UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE
CAMPOBASSO

FACOLTA' DI SS. FF. MM. NN.

DOTTORATO DI RICERCA
IN
"AMBIENTE E TERRITORIO"
XXIII CICLO

Aspetti chimico-biologici interazione uomo ambiente

ISOLAMENTO, CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DI METABOLITI SECONDARI DI ORIGINE VEGETALE

Formato file: pdf

SSD: CHIM/06: Chimica Organica- Chimica delle Sostanze Naturali

Tutor:
Chiar.mo Prof. Maria Iorizzi

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Fulvio Celico

Dottoranda
FILOMENA INCOLLINGO
Matr. 141216

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

ABSTRACT……...3

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

- **La chimica delle sostanze naturali……6**
- **Metodiche di isolamento……..17**
- **Tecniche di determinazione strutturale…….21**
- **Bibliografia……...34**

CAPITOLO II: ANALISI DEGLI ESTRATTI DI *Juniperus communis*

- **Descrizione *Juniperus communis* …….....37**
- **Caratterizzazione strutturale dei metaboliti isolati da *Juniperus communis*.42**
- **Attività biologica dell'acido Imbricatolico……63**
- **Parte sperimentale……...67**
- **Dati spettroscopici……...73**
- **Bibliografia……...90**

CAPITOLO III: ANALISI DEGLI ESTRATTI DI *Teucrium polium*

- **Descrizione *Teucrium polium*……..…95**
- **Caratterizzazione strutturale dei metaboliti isolati da *Teucrium polium*…100**
- **Attività biologica *Teucrium polium*……...120**
- **Parte sperimentale…….130**
- **Dati spettroscopici……..136**
- **Bibliografia…….150**

CAPITOLO IV: ANALISI DEGLI ESTRATTI DI *Satureja montana L.*

- **Descrizione *Satureja montana*……...154**
- **Caratterizzazione strutturale dei metaboliti isolati da *Satureja montana*…158**
- **Attività biologica *Satureja montana*…….….165**
- **Parte sperimentale…….……169**
- **Dati spettroscopici……..173**
- **Bibliografia…….178**

Isolamento, caratterizzazione strutturale e valutazione dell'attività biologica di metaboliti secondari di origine vegetale

Abstract:

La tematica di ricerca di questo dottorato si inserisce nell'ambito della chimica delle sostanze naturali. In particolare l'attenzione si è soffermata alle piante officinali e alle piante impiegate nella medicina popolare e alla purificazione e all'isolamento dei metaboliti secondari presenti in maggiore quantità attraverso tecniche cromatografiche quali: cromatografia su colonna, cromatografia su strato sottile, HPLC (high pressure liquid chromatography), DCCC (cromatografia liquida in controcorrente a gocce).

Sono stati analizzati i componenti chimici naturali degli estratti di *Juniperus communis*, *Teucrium polium* e *Satureja montana*, specie vegetali tipiche della flora appenninica molisana e di comune impiego nella medicina popolare. Le bacche di *Juniperus communis* (*Cupressaceae*) sono impiegate come aromatizzanti di cibi e per la preparazione del Gin. Il decotto di foglie di *Teucrium polium* (*Lamiaceae*) si adopera in Molise contro i disturbi gastrointestinali; proprietà antisettiche sono invece possedute dagli estratti di *Satureja montana* (*Lamiaceae*). Accanto all'isolamento di composti noti, molti dei quali mai isolati da tali piante, lo studio dell'estratto metanolico delle bacche di *Juniperus communis*, delle foglie di *Teucrium polium* e delle foglie di *Satureja montana*, ha condotto all'identificazione di alcuni nuovi metaboliti secondari che hanno esibito possedere interessanti attività farmacologiche.

Alcuni diterpeni isolati dallo *Juniperus communis* hanno mostrato azione citotossica su linee cellulari tumorali polmonari CaLu 6, mentre una interessante attività antiossidante è stata individuata in deiversi composti isolati dal *Teucrium polium*.

Gli estratti di *Satureja montana* hanno rivelato un'attività antiossidante minore rispetto a quella posseduta dalla pianta *Teucrium polium.* La caratterizzazione strutturale di tutti i composti isolati è avvenuta attraverso tecniche spettroscopiche di risonanza magnetica nucleare con esperimenti monodimensionali (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) e bidimensionali (COSY, HSQC, HMBC, ROESY), effettuati presso il C.S.I.A.S., Centro Servizi Interdipartimentale di Analisi Strumentale della Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II.

Isolation, chemical elucidation and evaluation of biological activity of secondary metabolites from plants

Abstract:

The research field of this PhD is the isolation and chemical characterization of secondary metabolites from medicinal and ethnobotanical plants grown in Molise, as *Juniperus communis*, *Teucrium polium* and *Satureja Montana*.

Aerial parts of plants were chopped and soaked in methanol, the methanol extract, was subjected to Kupchan's partition with solvents at increasing polarity as: *n*-hexane, $CHCl_3$, *n*-buthanol, water. The $CHCl_3$ and BuOH extracts were chromatographed by droplet countercurrent chromathography (DCCC), and some fractions were chromatographed by reverse phase HPLC.

Chemical analysis of the extracts of *Juniperus communis*, *Teucrium polium* and *Satureja Montana* led to isolation of some new compounds, along with known compounds, most of them never isolated from this plants. Compounds with labdane skeleton were identified from the berries of *Juniperus communis.* Flavonoids in their glycosidic form were identified from *Teucrium polium* and megastigmane compounds from *Satureja Montana*. Imbricatolic acid, one of the major components of the methanolic extract of *Juniperus communis*, induce growth arrest in p53 null CaLu-6 cells.

From the n-BuOH extract of aerial parts of *Teucrium polium* were isolated many glycosilated flavonoids, together with a new compound, which shows the highest antioxidant activity, among all compounds isolated. The extracts of *Satureja Montana* show a less antioxidant activity compared with the antioxidant activity of *Teucrium polium*.

The chemical structure of all compounds isolated were estabilished by means of spectroscopic data including high-resolution mass spectrometry, and one and two-dimensional nuclear magnetic resonance as ^{1}H and ^{13}C-NMR and 2D experiments as COSY, HSQC and HMBC. One and two dimensional NMR experiments and mass spectra were recorded at the C.S.I.A.S., Centro Servizi Interdipartimentale di Analisi Strumentale della Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

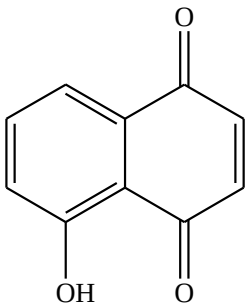
LA CHIMICA DELLE SOSTANZE NATURALI

La tematica di ricerca di questo dottorato si inserisce nell'ambito della chimica delle sostanze naturali. In particolare l'attenzione si è soffermata alle piante officinali e alle piante impiegate nella medicina popolare e alla purificazione e all'isolamento dei metaboliti secondari presenti in maggiore quantità attraverso tecniche cromatografiche quali: cromatografia su colonna, cromatografia su strato sottile, HPLC (High pressure liquid chromatography), DCCC (cromatografia liquida in controcorrente a gocce). La successiva caratterizzazione strutturale è avvenuta attraverso tecniche spettroscopiche di risonanza magnetica nucleare con esperimenti monodimensionali (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) e bidimensionali (COSY, HSQC, HMBC, ROESY), spettroscopia IR e spettrometria di massa. L'ultimo stadio è stato la valutazione delle proprietà di alcune delle molecole isolate attraverso opportuni saggi di attività biologica.

Il nostro ecosistema è caratterizzato da una gran varietà di piante, la cui sopravvivenza è influenzata da una molteplicità di fattori. La comune percezione che le piante siano degli organismi passivi che rispondano solamente alle fluttuazioni relative alla diminuzione delle risorse, è ormai da tempo superata. Alla base della teoria dell'evoluzione di Darwin si pone l'interazione fra le varie specie e l'ambiente in cui esse vivono; infatti gli organismi viventi sono soggetti a una molteplicità di fattori ambientali abiotici e biotici, i quali innescano un meccanismo competitivo che tende a favorire le specie che meglio si adattano alle caratteristiche del proprio habitat. Gli organismi viventi appartenenti ad uno stesso ecosistema sono strettamente legati tra loro da un complesso di relazioni e interscambi realizzati mediante opportuni segnali chimici.

E' generalmente accettato che le piante interagiscano con altre piante, microrganismi ed animali attraverso il rilascio e la ricezione di messaggeri chimici [1], quali metaboliti secondari noti come allelochimici distinguibili in allomoni e kairomoni, dove i primi apportano un vantaggio all'organismo che li produce, mentre i secondi a quello che li riceve.

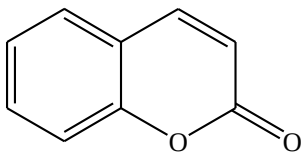
Le prime osservazioni nel campo dell'allelopatia risalgono a Teofrasto [2] (intorno al 300 a.C.), il fondatore della botanica. Egli notò che le piante di ceci (*Cicer arietinum* L.), a differenza delle altre leguminose, impoveriscono il suolo e riducono la crescita delle piante infestanti, come *Tribulus terrestris* L. In seguito, Plinio il Vecchio (23-79 d.C.) [3] osservò che i ceci, l'orzo, il fieno greco e la veccia essiccano la superficie del suolo riducendo la crescita del grano e del frumento. Inoltre, sempre Plinio il Vecchio notò che sotto la chioma del noce la crescita degli ortaggi risultava notevolmente rallentata. L'osservazione di questo fenomeno anche in inverno, quando la chioma della pianta era spoglia, gli fece escludere che la causa fosse la competizione per la luce. Solo di recente si è riusciti a dare una spiegazione scientifica al fenomeno. Infatti, intorno alla metà del ventesimo secolo ne è stato isolato il metabolita responsabile che è stato identificato come 5-idrossi-1,4-naftochinone, comunemente noto come Juglone [4], composto ottenuto attraverso l'ossidazione nel terreno dell'idrojuglone, che già a basse concentrazioni inibisce la crescita di molte specie vegetali. Precisamente, il noce produce l'idrojuglone sottoforma di glicoside non tossico che, quando viene dilavato dalla pioggia, raggiunge il suolo dove si ossida trasformandosi nella forma tossica attiva in grado di inibire la germinazione dei semi e lo sviluppo delle piante [4].



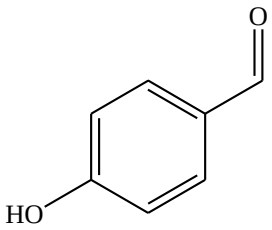
Juglone

Oltre allo juglone sono stati identificati molti altri allelochimici e si è osservato che, talvolta, l'effetto allelopatico rappresenta il risultato di un'azione sinergica di più composti.

È il caso della cumarina, il lattone dell'acido *o*-idrossicinnamico, che in presenza di *p*-idrossibenzaldeide mostra una più spiccata attività fitotossica [5].



Cumarina



p-Idrossibenzaldeide

Il termine *allelopatia*, fu proposto per la prima volta nel 1937 dal fisiologo vegetale Hans Molish [6] intendendo con esso "l'azione dannosa o benefica di una pianta sull'altra o su un animale vivente nello stesso habitat", che secondo Rice avveniva "…attraverso la produzione di composti chimici che si liberano nell'ambiente" [7]. Gli studi sull'allelopatia sono ancora oggi intenso oggetto di dibattito, ed infatti già nel 1985 i sei principi proposti da Inderjit et al. [8], sono stati riassunti in tre caratteristiche fondamentali:

1) Le piante allelopatiche devono produrre e rilasciare messaggeri chimici che modifichino la crescita di altre piante;
2) La quantità di sostanza inibente rilasciata deve essere sufficiente per poter influenzare i processi vitali delle piante;
3) I fattori fisici o biotici non possono essere sufficienti per spiegare l'inibizione osservata sulle piante in diversi campi.

Gli agenti allelochimici possono rappresentare per la pianta un valido meccanismo di difesa contro aggressioni esterne ma di carattere biologico, quali predazioni e parassitismo, provocando effetti blandamente irritanti o letalmente tossici negli organismi erbivori che se ne nutrono. L'azione difensiva può allo stesso modo essere indirizzata verso altri organismi vegetali, consentendo alla pianta produttrice di divenire, mediante soppressione allelopatica, la specie dominante di una comunità di piante, impedendo la proliferazione di altre specie. I metaboliti secondari sono prodotti organici di origine naturale caratteristici di una o poche specie; essi sono coinvolti in quelle che, secondo la classificazione proposta da Harborne [9], rappresentano le quattro più importanti categorie di interazione chimica:

1) Interazione animale-animale
2) Interazione pianta-animale
3) Interazione pianta-microrganismo
4) Interazione pianta-pianta

Per la prima forma di interazione animale-animale si distinguono a tal proposito l'interazione interspecifica e l'interazione intraspecifica. L'interazione interspecifica si instaura tra specie diverse ed alcuni esempi sono tipici di organismi marini, i quali sono in grado di secernere composti alogenati o sesquiterpenoidi utilizzati come meccanismi di difesa contro eventuali predatori. Invece l'interazione intraspecifica si verifica tra individui appartenenti a una stessa specie attraverso il rilascio di diverse categorie di feromoni, tra cui:

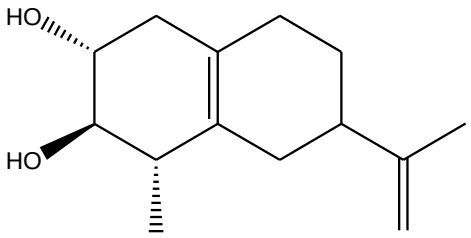
1) Feromoni sessuali, capaci di attrarre gli insetti nella fase di accoppiamento;
2) Feromoni di allarme, prodotti in situazioni di pericolo.

La categoria di interazione pianta-animale, si verifica attraverso la sintesi di sostanze quali: tannini, polifenoli che inibiscono la crescita di altre piante o attraverso la produzione di tossine che interferiscono con il metabolismo degli organismi erbivori.

Alcune piante, infatti, sintetizzano glucosidi cardiaci fisiologicamente attivi come la calatropina, responsabile della morte della ghiandaia blu *Cyanocitta cristata* [10].
Invece la categoria di interazione pianta-microorganismo si realizza attraverso la produzione di composti come fitoalexine, in risposta ad attacchi da parte di:

1) Microrganismi patogeni;
2) Irritazioni dovute a irradiazioni ultraviolette;
3) Infezioni batteriche.

In piante appartenenti alle *Solanaceae*, come la patata, in seguito ad un'infezione fungina vengono prodotte fitoalexine come la riscitina [11]:



Riscitina

L'ultimo tipo di interazione che prendiamo in considerazione è l'interazione pianta/pianta. Tutti gli organismi hanno bisogno di sintetizzare e trasformare un gran numero di composti organici per poter vivere, crescere e riprodursi. In contrasto con le vie del metabolismo primario, che sintetizzano, degradano, e, più in generale trasformano composti presenti in tutti gli organismi, esiste anche una parte del metabolismo che riguarda molecole con una distribuzione in natura molto più limitata.

Questi composti, chiamati metaboliti secondari, si trovano solo in specifici organismi o gruppi di organismi e sono espressione della individualità della specie.

Per molti anni i metaboliti secondari sono stati considerati poco più che semplici prodotti di scarto ('waste products') senza una funzione apparente nelle piante; successivamente studi più accurati hanno evidenziato il loro ruolo fondamentale anche in moltissime fasi della vita vegetale. Mentre i metaboliti primari (proteine, acidi nucleici, polisaccaridi), infatti, assolvono le funzioni essenziali alla crescita e alla vita dell'organismo quali la nutrizione e i processi metabolici, il termine metabolita secondario è associato a quei composti che partecipano per lo più a meccanismi ecologici d'interazione con altri organismi e tutto l'ambiente circostante.

I metaboliti secondari sono caratterizzati da un'enorme variabilità strutturale, alcuni dotati di molti centri chirali e di diversi gruppi funzionali che potrebbero essere responsabili della specifica azione farmacologica, ove presente. I composti allelochimici prodotti dal metabolismo secondario delle piante possono essere inseriti, sulla base della struttura chimica, in quattro classi principali: terpenoidi, steroidi, flavonoidi, alcaloidi [12].

Questi possono essere rilasciati nell'ambiente esterno mediante: volatilizzazione, lisciviazione, decomposizione ed essudazione (figura I.1). La volatilizzazione consiste nella liberazione di sostanze volatili come l'etilene, monoterpeni e sesquiterpeni che possono essere assorbiti dalle piante vicine direttamente dall'atmosfera o dal suolo a cui arrivano grazie alla pioggia. La lisciviazione è il processo che porta alla perdita di sostanze dalla parte aerea della pianta per mezzo dell'idrosolubilazzazione operata dalla nebbia o dalla pioggia. Tra i prodotti liberati in questo modo si trovano amminoacidi, acidi fenolici, terpenoidi, alcaloidi, acidi grassi e zuccheri.

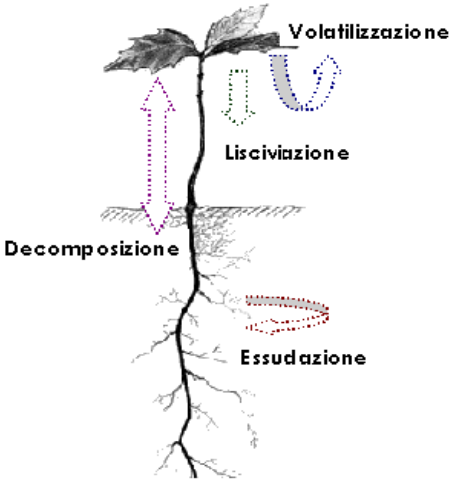


Figura I.1: Liberazione dei metaboliti secondari

La quantità e l'attività di queste sostanze dipende sia dalla specie vegetale produttrice (ad es. dall'età fisiologica, stato nutrizionale e caratteristiche delle foglie) sia da fattori ambientali abiotici quali luce, temperatura, intensità e durata delle precipitazioni. In particolare, è stato dimostrato che precipitazioni leggere e prolungate riescono ad eluire una quantità maggiore di metaboliti rispetto a piogge torrenziali. La decomposizione, insieme con la lisciviazione, risulta essere la principale fonte di allelochimici. Tali sostanze restano chiuse in compartimenti cellulari impermeabili, come vacuoli o inclusioni, e solo quando questi vengono demoliti esse si liberano e si convertono in possibili tossine [13]. Il processo dipende sia dalla natura dei residui vegetali che dalle caratteristiche biotiche ed abiotiche del suolo. L'essudazione avviene attraverso le radici e consiste nella liberazione di sostanze, come amminoacidi, carboidrati, nucleotidi, enzimi, vitamine e flavonoidi, da piante integre e sane.

La quantità di metaboliti liberati dipende dall'età della pianta, dalla temperatura ambientale, dalla disponibilità idrica e dalla presenza di intermedi metabolici nel substrato di coltivazione [14]. Gli agenti allelochimici liberati attraverso i quattro processi descritti sono potenzialmente in grado di svolgere la propria azione sugli altri organismi vegetali presenti nell'ambiente circostante e non sull'organismo produttore. Infatti, esso generalmente risulta immune alla loro azione tossica in quanto li conserva in forme inattive polimeriche (tannini, lignine) o glicosilate o in compartimenti, come vacuoli o zone morte della pianta, per cui non possono raggiungere la zona protoplasmatica cellulare [15].

Nonostante ciò, talvolta si osservano fenomeni di autotossicità causati dall'accumulo dell'allelochimico nell'organismo produttore. Un altro aspetto da tener presente è che gli allelochimici, una volta raggiunto l'ambiente esterno, possono andare incontro a modificazioni chimiche dovute ad agenti fisici o all'azione di microrganismi presenti nel suolo. Tali modificazioni influenzano l'attività del metabolita, ad esempio incrementandone o riducendone la citotossicità. Quindi, nel caso di sostanze con attività fitotossica il raggiungimento di concentrazioni tossiche nel terreno dipende dall'equilibrio che si instaura tra forma attiva e forma degradata. E' però da sottolineare che la decomposizione microbica non necessariamente sfocia in una diminuzione dell'attività allelopatica.

L´uso delle piante come terapia per le varie malattie è antichissimo, probabilmente risale alla preistoria, periodo in cui l'uomo cibandosi di bacche e radici spontanee, sperimentò casualmente i loro effetti curativi o al contrario i loro effetti tossici.

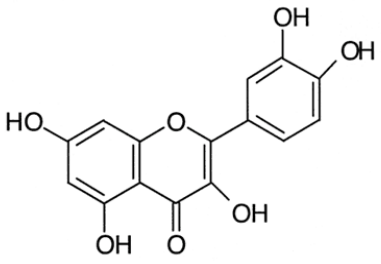
La ricerca e lo studio delle sostanze naturali, ed in particolare delle specie vegetali, risale a periodi molto antichi; esempi sono dati dalla "*Naturalis Historia"* di Plinio il Vecchio e dai papiri medici di Erbes Smith (1500 a.c.). Per secoli medici e guaritori hanno ricercato nelle piante, e in generale nella natura, i rimedi per curare le malattie. Testimonianze dell´uso di specie vegetali a scopi terapeutici, sono presenti in numerose parti del mondo; la prima classificazione scientifica di piante medicinali è stata fatta dal greco Ippocrate (460 a.c.), che ha descritto più di 200 specie vegetali; Dioscoride ne catalogò nel "*De Materia medica*" circa 600; Plinio il vecchio ne elencò mille; Galeno, medico e filosofo greco, ne descrisse un migliaio con le rispettive proprietà. Queste venivano usate per l'estrazione non solo di principi attivi singoli, ma anche di precursori per la sintesi di farmaci. Le piante officinali hanno rappresentato per molto tempo l'unico rimedio disponibile per curare i malanni dell'uomo e ancora oggi circa il 35% dei farmaci riportati nella farmacopea ufficiale sono degli "estratti di piante", oppure delle frazioni purificate e titolate. Sono infatti i principi attivi i componenti responsabili dell'azione farmacologica individuata in molte piante medicinali. Solo nel XIX secolo si concretizza l'idea di una disciplina a sé stante, che porta alla nascita dell' etnobotanica, scienza che si occupa dello studio delle piante in relazione ai popoli e della valutazione dei benefici derivanti dalle sostanze naturali presenti in esse.

Negli ultimi anni la ricerca farmacologica è sempre più rivolta allo studio di sostanze naturali estratte da piante, perché trovano utile applicazione in fitoterapia per la cura delle malattie umane, infatti la fitoterapia è quella branca della medicina che utilizza le piante a scopo curativo. La ricerca in farmacognosia coinvolge studi inerenti la biosintesi di composti biologicamente attivi, la selezione di piante capaci di produrre quantità significative e costanti di principi attivi e la semisintesi di prodotti naturali. Lo studio di una sostanza vegetale prevede diverse fasi, quali:

- osservazione sul campo degli usi medicinali delle piante;
- screening farmacologico degli estratti grezzi;
- frazionamento pilotato da saggi biologici;
- isolamento e identificazione strutturale dei principi attivi;
- valutazione della tossicità, a breve e lungo termine, degli estratti purificati;
- determinazione del meccanismo d'azione e dell'attività farmacologica.

Viene definita pianta medicinale ogni sostanza vegetale che contiene uno o più composti organici utilizzabili ai fini terapeutici o preventivi. Molti prodotti naturali sono in grado di prevenire malattie umane; gli antiossidanti presenti negli alimenti (tocoferoli, retinoli, acido ascorbico) e i flavonoidi sono utili nel prevenire l'ossidazione delle lipoproteine e nel neutralizzare i radicali liberi. Le vie biogenetiche più importanti attraverso le quali si ha la produzione di metaboliti secondari sono fondamentalmente quattro: la via dell'acetato, la via dell'acido shikimico, la via del mevalonato e quella che, partendo da amminoacidi precursori, conduce agli alcaloidi. Dalla via biogenetica dell'acido shikimico, via utilizzata esclusivamente da piante e microrganismi, si ottengono composti come: amminoacidi aromatici, acidi cinnammici, catecolamine, flavonoidi, che l'uomo può assumere esclusivamente dalla dieta. Un intermedio chiave di questa via biosintetica è l'acido shikimico ottenuto dall' accoppiamento del fosfo enolpiruvato PEP, che si origina dalla glicolisi, con il D-eritrosio fosfato, (proveniente dal ciclo del pentoso fosfato), per formare un sistema a sei atomi di carbonio. Un'altra classe di composti molto importante è quella dei flavoni. I flavoni appartengono alla classe dei flavonoidi, polifenoli di origine vegetale (presenti maggiormente nei cibi) derivanti dalla via biogenetica dei polichetidi e da quella dell'acido shikimico.

L' enzima calcone sintasi catalizza la condensazione del 4-idrossi-cinnammoilcoA (derivante dalla via dello shikimico) con tre unità di malonil coenzima A (derivanti dalla via dell' acetato) a calcone. In seguito l'enzima calcone isomerasi chiude l'anello del sistema non aromatico in una reazione ciclica intramolecolare che converte il calcone a flavanone.



Quercetina

La chimica delle sostanze naturali si inserisce come disciplina che funge da tramite tra la preparazione dell'estratto e l'individuazione dell'azione farmacologica, fornendo gli strumenti scientifici e le tecniche appropriate per caratterizzare i singoli componenti chimici, definendone la struttura dei singoli metaboliti. Lo studio delle sostanze naturali richiede una serie di passaggi obbligati:

- indagini sulla passata letteratura e osservazione sul campo degli usi delle piante;
- estrazione con solventi a polarità crescente; eventuale screening degli estratti grezzi;
- purificazione ed isolamento dei metaboliti secondari attraverso tecniche cromatografiche;
- identificazione strutturale dei metaboliti purificati attraverso tecniche spettroscopiche;
- valutazione delle attività dei composti puri attraverso specifici saggi di attività antinfiammatoria, antimicrobica, antiossidante; e se possibile la semisintesi di prodotti naturali.

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 cosmetico in profumi e oli essenziali;
- in ambito alimentare come coloranti e conservanti;

- in ambito zootecnico e agrario come potenziali erbicidi e insetticidi;
- in ambito farmacologico come antinfiammatori, potenziali antitumorali etc..

In ambito farmaceutico si utilizzano alcuni derivati della cumarina quali: umbelliferone, dicumarolo, psoralene. Il dicumarolo, presente nelle foglie e nelle influorescenze delle *Fabaceae*, è un anticoagulante utilizzato nelle profilassi e nel trattamento delle trombosi venose e degli edemi polmonari. Gli psoraleni sono utilizzati nella fotochemioterapia per il trattamento delle psoriasi, affezioni cutanee e micosi della pelle. I lignani, presenti nei tessuti legnosi delle piante, possiedono proprietà antibatteriche e antifungine.

L'etoposide, un derivato emisintetico della podofillotosina, lignano presente in alcuni tipi di piante, è usato in associazione a chemioterapici per il trattamento di tumori ovarici e polmonari. I derivati dei flavoni, quali flavokaina estratti dalla pianta *kava-kava*, mostrano effetti anestetici locali comparabili a quelli della benzocaina e cocaina, ma al contrario degli oppiacei, non provocano dipendenza fisica o psichica. Alcuni flavonoidi, estratti da piante come la *Passiflora*, presentano proprietà sedative che li rendono utilizzabili nei trattamenti dell'insonnia e dell'ansia. Oltre ai derivati dei flavonoidi, tra le maggiori classi di composti presenti all' interno del regno vegetale, vi sono gli alcaloidi: sostanze azotate che si formano a partire dagli amminoacidi e che mostrano una pronunciata attività farmacologia e/o tossicologica.

Molti alcaloidi sono utilizzati clinicamente come tali: la morfina come analgesico; la stricnina come stimolante del sistema nervoso centrale, l'atropina come midiatrico o per la semisintesi di nuovi farmaci (omatropina) a potenziali attività antitumorale. I derivati esterei delle cefalotossine, presentano spiccata attività citotossica nelle leucemie acuta e cronica, dovuta all'inibizione della sintesi proteica.

L'uso di questi composti naturali è però limitato alla loro tossicità, mentre più promettenti sono i derivati semisintetici, alcuni dei quali risultano particolarmente efficaci per il trattamento di tumori renali e della mammella. Spesso di alcune piante medicinali o che trovano impiego in ambito fitoterapico è maggiormente studiato l'olio essenziale, rispetto alla composizione chimica degli estratti della pianta fresca; l'olio essenziale infatti può possedere numerose proprietà terapeutiche: antiinfiammatoria, antifungina, antimicrobicha, antiipoglicemica etc..

Un'indagine di ricerca rivolta allo studio delle sostanze naturali coinvolge dunque numerosi ambiti disciplinari e richiede l'utilizzo delle moderne tecniche cromatografiche (HPLC, cromatografie su colonna, TLC, etc..) per la purificazione e l'isolamento dei metaboliti presenti in maggiore quantità negli estratti grezzi delle piante; delle tecniche spettroscopiche (^{1}H-NMR,^{13}C-NMR, spettroscopia IR e di massa etc..) per la caratterizzazione strutturale dei composti puri e l'utilizzo di tecniche quali il dicroismo circolare per la definizione della configurazione di centri chirali e per l'individuazione di un eventuale farmacoforo, qualora fosse presente l'attività biologica.

METODICHE DI ISOLAMENTO

L'isolamento e la purificazione dei metaboliti secondari rappresentano una fase cruciale del progetto; è importante fare attenzione nell'utilizzo di solventi o ambienti acidi/basici per preservare il composto naturale e poterlo caratterizzare senza che subisca alcuna degradazione. Gli estratti hanno composizioni diverse a seconda del tipo di solvente impiegato. Nel caso degli estratti, oltre il tipo di solvente impiegato, possono determinare diversità di composizione il volume del solvente rispetto alla quantità della droga da estrarre, lo stato fisico della droga, il livello di frantumazione, il tempo di contatto tra la droga e il solvente, la temperatura di estrazione ed eventuali altri fattori fisici di processo (per esempio l'applicazione di una pressione).

La farmacopea ufficiale (F.U.) definisce gli estratti come: "Preparazioni concentrate liquide o solide di consistenza intermedia, ricavate da materie prime vegetali". I metodi ufficiali della F.U. prevedono che gli estratti siano ottenuti utilizzando opportuni solventi attraverso due principali metodiche: la percolazione e la macerazione, in seguito alle quali si procede alla concentrazione dei liquidi fino alla consistenza desiderata. Lo scopo di tutti i processi tecnologici estrattivi è quello di ottenere in forma più pura e talvolta più concentrata possibile, i principi attivi delle piante, in modo da realizzare un prodotto con una maggiore biodisponibilità. Prima di operare l'estrazione è preferibile ridurre la pianta ad un opportuno grado di finezza in modo da facilitare la penetrazione del solvente nelle cellule vegetali, la conseguente solubilizzazione dei metaboliti secondari e la loro diffusione dalle cellule stesse.

Nella procedura d'estrazione è necessario, in prima istanza, frazionare l'estratto grezzo con solventi a diversa polarità per recuperare in "toto" i metaboliti con caratteristiche chimiche diverse. Una delle tecniche di estrazione maggiormente utilizzate è la metodica di Kupchan [16], sintetizzata nello schema sottostante di figura I.2:

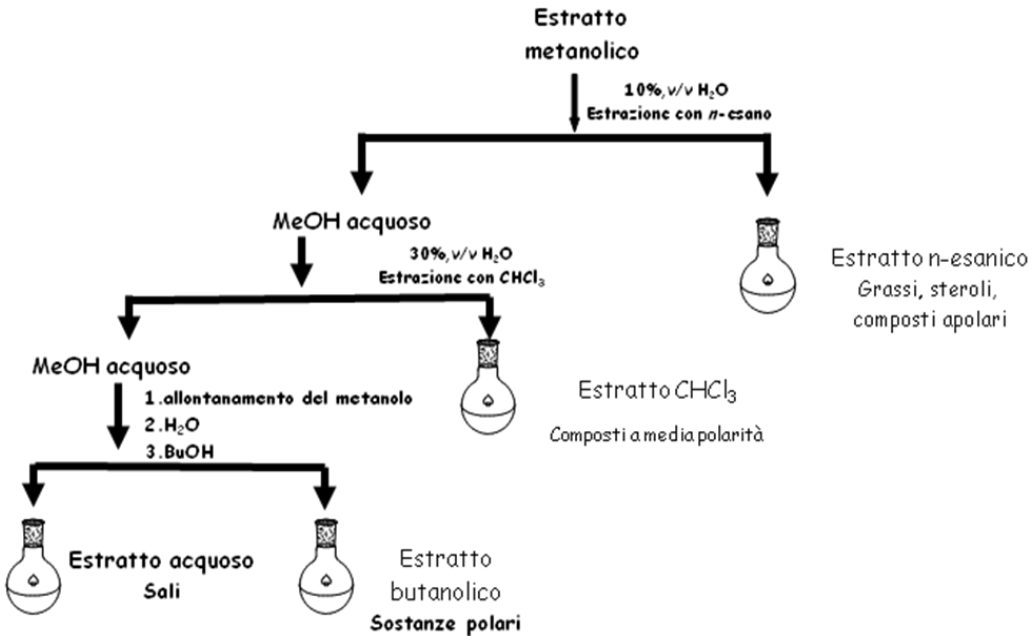


Figura I.2: Metodica di Kupchan

Il frazionamento degli estratti avviene poi attraverso l'utilizzo di tecniche quali: DCCC (cromatografia in controcorrente a goccia), cromatografia ad alte prestazioni (HPLC) a fase diretta e inversa, cromatografia su strato sottile (TLC), cromatografia su colonna (CC).

Tra le varie tecniche la TLC fornisce soltanto un'analisi di tipo qualitativa e quindi consente di visualizzare la composizione di un estratto o di una frazione dei composti analizzati: se l' Rf di una sostanza incognita coincide con quello di una nota, le due molecole sono identiche. La rivelazione degli analiti avviene sia all' U.V. che spruzzando le lastre con reagenti specifici. La ninidrina consente la visualizzazione di composti amminoacidici; mentre nebulizzando le lastre con una soluzione al 5% di H_2SO_4 in etanolo e con una soluzione al 5% di vanillina in etanolo, la comparsa di macchie colorate indica la presenza di composti che carbonizzano. La DCCC, droplet countercurrent chromatography, è una tecnica cromatotografica di ripartizione liquido-liquido, introdotta per la prima volta nel 1970 (Tanimura, Pisano, Ito 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.

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. Le colonne per HPLC hanno lunghezza dai 10 ai 30 cm, diametro interno 4-10 mm, costituite da tubi di acciaio inossidabile, impaccate in genere con particelle di gel di silice con diametro dai 3 ai 5 micron e possono contenere fino a 100000 piatti teorici. Nell'HPLC a fase diretta la fase stazionaria è polare, mentre la fase mobile è un sovente non polare come esano, da esse il primo composto eluito è quello meno polare. Al contrario in quelle a fase inversa, che è tra le tecniche più utilizzate, la fase stazionaria non polare è costituita da polimeri ottadecil silossanici mentre la fase mobile è generalmente costituita da solventi polari come l'acqua, acetonitrile, metanolo e da esse il composto eluito per primo è quello più polare. I vantaggi di questa tecnica sono: dimensioni ridotte della colonna che evitano problemi di diffusione longitudinale e slargamento della banda nella fase mobile, velocità di eluizione costante e regolabile, velocità di esecuzione ridotta, utilizzo di piccole quantità per l' analisi (si analizzano soluzioni dell' ordine di nano-micromolare), il tutto a favore di una maggiore accuratezza e precisione.

Alla fine della colonna è applicato un rivelatore, in genere l'U.V. o l'indice di rifrazione, che consente l'analisi in continuo dell'eluato e la quantificazione e l'identificazione delle sostanze iniettate. Dal rivelatore si ottiene il cromatogramma che rappresenta l'eluizione degli analiti in funzione del tempo o del volume di eluizione; mentre la loro quantificazione avviene sulla base delle aree dei picchi. Mentre l'HPLC è maggiormente indicata per l'analisi di sostanze non volatili, per l'analisi di campioni più volatili è utilizzata la gas cromatografia. Nella gas cromatografia, il campione vaporizzato in testa alla colonna cromatografica, è trasportato lungo essa attraverso il flusso di una fase mobile costituita da un gas inerte, quale: elio o azoto o argon. Spesso la gas cromatografia è accoppiata ad altre metodiche, quali la spettometria di massa che consentono di ottenere una tecnica più potente per identificare i componenti di una miscela complessa.

Infatti l'analisi dei componenti degli oli essenziali viene realizzata esclusivamente attraverso la gas-massa, GC-MS, in cui l'analisi gas-cromatografica è integrata dallo spettro di massa per ciascun picco eluito. Sia la gas-cromatografia che l'HPLC presentano alta selettività, facile adattabilità, rapidità e consentono buone analisi qualitative e quantitative.

Nelle cromatografie su colonna CC, invece, come in tutti i tipi di cromatografie, un composto si distribuisce tra due fasi (una stazionaria e una mobile) secondo un coefficiente di ripartizione detto Kd. La fase stazionaria è attaccata a una matrice adatta (in genere un supporto inerte e insolubile) ed è impaccata in una colonna di vetro, mentre la fase mobile fluisce 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 rappoto 1:20 rispetto all'estratto da cromatografare e impaccate con opportuno solvente applicando una pressione dall'alto. Il campione da purificare può essere reso preliminarmente compatibile con la fase stazionaria aggiungendo agli estratti silice e portando a secco con rotavapor. I composti sono separati dal continuo passaggio della fase mobile attraverso una eluizione a gradiente, realizzata aumentando progressivamente la polarità del solvente.

La separazione degli analiti è osservata dalla formazione di bande colorate nella colonna, monitorando l'eluato all'U.V. oppure con TLC.

