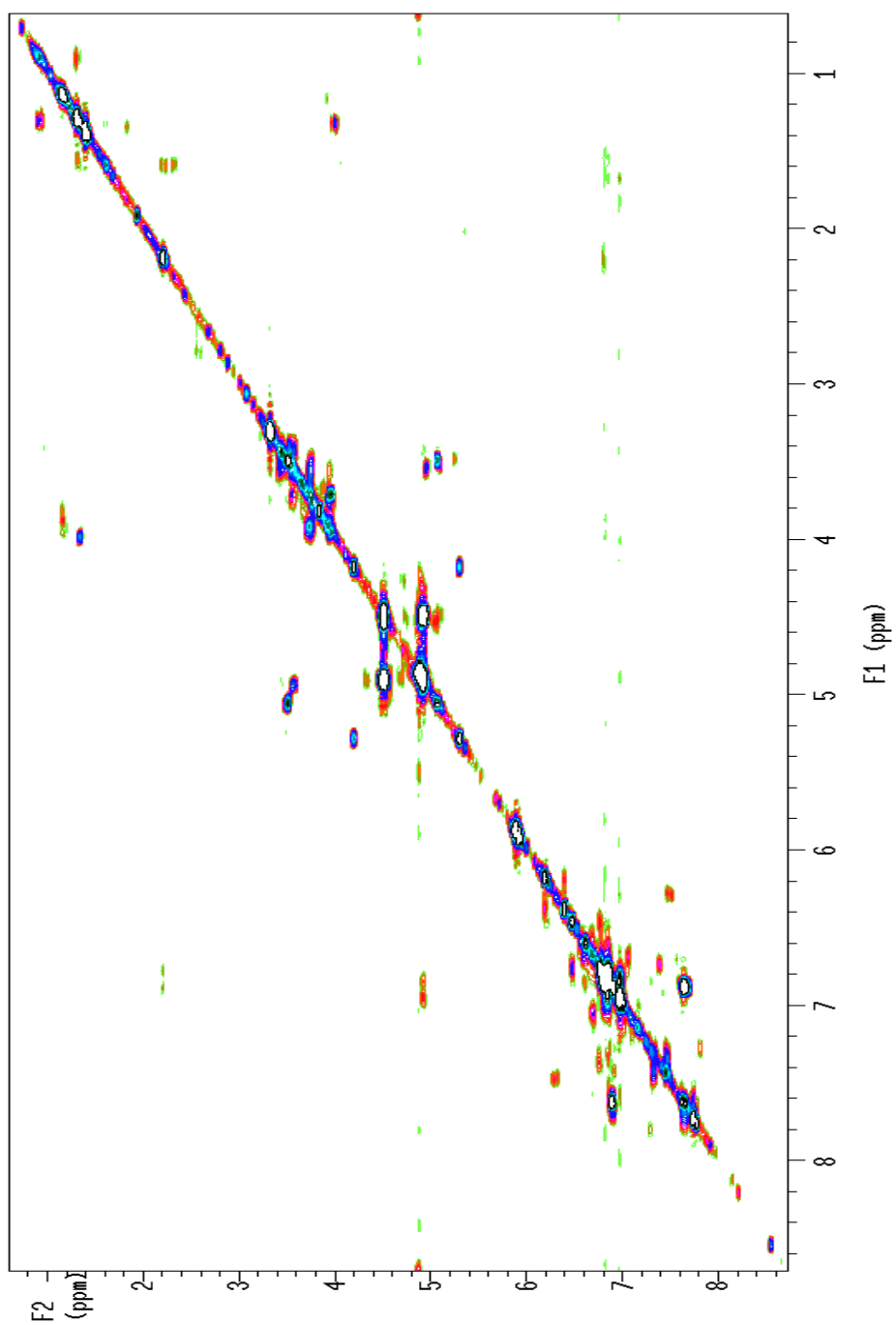
2D HMBC, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Fraxamoside (1)



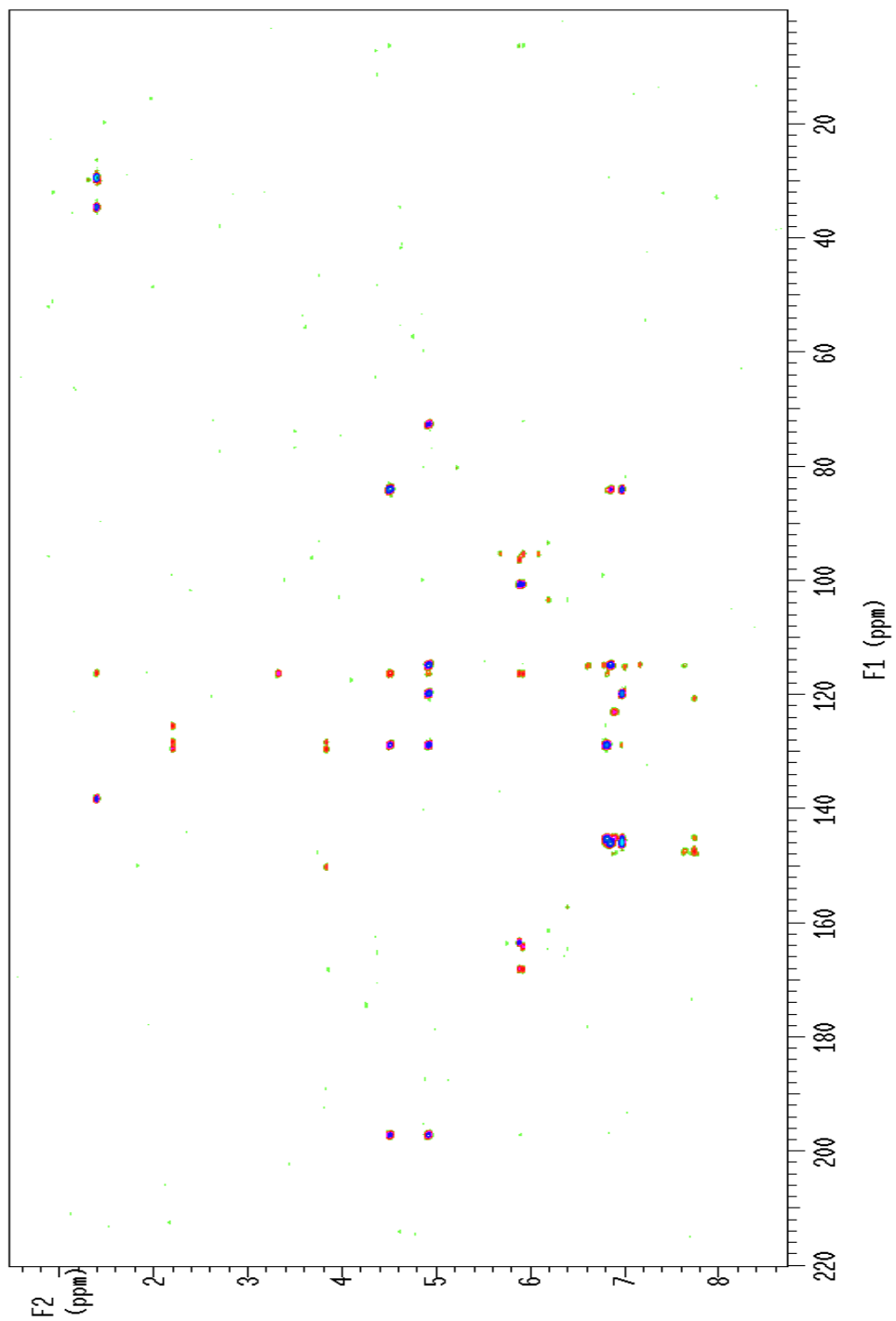
2D COSY, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Secoxiloganina (4)



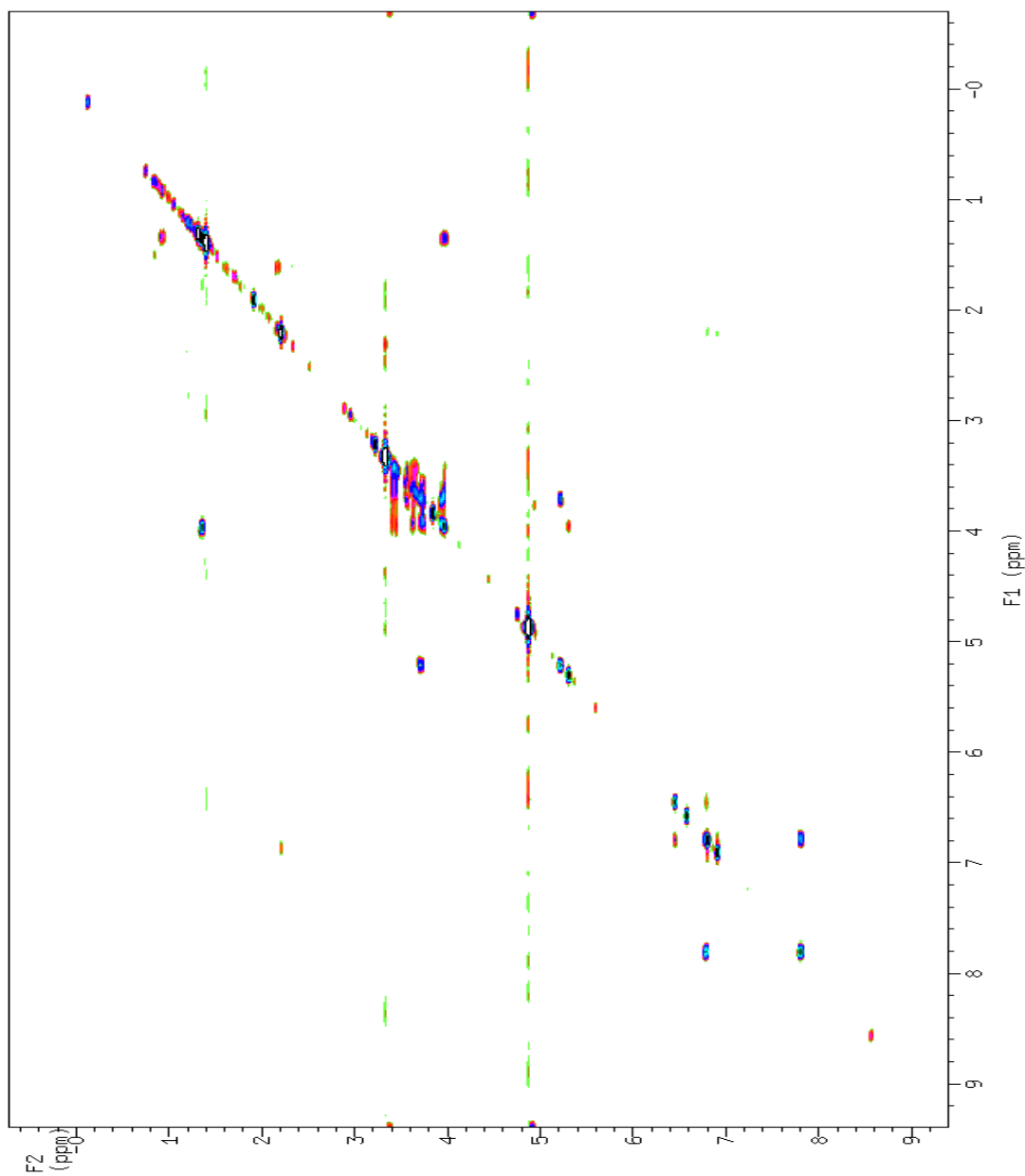
2D COSY, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Taxifolina (5)



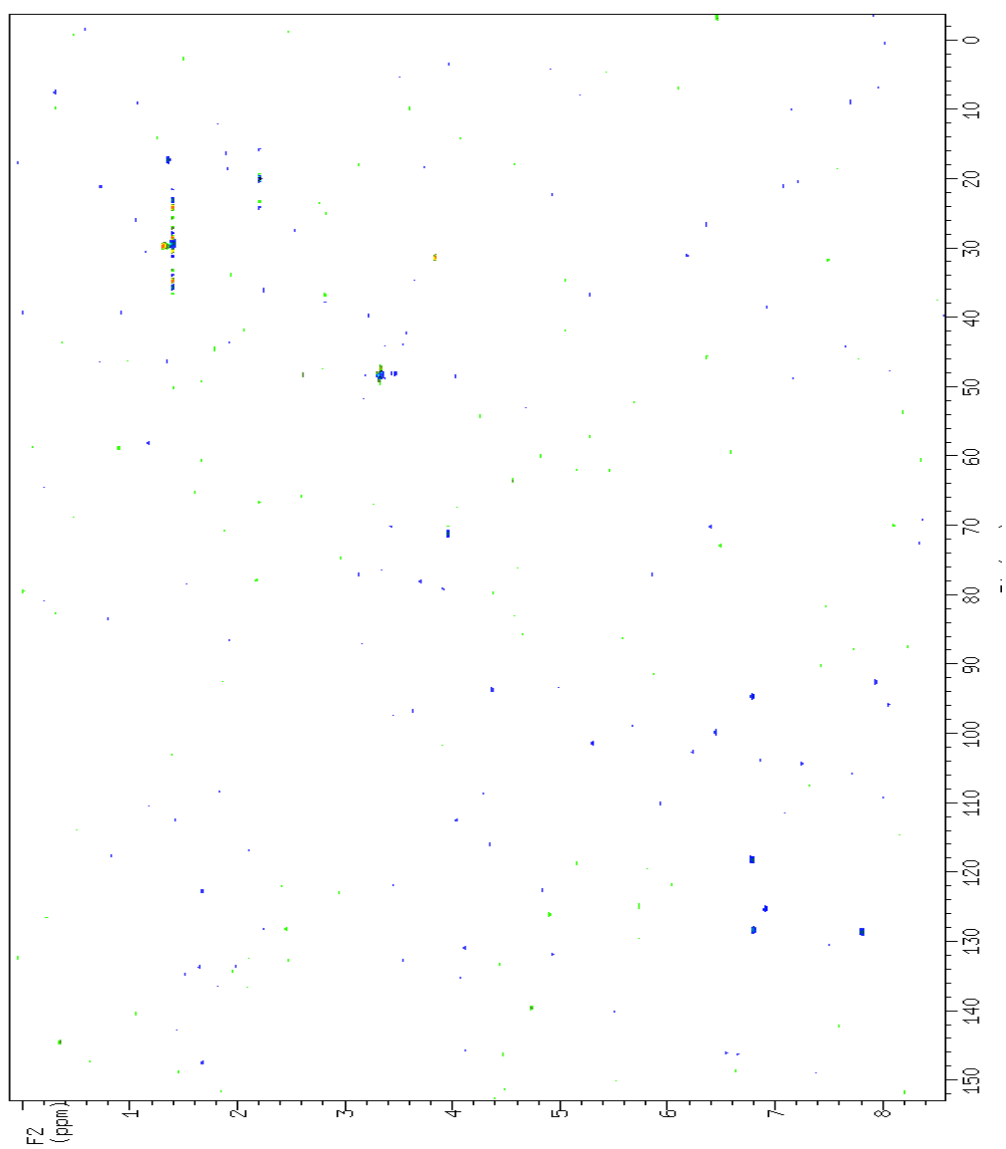
2D HMBC, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Taxifolina (5)



2D COSY, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Idrossitirosolo (7)

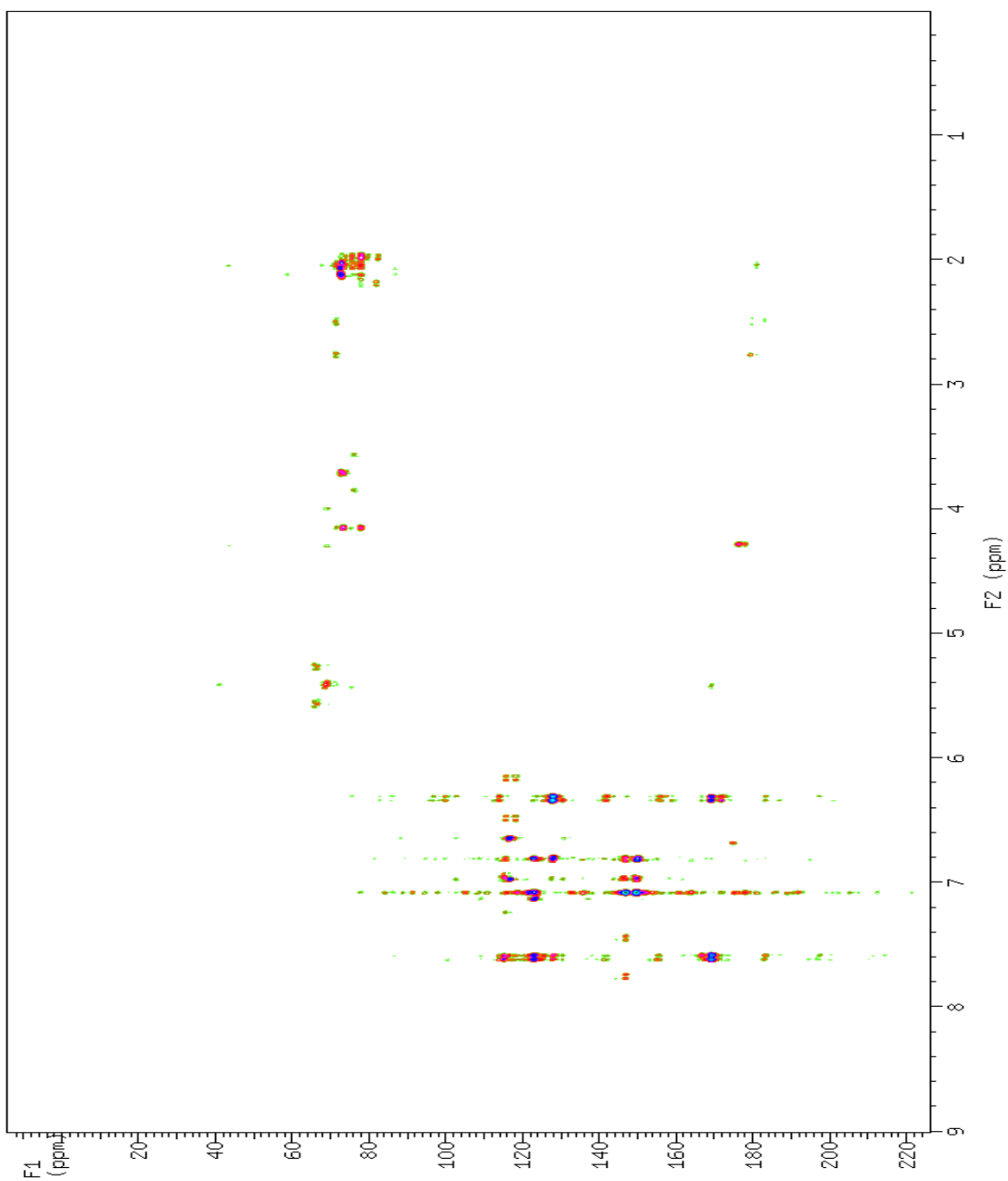


**2D HSCQ, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Idrossitirosolo**





2D HMBC, CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, Idrossitirosolo



## **CAPITOLO 3**

*Gentiana lutea L.*

# *Gentiana lutea* L.

Famiglia

**GENTINACEAE**

Nome italiano

**Genziana maggiore**



**Figura 3.1** *Gentiana lutea* L.



**Figura 3.2** Radici di *Gentiana lutea* L.

## **3.1. MORFOLOGIA**

La *Gentiana lutea* L. è una pianta erbacea perenne alta da 40 a 150cm, con una grossa radice a fittone polposa e fusti semplici, robusti ed eretti. Le foglie basali sono: glabre, picciolare, lunghe 20-30 cm e acute all'apice, con cinque nervature parallele evidenti. Le foglie cauline, simili alle basali sono progressivamente più piccole e sessili. I fiori sono peducolanti, riuniti in verticilli all'apice dei fusti e dell'ascella delle foglie. La corolla è di colore giallo intenso, con leggere linee punteggiate in bruno. Il rizoma e le radici essiccate si rigonfiano in acqua per la presenza di composti peptidici. Il frutto è una capsula a due valve contenenti numerosi piccoli semi appiattiti di colore marrone. La specie è allogama con impollinazione entomofila.

### 3.2. DISTRIBUZIONE

La *G.lutea* è diffusa in gran parte delle zone montane dell'Europa centro-meridionale: dai Pirenei fino ai Carpazi. In Italia è presente su tutto l'arco alpino, nell'Appennino settentrionale e meridionale e anche in Sardegna nei prati e pascoli montani. È tutelata sia a livello nazionale da leggi di protezione della flora spontanea, sia da regolamenti regionali che ne limitano la raccolta, a causa di una forte riduzione in alcuni ambienti.

### 3.3. PRINCIPI ATTIVI E PROPRIETA'

Il nome del genere *Gentiana* deriva da *Gentius*, un antico re dell'Illiria (180-167 a.C.), che, insieme a Plinio e Dioscoride, descrisse l'importanza di questa pianta come medicamento. Durante il Medioevo, la *G. lutea* veniva utilizzata come antidoto in casi di avvelenamento e successivamente per la cura di ferite. La droga è rappresentata dalle parti ipogee, in particolare le radici, vengono raccolte in autunno, generalmente nei mesi di settembre e ottobre. I composti più interessanti dal punto di vista farmacologico presenti nella *Gentiana lutea* L., sono i secoiridoidi glucosidici, un particolare gruppo di monoterpeni, presenti nelle specie vegetali, ed appartenenti alla famiglia degli iridoidi. Recenti studi hanno mostrato una interessante composizione chimica delle parti aeree della pianta. Hostettmann et al. hanno rilevato la presenza di isogentisina e due eterosidi flavonici (Hostettmann, K., 1973). La isogentisina ha mostrato una potente azione inibente nei confronti della monoammino-ossidasi (MAO), mentre la mangiferina, che è un composto xantonico, ha mostrato attività farmacologiche antidepressive e antiossidanti. Nella medicina popolare, le radici di *G. lutea* sono impiegate per la loro azione stomachica e per la preparazione di estratti che hanno effetti benefici per i disturbi dell'apparato epatobiliare (Wichte, M.,1994). Inoltre venivano utilizzate per la cura di gastriti, indigestioni e inappetenza durante le malattie febbrili. Numerosi studi hanno evidenziato la loro attività antibatterica nei confronti dello *Streptococcus pyogenes* e attività antimicrobica (Weckesser, S., 2007). I principi attivi caratterizzanti sono il gentiopicroside (3.5-15%) e l'amarogentina (0.01-0.05%), e altre sostanze come alcaloidi e zuccheri (genzianosio, genziobiosio, saccarosio).

Le radici essiccate possono essere utilizzate per la produzione di liquori digestivi e vini aromatici, mentre il prodotto fresco viene utilizzato nell'omeopatia, dalle industrie farmaceutiche e dalla distillerie. Il contenuto di principi attivi nelle radici varia in base alla tipologia di terreno, all'altitudine, alla provenienza, all'età e al diametro della radice. Nella farmacopea italiana la droga è rappresentata dalle radici di *G. lutea* che devono contenere un valore minimo pari al 33% di sostanze estraibili con l'acqua. Il sapore amaro dei derivati delle radici è conferito dalla presenza di composti chimici particolari, gli iridoidi.