Si può dunque osservare che la fase del'isolamento è una fase complessa e delicata; le maggiori difficoltà sono dovute alla purificazione dei composti e alle piccole quantità che se ne riescono a ottenere; sono infatti necessarie grandi quantità di piante per ottenere piccole quantità di prodotti puri, alcuni dei quali potrebbero però presentare importanti proprietà farmacologiche.

TECNICHE DI DETERMINAZIONE STRUTTURALE

L' identificazione strutturale dei composti è stata realizzata impiegando tecniche spettroscopiche di risonanza magnetica nucleare, spettroscopia IR e spettrometria di massa.

La Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare è basata sulla perturbazione del livello di energia del nucleo della materia sotto l'effetto di un campo magnetico esterno. In dettaglio, l'energia è assorbita dalla sostanza quando è soggetta ad una azione combinata di due campi magnetici, uno forte e costante e l'altro debole e variabile, in particolare di una radiofrequenza. Poichè 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 un valido mezzo per lo studio delle interazioni tra nucleo e substrato. L' NMR è dunque una tecnica nella quale un campione viene immerso in un campo magnetico e irradiato con onde radio, che determinano transizioni solo di nuclei come quello del protone ^{1}H o del carbonio ^{13}C in cui il numero di spin I vale ½ . 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 i "chemical shifts" dei vari nuclei, con quelli del composto di riferimento tetrametil silano, TMS, che ha tutti gli idrogeni chimicamente equivalenti ed emette un unico tipo di segnale che cade a campi molto alti dello spettro.

La Spettroscopia NMR offre innumerevoli possibilità di utilizzo ed è considerata uno dei più importanti strumenti fisici a disposizione del chimico organico; nella sua evoluzione si è anche rivelata un valido aiuto nei campi della biologia, biochimica e farmacologia soprattutto per l'analisi strutturale di importanti molecole. La possibilità di osservare, oltre ad ^{1}H, altri nuclei come ^{13}C, ^{15}N e ^{31}P, fa della spettroscopia NMR, la tecnica più potente e versatile a disposizione dei chimici e dei biochimici per ottenere informazioni sulla struttura dei composti, anche con elevato peso molecolare, e per comprendere in profondità i processi biologici ed i meccanismi di reazione.

Strumenti tecnologicamente molto sofisticati ed ad alto campo, l'impiego di sequenze bi- e tridimensionali, consentono lo studio di biomolecole strutturalmente molto complesse come proteine e polisaccaridi.

La spettroscopia NMR permette di distinguere i diversi nuclei atomici sulla base delle loro proprietà magnetiche mediate dall'intorno chimico; permette di misurare distanze inter-protoniche e di misurare gli angoli diedri dei legami covalenti. Lo scopo dell' ^{1}H e ^{13}C-NMR, è sostanzialmente quello di ricavare informazioni sul numero/tipo di idrogeni e carboni presenti all'interno di una molecola. In uno spettro ^{1}H-NMR, i valori dei chemical shifts entro i quali avviene l'assorbimento degli idrogeni, va da 0 a 20 ppm. Lo schermaggio è funzione del grado di densità elettronica presente sull'atono di carbonio che porta idrogeni: se la densità elettronica sul carbonio è alta (il carbonio è molto elettronegativo), l'assorbimento del protone avverrà a campi alti; nel caso in cui la densità elettronica sul carbonio è bassa, l'assorbimento avverrà a campi bassi dello spettro. Segnali che cadono a campi molto bassi dello spettro, tra 10 e 12 ppm, rivelano protoni aldeidici o di acidi carbossilici; tra i 7 e 9 ppm protoni aromatici, tra i 6 e 7 ppm composti carbonilici α-β insaturi; intorno a 3 ppm rivelano la presenza di protoni metossilici, e segnali a campi molto alti, tra 1-2 ppm, protoni alchilici.

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

Le informazioni utili alla caratterizzazione strutturale delle molecole vengono ottenute attraverso spettri di risonanza magnetica nucleare monodimensionali quali: ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, NOE ("Nuclear Overhauser Enhancement") e spettri bidimensionali, quali: COSY, (COrrelation SpectroscopY) HMBC, (Heteronuclear Multi Bond Correlation), HSQC, (Heteronuclear Single Quantum Correlation), ROESY, (Rotating-frame Overhauser Effect SpettroscopY), NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpettroscopY). La maggior parte degli spettri utili per la determinazione strutturale dei composti isolati ricade nella categoria dell'NMR bidimensionale, in grado di far risalire allo scheletro carbonioso della molecola organica. Gli esperimenti bidimensionali si distinguono in omodimensionali: COSY, TOCSY e NOESY (correlazioni tra gli stessi nuclei) ed eteronucleari: HMBC ed HSQC (correlazioni tra nuclei diversi).

Lo spettro ^{1}H NMR è un grafico dell'intensità contro la frequenza; si tratta di un grafico a due dimensioni ma è chiamato esperimento monodimensionale 1-D, in quanto esiste un'unica dimensione (asse delle frequenze). 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. Le due dimensioni a cui si fa riferimento in un esperimento 2D-NMR sono entrambe 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 delle frequenze perpendicolari. Nell'esperimento a singolo impulso vi è un unico fattore tempo che influenza lo spettro, e cioè il tempo di acquisizione t_2. In una sequenza multi-impulso invece, il periodo di equilibrazione è seguito da due bimpulsi (tra i quali è interposto un intervallo di tempo) l'ultimo dei quali è l'impulso di acquisizione a $\pi/2$. Viene pertanto inserito un periodo di "evoluzione" tra gli impulsi. Le informazioni ottenute mediante la spettroscopia NMR, insieme a studi di modellistica molecolare, consentono sia l'analisi conformazionale dettagliata di tali molecole in soluzione, sia la determinazione delle loro conformazioni bioattive.

COSY SPECTRUM (COrrelation SpectroscopY)

Una delle più importanti tecniche NMR bidimensionali è l'esperimento ^{1}H-^{1}H COSY [17], esperimento che consente di osservare accoppiamenti scalari tra i protoni. Esso è un esperimento di correlazione omonucleare di chemical shifts attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin a due ($^2J_{H\text{-}H}$) o tre legami ($^3J_{H\text{-}H}$). Nello spettro COSY appaiono due tipi principali di segnali: 1) i picchi diagonali che rappresentano lo spettro originale, così come ottenuto in un esperimento monodimensionale; 2) i picchi fuori diagonale chiamati "picchi di correlazione", che dimostrano la presenza di accoppiamenti scalari (attraverso i legami) tra i nuclei. I segnali accoppiati possono essere individuati tracciando linee orizzontali e verticali a partire 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 (es. ossigeno, zolfo etc..) ricavando in tal modo strutture parziali della molecola in esame.

NMR BIDIMENSIONALE: HSQC - HMQC - HMBC

Gli esperimenti HSQC [18] (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) ed HMQC [19] (*Heteronuclear Multi Quantum Correlation*) correlano i nuclei ^{13}C con i protoni direttamente legati ad essi, cioè accoppiati. Lo spettro HSQC rileva i carboni direttamente legati agli idrogeni, mentre l'HMQC consente di distinguere i CH dai CH_2 (i carboni pari da quelli dispari).

Si tratta di un accoppiamento tramite un solo legame ($^1J_{CH}$). In questo tipo di esperimenti, l'asse F_1, che deriva dal nostro intervallo di tempo incrementale t_1, è 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 esperimenti di accoppiamento eteronucleari non esiste una diagonale, né simmetria. L'inconveniente dell'HSQC e dell'HMQC è che, a causa della bassa abbondanza isotopica del ^{13}C (1,1 %), solo la piccola percentuale di protoni legati direttamente ad un carbonio ^{13}C fornisce informazioni utili, mentre vanno eliminati tutti i segnali relativi ai protoni legati a carboni ^{12}C. Tuttavia, poiché quest'ultimo rappresenta la gran parte del segnale totale, la sua completa eliminazione è piuttosto difficile, ed anche una eliminazione incompleta può lasciare un segnale residuo sufficiente a coprire tutti i picchi di correlazione.

L'esperimento HMBC [20] (*Heteronuclear Multi Bond Correlation*) invece si basa su accoppiamenti ^1H-^{13}C attraverso due o tre legami (*long range*) offrendo uno spettro estremamente diagnostico che consente di connettere tra di loro le subunità della struttura molecolare individuate attraverso l'analisi degli altri spettri bidimensionali. In sintesi è possibile ottenere indirettamente delle correlazioni carbonio-carbonio e, per di più, tale esperimento consente di correlare carboni quaternari (non visibili negli esperimenti HSQC e HMQC) con protoni ad essi vicini.

TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA STEREOCHIMICA

La determinazione della configurazione relativa ed assoluta di una sostanza naturale rappresenta una tappa chiave nel processo di caratterizzazione strutturale della stessa. Solo conoscendo la stereochimica di una molecola è possibile risalire al suo assetto tridimensionale ed avviare studi di tipo biologico, come ad esempio studi di interazione farmaco-recettore, o di tipo chimico, come gli studi relativi alla sintesi totale di molecole complesse con una buona attività farmacologica. La maggior parte dei composti di origine naturale presenta uno o più centri stereogenici. Di solito, nella determinazione della stereochimica, si procede prima con lo stabilire la configurazione relativa dei centri chirali. Se, applicando specifiche metodologie, si riesce a stabilire una stereochimica relativa unica, mettendo in relazione tutti i centri chirali della molecola, è sufficiente la determinazione di un solo centro stereogenico per ottenere la configurazione assoluta di tutta la struttura. Se, invece, sono state determinate *n* stereochimiche relative, non correlabili tra loro, per ciascuna substruttura bisognerà assegnare indipendentemente la configurazione assoluta.

Attraverso la spettroscopia NMR è possibile ottenere importanti informazioni sull'assetto tridimensionale delle molecole, soprattutto in sistemi rigidi. I parametri più significativi nella determinazione della configurazione relativa attraverso l'NMR sono: i valori dei chemical shifts (δ), le costanti di accoppiamento (*J*) e gli effetti NOE. I chemical shifts 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 ($J_{H\text{-}H}$). Infatti la legge di Karplus [21]:

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

evidenzia che il valore di tali costanti, sia omonucleari, $^{3}J_{H\text{-}H}$, che eteronucleari, $^{3}J_{C\text{-}H}$, dipende dall'angolo diedro θ tra gli atomi accoppiati. I valori di $^{3}J_{H\text{-}H}$ sono molto piccoli, circa 0-1,5 Hz, quando θ è circa 90°, mentre essi sono generalmente piuttosto grandi quando θ è intorno a 0° o 180°. Di conseguenza è possibile distinguere facilmente una relazione assiale-assiale tra due protoni di un ciclo a sei termini, $^{3}J_{a\text{-}a} \sim 7\text{-}9$ Hz, rispetto a quella assiale-equatoriale e a quella equatoriale-equatoriale, $^{3}J_{a\text{-}e} \sim 3$, $J_{e\text{-}e} \sim 2{,}5$ Hz.

Inoltre è possibile discriminare facilmente la relazione *cis-trans* tra i protoni di un doppio legame, $^3J_{cis}$ ~ 6-12 Hz, $^3J_{trans}$ ~ 14-20 Hz. Altre importanti informazioni riguardanti la 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). Mentre si registra lo spettro si può irradiare un segnale con una radiazione corrispondente alla sua frequenza di risonanza. Se l'intensità della radiazione è sufficientemente alta, il segnale si "satura", scomparendo dallo spettro.

La saturazione del segnale ha due conseguenze notevoli: a) gli accoppiamenti degli altri protoni presenti sulla molecola con il protone irradiato scompaiono (tecnica di disaccoppiamento); questa tecnica permette di semplificare i multipletti complessi determinati da più accoppiamenti, b) la velocità di rilassamento di protoni spazialmente vicini a quello irradiato aumenta (l'aumento diminuisce con la distanza alla sesta potenza). Questo effetto favorisce il ripristino della popolazione di Boltzmann, cioè favorisce il ritorno dei nuclei allo stato fondamentale, e si traduce in un aumento dell'intensità del segnale [22] (effetto n.O.e.: "Nuclear Overhauser Enhancement").

L'effetto NOE può essere utilizzato per stabilire una relazione spaziale tra i sostituenti di una molecola, a patto che la molecola abbia una certa rigidità. Le intensità delle interazioni dipolari NOE sono fortemente dipendenti dalla dimensione della molecola, infatti al crescere delle dimensioni della molecola gli accoppiamenti NOE sono prossimi allo zero, e quindi difficilmente evidenziabili. Per superare questo limite si può utilizzare l'esperimento ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpettroscopY) un esperimento bidimensionale di correlazione omonucleare, basato sul fenomeno ROE (Rotating-frame Overhauser Effect). Il ROE è un fenomeno simile al NOE, che però può essere messo in evidenza solo con un esperimento 2D e, al contrario del NOE, è sempre positivo.

TECNICHE COMPUTAZIONALI

I dati NMR permettono spesso la determinazione della stereochimica relativa di una molecola organica, sia valutando i valori delle costanti di accoppiamento, sia attraverso esperimenti NOESY e ROESY, che forniscono dati importanti sulle distanze tra i diversi protoni della molecola.

Tuttavia può accadere che i risultati ottenuti non permettano una interpretazione semplice ed univoca, rendendo quindi impossibile la determinazione configurazionale, senza sfruttare prima i metodi basati sullo studio conformazionale. I metodi basati su effetti NOE e sui valori delle costanti di accoppiamento sono infatti limitati a sistemi rigidi, ciclici e policiclici, in cui è ridotta la possibilità di movimenti conformazionali. Nel caso di molecole che possiedono strutture lineari o macrocicliche flessibili tali metodi non forniscono un'univoca interpretazione. Il crescente miglioramento dei computer e la messa a punto di metodi e algoritmi sempre più avanzati ed efficienti, ha portato alla nascita della chimica computazionale, cioè di una disciplina che, basandosi su principi quanto-meccanici, permette la rappresentazione realistica della struttura tridimensionale di una molecola.

Per determinare la conformazione di una molecola, mediante l'uso di un computer e secondo un processo chiamato "minimizzazione", si spostano gli atomi dalle loro posizioni valutando le conseguenti variazioni dell'energia totale del sistema. La geometria che corrisponde alla minima energia è quella più favorita e, quindi, la più rappresentativa della struttura in soluzione. È così possibile confrontare le distanze tra i protoni in diversi stereoisomeri e verificare quali di questi corrisponda ai dati spettroscopici precedentemente ottenuti.

Le informazioni sperimentali sulla conformazione della molecola, principalmente derivanti da esperimenti NMR (effetti NOE), possono essere incluse nel campo di forza per "aiutarlo" a determinare la reale conformazione a bassa energia. È anche possibile studiare il movimento dei nuclei, cioè studiare non solo le conformazioni staticamente, ma anche il movimento che porta al passaggio da una conformazione all'altra, le vibrazioni molecolari; questo tipo di processo è chiamato *dinamica molecolare*, e può essere utile per effettuare ricerche conformazionali, per studiare molecole flessibili, o per produrre strutture tridimensionali in accordo con i dati dedotti da studi NMR. La dinamica molecolare simula il comportamento reale della molecola: essa tende a sistemarsi in conformazioni a bassa energia, ma avendo un certo moto termico, è in grado di superare la barriera di energia che separa una conformazione dall'altra. Tuttavia ci sono dei limiti dato che i computer attuali permettono di effettuare simulazioni lunghe al più qualche nanosecondo, mentre molti cambiamenti conformazionali possono avvenire molto più raramente.

METODO DI MOSHER

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

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 ($\Delta = \Delta S - \Delta R$) 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 nella maggior parte dei casi, o, un alcol primario con un centro stereogenico in α, un' ammina o un acido carbossilico. L'agente derivatizzante chirale deve contenere un gruppo funzionale in grado di reagire quantitativamente con il gruppo funzionale del composto da analizzare; deve possedere un sostituente a forte carattere anisotropico e dovrebbe contenere un gruppo polare che possa fissare una conformazione preferenziale. L'agente derivatizzante chirale di gran lunga più utilizzato è il reattivo di Mosher (cloruro dell'acido 2-metossi-2-fenil-2-trifluorometilacetico o MTPA) (Figura I.3).

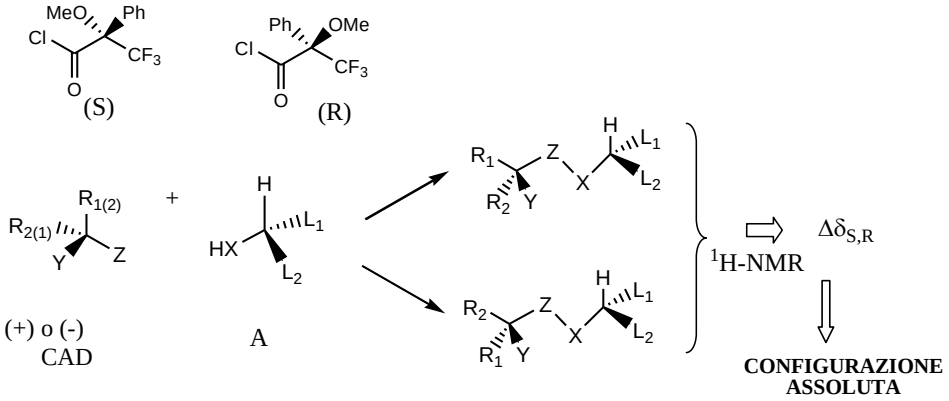


Figura I.3: Metodo generale di determinazione della configurazione assoluta attraverso l'NMR

Sulla base delle osservazioni sperimentali accumulate su una serie di alcoli secondari a configurazione nota, Mosher [23] osservò che era presente un andamento sistematico dei valori dei chemical shifts protonici dei corrispondenti esteri derivatizzati con il reattivo di Mosher. I dati potevano essere razionalizzati ammettendo l'esistenza in soluzione di una conformazione preferenziale, in cui il protone carbinolico, il carbonile estereo ed il gruppo trifluorometilico si trovano sullo stesso piano dell'MTPA. Se l'MTPA estere si trova nella conformazione ipotizzata, Mosher osservò che i valori dei protoni H_A vicino al centro carbinolico chirale, nell'(S)-MTPA devono essere più alti dei corrispondenti valori osservati per l'(R)-MTPA.

Una revisione del metodo di Mosher da parte di Kakisawa e Kashman, [24] indicato come metodo di Mosher modificato, è quella che viene utilizzata attualmente per la determinazione della configurazione assoluta di alcol secondari chirali. I principi guida del metodo di Mosher modificato sono gli stessi proposti originariamente da Mosher, solo che, grazie alle moderne tecnologie, si cerca di assegnare il maggior numero possibile di risonanze protoniche dei gruppi adiacenti al centro carbinolico. Una volta assegnate le risonanze, per ciascuno dei due esteri diastereoisomerici, si calcolano i valori di Δ, per convenzione riportati come ΔS-ΔR. Se l'estere assume la conformazione preferenziale, tutti i protoni localizzati alla sinistra del piano dell'MTPA avranno valori di $\Delta < 0$, mentre quelli a destra avranno valori di $\Delta > 0$. Questo metodo presenta alcuni svantaggi: alcuni alcoli stericamente impediti non si esterificano, in alcuni casi l'estere non assume la conformazione ideale prevista dal modello A o non si verifica un andamento sistematico dei valori di Δ.

SPETTROSCOPIA IR

Oltre all'NMR numerose informazioni sono ottenute grazie alla spettroscopia IR. Un composto irradiato con radiazione infrarossa assorbe energia causando moti vibrazionali di streching e di bending, che vengono registrati sotto forma di bande rotazionali. Sono attive all'IR soltanto molecole che hanno momento dipolare diverso da zero. Lo streching è un movimento ritmico lungo l'asse di rotazione che causa l' aumento o la diminuzione della distanza interatomica; il bending invece determina variazioni dell'angolo di legame. La presenza nello spettro IR di una banda larga intorno a 3500 cm^{-1} indica la presenza di alcoli o fenoli; bande nette intorno a 1700 cm^{-1} individuano aldeidi, chetoni o acidi carbossilici; tripli legami vibrano a frequenze intorno a 2100 cm^{-1}, mentre i doppi a 1600 cm^{-1}.

DICROISMO CIRCOLARE

La luce è una radiazione elettromagnetica a cui sono associati un vettore campo elettrico e un vettore campo magnetico. In un fascio di luce ordinaria il vettore campo elettrico oscilla in tutte le direzioni perpendicolari alla direzione di propagazione; tale luce è detta isotropa. Di contro, la luce linearmente polarizzata è caratterizzata da un vettore campo elettrico che oscilla in un'unica direzione e può essere considerata come derivante dalla combinazione di due fasci di luce circolarmente polarizzata destra e sinistra. La luce linearmente polarizzata rappresenta quindi un mezzo anisotropico; le due componenti circolarmente polarizzata destra e sinistra interagiscono in maniera differente con un composto chirale.

Il dicroismo circolare (CD) deriva da un non uguale coefficiente di estinzione dei due fasci di luce circolarmente polarizzata destra e sinistra da parte di un mezzo chirale. Tale fenomeno è osservato in una regione dello spettro UV o visibile in cui si osserva anche l'assorbimento di luce isotropica. Una transizione elettronica, associata ad un cromoforo con proprietà chirottiche in una molecola chirale, causa un differente assorbimento dei due fasci di luce circolarmente polarizzati sinistro e destro. Ne deriva che i due fasci di luce, dopo l'interazione con il composto chirale, risultano di intensità diversa. La luce linearmente polarizzata è quindi convertita in luce ellitticamente polarizzata in cui il vettore campo elettrico associato traccia un percorso ellittico.

Nell'analisi di uno spettro CD si tiene conto delle regole di ellitticità che si applicano ai cromofori chirali la cui disposizione spaziale è di tipo elicoidale. La regola generale come si può vedere in Figura I.4 è che, in tali sistemi, ad una elliticità destrorsa (a) corrisponde un CD positivo, mentre ad una ellitticità sinistrorsa (b) corrisponde un CD negativo.

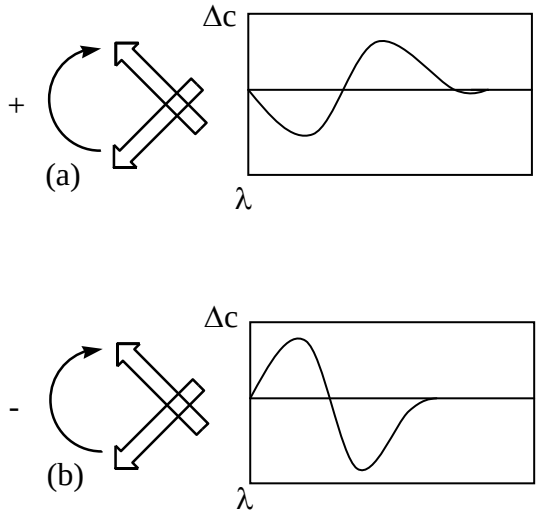


Figura I.4

Il metodo dell' "exciton chirality" si basa sul principio che quando due cromofori sono spazialmente vicini e disposti in modo tale da avere una disposizione chirale, l'interazione tra i due singoli cromofori determina uno split dello stato eccitato in due stati energetici non degeneri.

L'eccitamento a due livelli energetici non degeneri genera due curve CD di segno opposto: la combinazione di tali curve porta a una curva CD con due effetti Cotton di segno opposto separati da un $\Delta\lambda$. Il segno dell'effetto Cotton a λ più elevata designa il tipo di chiralità e corrisponde alla chiralità ricavabile dalle regole di ellitticità prima enunciate.

SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa e' una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica (*m/z*). A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi) e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi), vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector. L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*. Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale. Si può così individuare la formula molecolare di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

Il FAB (*Fast Atomic Bombardament*) e l'ESI (*ElectroSpray Ionization*) sono tra le tecniche di spettrometria di massa più utilizzate. Le molecole polari con pesi molecolari fino a 10000 Da possono essere analizzate mediante la tecnica FAB.

La frammentazione è provocata mediante "bombardamento con atomi veloci": il fascio che bombarda è costituito da atomi di xenon ad elevata energia traslazionale. Questo fascio è prodotto da una prima ionizzazione di atomi di xenon mediante elettroni, a dare radicali cationi di xenon. I radicali cationi vengono accelerati a 6-10 keV, generando radicali cationi ad alta energia traslazionale che attraversano lo xenon.

Durante questo passaggio lo xenon carico ad alta energia acquista elettroni dagli atomi di xenon trasformandosi in xenon neutro ad alta energia e i cationi radicali di xenon vengono rimossi da un campo elettrico.

Il composto in esame viene disciolto in un solvente viscoso altobollente e viene ionizzato dal fascio di atomi di xenon ad alta energia. Con questa tecnica di solito lo ione molecolare non viene osservato, ma gli addotti come $[M + H]^+$ sono pronunciati. Altri ioni addotti possono formarsi da impurezze saline, o per aggiunta di sali come NaCl o KCl, che producono i picchi $[M + Na]^+$ e $[M + K]^+$.

La ionizzazione elettrospray (ESI) prevede l'applicazione di una tensione ionizzante lungo l'ago nebulizzatore. Si ha la formazione di una nebulizzazione molto fine, da cui il solvente può essere facilmente rimosso. A questo punto le particelle vengono ionizzate da una scarica a corona a pressione atmosferica e trascinate da un piccolo potenziale elettrico attraverso un minuto orifizio verso il magnete analizzatore. Questa tecnica è ampiamente utilizzata per biomolecole idrosolubili come peptidi, proteine e carboidrati, ma attualmente il suo uso sta diventando sempre più universale. Il risultato è uno spettro i cui picchi maggiori sono dovuti allo ione molecolare recante diverse cariche. La ESI è una delle molteplici varianti dell' *atmospheric pressure ionization* (API) applicata tra l'uscita di una unità di HPLC e l'ingresso di uno spettrometro di massa. Nella spettrometria di massa a impatto elettronico (EI/MS) lo spettro viene ottenuto bombardando le molecole in fase vapore con un fascio elettronico di energia opportuna, che causa la rimozione di un singolo elettrone, portando alla formazione di un radicale catione. Molti di essi hanno vita breve (10^{-10}; 10^{-3} s), quelli che riescono a rimanere integri abbastanza a lungo da raggiungere il rivelatore, forniscono il picco dello ione molecolare, che rappresenta il peso molecolare del composto analizzato. Molto intensi sono i picchi di sostanze aromatiche, di chetoni ciclici e di composti tiolici; meno evidenti sono quelli di idrocarburi saturi, eteri alifatici e alcoli.

BIBLIOGRAFIA

[1] *Lawrens, G.; Michell, J. A.; Mutchmor, W. D.* (1991). Zoologia.

[2] *Theophrastus* (ca 300 B. C.). "Enquiry into plants and Minor Odours and Weather Signs", 2 vo., Transl. to Englis by Hort, A., W. Heinemann: London, 1916.

[3] *Plinio il Vecchio* (23-74 D.C.), Naturalis Historia, 10 vol.

[4] *Bode, H. R.* (1958). "Allelopathy in some Juglandaceae". Planta, 51, 440-80.

[5] *Del Morl R.; Muller C. H.* (1970). "Allelophatic effect of Eucalyptus camaldulensis". Am. Midl. Nat., 83(1), 254-282.

[6] *Molish, H.* (1937). "Deir Einflus einer pflanze and die andere Allelopathie, Fisher, Jena".

[7] *Rice, E. L*. (1984). Allelopathy, Accademic Press-Florida.

[7] *Inderjit, Keating, K., Irwin*. (1999). "Allelopathy: principles, procedures, processes, and promises for biological control". Advances in Agronomy, 67, 141-231.

[8] *Harborne J. B.* (1993). "Introduction to ecological Biochemistry", Academic Press, 1989; Adv. Chemical Ecology in Natural Product Rep., 10, 327 – 335.

[9] *Roeske, C N.; Seiber, J. N.; Brower, L. P.; Moffit, C. M*. (1975). "Milkweed cardenolides and their comparative processing by monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.)". Recent Advances in Phytochemistry, 10 (Biochem. Interact. Plants Insects), 93-167.

[11] *Tomiyana, K.; Sakuma, T.; Ishizaka, N.; Sato, N.; Katsui, N.; Takasugi, M.; Masamune, T.*; (1968). ''New antifugal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens". Phytopatology, 58, 115-122.

[12] *Whittaker, R. H.; Feeny, P. P*. (1971). "Allelochemic effects of Petalostemos gallingeri on the distribution of Arenaria patula in cedar glades". Ecology, 56, 924-932.

[13] *Macias, F. A.; Oliveros-Bastidas, A.; Marin, D.; Castellano, D.; Simonet, A. M.; Molinillo, J. M. G*. (2005). Degradation Studies on Benzoxazinoids. Soil Degradation Dynamics of (2R)-2-O-β-D-Glucopyranosyl-4-hydroxy-(2H)-1,4 benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA-Glc) and its degradation products, Phytotoxic Allelochemicals from Gramineae". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(3), 554-561.

[14] *Rovira, A. D.* (1969). Plant root exudates. Bot. Rev. 35, 35-57.

[15] *Whittaker, R. H.; Feeny, P. P.* (1971). "Allelochemics: chemical interaction between species". Scienze, 171, 757-770.

[16] *Kupchan SM, Britton RW, Ziegler MF, Sigel CW. "Bruceantin*, a new potent antileukemic simaroubolide from Brucea antidysenterica". J. Org. Chem. 1973; 38: 178-179.

[17] *Bax, A.*; "Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquidis", Delf University Press, Dordrecht, 1982.

[18] *Palmer III, A. G.; Cavanagh, J.; Wright P. E.; Rance, M.*; J. Magn. Reson, 1991, 151-170.

[19] *Davis, D. G.; Bax, A.*; J. Magn. Reson, 1986, 565.

[20*] Bax, A.; Summers, M. F.*; "^{1}H and ^{13}C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple bond connettivity by 2D multiple quantum NMR", J. Am. Chem. Soc, 1986, 2093.

[21] *Karplus, M.*; "Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments", J Chem. Phys, 1959, 11.

[22] *Sanders, J., K., M.; Mersh, J., D.*; "Nuclear magnetic double resonance: the use of difference spectroscopy", Prog. NMR Spectrosc., 1982, 353.

[23] *Dale, J., A.; Mosher, H., S.;* "Nuclear magnetic resonance non-equivalence of diasteromeric esters of α-substituted phenylacetic acids for determination of stereochemical purity", J. Am. Chem. Soc., 1968, 3732. Dale, J., A.; Dull, D., L., Mosher, H., S.; "α-Methoxy-α trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for determination of enantiomeric composition of alcohols and amines", J. Org. Chem.,1969, 2543.

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

CAPITOLO II

ANALISI DEGLI ESTRATTI DI *Juniperus communis*

DESCRIZIONE *Juniperus communis*

Figura II.1: *Juniperus communis*

Juniperus communis L. è un arbusto sempreverde diffuso in Europa, Asia e Nord-America, che appartiene alla famiglia delle *Cupressacee*, al genere *Juniperus* ed alla specie *communis*; il genere *Juniperus L.* comprende ben oltre 70 specie. E' uno dei pochi esempi di arbusto che cresce anche in regioni dal clima freddo, anche se la migliore qualità di *J. Communis* si trova nelle regioni del Sud-Europa. In Italia è presente specialmente nelle regioni alpine, dove il ginepro è molto abbondante.

Presenta un lento sviluppo, ma può arrivare a raggiungere anche altezze di 3 metri, e assumere un portamento cespuglioso con fusti molto ramificati che producono una resina; mentre la corteccia, di color bruno-rossastro si può staccare longitudinalmente a scaglie. Il ginepro preferisce i climi temperati, ha una buona resistenza alle alte e soprattutto alle basse temperature; negli ambienti montani, caratterizzati da inverni piuttosto rigidi, gli alberi assumono un portamento basso e prostrato. Le esposizioni migliori sono le aree pienamente soleggiate o parzialmente ombreggiate, non necessariamente devono essere riparate perché l'albero sopporta bene il vento, predilige i terreni leggermente alcalini e ben drenati, ma si adatta bene anche a suoli aridi, sassosi ed argillosi.

Uno studio effettuato dall'Università di Camerino ha evidenziato che due delle specie di *Juniperus L.* (*Juniperus communis* e *Juniperus oxycedrus*), sono in grado di promuovere la formazione di biogruppi.

I biogruppi sono un particolare tipo di nucleo di rigenerazione delle specie erbacee: si tratta di aggregazioni costituite da alcune specie di alberi e cespugli di età diversa; di regola, uno degli alberi è più vecchio degli altri e si trova al centro di questa aggregazione, superando per altezza gli altri componenti e assumendo il ruolo di promotore; inoltre si è osservato che i biogruppi di ginepro racchiudono all'interno molte specie legnose e erbacee.

Il genere *Juniperus Communis* comprende tre sottospecie: *J. communis*, *J. nana Willd* e *J. hemisphaerica*. *J.nana* è considerato da alcuni botanici il risultato dell'adattamento di *J. communis* a determinate condizioni climatiche, altri invece lo considerano come una specie distinta [1]. Queste tre specie si distinguono per le loro caratteristiche morfologiche; non vi sono invece chiare differenze genetiche tra le due sottospecie di *J. communis e J. nana*.

Da secoli l'infuso delle bacche è utilizzato nella medicina popolare per le sue proprietà antisettiche, stomachiche, carminative e diuretiche. L'olio essenziale ottenuto dalle bacche e l'infuso o il decotto ottenuto dalle foglie hanno un gran numero di usi tradizionali dalle applicazioni in campo alimentare [2] alle proprietà medicinali. Le bacche acerbe e mature del *Juniperus communis* sono riportate nella Farmacopea Europea [3] e nella Farmacopea ufficiale italiana per le proprietà diuretiche e balsamiche. E' ampiamente documentato l'utilizzo dell'olio essenziale come rimedio per aumentare la diuresi e come agente carminativo [4]. L'olio essenziale mostra inoltre attività antiinfiammatoria, ipoglicemica [5], antiossidante [6], antimicrobica [7] e antifungina [8]. Le bacche sono state utilizzate per molto tempo per profumare e aromatizzare bevande alcoliche come il noto gin o la grappa. Molti degli studi riportati in letteratura riguardano maggiormente lo studio della composizione chimica degli oli essenziali delle bacche [7-8], mentre un minor numero di ricerche riguarda lo studio della componente non volatile. Diversi studi condotti sulla composizione chimica dell'estratto metanolico ottenuto dalla bacche hanno portato all'isolamento di monoterpeni labdanici [9], glicosidi megastigmanici, diterpeni labdanici [10] e flavonoidi [11].

***Descrizione della pianta*:**

Appartenente alla famiglia delle *Cupressaceae*, il *Juniperus communis* è una pianta di portamento molto variabile; in collina si presenta sotto forma di cespuglio alto fino a 1-1.5 m; mentre nei pascoli e sulle rupi di alta montagna, dove raggiunge anche quote prossime a 3500 m, vegeta aderente al suolo, con foglie meno rigide e poco pungenti, lunghe 4-8 mm.

Foglie. Le foglie sono verticellate a tre a tre, lineari, di colore verde glauco, fatta eccezione per un solco bianchiccio sulla faccia ventrale.

Galbuli. La droga e' costituita da galbuli o più propriamente coccole, ma conosciuti impropriamente come frutti ovvero bacche (*bacche di Ginepro).* Ogni galbulo presenta un epicarpo liscio e sottile e polpa spugnosa e verdastra contenente tre semi duri, triangolari di colore bruno chiaro [12]. Nella droga sono presenti: olio essenziale (0,2-3,42%), tannini (proantocianidine, gallocatechine ed epigallocatechine), flavonoidi (quercetina, isoquercetina, apigenina) e zuccheri. Per distillazione in corrente di vapore, dai galbuli si ottiene un olio essenziale contenente per il 60% monoterpeni **(**α-pinene, β-pinene, mircene, limonene etc); inoltre sono presenti idrocarburi sequiterpenici (es. cariofillene) ed alcoli terpenici (4-terpineolo) [13].

Usi:

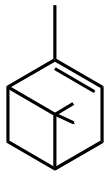
- **Farmaceutici:** L'azione balsamica, diuretica e diaforetica di questa droga, è nota fin dall'antichità ed entra nella composizione di molti preparati prescritti, sia dalla farmacologia ufficiale, sia dalla medicina popolare, per la cura delle affezioni delle vie respiratorie e delle tumefazioni edematose; agisce anche come tonico stimolando la secrezione gastrica. In numerosi studi condotti su animali è stato riportato un aumento nella produzione di urina in seguito a somministrazione di ginepro; questa attività è stata attribuita ad alcuni composti dell'olio essenziale, (in particolare il terpinen-4-olo) che risultano capaci di aumentare la velocità di filtrazione glomerulare. Tuttavia è stato anche dimostrato che gli infusi di ginepro sono più attivi rispetto all'essenza; pertanto l'attività è da ricercarsi anche in altri componenti non presenti nell'olio essenziale.

Anche se sono ampiamente note le proprietà diuretiche del ginepro, il suo utilizzo non viene raccomandato per i disturbi del tratto urogenitale poichè l'uso prolungato dell'essenza di ginepro può provocare danno renale, mentre è controindicato il suo utilizzo in gravidanza e negli stati infiammatori del parenchima renale.

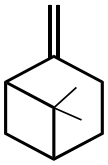
L'estratto fluido e la tintura di ginepro sono utilizzati come carminativi, stomachici e nelle dispepsie. Inoltre i galbuli vengono utilizzati anche per le proprietà balsamiche ed espettoranti, soprattutto nei riguardi della tosse. L'uso dei galbuli essiccati prevede il loro sminuzzamento attraverso un setaccio o una triturazione, ed una utilizzazione da effettuarsi entro 24 ore, a causa della perdita di olio essenziale. Il decotto dei galbuli di ginepro ha azione ipoglicemizzante.