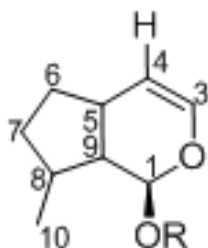
### 3.4. IRIDOIDI

Gli iridoidi rappresentano un gruppo eterogeneo di sostanze con attività terapeutiche molto diverse come ad esempio quella antinfiammatoria, antalgica, antireumatica, spasmolitica, anti allergica e ipotensiva. Il termine iridoide deriva dal nome di alcune specie di formiche (*Iridomyrmex*) che presentano la iridomirmecina e l'iridodiale come componenti delle loro secrezioni difensive.

Gli iridoidi si suddividono in quattro gruppi principali: iridoidi glicosidici, iridoidi non glicosidici, secoiridoidi e bisiridoidi.

#### 3.4.1 IRIDOIDI GLICOSIDICI E NON GLICOSIDICI

Questi composti sono caratterizzati da una particolare struttura in cui l'unità ciclopentanoide è fusa, mediante una giunzione di tipo cis, con un anello diidropiranosico sul cui carbonio C-1 è legato un residuo glicosidico, rappresentato generalmente dal  $\beta$ -D-glucosio.



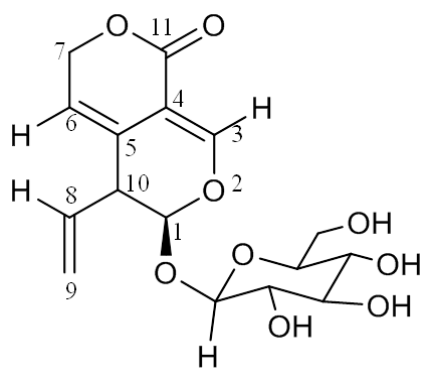
**Figura 3.3** Struttura di base dell'iridoide

Gli iridoidi non glicosidici sono anche chiamati iridoidi semplici oppure agliconi iridoidi. Differiscono dai composti del gruppo precedente per l'assenza dell'unità glicosidica legata al carbonio C-1. Tuttavia tra gli iridoidi non glicosidici potrebbero essere inclusi molti composti come patrinoside, penstamide, gelsemide, caratterizzati dalla presenza, nella loro molecola, di una o più unità di zucchero, nessuna delle quali però legata al carbonio C-1. Fanno parte del gruppo degli iridoidi non glicosidici anche alcuni composti aventi strutture analoghe alla plumiericina, cioè caratterizzati da quattro carboni di origine acetica, alla valeriana e a vari altri composti tra cui il nepetalactone e la iridomirmecina. Questi derivano biogeneticamente da un iridoide aglicone, mediante la apertura riduttiva dell'anello diidropiranosico.

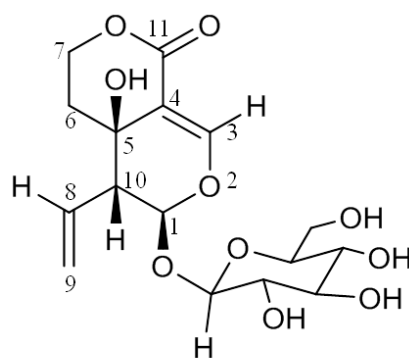
### **3.5. CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI METABOLITI SECONDARI ISOALTI DA *Gentiana lutea* L.**

Il protocollo utilizzato per l'estrazione dei metaboliti secondari dalle radici di *Gentiana lutea* è lo stesso che viene utilizzato per la preparazione "dell'amaro di genziana". Le radici sono state campionate nel Giardino della Flora Appenninica di Capracotta. L'estratto etanologico ottenuto dall'estrazione delle radici di genziana essiccate è stato ripartito mediante metodica di Kupchan (Kupchan, 1973). Le frazioni n-butanolica e cloroformica sono state purificate tramite DCCC e successivamente separate tramite HPLC.

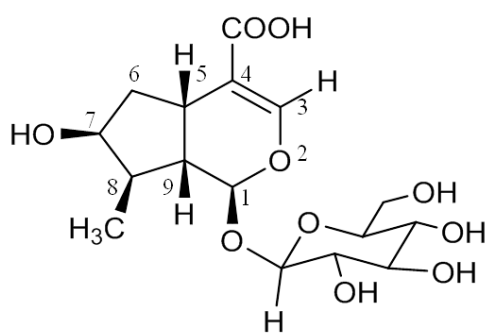
Dalla frazione butanolica sono stati identificati i seguenti composti: gentiopicroside (**14**), swertiamarine (**15**), acido loganico (**16**), gentiopicroside-6'-diglucoside (**17**).



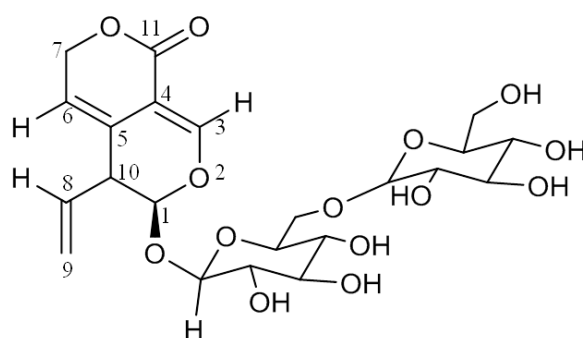
**14**



**15**

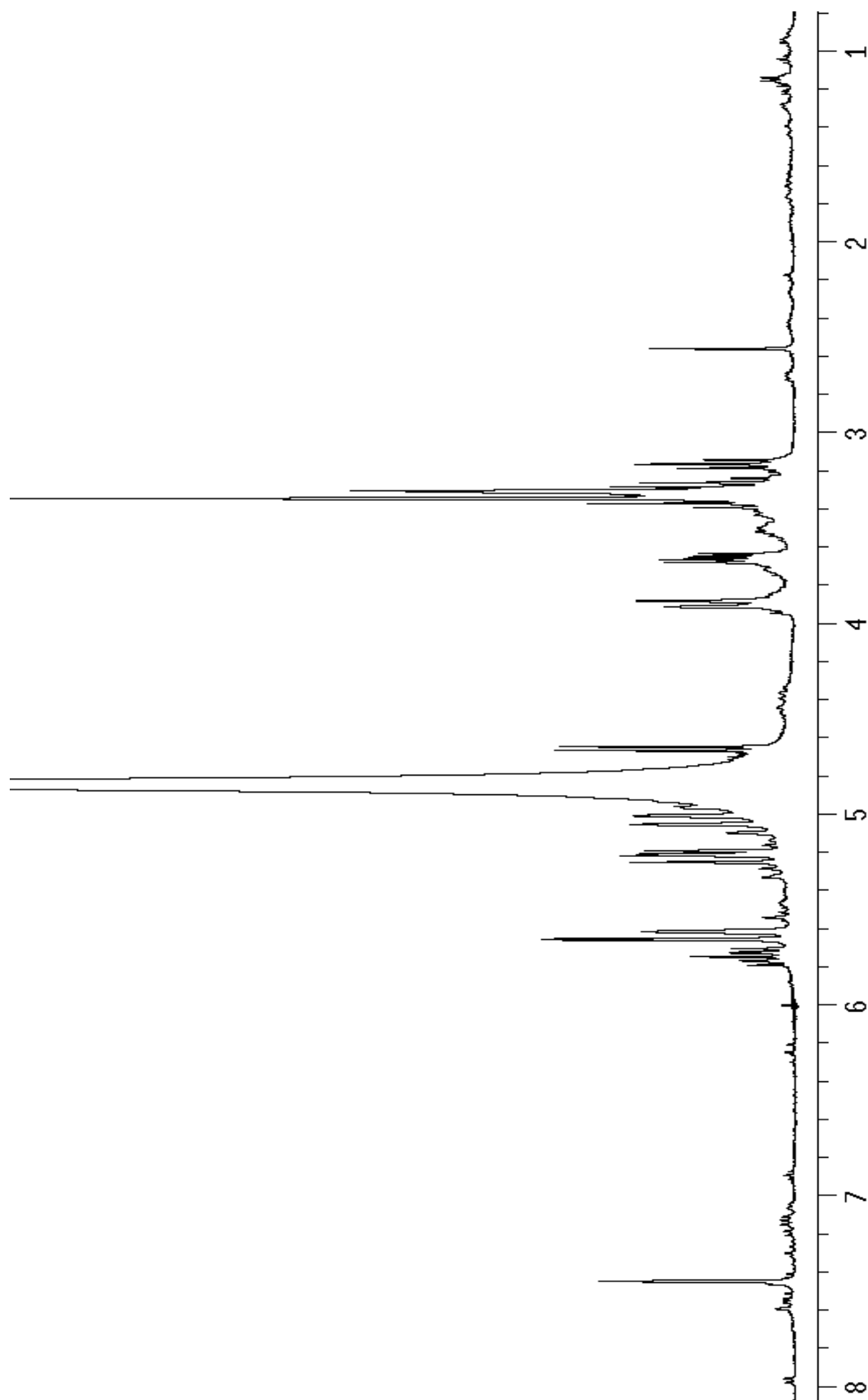


**16**

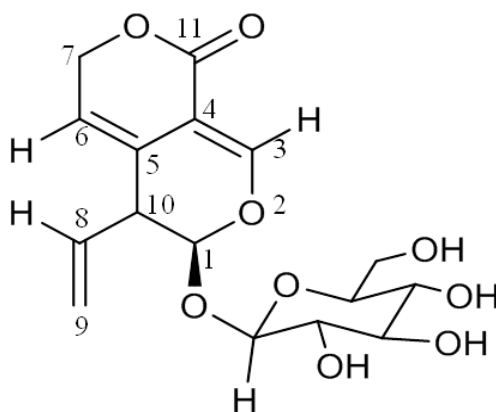


**17**

**<sup>1</sup>H-NMR, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Gentiopicroside (14)**







**14**

### **GENTIOPICOSIDE**

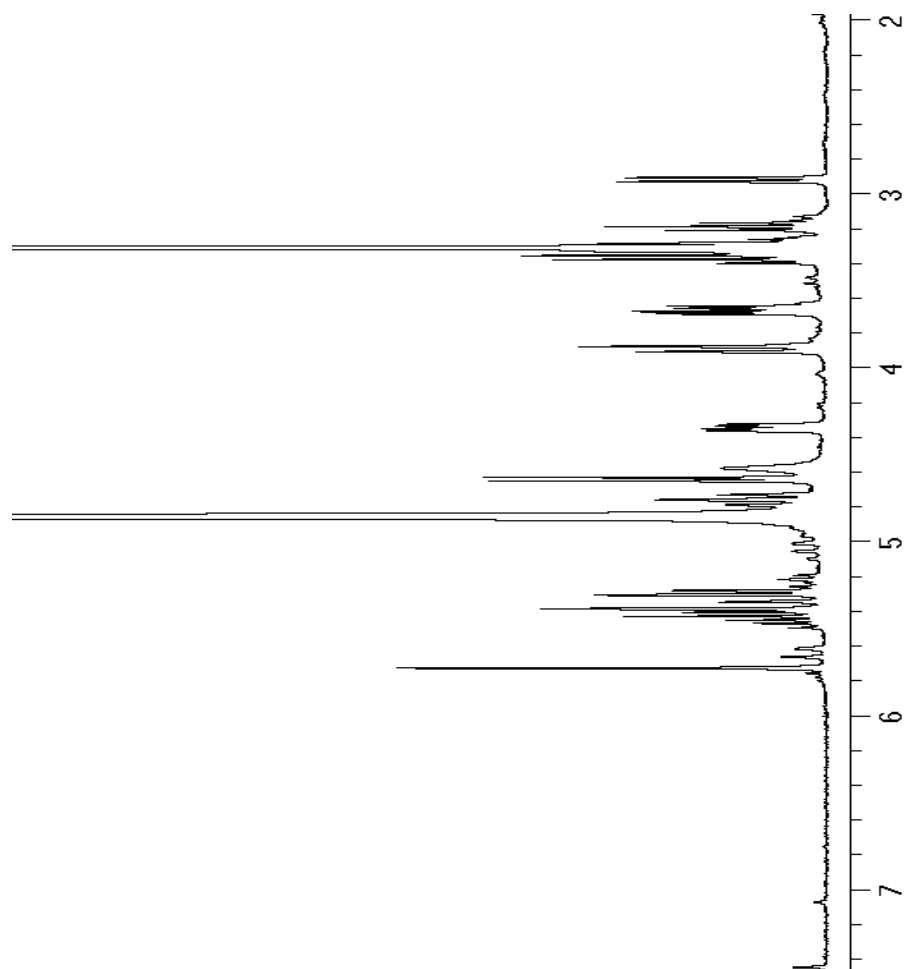
Da una prima indagine dello spettro NMR protonico è possibile individuare lo scheletro del secoiridoide del gentiopicroside legato ad un'unità saccaridica. Lo spettro di massa evidenzia un ione pseudomolecolare a  $m/z$  379  $[M+Na]^+$ . Dallo spettro  $^1H$ -NMR si evince un singoletto a  $\delta$  7.45 che corrisponde al protone legato in posizione C-3 (153.2 ppm), il quale indica la presenza di un'insaturazione. Si evidenziano, inoltre il protone in posizione H-8 che compare doppio doppietto con un chemical shift  $\delta$  5.75 che nel COSY risulta accoppiato con i due protoni che risuonano a  $\delta$  5.25 e  $\delta$  5.21 (dd) rispettivamente, ciò indica la presenza di una catena alchilica insatura. Dall'esperimento COSY è ben evidente un monosaccaride che dai chemical shift e dalle costanti di accoppiamento risulta essere una unità di glucosio, partendo dal protone anomero a  $\delta$  4.65 è possibile individuare H-2' ( $\delta$  3.90), H-3' ( $\delta$  3.66), H-4' ( $\delta$  3.36), H-5' ( $\delta$  3.16), H-6' ( $\delta$  3.90, 3.66). Attraverso l'esperimento HSQC è possibile correlare i protoni con i corrispondenti atomi di carbonio. Attraverso il successivo esperimento HMBC è stata determinata la struttura del composto collegando i segnali ottenuti dallo spettro COSY. In particolare il protone a  $\delta$  5.66 è assegnabile al protone C-1 del secoiridoide che mostra una correlazione  $^3J$  con il carbonio anomero dell'unità di glucosio (102.5 ppm), definendo così il sito di glicosilazione. L'esperimento HMBC ha messo in evidenza la presenza di una funzione carbonilica (168.8 ppm) che mostra una correlazione  $^3J$  con H-3 a  $\delta$  7.45. Altre correlazioni significative ai fini della definizione della struttura sono l'H-8 ( $\delta$  5.75) che mostra una correlazione con il C-10 (49.4 ppm) e il C-1 (101.0 ppm) e la correlazione tra H-1 ( $\delta$  5.64) e il C-5 (ppm). Dai dati ottenuti dagli esperimenti NMR e dal confronto dei dati di

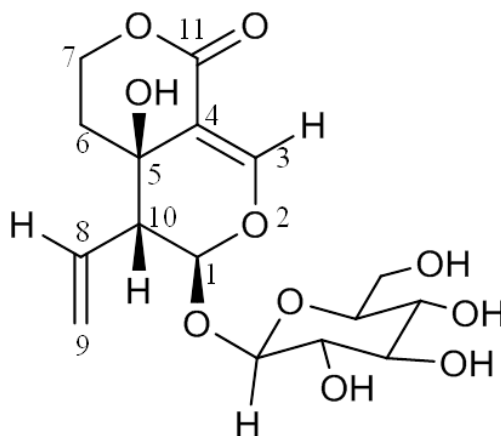
letteratura possiamo confermare che il composto isolato è il gentiopicoside.  
(Hajimehdipoor. H., 2008) (Tabella 3.1)

**Tabella 3.1** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Gentiopicoside (14)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1	5.66 d (2.9)	101.0	C3 C5 C1'
2			
3	7.44 s	153.2	C11 C5 C4 C1
4		107.5	
5		129.9	
6	5.61 m	119.6	C4 C7 C10
7	5.02 d (17.6)	73.5	C11 C5 C6
8	5.75 ddd (17.1, 10.3, 6.8)	137.5	C5 C1 C10
9	3.30 m	120.9	C10 C1 C8
10	5.21 dd (10.3, 1.5) 5.24 dd (17.1, 1.5)	49.4	
11		168.8	
Glucosio			
1'	4.65 d (8.1)	102.5	
2'	3.14 dd (9.2, 8.0)	76.8	
3'	3.35 t (8.8)	80.7	
4'	3.23 t (8.8)	73.9	
5'	3.30 m	73.7	
6'	3.64 dd (12.0, 6.4) 3.89 dd (12.0, 2.4)	65.1	

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz, Swertiamarina (15)**





15

### SWERTIAMARINA

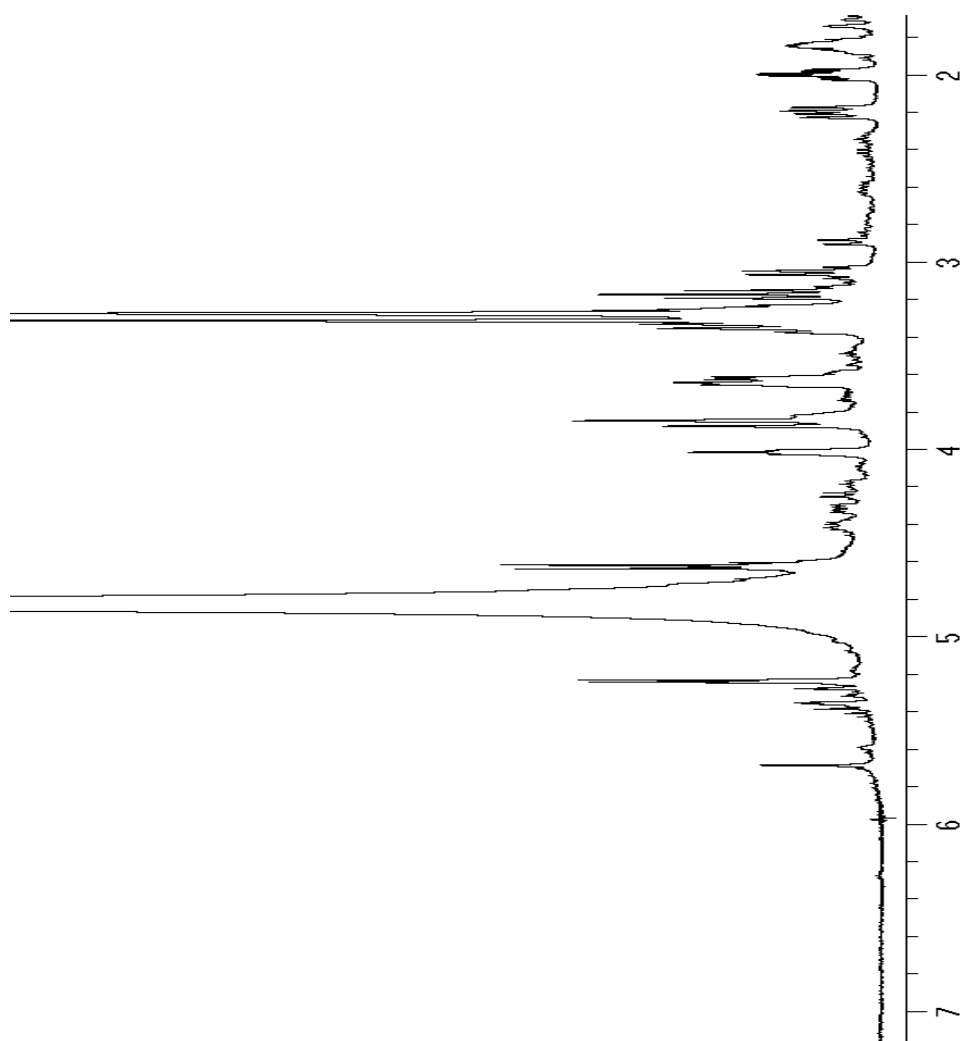
Dall'analisi dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  si evidenzia la presenza di un secoiridoide a cui è legata una unità saccaridica. L'analisi ESI-MS mostra la presenza di uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  397  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , da cui si evince un peso molecolare di 374 Dalton. Nello spettro protonico si denota un singoletto a  $\delta$  7.63 che corrisponde ad un carbonio ibridato  $\text{sp}^2$  e può essere assegnato al protone legato al C-3 ( $\delta$  153.2). Nella regione dello spettro tra  $\delta$  5 e 6 evidenziamo una serie di segnali abbastanza complessi a  $\delta$  5.29 e 5.23 (dd) i protoni del sistema olefinico ( $\text{H}_2$ -9). I quali sono ulteriormente accoppiati con il segnale a  $\delta$  5.41 assegnato all'H-8. A  $\delta$  5.73 risuona il protone in C-1 il cui chemical shift è condizionato dalla presenza di due atomi di ossigeno adiacenti. Dall'esperimento COSY compare un altro sistema di spin costituito da quattro protoni accoppiati tra loro  $\delta$  1.93 e  $\delta$  1.74 legati al C-6 a gli  $\text{H}_2$ -7 che risuonano a  $\delta$  4.74 e  $\delta$  4.35 questi ultimi shiftati a campi bassi per effetto dell'atomo di ossigeno adiacenti. Attraverso l'esperimento HSQC ad ogni segnale protonico è stato assegnato il corrispondente segnale  $^{13}\text{C}$ . La combinazione del COSY e HSQC ha consentito di assegnare la sequenza protonica al monosaccaride che, dal valore dei chemical shifts e dalla valutazione della costante di accoppiamento è risultato essere una unità di glucosio. Il protone anomero a  $\delta$  4.65, dal quale si possono determinare i chemical shifts dei successivi protoni H-2' ( $\delta$  3.19), H-3' ( $\delta$  3.38), H-4' ( $\delta$  3.23), H-5' ( $\delta$  3.33) e H-6' ( $\delta$  3.67, 3.90). L'esperimento HMBC ha consentito di correlare tra loro i vari sistemi di spin individuati ed ha evidenziato la presenza di una funzione carbonilica (166.8) e di un carbonio quaternario ossigenato (62.9 ppm). Significative sono le correlazioni tra il protone anomero a  $\delta$  4.65 con il C-1 (97.8 ppm) che consente di

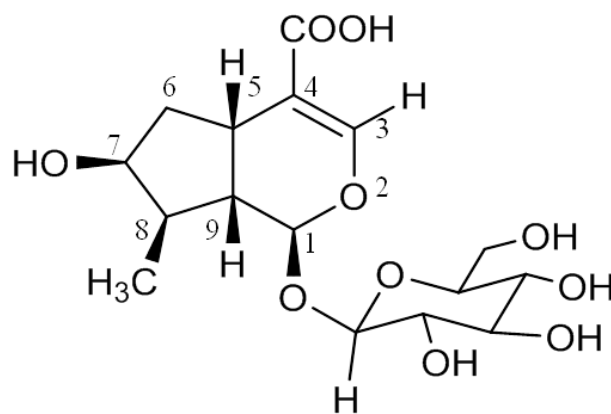
collocare sul C-1 il glucosio. Il protone H-3 a  $\delta$  7.63 mostra una correlazione  $^3J$  con la funzione carbonilica C-11 (166.8 ppm) che a sua volta correla con uno degli H-7 ( $\delta$  4.35) e H-1 ( $\delta$  5.73). I dati ottenuti concordano con la struttura della swertiamarina (Zhu, B.K., 2012). (Tabella 3.2)

**Tabella 3.2** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Swertiamarina (15)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$
1	5.73 d (1.7)	97.8
2		
3	7.63 d (2.4)	153.2
4		107.6
5		62.9
6	1.93 1.74 ddd (13.5, 1.7, 2.2)	32.9
7	4.35 ddd (4.2, 1.7, 11.4) 4.74	64.4
8	5.41 m	132
9	2.92 dd (1.8, 9.4)	50.21
10	5.29 dd ovl 5.23 (10.3, 1.5)	119.9
11		166.8
Glucosio		
1'	4.65 d (7.8)	98.9
2'	3.19	75.1
3'	3.38 m	77.1
4'	3.23	70.1
5'	3.33 t (9.5)	77.8
6'	3.67 ,3.90 dd (12.0, 2.1)	60.6

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz, Acido Loganico (16)**





16

### ACIDO LOGANICO

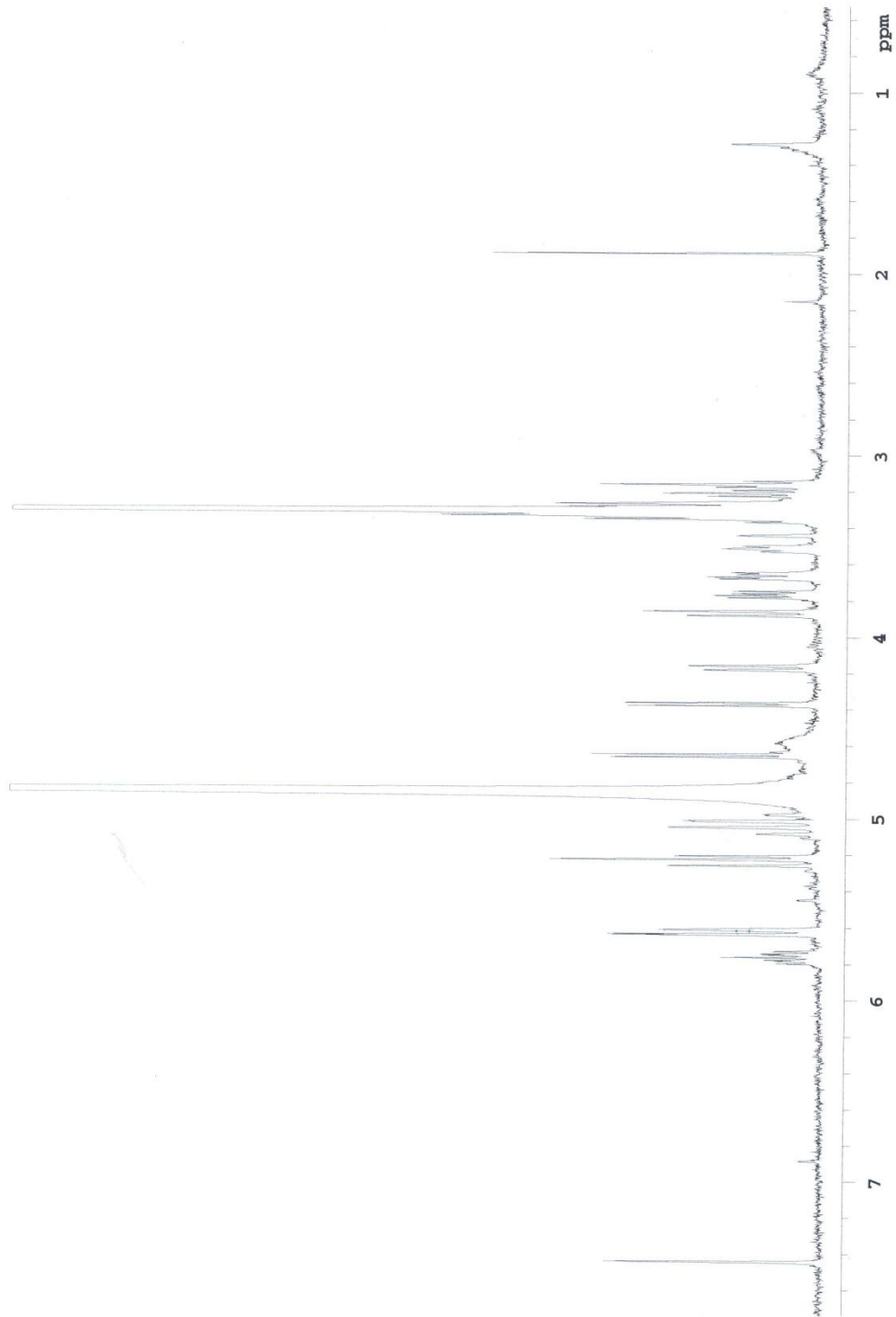
Da una prima analisi dello spettro  $^1\text{H-NMR}$ , il composto ha lo scheletro di base di un iridoide al quale è legata un'unità saccaridica. Il composto presenta uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  377  $[\text{M} + \text{H}]$ . Dallo spettro COSY è possibile individuare due sistemi di spin attribuibili all'aglicone ed un terzo assegnabile ad un monosaccaride. In particolare è possibile seguire gli accoppiamenti scalari, partendo dal segnale che risuona a  $\delta$  5.26 (d). Quest'ultimo protone è accoppiato con un CH a  $\delta$  2.03 (dt) che a sua volta mostra un accoppiamento con un altro CH a  $\delta$  1.87. Questo ultimo protone risulta avere tre correlazioni con i  $\delta$  2.03 (CH),  $\delta$  4.04 e  $\delta$  1.09. Dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$  quest'ultimo segnale risulta essere un metile mentre il segnale a  $\delta$  4.04 mostra una complessa molteplicità e può essere assegnato ad un protone legato ad un carbonio recante una funzione ossidrilica. La restante sequenza comprende un  $\text{CH}_2$  ( $\delta$  2.23,  $\delta$  1.65) e un CH ( $\delta$  3.09). E' presente anche un protone olefinico a  $\delta$  7.39. Dall'analisi dello spettro HSQC sono state individuate le correlazioni dei protoni con i rispettivi carboni (Tabella 3.3). Mentre dall'esperimento HMBC sono state determinate le correlazioni tra il protone H-3 ( $\delta$  7.39) con il carbonio del gruppo carbossilico (170.1); il protone H-1 correla con C-3 (151.4 ppm) e con il carbonio anomero dell'unità di glucosio (99.2 ppm) infine i protoni H-8 ( $\delta$  1.09) correlano con il carbonio in posizione 7 (74.4 ppm). Dall'interpretazione dei dati ottenuti dagli esperimenti NMR è stato riscontrato che l'iridoide glucoside è l'acido loganico (Xiaozhe, Z., 2003).

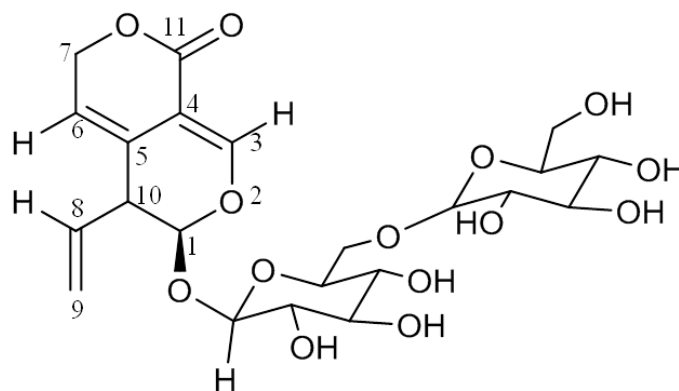
**Tabella 3.3** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Acido loganico (16)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1	5.26 d (4.4)	96.8	C3 C1'
2			
3	7.39 s	151.4	
4		113.4	
5	3.09 dd (7.6, 8.0)		
6	2.23, 1.65	41.8	
7	4.04 m	74.1	
8	1.85 m	41.2	
9	2.03 dt (13.3, 4.0)	45.7	
Glucosio			
1'	4.66 d (8.4)	99.2	
2'	3.21 dd (8.8, 8.0)	73.8	
3'	3.35 m	77.3	
4'	3.32 t (9.5)	70.7	
5'	3.32 Ovl	77.3	
6'	3.89 dd (1.6, 12.4) 3.70 dd (6.0, 12.4)	62.8	
$\text{CH}_3$	1.09 d (7.2)		C7
COOH		170.1	



**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz, Gentiopicroside-6'-O-diglucoside**





17

### GENTIOPICROSIDE-6'-DIGLUCOSIDE

La molecola isolata presenta come struttura base un secoiridoide a cui sono legate due unità saccaridiche. Lo spettro ESI-MS mostra uno ione pseudomolecolare a  $m/z$  519  $[M+H]^+$ , 162 unità di massa atomica in più rispetto al gentiopicroside. Dallo spettro protonico si evince che i valori dei chemical shifts sono simili a quelli del gentiopicroside. La differenza, evidenziata nella regione tra 3 e 4.7 ppm, è dovuta alla presenza di segnali multipli imputabili all'esistenza di due unità saccaridiche. Dall'analisi dello spettro  $^1H$ -NMR è possibile determinare le unità saccaridiche i cui protoni anomerici risuonano a  $\delta$  4.65 e  $\delta$  4.37 ciascuna con  $J=7.6$  Hz. Attraverso l'esperimento COSY è stato possibile seguire la sequenza per ciascun monosaccaride. A partire dal protone anomero ( $\delta$  4.65) i successivi protoni risuonano a  $\delta$  3.16 H-2', a  $\delta$  3.34 H-3',  $\delta$  3.27 H-4',  $\delta$  3.34 H-5' e  $\delta$  4.16 e 3.76 H-6. Il secondo monosaccaride è stato rilevato dal protone anomero a  $\delta$  4.37 e dall'esperimento COSY, sono stati definiti gli altri protoni H-2'' ( $\delta$  3.21), H-3'' ( $\delta$  3.51), H-4'' ( $\delta$  3.31), H-5'' ( $\delta$  3.27), H-6'' ( $\delta$  3.87 e  $\delta$  3.66). Dall'analisi GC i due monosaccaridi risultano essere glucosio. Dai valori del chemical shift del primo monosaccaride ( $\delta$  4.65) si osserva che i due protoni al C-6 ( $\delta$  4.16 e  $\delta$  3.76) sono spostati a campi bassi rispetto ai corrispondenti valori dell'altro monosaccaride. Ciò lascia presupporre che la seconda unità saccaridica (Glu-2) possa essere legata an C-6' del Glc-1. L'esperimento HSQC ha consentito di correlare ciascun segnale protonico con i corrispondenti carboni. La parte inerente all'aglicone ben concorda con i dati del Gentiopicroside. Una sensibile variazione si osserva per il C-6' che compare a 69.7 ppm spostato a campi bassi rispetto al valore di circa 62.0 ppm osservato in un glucosio non sostituito. Ciò ha fatto pensare che la seconda unità di glucosio sia legata al C-6' del Glc-1. L'esperimento HMBC ha inoltre confermato la sequenza dei monosaccaridi, infatti H-1'' (Glc-2)

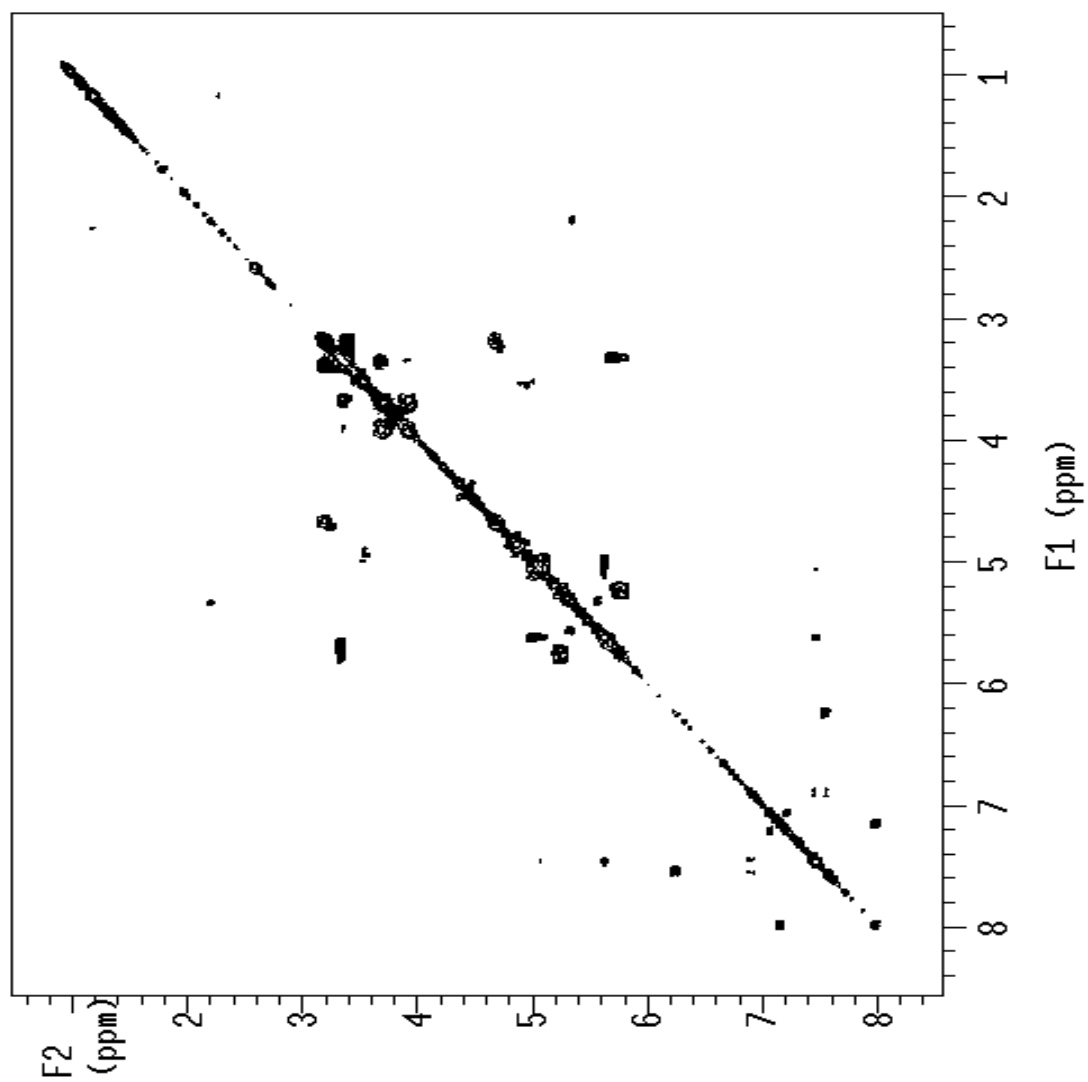
mostra un cross peak con il C-6' (69.7 ppm) e uno degli idrogeni H-6' ( $\delta$  4.16) ha una correlazione con il C-1'' (104.7 ppm). (Tabella 3.4). Dall'analisi degli spettri NMR e dai dati di letteratura è possibile definire la struttura, gentiopicroside-6'-O-di-glucoside. (Takeda, Y., 1999)

**Tabella 3.4** Dati  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Gentiopicroside-6'-diglucoside (17)

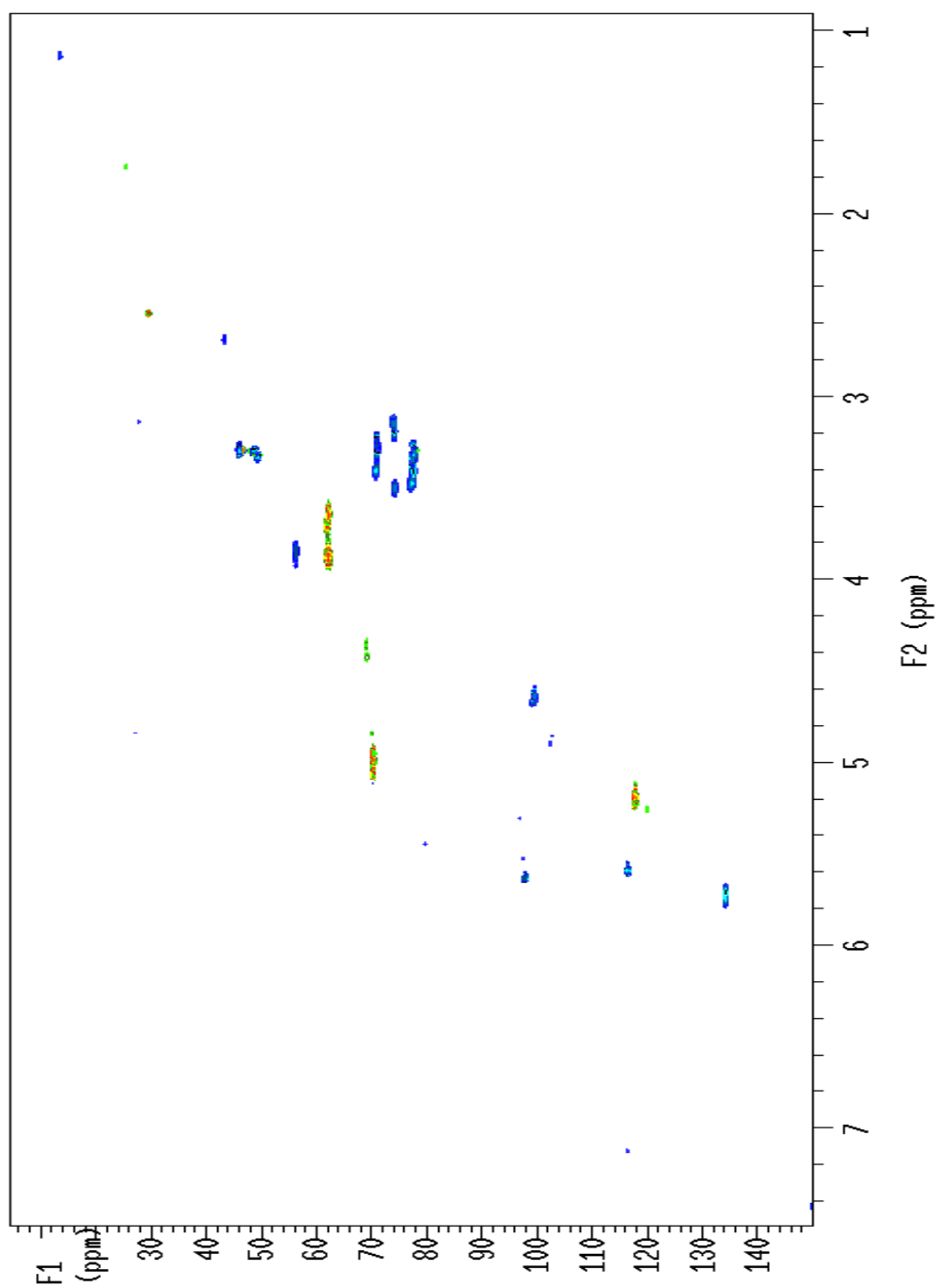
POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	HMBC
1	5.64 d (2.9)	98.5	
2			
3	7.44 s	150.5	
4			
5			
6	5.61 m	116.8	
7	5.01 br	70.5	
8	5.76 ddd (17.1, 10.3, 6.8)	134.6	
9	3.30	46.3	
10	5.26 dd (10.3, 1.5) 5.22 dd (17.1, 1.5)	118.4	
Glucosio 1			
1'	4.65 d (8.3)	100.2	
2'	3.16 dd (9.2, 8.0)	74.3	
3'	3.34 t (9.5)	77.6	
4'	3.25 m	71.2	
5'	3.34 t (9.5)	77	
6'	4.10 dd (12.0, 4.5) 3.72 dd (12.0, 2.5)	69.7	
Glucosio 2			
1''	4.37 d (7.9)	104.7	C6'
2''	3.21 t (8.8)	74.9	
3''	3.51 ovl	77.1	
4''	3.31 m	71.3	
5''	3.27 m	77.7	
6''	3.87 dd (12.0, 2.0) 3.66 dd (12.4, 2.1)	62.4	

### 3.6. DATI SPETTROSCOPICI

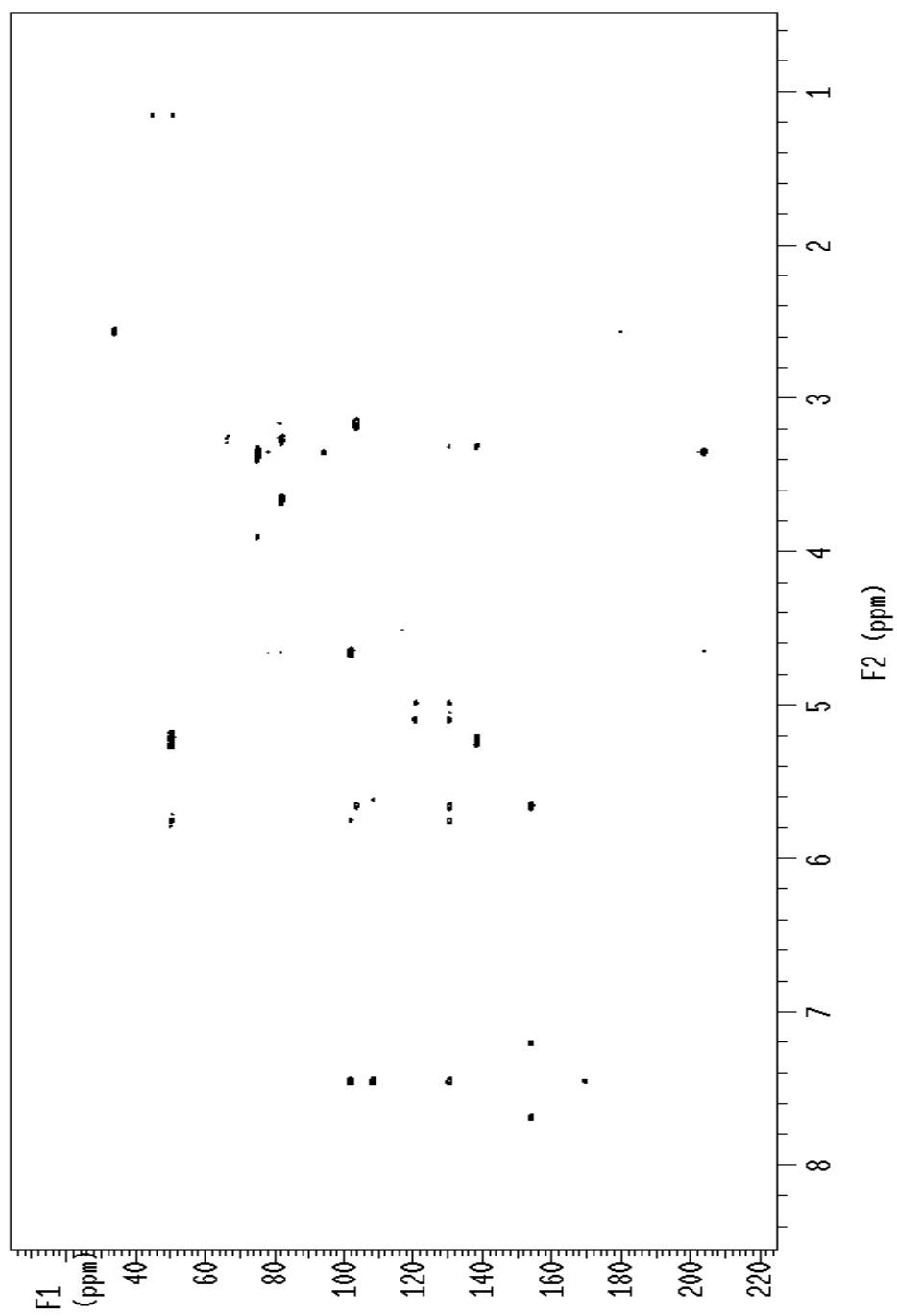
2D COSY, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Gentiopicroside (14)