- **Cosmetici:** applicato sulla pelle l'olio essenziale può avere un effetto vescicatorio. Usato in cosmetica ha sul cuoio capelluto azione antisettica, antiinfiammatoria e regolatrice della sebogenesi. È presente in shampi e lozioni associato all'essenza di lavanda o geranio, per mitigarne l'odore penetrante.
- **In cucina:** viene utilizzato per aromatizzare la carne, il vino e altre bevande e per affumicare il prosciutto
- **Nel settore dei liquori:** il ginepro è l'elemento base nella preparazione del gin; quello artigianale si prepara lasciando macerare per 40 giorni una ventina di frutti in un litro di alcool etilico puro, quindi si filtra e si aggiunge lo sciroppo di zucchero (350 g di zucchero in 350 g di acqua)**.**

Il *Juniperus communis* si è rivelata una ricca fonte di metaboliti secondari, con diverse architetture chimiche. In letteratura, sono riportati diversi lavori che descrivono l'isolamento e le proprietà farmacologiche di composti estratti dai galbuli del *Juniperus communis*. L'olio essenziale estratto dai galbuli ha mostrato attività antiinfiammatoria, ipoglicemizzante, antiossidante, abortiva, antimicrobica, antifungina e recentemente è stata riscontrata anche un'attività antitumorale. Tali attività sono da attribuirsi ai singoli composti chimici isolati che sono risultati essere monoterpeni quali: l'α-pinene e il β-pinene.



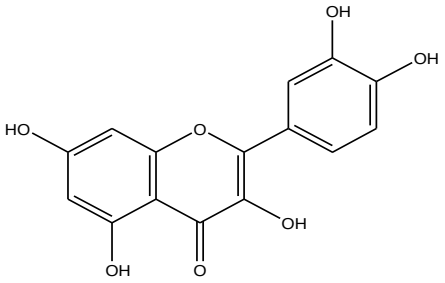
α-pinene



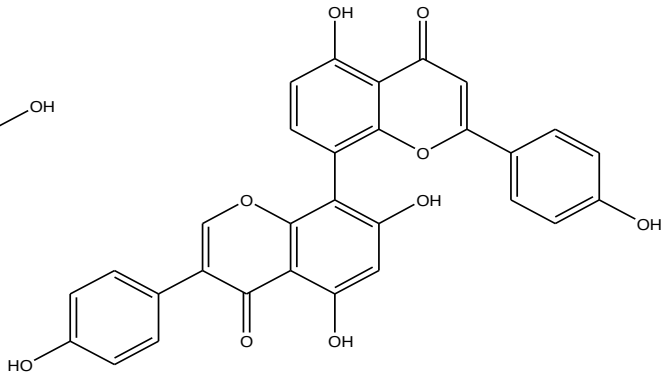
β-pinene

Inoltre, dai galbuli di *Juniperus communis* sono stati isolati labdani monoterpenici e glicosidi del megastigmano [14], labdani diterpenici [15], flavonoidi e biflavonoidi. Particolarmente abbondanti risultano i flavonoidi, quali la quercetina, il cupressoflavone, la catechina (Fig. II.2).

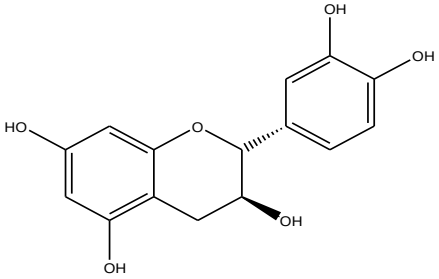
I flavonoidi, molecole dotate di attività antiossidante, hanno un ruolo importante nella cardioprotezione; molti studiosi affermano che diete ricche di alimenti contenenti flavonoidi riducono il rischio di malattie cardiovascolari.



Quercetina



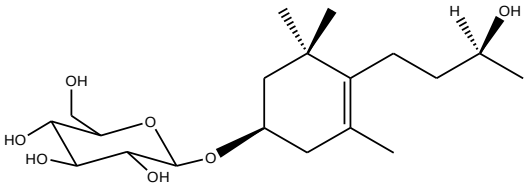
Cupressoflavone



Catechina

Figura II.2

Dai dati riportati in letteratura si oserva che dalle bacche sono stati isolati dei glicosidi con lo scheletro del megastigmano. Tali composti sono risultati essere potenti antibatterici che agiscono contro vari ceppi dell'*Helicobacter pylori* [14].



Glicoside con lo scheletro del megastigmano

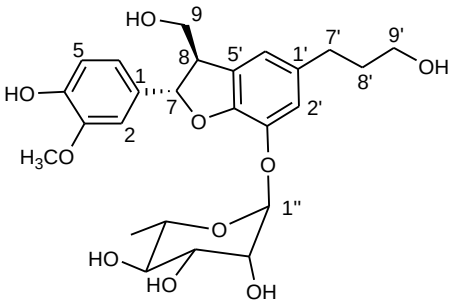
Altri studi effettuati sui galbuli del *Juniperus communis* hanno evidenziato una ricca varietà di diterpenoidi [10] con lo scheletro del labdano variamente sostituito tra cui: l'acido imbricatolico, l'acido isocupressico, l'acido sandaracopimarico e l'acido isopimarico.

CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI METABOLITI ISOLATI DA *Juniperus communis*

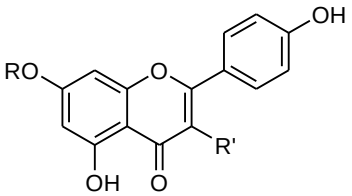
Dall'estratto metanolico delle bacche di *Juniperus communis* è stato isolato un nuovo lignano glicoside diidrobenzofuranico, chiamato Juniperoside A (1), e sedici composti noti. Le bacche di *Juniperus commun*is sono state estratte con metanolo e l'estratto ottenuto è stato sottoposto a metodica di Kupchan [16] ottenendo quattro estratti: n-esano, $CHCl_3$, n-BuOH e un residuo acquoso. L'estratto esanico è stato separato attraverso cromatografia su colonna di gel di silice ottenendo in modo più abbondante il composto noto acido *cis*-Communico (2) [17]. Dall' estratto *n*-BuOH, in seguito a purificazione attraverso DCCC e HPLC sono stati isolati e identificati un nuovo glicoside di natura lignanica (1) e l'aldeide *cis*-Communica (3), l'Apigenina7-O-β-D-glucopiranoside (13) [18], il Kamferolo 7-O-β-D-glucopiranoside (14) [19] e la Catechina (15) [20].

Dall'estratto cloroformico sono stati purificati l'acido Imbricatolico [acido 15-idrossi-labd-8(17)en-19-oico] (4) [21]; l'aldeide Imbricatolica (5) [22]; l'Agatadiolo (6) [23]; l'aldeide Isoagatolale (7) [24]; l'acido Iunicedrico (8) [25]; l'aldeide Iunicedrica (9); l'acido Mircecommunico (10) [26]; l'acido Sandarocopimarico (11) [27]; l'acido Isopimarico (12) [28]; l'Oplopanone (16) [29] e il Matairesinolo (17) [30].

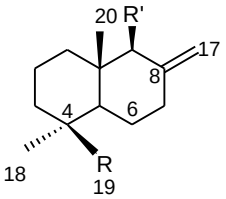
In figura II.3 vengono riportati i composti isolati (1-17):

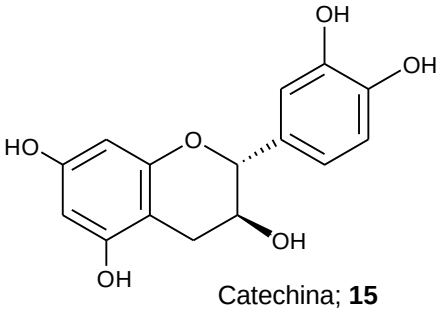


Juniperoside A ; **1**



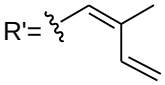
Apigenina 7-O-β-D-glucopiranoside; **13** R=Gluc R'=H
Kamferolo 7-O-β-D-O-glucopiranoside; **14** R=Gluc R'=OH

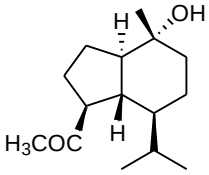




Catechina; **15**

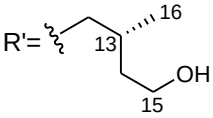
Acido *cis*-communico; **2** R=COOH
Aldeide*cis*-communica; **3** R=CHO



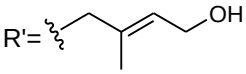


Oplopanone; **16**

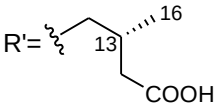
Acido Imbricatolico; **4** R=COOH
Aldeide Imbricatolica; **5** R=CHO

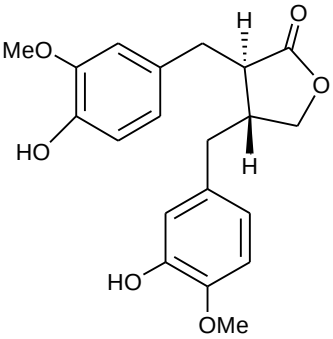


Agatadiolo; **6** R=CH_2OH
Aldeide Isoagatolale; **7** R=CHO



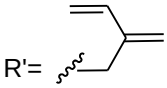
Acido Iunicedrico; **8** R=COOH
Aldeide Iunicedrica; **9** R=CHO

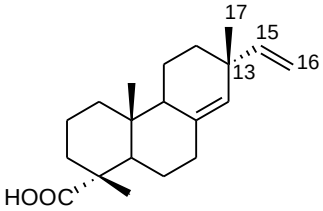




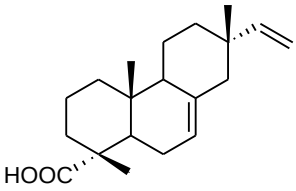
Matairesinolo; **17**

AcidoMircecommunico; **10** R=COOH





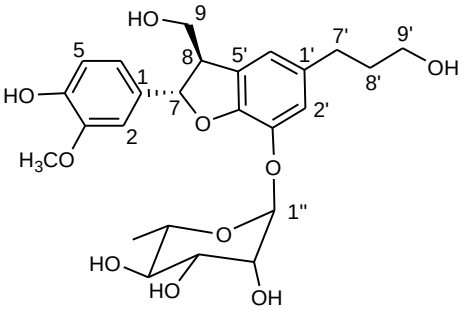
Acido Sandarocopimarico; **11**



Acido Isopimarico; **12**

Figura II.3

1- JUNIPEROSIDE A



Il nuovo lignano isolato (1) è un glicoside diidrobenofuranico, definito Juniperoside A, ([α]Δ = +34.4°), mostra la presenza di uno ione pseudomoleculare a *m/z*=493.2 u.m.a. nel suo HR-FABMS e la presenza di 25 atomi di carbonio nello spettro ^{13}C NMR, che suggerisce la formula molecolare del composto $C_{25}H_{32}O_{10}$. Nello spettro ESI-MS è inoltre presente uno ione pseudo molecolare a *m/z*=516 relativo a $[M+Na]^+$. Lo spettro IR mostra delle bande d'assorbimento a 3451 cm^{-1}, relative ai gruppi ossidrilici aromatici. I dati ^1H e ^{13}C NMR sono in parte simili a quelli della Clemastatina A [31], un glucoside isolato dalla pianta della specie *Clematis.*

Lo spettro protonico mostra la presenza di segnali relativi a tre protoni aromatici a δ_H 6.94, 7.06 e 7.08 ppm di un anello benzenico trisostituito nelle posizioni 1, 3, 4 e i segnali a δ_H 6.59 e 6.62 ppm attribuiti ad altri due protoni di un anello benzenico sostituito nelle posizioni 1', 3', 4', 5'. Nello spettro protonico sono inoltre presenti i segnali di protoni metilenici ossigenati a δ_H 3.88/3.77 ppm e a 3.58 ppm (t); un segnale relativo al gruppo –CH-O- a 5.57 ppm (d) e il segnale di una funzione metossilica a δ_H 3.83ppm (s). Grazie ai dati ottenuti dallo spettro ^1H-^1H COSY è stata evidenziata la presenza di una catena laterale costituita da un residuo propanolico. La sequenza dei sistemi di spin mostra che i protoni ossigenati metilenici (δ_H 3.88/3.77 ppm) sono correlati ai protoni metilenici a δ_H 3.47 ppm, l'ultimo dei quali accoppiato con il segnale del protone a δ_H 5.57 ppm.

I dati ottenuti dal ^{13}C-NMR e gli esperimenti HSQC consentono di correlare le risonanze dei protoni dell'aglicone con i rispettivi carboni (Tab.II.1) e indicano che si tratta di un lignano con un residuo di alcool deidroconilferilico.

La presenza del monosaccaride è stata dedotta dal segnale del protone anomerico a δ_H 5.35 ppm. Iniziando dal protone anomerico sono state assegnate le risonanze degli altri protoni utilizzando esperimenti ^{1}H-^{1}H COSY e TOCSY. La presenza dell'unità di ramnosio in forma piranosidica è stata dedotta sulla base delle costanti di accoppiamento dei protoni dell'unità saccaridica: la costante di accoppiamento grande tra il protone H-3''/H-4'' (8.5 Hz) indica una interazione assiale-assiale tra i due protoni; cosi' come per H-4''/H-5'' (8.5 Hz); mentre la costante tra H-2''/H-3'' (1.8 Hz) indica una interazione equatoriale-assiale che si verifica (soltanto nelle unità di ramnosio) tra il protone H-2'' (eq.) e il protone H-3'' (ax). Il legame del ramnosio in α è stato invece dedotto sulla base della piccola costante di accoppiamento tra H-1''/H-2'' (1.8 Hz).

Dall'idrolisi acida del composto Juniperoside A con acido trifluotoacetico si ottiene il ramnosio. La configurazione L del ramnosio è stata assegnata nel seguente modo: in seguito all'idrolisi del composto 1 l'idrolizzato è stato fatto reagire con L-cistein-metil estere 0.1 M in piridina anidra (200 μl) e in acido cloridrico per 1 ora a 60° [32]. E' stato aggiunto 1-Trimetilsilil-imidazolo in piridina e i derivati tiazolidinici sono stati analizzati attraverso gas cromatografia.

La presenza del ramnosio di tipo L nel composto 1 è stata confermata attraverso il confronto tra il tempo di ritenzione dei loro derivati con quelli del D-ramnosio. (t_R=12.60 min) e del L-ramnosio (t_R =12.14 min). La connessione tra l'unità di ramnosio al carbonio C-3' dell'aglicone è stata verificata nell'esperimento HMBC dalla presenza del picco di correlazione tra il protone anomerico a δ_H 5.35 ppm (H-1') e il carbonio C-3' a δ 146.0 ppm; inoltre si evidenzia dall'HMBC la posizione del gruppo metossilico al carbonio C-3 e il legame della catena laterale propanolica al carbonio C-1'. La geometria tra il gruppo idrossimetilico e il gruppo arilico è stata definita di tipo trans in base a un esperimento ROESY, valutando le costanti di accoppiamento di H-7/H-8 (*J*=5.7 Hz) e in base ai loro chemical shifts. E' stato osservato un ROE intenso tra H-8/H-6' (δ_H 3.47/6.62 ppm) e H-7/H_2-9 (δ_H 5.57/3.88-3.77ppm), H-7/H-6 (δ_H 5.57/6.94 ppm), H-7/H-2 (δ_H 5.57/7.06 ppm).

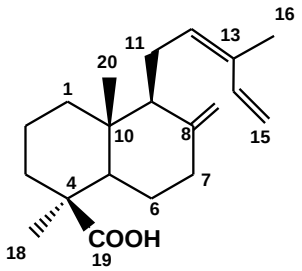
Quindi la struttura dello Juniperoside A, **1**, è: 3-metossi-3',4,9,9'-tetraidrossi-4',7-epossi-5',8-lignano-3'-O-α–L–ramnopiranoside.

Tabella II.1. Dati ^{1}H e ^{13}C NMR (CD_3OD, 500 MHz) dello Juniperoside A (**1**)

Posizione	δ_H (*J* in Hz)	δ_C	HMBC
1	-	138.8	
2	7.06 br s	110.9	C4, C6, C7
3	-	151.7	
4	-	146.1	
5	7.08 d (8.4)	119.2	C1, C3
6	6.94 d (8.4)	118.7	C2, C4, C7
7	5.57 d (5.7)	89.0	C1, C2, C6, C8, C9, C3', C5'
8	3.47 ovl	55.6	
9	3.77 dd (9.9, 17.9), 3.88 ovl	64.8	C7, C8, C5'
1'	-	136.4	
2'	6.59 s	116.7	C4', C6', C7'
3'	-	146.0	
4'	-	140.7	
5'	-	129.1	
6'	6.62 s	116.3	C8, C2'
7'	2.58 d (7.3)	32.4	C1', C2', C6', C8', C9'
8'	1.80 m	35.5	C1', C7', C9'
9'	3.58 t (6.5)	62.0	C7', C8'
OCH_3	3.83 s	56.0	C5
Ramn.			
1''	5.35 br s (1.8)	101.1	C3', C3'', C5''
2''	4.08 br s (1.8)	71.7	
3''	3.90 ovl (1.8)	71.9	
4''	3.47 ovl (8.5)	73.5	
5''	3.82 ovl (8.5)	70.5	
6''	1.22 d (6.2)	17.6	C4'', C5''

^{1}H e ^{13}C assegnati sulla base di esperimenti COSY, TOCSY, HSQC and HMBC.

In letteratura si è osservato che vi sono poche informazioni in merito ai dati ^{13}C NMR dell'acido *cis*-Communico; per tal motivo di seguito si riporta la caratterizzazione strutturale completa del composto 2.



2-Acido cis communico

Attraverso la spettrometria di massa HR-EIMS è stato evidenziato uno ione pseudo molecolare a *m/z*=302.22 u.m.a., da cui, unitamente allo spettro ^{13}C-NMR, è derivata la formula molecolare del composto come: $C_{20}H_{30}O_2$.

Lo spettro ^{13}C-NMR mostra 20 segnali: un segnale relativo ad un carbonio carbonilico a δ 182.1 imputabile a una funzione carbossilica; sei segnali relativi a carboni olefinici a δ 148.6, 134.9, 132.4, 131.6, 113.2 e 107.7 ppm; una zona compresa tra 20 e 45 ppm in cui risuonano carboni di tipo metilenico, metinico e due carboni quaternari; infine tre carboni metilici a δ 29.4, 19.7 e 13.2 ppm. Dall'analisi dello spettro ^{1}H-NMR è possibile individuare due zone ben distinte: una zona a campi bassi, tra δ_H 7.0 e δ 4.5 ppm, in cui si osservano una serie di segnali imputabili a protoni di tipo olefinico e una zona compresa tra δ_H 2.5 e 0.6 ppm, che comprende sia i protoni del sistema diterpenoidico che i segnali dei protoni metilici. Questi ultimi, integranti ciascuno per tre protoni, risuonano come singoletti a δ_H 0.70, 1.18 e 1.75 ppm. Il valore di quest'ultimo metile, spostato a campi bassi, ci suggerisce la posizione di tale gruppo su un doppio legame. Lo spettro COSY, che mostra i protoni scalarmente accoppiati tra loro, ha permesso di individuare tre sistemi di spin indipendenti. Il primo sistema di spin comprende i protoni H_2-1 (δ_H 1.16 e 1.88 ppm) che risultano accoppiati fra di loro e con i protoni H_2-2 (δ_H 1.50 e 1.92 ppm); questi a loro volta risultano essere accoppiati con i protoni H_2-3 (δ_H 1.05 e 2.13 ppm). I protoni al C-3 risultano essere accoppiati solo con gli H_2-2 indicando quindi che in C-4 vi è un carbonio quaternario. Il secondo sistema di spin è costituito dal protone a δ_H 1.35 ppm, relativo all'H-5, che accoppia con i protoni H_2-6 (δ_H 1.92 e 2.00 ppm), che a loro volta accoppiano con i protoni H_2-7 (δ_H 2.39 e 1.93 ppm).

Questi due protoni mostrano un piccolo accoppiamento di tipo allilico con i due protoni olefinici a δ_H 4.46 e 4.82 ppm. Ciò ci ha permesso di stabilire la presenza della funzione esometilenica, confermata anche dall'esperimento HMBC.

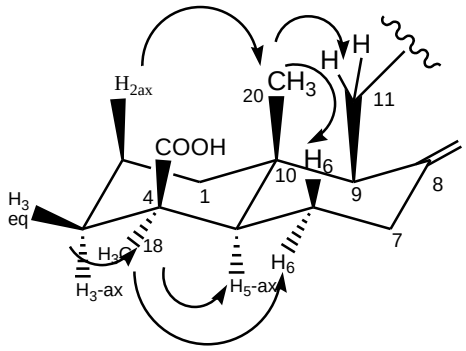
Il terzo sistema di spin risulta essere costituito dal protone a δ_H 1.73 ppm, relativo all'H-9, che mostra una piccola correlazione di tipo allilico con i protoni olefinici a δ_H 4.46 e 4.82 ppm e due picchi di correlazione con i protoni H_2-11 (δ_H 2.46 e 2.18 ppm). Questi, a loro volta, accoppiano con il protone olefinico a δ_H 5.30 ppm che mostra un piccolo accoppiamento di tipo allilico con il protone olefinico a δ_H 6.83 ppm. Quest'ultimo mostra due picchi di correlazione con i due protoni olefinici H_2-15 a δ_H 5.18 e 5.07 ppm. L'esperimento HSQC ha permesso di correlare il chemical shifts di ciascun idrogeno con il corrispondente carbonio. L'esperimento bidimensionale HMBC, che consente di stabilire le correlazioni C-H attraverso due o tre legami, è stato di notevole importanza per poter determinare correttamente la struttura del composto. Dall'analisi dello spettro HMBC emergono chiaramente le correlazioni "long range" tra i protoni del metile a δ_H 0.70 ppm in C-20, con il C-10 (δ 40.5 ppm), C-1 (δ 40.4 ppm), C-5 (δ 57.3 ppm) e C-9 (δ 58.0 ppm). Inoltre, il metile a δ_H 1.18 ppm mostra picchi di correlazione con il C-4 (δ 44.5 ppm), C-3 (δ 39.3 ppm), C-5 (δ 57.3 ppm) e con il carbonio carbossilico C-19 (δ 182.1 ppm). La conferma della posizione della funzione esometilenica al C-8 si è avuta grazie all'analisi dello spettro HMBC nel quale compaiono picchi di correlazione tra i protoni della funzione esometilenica a δ_H 4.46 e 4.83 ppm con il C-8 (δ 148.6 ppm), con il C-9 (δ 58.0 ppm) ed il C-7 (δ 39.6 ppm). Per quanto riguarda la catena laterale, sono presenti sempre nello spettro HMBC, delle correlazioni tra i due protoni H_2-11 (δ_H 2.18 e 2.46 ppm) con il C-9 (δ 58.0 ppm), C-10 (δ 40.5 ppm) e C-8 (δ 148.6 ppm). Inoltre tali protoni mostrano ulteriori correlazioni con i due carboni olefinici C-12 (δ 132.4 ppm) e C-13 (δ 131.6 ppm). Il metile CH_3-16 (δ_H 1.75 ppm), che come detto precedentemente risulta spostato a campi bassi in quanto legato ad un carbonio ibridato sp^2, mostra correlazioni con il C-12, C-13 e C-14.

Infine i protoni olefinici a δ_H 5.07 e 5.18 ppm correlano con il carbonio C-14 (134.9 ppm) ed C-13. Tali dati hanno confermato che si tratta di una catena laterale contenente un diene terminale con un metile sul carbonio 13. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 2, pag.73).

ANALISI CONFORMAZIONALE DEI LABDANI:

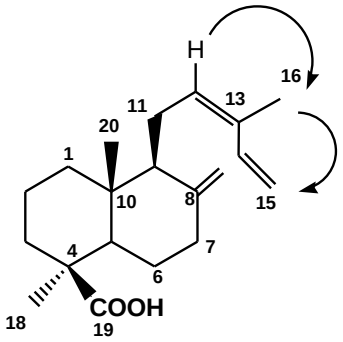
L'analisi conformazionale dei vari labdani isolati è stata dedotta sulla base di esperimenti ROESY dell'acido *cis*-Communico. Nello spettro ROE si osserva un picco di correlazione tra gli H_3-18 (δ_H 1.18 ppm) con l'H_{3eq} (δ_H 2.13 ppm), con l'H_{5ax} (δ_H 1.35 ppm) e con l'H_{6eq} (δ_H 2.00 ppm); da ciò si deduce che il COOH, presente in posizione 19 e legato al carbonio 4, deve essere in posizione assiale.

Inoltre si rileva che il gli H_3-20 (δ_H 0.70 ppm) mostrano un ROE con l'H_{2ax} (δ_H 1.92 ppm), con gli H_2-11 (δ_H 2.46-2.18 ppm) e con l'H_{6ax} (δ_H 1.92 ppm), da ciò di deduce che la catena laterale è posizionata in assiale.



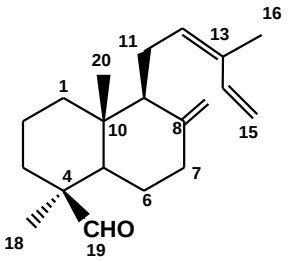
Correlazioni ROE

Nell'acido *cis*-Communico la configurazione del doppio legame Δ^{12} è stata definita Z, in quanto nell'esperimento ROESY, era presente un picco di correlazione tra il metile CH_3-16 (δ_H 1.75 ppm) ed il protone olefinico H-12 (δ_H 5.30 ppm). L'assetto conformazionale del diene è stato definito come s-trans in quanto, sempre nell'esperimento ROESY, era presente un picco di correlazione tra uno dei protoni olefinici H-15 (δ_H 5.18 ppm) ed il CH_3-16 (δ_H 1.75 ppm).



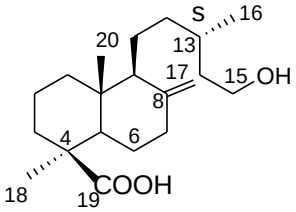
2-Acido cis communico

I dati spettroscopici del composto **3** sono risultati essere molto simili a quelli del composto 2; le uniche differenze sono dovute alle presenza nello spettro ^{1}H-NMR del segnale di un singoletto a δ_H 9.73 ppm relativo a un protone aldeidico e al segnale del CH_3-in 20 a δ_H 0.60 ppm (nell'acido *cis*-Communico il CH_3- in 20 risuonava a 0.70 ppm). Un esperimento HMBC mostra che il protone a δ_H 9.73 ppm correla con il carbonio C-4 (δ 48.6 ppm), C-5 (δ 57.5 ppm) e C-18 (δ 29.4 ppm); ciò consente di affermare che la funzione aldeidica è presente in posizione C-19. Lo spettro ESI$^+$ presenta uno ione molecolare a *m/z*=287, che indica che il peso molecolare del composto è pari a 286 u.m.a, e conferma che la struttura del composto 3 è quella dell'aldeide *cis*-Communica.



3-Aldeide cis communica

Il composto **4**, isolato in maggiore quantità, è stato identificato come acido Imbricatolico.



4-Acido Imbricatolico

Nello spettro ^{1}H-NMR i protoni H_2-1 e H_2-2 risuonano come doppi doppietti a δ_H 1.87 e 1.12 ppm e a δ_H 1.93 e 1.51 ppm rispettivamente.

Lo spettro mostra i segnali dei protoni geminali di un -CH_2 ibridato sp^2 a δ_H 4.83 e 4.51 ppm (H_2-17) e i segnali singoletto di due funzioni metiliche -CH_3 in posizione 18 e 20 (δ_H 1.19 e 0.64 ppm); il segnale del metile in 16 che risuona come doppietto a δ_H 0.91 ppm e il segnale di un tripletto a δ_H 3.51 ppm assegnabile al CH_2OH presente nella posizione 15.

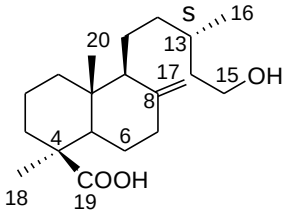
Sono inoltre presenti il segnale di un tripletto inerente ai protoni H_2-7 (δ_H 2.40 e 1.92 ppm), e il segnale di un protone H-9 (δ_H 1.58 ppm), che risuona come doppietto. Confrontando i dati NMR con quelli del composto 2 si osserva che anche in questo caso è presente l'insaturazione $\Delta^{8(17)}$, funzione che si ritroverà anche nei composti da 5 a 10. Attraverso lo spettro ^{1}H-^{1}H COSY è stato possibile individuare una serie di protoni accoppiati scalarmente tra loro relativi alla catena laterale. Gli H_2-15 (3.57 ppm) sono accoppiati con i protoni H_2-14 (δ_H 1.60 e 1.32 ppm), che a loro volta sono accoppiati con il protone H-13 che risuona a δ_H 1.54 ppm. Si è dedotto inoltre che il carbonio in posizione 13 lega un gruppo metilico, infatti H-13 risulta accoppiato con i protoni H_3-16 (δ_H 0.91 ppm), H_2-12 (δ_H 1.49 e 0.96 ppm) e H_2-14 (δ_H 1.60 e 1.32 ppm).

La configurazione del carbonio C-13 è stata stabilita essere S confrontando il potere ottico rotatorio dell'acido Imbricatolico e dei composti 5, 8, 9 (per tutti di valore positivo) con i dati riportati in letteratura [33].

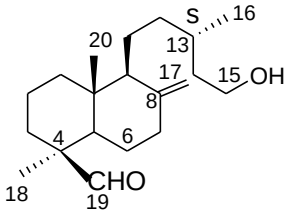
L'esperimento HMBC mostra che i protoni H_2-17 della funzione esometilenica (δ_H 4.83 e 4.51 ppm) correlano con i carboni C-9 (δ 57.6 ppm), C-7 (δ 39.7 ppm) e C-8 (δ 147.4 ppm). Inoltre dallo spettro HMBC si rileva che i protoni H_2-15 a δ_H 3.57 sono correlati con i carboni C-13 e C-14 che risuonano rispettivamente a δ 31.2 e 40.2 ppm. Si osserva dallo spettro HMBC la correlazione tra il protone H-7 con il carbonio C-8 (δ 147.4 ppm) e la correlazione tra il protone H-9 con il carbonio C-17 (δ 106.3 ppm). Si osserva dall'HMBC che il segnale a δ_H 0.64 ppm, $-CH_3$ in posizione 20, è correlato con i carboni a δ 40.2, 57.6, e 41.3 ppm, relativi rispettivamente alle risonanze dei carboni nelle posizioni C-1, C-9 e C-10, confermando la presenza della funzione metilica. Inoltre un esperimento HMBC evidenzia che i protoni H_2-11, che risuonano a 1.60 e 1.30 ppm, correlano con il carbonio in posizione C-14 che risuona a 40.2 ppm. Lo spettro ESI^+ presenta uno ione molecolare $[M+H^+]$ a *m/z*= 323 u.m.a., che conferma il peso molecolare del composto. Un esperimento HSQC ha consentito di stabilire le correlazioni tra ciascun protone con il rispettivo atomo di carbonio, confermando la struttura del composto 4. (Tab. ^{13}C-NMR composto 4, pag. 74)

I dati spettroscopici ottenuti degli spettri mono e bidimensionali del composto **5,** identificato come aldeide Imbricatolica, sono risultati essere molto simili a quelli del composto **4**.

Le poche differenze erano dovute al fatto che nello spettro ^{1}H-NMR del composto **5** era presente il segnale di un singoletto a δ_H 9.74 ppm, dovuto a un protone di tipo aldeidico e il segnale del CH_3-in 20 a δ_H 0.58 ppm (nell'acido Imbricatolico il CH_3- in 20 risuona a 0.64 ppm). Da un esperimento HMBC si evince che il protone a δ_H 9.74 ppm correla con il carbonio C-4 (δ 44.8 ppm) e il carbonio C-3 (δ 39.2 ppm); un esperimento HSQC evidenzia che il protone a δ_H 9.74 ppm è correlato con il carbonio C-19 (δ 206.3) ppm e insieme ai dati HMBC si è potuto stabilire che la funzione aldeidica è presente in posizione 19. Inoltre lo spettro ESI$^+$ presenta uno ione molecolare [M+H$^+$] a *m/z*= 339 u.m.a., che conferma il peso molecolare del composto pari a 338 u.m.a.

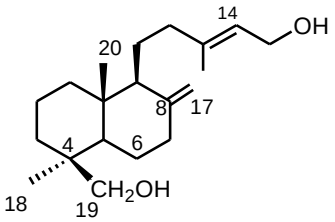


4-Acido Imbricatolico



5- Aldeide Imbricatolica

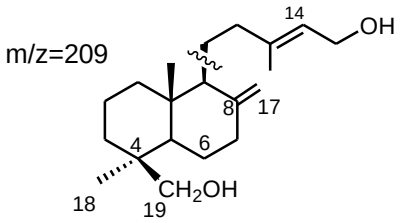
I dati spettroscopici ottenuti degli spettri mono e bidimensionali del composto **6** identificato come Agatadiolo, sono risultati essere molto simili a quelli del composto **4**.



6- Agatadiolo

Le poche differenze erano dovute al fatto che nello spettro ^{1}H-NMR dell'Agatadiolo era presente in più un segnale tripletto a δ_H 5.31 ppm (relativo al protone olefinico H-14) e il segnale di un doppio doppietto a δ_H 3.72 e 3.28 ppm, relativi alla funzione CH_2OH in posizione 19, mentre lo spettro ^{1}H-^{1}H COSY evidenzia che il protone H-14 (δ_H 5.31 ppm) è accoppiato con i protoni del CH_2OH in posizione 15 (δ_H 4.08 ppm). Un esperimento HSQC evidenzia che i protoni H_2-19 (δ_H 3.72 e 3.28 ppm) sono direttamente legati al carbonio C-19 (δ 64.5 ppm).

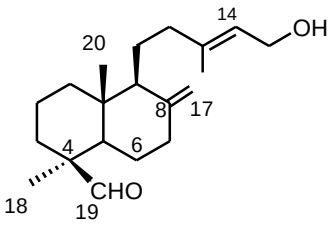
Da un esperimento HMBC si evince che essi sono correlati a loro volta con il carbonio C-3 (δ 36.4 ppm), il carbonio C-4 (δ 39.4 ppm), e il carbonio C-6 (δ 27.6 ppm); ciò ha consentito di affermare che in posizione 19 fosse presente un gruppo CH_2OH. Lo spettro di massa del composto 6 evidenzia la presenza di uno ione a *m/z*=307 u.m.a relativo a $[M+H^+]$ e un frammento di intensità maggiore a *m/z*=209 u.m.a., relativo alla frammentazione della molecola nelle seguenti parti:



6- Agatadiolo

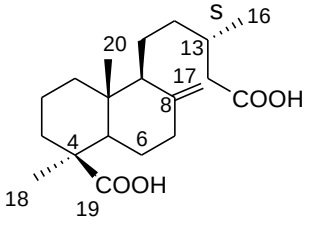
a conferma dell'ipotesi di struttura effettuata.

Il composto **7** identificato come aldeide Isoagatolale [24] presentava gli stessi dati spettroscopici del composto **6**, differiva soltanto per la presenza del segnale di un singoletto a δ_H 9.74 ppm, relativo a un protone di tipo aldeidico e il segnale del CH_3-in 20 a δ_H 0.56 ppm (nell'Agatadiolo il CH_3-in 20 risuona a 0.68 ppm). Da un esperimento HMBC si osserva che il protone a δ_H 9.74 ppm è correlato al carbonio C-3 (δ 36.4 ppm) e al carbonio C-4 (δ 39.4 ppm); da un esperimento HSQC si rileva che il protone a δ_H 9.74 ppm è direttamente legato al carbonio a δ 206.3 ppm e insieme ai dati HMBC si è potuto stabilire che la funzione aldeidica è presente in posizione 19. Lo spettro di massa ESI^+ inoltre conferma il peso molecolare del composto di 304 u.m.a, poiché presenta un picco di intensità maggiore a *m/z*=327 relativo a $[M+Na^+]$.

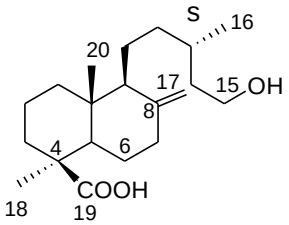


7- Aldeide Isoagatolale

Lo spettro ^{1}H-NMR del composto **8** identificato come acido Iunicedrico, è molto simile allo spettro ^{1}H-NMR del composto 4; le uniche differenze sono dovute all'assenza del segnale a δ_H 3.58 ppm, relativo al gruppo ossidrilico OH in posizione 15.