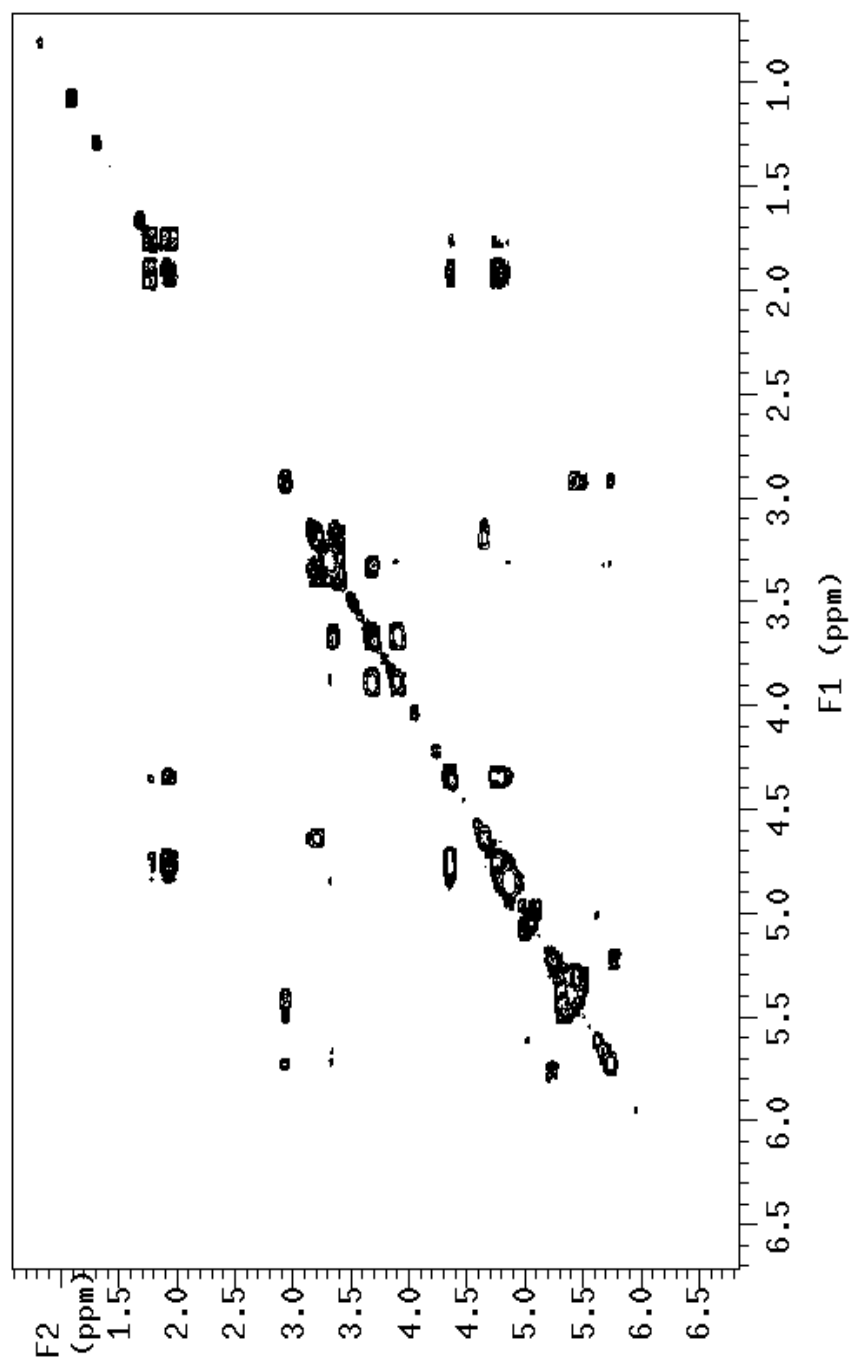
2D HSQC, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Gentiopicroside (14)



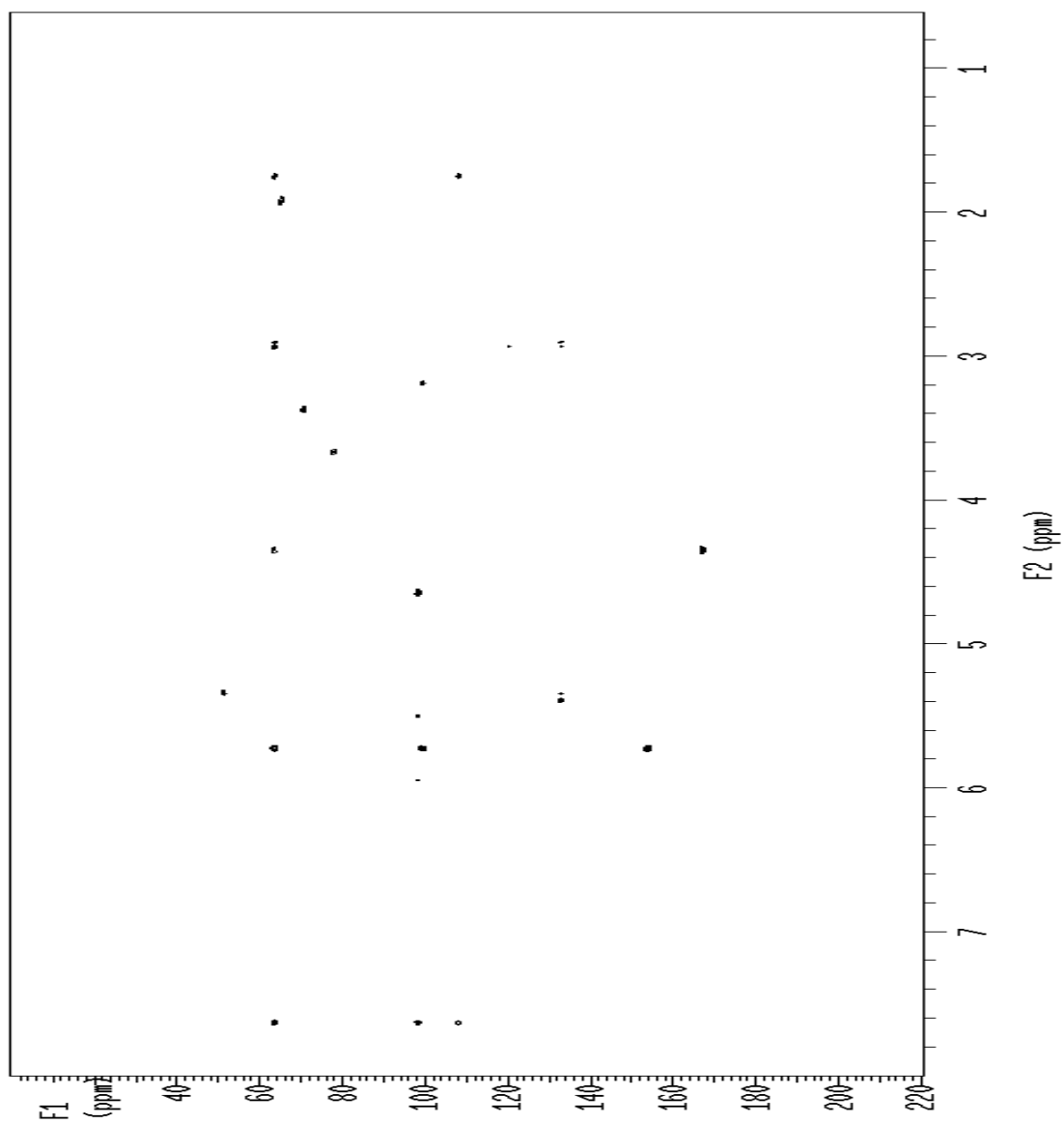
2D HMBC, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Gentiopicroside (14)



2D COSY, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Swertiamarina (15)

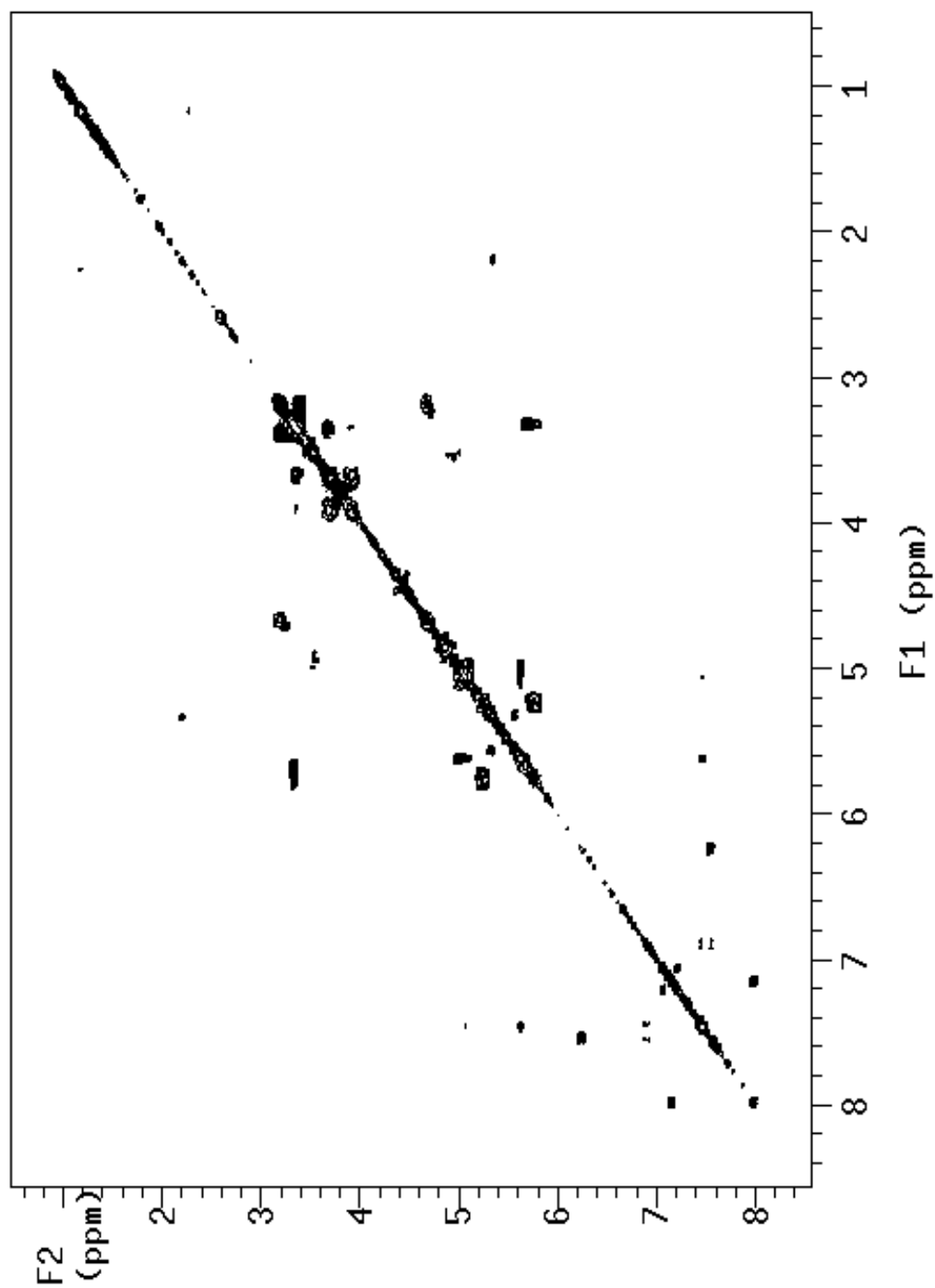


2D HMBC, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Swertiamarina (15)

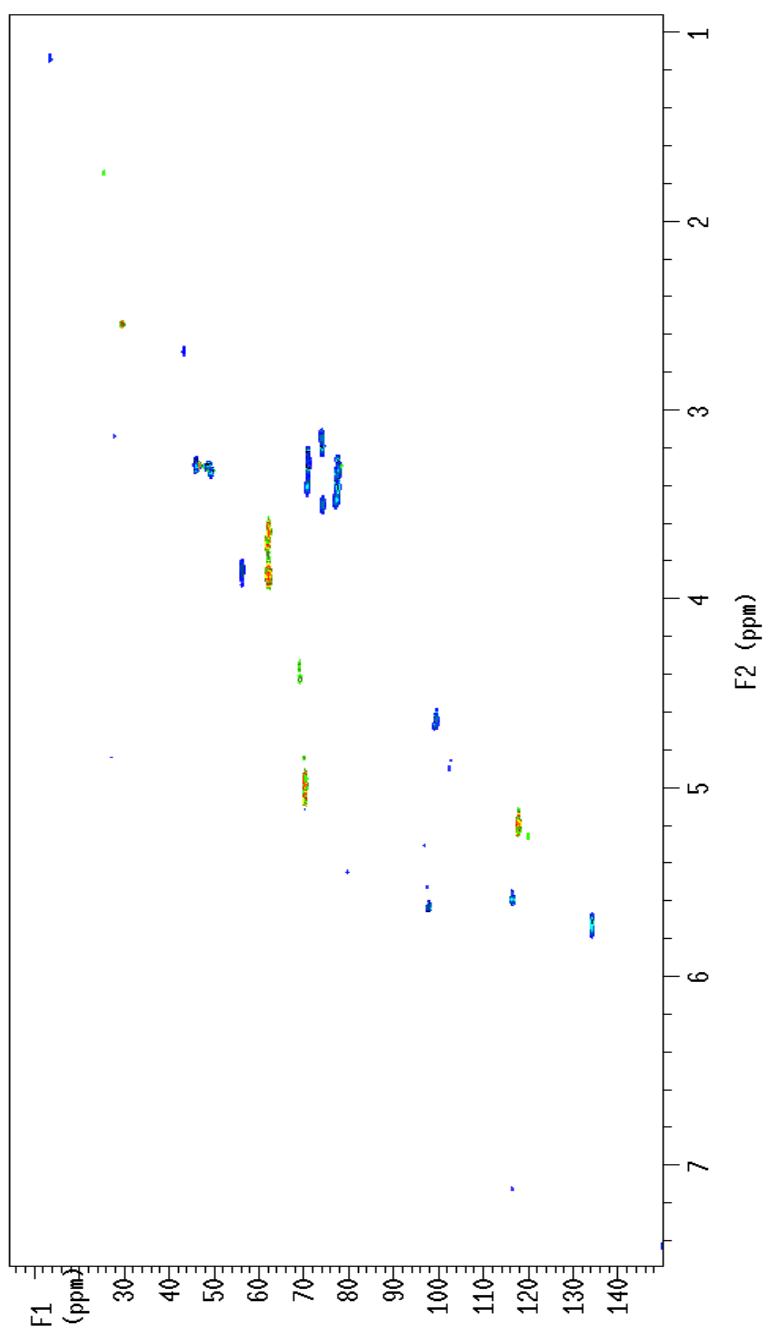




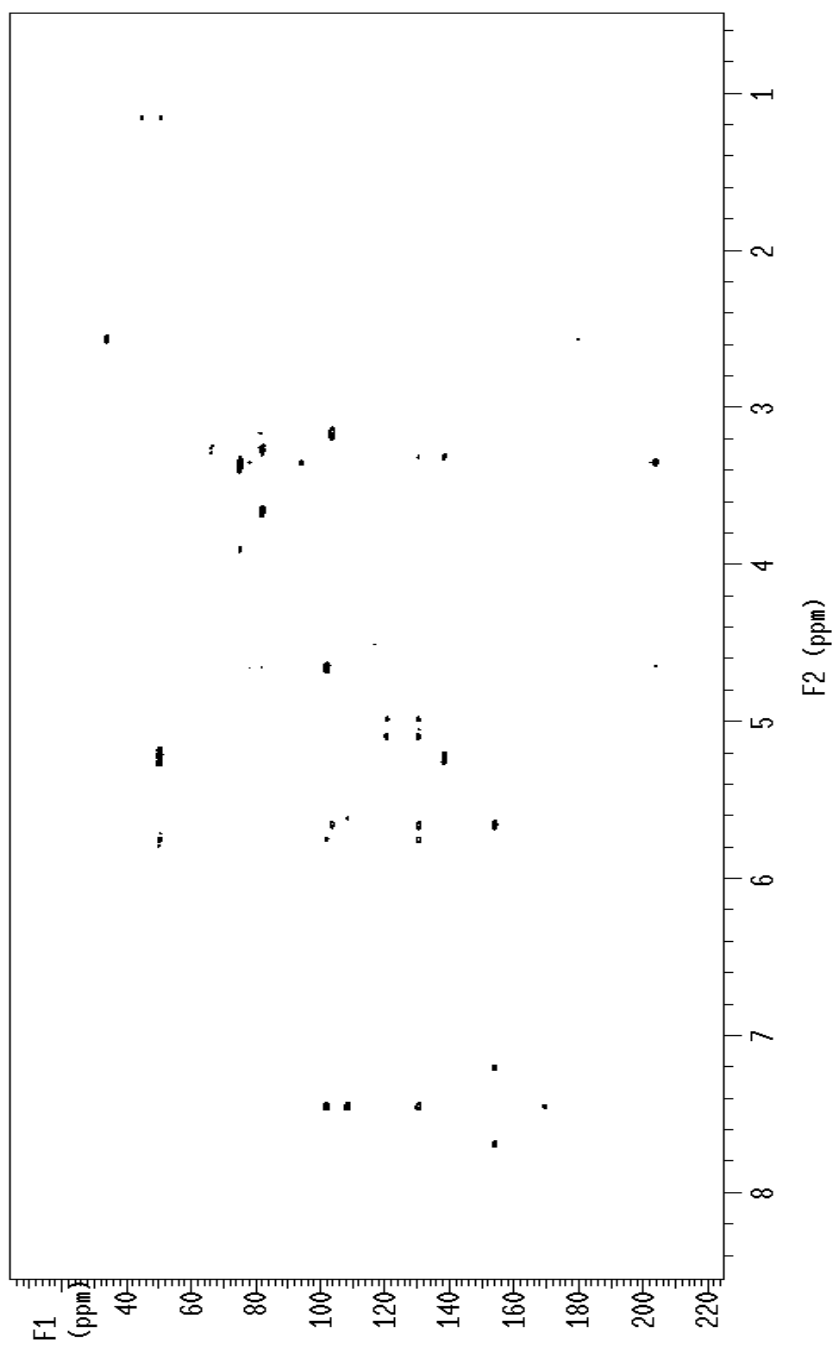
2D COSY, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Acido Loganico (16)



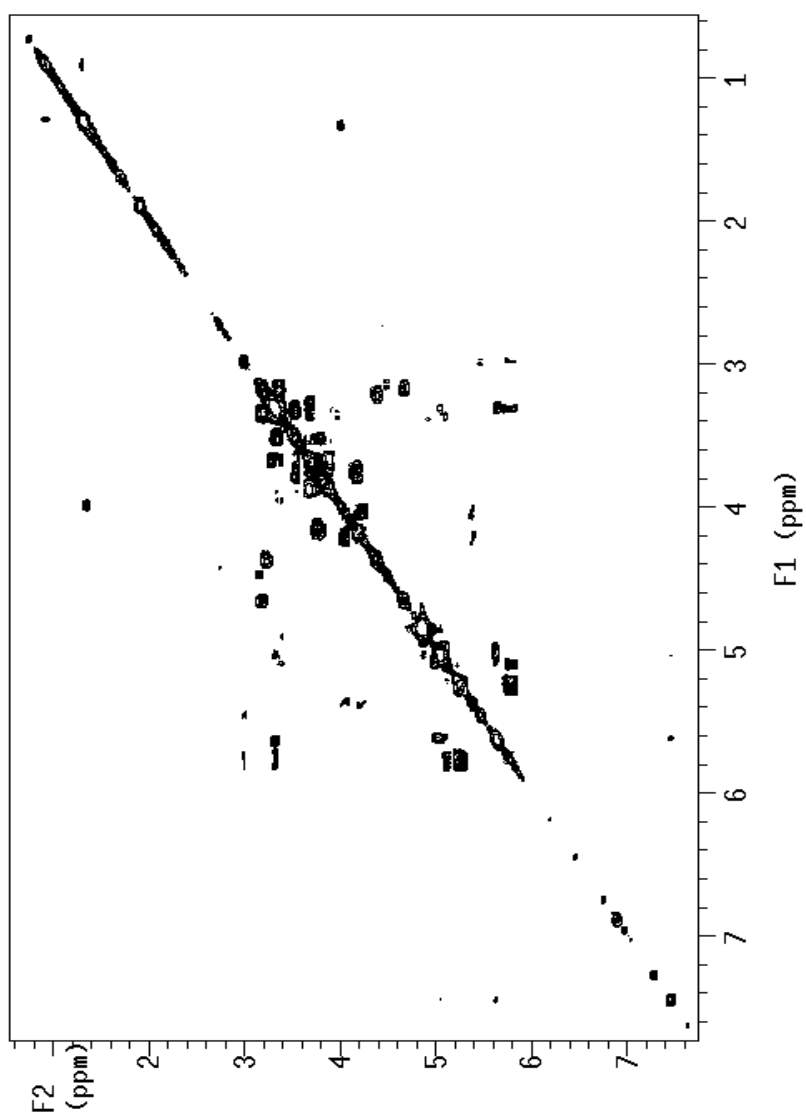
2D HSQC, CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, Acido Loganico (16)



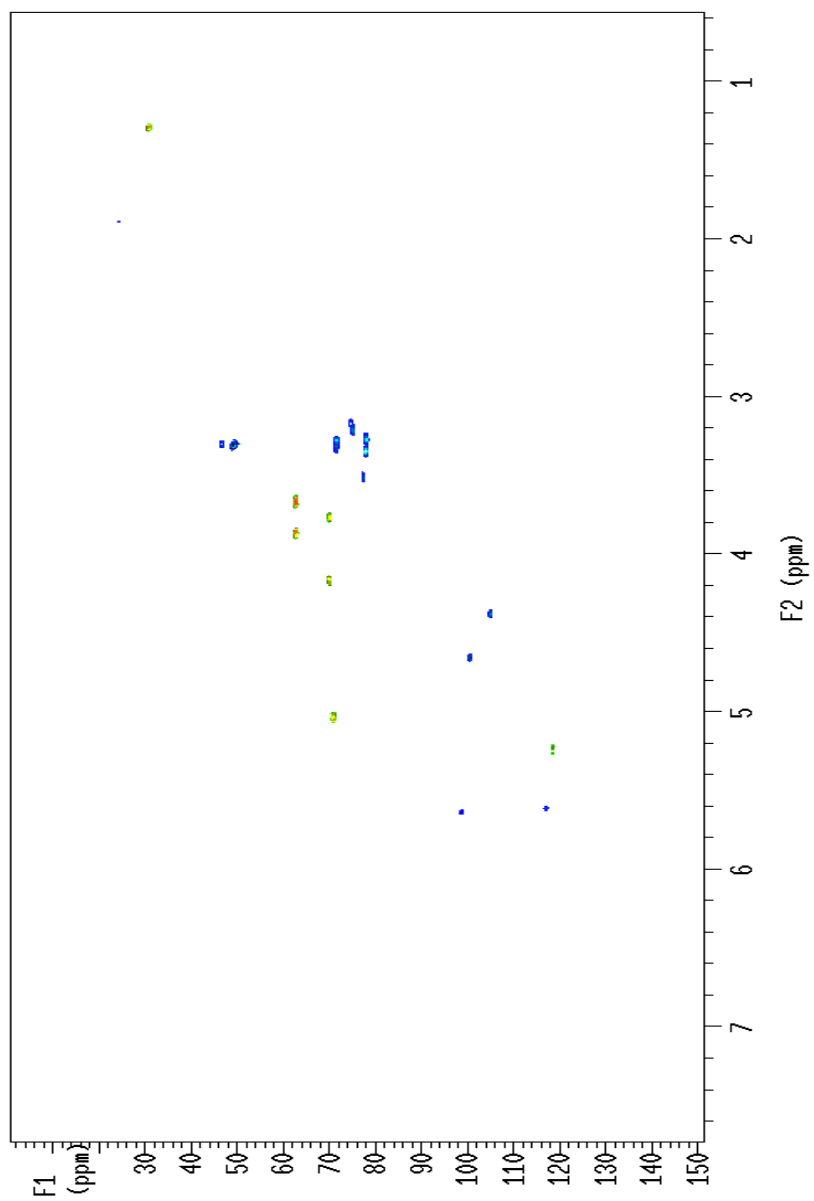
2D, HMBC, 400 MHz, Acido Loganico (16)



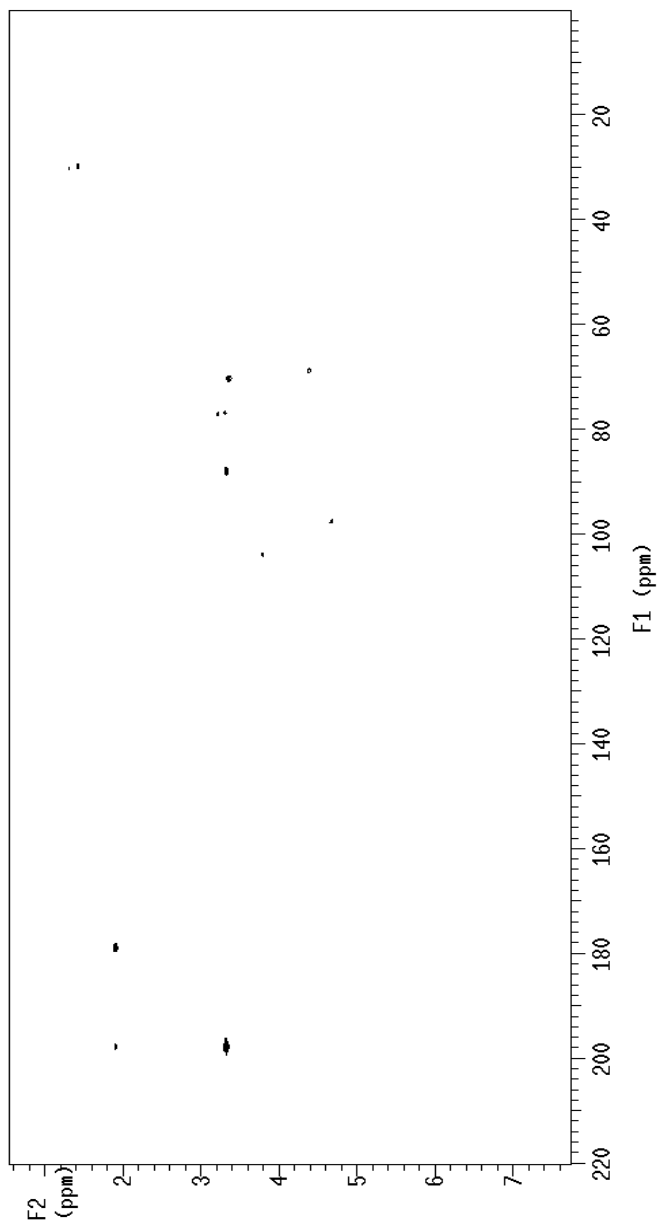
2D, COSY, 400 MHz, Gentiopicroside-6'digluconide (17)



**2D, HSQC, 400 MHz, Gentiopicroside-6'-diglucoside (17)**



**2D, HMBC, 400 MHz, Gentiopicroside-6'digluconide (17)**



## **CAPITOLO 4**

*Allium cepa L.*

# *Allium cepa* L.

Famiglia

**Alliaceae**

Nome italiano

**Cipolla**



**Figura 4.1** *Allium cepa* L.

## **4.1 DESCRIZIONE**

Il genere *Allium* è uno dei più ampi e rappresentativi della famiglia Alliaceae e comprende circa 450 specie ampiamente distribuite nelle zone calde e temperate. L'*Allium cepa* è una erbacea a ciclo biennale (annuale in coltura) provvista di radici superficiali e fascicolate, prive di peli radicali, che non si approfondiscono nel terreno oltre 40 cm, ma si sviluppano per lo più in orizzontale per 20-25 cm dal fusto. Le foglie alterne si dividono in due parti: una parte basale tubolare detta guaina, ed una lamina di consistenza carnosa sprovvista di cera. Le guaine fogliari più interne si trasformano in squame ( o tuniche) sovrapposte, mentre quelle più esterne rimangono sottili, tipo cartacee, ed hanno funzione protettiva del frutto interno. La parte esterna può variare dal giallo, all'arancio o al violaceo. Il frutto è composto da una capsula trilobata che contiene dai 2 o 3 semi per lobo. La formazione del bulbo è strettamente correlata al fotoperiodo e alla temperatura.



## 4.2 DISTRIBUZIONE

L' *A. cepa* è una pianta originaria di una vasta area dell'Asia occidentale che va dalla Turchia fino all'India. Nel Nord Italia si concentra circa il 66% della produzione nazionale e le regioni che contribuiscono maggiormente sono Emilia Romagna, Piemonte e Veneto. Il Sud Italia copre circa il 30% della produzione mentre le regioni del Centro sono responsabili del restante 4%. Nel Sud Italia le regioni che contribuiscono maggiormente alla produzione sono Campania e Puglia e in parte la Calabria famosa per la Cipolla rossa di Tropea, denominata provvista del marchio I.G.P (Cipolla Rossa di Tropea –Calabria I.G.P.)

## 4.3 INDAGINI FITOCHIMICHE

La prima citazione di questa pianta risale al Codex Ebers (1550 a.C.), un papiro egiziano dove erano riportate tutte le formulazioni erboristiche per la cura di numerosi disturbi. La maggior parte di queste specie è coltivata per uso alimentare e comprende tipologie caratterizzate da forma, colore, sapore e aroma differenti in base alla varietà. Generalmente con il termine *Allium cepa* si intendono tutte le specie caratterizzate da aroma e sapore pungente. Allo stesso genere appartengono anche l'aglio (*Allium sativum* L.) e alcune varietà più delicate come lo scalogno (*Allium ascalonicum* L.), il porro (*Allium porrum* L.), la cipolla d'inverno (*Allium fistulosum* L.), l'erba cipollina (*Allium schoenoprasum* L.). In genere le Cipolle, per uso alimentare, sono classificate in base al colore delle "tuniche". La più conosciuta è la cipolla rossa di Tropea, seguita da quella di Suasa, quella di Breme, la "ramata" di Montoro e la Borrettana. Alla cipolla sono attribuite anche numerose azioni benefiche. E' stata constatata una azione ipoglicemizzante, diuretica, stimolante della secrezione biliare. Inoltre rafforza l'attività cardiaca, provoca una vasodilatazione arteriosa e favorisce la motilità intestinale. La cipolla, in forma di estratto, presenta anche una azione battericida sulla flora microbica del cavo orale (Capasso, F., 2003). Da diversi anni è cresciuto l'interesse della comunità scientifica nei confronti di tutte le piante appartenenti al genere *Allium* in quanto i componenti naturali presenti, si sono rivelati interessanti dal punto di vista farmacologico (Lanzotti V., 2006). Gli estratti grezzi e i componenti puri hanno manifestato possedere una documentata

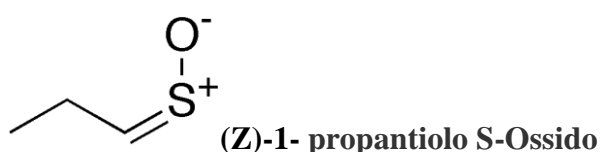
azione antimicrobica, ipoglicemizzante, digestiva, antitussiva e alcuni preparati omeopatici a base di *Allium cepa* sono tuttora in commercio. La cipolla per usi alimentari, è consumata sia cruda che cotta ed è universalmente conosciuta ed usata in quasi tutti i paesi del mondo. Il bulbo contiene Sali minerali, vitamine, oligoelementi (zolfo, ferro, potassio, magnesio, fluoro, calcio, manganese e fosforo) e acido folico ed è ricco di fitonutrienti che rappresentano degli importanti elementi nella dieta Mediterranea. L'*Allium cepa* contiene, inoltre, alcuni metaboliti secondari che vengono definiti “nutraceutici”, classificati come dei micronutrienti non essenziali che sembrano avere un ruolo importante nel mantenimento del benessere dell'organismo umano. Studi epidemiologici hanno attribuito tali effetti positivi alla presenza di composti ad azione antiossidante come i derivati fenolici, i flavoni, i fenilpropanoidi (Pisha, E., 1994).

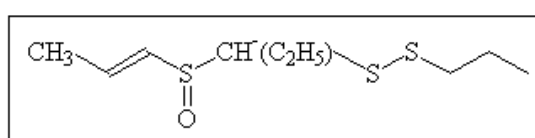
#### 4.4 COMPONENTE CHIMICA E PRINCIPI ATTIVI

Dal punto di vista chimico è possibile classificare i componenti naturali presenti nella cipolla in: composti naturali volatili e composti naturali non volatili.

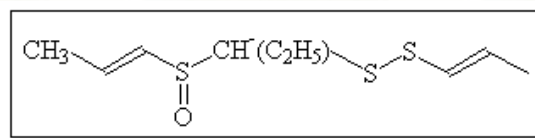
##### - *Composti naturali volatili*

I componenti naturali volatili sono responsabili dell'aroma più o meno intenso che emana il bulbo integro. Quando il bulbo viene tagliato si sprigiona un odore più intenso, talvolta pungente, relazionabile ad alcuni componenti chimici naturali contenenti zolfo. Questi composti solforati sono racchiusi all'interno della cellula vegetale e, nel momento in cui il tessuto è frantumato, essi entrano in contatto con alcuni enzimi specifici (allinasi) dando origine a delle reazioni spontanee che portano alla formazione di complesse miscele di “Tiosulfinati”. In particolare lo (Z)-1- propantiolo S-Ossido è un composto volatile che viene definito anche “fattore lacrimatorio” in quanto è responsabile dell'irritazione degli occhi. Tra i tiosulfinati alcuni esempi sono rappresentati dai Cepaeni (**Cepaene 1, 2A, B**)





CEPAENE 1



CEPAENI 2A e B

### - *Composti naturali non volatili*

A partire dagli anni '90 è stato affrontato lo studio sistematico dei componenti chimici non volatili presenti in molte varietà di *Allium*. Tali composti sono più stabili alla cottura e alla conservazione, rispetto ai composti volatili.

I metaboliti isolati in maggiore quantità appartengono alle classi dei flavonoidi, delle saponine, dei polifenoli. Studi recenti hanno evidenziato che i bulbi e le foglie di cipolla contengono un'alta percentuale di flavonoidi rispetto ad altri vegetali analizzati (Park, Y.K., 1996; Rhodes, M.J.C., 1996). Dal punto di vista biologico i flavonoidi sono considerati dei componenti di rilievo soprattutto in relazione alla loro azione antiossidante. In effetti, i composti provvisti di azione antiossidante sono in grado di bloccare i processi di ossidazione innescati dalle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) che, a loro volta, sono implicate nei processi di invecchiamento cellulare. Di conseguenza una dieta ricca in frutta e verdure apporta un livello significativo di tali componenti.

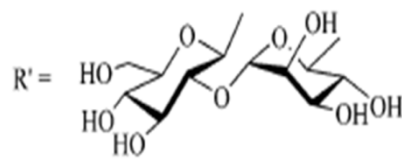
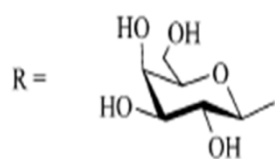
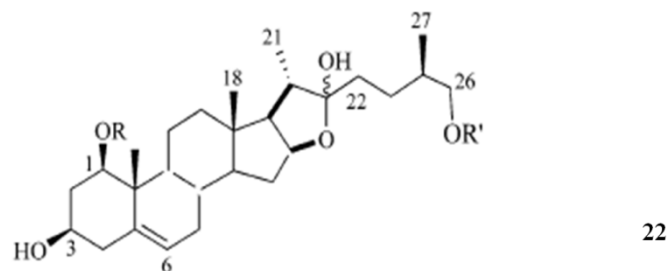
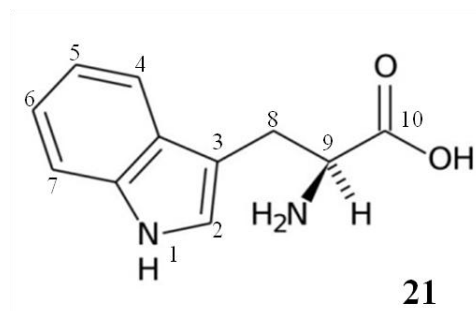
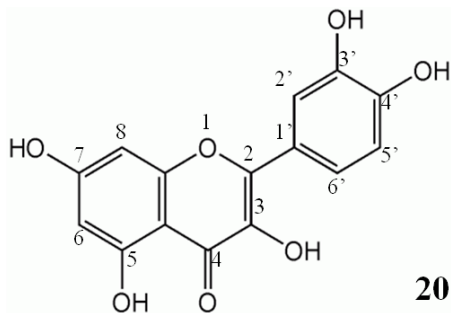
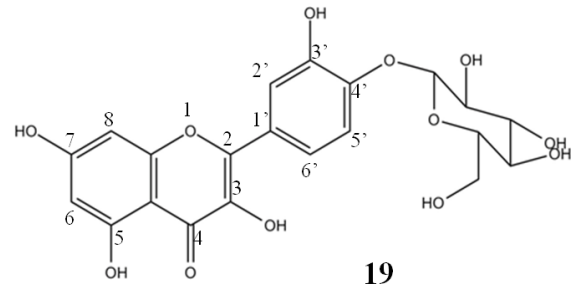
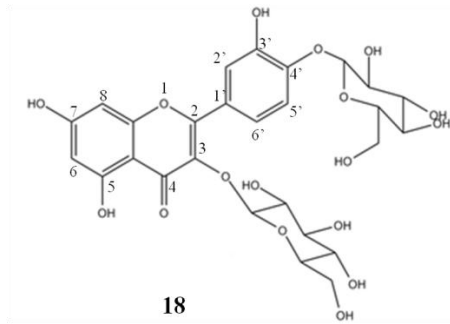
In letteratura molti dei composti puri isolati sono stati sottoposti a test biologici specifici confermando alcune applicazioni già individuate attraverso la medicina popolare quali l'azione antimicrobica, antitumorale, antiaggregante piastrinica, antifungina, antispastica e l'azione antiossidante (Corea, G., 2005; Lawson, L.D., 1998).

## 4.5 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI COMPOSTI ISOLATI DA *Allium cepa* L.

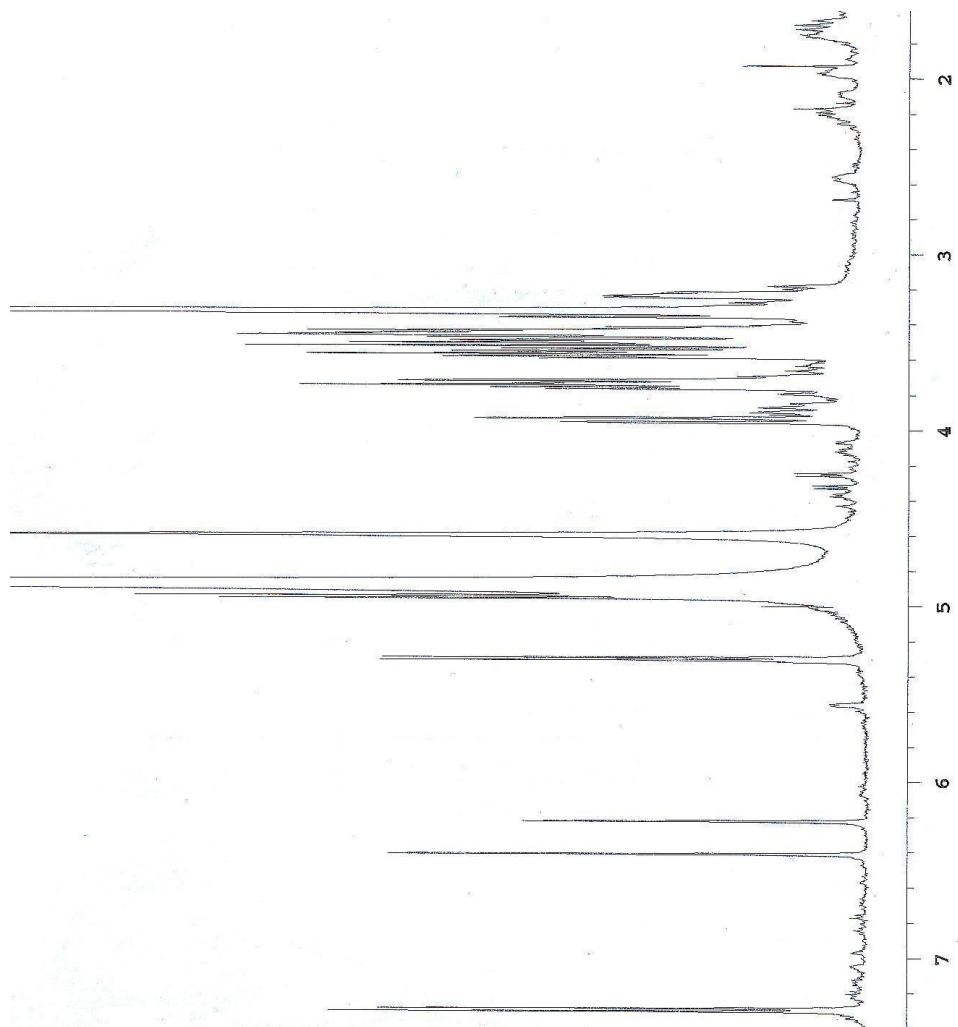
L'indagine chimica dei metaboliti secondari si è focalizzata su una varietà di *Allium cepa*, prodotta e coltivata nella provincia di Isernia (cipolla bianca), in modo da confrontare i componenti chimici isolati con quelli presenti nelle tipologie conosciute e commercializzate.

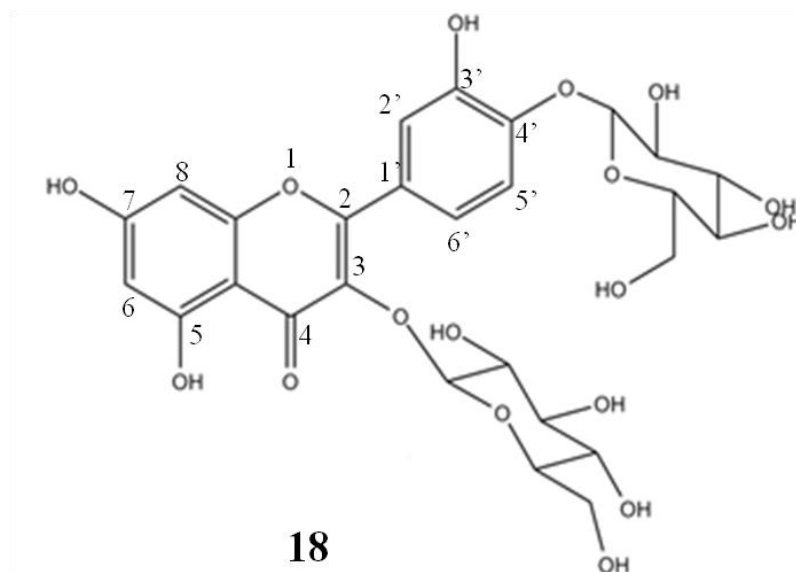
L'estratto metanolico dell'*Allium cepa* è stato sottoposto a ripartizione mediante la metodica di Kupchan ottenendo quattro estratti: *n*-esano, cloroformico, *n*-butanologico e residuo acquoso.

Dalla frazione *n*-butanologica sono stati isolati: Quercetina-3-4'-diglucoside (**18**), Quercetina-4'-*O*-glucoside (**19**), Quercetina (**20**), Triptofano (**21**), Ascalonicoside A1 (**22**).