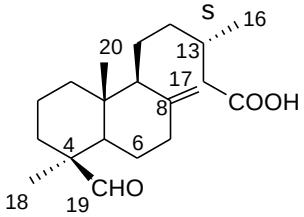


8- Acido Iunicedrico



4- Acido Imbricatolico

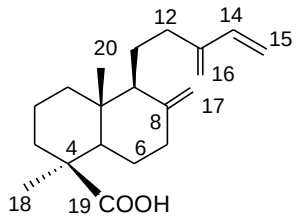
Nello spettro HMBC si evidenzia invece che i protoni H_2-14 (δ_H 2.23 ppm) correlano con il carbonio C-15 (δ 181.4 ppm); ciò consente di affermare che in posizione 15 è presente un gruppo carbossilico COOH, e attraverso dati di letteratura [25] di identificare il composto 8 come acido Iunicedrico**.** Inoltre lo spetttro di massa conferma l'ipotesi effettuata, infatti lo spettro ESI$^-$ presenta uno ione a *m/z*=335 u.m.a., relativo a [M-H$^+$], che conferma il peso molecolare del composto pari a 336 u.m.a. Inoltre si è osservato che i dati spettroscopici ottenuti dagli spettri mono e bidimensionali dell'acido Iunicedrico **8** (Tab. ^{13}C-NMR composto 8, pag. 74), sono molto simili a quelli di un altro composto, il composto **9**; le uniche differenze erano dovute alla presenza del segnale singoletto a δ_H 9.74 ppm, attribuito alla funzione aldeidica, che grazie alle informazioni ottenute da un esperimento HMBC si è potuta assegnare alla posizione del carbonio C-19; e al segnale del CH_3-in 20 a δ_H 0.57 ppm (nell'acido Iunicedrico il CH_3- in 20 risuona a 0.68 ppm). Inoltre lo spettro ESI$^+$ presenta uno ione molecolare [M+H$^+$] a *m/z*= 321 u.m.a., che conferma il peso molecolare del composto pari a 320 u.m.a. Infine grazie alle informazioni ottenute dallo spettro HSQC che hanno consentito di correlare ogni atomo di idrogeno con il rispettivo atomo di carbonio, il composto **9** è stato identificato come aldeide Iunicedrica.



9-Aldeide Iunicedrica

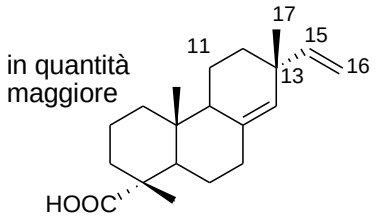
I dati spettroscopici del composto **10** erano molto simili a quelli degli altri labdani isolati; ciò che variava era soltanto la catena laterale. Infatti nello spettro protonico erano presenti oltre ai segnali dello scheletro labdanico tra 0.5 e 3 ppm, il segnale multipletto a δ_H 6.38 ppm relativo al protone olefinico H-14 (*J*=10.9, 17.6 Hz), due doppietti allargati a δ_H 5.02 ppm (*J*=10.9 Hz) e 5.21 ppm (*J*=17.6 Hz) relativi ai protoni H_2-15, un segnale doppietto a δ_H 4.96 ppm (*J*=13.8 Hz) attribuito ai protoni H_2-16 e i segnali singoletto relativi ai protoni della funzione esometilenica H_2-17 (δ_H 4.55 e 4.88 ppm).

Un esperimento ^{1}H-^{1}H COSY evidenzia che il protone H-14 (δ_H 6.38 ppm) è accoppiato con i protoni H_2-15 (δ_H 5.02 e 5.21 ppm) e che i protoni H_2-17 (δ_H 4.55 ppm) sono accoppiati con il protone H-9 (δ_H 1.67 ppm); sono inoltre accoppiati i protoni H_2-12 (δ_H 2.37 e 2.02 ppm) e i protoni H_2-16 (δ_H 4.95 ppm). La catena laterale è stata poi definita sulla base delle informazioni ottenute dallo spettro HMBC ed HSQC, che ha consentito di correlare i protoni con i rispettivi atomi di carbonio. Un esperimento HMBC evidenzia che il protone H-14 (δ_H 6.38 ppm) correla con il carbonio C-15 (δ 114.9 ppm) e il carbonio C-12 (δ 30.3 ppm) e che i protoni H_2-15 (δ_H 5.02 e 5.21 ppm) correlano con il carbonio C-13 (δ 147.3 ppm) e C-14 (δ 139.1 ppm) e che i protoni H_2-16 (δ_H 4.95 ppm) correlano con il carbonio C-14 e C-12. Lo spettro di massa ESI$^-$ conferma l'ipotesi relativa alla struttura del composto 10 di peso molecolare 302 uma, con la presenza di un picco di intensità maggiore a *m/z*=301 relativo a [M-H$^+$]. (Tab. ^{13}C-NMR composto 10, pag. 74).

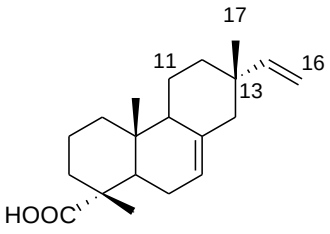


10-Acido Mircecommunico

Dallo spettro ^{1}H-NMR del composto **11** e **12** si rileva che essi sono presenti sotto forma di una miscela di due composti, uno in quantità maggiore e l'altro in quantità minore. Nello spettro protonico si osservano i segnali dei metili che risuonano come singoletto a δ_H 0.85, 1.03, 1.16 ppm attribuiti rispettivamente alle posizioni in 17, 18, e 20 del composto 11, e i singoletti a δ_H 0.93, 0.87, 1.22 ppm relativi ai metili in posizione 17, 18, 20 del composto 12 presente in quantità minore. Si rileva la presenza di un segnale multipletto a δ_H 5.75 ppm, relativo al protone olefinico H-15 del composto 11 e il multipletto a δ_H 5.80 ppm del protone olefinico H-15 del composto 12. Sono inoltre presenti i segnali a δ_H 5.20 ppm (s) e δ_H 5.32 ppm (s) attribuiti rispettivamente al protone olefinico H-14 del composto 11 e al protone olefinico H-7 del composto 12, e i segnali a δ_H 4.88 e 4.90 ppm relativi ai protoni H_2-16 di entrambi i composti. Un esperimento ^{1}H-^{1}H-COSY evidenzia che il protone H-15 a δ_H 5.75 ppm del composto 11 è accoppiato con i protoni H_2-16 (δ_H 4.88 e 4.90 ppm) e che il protone H-14 è accoppiato con i protoni H_2-7 (δ_H 2.15 e 1.84 ppm). Un esperimento HMBC evidenzia nel composto 11 che gli H_3-17 a δ_H 0.85 ppm correlano con i carboni a δ 38.9, 50.6, 51.9, 39.1 ppm attribuiti rispettivamente ai carboni C-1, C-5, C-9, C-10; mentre gli H_3-18 (δ_H 1.03 ppm) correlano con i carboni a δ 35.4, 38.1, 129.2, 149.8 ppm attribuiti rispettivamente ai carboni C-12, C-13, C-14 e C-15. Invece per il composto 12 si osserva dall'HMBC che il segnale a δ_H 0.83 ppm degli H_3-18 correla con i carboni a δ 37.7 ppm, δ 151.0 ppm, attribuiti rispettivamente ai carboni C-13, C-15. (Tab. ^{13}C-NMR composto 11 e 12 pag. 75).



11-Acido Sandarocopimarico

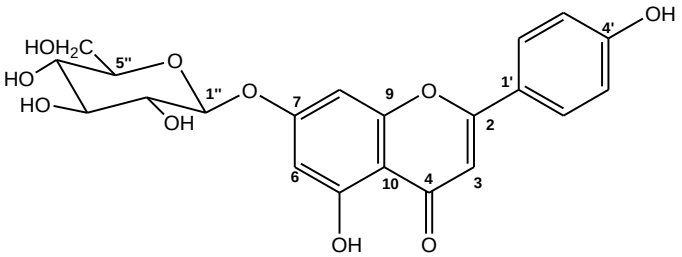


in quantità
minore

12-Acido Isopimarico

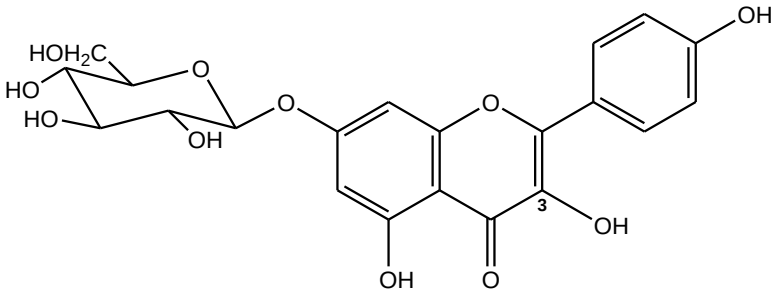
Il composto **13**, è stato identificato come Apigenina 7-O-β-D-glucopiranoside. Dallo spettro ^{1}H-NMR si evidenzia che nella regione tra 6 e 8 ppm sono presenti i segnali attribuibili a due sistemi aromatici. I protoni H-2' e H-6' che risuonano a δ_H 7.89 ppm e i protoni H-3' e H-5' risuonano entrambi come doppietti a δ_H 6.93 ppm. Sono inoltre presenti nella regione aromatica tre segnali singolatto a δ_H 6.51, 6.83, 6.66 ppm attribuiti rispettivamente ai protoni H-3, H-6, H-8. Un esperimento ^{1}H-^{1}H COSY evidenzia che i protoni H-2' e H-3' sono accoppiati tra loro e viceversa; uno spettro HMBC evidenzia che il protone H-5' (δ_H 6.93 ppm) è correlato con il carbonio C-1' (δ 122.2 ppm) e con il carbonio C-3' (δ 116.7 ppm).

Nello spettro protonico si rileva inoltre il segnale di un doppietto assegnabile al protone anomerico (δ_H 5.08 ppm) di un glucosio legato allo scheletro del flavone con un legame di tipo β, perché la costante di accoppiamento tra H-1''/H-2'' è di 7.8 Hz. Il monosaccaride è presente in forma piranosidica poiché le costanti di accoppiamento dei protoni (da H-2'' a H-5'') sono tutte grandi a causa delle interazioni (ax-ax) tra i protoni. Un esperimento HMBC evidenzia che il protone anomerico a δ_H 5.08 ppm è correlato con il carbonio a 162.1 ppm, da cui si deduce che l'unità saccaridica è legata al carbonio C-7 dello scheletro dell'Apigenina. La configurazione D del glucosio è stata assegnata in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto 13, condotta nelle stesse condizioni in cui è stata effettuata per il composto 1 [33] e dalla successiva analisi gas-gramatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard. Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza dei 6 atomi di carbonio presenti nel glucosio, che si trova nel composto. Lo spettro di massa ESI^{+} presenta un picco a *m/z*=433 u.m.a. che conferma il peso molecolare del composto. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 13, pag. 76).



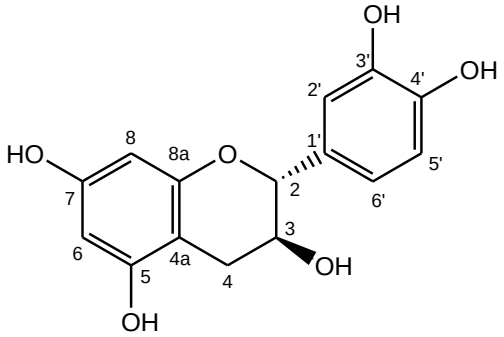
13-Apigenina 7-O-β-D-glucopiranoside

I dati spettroscopici del composto **14** erano molto simili a quelli del composto 13; le uniche differenze erano dovute al fatto che nello spettro protonico del composto 14 erano presenti soltanto due segnali che risuonano come singoletto, relativi ai protoni H-6 (δ_H 6.27 ppm) e H-8 (δ_H 6.65 ppm), mentre mancava il segnale del protone H-3, poichè in questo caso al posto dell'idrogeno era presente il gruppo OH. In questo caso il protone H-2' (δ_H 8.13 ppm) è accoppiato soltanto con il protone H-3'(δ_H 6.96 ppm), mentre nello spettro COSY del composto 13 il protone H-2' (δ_H 7.89ppm) era accoppiato con il protone H-3'(δ_H 6.93) e H-3 (δ_H 6.51ppm). Anche in questo caso un esperimento HMBC evidenzia che il protone anomerico del glucosio a δ_H 5.08 ppm, è correlato con il carbonio C-7 (δ 161.7 ppm) dello scheletro del Kamferolo. Lo spettro di massa ESI^+ presenta uno ione a *m/z*=449 u.m.a. che conferma il peso molecolare del composto pari a 448 u.m.a. e dal confronto con dati di letteratura [19] si è stabilito che il composto 14 è il Kamferolo 7-O-β-D-glucopiranoside.



14- Kamferolo 7-O-β-D-glucopiranoside

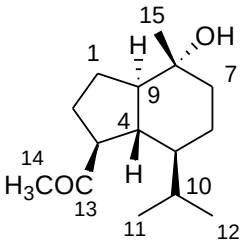
E' stato inoltre identificato il composto 15 come catechina.



15- Catechina

I dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR coincidevano con quelli riportati in letteratura [20]. La stereochimica di tipo trans tra l'OH in C-3 e il sistema aromatico in C-2 è stata dedotta dalla costante di accoppiamento tra il protone H-3 e H-2 (J=7.8 Hz); inoltre si osserva un NOE intenso tra i protoni H-8 e H-2. Dai dati ^{1}H e ^{13}C-NMR e insieme ai dati HMQC è stata possibile effettuare l'assegnazione completa delle risonanze di ciascun protone con i rispettivi atomi di carbonio. Lo spettro di massa ESI^{+} presenta uno ione a *m/z*=291 u.m.a. che conferma il peso molecolare del composto pari a 290 u.m.a. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 15, pag. 77).

Dal confronto dei dati ^{13}C-NMR del composto **16** con quelli riportati in letteratura [29] si evidenzia che essi sono molto simili; per tal motivo le molecole hanno lo stesso scheletro strutturale con uguale assetto conformazionale; ciò è ulteriormente confermato anche dai dati ottenuti dagli spettri bidimensionali.



16-Oplopanone

Dallo spettro ^{1}H-NMR del composto 16 si osserva la presenza di segnali che cadono nella zona tra δ_H 0.80 e 4 ppm, che rivelano la presenza di uno scheletro di natura terpenoidica, confermato anche dai dati di letteratura su composti isolati dalla medesima pianta. Nello spettro protonico sono presenti i segnali doppi doppietti a δ_H 1.73 e 1.36 ppm e a δ_H 1.57 e 1.10 ppm indicanti rispettivamente i protoni H_2-7 e H_2-6 e i segnali multipletti a δ_H 1.52 e 1.96 ppm relativi ai protoni H_2-2. Un esperimento ^{1}H-^{1}H COSY evidenzia che il protone H-3 (δ_H 2.73 ppm) è accoppiato con i protoni H_2-2, che risuonano a δ_H 1.96 ppm e 1.52 ppm, a loro volta accoppiati tra loro.

Inoltre un esperimento HMBC evidenzia che il protone H-3 (δ_H 2.73 ppm) è correlato con il carbonio C-13 (δ 213.6 ppm) e con il carbonio C-14 (δ 29.4 ppm).

Inoltre si osserva che i segnali singoletto relativi alle quattro funzioni metiliche sono cosi' correlati: gli H_3-11 (δ_H 0.91 ppm) correlano con il carbonio C-11 (δ 21.9 ppm); gli H_3-12 (δ_H 0.69 ppm) correlano con il carbonio C-12 (δ 15.6 ppm), gli H_3-14 (δ_H 2.21 ppm) correlano con il carbonio C-14 (δ 29.4 ppm), e gli H_3-15 (δ_H 1.15 ppm) correlano con il carbonio C-15 (δ 29.8 ppm).

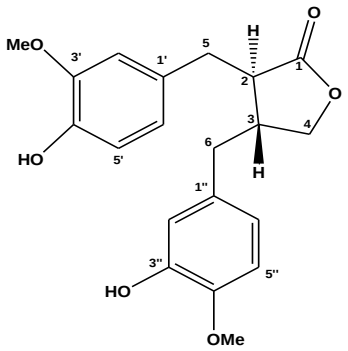
Un esperimento HSQC evidenzia le seguenti correlazioni dirette carbonio-idrogeno:

H (δ_H ppm)	C (δ ppm)
H_2-1,dd (1.43-1.99)	C-1 (21.1)
H_2-2,m (1.52-1.96)	C-2 (29.4)
H-3,m (2.73)	C-3 (56.4)
H-4,t (1.79)	C-4 (47.6)
H-5, ovl (1.10)	C-5 (50.4)
H-6,dd (1.10-1.57)	C-6 (23.5)
H-7, dd (1.36-1.73)	C-7 (42.4)
H-10,ovl (1.45)	C-10 (30.4)

ovl: segnale sovrapposto

Lo spettro di massa ESI^+ presenta uno ione a *m/z*=239 u.m.a. che conferma il peso molecolare del composto pari a 238 e insieme alle altre informazioni riportate si può affermare che il composto 16 è l'Oplopanone. (Tab. ^{13}C-NMR composto 16, pag. 78).

Il composto **17** è stato identificato come Matairesinolo, un lignano ad attività antitumorale [34] mai isolato in precedenza da questa pianta:



17-Matairesinolo

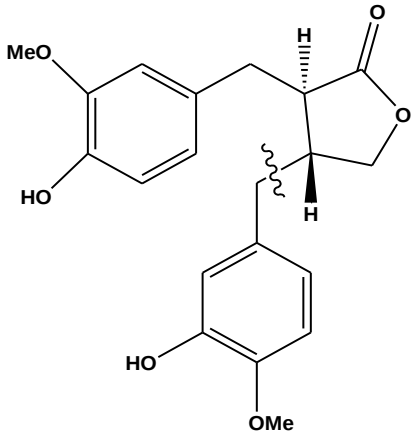
Nello spettro ^{1}H-NMR del composto **17** si rilevano la presenza dei seguenti segnali nella zona aromatica: il segnale doppietto del protone H-6'' a δ_H 6.53 ppm; il segnale singoletto del protone H-2' a δ_H 6.57 ppm e il segnale doppietto del protone H-5'' a δ_H 6.70 ppm, che evidenzia la presenza di sistemi aromatici. Si osservano inoltre i segnali tra 2 e 3 ppm, che rilevano l'esistenza di protoni alchilici e i tripletti a δ_H 3.92 e 4.18 ppm relativi ai protoni H_2-4.

Sono inoltre presenti i segnali a δ_H 3.79 e 3.80 ppm, relativi ai due metossili legati ai carboni C-4' e C-4''. Un esperimento ^{1}H-^{1}H-COSY evidenzia l'accoppiamento tra i protoni H_2-4 (δ_H 3.95 e 4.18 ppm) e il protone H-3 (δ_H 2.53 ppm) e l'accoppiamento tra il protone aromatico H-6'' (δ_H 6.53 ppm) e il protone H-5'' (δ_H 6.70 ppm). Uno spettro HMBC evidenzia la correlazione tran il protone H-6' (δ_H 2.55-2.91 ppm) con i carboni C-1', C-2', C-6', che risuonano rispettivamente a δ 131.1 ppm, a 112.9 e 121.9 ppm. Dal confronto con dati di letteratura [30] si è osservato che i segnali presenti nello spettro ^{13}C-NMR a 181.3 ppm e 72.6 ppm erano relativi al carbonile C-1 e al C-4 adiacente al lattone. Lo spettro di correlazione diretta HSQC ci ha consentito di assegnare i segnali a δ 35.0 e 38.7 ppm rispettivamente ai carboni aromatici C-5 e C-6; sono inoltre state dedotte dallo spettro HSQC le C-2' (δ 112.9 ppm), C-5' (δ 116.7 ppm), C-6' (δ 121.9 ppm), C-2'' (δ 113.5 ppm), C-5'' (δ 122.7 ppm) e C-6'' (δ 115.9 ppm) dei rispettivi carboni aromatici.

La correlazione a lunga distanza ^{1}H-^{13}C nell'HMBC confermano i dati riportati; ma è stata utilizzata soprattutto per l'assegnazione dei carboni quaternari.

L'accoppiamento tra il protone H-5' (6.70 ppm) e i segnali a 131.1 e 151.2 consente di stabilire l'assegnazione al carbonio C-1' e C-3'. L'accoppiamento tra il protone H-6' (6.53 ppm) e il segnale a 142.9 ppm consente di stabilire C-4', determinando in tal modo tutti i carboni quaternari dell'anello aromatico su C-5. L'assegnazione di C-1'', C-3'' e C-4'' sono stati fatti allo stesso modo. (Tab. ^{13}C-NMR composto 17, pag. 78).

Lo spettro di massa conferma l'ipotesi sull'identificazione strutturale di tale composto con la presenza nello spettro ESI^{+} di un ione a *m/z*=381 u.m.a., relativo all'addotto formato tra il composto e lo ione sodio. E' inoltre presente uno ione a *m/z*= 193 u.m.a. che indica la frammentazione della molecola cosi' come schematizzata in figura:



ATTIVITA' BIOLOGICA DELL'ACIDO IMBRICATOLICO

I diterpeni di natura labdanica sono stati isolati da diverse famiglie di piante e mostrano molti tipi di attività biologica [35], tra cui l'inibizione della proliferazione cellulare in diverse linee cellulari tumorali [36-37]. E' stata analizzata dal gruppo di ricerca del Prof. R. Ammendola dell'Università degli studi di Napoli Federico II, la bioattività dell'acido imbricatolico, il diterpene di natura labdanica isolato in maggiore quantità dalle bacche di *J. communis*. In particolare è stata studiata la capacità dell'acido Imbricatolico di indurre l'arresto della crescita cellulare in cellule di tumore anaplastico del polmone umano CaLu 6, prive della proteina p53.

La proteina p53, anche conosciuta come proteina tumorale 53, è un fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare e ricopre la funzione di soppressore tumorale. La sua funzione è particolarmente importante negli organismi pluricellulari per sopprimere i tumori nascenti. La p53 è stata descritta come "il guardiano del genoma" riferendosi al suo ruolo di preservazione della stabilità attraverso la prevenzione delle mutazioni. Deve il suo nome alla semplice massa molecolare: pesa infatti 53 kDa.

Nel ciclo cellulare in una cellula sana è possibile definire quattro fasi distinte G1, S (sintesi del DNA), G2 e M (mitosi, duplicazione cellulare). La fase G1 è una fase di accrescimento cellulare a cui segue la fase S in cui avviene la sintesi del DNA. Segue la fase G2 che è una ulteriore fase di accrescimento cellulare e poi la fase M che è la fase di mitosi in cui la cellula riproduce se stessa. La progressione del ciclo cellulare è influenzata da fattori esogeni (fattori nutritivi, di crescita, ormoni etc..) e fattori endogeni. Tra i fattori endogeni vi sono molecole responsabili della trasduzione di segnali indotti da fattori esogeni, e diverse proteine deputate al controllo della progressione del ciclo cellulare note come: cicline, chinasi dipendenti dalle cicline, loro inibitori e proteine dei check points. Le proteine dei check points inducono rallentamento o arresto della progressione del ciclo cellulare in modo che la cellula possa riparare eventuali danni oppure in alternativa, possa innescare l'apoptosi cellulare. Tutto ciò per evitare che una cellula con patrimonio genetico danneggiato possa duplicarsi e trasmettere l'errore alla sua progenie cellulare.

Nelle cellule sane la progressione del ciclo cellulare è regolata anche dalle cicline e dalle cicline-chinasi. I complessi cicline/CDK (chinasi dipendenti dalle cicline) facilitano la progressione attraverso il ciclo cellulare e sono attivati in specifici check-points [38]. Questi complessi sono inoltre regolati dal loro legarsi con inibitori CKI (CKIs) [39]. Il ciclo cellulare eucariotico è controllato quindi da una serie di eventi biochimici che coordinano la transizione delle cellule da una fase all'altra. In letteratura è riportato che i diterpeni di natura labdanica inibiscono la proliferazione delle cellule in diverse linee di tumori cellulari che esprimono la proteina p53 o che non la esprimono [36-37].

E' stato studiato dal gruppo di ricerca del Prof. Ammendola l'effetto dell'acido imbricatolico (4) sulla proteina $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$, proteina che inibisce il ciclo cellulare nelle cellule del tumore anaplastico di polmone umano CaLu-6, (cellule che non esprimono la proteina p53) [40]. La proteina $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ induce l'arresto del ciclo cellulare, attraverso l'inibizione dell'attività dei complessi cicline/cdk. L'espressione del gene $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ è regolata da meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali. La regolazione trascrizionale è caratterizzata dall'attivazione di pathway dipendenti da p53 in seguito al danno del DNA. In cellule tumorali prive di p53 o che esprimono una forma mutata di tale proteina, l'espressione di $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ è attivata attraverso vie indipendenti da p53.

Le cellule sono state incubate con acido imbricatolico 10 mM per intervalli di tempo crescenti e sono stati effettuati esperimenti di Western Blot. Il Western blot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici; per facilitare il riconoscimento la miscela di proteine viene prima separata in base al peso molecolare, utilizzando un gel di poliacrilammide. In seguito le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico. L'analisi dei Western Blot mostra un aumento della produzione della proteina $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ (tempo dipendente) con un accumulo massimo che si verifica dopo 12 ore di trattamento (Fig.II.4A).

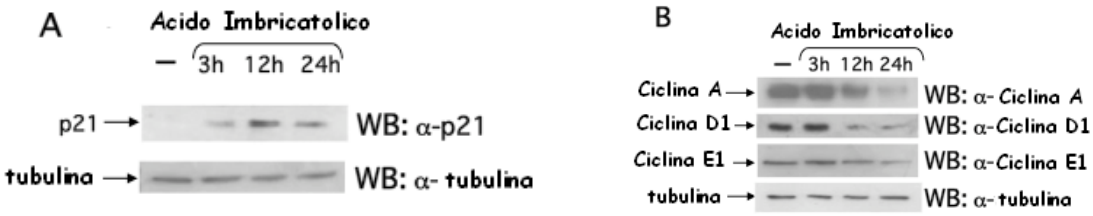


Fig.II.4: Le celule CaLu-6 sono state trattate con acido imbricatolico 10 mM secondo i tempi riportati in figura e 40 μg di lisato cellulare sono stati caricati su SDS PAGE al 2%. **(A):** la regolazione della proteina $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ è stata rilevata con anticorpi specifici**. (B)** Le cicline A, D1 e E1 sono state immunorilevate con anticorpi specifici. Un anticorpo di anti-tubulina è stato usato come controllo per le proteine caricate.

E' stato inoltre valutato l'effetto dell'acido imbricatolico sul livello della produzione delle cicline. Le CKI della famiglia Cip/Kip possono modulare le attività delle cicline D, E, e dei complessi A-CDK [37] che sono coinvolte rispettivamente nei checkpoints G1, G1/S e S.

Il trattamento delle cellule con il labdano mostra una significativa diminuzione dell'espressione delle cicline A, D1 e E1 in modo tempo dipendente (Fig.II.4B). I risultati mostrano l'accumulo degli inibitori delle chinasi dipendenti dalle cicline e la degradazione delle cicline A, D1 e E1. Questo suggerisce che l'acido imbricatolico ripristina il controllo del proprio chek points attraverso la modulazione delle cicline e dell'espressione dei loro inibitori. Per valutare l'effetto dell'acido imbricatolico sulla progressione del ciclo cellulare delle cellule CaLu-6, sono stati usati saggi MTT.

Il saggio MTT, dove l'acronimo indica il composto *bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio,* è un saggio colorimetrico utilizzato per misurare l'attività di enzimi (es. dell'enzima succinato deidrogenasi) che riducono l'MTT a formazano (un sale), conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo.

L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu). Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. Il saggio può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o di altri tipi di sostanze chimicamente attive.

Valutazioni della crescita cellulare basate su tale metodica hanno evidenziato che le cellule esposte per tempi differenti al labdano, mostrano una significativa inibizione della crescita in modo tempo dipendente (Figura II.5): diminuzione dell' 89.8, 53.4 e 41,4% rispettivamente dopo 3, 12 e 24 ore. L'analisi complessiva dei dati degli esperimenti di Western blot e dei saggi dell'MTT ha suggerito che l'acido imbricatolico ha un effetto citostatico sulle cellule CaLu-6, ma non apoptotico.

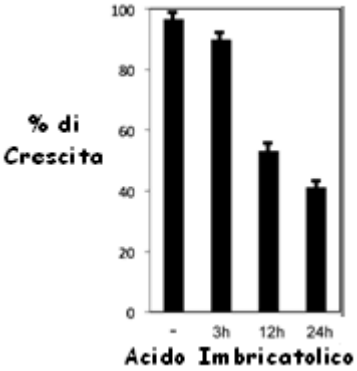


Figura II.5: La crescita delle linee cellulari di cellule CaLu-6 è stata valutata attraverso analisi spettrofotometrica usando metodi MTT. Le cellule CaLu-6 sono state poste in 96 piastre per 3, 12, 24 ore con un mezzo di coltura completo contenente acido Imbricatolico. La soluzione MTT è stata aggiunta a ciascuna piastra e i cristalli formati sono stati poi dissolti e ne è stata misurata la relativa assorbanza a λ=450 nm. Sono stati effettuati quattro esperimenti indipendenti.

I risultati degli esperimenti effettuati dal gruppo di ricerca del Prof. Ammendola evidenziano dunque che l'acido imbricatolico induce l'arresto della crescita nelle cellule del tumore anaplastico di polmone umano CaLu-6, poiché agisce nel passagio da G1 a S del ciclo cellulare, determinando una diminuzione della produzione delle cicline (che sono responsabili della progressione del ciclo cellulare) e contemporaneamente causa un aumento della produzione di $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$, proteina che induce l'arresto del ciclo cellulare, e che normalmente viene biosintetizzata da p53. Ciò significa che nelle cellule tumorali che mancano di p53, la proteina $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ viene biosintetizzata attraverso un percorso biosintetico indipendente. Altri studi sono in corso per valutare il ruolo indotto dai labdani sul percorso biosintetico di $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$.

PARTE SPERIMENTALE

Estrazione:

800 g di bacche mature di *Juniperus communis* (dal colore violaceo), prelevate nel comune di Colli a Volturno (IS) nell'ottobre del 2007 e identificate dalla Dott. Paola Fortini del Dipartimento STAT (Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio) dell'Università degli studi del Molise, sono state estratte per 3 volte con 2L di MeOH per volta; l'estratto metanolico ottenuto è stato filtrato (circa 6L) e portato a secco ottenendo 350g di estratto metanolico. 200g di estratto metanolico sono stati sottoposti a metodica di Kupchan [16]: ai 200g di estratto si è aggiunto 500 ml di una soluzione MeOH:H_2O, 9:1 (450 ml MeOH, 50 ml di H_2O) ed estratto per 3 volte con 300 ml di esano, ottenendo un estratto esanico di circa 32g.

In seguito si modula la miscela 9:1 aggiungendo una quantità tale d'acqua fino ad arrivare a un rapporto 7:3, MeOH:H_2O e si estrae per 3 volte con $CHCl_3$ (250 ml per volta) ottenendo 20g di estratto cloroformico; quindi si elimina tutto il MeOH dalla fase acquosa e si estrae per 3 volte con butanolo ottenendo circa 35g di estratto butanolico e 40 g di estratto acquoso.

Purificazione estratto cloroformico

1.5g di estratto cloroformico sono stati sottoposti a DCCC, cromatografia liquida in controcorrente a gocce, in cui la fase organica è costituita da $CHCl_3$/MeOH/H_2O, 7:13:8, nella fase ascendente (la fase discendente era la fase stazionaria) ottenendo 216 provette, riunite, sulla base del comportamento comune su TLC in 24 frazioni. La frazione n. 9 è stata separata in HPLC a fase inversa, su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 1:1, ϕ= 1.3 ml/min, ottenendo 4 picchi; dagli spettri NMR è stato identificato il secondo picco come Matairesinolo (17), 1.2 mg.

La frazione n.14 è stata purificata in HPLC, su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 7:3, ϕ=1.3 ml/min, ottenendo un cromatogramma con 3 picchi maggiori e dagli spettri NMR il primo picco è stato identificato come Oplopanone (16), 1.5 mg. Il secondo picco è stato ulteriormente cromatografato in HPLC su colonna Luna Phenomenex, 3 micron, con miscela MeOH:H_2O, 8:2, ottenendo 2 picchi, il secondo dei quali identificato grazie agli spettri NMR come Agatadiolo (6), 1.7mg. Il composto (6) è stato ottenuto anche dalla frazione n.16 della DCCC cloroformica, cromatografata su colonna C-18 μbondapack, eluente MeOH:H_2O, 7:3, ϕ=1 ml/min, ottenendo 9 frazioni, la n.6 era ancora l'Agatadiolo, 1.4 mg.

La frazione n. 15 è stata sottoposta ad HPLC, eluendo con miscela MeOH:H_2O, 7:3, colonna C-18 μbondapack, ϕ=1 ml/min, ottenendo 5 picchi, il quinto dei quali corrispondente al composto acido Imbricatolico (4), 5.8 mg. L'acido Imbricatolico è stato ritrovato anche nelle frazioni 14, 16, 17, 19, 21, 23 della DCCC cloroformica, cromatografate ognuna su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 70:30, ϕ=1.2 ml/min; è stato inoltre ritrovato anche in una frazione proveniente dall'estratto BuOH: infatti la frazione n.29 della DCCC butanolica, è stata purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 1:1, ϕ=1.2 ml/min, la frazione n.5 è stata ulteriormente cromatografata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 8:2, ϕ=1ml/min, ottenendo 9 frazioni, la quinta era ancora l'acido Imbricatolico, 1.8 mg. La frazione n. 19 è stata purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, miscela MeOH:H_2O, 7:3, ϕ=1.2 ml/min, ottenendo 8 frazioni, delle quali la prima ulteriormente cromatografata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 45:55, ϕ=1 ml/min, ottenendo 8 frazioni, la quarta identificata grazie agli spettri NMR come acido Iunicedrico (8), 1.8 mg.

La frazione n. 23 è stata sottoposta ad HPLC su colonna C-18 μbondapack, MeOH:H_2O, 8:2, ϕ=1 ml/min, ottenendo 16 frazioni, l'undicesima delle quali corrispondente al composto (10), mentre la nona conteneva ancora l'acido Imbricatolico, 1.5 mg. Delle 16 frazioni, la frazione n. 3 è stata ulteriormente purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 75:25, ϕ=1 ml/min ottenendo 4 frazioni, la terza identificata grazie agli spettri NMR come aldeide Imbricatolica (5), 1.6 mg, aldeide Isoagatolale (7), 1.4 mg, aldeide Iunicedrica (9), 1.6 mg.

La frazione n. 7 è stata ulteriormente purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 75:25, ϕ=1 ml/min ottenendo 6 frazioni, la terza delle quali corrispondente alla miscela di composti acido Sandacopimarico (11),1.2 mg e acido Isopimarico (12), 0.8 mg.

Purificazione estratto esanico

2.9g di estratto esanico sono stati cromatografati su colonna di gel di silice (circa 60g di silice) ottenendo 78 provette, eluendo con n-esano fino alla provetta n.9, 4% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 15, 5% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 27, 10% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 40, 12% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 50, 20% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 55, 25% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 62, 28% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 68, 30% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 71, e infine con 100 ml di acetato d'etile e 200 ml di MeOH per effettuare il lavaggio finale della colonna. Sulla base delle TLC delle 75 provette sono state effettuate 13 riunioni. La frazione n. 2 (mg 150) ottenuta dalla cromatografia su colonna, è stata ulteriormente ricromatografata su colonna di gel di silice (circa 40g di gel di silice), ottenendo 78 provette ed eluendo con esano fino alla provetta n.42; con 1% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 50, con 2% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 57, con 5% acetato d'etile-esano fino alla provetta n. 70, 100% acetato d'etile fino alla provetta n.78, ed infine eluendo con 100 ml di acetato d'etile per effettuare il lavaggio della colonna. Sulla base delle TLC intermedie sono state effettuate le seguenti riunioni. La frazione n. 10, eluita con acetato d'etile, è stata passata in HPLC, su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O 8:2, ϕ=1.3 ml/min, ottenendo 10 frazioni.

La frazione n. 6 e n.7 è stata ulteriormente cromatografata in HPLC su colonna 3 micron, Luna-Phenomenex, ottenendo altre 7 frazioni. La frazione n. 4 è stata identificata grazie agli spettri NMR come acido *cis* Communico (2), 2.8 mg.

Purificazione estratto butanolico

2g di estratto butanolico sono stati purificati attraverso DCCC nelle seguenti condizioni: n-BuOH/Me_2CO/H_2O, 3:1:5, nella fase discendente (la fase ascendente è la fase stazionaria); in tal modo le frazioni vengono a essere eluite in ordine decrescente di polarità. Sono state ottenute 320 provette, riunite sulla base delle TLC intermedie in 24 riunioni. La frazione n.9 della DCCC è stata identificata come aldeide *cis*-Communica (3), 1.4 mg. La frazione n. 22 è stata passata in HPLC, su colonna C-18 μbondapack, ϕ=0.8 ml/min, con miscela MeOH:H_2O, 40:60, ottenendo 10 frazioni, la quarta identificata grazie agli spettri NMR come Juniperoside A (1), 1.3 mg. La frazione n. 23 è stata passata in HPLC, su colonna C-18 μbondapack, ϕ=0.8 ml/min, con miscela MeOH:H_2O, 1:1, ottenendo 13 frazioni, la terza identificata grazie agli spettri NMR come Catechina (15), 1.4 mg. La frazione n. 24 e 25 sono state passate entrambe in HPLC, su colonna C-18 μbondapack, ϕ=0.8 ml/min, con miscela MeOH:H_2O, 1:1, ottenendo per la numero 25, 12 frazioni, l'ottava identificata grazie agli spettri NMR come Apigenina 7-O-β-D-glucopiranoside (13), 1.9 mg, mentre per la numero 26 si sono ottenuti sette picchi, il sesto identificato come Kamferolo-7-O-β-D-glucopiranoside (14), 1.0 mg.

Procedure generali degli esperimenti

Gli spettri IR (KBr) sono stati misurati su uno spettrofotometro modello Brucker IFS-48. Gli spettri UV sono stati ottenuti in CH_3CN usando uno spettrofotometro Beckman DU70.

La spettrometria di massa High-resolution fast atom bombardment (HRFAB-MS) è stata effettuata su strumento Fisons VG Prospec e la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica (ESI-MS) è stata realizzata su spettrometro con triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000. Il potere ottico roratorio è stato misurato su un polarimetro Jasko P-2000. Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati realizzati su un apparecchio Varian Unity INOVA a 500.13 e 125.77 MHz, rispettivamente. I chemical shifts erano riferiti al segnale del solvente metanolo deuterato (CD_3OD,δ_H 3.31 ppm). Le correlazioni omonucleari ^1H-^1H sono state determinate mediante esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari ^1H-^{13}C sono state determinate con esperimenti HSQC.

Le correlazioni ^{1}H-^{13}C attraverso due e tre legami sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per $^{2,3}J$ di 8.0 Hz. Le analisi gas cromatografiche sono state realizzate su strumento Agilent Technologies 6850, Serie II gas cromatografo, con colonna capillare (HP-5, 30 m x 0.25 mm, 180°; velocità di flusso del gas carrier elio di 10 mL min^{-}1) e con detector FID che operava a 260°. 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 una pompa Waters 510, con un iniettore Waters U6K e un indice di rifrazione Waters 401 come rivelatore, usando una colonna C_{18} μ-bondapak (30 cm x 3.9 mm; i.d.; velocità di flusso di 1 mL min^{-1}; Waters, Milford, MA, USA); e colonna Luna C-18 (3μ, 150 mm x 4.60 mm i.d.; velocità di flusso di 1 mL min^{-1}; Phenomenex, Torrance, CA, USA). La purificazione dei prodotti è stata ottenuta attraverso cromatografia su colonna solido-liquido utilizzando come fase stazionaria gel di silice (Macherey-Nagel 70-230 mesh) e come fase mobile miscele di *n*-esano/etil-acetato. I profili di eluizione delle cromatografie su strato sottile TLC sono stati definiti tenendo conto dei valori di Rf ricavabili dalle TLC con Kiesegel 60 F_{254} e rilevate nebulizzando le TLC con una prima soluzione al 5% in volume di H_2SO_4 in etanolo e una seconda soluzione al 5% in peso di vanillina in etanolo. Per le TLC sono state usate lastre di silice Merck del tipo Kieselgel 60 F_{254}, 0.25 mm. Le TLC sono state fatte salire in eluente $CHCl_3$, MeOH, H_2O, in rapporto 80:18:2, per le frazioni meno polari; le frazioni più polari invece sono state fatte migrare in eluente: BuOH:CH_3COOH:H_2O, in rapporto 60:25.15.

Materiali esperimenti, reagenti e trattamenti di colture cellulari: i reagenti SDS-PAGE provenienti da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Cellule di tumore del polmone anaplastico CaLu-6 sono state acquistate presso ATCC (Rockville, MD, USA) e cresciute in mezzo di cultura Dulbecco e Eagle modificato (DMEM) che conteneva 10% di siero fetale di bovino (FBS), 100 U/mL di penicillina e 100 μg/mL di streptomicina, 1% di L-glutammina,e 1% di mezzo di Eagle modificato (MEM). Le cellule sono state cresciute fino a che raggiungessero l'80% della confluenza e successivamente trattate con acido Imbricatolico a concentrazione 10 μM per tempi differenti come indicato nella figura II.5.

Analisi dei Western Blot: le cellule CaLu-6 sono state lavate a freddo con tampone di fosfato di sodio (PBS: 50 mM, pH 7.4, 100 mM NaCl, e 10 mM KCl) e lisate con 0,5 ml di tampone RIPA contenete soluzioni 50 mM di tris-HCl (pH 7.4), 150 mM di NaCl, 1 mM EDTA, 0,25% di sodio deossicolato, 1 mM di NaF, una soluzione 10 μM di Na_3VO_4, una soluzione 1mM di fenilmetilsulfonilfluoruro, un cocktail di inibitori di proteasi (10 μg/ aprotinina, 10 μg/mL pepstatina, 10 μg/mL leupeptina).Gli esperimenti Western blot sono stati effettuati anche sulle cellule nel modo in cui è stato descritto in precedenza [18]. L'espressione delle proteine marcate è stata rilevata attraverso kit del tipo ECL e visualizzate attraverso autoradiografia.

Test per valutare la crescita cellulare: l'effetto dell'acido Imbricatolico sulla crescita delle cellule tumorali è stato analizzato attraverso metodi MTT. Le cellule Calu-6 sono state poste in piastre a 4 x 10^4 cellule per ciascuna, in 200 μl di mezzo di coltura completo contenente acido Imbricatolico 10 μM in 96 piastre (Corning U.S.A.) per 3, 12 e 24 ore. In seguito a incubazione a 37°C in incubatore umidificato, è stato aggiunto 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazoliumbromuro (MTT; 5 mg/ml in PBS) a ciascuna piastra e incubate per 4 ore. In seguito ad attenta rimozione del mezzo di coltura, sono stati aggiunti a ciascuna piastra 0.2 ml di DMSO. Il controllo negativo è stato ottenuto con soltanto DMSO per lo stesso tempo. L'assorbanza è stata misurata con un lettore di micro piastre a lunghezza d'onda di 540 nm. L'effetto dell'acido Imbricatolico sull'inibizione della crescita è stata stimata come % di crescita delle cellule confrontate con la crescita di cellule trattate soltanto con DMSO al 100%. Il DMSO alle concentrazioni usate non ha effetti sulla viabilità cellulare. Sono stati realizzati quattro esperimenti indipendenti.

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR dell'acido *cis* Communico (2), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H /ppm (*J in Hz*)	δ_C /ppm
1	1.16, m-1.88, m	40.4
2	1.92 (ax),m-1.50 (eq), m	21.1
3	1.05,(ax), ddd (16.2, 13.1, 3.1) 2.13,(eq),m	39.3
4	-	44.5
5	1.35, br d	57.3
6	1.92 (ax), ovl*-2.00 (eq), ovl	27.2
7	2.39, br d-1.93, ovl	39.6
8	-	148.6
9	1.73, ovl	58.0
10	-	40.5
11	2.46-2.18, ovl	23.0
12	5.30, t (6.4)	132.4
13	-	131.6
14	6.83, dd (10.9, 17.9)	134.9
15	5.18, d (17.2) 5.07 d (10.9)	113.2
16	1.75, s	19.7
17	4.46, s - 4.82, s	107.7
18	1.18, s	29.4
19	-	182.1
20	0.70, s	13.2

Ovl=segnale sovrapposto

Dati ^{13}C-NMR dell'acido Imbricatlico (4), dell'acido Iunicedrico (8) e dell'acido Mircecommunico (10), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_C/ppm (4)	δ_C/ppm (8)	δ_C/ppm (10)
1	40.2	39.1	39.8
2	20.8	19.9	19.2
3	39.2	37.9	38.5
4	44.8	44.2	44.2
5	57.3	56.3	56.7
6	27.3	26.0	26.6
7	39.7	38.7	38.7
8	147.4	147.9	148.7
9	57.6	56.5	56.0
10	41.3	40.5	40.2
11	21.9	21.7	22.6
12	37.2	36.8	30.3
13	31.0	31.1	147.3
14	40.2	41.6	139.1
15	60.8	181.4	114.9
16	19.9	21.1	114.7
17	106.3	106.6	105.6
18	29.5	28.9	29.8
19	181.2	184.1	180.8
20	13.0	12.9	12.4

Dati ^{13}C-NMR dell'acido Sandarocopimarico (11), e dell'acido Isopimarico (12), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_C/ppm (11)	δ_C/ppm (12)
1	38.9	38.5
2	17.9	18.2
3	36.9	37.7
4	46.0	49.1
5	50.6	50.8
6	25.1	25.1
7	120.9	35.2
8	135.6	136.9
9	51.9	50.8
10	39.1	38.6
11	21.4	18.8
12	35.4	34.7
13	38.1	37.7
14	46.0	129.4
15	129.2	46.0
16	149.8	110.4
17	21.4	26.3
18	17.0	15.5
19	185.6	185.9
20	15.23	13.1

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR dell'Apigenina 7-O-β-D-glucopiranoside (13), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H /ppm (*J* in Hz)	δ_C/ppm
1	-	-
2	-	165.2
3	6.51,s	102.8
4	-	183.9
5	-	159.2
6	6.83,s	100.0
7	-	162.1
8	6.66,s	100.0
9	-	147.7
10	-	106.4
1'	-	122.2
2'	7.89,d (8.9)	128.5
3'	6.93, d (8.9)	116.7
4'	-	162.1
5'	6.93,d (8.9)	116.7
6'	7.89,d (8.9)	128.5
1''	5.08, d (7.8)	100.8
2''	3.50, m (8.5)	74.7
3''	3.42, m (8.5)	77.5
4''	3.42, m (10.1)	70.5
5''	3.56, m (10.1)	78.4
6''	3.72, m-3.94, dd (8.7)	62.1

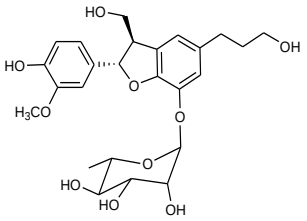
Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR della Catechina (15), CD_3OD, 500 MHz

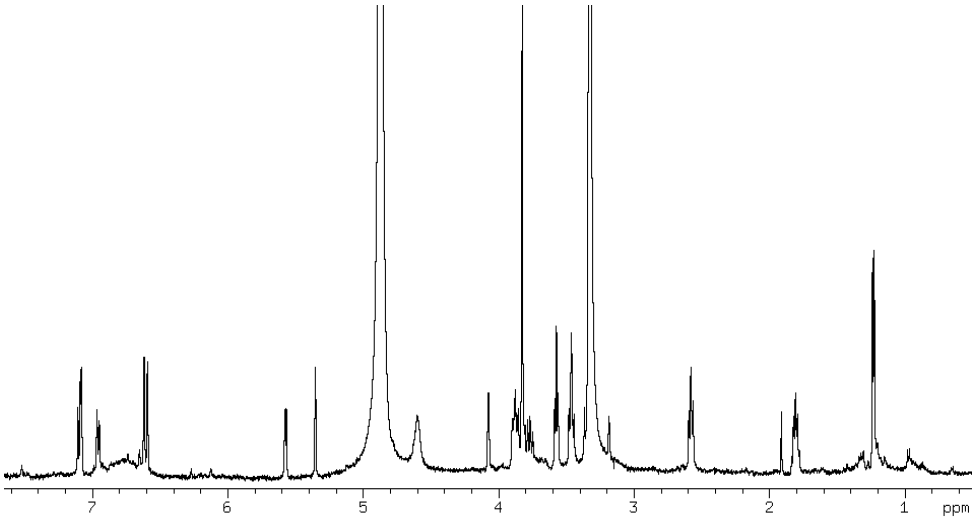
Posizione	δ_H/ppm (*J in Hz*)	δ_C/ppm
1	-	-
2	4.56, d, (7.8)	82.7
3	3.99, d, (7.8)	66.3
4	2.91-2.53, dd, (16.1)	28.8
4a	-	100.6
5	-	157.7
6	6.02, br s, (2.3)	96.1
7	-	157.7
8	5.88, br s, (2.3)	95.5
8a	-	156.9
1’	-	132
2’	6.89, br s, (1.9)	115
3’	-	145
4’	-	145
5’	6.79, d, (8.1)	115
6’	6.75, d, (8.1)	120

Dati ^{13}C-NMR dell'Oplopanone (16) e del Matareisinolo (17), CD_3OD, 500 MHz

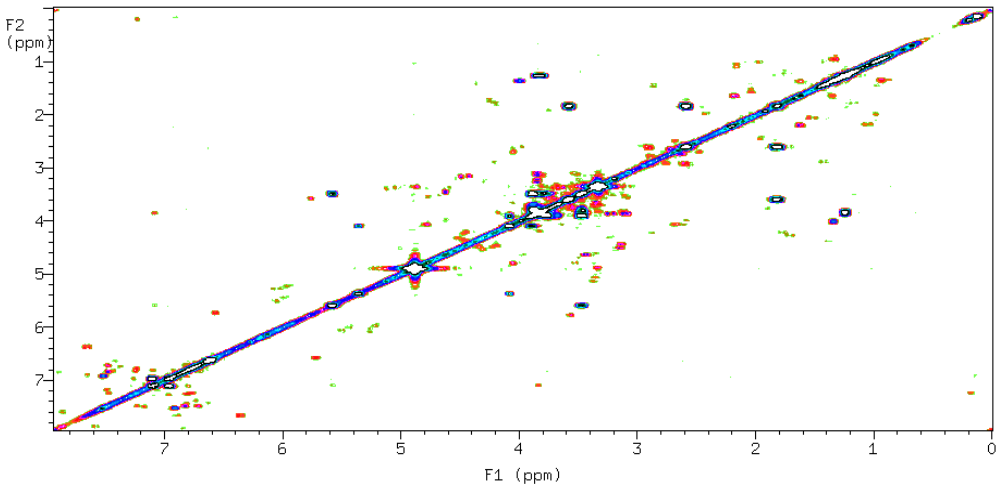
Pos.	δ_C/ppm (16)	Posizione	δ_C/ppm (17)
1	21.1	1	181.3
2	29.4	2	47.5
3	56.4	3	42.3
4	47.6	4	72.6
5	50.4	5	35.0
6	23.5	6	38.7
7	42.4	1'	131.1
8	73.0	2'	112.9
9	57.7	3'	151.2
10	30.4	4'	142.9
11	21.9	5'	116.7
12	15.6	6'	121.9
13	213.6	1''	130.4
14	29.4	2''	113.5
15	29.8	3''	151.2
		4''	142.7
		5''	122.7
		6''	115.9
		C-4'- OMe	56.1
		C-4''-OMe	56.2

^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 1- Juniperoside A

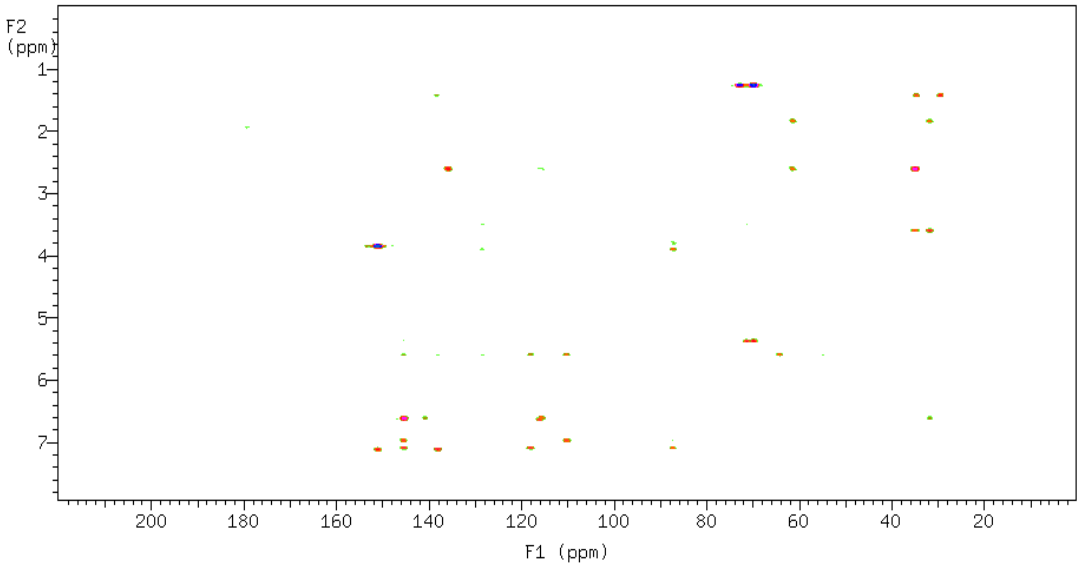




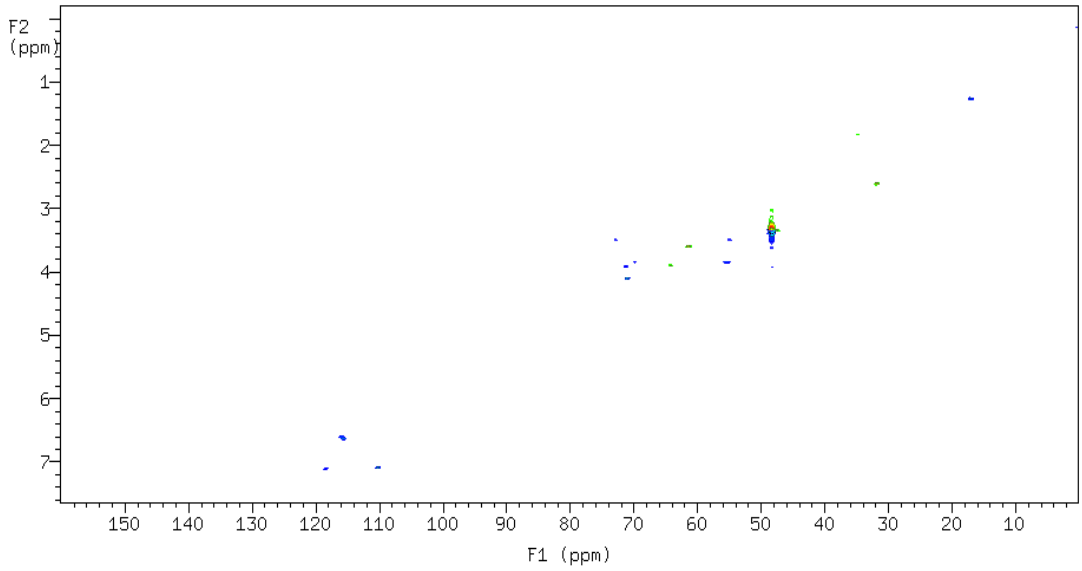
2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 1- Juniperoside A



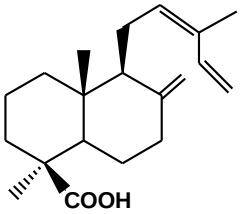
2D NMR HMBC, CD_3OD, 500 MHz, 1- Juniperoside A

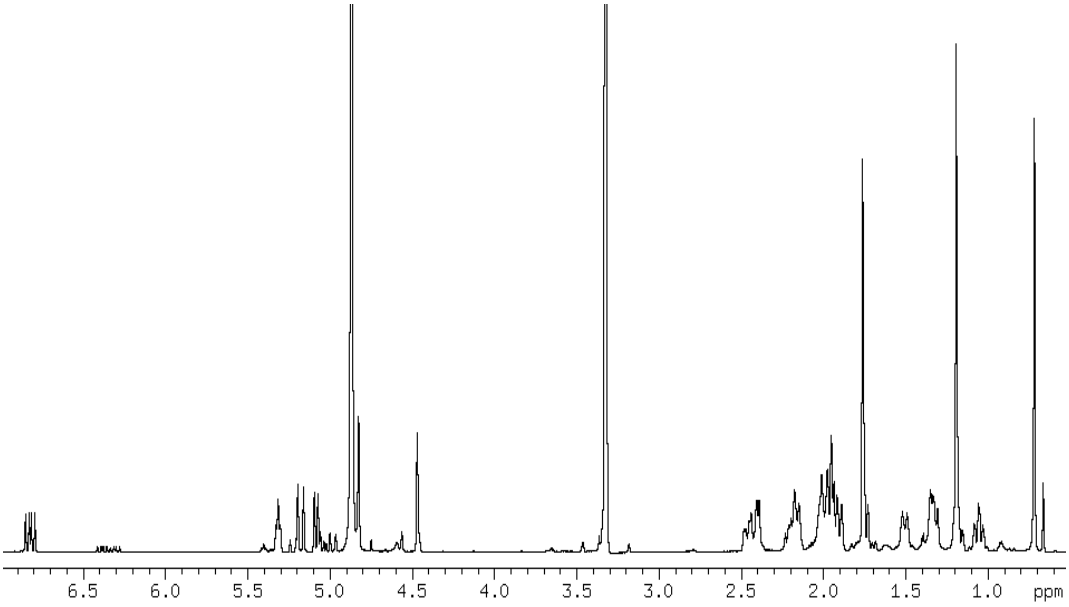


2D NMR HSQC, CD_3OD, 500 MHz, 1- Juniperoside A

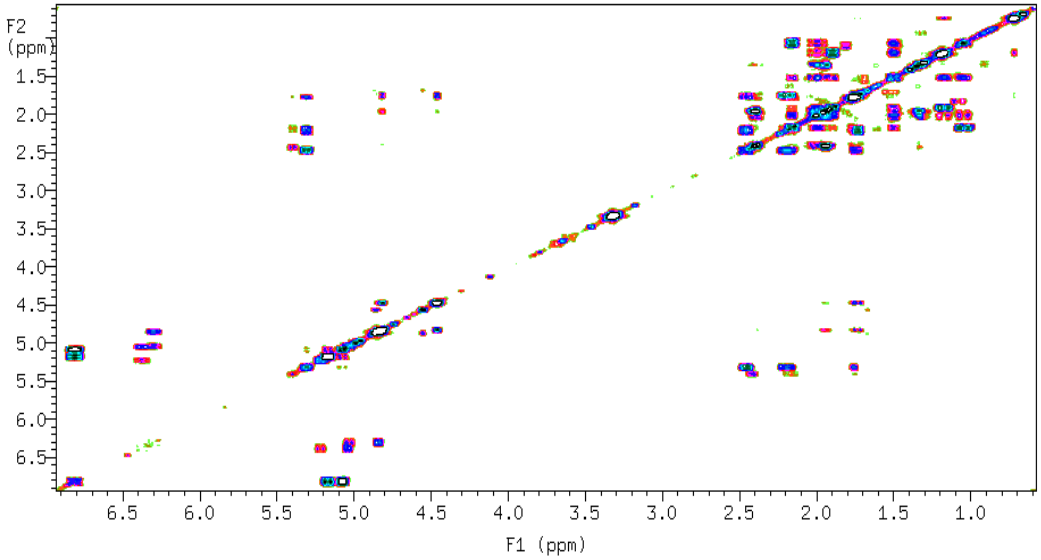


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 2- Acido *Cis*- Communico

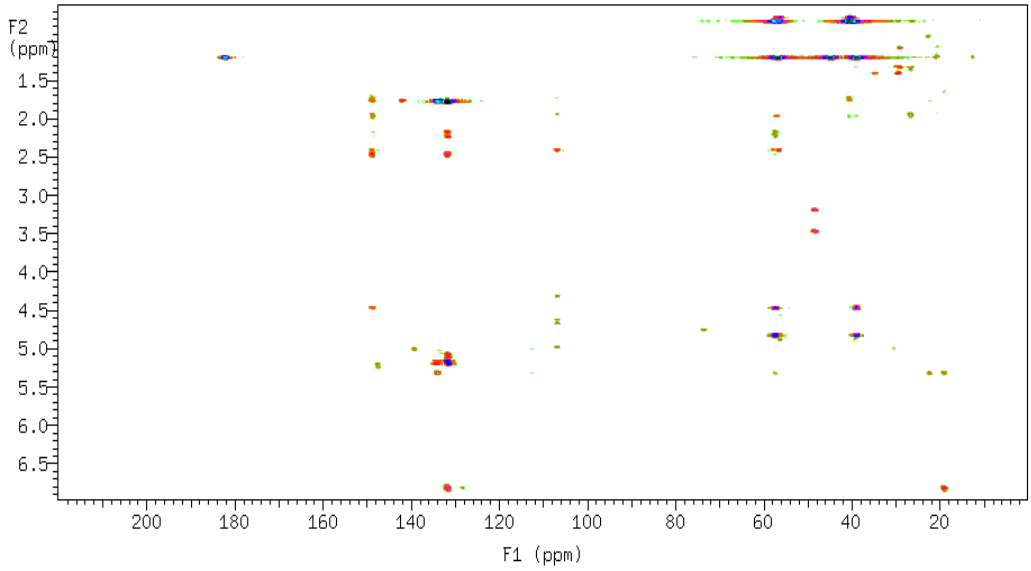




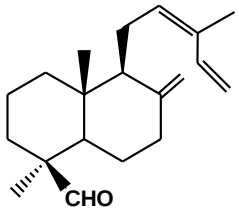
2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 2- Acido *Cis*-Communico

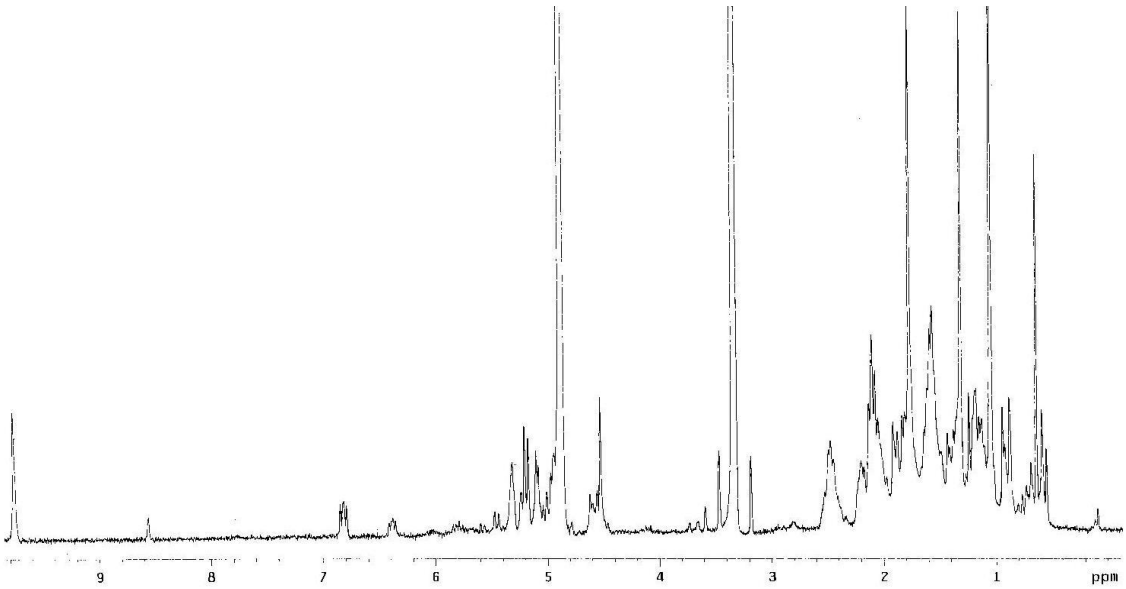


2D NMR HMBC, CD_3OD, 500 MHz, 2- Acido *Cis*-Communico

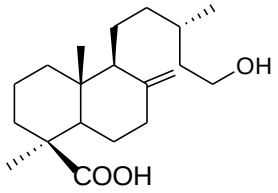


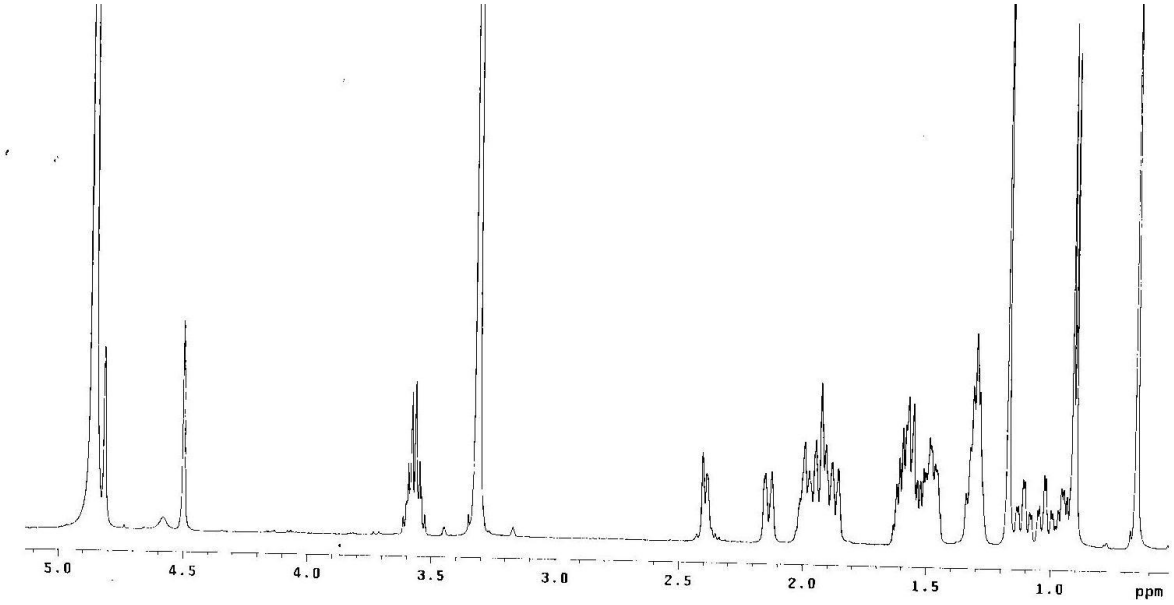
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 3- Aldeide *Cis*-Communica



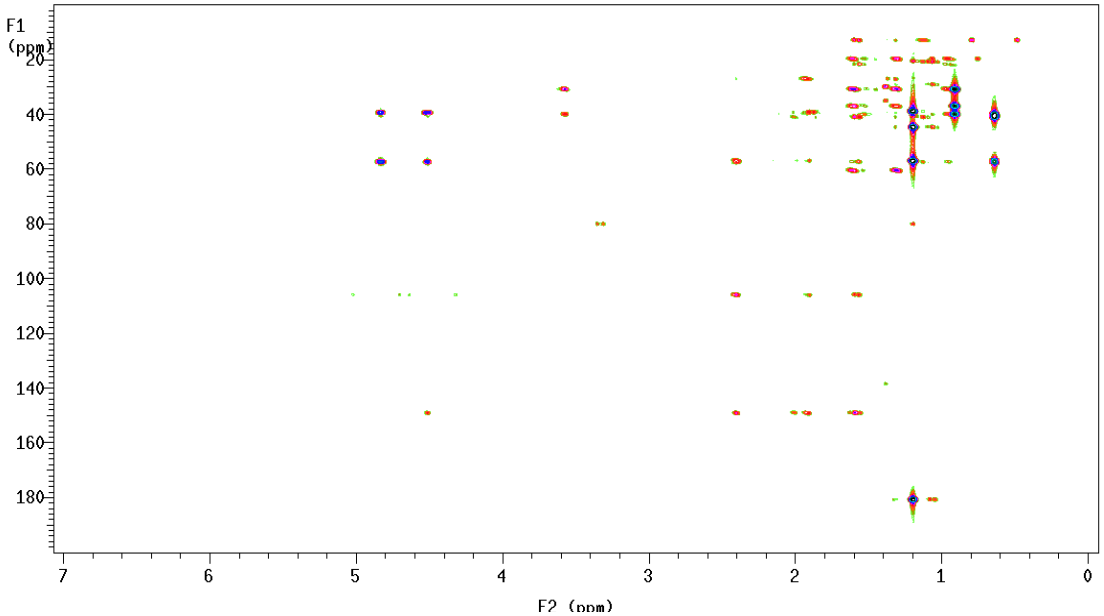


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 4- Acido Imbricatolico

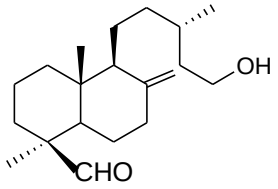


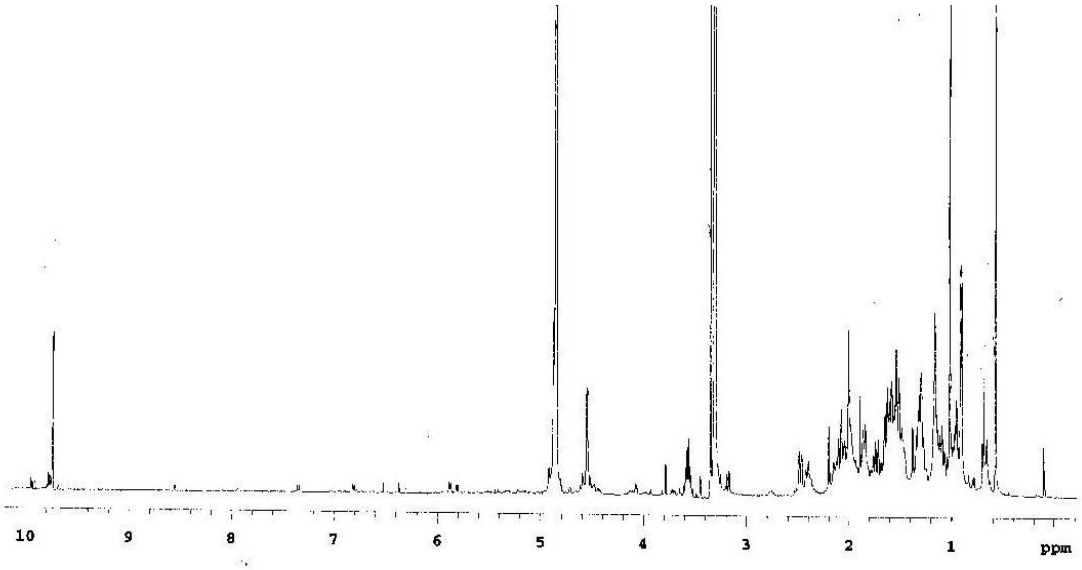


2D NMR HMBC, CD_3OD, 500 MHz, 4- Acido Imbricatolico

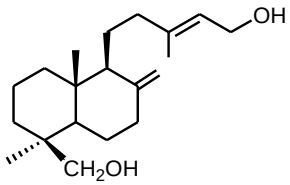


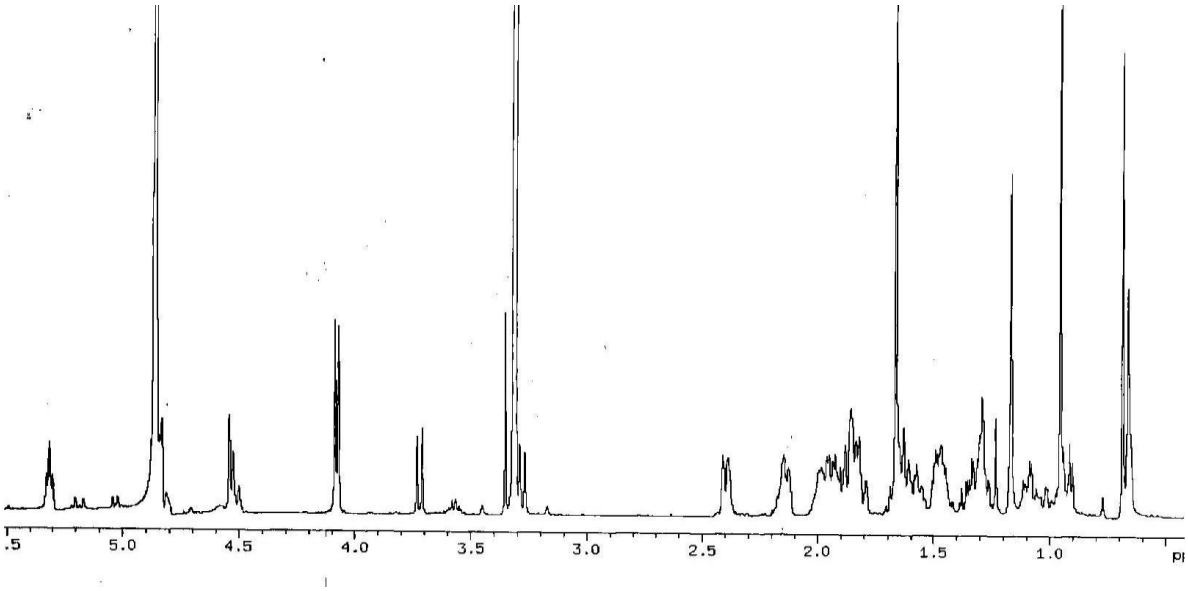
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 5- Aldeide Imbricatolica



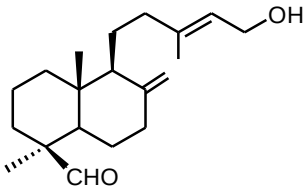


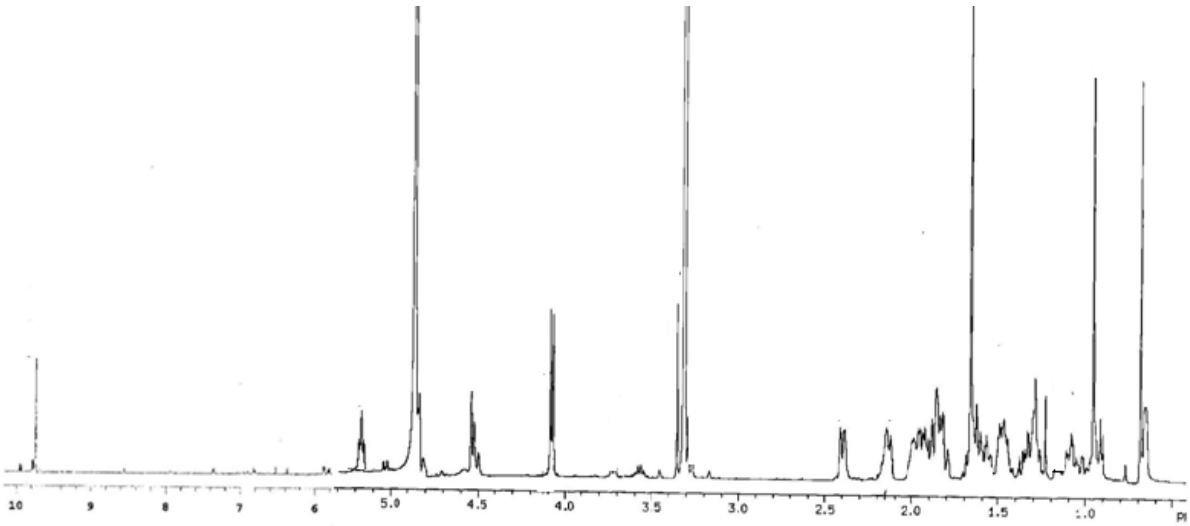
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 6- Agatadiolo