**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Quercetina-3,4'-diglucoside (18)**





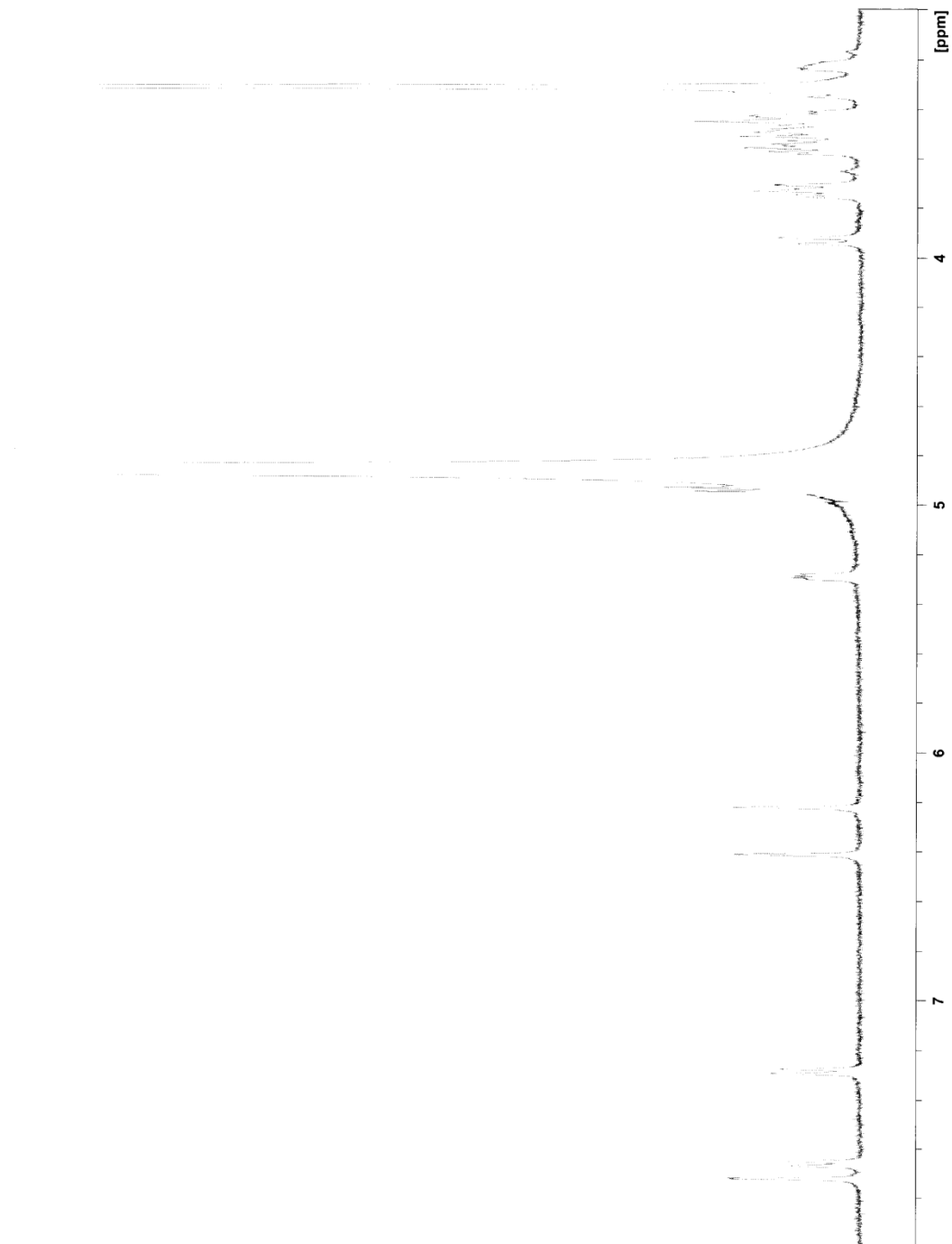
### QUERCETINA 3,4'-O-DIGLUCOSIDE

La quercetina è stata determinata sulla base degli spettri NMR mono e bi-dimensionali. Dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$  sono presenti segnali imputabili alla presenza di un flavonoide e due unità saccaridiche. Sul primo anello del flavonoide si rilevano due segnali che risuonano come doppietto a  $\delta$  6.18 ( $J=1.7$  Hz) e 6.37 ( $J=1.6$  Hz) ppm. Nella regione dello spettro a campi bassi compaiono i segnali relativi all'anello B del flavonoide a  $\delta$  7.65 (H-2'),  $\delta$  6.86 (H-5';  $J=8.7$  Hz) e  $\delta$  7.71 (H-6';  $J=8.6$  Hz). Dalle sequenze di spin dell'esperimento COSY si evince che i protoni H-5' e H-6' sono accoppiati tra loro. La presenza delle due unità saccaridiche è imputabile ai segnali nella regione alifatica dello spettro protonico. Il protone anomero del glucosio legato al carbonio in posizione 4' dell'anello B risuona a  $\delta$  5.29 con una  $J=7.3$  Hz. Invece, il protone della unità di glucosio legato in posizione C-3 dell'anello C del flavonoide risuona a  $\delta$  4.73 con una  $J=7.1$  Hz. Le due unità di glucosio sono in configurazione D. Dagli esperimenti NMR e dai dati di letteratura possiamo dedurre che siamo in presenza di una quercetina 3,4'-O-diglucoside. (Wang, Y., 2012) (Tabella 4.1)

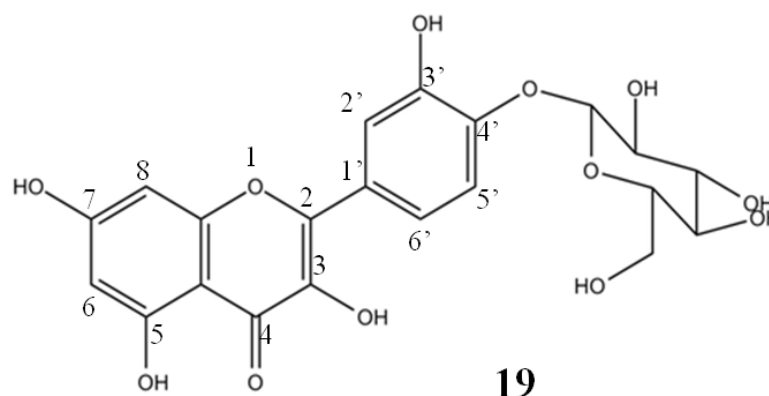
**Tabella 4.1** Dati  $^1\text{H-NMR}$  , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Quercetina-3,4'-O- diglucoside (18)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}$ /ppm	$\delta_{\text{C}}$ /ppm
1		
2		158.4
3		136.0
4		180.1
5		162.0
6	6.18 d (1.7)	100.9
7		165.3
8	6.37 d (1.6)	96.8
1'		124.9
2'	7.65 d (2.2)	118.9
3'		145.8
4'		149.7
5'	6.86 d (8.7)	117.7
6'	7.71 dd (8.6,2.2)	123.9
Glucosio 1		
1''	5.29 d (7.3)	104.5
2''	3.53	75.9
3''	3.56	78.0
4''	3.42	71.9
5''	3.47	79.7
6''	3.91,3.72 dd (12.0,2.1)	63.1
Glucosio 2		
1'''	4.73 d (7.1)	102.8

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Quercetina-4'-O-glucoside (19)**







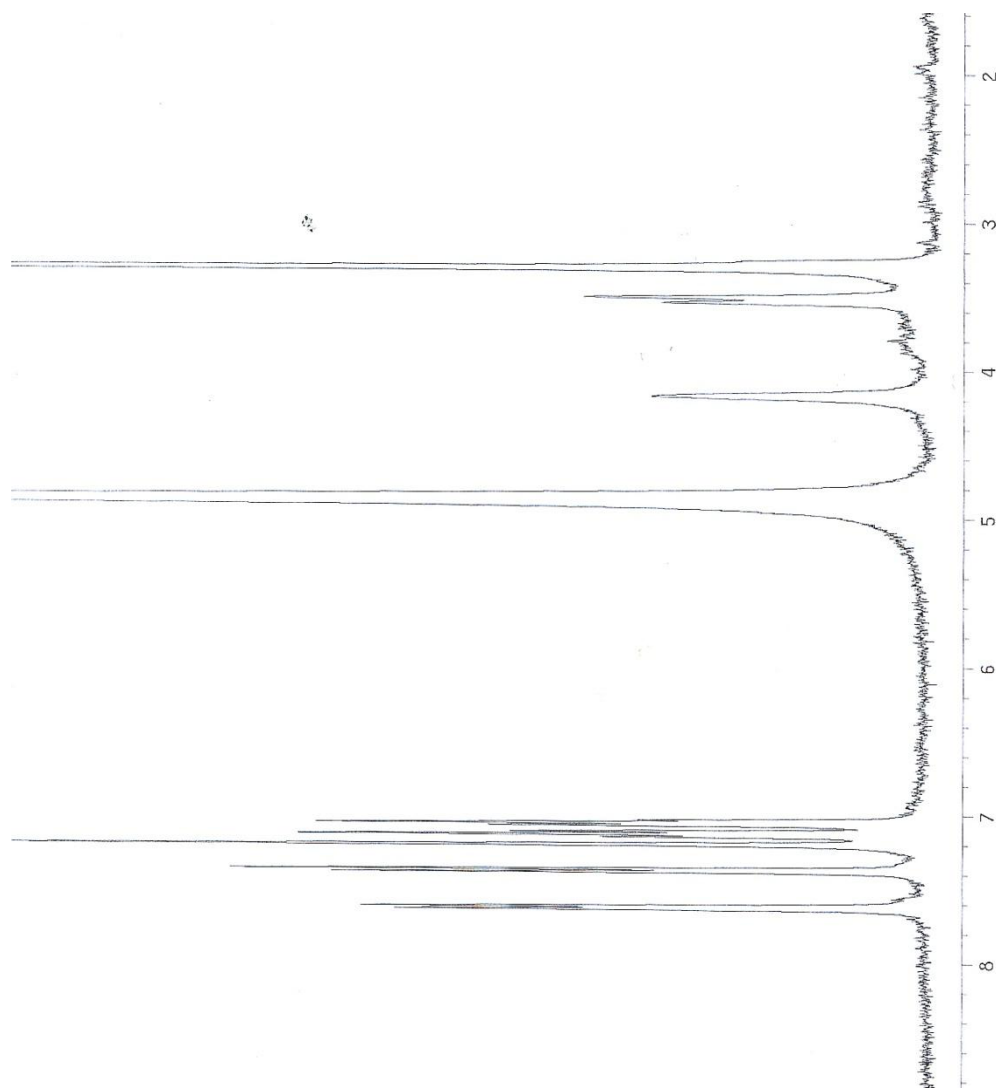
### QUERCETINA-4'-O-GLUCOSIDE

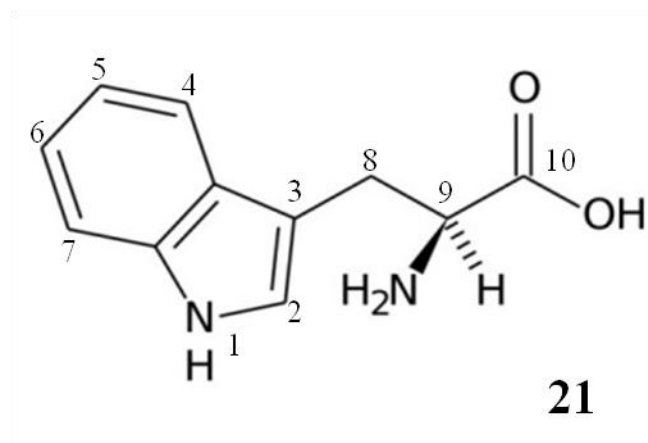
Il composto numero 19 fa parte del gruppo dei flavonoidi. Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  conferma la presenza di cinque protoni. Sull'anello A del flavonoide si rileva il protone H-6 a  $\delta$  6.16 e H-8  $\delta$  6.35 ppm, i due protoni che risuonano come singoletti. A frequenze più basse si individuano i protoni legati all'anello B del flavonoide. Il protone in posizione H-2' mostra un singoletto a  $\delta$  7.73. I protoni H-5' e H-6' risuonano come doppietto a  $\delta$  7.25 ( $J=8.8$  Hz) e a  $\delta$  7.66 ( $J=8.5$  Hz), in posizione orto. Dall'esperimento COSY il protone H-6' è accoppiato con entrambi i protoni H-2' e H-5', mentre il protone H-5' è accoppiato solo con il protone H-6'. Dalla regione alifatica dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  si rileva la presenza di un protone anomero  $\delta$  4.90 imputabile alla presenza di una unità di saccaridica. Dall'esperimento HMBC si evince un picco di correlazione tra il protone anomero dell'unità di glucosio ( $\delta$  4.90) e il carbonio presente sull'anello B del flavonoide in posizione C-4' (146.9 ppm). Inoltre sono determinabili i valori dei chemical shifts degli altri protoni dell'unità di glucosio H-2' ( $\delta$  3.55), H-3' ( $\delta$  3.53), H-4' ( $\delta$  3.44), H-5' ( $\delta$  3.48), H-6' ( $\delta$  3.74, 3.93). Il glucosio è presente nella configurazione D (Ya-Zhou, W., 2008). Dai dati degli spettri NMR e da quelli presenti in letteratura si evince che siamo in presenza della quercetina-4'-O-glucoside. (Tabella 4.2)

**Tabella 4.2** Dati  $^1\text{H-NMR}$  , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Quercetina-4' glucoside (19)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$
1		
2		
3		137
4		176
5		161.5
6	6.16 s	98.2
7		164.8
8	6.35 s	93.6
1'		126.6
2'	7.73 s	115.3
3'		145.7
4'		146.9
5'	7.25 d (8.8)	116.5
6'	7.66 d (8.54)	120.1
Glucosio		
1''	4.90 (8.0)	102.4
2''	3.55 m	73.8
3''	3.53	76.4
4''	3.44 m	70.2
5''	3.48	77.3
6''	3.74, 3.93 dd (12.0,2.3)	61.3

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Triptofano (21)**





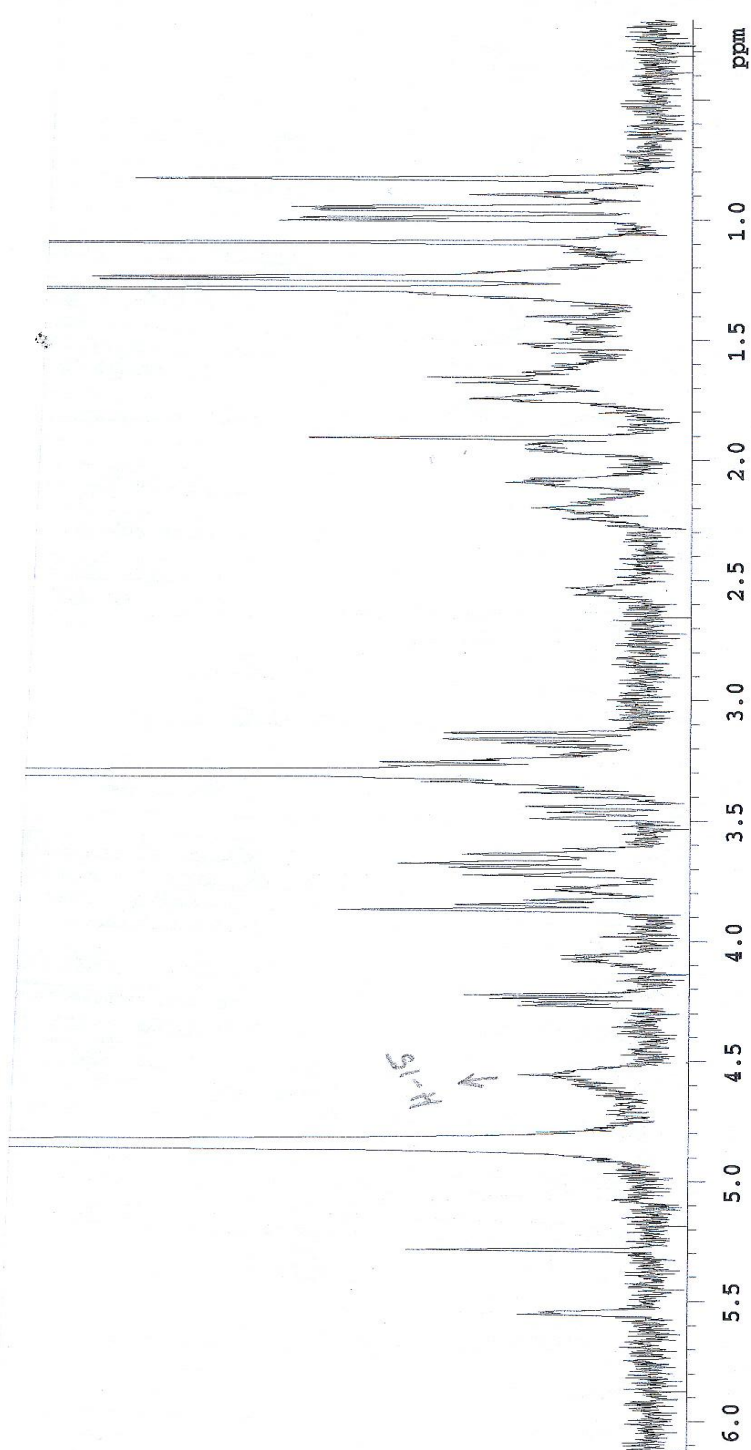
## TRIPTOFANO

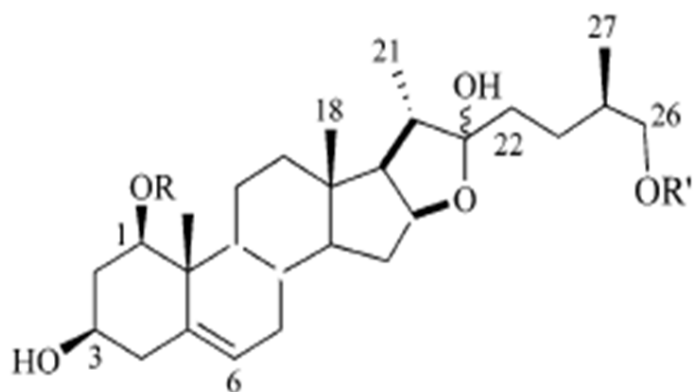
Il triptofano è un amminoacido naturale di natura indolica. Il nucleo indolico mostra segnali nella regione aromatica dello spettro a  $\delta$  7.0 (s) che corrisponde al protone 2, a  $\delta$  7.3 e 7.6 segnali che risuonano ciascuno come doppi doppietto imputabili ai protoni H-4 ( $J=8.1,2.0$  Hz) e H-7 ( $J=7.6,1.8$  Hz) rispettivamente. I protoni H-5 e H-6 risuonano sovrapposti a  $\delta$  7.11 e  $\delta$  7.15. Il protone legato al carbonio chirale C-9, risuona a  $\delta$  4.05 come doppio doppietto. (Tabella 4.3)

**Tabella 4.3** Dati  $^1\text{H-NMR}$ , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Triptofano (21)

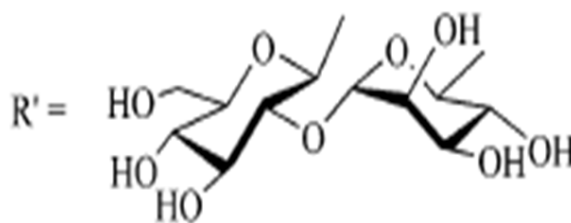
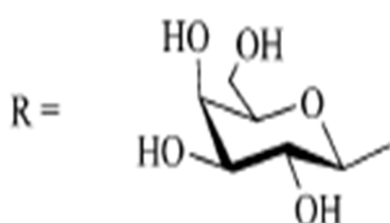
POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$
2	7.0 s
4	7.3 dd (8.1,2.0)
5	7.11 m
6	7.15 m
7	7.61 dd (7.6,1.8)
9	4.05 dd ovl

**$^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz, Ascalinicoside A1 (22)**





22



### ASCALONICOSIDE A1

Dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$  non è stato possibile eseguire una ricostruzione completa di tutti protoni appartenenti alla molecola. Siamo in presenza di una molecola complessa, come si evince dallo spettro, inoltre il campione a disposizione per l'esperimento NMR era in quantità ridotte. Dallo spettro si denota la presenza dei seguenti segnali a  $\delta$  5.59 che corrisponde al protone in posizione 6,  $\delta$  4.59 corrisponde ad H-16, inoltre i segnali a  $\delta$  3.82 e 3.29 sono legati ad un  $\text{CH}_2$  in posizione C-26. Nella regione a campi alti dello spettro si osservano i segnali a  $\delta$  1.13 ( $\text{CH}_3$ -19),  $\delta$  0.87 ( $\text{CH}_3$ -18),  $\delta$  1.04 ( $\text{CH}_3$ -21) e 0.99 ( $\text{CH}_3$ -27). Inoltre, possiamo desumere la presenza di tre protoni anomerici che fanno ipotizzare la presenza di tre unità monosaccaridiche. Il protone anomerico della prima unità saccaridica risuona a  $\delta$  4.30, il protone anomerico della seconda unità saccaridica risuona a  $\delta$  4.26, mentre il protone anomerico dell'ultima unità saccaridica risuona a  $\delta$  5.32. Possiamo dedurre che siamo in presenza di un Glucosio, di un Galattosio e di un Ramnosio. Dall'interpretazione dell'  $^1\text{H-NMR}$  e dai dati presenti in bibliografia, possiamo dedurre che la struttura isolata sia una saponina, Ascalonicoside A1 (Fattorusso, E., 2002). (Tabella 4.4)

**Tabella 4.4** Dati  $^1\text{H-NMR}$  , 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Ascalonicoside A1 (22)

POSIZIONE	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (J in Hz)
6	5.59 (3.2)
7	1.98,1.96
16	4.59, q (5.5)
18	0.87 s
19	1.13 s
21	1.04, d (6.6)
26	3.82,dd (8.5,6.9) 3.29
Glucosio	
1'	4.30, d (7.5)
2'	3.71
3'	3.68, dd,( 6.8, 2.5)
4'	3.87
5'	3.45
6'	3.47, 3.65
Galattosio	
1''	4.26 d (7.5)
Ramnosio	
1'''	5.32 ovl

## **CAPITOLO 5**

### **Materiali e Metodi**



## 5.1. PREPARAZIONE DEL DECOTTO *Olea europea* L.

Le foglie di *Olea europea* L. (cultivar *Leccino*) sono state campionate a Benevento, nella regione Campania e identificate presso l'Università degli Studi del Molise dalla Prof.ssa P. Fortini. Dopo la raccolta le foglie sono state conservate a -20°C.

Il decotto (OELD) è stato preparato seguendo la procedura impiegata nella medicina popolare. 250 g di foglie sono state fatte bollire per 30 minuti in 2 L di acqua. Dopo la bollitura l'estratto acquoso è stato raffreddato e filtrato. L'estratto ottenuto è stato ripartito mediante metodica di Kupchan, utilizzando i seguenti solventi: *n*-esano, cloroformio e *n*-butanolo. Dopo la rimozione dei solventi mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante sono stati ottenuti tre estratti; l'estratto *n*-esanico (35.5 mg), l'estratto cloroformico (253.5 mg), l'estratto butanologico (1.8 mg) e il residuo acquoso.

### 5.1.1 PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO *n*-BUTANOLICO

L'estratto butanologico è stato sottoposto a cromatografia ad esclusione molecolare Sephadex<sup>R</sup> LH-20, utilizzando come eluente il metanolo. Le frazioni ottenute sono state raggruppate in base al comune comportamento cromatografico, valutato tramite TLC. Sono state ottenute 3 frazioni principali.

La frazione numero 2 (650 mg) è stata sottoposta a DCCC, cromatografia liquida in controcorrente a goccia, utilizzando una fase organica composta da CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 7:13:8, nella fase ascendente (la fase discendente era la fase stazionaria) ottenendo 6 frazioni (A-F), riunite, in base al comportamento comune su TLC, utilizzando come eluente di sviluppo *n*-BuOH-HOAc-H<sub>2</sub>O 12:3:5 e CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O 80:18:2). Successivamente, le frazioni, sono state separate tramite HPLC (Tabella 5.1).

**Tabella 5.1** Purificazione mediante HPLC

Frazione DCCC	HPLC <sup>a</sup> Eluente MeOH:H <sub>2</sub> O	Composti	Nr.
A	30:70 <sup>b</sup>	3,4 diidrossi fenil glicole	8
		Apigenina-7-O-neohesperidoside	12
		Apigenina-7-O-rutinoside	13
B	20:80 <sup>c</sup>	Oleoside-11-metil estere	3
		Secoxiliganina	4
C	30:70	Oleuropeina	2
D	35:65	Oleuropeina	2
		Tirosolo	6
		Idrossitirosolo	7
E	40:60	Fraxamoside	1
F	35:65 <sup>c</sup>	Taxifolina	5
		Quercetina-3-O- glucoside	9
		Luteolina-7-O- glucoside	10
		Luteolina-4'-O-glucoside	11

<sup>a</sup>  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (300 mm x 3.9 mm i.d.); flusso 1.0 ml/min.