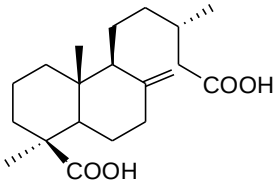


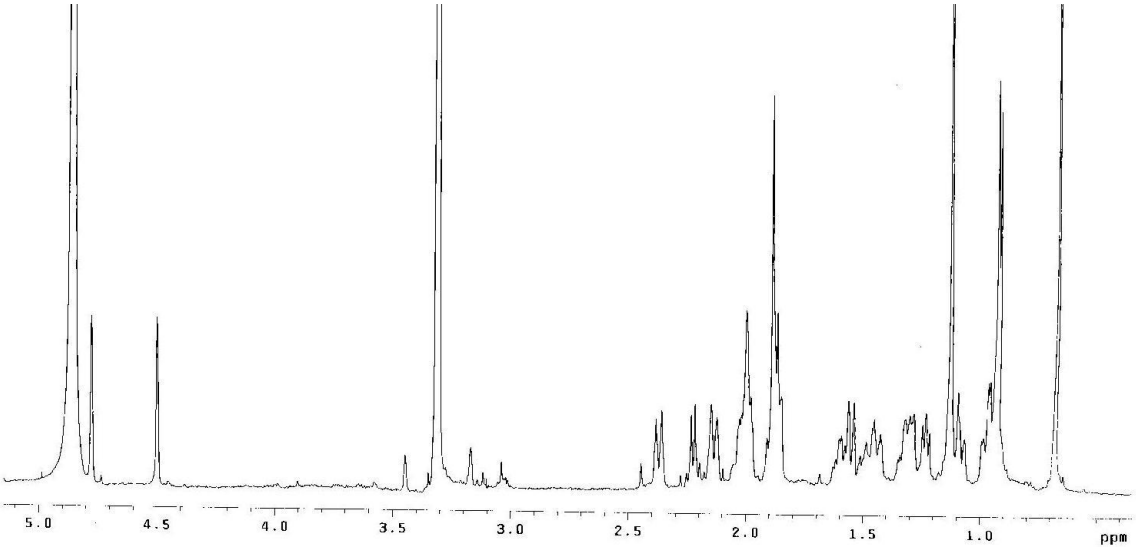
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 7- Aldeide Isoagatolale



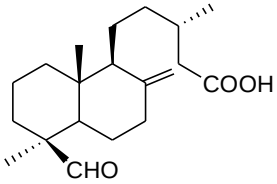


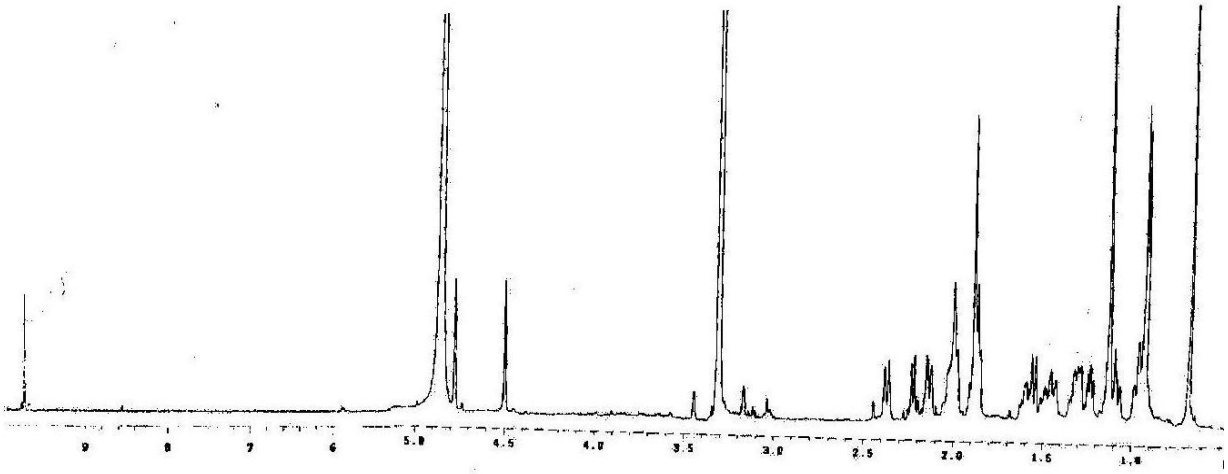
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 8- Acido Iunicedrico



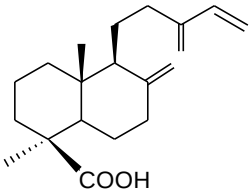


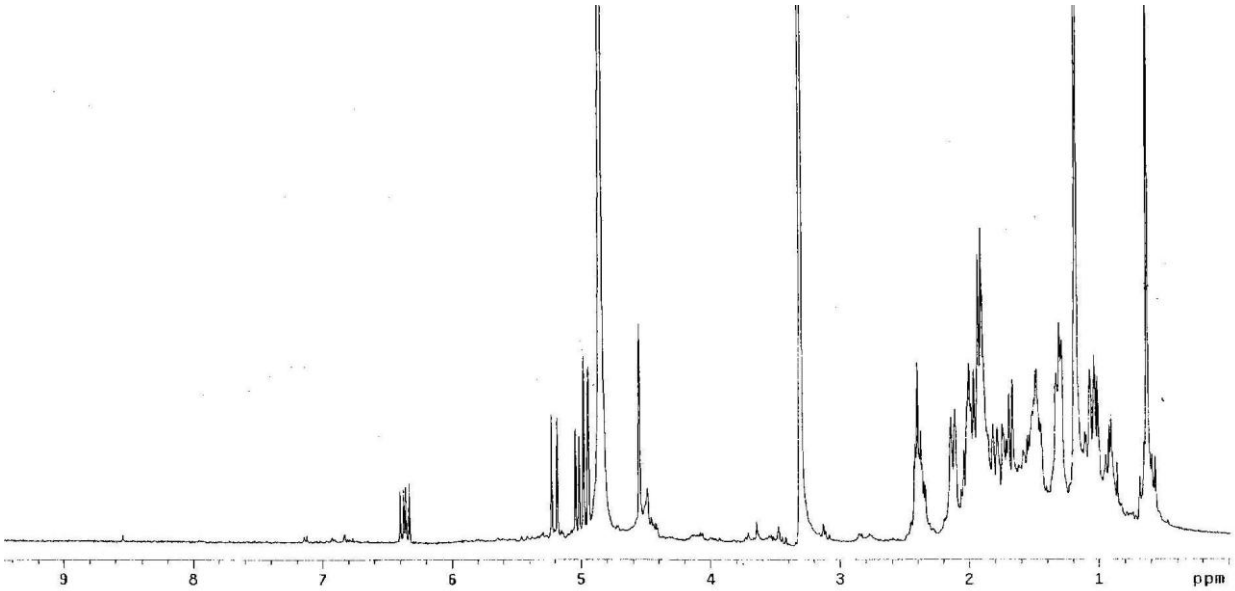
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 9- Aldeide Iunicedrica



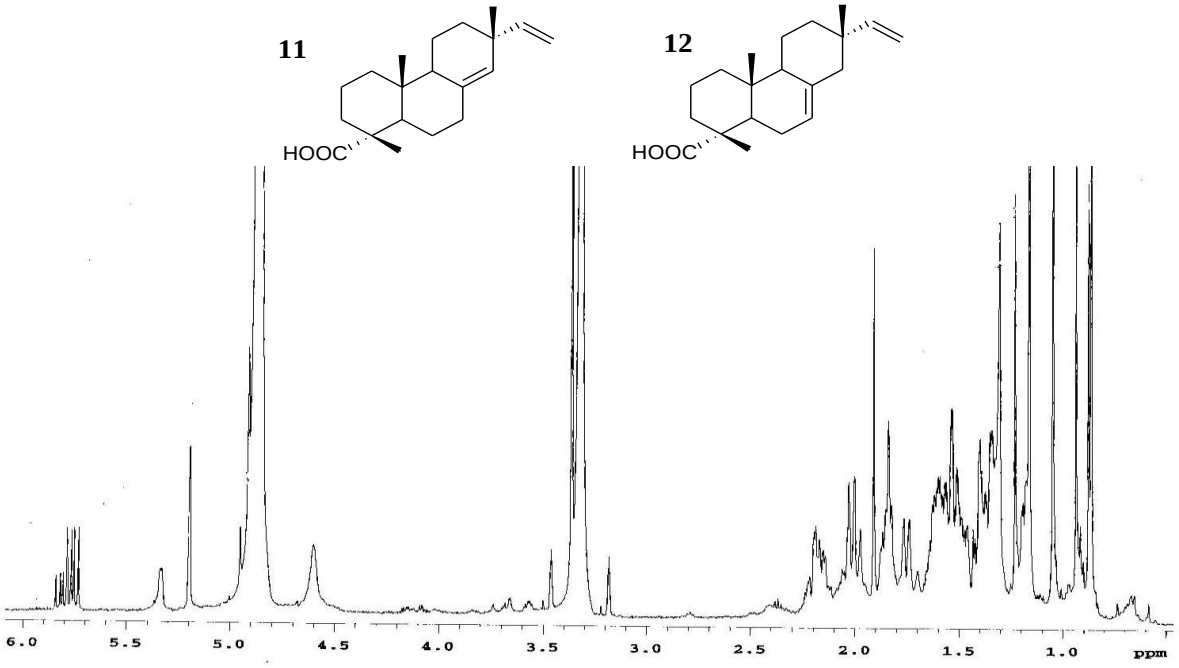


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 10- Acido Mirececommunico

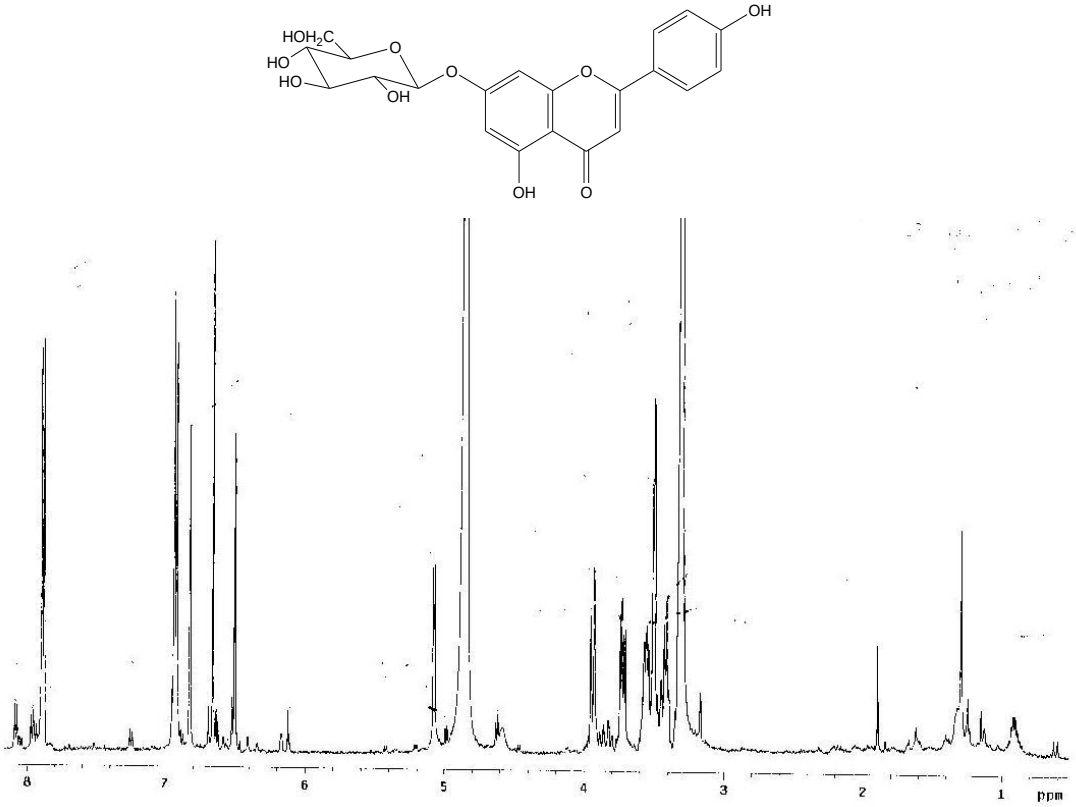




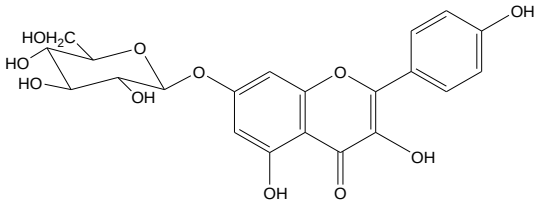
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 11- Acido Sandarocopimarico e 12- Acico Isopimarico

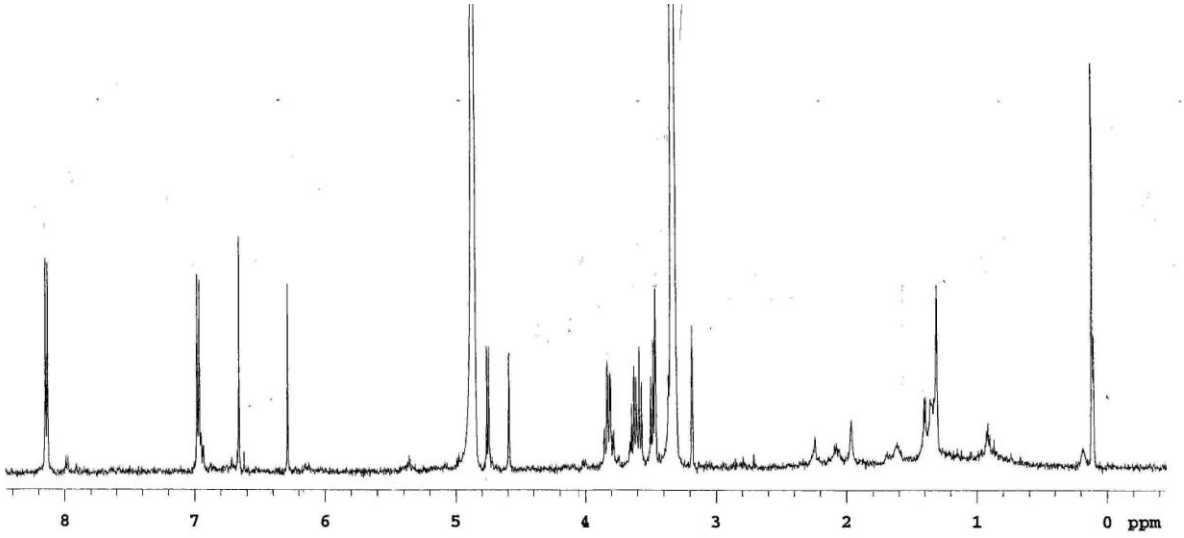


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 13- Apigenina 7-O-β-D-glucopiranoside

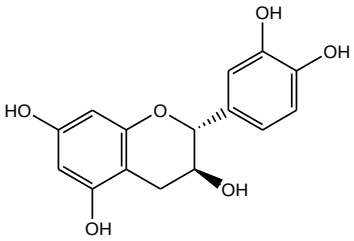


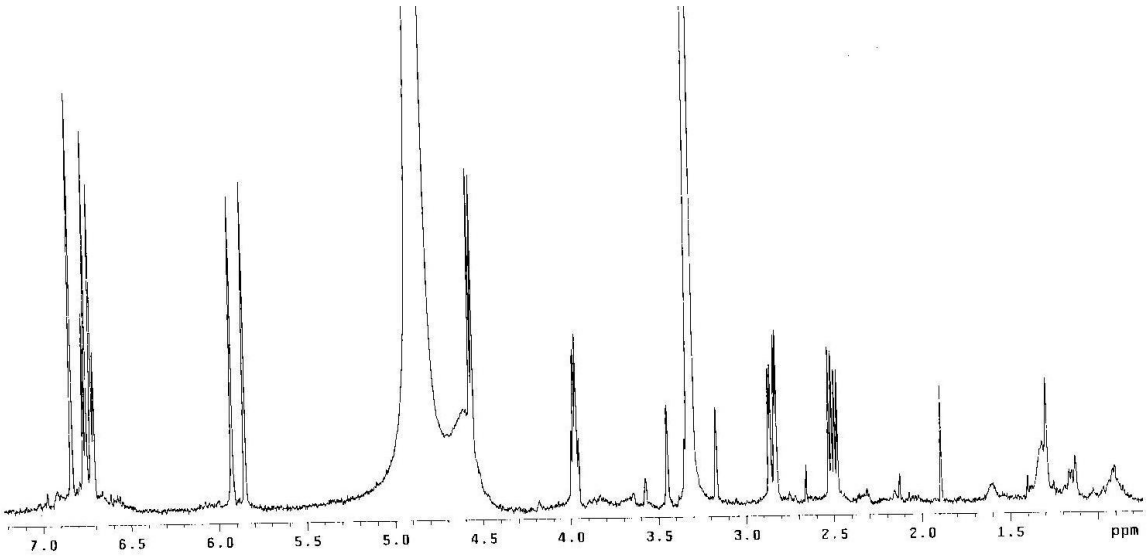
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 14- Kamferolo 7-O-β-D-glucopiranoside



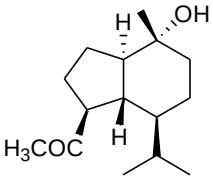


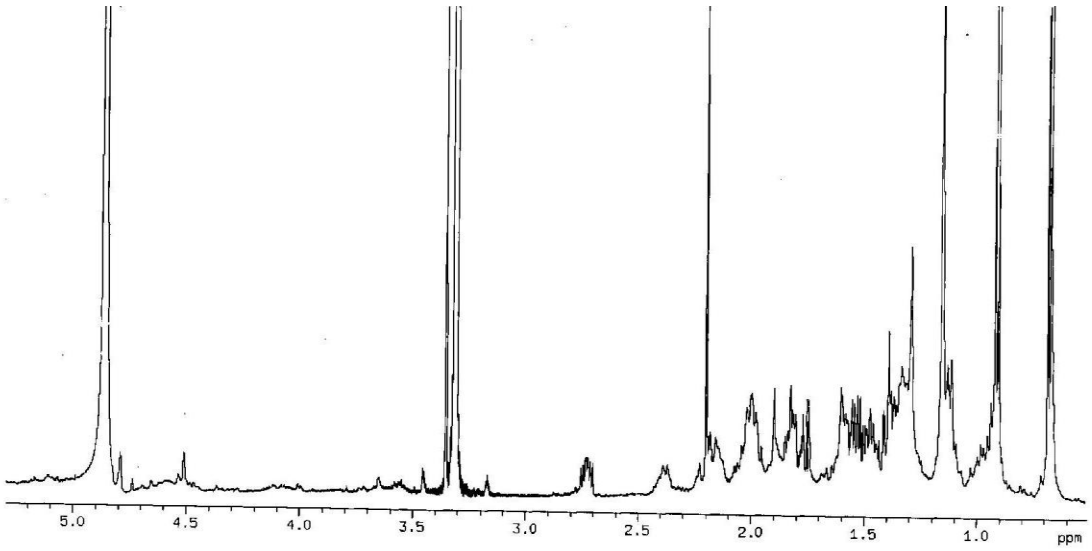
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 15- Catechina



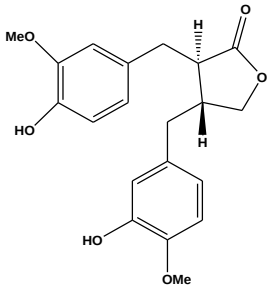


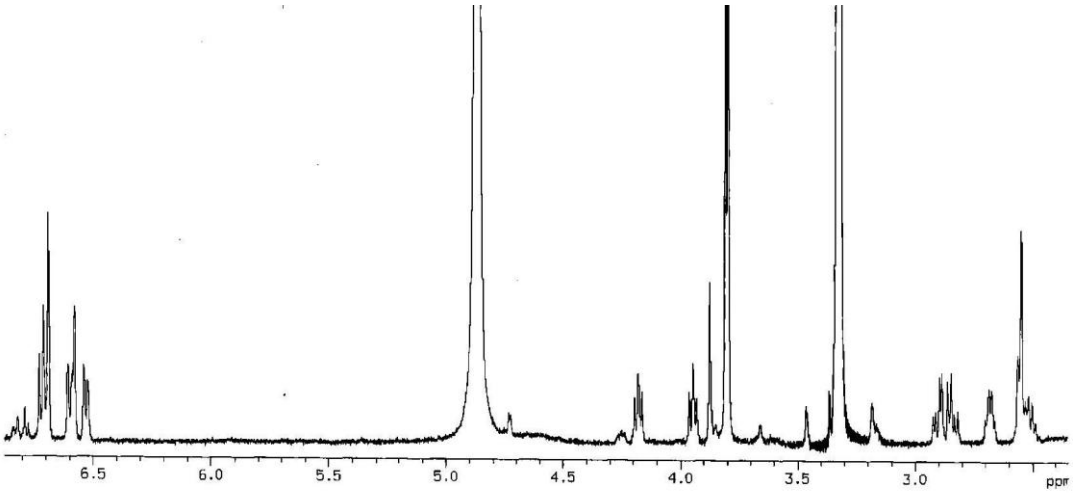
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 16- Oplopanone





^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 15- Matairesinolo





BIBLIOGRAFIA

[1] *Thomas, P. A.; El-Barghathi, M.; Polwart, A.* Biological flora of the British Isles: *Juniperus communis* L. J. Ecol. 2007, 95, 1404–1440.

[2] *Vichi, S.; Riu-Aumatell, M.; Mora-Pons, M.; Guadayol, J. M.; Buxaderas, S.; Lopez-Tamames*, E. HS-SPME coupled to GC/MS for quality control of *Juniperus communis L.* berries used for gin aromatization. Food Chem. 2007, 105 (4), 1748–1754.

[3] European Pharmacopoeia, 6th ed.; European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, Council of Europe: Strasburg, France, 2008; vol. 3, p. 2206.

[4] *Stanic, G., Samarzija, I., Blazevic, N.*, 1998. Time-dependent diuretic response in rats treated with juniper berry preparations. Phytother. Res. 12, 494-497.

[5] *Sanchez de Medina, F., Gamez, M. J., Jimenez, I., Jimenez, J., Osuna, J. I., Zarzuelo, A.*, 1994. Hypoglycemic activity of juniper " berries ". Planta medica 60, 197-200.

[6] *Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T. M., Guvenc, A., Taviano, M. F.*, 2009. Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. J. Agric. Food Chem. 57, 6570-6577.

[7] *Angioni, A., Barra, A., Russo, M. T., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P.*, 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem. 51, 3073-8.

[8] *Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., Ochocka, J. R.*, 2003. Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. Phytother. Res. 17, 227-231.

[9] *Nakanishi, T., Iida, N., Inatomi, Y., Murata, H., Inada, A., Murata, J., Lang, F. A., Iinuma, M., Tanaka, T., Sakagami, Y.*, 2005. A monoterpene glucoside and three megastigmane glycosides from *Juniperus communis* var. depressa. Chem. Pharm. Bull. 53, 783-787

[10] *San Feliciano, A., Medarde, M., Lopez, J. L., Del Corral, J. M., Puebla, P., Barrero, A. F.,* 1988. Terpenoids from leaves of *Juniperus thurifera*. Phytochemistry 27, 2241-8.

[11] *Innocenti, M., Michelozzi, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F. F., Mulinacci, N.,* 2007. Flavonoids and biflavonoids in Tuscan berries of *Juniperus communis* L.: detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS. J. Agric. Food Chem. 55, 6596-6602.

[12] *Alessandro Bruni* "FARMACOGNOSIA GENERALE E APPLICATA" ed.PICCIN

[13] *F.Capasso, G.Grandolini, A.A.Izzo* "Fitoterapia" ed.Springer

[14] *T.Nakanishi, N.Iida, Y.Inatomi, H.Murata, A.Inada, J.Murata, F.A.Lang, M.Iinumada, T.Tanaka, Y.Sakagami* "A monoterpene glucoside and three megastigmane glycosides from *Juniperus communis* var.*depressa*" Chem.Farm.Bull. 53, 783-787

[15] *A.Martin, E.F.Quieroz, A.Marston, K.Hosttmann* "Labdane Diterpenes from *Juniperus communis* L. Berries" Pytochemical Analysis 17,32-35

[16] *Kupchan SM, Britton RW, Ziegler MF, Sigel CW.* Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. J. Org. Chem. 1973; 38: 178-179.

[17] *Fang JM, Chen YC, Wang BW, Cheng YS.* Terpenes from hearthwood of Juniperus chinensis. Phytochemistry 1996; 41: 1361-1365.

[18] *Veitch, N.C., Grayer, R.J., Irwin, J.L., Takeda, K.,* 1998. Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. Phytochemistry 48, 389-93

[19] *March, R.E., Lewars, E.G., Stadey, C.J., Miao, X, Zhao, X., Metcalfe, C.D.,* 2006. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. IJMS 248, 61-85.

[20] *Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., Lewis, J. R., 1996.* ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of some green tea polyphenols. Magn. Reson. in Chem. 34, 887-890

[21] *Su WC, Fang JM, Cheng YS.* Labdanes from *Cryptomeria japonica.* Phytochemistry 1994; 37: 1109-1114.

[22] *Garbarino, J. A., Oyarzun, M. L., Gambaro, V.,* 1987. Labdane diterpenes from *Araucaria araucana*. J. Nat. Prod. 50, 935-6.

[23] *San Feliciano A, Medarde M, Lopez JL, Del Corral M, Puebla P, Barrero AF*. Terpenoids from leaves of *Juniperus thurifera*. Phytochemistry 1988; 27: 2241-2248.

[24] *Hasegawa S, Hirose Y.* A diterpene glycoside and lignans from seed of *Thujopsis dolabrata*. Phytochemistry 1980;19: 2479-2481

[25] *Su WC, Fang JM, Cheng YS.* Diterpenoids from leaves of *Cryptomeria japonica*. Phytochemistry 1996; 41: 255-261

[26] *Sakar MK, Er N, Ercil D, Del Olmo E, San Feliciano A.* (-)-Desoxypodophyllotoxin and diterpenoids from *Juniperus nana Willd*. berries. Acta Pharmaceutica Turcica 2002; 44: 213-219.

[27] *Fang, JM, Sou YC, Chiu YH, Cheng YS.* Diterpenes from the bark of *Juniperus chinensis*. Phytochemistry 1993; 34: 1581-1584.

[28] *De Pascual TJ, Barrero AF, Muriel L, San Feliciano A, Grande M.* New natural diterpene acids from *Juniperus communis*. Phytochemistry 1980; 19: 1153-1156.

[29] *Herz W, Watanabe K.* Sesquiterpene alcohols and triterpenoids from *Liatris microcephala*. Phytochemistry 1983; 22, 1457-1459.

[30] *Estevez-Braun A, Estevez-Reyes R, Gonzalez AG.* ^{13}C NMR assignments of some dibenzyl-γ-butyrolactone lignans. Phytochemistry 1996; 43: 885-886.

[31] *Kizu H, Shimana H, Tomimori T.* Studies on the constituents of Clematis species. The constituents of *Clematis stans SIEB.* et ZUCC. Chem. Pharm. Bull. 1995; 43: 2187-2194.

[32] *Hara S, Okabe H, Mihashi K.* Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4-(R) carboxylates. Chem. Pharm. Bull. 1987; 35: 501-506.

[33] *Ya-Zhou Wang, Chun-Ping Tang , Chang-Qiang Ke , Hans-Christoph Weiss, Ernst-Rudolf Gesing , Yang Ye* Diterpenoids from the pericarp of *Platycladus orientalis*, Phytochemistry 69 , 2008, 518–526

[34] Effect of benzilic oxygen on the cytotoxic activity for colon 26 cell line of phenolic lignans, Biosci. Biotechnol. Biochem, 2006, 70, 2942-2947

[35] *Demetzos C, Dimas K.* Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity. In: Atta-Ur-Rahman, editor. Studies in natural Products Chemistry of Bioactive Natural Products. Oxford: Elsevier Science. 2001; vol 25: 235-292.

[36]*Dimas K, Papadaki M, Tsimplouli C, Hatziantoniou S, Alevizopoulos K, Pantazis P, Demetzos C*. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. Biomed. Pharmacother. 2006;60: 127-133.

[37] *Geethangili M, Rao YK, Fang SH, Tzeng YM*. Cytotoxic constituents from *Andrographis paniculata* induce cell cycle arrest in jurkat cells. Phytother Res. 2008; 22: 1336-1341.

[38] *Sherr CJ*, *Roberts JM*. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. 1999; 13: 1501–1512.

[39] *Besson A*, *Dowdy SF*, *Roberts*, *JM*. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Developmental Cell. 2008;14: 159-169.

[40] *Lehman TA*, *Bennett WP*, *Metcalf RA*, *Welsh JA*, *Ecker J*, *Modali RV*, *Ullrich S*, *Romano JW, Appella E, Testa JR, Gerwin BI, Harris CC.* p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. Cancer Res. 1991; 51: 4090-4096.

CAPITOLO III

ANALISI DEGLI ESTRATTI DI *Teucrium polium*

DESCRIZIONE *Teucrium polium*

Teucrium polium L. (Fig.III.1) è una pianta arbustiva appartenente al genere *Teucrium* e alla specie *polium*. Cresce tipicamente sulle colline aride e nei deserti dei paesi del Mediterraneo, a valori di altitudine compresi tra 0 e 2600 metri e a valori di pH del suolo compresi tra 6.6 (valore minimo) e 8,5 (valore massimo). Il genere *Teucrium* appartiene alla famiglia delle *Lamiacae* e comprende oltre 300 specie vegetali, di natura erbacea o arbustiva, annuali o perenni, spesso aromatiche (in Europa ne sono presenti circa 50 specie).

Si tratta di una pianta che per più di 2000 anni è stata utilizzata in medicina per la sua azione diuretica, diaforetica, antispasmodica. Inoltre da studi di letteratura si è osservato che la pianta possiede un'attività ipoglicemica [1], antiossidante [2], antinfiammatoria, ed è anche in grado di ridurre il peso corporeo e la pressione sanguigna.

Fig. III.1- *Teucrium polium* L.

Probabilmente l'origine del nome *Teucrium polium* deriva dal fatto che *Teucro*, fondatore di Troia, la usò per primo a scopo terapeutico, invece *polium*, dal greco *polion*, che significa grigio, canuto, indica il colore dei peli che ricoprono le foglie di questa pianta.

In Italia è diffusa in pianura, nelle località collinari e submontane, ma alligna maggiormente in posti aridi e soleggiati, soprattutto su terreni molto calcarei: come ad esempio sulle scarpate sassose e sui ghiaioni, tra i ruderi e sulle rocce, insinuandosi fin nelle più piccole fessure con i sottili steli striscianti, che emettono radici avventizie; si presenta densamente ramificata, con fusti ascendenti, parzialmente lignificati e l'altezza è mediamente di circa venti centimetri. Le foglie sono ovali e lunghe fino a 2-3 cm, con una larga dentatura arrotondata e fuori dal periodo vegetativo, si chiudono su sé stesse assumendo un caratteristico aspetto dentato. Sia i rami che le foglie sono coperte da un fitto tomento biancastro che fa assumere alla pianta un colore verde cinerino. La fioritura avviene tra la fine della primavera e la prima parte dell'estate ed è caratterizzata da numerose infiorescenze apicali piuttosto compatte, anch'esse tomentose, che ricoprono l'intera pianta. I fiori sono bianchi, talvolta violacei, piccolissimi (5-6 mm di lunghezza), difficili da "decifrare" ad occhio nudo. La corolla porta un solo labbro, quello inferiore (lungo circa 2 mm) alla base del quale è talvolta presente una minuscola ma nitida macchia gialla. L'intera pianta è decisamente aromatica, l'odore ricorda quello della Lavanda selvatica (*Lavandula stoechas*).

Alcune ricerche hanno evidenziato che cresce in maniera differente in funzione delle caratteristiche morfologiche del territorio; probabilmente risente della soppressione allelopatica esercitata da piante più grandi che si trovano nel suo stesso habitat. Molte ricerche riguardano anche lo studio della composizione chimica degli oli hanno evidenziato che i costituenti principali variano al variare della zona geografica in cui la pianta cresce [3].

A volte da origine a un arbusto di forma arrotondata; *T. polium* è infatti una pianta di taglia piccola, che può raggiungere al massimo i 15 cm di altezza e in estate assume una colorazione rosa, mentre perde le foglie per alcuni mesi dell'anno.

In Italia è molto diffusa in Sardegna dove è presente maggiormente la specie *T. subspinosum Pourrette ex Willd.*; si tratta di una specie endemica delle isole di Maiorca e del sud-ovest della Sardegna (isole di San Pietro), che cresce in zone aride anche vicino al mare.

Il genere *Teucrium* (*Labiatae*) è inoltre una sorgente molto ricca di *neo*-clerodani [4]; in letteratura sono riportati molti dati anche per un'altra varietà di *Teucrium*: il *T. chaemaedris* (camedrio)

Il *Teucrium chamaedrys* noto anche come Camedrio comune, è un erba caratteristica dell'area mediterranea, utilizzata in passato per le sue proprietà mediche. Sebbene ancora oggi il *T. chamaedrys* è usato nelle preparazioni di vermouth o altri liquori, alcuni studi hanno evidenziato che la Teucrina A, un metabolita isolato dal *T.chamaedrys*, causa necrosi epatica [5], per tal motivo il suo utilizzo nelle preparazioni farmaceutiche è stato proibito. Il Germando (*T. chamaedrys*) è una pianta medica popolare contenente diterpenoidi, ed è tradizionalmente usato nella medicina popolare per le sue proprietà antisettiche; nel 1991 in Francia le pillole a base dei principi attivi del Germando venivano usate come coadiuvante per combattere l'obesità. Purtroppo vennero registrati più di 30 casi di epatotossicità (maggiormente epatiti e cirrosi epatiche) in seguito al loro consumo, e in Francia avvenne anche un caso di morte fulminante; per tal motivo il suo utilizzo è stato proibito dal 1992.

Il Germando causa epatotossicità negli animali [6] e negli uomini [7]; la composizione chimica degli estratti del Germando è costituita da saponine, glicosidi, flavonoidi e diterpenoidi furano neoclerodanici. L'epatotossicità è dovuta a diterpenoidi, tra cui la Teucrina A e la Teucramedrina A.

L'anello furanico di questi diterpenoidi è ossidato da un enzima,CYP3A4, a epossidi reattivi che reagiscono con proteine come CYP3A e idrolasi epossidate. L'epossido reattivo determina nei ratti transizioni di permeabilità mitocondriale, l'attivazione di proteine caspasi e l'apoptosi di epatociti [8].

La Teucrina A si lega con un legame covalente alle proteine degli epatociti dei topi, ed avvengono una serie di processi che determinano la rottura delle membrane plasmatiche, il danneggiamento del DNA e l'apoptosi delle cellule (Fig. III.2).

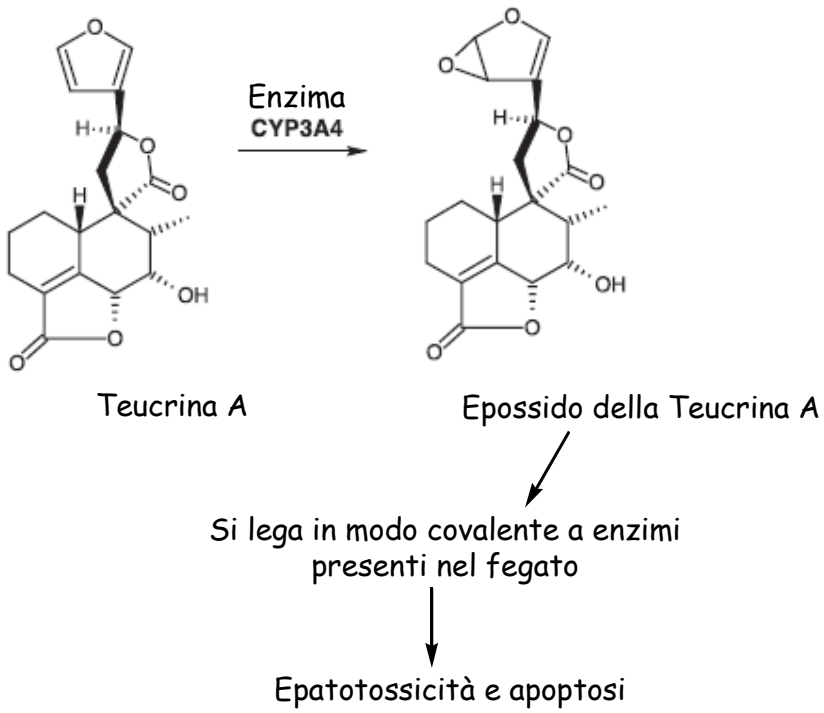
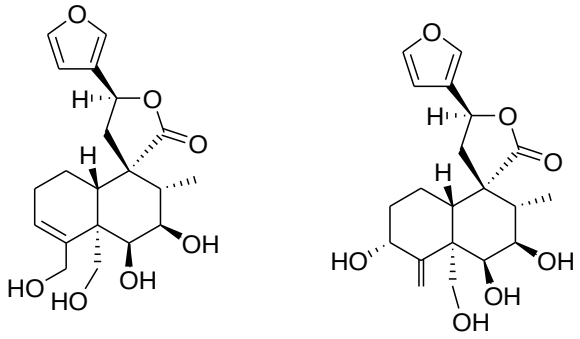


Fig. III.2 Bioattività della Teucrina A

Alcune specie di *Teucrium* vengono utilizzate anche per le loro proprietà sedative, decongestionanti e cicatrizzanti. Il *Teucrium polium* L. è utilizzato anche nel trattamento del diabete, e di disturbi gastrici anche nella medicina popolare Turca [9]. Sono stati isolati dalla parte aerea di questa pianta composti come glicosidi fenil-etanoici quali il verbascoside; mentre dalle frazioni più polari dei suoi estratti sono stati isolati diterpeni con lo scheletro del neoclerodano, come: Teulolina A e Teulolina B (Fig. III.3).



Teulolina A Teulolina B

Fig. III.3

Sono stati individuati nel *Teucrium* anche monoterpeni con lo scheletro del ciclopentano [10], presenti specialmente nei fiori e nelle foglie (dal 66 al 99% dei composti totali identificati) e composti come Arpagide e 8-acetil derivati dell'Arpagide e Teucardosidi [11].

Specialmente nei paesi del Mediterraneo *T. polium* viene usata per le sue proprietà antispasmodiche, la sua attività ipoglicemica e l'infuso di questa pianta è fortemente raccomandato dagli erboristi dei paesi iraniani [12].

Alcuni studi hanno evidenziato l'attività ipoglicemica della pianta attraverso il trattamento di cavie di laboratorio con dosi di decotto di *T. polium,* osservando la riduzione dell'assorbimento del glucosio nel sangue di questi animali [13]; inoltre è stata riscontrata attività ipoglicemica anche da parte degli oli di tale pianta [14].

Nella tradizione popolare l'infuso di questa pianta viene utilizzato per lenire le infiammazioni della gola, nei casi di costipazione intestinali, contro la cattiva digestione, contro l'inappetenza, per combattere l'emicrania, etc. Gli steli erbacei, o meglio le sommità fiorite, si recidono a primavera inoltrata o all'inizio dell'estate, preferibilmente quando stanno per sbocciare i fiori e si fanno seccare all'ombra e successivamente si conservano in sacchi di juta, di tela o in scatole di cartone.

Nella tradizione molisana il decotto ottenuto dalle foglie di *T. polium* viene usato come rimedio per lenire disturbi legati a gastriti, ulcere etc.

Oggi è noto che le proprietà benefiche del *T. polium* sono legate alla presenza di molecole dotate di attività antiossidante; da qui il notevole interesse allo sviluppo di metodi volti all'individuazione e al dosaggio dei metaboliti che sono responsabili di tali proprietà. Infatti, gli estratti vegetali, in particolare della parte aerea della pianta, si sono rivelati ricchi di molecole, quali flavonoidi, dotate di attività antiossidante; queste molecole possono rappresentare, quindi, dei potenziali principi terapeutici per rafforzare le normali difese dell'organismo contro i danni ossidativi indotti dai radicali liberi.

Per tal motivo si è proceduto oltre che all'isolamento e alla caratterizzazione strutturale dei metaboliti secondari presenti negli estratti di *T. polium*, anche alla valutazione della composizione chimica del decotto della stessa pianta e in una successiva fase (in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Raimo dell'Università del Molise) alla valutazione dell'attività antiossidante sia del decotto che degli estratti della pianta fresca.

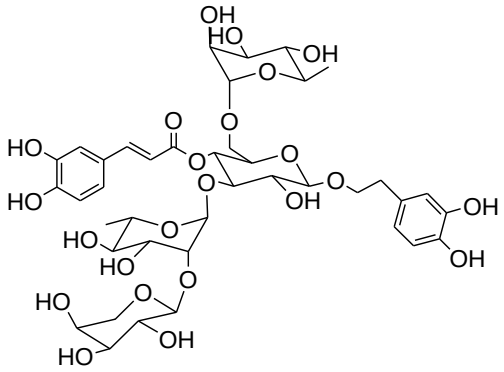
CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI METABOLITI ISOLATI DA *Teucrium polium*

Dall'estratto metanolico delle foglie di *Teucrium polium* è stato isolato un nuovo metabolita (1), e nove composti noti. Le foglie di *Teucrium polium* sono state estratte con metanolo e l'estratto ottenuto è stato sottoposto a metodica di Kupchan [15] ottenendo quattro estratti: n-esano, $CHCl_3$, n-BuOH e un residuo acquoso.

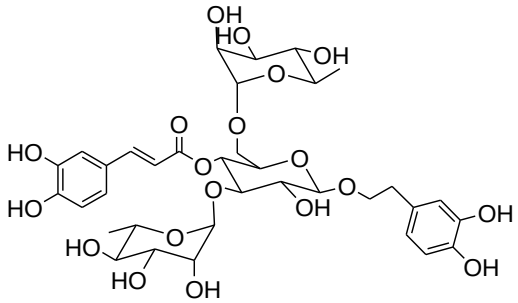
Dall'estratto *n*-BuOH, in seguito a purificazione attraverso DCCC (cromatografia liquida in controcorrente a gocce) e HPLC sono stati isolati e identificati un nuovo derivato dell'acido caffeico contenente quattro unità saccaridiche (1), il composto noto Poliumoside A (2) [16], la Luteolina-7-O-β-D-glucopiranoside (3) [17], la Luteolina 4'-O-β-D-glucopiranoside (4) [18], la Luteolina 7-O-neoesperidoside (5) [19], la Luteolina-7-O-rutinoside (6) [20], l' 8-acetl-Arpagide (7) [21] e il Teucardoside (8) [22, 23].

Sono stati analizzati contemporaneamente anche i componenti chimici presenti nel decotto delle foglie di *T.polium* e confrontati con i composti ottenuti da un'estrazione della pianta "fresca". La parte aerea di *T.polium* è stata posta in infusione e l'infuso acquoso portato a secco ed estratto con metanolo; l'estratto metanolico ottenuto è stato sottoposto a DCCC e le frazioni ottenute, purificate in HPLC, ottenendo in quantità consistenti i due seguenti neoclerodani: Teusalvina C (9) [24, 25] e Teulamifina B (10) [26]. Si è osservato che la composizione chimica del decotto è molto diversa rispetto alla composizione chimica della parte fresca della pianta, perché è probabile che in seguito alla bollitura i composti più labili si siano degradati e siano rimasti soltanto i componenti più resistenti quali i clerodani.

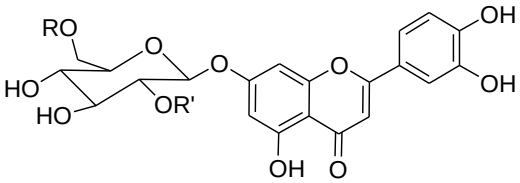
In figura III.4 vengono riportati i composti isolati (1-10):



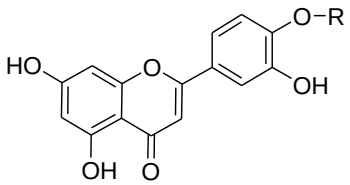
Composto nuovo;**1**



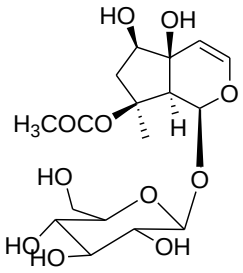
Poliumoside A; **2**



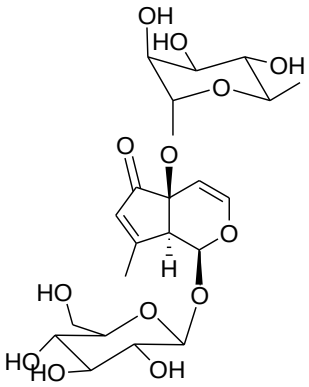
Luteolina 7-O-β-D-glucoside, R=R'=H**; 3**
Luteolina 7-O-neoesperidoside, R=H, R'=ramn, ramn-gluc, 1→2; **5**
Luteolina 7-O-rutinoside, R'=H, R=ramn, ramn-gluc, 1→ 6; **6**



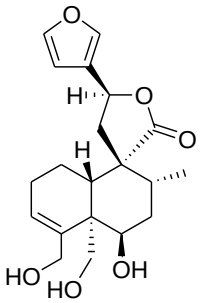
Luteolina 4'-O-glucoside, R=Gluc; **4**



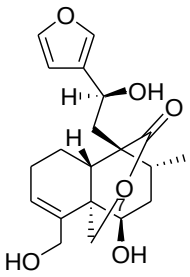
8-acetil-Arpagide; **7**



Teucardoside; **8**

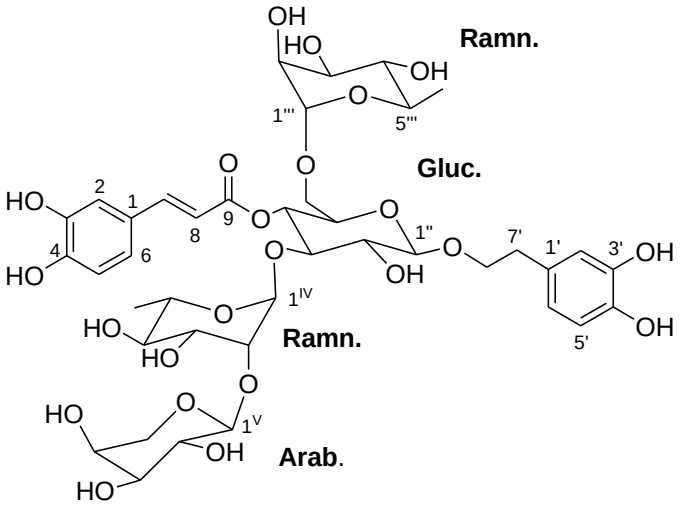


Teusalvina C; **9**



Teulamifina B; **10**

Fig. III.4



1- Tetraglicoside (composto nuovo)

Il composto nuovo **1** è stato ottenuto come un solido giallo amorfo; lo spettro di massa mostra uno ione pseudo molecolare a *m/z*= 925 u.m.a. relativo a $[M+Na^+]$ e insieme allo spettro ^{13}C-NMR si è stabilito che la formula molecolare del composto è $C_{40}H_{54}O_{23}$. Nello spettro IR si osservano bande di assorbimento tipiche di gruppi ossidrilici (3380 cm^{-1}), di esteri α-β insaturi (1690, 1630 cm^{-1}) e di sistemi aromatici (1630, 1600, 1520 cm^{-1}). Lo spettro protonico evidenzia i segnali caratteristici di una unità di acido caffeico con geometria E del doppio legame. Sono presenti 3 protoni aromatici che risuonano a δ_H 7.05, 6.77 e 6.95 ppm, di un sistema ABX e due protoni di un doppio legame olefinico con geometria trans di un sistema AB (δ_H 7.62 e d 6.27 ppm, *J*= 15.9 Hz) e una unità 3',4', diidrossi-fenil-etanoica (con tre protoni aromatici a δ_H 6.7, 6.57, 6.67 ppm, di un sistema ABX). Si osserva inoltre un doppio doppietto a δ_H 2.80 ppm relativo a un β-metilene e due protoni non equivalenti a δ_H 3.98 e 3.73 ppm relativi alla catena laterale di un sistema aromatico. Il nuovo composto isolato presenta dati molto simili a quelli del composto noto Velutinoside I [27], la differenza è dovuta alla presenza di quattro unità saccaridiche, due unità di ramnosio, una di glucosio e una di arabinosio.

La presenza di quattro unità saccaridiche è dedotta dalle risonanze di quattro protoni anomerici: un doppietto a δ_H 4.37 ppm (J=7.9 Hz), relativo al protone anomerico del β-glucosio, un doppietto a δ_H 4.30 ppm (J=7.3 Hz), relativo al protone anomerico del β-arabinosio, e due singoletti a δ_H 5.47 e 4.61 (J=1.0 Hz), relativi a due unità di α-ramnosio, presenti tutti in forma piranosidica, come riscontrato dai valori delle costanti di accoppiamento.

Nello spettro COSY si osserva che il protone H-2 (δ_H 7.05 ppm), del primo sistema aromatico, è accoppiato con i protoni H-5 (δ_H 6.77) e H-6 (δ_H 6.95). Il protone H-7 (δ_H 7.62) è accoppiato con H-8 (δ_H 6.27), il protone H-7' con H-8' (δ_H 3.98-3.73), e H-6' (δ_H 6.57) è accopppiato con H-2' (δ_H 6.70) e H-5' (δ_H 6.67). Nello spettro HMBC si osserva che il protone H-2 (δ_H 7.05 ppm) correla con i carboni C-3 (δ 147.1 ppm), C-4 (δ 150.0 ppm), C-6 (δ 122.9 ppm), C-7 (δ 147.7 ppm), e che il protone H-5 (δ 6.77 ppm) correla con i carboni C-1 (δ 127.8 ppm), C-3 (δ 147.1 ppm), C-4 (δ 150.0 ppm); H-6 (δ_H 6.95 ppm) correla con C-2 (δ 114.9 ppm), C-4 (δ 150.0 ppm), C-7 (δ 147.7 ppm), mentre H-7 (δ_H 7.62 ppm) correla con i carboni C-1 (δ 127.8 ppm), C-2 (δ 114.9 ppm), C-6 (δ 122.9 ppm), C-8 (δ 114,3), C-9 (δ 169.5); H-8 (δ 6.27 ppm) correla con C-1 (δ 127.8 ppm).

L'analisi degli zuccheri è stata realizzata effettuando una reazione di idrolisi acida del composto 1 con acido trifluoroacetico, facendo reagire l'idrolizzato con L-cistein-metil estere 0.1 M in piridina anidra (200 μl) e HCl per 1 ora a 60° (Hara et al., 1987). E' stato aggiunto 1-(Trimetilsilil)imidazolo in piridina e i derivati tiazolidinici analizzati attraverso gas cromatografia (in cui si è utilizzata una colonna chirale), paragonando i tempi di ritenzione dei derivati trisililati tiazolidinici con i relativi standard. La serie sterica dei quattro monosaccaridi è stata definita: D-glucosio, L-ramnosio, L-arabinosio. Attraverso gli esperimenti COSY e soprattutto TOCSY è stato possibile determinare le sequenze di spin e risalire alle risonanze degli idrogeni di tutti e quattro i monosaccaridi.

I chemical shifts dei carboni C-6’ (67.2 ppm) e del carbonio C-3’’ (82.1 ppm) del glucosio, suggeriscono che essi sono i siti di glicosilazione di due unità saccaridiche; attraverso l’HMBC è stato possibile stabilire la posizione dei legami interglicosidici, poiché si osserva un picco di correlazione tra il carbonio C-6’’ del glucosio (δ 67.2 ppm) e il protone anomerico di una unità di ramnosio (δ_H 4.61 ppm), (1 → 6). Un picco di correlazione è prsente tra il carbonio C-3’ (δ 82.1 ppm) del glucosio e il protone anomerico della seconda unità di ramnosio (δ_H 5.47 ppm), (1 → 3).

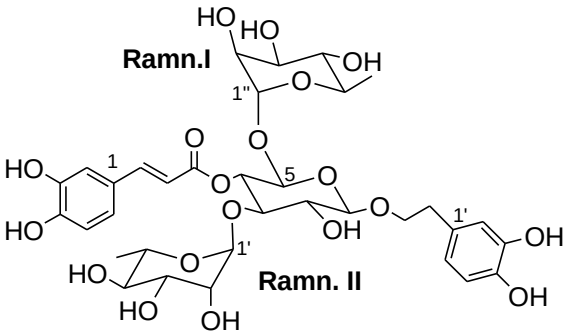
Il sito di glicosilazione sull’unità di ramnosio è stato determinato da un picco di correlazione tra il protone anomerico dell’arabinosio (δ_H 4.30 ppm) e il carbonio C-2^{IV} (δ 82.6 ppm) del ramnosio, presente all’interno della molecola (1→2). Inoltre si osserva un picco di correlazione tra il protone H-1’’ (δ_H 4.37 ppm) dell’unità di glucosio con il carbonio C-8’ (δ 72.2 ppm) dell’unità 3’,4’diidrossi-fenil-etanoica e tra il protone H-4’’ (δ_H 4.99 ppm) del glucosio con il carbonio carbonilico C-9 (169.5 ppm) dell’unità di acido caffeico. Attraverso un esperimento HSQC è stato possibile correlare ogni H al rispettivo atomo di C delle unità saccaridiche e della parte aromatica.

Tab. III.1: Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR del Composto Nuovo (1), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H/ppm (*J* in Hz)	δ_C (*J* in Hz)
Acido caffeico		
1	-	127.8
2	7.05, s	114.9
3	-	147.1
4	-	150.0
5	6.77, d, (8.1)	116.2
6	6.95, dd, (2.4, 8.1)	122.9
7	7.62, d, (15.7)	147.7
8	6.27, d, (15.7)	114.3
9	-	169.5
Aglicone		
1’	-	131.1
2’	6.70, s	116.9
3’	-	144.8
4’	-	143.5
5’	6.67, d, (7.8)	116.2
6’	6.57, d, (7.8)	120.9
7’	2.80, t, (8.0)	36.2
8’	3.98-3.73, m	72.2
Glucosio		
1’’	4.37, d, (7.9)	104.0
2’’	3.37, dd, (8.0, 8.5)	75.7
3’’	3.76, dd, (8.5, 9.5)	82.1
4’’	4.99, t, (9.9)	69.9
5’’	3.68, m, (9.5)	74.3
6’’	3.76-3.50, m, (10.5)	67.2
Ramn. (esterno)		
1’’’	4.61, br s, (1.0)	101.9
2’’	3.83, dd, (1.3)	71.6
3’’	3.69, dd, (3.0, 9.5)	71.8
4’’	3.36, t, (9.5)	73.7
5’’	3.60, m	69.8
6’’	1.19, d (6.1)	17.7
Ramn. (interno)		
1^{IV}	5.47, brs, (1.0)	101.7
2^{IV}	3.94, dd, (1.3)	82.6
3^{IV}	3.65, dd, (3.0, 9.5)	71.9
4^{IV}	3.27, t, (9.5)	73.8
5^{IV}	3.53, m	70.1
6^{IV}	1.04, d, (6.1)	18.2
Arabinosio V		
1^{V}	4.30,d, (7.3)	107.2
2^{V}	3.58, dd, (6.9,10.2)	72.5
3^{V}	3.50, ovl	74.1
4^{V}	3.76, ovl	69.5
5^{V}	3.53-3.85, dd, (2.6,12.4)	67.2

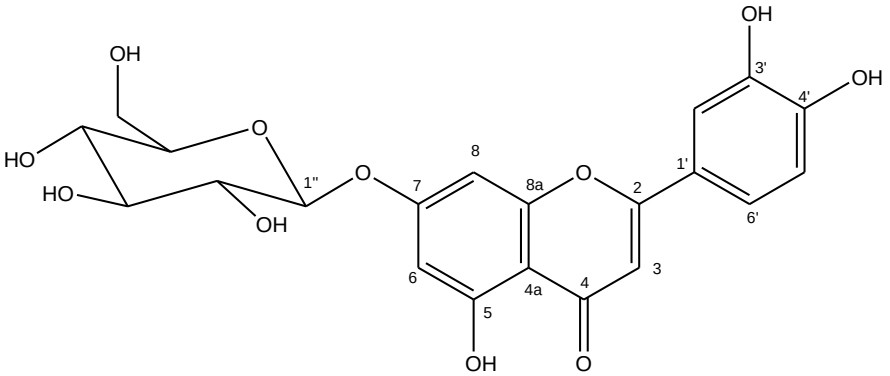
I dati spettroscopici del composto **2** erano gli stessi del composto 1, differivano soltanto per il fatto che erano presenti tre unità saccaridiche: una di β-D-glucopiranosio e due di α-L-ramnopiranosio, mancava soltanto l'unità di arabinosio.

Anche in questo caso attraverso l'HMBC è stato possibile stabilire la posizione dei legami interglicosidici, poiché si osserva un picco di correlazione tra il carbonio C-6 del glucosio (δ 67.3 ppm) e il protone anomerico di una unità di ramnosio (δ_H 5.18 ppm) (1→6); e un picco di correlazione tra il carbonio C-3 (δ 81.4 ppm) del glucosio e il protone anomerico della seconda unità di ramnosio (δ_H 4.62 ppm), (1→3). Dallo spettro di massa si ricava che il peso molecolare del composto è 756 u.m.a e insieme allo spettro ^{13}C-NMR si è stabilito che la formula molecolare del composto è $C_{34}H_{44}O_{19}$ e unitamente al confronto con dati di letteratura si è stabilito che il composto 2 è il Poliumoside A. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 2, pag. 136).



2-Poliumoside A

Lo spettro IR del composto **3** mostra la presenza di bande di assorbimento a 3450 cm^{-1}, relative a OH ossidrilici e a 1720 cm^{-1} relative alla funzione carbonilica.



3- Luteolina-7-O-β-D-glucopiranoside

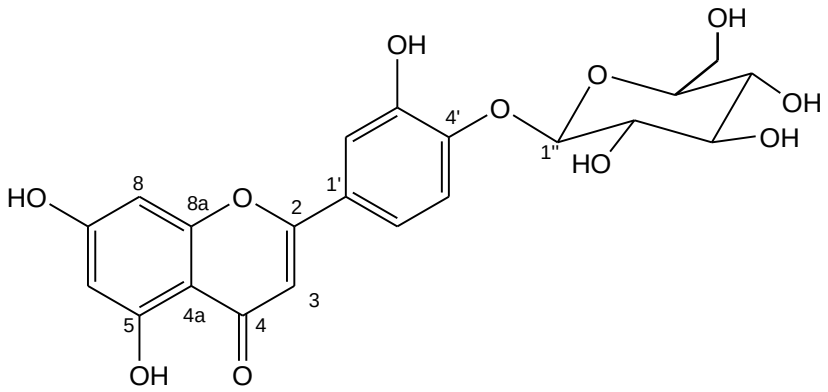
Lo spettro ^{1}H-NMR evidenzia una serie di segnali che lasciano intuire la presenza dello scheletro di un flavone, in cui è legata una unità saccaridica; si osservano infatti i segnali dei protoni aromatici, che risuonano come singoletto, H-6 (δ_H 6.51 ppm) e H-8 (δ_H 6.81 ppm) dell'anello del flavone e il segnale del singoletto relativo al protone H-3 (δ_H 6.61 ppm) adiacente al gruppo carbonilico presente sull'anello A dello scheletro del flavone. Sono inoltre presenti i segnali del protone H-2' (δ_H 7.41, d, *J*= 2.5 Hz), H-5' (δ_H 6.92, d, *J*= 8.0 Hz) e H-6' (δ_H 7.43, dd, *J*= 8.0 Hz) e dal confronto di dati di letteratura [17] si è stabilito che lo scheletro del flavone in questo caso è quello della Luteolina. Nello spettro ^{1}H-^{1}H COSY si osserva che il protone H-8 (δ_H 6.81 ppm) è accoppiato con H-6 (δ_H 6.51 ppm), il protone H-6' (δ_H 7.43 ppm) è accoppiato con H-5' (δ_H 6.92 ppm) e che il protone H-3 (δ_H 6.61 ppm) è accoppiato con H-6' (δ_H 7.43 ppm).

E' inoltre presente il segnale doppietto del protone anomerico (δ_H 5.07) che rivela la presenza di una unità di glucosio, in forma β, in base al valore della costante di accoppiamento (*J*=7.9 Hz). Sulla base dei valori grandi delle costanti di accoppiamento dei protoni del glucosio si osserva che esso è presente in forma piranosidica; si è determinato che appartiene alla serie sterica D in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto 3 [28] e dalla successiva analisi gas-gramatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard. Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza e le risonanze dei protoni e dei rispettivi atomi di carboni del glucosio.

Il monosaccaride è legato al carbonio 7 dello scheletro della Luteolina perché nello spettro HMBC è presente un picco di correlazione tra il protone anomerico (δ_H 5.07 ppm) e il carbonio C-7 (δ 164.5 ppm) della Luteolina. Inoltre nell'HMBC si osserva che il protone H-3 (δ_H 6.61 ppm) correla con i carboni C-1' (δ 123.1 ppm), C-2 (δ 166.6 ppm), C-4 (δ 183.9 ppm), C-4a (δ 106.8 ppm), mentre il protone H-6 (δ_H 6.51 ppm) correla con i carboni C-4 (δ 183.9 ppm), C-5 (δ 162.7 ppm), C-7 (δ 164.5 ppm) e C-8 (δ 95.7 ppm); il protone H-2' (δ_H 7.41 ppm) correla con i carboni C-1' (δ 123.1 ppm), C-3' (δ 146.8 ppm), C-4' (δ 151.0 ppm), e che il protone H-6' (δ_H 7.43 ppm) correla con i carboni C-2' (δ 113.9 ppm) e C-4' (δ 151.0 ppm). Lo spettro di massa ESI^{+} evidenzia uno ione a *m/z*= 449, che conferma il peso molecolare del composto e quindi si può affermare che il composto 3 è la Luteolina-7-O-β-D-glucopiranoside. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 3, pag. 137).

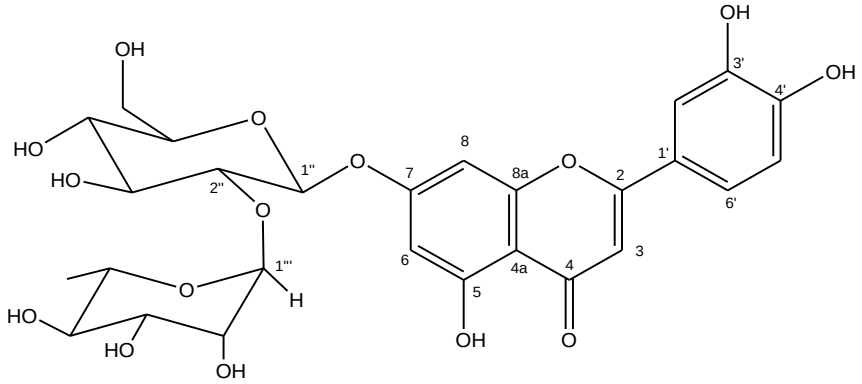
I dati spettroscopici del composto **4** erano molto simili a quelli del composto 3; infatti i segnali dello spettro protonico evidenziano anche in questo caso la presenza della Luteolina e di una unità di glucosio, rilevata dal segnale del protone anomerico (δ_H 4.93, *J*=7.2 Hz). Nello spettro di massa ESI^- compare uno ione a *m/z*=447, che insieme allo spettro ^{13}C-NMR ci consente di affermare che la formula molecolare del composto è $C_{21}H_{20}O_{11}$. Si tratta quindi di un isomero del composto 3.

Anche in questo caso nello spettro COSY il protone H-8 (δ_H 6.46 ppm) è accoppiato con il protone H-6 (δ_H 6.22 ppm), il protone H-6' (δ_H 7.48 ppm) è accoppiato con H-5' (δ_H 7.33 ppm) e che il protone H-3 (δ_H 6.62 ppm) è accoppiato con H-6' (δ_H 7.48 ppm). Dallo spettro HMBC si sono osservate molte correlazioni simili a quelle riportate per il composto 3; la differenza maggiore è dovuta al fatto che il protone anomerico del glucosio (δ_H 4.93, *J*=7.2 Hz) correla con il carbonio C-4' (δ 149.7 ppm) del secondo sistema aromatico presente nella Luteolina, che ha consentito di affermare che il glucosio è legato al carbonio 4' della Luteolina. Dai dati NMR e dal confronto con quelli di letteratura si è stabilito che il composto 4 è la Luteolina 4'-O-β-D-glucopiranoside. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR pag.137).



4- Luteolina 4'-O-β-D-glucopiranoside

I segnali dello spettro protonico del composto **5** evidenziano ancora una volta la presenza dello scheletro della Luteolina. Nello spettro di massa ESI^+ compare uno ione a *m/z*=595 u.m.a., che insieme allo spettro ^{13}C-NMR ci consente di affermare che la formula molecolare del composto è $C_{27}H_{30}O_{15}$.



5- Luteolina 7-O-neoesperidoside

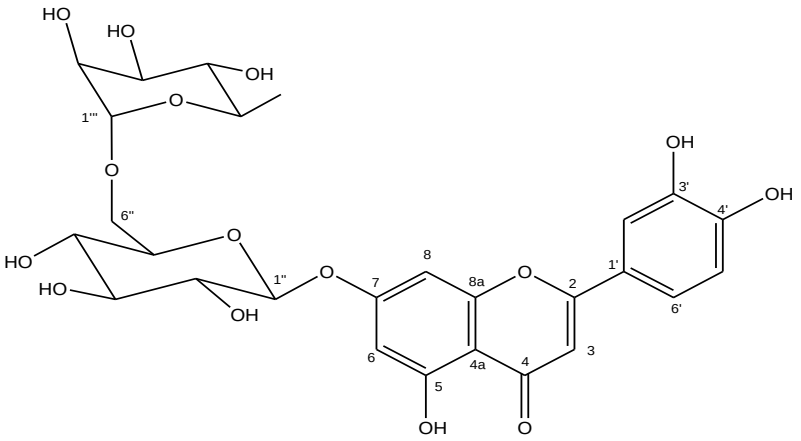
Inoltre lo spettro ^{1}H-NMR mostra la presenza di due unità saccaridiche: il segnale del protone anomerico (δ_H 5.20 ppm, *J*= 8.0 Hz) indica la presenza di una unità di β glucosio, il segnale singoletto del protone anomerico (δ_H 5.28, *J*= 1.8 Hz), con una piccola *J*, rivela la presenza di una unità di ramnosio; entrambe confermate da uno spettro COSY e TOCSY che hanno consentito di risalire alle risonanze dei protoni e dei carboni delle unità saccaridiche di glucosio e di ramnosio. Nello spettro COSY inoltre si osserva che il protone H-8 (δ_H 6.76 ppm) correla con H-6 (δ_H 6.46 ppm) e che H-2' (δ_H 7.40 ppm) correla con H-6' (δ_H 7.42 ppm). Lo spettro HMBC evidenzia che il protone H-3 (δ_H 6.60 ppm) è correlato con i carboni C-2 (δ 165.7 ppm), C-4 (δ 183.2 ppm), C-4a (δ 105.8 ppm), C-1'(δ 122.7 ppm); H-6 (δ_H 6.46 ppm) correla con i carboni C-4a (δ 105.8 ppm), C-5 (δ 161.9 ppm), C-7 (δ 163.5 ppm), C-8 (δ 94.2 ppm); H-8 (δ_H 6.76 ppm) correla con C-6 (δ 106.0 ppm), C-7 (δ 163.5 ppm), C-8a, e H-2' correla i carboni con C-2 (δ 165.7 ppm), C-3'(δ 146.0 ppm), C-4' (δ 150.1 ppm), C-6'(δ 119.5 ppm).

Lo spettro HMBC ha consentito di determinare la posizione dei legami delle unità saccaridiche: il protone anomerico del glucosio (δ_H 5.20 ppm) correla con il carbonio C-7 (δ 163.5 ppm) dello scheletro della Luteolina, invece il protone anomerico del ramnosio (δ_H 5.28 ppm) correla con il carbonio C-2'' (δ 78.8 ppm) del glucosio e ciò consente di affermare che il carbonio 2 del glucosio è legato al carbonio 1 del ramnosio; (1→2).

Il ramnosio è presente in forma α come si osserva dal valore basso della costante di accoppiamento H1/H2 di 1.2 Hz, mentre il glucosio è presente in forma β, infatti la costante di accoppiamento del protone anomerico è di 8.0 Hz. Si è stabilito che il glucosio appartiene alla serie sterica D e il ramnosio alla serie L, in seguito a una reazione di idrolisi acida; entrambi i monosaccaridi sono presenti in forma piranosidica.

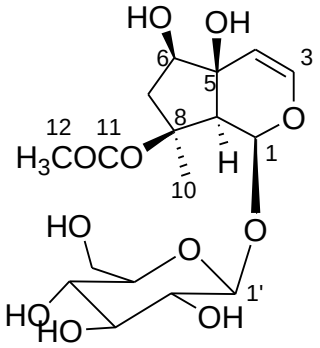
La presenza dell'unità di ramnosio in forma piranosidica è stata dedotta sulla base delle costanti di accoppiamento dei protoni dell'unità saccaridica: la costante di accoppiamento grande tra il protone H-3'''/H-4''' (8.5 Hz) indica una interazione assiale-assiale tra i due protoni; cosi' come per H-4'''/H-5''' (8.5 Hz); mentre la costante tra H-2'''/H-3''' (1.8 Hz) indica una interazione equatoriale-assiale che si verifica (soltanto nelle unità di ramnosio) tra il protone H-2''' (eq.) e il protone H-3''' (ax). (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 5, pag.138).

I dati spettroscopici del composto **6** erano molto simili a quelli del composto 5; le uniche differenze si osservano nello spettro HMBC, che ha consentito di stabilire le posizioni dei legami interglicosidici. Infatti mentre il protone anomerico (δ_H 5.04 ppm, J=7.2 Hz) del glucosio era ancora correlato con il carbonio C-7 (δ 164.5) ppm della Luteolina, il protone anomerico (δ_H 4.72 ppm, J=1.6 Hz) del ramnosio invece era correlato con il carbonio C-6'' del glucosio (δ 66.2 ppm). Dai dati NMR e dal confronto con quelli di letteratura [20] si è stabilito che il composto 6 è la Luteolina-7-O-rutinoside. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 6, pag. 138)



6- Luteolina-7-O-rutinoside

- ***8 Acetil Arpagide (7):***



7- 8 Acetil Arpagide

Lo spettro IR del composto **7** evidenzia le bande di assorbiomento a 3450 cm^{-1} relative a OH ossidrilici, a 1660 cm^{-1} di doppi legami olefinici e a 1715 cm^{-1} di una funzione carbonilica. Nello spettro ^{1}H-NMR si osservano i segnali singoletto relativi al metile in 10 (δ_H 1.47 ppm) e del gruppo acetile (δ_H 2.03 ppm); il segnale del protone olefinico H-4 (δ_H dd. 4.93 ppm) adiacente a un legame etereo e al protone H-3 (δ_H 6.39 ppm) e insieme ai dati ^{13}C-NMR dei carboni in C-3 (δ 142.8 ppm) e in C-4 (δ 105.8 ppm) è stato possibile affermare che in posizione 3 e 4 è presente un doppio legame.

Sono inoltre presenti i segnali del protone H-9 (δ_H 2.86 ppm), che risuona come singoletto, e dei protoni H_2-7 (δ_H 1.97- 2.17 ppm) e il segnale del multipletto inerente al protone H-6 (δ_H 3.70 ppm) che indica la presenza di un gruppo OH. Nello spettro COSY si osserva che il protone H-1 (δ_H 6.08 ppm) è accoppiato con il protone H-6 (δ_H 3.7 ppm) e il protone H-9 (δ_H 2.86 ppm), il protone H-3 (δ_H 6.39 ppm) è accoppiato con il protone H-4 (δ_H 4.93 ppm) e viceversa. Inoltre il protone H-6 (δ_H 3.70 ppm) è accoppiato con i protoni H_2-7 (δ_H 2.17 e 1.95 ppm) e il protone H-9 (δ_H 2.86 ppm) è accoppiato con i protoni H-4 (δ_H 4.93 ppm), H_2-7 e H_3-10 (δ_H 1.47ppm) e viceversa. La funzione alcolica sul carbonio 6 è stata stabilita essere in posizione β dal confronto dei dati ^{13}C-NMR del composto isolato con i dati di letteratura, relativi a iridoidi epimerici modello dell'OH del C-6 [21]. In genere in letteratura è riportato che la stereochimica relativa della giunzione dei 2 anelli è di tipo cis per gli iridoidi [29]; in questo caso, (cosa molto rara) la stereochimica di giunzione degli anelli, è di tipo trans. Essa è stata determinata attraverso uno spettro ROESY, grazie al quale si è potuto stabilite l'intero assetto conformazionale della molecola.

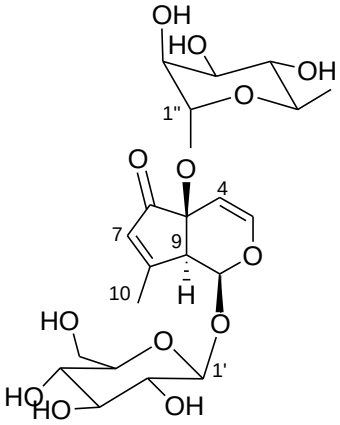
Nello spettro si osserva un ROE intenso tra il protone H-1 (δ_H 6.08 ppm), il protone H-9 (δ_H 2.86 ppm), i protoni H_3-10 (δ_H 1.47 ppm) e il protone del carbonio anomerico del glucosio (δ_H 4.60 ppm), che indica che tali protoni si trovano in α nella molecola. Inoltre si osserva ROE tra il protone H-9 (δ_H 2.86 ppm), gli H_3-10 e H-1' del glucosio (δ_H 4.60 ppm), il protone H-6 (δ_H 3.70 ppm) che sono quindi dallo stesso lato α della molecola e tra i protoni H_3-10 (δ_H 1.47 ppm) e il protone H-7α (δ_H 1.95 ppm) e H-7β (δ_H 2.17 ppm). Si osserva ROE tra il protone H-6 (δ_H 3.70 ppm) e il protone H-3 (3.49 ppm) e il protone H-4 (δ_H 4.93 ppm). Il gruppo CH_3COO- (evidenziato dal segnale del carbonio carbonilico a 176.8 ppm) è presente sul carbonio 8 sul lato β, dal confronto dei dati ^{1}H e ^{13}C-NMR delle posizioni 1 e 9 con quelli dell'8 acetil Arpagide riportati in letteratura [30].