<sup>b</sup>flusso 1.5 ml/min.

<sup>c</sup> Luna C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.); flusso 1.0 ml/min.

### 5.1.2 ESTRAZIONE DELLE FOGLIE DI *Olea europea* L.

L'estratto metabolico è stato ottenuto da 250 g di foglie di ulivo "fresche" (cv *leccino*). Le foglie sono state estratte tre volte con 700 mL di metanolo a temperatura ambiente. L'estratto ottenuto è stato portato a secco e ripartito secondo la metodica di Kupchan (De Marino, S., 2012; Kupchan, S.M., 1973), ottenendo le seguenti frazioni: *n*-esano (11.2 g), CHCl<sub>3</sub> (6.4 g), *n*-butanolo (4.2 g) e il residuo acquoso. Una parte dell'estratto butanologico è stata purificata attraverso cromatografia ad esclusione molecolare Sephadex<sup>R</sup> LH-20, utilizzando MeOH come eluente. Le frazioni ottenute sono state analizzate tramite TLC e riunite in base al comune comportamento cromatografico in due frazioni principali. La frazione 2 (800 mg) è stata purificata tramite DCCC, utilizzando come fase organica CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 7:13:8, nella fase ascendente (la fase discendente era la fase stazionaria). Le 10 frazioni ottenute sono state analizzate tramite HPLC. La cromatografia liquida in controcorrente a gocce (DCCC) è stata realizzata su un sistema

DCC-A (Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan); la cromatografia HPLC è stata realizzata su un sistema dotato di pompa Waters 510, con un iniettore Rheodyne 7125 e un indice di rifrazione Waters 401 come rivelatore, usando come colonna C18- $\mu$ -bondapak (30 mm x 3.9 mm i.d.) e Luna C18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.). Per le TLC sono state usate lastre di silice Merck del tipo Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0.25 mm.

## 5.2. ESTRATTO DELLE RADICI DI *Gentiana lutea* L.

Le radici di genziana (167.04 g) essiccate e sminuzzate sono state estratte con etanolo (2 x 500 mL). Le radici sono state a contatto con il solvente per sette giorni a temperatura ambiente. L'estratto ottenuto è stato concentrato con evaporatore rotante a circa 40°C. La frazione ottenuta concentrando l'etanolo (16.8 g) è stata ripartita mediante metodica di Kupchan. Il residuo secco è stato solubilizzato in MeOH:H<sub>2</sub>O al 90%, e ripartito tre volte con etere di petrolio, nel quale si concentrano le sostanze più lipofile. La fase acquosa è stata portata al 30% v/v di acqua e si è proceduto ripartendo l'estratto con CHCl<sub>3</sub>, ottenendo un estratto cloroformico contenente sostanze a polarità media.

La fase in EtOH-H<sub>2</sub>O è stata a sua volta concentrata a pressione ridotta al fine di allontanare l'etanolo, lasciando un residuo acquoso che è stato poi ripartito tre volte con *n*-butanolo nel quale si concentrano le sostanze più polari. I singoli estratti sottoposti a metodica di Kupchan sono stati analizzati tramite TLC.

Per l'estratto in etere di petrolio è stato utilizzato un sistema eluente costituito da *n*-esano:etilacetato (6:4); per l'estratto cloroformico è stato utilizzato un sistema eluente costituito da CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:18:2); per gli estratti in *n*-butanolo e H<sub>2</sub>O è stato utilizzato sia un sistema eluente costituito da CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:18:2) che [BAW (*n*-butanolo:acido acetico:H<sub>2</sub>O)].

### 5.2.1 PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO BUTANOLICO E CLOROFORMICO

Gli estratti *n*-butanologico e cloroformico ottenuti dalla ripartizione di Kupchan sono stati purificati tramite DCCC. Dall'analisi DCCC del *n*-butanolo sono state ottenute 20 frazioni, come eluente è stata utilizzata una miscela ternaria costituita da *n*-butanolo:acetone:H<sub>2</sub>O (3:1:5), in cromatografia discendente (fase mobile: acquosa; fase stazionaria: fase organica).

Per quanto riguarda l'estratto cloroformico dalla purificazione tramite DCCC sono state ottenute 17 frazioni utilizzando una miscela composta da Cloroformio: Metanolo: Acqua (7:13:8), in cromatografia ascendente (fase mobile: fase acquosa; fase stazionaria:cloroformica). Le frazioni eluite sono state riunite in base al comune comportamento cromatografico. Tali frazioni sono state isolate tramite HPLC, utilizzando come solvente MeOH:H<sub>2</sub>O in rapporti variabili.(Tabella 5.2)

CONDIZIONI HPLC	COMPOSTI
Eluente MeOH:H <sub>2</sub> O (25:75), flusso 0,8 mL/min	Swertiamarina
Eluente MeOH:H <sub>2</sub> O (25:75), flusso 0,8 mL/min	Gentiopicroside
Eluente MeOH:H <sub>2</sub> O (25:75), flusso 1 mL/min	Acido Loganico
Eluente MeOH:H <sub>2</sub> O (20:80), flusso 1 mL/min	Gentiopicroside 6'-O- diglucoside

**Tabella 5.2** Purificazione mediante HPLC

### 5.3. Estratto *Allium cepa* L.

La cipolla fresca matura (853 g) è stata sottoposta ad estrazione con solventi. Il materiale organico è stato tagliato finemente ed estratto con metanolo a temperatura ambiente per 48 ore. Dopo essere stato filtrato l'estratto metanolico è stato concentrato tramite sotto un evaporatore rotante fino ad ottenere un residuo secco. Tale residuo è sottoposto alla metodica modificata di Kupchan (Kupchan *et al.*, 1973) che prevede la ripartizione progressiva con solventi a polarità crescenti (n-esano, cloroformio, n-butanolo) lasciando un residuo acquoso. La metodologia prevede che il residuo secco, venga solubilizzato in MeOH: H<sub>2</sub>O al 90%, e poi ripartito con n-Esano, nel quale si concentrano le sostanze più lipofile (acidi grassi, steroidi, etc), ottenendo così un estratto in Esano (421 mg). La fase acquosa viene portata al 40% v/v di acqua e si realizza una nuova ripartizione con CHCl<sub>3</sub>, ottenendo un estratto in Cloroformio (410 mg) contenente sostanze a media polarità (terpeni, sistemi aromatici apolari, alcaloidi etc).

La fase in MeOH/H<sub>2</sub>O viene concentrata a pressione ridotta al fine di allontanare il metanolo, lasciando un residuo acquoso che poi è stato ripartito con *n*-butanolo nel quale si concentrano le sostanze più polari (glicosidi di composti fenolici, terpeni

glicosilati, sistemi polifenolici, etc) (Estratto n-butanolico 7,38 g). Ciascun estratto viene poi frazionato e purificato singolarmente.

Le frazioni ottenute sono poi sottoposte a purificazione attraverso HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) con colonne cromatografiche pre-impaccate a fase inversa del tipo C<sub>18</sub>  $\mu$ -Bondapak (10  $\mu$ m), Luna C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m) usando come eluente una miscela MeOH: H<sub>2</sub>O in rapporti variabili. Il rivelatore prescelto è ad “*Indice di Rifrazione*”, un rivelatore aspecifico in grado di evidenziare qualunque tipo di composto organico.

Il residuo acquoso, essendo ricco in materiale polare, è stato separato mediante una resina Amberlite XAD-7, usando un gradiente di eluizione a partire da H<sub>2</sub>O 100% fino a MeOH 100%. Una quota dell'estratto n-Butanolico (3,0 g) è stato frazionato impiegando una DCCC (cromatografia controcorrente a goccia) che consente di purificare miscele complesse applicando il principio della ripartizione liquido-liquido. La miscela ternaria impiegata è costituita da n-Butanolo: Acetone: H<sub>2</sub>O (3:1:5), in cromatografia discendente (fase mobile: fase acquosa; fase stazionaria: fase organica) Flusso 27 ml/h, Volume delle frazioni 9 ml. Le frazioni eluite (310) sono riunite sulla base del comune comportamento cromatografico su TLC (Thin Layer Chromatography) di gel di Silice (SiO<sub>2</sub>) usando come reattivi di sviluppo BAW [*n*-BuOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (12:3:5)] e CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:18:2).

Le singole frazioni provenienti dalla DCCC sono state purificate impiegando una cromatografia HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

#### 5.4. CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE

La caratterizzazione strutturale dei composti isolati dalle specie *Olea europea* L., *Gentiana lutea* L. e *Allium cepa* L. è avvenuta nelle medesime condizioni. La spettrometria di massa a ionizzazione elettronica (ESI-MS) è stata realizzata su spettrometro con triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000. Gli spettri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono stati realizzati mediante Varian Unity Inova 500 e 125 MHz rispettivamente. I chemical shifts erano riferiti ai segnali dei solventi deuterati (<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>OD,  $\delta_C$  49.0 ppm e CD<sub>3</sub>HOD,  $\delta_H$  3.31 ppm). Le correlazioni omonucleari <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H sono state determinate tramite esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C sono state determinate mediante esperimenti HSQC ottimizzati per <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> a 140 Hz. Le correlazioni <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C attraverso la presenza di più legami

sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per  $^3J_{CH}$  di 8.0 Hz. La cromatografia liquida in controcorrente a gocce (DCCC) è stata realizzata su un sistema DCC-A (Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan); la cromatografia HPLC è stata realizzata su un sistema dotato di pompa Waters 510, con un iniettore Rheodyne 7125 e un indice di rifrazione Waters 401 come rivelatore, usando come colonna C18- $\mu$ -bondapak (300 mm x 3.9 mm i.d.) e Luna C18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.). Per le TLC sono state usate lastre di silice Merck del tipo Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0.25 mm. La configurazione L del ramnosio è stata assegnata nel modo seguente: in seguito all'idrolisi del composto isolato, l'idrolizzato è stato fatto reagire con L-cistein-metil-estere 0.1 M in piridina anidra (200  $\mu$ L) e in acido cloridrico per 1 ora a 60° (Hara, S., 1987). È stato aggiunto 1-trimetilsililimidazolo in piridina e i derivati tiazolidinici sono stati analizzati attraverso gas cromatografia. La presenza del ramnosio di tipo L è stata confermata attraverso il confronto tra il tempo di ritenzione dei loro derivati con quelli del D-ramnosio, ( $t_R$ =12.60 minuti) e del L-ramnosio ( $t_R$ = 12.14 minuti). Invece, la configurazione D del glucosio è stata assegnata in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto isolato (Ya-Zhou, W., 2008) e dalla successiva analisi gas-cromatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard.

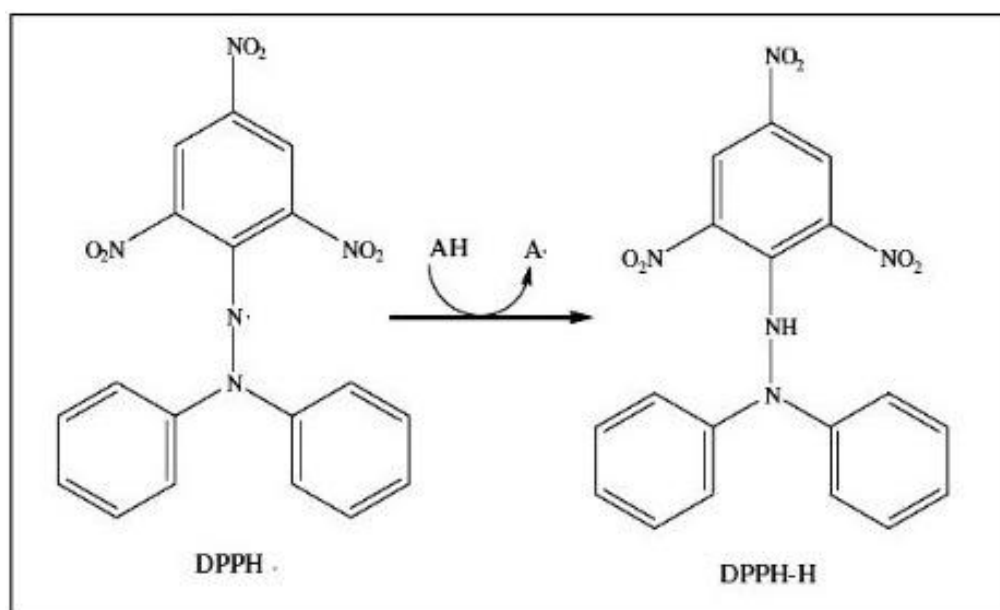
## **5.5. ATTIVITA' CHIMICO-BIOLOGICHE**

### **5.5.1 CONTENUTO TOTALE DI FENOLI (TPC)**

Il contenuto di fenoli (TPC) degli estratti OEL e OELD è stato determinato quantitativamente mediante un dosaggio colorimetrico (Chew, 2009). A 750  $\mu$ L del rattivo di Folin-Ciocalteu 10% (v/v) sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di una soluzione etanolica al 50% (v/v) contenente differenti quantità degli estratti OELD e OEL. Dopo 5 minuti, sono stati aggiunti alla miscela 750  $\mu$ L di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 g/L).. L'assorbanza della miscela così ottenuta è stata misurata a 700 nm dopo una incubazione al buio per 120 minuti. Il contenuto di TPC viene espresso in equivalenti di acido caffeico per  $\mu$ g di estratto (CAE). La retta di taratura per l'acido caffeico è stata determinata attraverso la seguente formula:  $y = 0.010 + 0.0123x$  ( $R^2 = 0.9994$ ), dove  $x$  sta ad indicare la concentrazione di acido caffeico (nM) e  $y$  indica l'assorbanza a 700 nm.

### 5.5.2 ATTIVITA' SCAVENGER (DPPH)

Il dosaggio del DPPH rappresenta una misura indiretta dell'attività antiossidante della sostanza in esame, in quanto si può valutare la capacità di specifiche molecole di mascherare l'azione di questo radicale (attività *scavenger*). Il DPPH (2,2-difenilpicrylhydrazyl) è uno dei rari radicali dell'azoto che è stabile in soluzione e presenta un massimo di assorbimento nel visibile a 517 nm ( $\epsilon_{M517} 9660 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), conferendo alla soluzione una colorazione viola. Dopo la sua riduzione, si osserva un cambiamento nella colorazione da viola a giallo ( $\epsilon_{M517} 9660 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) (Figura 5.1).



**Figura 5.1** Riduzione del radicale di DPPH<sup>·</sup> in presenza di un antiossidante

La capacità *scavenger* degli estratti OEL, OELD e dei composti puri è stata valutata attraverso il metodo spettrofotometrico misurando il *quenching* del DPPH come è descritto in letteratura (De Marino, 2012). Una appropriata quantità di estratto puro è stata aggiunta ad 1 mL di soluzione 100 mM Tris-HCl a pH 6.8 in etanolo al 50% (v/v), contenente DPPH ad una concentrazione finale di 150  $\mu\text{M}$ . Dopo 30 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente è stata misurata l'assorbanza a 517 nm. Il grado di decolorazione sta ad indicare l'entità dell'attività *scavenger* del campione. Come riferimento viene utilizzato l'acido ascorbico. Il risultato viene espresso in  $\text{EC}_{50}$ , cioè la concentrazione di antiossidante capace di neutralizzare il 50% delle specie radicaliche presenti nella miscela di reazione.

### **5.5.3 CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAC)**

La capacità antiossidante totale è stata valutata mediante l'utilizzo del metodo del fosfomolibdato,cos' come descritto da Umamaheswari et al. (Umamaheswari, 2008). Ad 1 mL di soluzione (0.6 M acido solforico, 28 mM fosfato di sodio e 4 mM di ammonio molibdato) veniva aggiunta un'aliquota di 100 µL contenente un appropriato quantitativo di estratto (OELD). La soluzione è stata quindi incubata a 95°C; dopo 90 minuti la miscela viene raffreddata fino a temperatura ambiente. L'assorbanza della miscela è stata misurata a 695 nm in parallelo con il bianco.

### **5.5.4 ATTIVITA' ANTILIPOPERROSSIDASICA (ALP)**

Il test dell'inibizione della perossidazione dell'acido linoleico è stato eseguito aggiungendo ad 1 mL (volume finale) di fosfato 200 mM, buffer pH 7.8, contenente 0.7% v/v Tween 20 e 23 mM di acido linoleico, diverse quantità di estratto o di molecole pure; La reazione di lipoperossidazione è stata avviata aggiungendo alla soluzione FeCl<sub>2</sub> 0.4 mM.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, su un'aliquota di 250 µL di ogni miscela è stata misurata la quantità di malondialdeide prodotta, aggiungendo a queste aliquote 100 µL di una soluzione composta da BHT 0.8 g/L, 50 µL HCl 10% (v/v), 50 µL di TBA 1% w/v e trattando ciascuna miscela a 100°C. Dopo 20 minuti la miscela di reazione è stata raffreddata in ghiaccio, sono stati aggiunti 900 µL di *n*-butanolo ed è stata agitata vigorosamente per 5 minuti. Successivamente il campione è stato centrifugato a 4° C per 5 minuti ad una velocità di 14000 rpm. L'assorbanza della fase *n*-butanolica è stata misurata a 532 nm. La valutazione dell'EC<sub>50</sub> è stata effettuata secondo il metodo già descritto in letteratura (De Marino, S., 2012).

### **5.5.5 INIBIZIONE DELLA ATTIVITA' DELL'ENZIMA XANTINA OSSIDASI**

Il test dell'inibizione della XO è stato effettuato monitorando la formazione di acido urico in presenza e in assenza degli estratti o dei composti puri, facendo riferimento al metodo descritto da Marocci *et al* (Marocci, L., 1994). In particolare, l'attività della XO è stata misurata preparando una miscela di reazione dal volume finale di 500 µL,



contenente 5 % (v/v) metanolo, 50 mM tampone fosfato, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 40  $\mu$ M xantina (substrato), 0.7 mg/mL di xantina ossidasi (enzima) e diverse quantità dei campioni oggetto di questo lavoro, quali potenziali inibitori della XO. Il dosaggio è iniziato aggiungendo l'enzima alla reazione e l'attività è stata seguita cinematicamente leggendo l'assorbanza a 295 nm fino a 2 minuti di incubazione a temperatura ambiente. Il valore di  $IC_{50}$  è stato determinato in base al metodo descritto da Hamdi et al, 2005.

**CAPITOLO 6**  
**Analisi ChemGPS**

## 6.1. ChemGPS

Durante il periodo di sei mesi di studio all'estero, presso il Dipartimento di Chimica, divisione Farmacognosia, dell'Università di Uppsala (Svezia) mi sono occupata dell'analisi di predizione chemGPS sui composti isolati ed identificati dalle specie *Gentiana lutea* L. ed *Olea europea* L. La ChemGPS è un'analisi innovativa, che mostra la disposizione delle molecole in uno spazio chimico virtuale. Il concetto di chemografia e dell'analisi chemGPS fu introdotto nel 2001 da Oprea e Gottfries, due ricercatori della casa farmaceutica AstraZeneca. Il chemGPS (Chemical Global Positioning System) è una tecnica computerizzata, basata su modelli matematici e statistici, che permette un'esplorazione globale dello spazio chimico (Oprea, T.I., 2002; Oprea, T.I., 2001). La Chemiografia, definita dagli autori "l'arte di navigare nello spazio chimico", ha le stesse caratteristiche di un sistema geografico, in cui gli "oggetti" sono disposti nello spazio in base a dei parametri chimici. L'idea di Oprea e Gottfries era quella di costruire una mappa, chemGPS, dello spazio chimico utilizzando gli stessi principi che Mercatore utilizzò per costruire una proiezione cartografica (Snyder, J.P., 1987). Lo spazio multidimensionale, può essere illustrato e studiato attraverso il ChemGPS in una proiezione bi-dimensionale. Gli oggetti presenti in una mappa geografica come case, città, paesi, vengono tradotti in un sistema chemGPS in composti chimici; la longitudine e la latitudine invece in parametri chimici quali ad esempio dimensione, flessibilità e lipofilità di una molecola.

Lo spazio chimico potrebbe essere descritto come una regione multidimensionale costituito da un sistema di coordinate con molteplici assi, che rappresentano il numero di proprietà fisico-chimiche dei composti. L'utilizzo del chemGPS ci permette di fare un'analisi "predittiva" sui nuovi composti isolati, quindi di individuare sulla mappa chimica delle possibili attività biologiche, comparando il set di campioni nuovi sottoposti ad esame con il set di campioni noti. Per campioni noti, si intende un insieme di campioni presenti in una libreria virtuale, dei quali è nota non solo la struttura chimica ma anche le eventuali attività biologiche. I dati presenti nelle librerie virtuali sono ottenuti dai lavori bibliografici, i siti più utilizzati sono PubChem e ChemSpider.

## 6.2. ChemGPS-NP

Il ChemGPS-NP è un modello modificato di chemGPS che si basa sullo studio e analisi spaziale dei prodotti naturali. Permette di selezionare prodotti naturali che

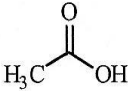
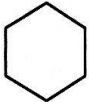

potrebbero divenire potenziali farmaci, inoltre consente uno screening virtuale sulle possibili attività biologiche dei composti isolati ex-novo. L'attenzione è stata focalizzata sullo studio dei prodotti naturali, in particolare dei metaboliti secondari, in quanto sono un'essenziale risorsa per la scoperta e lo sviluppo di nuovi e promettenti composti nella drug discovery. I prodotti naturali possono essere considerati come dei "pre-validati" dalla natura, durante l'evoluzione hanno subito delle modifiche, determinate dalla loro interazione con macromolecole biologiche (Mullin, R., 2004). Inoltre hanno avuto un lungo impiego nella medicina popolare in quanto erano gli unici composti disponibili. Approssimativamente il 50% dei farmaci utilizzati sono di origine naturale (Bruhn, J.G., 1997; Hiortrberg, L., 1754). Infatti, molti dei farmaci attualmente commercializzati sono originati da NP o NPs, particolarmente nella cura del cancro e delle malattie infettive (Larsson, S., 2008; Breinbauer, R 2202). Nonostante ciò c'è stato un declino nello sviluppo di questi composti come potenziali farmaci nelle industrie parafarmaceutiche nel 1990 in favore dei composti di sintesi (Butler, M.S. 2005). I prodotti naturali, rispetto ai prodotti di sintesi occupano un ampio spazio chimico e numerose indagini statistiche hanno individuato una serie di caratteristiche distintive.

## **6.2.1 COME REALIZZARE UN GRAFICO ChemGPS-NP**

### **Rappresentazione della struttura chimica**

Per utilizzare le strutture chimiche nell'analisi chemGPS-NP le molecole devono essere trasformate in linguaggio computazionale. Ciò è possibile attraverso la conversione in notazioni lineari, ovvero SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification). Gli SMILES consistono in una stringa costituita da un codice alfanumerico senza spazi. Indicazioni chirali e isotopiche sono facoltative. Un codice senza queste informazioni è chiamato generalmente SMILE. Se sono incluse informazioni in merito a proprietà chirali o isotopiche verrà chiamato isomeric SMILE.

In uno SMILE ad esempio gli atomi di idrogeno vengono rappresentati in parentesi quadre, le cariche con + e -, la presenza di un doppio legame con =, la presenza di un triplo legame con # etc. (Tabella 6.1).

	ethane	carbon dioxide	hydrogen cyanide	acetic acid	cyclo-hexane	benzene
empirical formula:	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	CO <sub>2</sub>	CHN	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>
2D chemical structure:	H <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub>	O=C=O	HC≡N			
SMILES:	CC	O=C=O	C#N	CC(=O)O	C1CCCCC1	c1ccccc1

**Tabella 6.1** Conversione delle strutture molecolari in SMILES

### Descrittori molecolari

I descrittori molecolari danno informazioni chimiche sulle molecole e ci permettono di evidenziare eventuali correlazioni tra la struttura e l'attività biologica di un composto. Per il calcolo dei descrittori molecolari viene utilizzato il software Dragon Professional. I descrittori si suddividono in quattro gruppi: 0, 1, 2, 3-dimensionali.

- 0, 1-dimensionali: consentono di avere informazioni in merito alla formula empirica, per calcolare il numero di atomi complessivo e il peso molecolare;
- 2-dimensionale: consentono di stabilire i legami tra gli atomi, di evidenziare la presenza di gruppi funzionali, ramificazioni e composti ciclici;
- 3-dimensionali: forniscono informazioni in merito alla stereochimica e alla geometria molecolare.

### Tecniche chemiometriche

Le tecniche chemiometriche sono tecniche matematiche e statistiche applicate ai dati chimici. Si basano su metodi di analisi multivariata quali PCA (Principal Component Analysis) (Wold, S., 1984, Pearson, K., 1991), PLS (Partial Least Squares) e OPLS (Orthogonal Partial Least Squares).

L'analisi PCA ci permette di individuare correlazioni tra i diversi composti chimici. Si basa sull'analisi della varianza, ha cioè l'obiettivo di mettere in risalto le differenze

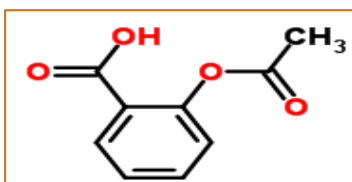
presenti nei dati. Questo è possibile grazie ad una riduzione delle dimensioni del dataset mantenendo il più possibile la variabilità in esso presente. È possibile, quindi, identificare un raggruppamento dei dati unsupervised. La PLS, invece, è una tecnica di classificazione. In questa tecnica viene creato un modello di regressione tra la matrice dei predittori, X, e il vettore (o la matrice) dei responsi, Y. In PLS la matrice dei responsi, un vettore per ogni classe, su cui fare la regressione riporta un 1 se l'oggetto appartiene alla classe e uno zero se non appartiene ad essa.

## Rappresentazione 3-dimensionale

Viene riportano un esempio di costruzione di un modello 3-D

### Struttura chimica

Aspirina



SMILE dell'aspirina

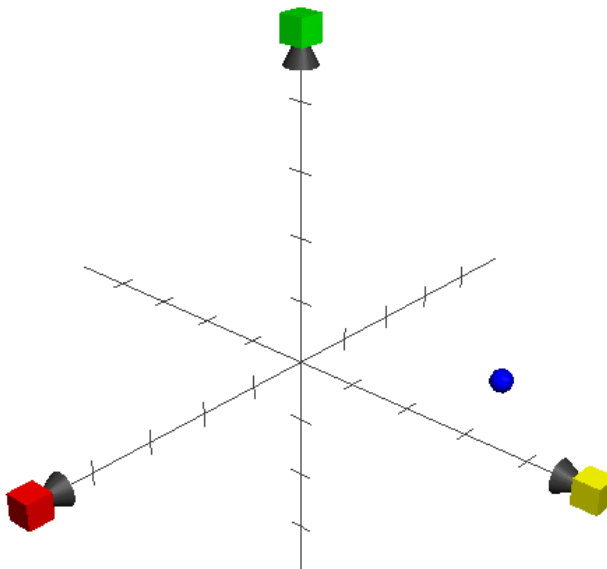
CC(=O)OC1=CC=CC=C1C(=O)O

Descrittori Molecolari



- molecular weight
- sum of atomic van der Waals volumes (scaled on C atom)
- sum of atomic Sanderson electronegativities (scaled on C atom)
- sum of atomic polarizabilities (scaled on C atom)
- mean atomic van der Waals volume (scaled on C atom)
- mean atomic Sanderson electronegativity (scaled on C atom)
- number of atoms
- number of non-hydrogen atoms
- number of bonds
- number of non-hydrogen bonds
- number of multiple bonds
- aromatic ratio
- number of rings
- number of rotatable bonds
- rotatable bond fraction
- number of double bonds
- number of aromatic bonds
- number of carbon atoms
- number of nitrogen atoms
- number of oxygen atoms
- number of halogens
- number of benzene-like rings
- number of aromatic carbon atoms (sp<sup>2</sup>)
- number of amides
- number of aliphatic hydroxy groups
- number of aromatic hydroxy groups
- number of donor atoms for hydrogen bonds (N and O)
- number of acceptor atoms for hydrogen bonds (N, O, and F)
- unsaturation index
- hydrophilic factor
- Ghose-Crippen molar refractivity
- topological polar surface area using N and O
- topological polar surface area using N, O, S, and P
- Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient
- Lipinski alert index (drug-like index)

## Rappresentazione 3-D dell'aspirina



### Principio di similarità

Nella drug discovery è spesso interessante scoprire le similarità tra molecole diverse. La ricerca delle similarità sono importanti per esempio per eseguire uno screening virtuale di una lunga lista di composti che hanno trovato impiego nell'industria parafarmaceutica. Le ricerche sulla similarità hanno le loro basi filosofiche, il cosiddetto *principio di similarità* (Newman, D.J., 2000; Johnson, M. 1990) che afferma che molecole simili potrebbero avere le stesse proprietà chimico-fisiche e probabilmente le stesse attività biologiche. L'obiettivo è identificare strutture molecolari alternative che hanno le proprietà richieste, però migliorando ad esempio il profilo farmacocinetico. Ciò è possibile tramite una sovrapposizione di dati: i dati delle strutture chimiche presenti nelle librerie virtuali e i dati delle strutture isolate ex-novo o di sintesi.

I dati input vengono comparati usando degli indici di similarità, le metriche più utilizzate sono semplici misure di distanza quali: la distanza euclidea e il coefficiente di associazione come il coefficiente di Hamming e Tanimoto (Koehn, F.E., 2005).

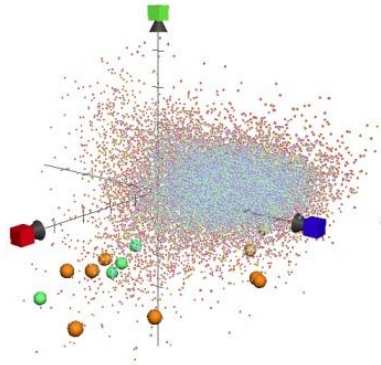
### **6.2.2 VALUTAZIONE CHEMOGRAFICA DELLE EVENTUALI ATTIVITA' BIOLOGICHE DEI COMPOSTI ISOLATI DA *Olea europea* L. e *Gentiana lutea* L.**

La predizione delle attività biologiche, tramite ChemGPS, è stata eseguita comparando i prodotti naturali presenti nella libreria virtuale ZINC-NP con i composti isolati dalle specie *Olea europea* L. e *Gentiana lutea* L., in particolare il confronto è stato effettuato con le attività biologiche note dei composti strutturalmente simili. Si tratta di un'analisi "predittiva in silico" che andrebbe poi confermata con esperimenti in vitro. Le affinità sono state calcolate in base al principio di similarità. L'asse delle X (rosso) rappresenta la disposizione spaziale delle molecole in base alla dimensione, l'asse delle Y (blu) in base all'aromaticità e l'asse Z (verde) in base alla lipofilicità.

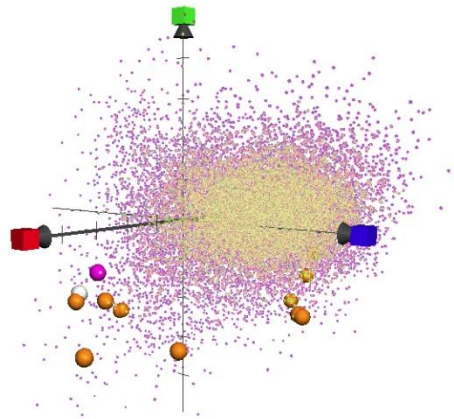
Nel grafico 1 si evidenzia che i composti isolati da *O. europea* (arancio) e *G. lutea* (verde) hanno caratteristiche diverse in termini di dimensione e lipofilicità rispetto ai prodotti naturali presenti nella libreria virtuale. Nel grafico 2 i composti isolati dalla specie *O. europea* sono stati comparati con le attività biologiche note dei prodotti naturali (celeste), da ciò si evince che un composto isolato potrebbe avere attività anticancro (rosa e bianco). Questo è stato stabilito dal principio di similarità tra i composti isolati e i composti presenti nella libreria virtuale, la similarità è stata calcolata sulla base della distanza euclidea. Nel grafico 3 e 4 i quattro composti isolati dalla *G. lutea* sono stati confrontati con i composti presenti nella libreria ZINC-NP, e si evince nel grafico 3 la vicinanza spaziale di uno dei composti ad un composto di cui è nota l'attività antibatterica (viola); nel grafico 4 invece due dei composti isolati dalla *G. lutea* sono vicini spazialmente a composti di cui è nota l'attività antiossidante (rosso). In conclusione da un'analisi in silico di predizione dei composti isolati da *Olea europea* e *Gentiana lutea*, si denota una potenziale attività anticancro per i composti caratterizzati dal decotto (OELD); invece i composti isolati dalle radici di genziana, potrebbero avere attività antibatterica e antiossidante. Le informazioni ottenute andrebbero confermate con esperimenti in vitro.



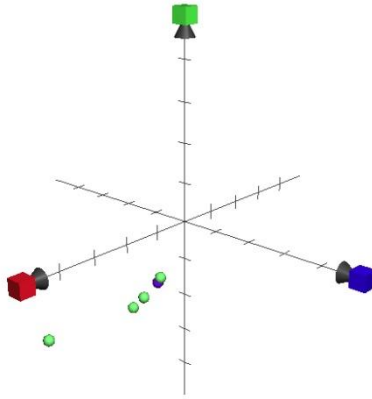
**Grafico 1**



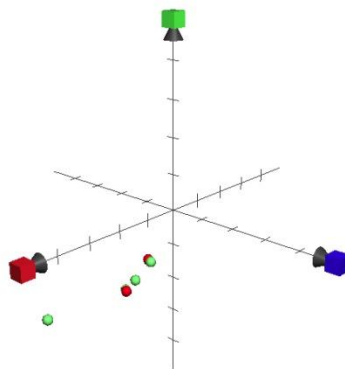
**Grafico 2**



**Grafico 3**



**Grafico 4**



## BIBLIOGRAFIA

Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E.K. Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E., Kremastinos, D.T. (2007) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 549-558.

Bax, A., Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquidis, Delf Univrsity Press, Delf University Press, Dordrecht, 1982

Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therapeutics*, **90(2-3)**, 157-177.

Benetou, V., Trichopoulou, A., Orfanos, P., Naska, A., Lagiou, P., Boffetta, P., Trichopoulos, D. (2008) Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *British J. of Cancer*, **99**, 191-195.

Bruhn, J.G., and Bohlin, L. (1977) Molecular pharmacognosy: an explanatory model. *Drug Discov Today* **2**, 243.246.

Breinbauer, R., Vetter, I.R. and Waldmann, H. (2002) From proteins domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libreraries. *Angew Chem Int En Engl* **41**, 2879-2890

Butler, M.S. (2005) Natural products to drug: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep.* **22**, 162-195.

Capasso, F., Gaginella, T.S. Grandolini, G., Izzo, A.A. (2001) *Phytotherapy*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Cecchini, T.(1992) in: Enciclopedia de las hierbas medicinales; Editio de Vecchi: Barcelona.

Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K.S. (2008) Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Food Sci. Technol. LEB.* **41**, 1067-1072.

Commoner, B., Townsend, J., Pake, Ge., (1954) Free radicals in biological materials. *Nature*, **174**, 689-691.

- Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Capasso, R. and Izzo A.A. (2005) Antispasmodic Saponins from Bulbs of Red Onion, *Allium cepa* L. Var. Tropea *J. Agric. Food Chem* **53**, 935-940.
- Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Papasso, F., Izzo, A.A.. 2005, *J.Agric. Food Chem.* **53**, 935.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimice. Agents*, **26**, 343-356.
- Dale, J., K., Mosher, H.S. Nuclear magnetic resonance non-equivalence of diastereomeric esters of  $\alpha$ -substituted phenylacetic acid for determination of stereochemical purity. *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 3732.
- Dale, J., A., Dull, D., L., Mosher, H., S.,  $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$  trifloromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *J. Org. Chem.*, 1969, 2543.
- Damfort, S., Franzik, H., Jensen, S.R. (1993) Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry* **49** (6), 1829-1832.
- Damtoft, S., Frazyk, H. and Jensen, S. R. (1992) Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior* *Phytochemistry*, 31, 4197-4201.
- Della Greca, M., Previtiera, L., Temussi, F., Carelli, A. (2004) Low molecular-weight components of olive oil mill waste-water *Phytochem. Anal.*, **15**, 184-188.
- De Marino, S. Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., Evangelista, G., Iorizzi, M. (2012) Antioxidant activity of phenolic and phenyletanol glycosides from *Teucrium polium*. *L. Food Chemistry*, **133**, 21-28.
- De Pasquale, R., Monforte, R.T., Trozzi, A., Raccuia, A., Tommasin, S., Ragusa, S. (1991) Effects of leaves and shoots of *Olea europea* L. and oleuropein on experimental hypercholesterolemia in rat. *Plantas Med Phytoter.* **25**, 134-140.
- El N. S., Karakaya S., (2009) Olive tree (*Olea europea*) leaves: potential beneficial effects on human health, *Nutrition Reviews*, **67**, 632-638

- Eun Ju, Y., Sang In, K., Sang Yun, P., Han Yeol, B., Ji Hye, J., Jai Hyun, S. (2012) Fermentation enhances the *in vitro* antioxidative effects of onion (*Allium cepa*) via an increase in quercetin content *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 2042-2048.
- Fattorusso, E., Iorizzi, M., Lanzotti, V., Tagliatela-Scafati, O. (2002) Chemical Composition of Shallot (*Allium ascalonicum* Hort) *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 5686-5690
- Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J., Osuna, I. (1992) Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med.*, **18** (4), 251-258.
- Hajimehdipooe, H., Dijoux-Franca M.G., Mariotte, A.M., Amanzadeh, Y., Sadat-Ebrahimi, S.E., Ghazi-Khansari M. and Mozaffarin, V. (2008) Phytochemical study of *Swertia longifolia* *DARU* **16** (4), 245-249.
- Halliwell, B., (1997) Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharm.*, **49**, 1341,1348.
- Hamdi, H.K., Castellon, R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **334**, 769-778
- Harborne, J.B. (1999) The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**, 335-367.
- Hiortzberg, L. (1954) *De Methodo Investigandi Vires Medicamentorum chemica* (On the chemical method of investigating the powers of medicines) PhD. Dissertation in medicinal chemistry. Uppsala University, Uppsala.
- Hostettmann K., Bellmann G., Tabacci R., Jacot-Guillarnic A.,(1973) *Helv. Chim. Acta*, **56**, 3050-3055.
- Japon-Lujan, R., Luque, De Castro, M.D. (2008) Liquid-liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenol from olive leaf extracts. *J. Agric. Food Chem*, **56**, 2505-2511.
- Johnson, M. and Maggiora, G.M. (1990) *Concepts and Applications of Molecule Similarity*, John Wiley & Sons, New York.

Karplus, M., Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, *J. Chem. Phys.*, 1959, 11.

Koehn, F.E. and Carter, G.T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev Drug Discov* **4**, 206-220.

Kupchan, S.M., Britton, R.W., Ziegler M.F., Singel C.W.(1973) Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. *J. Org. Chem.* **38**: 178-179.

Lanzotti, V. (2006) The analysis of onion and garlic *J. of Chromatography A* , **1112**, 3-22.

Larsson, S., Backlund, A., and Bohlin, L. (2008) Reappraising a decade old explanatory model for pharmacognosy *Phytochem Lett* **1**, 131-134 .

Lawson, L.D, (1998) in: *Phytomedicines of Europe*, American Chemical Society Symp. Ser., **691**, p. 176.

Lee, E.J.; Kim, K.S., Jung, H.Y., Kim, H.D., Jang, H.D. 2005 *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 123.

Leporatti, M.L., Posocco, E., Pavesi, A. (1985) Some new therapeutic uses of several medicinal plants in the province of Terni (Umbria, central Italy). *J. Ethnopharmacol.*, **14(1)**, 65-68.

Lin, C.M., Chen, C.T., Lee, H.H, Lin, J.K.(2002) Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids, *Planta Med*, **68**, 365-367.

Maffei, M. (1999) *Metabolismo e prodotti secondari delle piante*. UTET.

Marcocci, L., Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M., Pacher, L. (1994) Antioxidant activity of nitecapone and its analog OR-1246: effect of structural modification on antioxidant action. *Methods Enzymol* **234**, 525-541.

Matsuura, H. 2001, *J.Nutr.* **131**, 1000.

Mol, J., Grotewold, E., Koes, R. (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.*, **3**, 212–217.

Molisch, H. (1937) *Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere. Allelopathie*, Fischer, Jena.

Mullin, R. (2004) Dealing with data overload. *Chem Eng News* **82**, 19-25.

Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H. (1999) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotech.*, **63 (10)**, 1787-1790.

Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**, 461-477.

Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 128–134.

Oprea, T.I.(2002) Chemical space navigation in lead discovery. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 384-389.

Oprea, T.I. and Gottfries, J. (2001) Chemography: the art of navigating in chemical space. *J Comb Chem* **3**, 157-166.

Owen, R.W., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2004) olive and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.*,**13(4)**, 319-326.

Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000) Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet. Oncol.* **62**, 541-546.

Palmer III, A.G., Cavanagh, J., Wright, P.E., Rance, M., Magn. Reson, (1991), 151-170.

Park, Y. K., Lee, C.Y.(1996) *J. Agric. Food Chem* . **44**, 331.

Pérez, J.A., Hernández, J.M., Trujillo, J.M., Lòpez, H., (2005) Iridoids and secoiridoids from Oleaceae, *Bioact. Nat. Prod.*, **72(4)** , 303-363.

- Pearson, K. (1901) On lines and planes of closest fit to system of point in space. *Philos Mag* **2**, 559-572.
- Pichersky, E., & Gang, D.R., (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.*, **5**, 439-445.
- Pisha, E., Pezzuto, in: H. Wagner, H. Hikino, N. Fainsworth (1994) *Economic and Medicinal Plant R.* p. 189.
- Ponce, A.M., Bianco, S.E., Molina, A.S., Garcia-Domenech, R., Galvez, J.(2000) Study of the action of flavonoids on xanthine-oxidase by molecular topology *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**, 1039-1045.
- Rastrelli, L., Caceres, A., Moreles, C., De Simone, F., Aquino, R. (1998) Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* **49** (6), 1829-1832.
- Rhodes, M.J.C., Price, K.R. (1996) *Food Chem.*, **57**, 113. Ryan, D., Antolovich, M.,
- Prenzler, P., Robards, K, Lavee S., (2002) Biotrasformations of phenolic compounds. *Scientia Horticultutae*, **92**, 147-176.
- Rovira A.D. (1969) Plant root exudates. *Bot. Rev.* **35**, 35-57.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K, Lavee S., (2002) Biotrasformations of phenolic compounds. *Scientia Horticultutae*, **92**, 147-176
- Sakushima, A., Ohno, K., Coskun, M., Seki, K., Ohkura, K. (2002) Separation and identification of taxifolin 3-O-glucoside isomers from *Chamaecyparis obtuse* (Cupressaceae). *Nat. Prod. Lett.*, **16** (6), 383-387.
- Sampaio-Santos, M.I., Kaplan, M.A.C. (2001) Biosynthesis Significance of Iridids in Chemosystematics, *J. Braz, Chem, Soc*, **2**, 1221-1227.



Savikin, K., Menkovic, N., Zdunic, G., Stevic, T., Radanovic, D., Jankovic, T. (2009) Antimicrobial Activity of *Gentiana lutea* L. extract. **64c**, 339-342.

Servilli, M., Montedoro, G.F., (2002) Contribution of Phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2**, 144-153.

Snyder, J.P. (1987) Map projections – A Working Manual. U.S. Geological Survey Professional Paper 1395. United States Government Printing Office, Washington, D.C. <http://pubs.er.usgs.gov/usgspubs/pp/pp1395>.

Stanner, S.A., Hughers, J. Kelly, C.N., Buttriss, J. (2004) A review of the epidemiological evidence for the ‘antioxidant hypothesis’. *Public Health Nutr*, **7**, 407-422.

Takenaka, Y., Tanahashi, T., Shintaku, M., Nagakura, N., Parida, (2000) Secoiridoid glucosides from *Fraxinus amaricana*. *Phytochemistry*, **55**, 275-282

Tomiyana, K., Sakuma, T., Ishizaka, N., Sato, N., Katsui, N., Takasugi, M., Masamune, T., (1968) New antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens. *Phytopatology*, **58**, 115-122.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005) The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* **18**, 98-112

Trouillas, P., Fagnere, C., Lazzaroni, R., Calliste, C., Marfak, A., Durox, J.L. (2004) A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **88**, 571-582

Weckesser, S. Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., Schempp, C.M. (2007) Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*.**7-8**, 508-16

Weininger, D., (1988) SMILES, a chemical language and informations system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J Chem Inf Comput Sci* **28**, 31-36.

Weininger, D., Weininger, A. and Weininger, J.L. (1989) SMILES. 2. Algorithm for generation of unique SMILES notation. *J Chem Inf Comput Sci* **29**, 97-101.

Wichte M., Teedrogen, Scientific Publishers, Stuttgart, 1994, 233- 235.

Wold, S., Esbensen, K. and Geladi, P. (1987) Principal component analysis. *Chemometr Intell Lab Syst* **2**, 37-52

Visioli, F., Bellosta, S., Galli., C. (1998) Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Science* **62**, 541-546

Visioli F., Galli, C., Galli, G., Caruso, D. (2002) Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur J. Lipid Sci Technol.* **104**, 677-684

Xiaozhe, Z., Qing, X., Hongbin, X., Xinmao, L.(2003) Iridoid glucosides from *Strychnos nux-vomica*. *Phytochemistry* **64**, 1341-1344

Zhu, B.K., Zhe, W., Duan, Y.Q., Wang, M.F., Gao, Y., Wei, G.Z., Liao, T., G. (2012) Two new xanthenes from *Swertia angustifolia* J. of Asian Natural Products Research **14:2**, 154-158.