La presenza di un glucosio legato con un legame di tipo β, è dedotta dalla costante di accoppiamento del protone anomerico di 7.8 Hz. Il monosaccaride è presente in forma piranosidica poiché le costanti di accoppiamento dei i protoni sono tutte grandi a causa delle interazioni (ax-ax) tra i protoni. La configurazione D del glucosio è stata assegnata in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto, condotta nelle stesse condizioni in cui è stata effettuata per il composto 1 [28] e dalla successiva analisi gas-gramatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard. Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza e le risonanze dei protoni e dei rispettivi atomi di carboni presenti nel glucosio, che si trova nel composto. Dallo spettro HMBC si osserva che il protone H-1 (δ_H 6.08 ppm) correla con C-1' (δ 99.0 ppm), C-3 (δ 142.8 ppm), C-5 (δ 72.2 ppm) e C-8 (δ 87.7 ppm), mentre il protone H-9 (δ_H 2.86 ppm) correla con i carboni C-1 (δ 93.4 ppm), C-4 (δ 105.8 ppm), C-5 (δ 72.2 ppm), C-8 (δ 87.7 ppm).

Inoltre i protoni H_3-10 (δ_H 1.47 ppm) correlano con i carboni C-7 (δ 44.8 ppm), C-8 (δ 87.7 ppm), C-9 (δ 54.3 ppm); il protone H-7β correla con i carboni C-6 (δ 76.6 ppm), C-8 (δ 87.7 ppm), C-9 (δ 54.3 ppm), C-10 (δ 21.3 ppm), mentre il protone H-7α (δ_H 1.95 ppm) correla con i carboni C-5 (δ 72.2 ppm), C-6 (δ 76.6 ppm), C-10 (δ 21.3 ppm). Il legame del glucosio è con il carbonio C-1 (δ 93.4 ppm) poiché nello spettro HMBC è presente un picco di correlazione tra il protone H-1' (δ_H 4.60 ppm) e il carbonio C-1 (δ 93.4 ppm).

Lo spettro di massa ESI^+ presenta un picco a *m/z*= 407 u.m.a., che conferma il peso molecolare del composto pari a 406 u.m.a. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 7, pag. 139).

- ***Teucardoside (8):***



8- Teucardoside

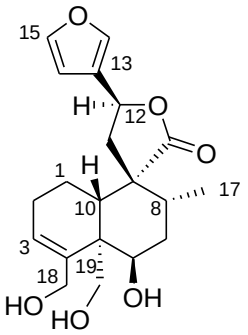
Nello spettro IR del composto **8** sono presenti bande di assorbimento a 1715 cm^{-1}, dovute alla presenza di una funzione carbonilica, e a 1660 cm^{-1} relativi a doppi legami olefinici. Lo spettro ^{1}H-NMR mostra la presenza del segnale del protone olefinico H-7 (δ_H 5.97 ppm), e nello spettro ^{13}C-NMR si osservano le risonanze a δ 129.0 e 175.6 ppm attribuite ai carboni del doppio legame in C-7 e in C-8 e il segnale di un carbonio carbonilico in C-6 (203.9 ppm), inoltre a differenza del composto 7 si osserva l'assenza del $COOCH_3$ in posizione 8.

Nello spettro protonico si osserva il segnale di un gruppo CH_2-O- (6.45 ppm) che indica la presenza di protoni alchilici adiacenti a un eteroatomo di ossigeno di un legame etereo; la presenza dei segnali singoletto attribuiti rispettivamente al protone olefinico H-7 (δ_H 5.97 ppm), al protone H-9 (δ_H 3.55 ppm) e agli H_3-10 (δ_H 2.27 ppm). Sono inoltre presenti il doppietto del protone anomerico (δ_H 4.60 ppm, J=7.8 Hz) di una unità di glucosio, e del protone anomerico di una unità di ramnosio (δ_H 5.45 ppm, J=1.8 Hz); ed una serie di segnali tra 3 e 4 ppm attribuiti agli idrogeni delle due unità saccaridiche. Il glucosio legato è presente con un legame di tipo β, perché la costante di accoppiamento relativa al protone anomerico è di 7.8 Hz.

Il monosaccaride è presente in forma piranosidica poiché le costanti di accoppiamento dei protoni sono tutte grandi a causa delle interazioni (ax-ax) tra gli idrogeni; il legame del ramnosio invece è in α poiché la costante di accoppiamento tra H-1''/H-2'' è piccola e del valore di 1.8 Hz. La presenza dell'unità di ramnosio in forma piranosidica è stata dedotta sulla base delle costanti di accoppiamento dei protoni dell'unità saccaridica: la costante di accoppiamento grande tra il protone H-3''/H-4'' (J=8.5 Hz) indica una interazione assiale-assiale tra i due protoni; cosi' come per H-4''/H-5'' (J=8.7 Hz); mentre la costante tra H-2''/H-3'' (1.8 Hz) indica una interazione equatoriale-assiale che si verifica (soltanto nelle unità di ramnosio) tra il protone H-2'' (eq.) e il protone H-3'' (ax). Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza delle risonanze dei protoni e dei carboni delle unità di glucosio e ramnosio presenti nel composto. La configurazione del glucosio è stata stabilita essere D, mentre quella del ramnosio essere L, in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto [28] e dalla successiva analisi gas-cromatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard. Dallo spettro COSY si osserva che il protone H-1 (δ_H 5.84 ppm) è accoppiato con il protone H-9 (δ_H 3.55 ppm); il protone H-3 (δ_H 6.45 ppm) è accoppiato con il protone H-4 (δ_H 4.99 ppm), mentre il protone H-7 (δ_H 5.97 ppm) ha un accoppiamento con il protone H-9 (δ_H 3.55 ppm) e viceversa. Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza e le risonanze dei protoni e dei rispettivi atomi di carboni presenti nel glucosio e nel ramnosio, che si trovano legati nel composto. L'unità saccaridica di glucosio è legata sul carbonio C-1 (δ 92.9 ppm) poiché nello spettro HMBC è presente un picco di correlazione tra il protone anomerico del glucosio H-1' (δ_H 4.60 ppm) e il carbonio C-1 (δ 92.9 ppm), mentre il picco di correlazione tra il protone anomerico del ramnosio (δ_H 5.45 ppm) e il carbonio a 77.0 ppm ci consente di affermare che la seconda unità di monosaccaride è legata sul carbonio C-5. Inoltre nello spettro HMBC si osserva che il protone H-1 (δ_H 5.84 ppm) correla con i carboni C-3 (δ 144.3 ppm), C-5 (δ 77.0 ppm); mentre il protone H-3 (δ_H 6.45 ppm) correla con i carboni C-1 (δ 92.9 ppm), C-4 (δ 103.0 ppm) e C-5 (δ 77.0 ppm); i protoni H_2-4 (δ_H 4.99 ppm) correlano con i carboni C-3 (δ 144.3 ppm), C-6 (δ 203.9 ppm), C-9 (δ 55.2 ppm) e che il protone H-7 (δ_H 5.97 ppm) correla con C-5 (δ 77.0 ppm), C-6 (δ 203.9 ppm), C-8 (δ 175.6 ppm), C-9 (δ 55.2 ppm).

Infine si osserva che i protoni H_3-10 (δ_H 2.27 ppm) correlano con i carboni C-7 (δ 129.0 ppm), C-8 (δ 175.6 ppm), C-9 (δ 55.2 ppm). Grazie allo spettro HSQC è stato possibile correlare le risonanze di ciascun atomo di protone con il rispettivo atomo di carbonio. Dai dati NMR e insieme a uno spettro di massa ESI^- con la presenza di uno ione a *m/z* =504 u.m.a. (che conferma il peso molecolare del composto) e dal confronto con dati di letteratura [22, 23] si è stabilito che il composto 8 è il Teucardoside. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 8, pag. 139).

- ***Teusalvina C (9):***



9- Teusalvina C

Il composto **9** è stato isolato come un solido bianco amorfo: lo spettro IR mostra bande di assorbimento relative alla presenza di un anello furanico (3160, 1603, 1505, 876 cm^{-1}), di gruppi ossidrilici (3367 cm^{-1}), olefinici (1660 cm^{-1}) e di un sistema lattonico (1747 cm^{-1}). Lo spettro di massa ESI^+ mostra uno ione molecolare a *m/z*= 362 u.m.a., che insieme ai dati ^{13}C-NMR consente di stabilire che la formula molecolare del composto è $C_{20}H_{27}O_6$; lo spettro ^{13}C-NMR evidenzia la presenza di 20 atomi di carbonio, di cui: un carbonio carbonilico, 3 doppi legami endociclici, un metile secondario, 5 metileni (due dei quali ossigenati), due metini, uno dei quali carbinolico e di carboni quaternari che indicano che si tratta di un composto tetraciclico.

Dai dati NMR si osserva che il composto possiede un nucleo neoclerodanico ossidato. Nello spettro ^{1}H-NMR si osservano i seguenti segnali singoletto: il segnale del protone H-14 (δ_H 6.38 ppm), il segnale del protone H-15 (δ_H 7.58 ppm) e del protone H-16 (δ_H 7.54 ppm) assegnati a un anello furanico terminale. Un altro sistema di spin comprende due set di segnali che risuonano come tripletti ben distinti, relativi al protone H-11 (δ_H 2.62-2.44 ppm, *J*=8.3 Hz) e H-12 (δ_H=5.50, *J*=8.3 Hz).

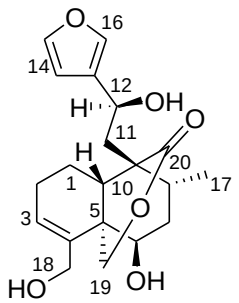
I chemical shifts dei carboni C-11 e C-12 (δ 45.9 e 72.9 ppm) e di due carboni quaternari C-9 e C-20 (δ 53.9 e 179.7 ppm) erano in accordo con la presenza di un'unità a cinque termini spirolattonica. Sono inoltre presenti due segnali, ciascuno un doppietto, dei protoni H_2-19 (δ_H 4.51 e 3.82 ppm) relativi a un gruppo OH, il multipletto a δ_H 4.17 ppm relativi ad un altro gruppo OH presente sul C-18, e il segnale a δ_H 4.41 ppm del protone H-6, relativo alla terza funzione ossidrilica presente nel composto.

Lo spettro COSY evidenzia che il protone H-14 (δ_H 6.38 ppm) è accoppiato con il protone H-15 (δ_H 7.58 ppm) e H-16 (δ_H 7.54 ppm), mentre il protone H-15 è accoppiato con il protone H-12 (δ_H 5.50 ppm), che a sua volta risulta accoppiato con i protoni H_2-11 (δ_H 2.44 e 2.62 ppm). I protoni H_3-17 (δ_H 1.11 ppm) sono accoppiati con il protone H-8 (δ_H 2.33 ppm) e i protoni H_2-7 (δ_H 1.63-1.98 ppm); inoltre il protone H-6 (δ_H 4.41 ppm) è accoppiato con i protoni H_2-7, mentre il protone H-3 (δ_H 5.77 ppm) è accoppiato con i protoni H_2-18 (δ_H 4.17 ppm) e i protoni H_2-2 (δ_H 1.76-2.22 ppm). Dallo spettro COSY si osserva inoltre la presenza di quattro sistemi di spin: il primo sistema include i segnali di un metino, due metileni e di un protone olefinico. I protoni H_2-1 (δ_H 1.09 ppm) risultano accoppiati con il protone H-10 (δ_H 2.08 ppm) e H_2-2 (δ_H 1.67-2.22) che sono accoppiati con il protone vinilico H-3 (δ_H 5.77, s). Il secondo sistema di spin riguarda i protoni metilici H_3-17 (1.11, d, J=6.7 Hz) accoppiati con il protone H-8 (δ_H 2.33 ppm) e con i protoni H_2-7 (δ_H 1.63-1.98). Questi ultimi mostrano un accoppiamento vicinale con un altro protone carbinolico H-6 (δ_H 4.41 ppm), ponendo in tal modo la funzione ossidrilica sul carbonio 6. Gli altri due sistemi separati di spin sono attribuiti a un OH in C-18 e in C-19 sulla base dei dati NMR: nell'HMBC si osserva il cross peak tra i protoni H_2-18 (δ_H 4.17 ppm) e H_2-19 (δ_H 4.51-3.82 ppm) con il carbonio C-4 (144.2 ppm) e le correlazioni a lunga distanza tra i protoni H_2-18 e il carbonio C-3 (δ 131.2 ppm), H_2-18/C-10 (δ_C 43.9 ppm), H_2-19/C-5 (δ_C 48.5 ppm) e H_2-19/C-10 (δ_C 43.9 ppm), inoltre i dati HMBC indicano la presenza di un doppio legame in C-3/C-4. L'unione di tutti i frammenti è stata dedotta sulla base dei dati HMBC.

Dallo spettro HMBC si osserva che il carbonio C-9 (δ 53.9 ppm) correla con H-8 (δ_H 2.33 ppm), con gli H_3-17 (δ_H 1.11 ppm) e H_2-7 (δ_H 1.98 ppm), mentre i protoni H_2-11 (δ_H 2.62 e 2.44 ppm) correlano con C-20 (δ 179.7 ppm), C-13 (δ 126.8 ppm), C-12 (δ 72.9 ppm), C-9 (δ 53.9 ppm) e C-8 (δ 35.8 ppm).

Il protone H-12 (δ_H 5.50 ppm) correla con il carbonio C-14 (δ 140.8 ppm), C-11 (δ 45.9 ppm); il protone H-10 (δ_H 2.08 ppm) correla con C-20 (δ 179.7 ppm),C-9 (δ 53.9 ppm), C-5 (δ 48.5 ppm) e C-11 (δ 45.9 ppm). Inoltre nello spettro HMBC si osserva che i protoni H_2-19 (δ_H 4.51 e 3.82 ppm) correlano con il carbonio C-6 (δ 67.3 ppm), C-4 (δ 144.2 ppm); invece il protone H-10 (δ_H 2.08 ppm) correla con C-1 (δ 19.7 ppm) e i protoni H_2-18 (δ 4.17 ppm) correlano con i carboni C-4 (δ 144.2 ppm), C-3 (δ 131.2 ppm), C-5 (δ 48.5 ppm). La stereochimica relativa dei centri chirali, è stata risolta dall'insieme dei dati 2-D ROESY, dalle costanti di accoppiamento e dal confronto con dati di letteratura [24, 25]. Nello spettro ROESY si osserva un picco di correlazione tra H-8 (δ_H 2.33 ppm), H-10 (δ_H 2.08 ppm) e H_2-11 (δ_H 2.62-2.44 ppm), ciò indica che questi protoni sono dallo stesso lato della molecola (β), mentre le correlazioni tra H-6 (δ_H 4.41 ppm) e H_3-17 (δ_H 1.11 ppm) e H-7 (δ_H 1.63-1.98) e H_2-19 (δ_H 4.51-3.82 ppm), rivela che essi si trovano sul lato opposto della molecola (α). Quindi i dati consentono di stabilire che gli anelli A e B hanno una giunzione di tipo trans e che giacciono su uno stesso piano mentre il terzo anello costituito dall'anello spiro-lattonico è posizionato perpendicolarmente al piano individuato dai sistemi A e B (dati di modellistica). La stereochimica dell'OH in 6 non è dedotta dallo spettro ROESY ma dalla piccola costante di accoppiamento tra H-6 e H_2-7 che dimostra che essi hanno una disposizione α,α, equatoriale. La presenza di un accoppiamento dipolare tra H-12 (δ_H 5.50 ppm) e i protoni H_2-1 (δ_H 1.09 ppm), consente di affermare che H-12 ha una configurazione di tipo S, che è ulteriormente confermata dall'assenza di un picco ROE tra H-12 e H_3-17. La distanza interatomica [24, 25] nel conformero 12(S) tra H-12 e H_2-1 (2.3 e 3.4 Angstrong) è stata rilevata nello spettro ROE. Quindi la struttura del composto 9 è 15,16-epossi-6β,18,19, triidrossi, neocleroda, 3(4), 13(16), 14, trien, 12(S)- olide, nota come Teusalvina C. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 9, pag. 140).

- ***Teulamifina B (10):***



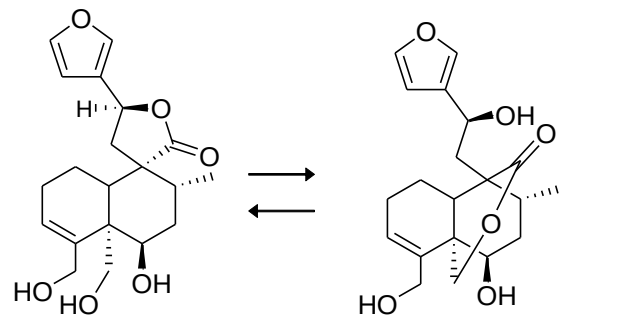
10- Teulamifina B

Nello spettro protonico del composto **10** si osservano un segnale doppio doppietto del protone H-12 (δ_H 4.84 ppm, *J*= 4.0, 10.3 Hz) e il doppio doppietto del protone H-6 (δ_H 4.26 ppm, *J*= 1.5, 4.0 Hz) un sistema di spin relativo a H_2-19 (δ_H 4.36,d 4.46,d, *J*=11.0 Hz). Inoltre è presente il segnale di un protone doppietto relativo a H-12 (δ_H 4.84 ppm) inerente alla funzione emiacetalica, situata sull'atomo di carbonio con un protone vicinale; la chiusura del gruppo emiacetalico è rivelata dal doppio doppietto del protone H-6 a δ_H 4.26 ppm, che deve essere vicino a un gruppo metilenico. Lo spettro di massa ESI^- mostra uno ione molecolare a *m/z*= 361 u.m.a.

Nello spettro COSY si osserva che il protone H-15 (δ_H 7.45 ppm) e il protone H-16 (δ_H 7.48 ppm) correlano con il protone H-14 (δ_H 6.49 ppm) e il protone H-3 (δ_H 5.85 ppm) correla con i protoni H_2-2 (2.22 ppm) e H-6 (δ_H 4.26 ppm), mentre il protone H-12 (δ_H 4.84 ppm) correla con i protoni H_2-11 (δ_H 2.15 e 2.43 ppm). Sono accoppiati tra loro i protoni H_2-19 (δ_H 4.36 e 4.46 ppm); i protoni H_2-18 (δ_H 3.97 ppm) sono accoppiati con il protone H-3 (δ_H 5.85 ppm), H_2-2 (δ_H 2.22 ppm) e H_2-18 (δ_H 4.21 ppm) e i protoni H_3-17 (δ_H 0.79 ppm) sono accoppiati con il protone H-8 (δ_H 2.49 ppm). Nello spettro HMBC si osserva che i protoni H_3-17 (δ_H 0.79 ppm) correlano con i carboni C-8 (δ 31.2 ppm), C-7 (δ 37.8 ppm) e C-9 (δ 50.9 ppm) e che i protoni H_2-19 (δ_H 4.36 e 4.46 ppm) correlano con i carboni C-4 (δ 140.3 ppm), C-5 (δ 42.3 ppm), C-7 (δ 37.8 ppm), C-6 (δ 70.1 ppm) e C-20 (δ 175.4 ppm). Inoltre il protone H-10 (δ_H 2.74 ppm) correla con il carbonio C-20, C-19 (δ 50.9 ppm), C-5 (δ 42.3 ppm), C-8 (δ 31.2 ppm) e C-1 (δ 21.2 ppm).

I protoni H_2-11 (δ_H 2.15 e 2.43 ppm) correlano con il carbonio C-12 (δ 62.9 ppm), C-9 (δ 50.9 ppm) e C-8 (δ 51.2 ppm). Infine i dati HSQC hanno consentito di correlare ciascun protone con i rispettivi atoni di carbonio. E' presente un gruppo δ-lattonico in C-19 e C-20 e si osserva che è presente una giunzione trans tra il protone H-10 e l'anello lattonico; la configurazione dell'OH in 12 è stato determinata essere β confrontando i dati ^{13}C-NMR del composto isolato con quelli riportati in letteratura della Teulamifina B [26]; la struttura è stata inoltre confermata dal confronto dei dati ^{13}C-NMR con quelli riportati in letteratura [26].

Probabilmente i composti 9 e 10 si interconvertono tra loro e l'uno si origina dall'altro in quanto blande condizioni basiche possono aprire l'anello lattonico e formare un nuovo δ lattone attraverso la chiusura della funzione carbinolica primaria in posizione 5. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 10, pag. 140).



Teusalvina C **Teulamifina B**

ATTIVITA' BIOLOGICA *T.polium*

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Raimo dell'Università degli studi del Molise, è stato effettuato lo studio dell'attività antiossidante del *Teucrium polium*, una pianta appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae* che cresce anche sul territorio molisano. Oggi è noto che molte delle proprietà di questa pianta sono attribuibili alla presenza di sostanze con attività antiossidante, in grado di limitare i danni causati dallo stress ossidativo. Sono state prese in esame quattro attività biologiche: (*i*) l'attività *scavenger*, (*ii*) il potere riducente, (*iii*) l'attività di inibizione dell'enzima *Xanthine oxidase* e (*iv*) l'attività antilipoperossidasica degli estratti della pianta fresca *T.Polium* e confrontati con l'attività dell'estratto metanolico proveniente dall'infuso della stessa pianta, che ha evidenziato un attività molto bassa. Per tal motivo è stato effettuato lo studio dell'attività biologica esclusivamente degli estratti provenienti dalla pianta fresca, eseguendo un frazionamento bioguidato, fino ad arrivare alla valutazione delle proprietà antiossidanti di alcuni dei composti puri che sono stati caratterizzati in questo lavoro di tesi.

Lo stress ossidativo, è coinvolto in numerosi danni a carico di diverse componenti cellulari responsabili dell'invecchiamento cellulare (*aging*) e di numerose patologie, quali le malattie degenerative. L'ossigeno (O_2) è una molecola indispensabile per la sopravvivenza dell'uomo e di tutti gli organismi aerofili; allo stesso tempo però è una molecola estremamente reattiva e in grado di generare specie radicaliche. I ROS (Reactive Oxygen Species) sono composti altamente reattivi dell'ossigeno caratterizzati dalla presenza di elettroni spaiati nel loro guscio elettronico di valenza. In questo gruppo, oltre alle specie radicaliche (radicale ossidrilico $^{\cdot}OH$), rientrano anche molecole neutre (il perossido d'idrogeno H_2O_2), gli idroperossidi(R–O–O–R) e molecole ioniche (l'anione superossido $O_2^{\cdot-}$). I radicali, per la loro caratteristica di possedere un elettrone spaiato, sono delle specie altamente reattive; infatti, la loro continua esigenza di appaiare l'elettrone li spinge a reagire con le molecole vicine, spesso molecole organiche, e ad acquisire un elettrone. In questo modo il radicale viene convertito in una molecola stabile mentre la molecola donatrice si trasforma in una specie radicalica alla ricerca di un nuovo elettrone.

Viene così attivata una reazione di ossidazione a catena che coinvolge le molecole normalmente presenti nella cellula, come lipidi, proteine, acidi nucleici e carboidrati che ne risultano inevitabilmente danneggiate.

A concentrazioni fisiologiche i ROS svolgono dei ruoli importanti per la sopravvivenza dell'organismo: fungono da trasduttori di importanti processi cellulari, partecipano alla regolazione dell'espressione genica, alla proliferazione e differenziamento cellulare, all'apoptosi, alla difesa dell'organismo e in alcuni casi sono considerati dei veri e propri messaggeri secondari. Normalmente le cellule sono in grado di tenere sotto controllo la produzione di queste specie reattive dell'ossigeno, mantenendo la loro concentrazione intracellulare entro livelli fisiologici. Quando la loro produzione supera le normali difese antiossidanti delle cellule o si ha una riduzione dell'efficacia di queste ultime si instaura una condizione nota come *stress ossidativo*.

I principali bersagli dei radicali liberi sono: i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici. Ad esempio nei lipidi di membrana il radicale ossidrile ($HO^{\cdot}$) può causare la perossidazione lipidica, un processo a cascata caratterizzato dalla produzione di perossidi lipidici. Il fenomeno della perossidazione, noto principalmente per i lipidi, non è esclusivo di tali molecole, ma può interessare qualsiasi tipo di substrato organico, dagli amminoacidi alle proteine, dai carboidrati ai nucleotidi. I lipidi, soprattutto quelli insaturi, con elettroni "disponibili" a soddisfare l'avidità dei radicali liberi, rappresentano per tale caratteristica un bersaglio importante del danno ossidativo. Altro importante bersaglio dello stress ossidativo sono le proteine, macromolecole che possono essere oggetto di diverse trasformazioni quali modificazioni amminoacidiche sito-specifiche, frammentazioni della catena polipeptidica, aggregazione di peptidi mediante cross-linking, alterazioni delle cariche elettriche. Il danno ossidativo del DNA, a differenza di quello a carico delle proteine spesso irreversibile, può essere eliminato dai normali sistemi di riparo della cellula. La produzione di basi azotate modificate può interferire con il normale appaiamento delle basi complementari, quindi con i processi di trascrizione e replicazione del DNA. Data l'immediata vicinanza al sito di produzione dei ROS, il DNA mitocondriale rappresenta il principale bersaglio del danno ossidativo.

Le mutazioni a carico del DNA mitocondriale si associano ad alterazioni del normale metabolismo cellulare, quindi ad aumentati livelli di superossido, e all'innesco della cascata apoptotica mitocondriale.

Meccanismi di difesa dallo stress ossidativo

Gli organismi sono costantemente esposti a uno o più sistemi che generano ROS, causando danni a proteine, acidi nucleici e lipidi. Le specie reattive dell'ossigeno sono prodotti del normale metabolismo cellulare aerobio, dei processi infiammatori, delle reazioni catalizzate dalle ossidasi o da metalli, etc. La cellula, per poter fronteggiare la produzione e la reattività dei radicali liberi ha sviluppato, nel corso dell'evoluzione, vari sistemi di difesa. Gli agenti antiossidanti possono essere classificati in preventivi, *scavenger* e agenti di riparo.

Gli antiossidanti preventivi sono agenti che, attraverso vari meccanismi, quali la chelazione dei metalli di transizione prevengono la formazione di specie reattive. In questo gruppo rientrano gli enzimi: catalasi, superossido dismutasi e glutatione per ossidasi [31]. Gli antiossidanti *scavengers* ("spazzini") devono il loro nome al meccanismo chimico alla base della loro attività antiossidante. E' possibile distinguerli in due grandi classi:

a) 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 i tocoferoli, l'acido citrico, il β-carotene, e i polifenoli)
b) composti tiolici in grado di agire direttamente o tramite la catalisi di enzimi originando equivalenti riducenti e disolfuri (ad esempio il glutatione, la tioredossina)

Ad elevate concentrazioni anche gli amminoacidi liberi, ad esempio triptofano, cisteina, tirosina, istidina, possono svolgere un'importante attività *scavenger* nei confronti dei ROS. Gli agenti di riparo comprendono invece enzimi che agiscono dopo che si è instaurato il danno da specie reattive dell'ossigeno; in questo gruppo rientrano le idrolasi (proteasi, lipasi, etc.), le transferasi e le polimerasi (DNA polimerasi, etc.).

Oggi particolare attenzione viene rivolta alla ricerca di molecole antiossidanti che possono essere acquisite con la dieta o come medicinali e rafforzare le difese naturali dell'organismo.

Sono stati, infatti, messi a punto una serie di dosaggi chimici ed enzimatici per valutare l'attivita' antiossidante di queste sostanze benefiche derivanti da piante, alimenti, etc.

VALUTAZIONE DELLE ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTI DEGLI ESTRATTI DI *Teucrium polium* L.

Si è proceduto alla valutazione dell'attività degli estratti e dei composti puri isolati dalla pianta fresca di *T. polium* dopo aver riscontrato una bassa attività per il decotto della stessa pianta. E' stata perciò valutata l'attività antiossidante dei quattro estratti cloroformico, n-esanico, butanolico e acquoso. Dall'analisi comparativa delle diverse attività antiossidanti analizzate, cioè il potere scavenger (DPPH) [32], il potere riducente (RP) [33], l'attività di inibizione della XO (XOI) e l'attività antilipoperossidasica (ALP) [34], è emerso che, tra i quattro estratti di *Teucrium polium* L., quello che ha mostrato la più alta attività antiossidante è l'estratto butanolico.

Estratto	**DPPH (IC_{50}, µg/mL)**	**RP (Eq.Ac.Asc.)**	**XOI (IC_{50}, µg/mL)**	**ALP (LPO_{50}, µg/mL)**
$CHCl_3$	414,3	0,02	152,5	5127,3
n-Esano	208,0	0,02	n.d.	571,7
BuOH	**8,6**	**0,41**	**35,4**	**39,8**
H_2O	10,9	0,30	84,6	65,7

Tab.III.2 -Valori delle quattro attività antiossidanti degli estratti di *Teucrium polium* L.

Sulla base dei risultati ottenuti, si è concentrata l'attenzione limitatamente alla valutazione delle proprietà antiossidanti dell'estratto butanolico.

VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DELLE FRAZIONI OTTENUTE DALLA DCCC

Sulle frazioni ottenute dalla DCCC è stato eseguito uno *screening* dell'attività *scavenger*; in particolare è stata valutata la capacità antiossidante di ciascuna frazione (circa 6 µg/mL). Allo scopo di snellire il lavoro di caratterizzazione delle diverse attività biologiche testate, le frazioni della DCCC sono state riunite, sulla base del loro comportamento comune in TLC, così come riportato in Tab.III.3 :

RIUNIONE	FRAZIONE
A	3
B	9-10
C	12-16
D	17-20
E	22-23
F	26-29

Tab.III.3 - Riunioni delle frazioni ottenute dalla DCCC dell'estratto BuOH

Su queste frazioni sono state valutate le quattro attività biologiche. In particolare, l'attività *scavenger* mostrava un significativo incremento in corrispondenza del *pool* C (IC_{50} 1,5 µg/mL), come indicato nella Tab. III.4.

Riunioni	IC_{50} (µg/mL)
A	21,6
B	3,0
C	1,5
D	2,8
E	4,6
F	3,8

Tab.III.4 – Attività scavenger riunioni DCCC

Per quanto riguarda il potere riducente, il *pool* F ha mostrato il maggiore incremento dell'attività specifica, risultando infatti circa due volte maggiore rispetto all'estratto butanolico di partenza. La valutazione dell'effetto inibitorio sull'attività della XO esercitato dai *pool* della DCCC ha mostrato come tale proprietà sia concentrata essenzialmente su due gruppi di frazioni, D e F, costituite da composti caratterizzati da medio-bassa polarità (Tab. III.5).

Riunioni	IC_{50} (µg/mL)
A	443,8
B	n.a.
C	491,5
D	92,7
E	328,2
F	37.5

Tab.III.5 – Inibizione XO riunioni ottenute dalla DCCC BuOH, n.a.: campione non attivo

Sulla base di questi risultati è stata valutata l'attività biologica dei composti puri, provenienti dalle frazioni con l'attività maggiormente significativa.

ATTIVITÀ BIOLOGICA DEI COMPOSTI PURI

Nella tabella sono riassunte le quattro attività biologiche analizzate per i cinque composti puri: il Composto Nuovo, (Tetraglic.), il composto Poliumoside A (PUAm), la Luteolina-7-O-β-D-glucopiranoside (L7G), la Luteolina 7-O-neoesperidoside (L7N), la Luteolina-7-O-rutinoside (L7R):

Composto	**DPPH (IC_{50}, µg/mL)**	**RP (Eq.Ac.Asc.)**	**XOI (IC_{50}, µg/mL)**	**ALP (LPO_{50}, µg/mL)**
Tetraglic.	**4.3**	**0.53**	301.5	**15.0**
PUAm	5.3	0,27	531.7	82.5
L7R	13.0	0,28	63.5	21.6
L7N	33.0	0,08	17.9	43.3
L7G	6.0	0.10	**5.6**	n.d.

Tab III.6: Attività biologica dei composti puri

Gli antiossidanti con proprietà *scavenger*, sono molecole in grado di neutralizzare i radicali liberi; tale capacità è legata essenzialmente al numero e alla particolare disposizione dei residui ossidrilici presenti. In particolare, la Luteolina7-O-neoesperidoside, la Luteolina 7-O-rutinoside e la Luteolina 7-O-glucoside hanno la stessa struttura di base, cioè quella di un flavone glicosilato, ma si differenziano tra loro solo per il numero di zuccheri legati all'ossidrile in posizione 7 (nella Lut.7-O-gluc. è presente una sola molecola di glucosio, mentre nella Lut.7-O-rut. e Lut.7-O-neoesp. sono presenti due unità saccaridiche, una di glucosio e l'altra di ramnosio) o per la disposizione dei monossacaridi nella molecola (il ramnosio occupa una diversa posizione nella Lut.7-O-gluc. e nella Lut.7-O-neoesp.).

Il Poliumoside A (PUAm) e il nuovo composto ad esso correlato (Tetraglic.) sono invece dei derivati glicosidici dell'acido caffeico che si differenziano per il numero di residui saccaridici (il PUAm contiene tre unità saccaridiche mentre il composto nuovo ne contiene quattro).

Confrontando l'attività *scavenger* dei tre flavoni glicosidici, è emerso che in generale possiedono un discreto potere *scavenger* dovuto prevalentemente alla presenza del carbonile in posizione 4 e al catecolo in posizione 3',4' (caratteristiche queste comuni alle tre molecole in esame). Il metabolita dotato di maggiore attività *scavenger* è risultato essere la Luteolina 7-O-glucoside (IC_{50}=6,0 μg/mL), che contiene una sola unità saccaridica. Ciò conferma i dati presenti in letteratura, secondo i quali le unità saccaridiche determinano una distorsione del nucleo del benzo-γ-pirone e, quindi, una ridotta capacità nel delocalizzare gli elettroni. Sebbene le molecole Luteolina 7-rutinoside (IC_{50}=13,0 μg/mL) e Luteolina 7-O-glucoside (IC_{50}=33,0 μg/mL) siano molto simili tra loro, possiedono attività scavenger abbastanza diverse. Tale differenza è probabilmente ascrivibile alla diversa posizione del ramnosio; la presenza del ramnosio in una posizione più vicina al nucleo del benzo-γ-pirone, potrebbe influire maggiormente sulla planarità e quindi sulla capacità nel neutralizzare i radicali liberi da parte della Luteolina 7-O-neoesp., che di fatto risulta essere meno attiva della Luteolina-7-O-rut.

Le molecole PUAm e Tetraglic. non sono dei flavonoidi, ma dei fenilpropanoidi; è pertanto necessario analizzarle separatamente. Si tratta di due esteri glicosidici dell'acido caffeico, entrambi caratterizzati da tre domini: (*i*) una struttura fenolica derivante dall'acido caffeico, (*ii*) un gruppo etil-catecolico e (*iii*) una struttura portante di tipo saccaridico.

L'attività *scavenger* dell'acido caffeico è legata principalmente al catecolo dell'anello aromatico. In questo caso l'attività è ulteriormente potenziata dalla presenza del gruppo etil-catecolico, che lega il glucosio presente al centro della molecola. Le due molecole PUAm (IC_{50}=5,3 μg/mL) e Tetraglic. (IC_{50}=4,3 μg/mL) hanno una attività *scavenger* maggiore di quella dei flavoni glicosidici. A differenza dei tre flavonoidi, l'attività *scavenger* di tali composti aumenta all'aumentare delle unità saccaridiche in essi presenti. La maggiore attività potrebbe essere dovuta, oltre alla presenza del catecolo, all'elevato numero di residui ossidrilici presenti sulle unità saccaridiche, che non vanno a interferire con le due funzioni catecoliche.

Gli antiossidanti riducenti partecipano anch'essi alla protezione della cellula dagli effetti deleterei dello stress ossidativo. Sembra che l'attività riducente dei polifenoli sia dovuta al gruppo catecolico [35].

Il numero di residui ossidrilici non influenza l'attività riducente che, invece, risulta potenziata dalla presenza di sostituenti alifatici (come $–CH_3$, $-CH_2-CH_3$) sulla funzione catecolica [36]. Tali sostituenti aumentano, di fatto, la tendenza dell'anello aromatico a donare gli elettroni dal residuo ossidrilico, aumentandone di conseguenza il suo potere riducente. L'analisi del potere riducente dei composti purificati da alcune frazioni dell'estratto butanolico ha evidenziato come il metabolita dotato di maggiore attività biologica è il composto nuovo mai isolato in precedenza, (0,53 Eq.Ac.Asc.). Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di due gruppi catecolici e di quattro unità saccaridiche (che non interfereniscono con i catecoli), fonti di ulteriori gruppi ossidrilici. I flavoni glicosidici Lut.7-O-neoesp. (0,08 Eq.Ac.Asc.) e Lut.7-O-gluc. (0,10 Eq.Ac.Asc.) mostrano un potere riducente pressocchè identico tra loro, ma inferiore a quello dei glicosidi di natura polifenolica. La minore attività potrebbe derivare dalla presenza di un solo catecolo. La possibilità di una maggiore attività della Lut.7-O-neoesp., ipotizzata per la presenza di una unità saccaridica in più, non ha trovato riscontro nelle analisi biologiche; probabilmente esso risulta troppo vicino al nucleo del benzo-γ-pirone, influenzandone negativamente la bioattività. Anche la Lut.7-O-rut. (0,28 Eq.Ac.Asc.), ha evidenziato una attività riducente maggiore rispetto a quella della Lut. 7-O-neoesp., prossima a quella del PUAm. Probabilmente il maggior potere riducente è dovuto alla presenza di ulteriori unità saccaridiche, fonti insieme ai catecoli di altri gruppi ossidrilici.

La maggiore attività di inibizione sull'enzima *Xanthine Oxidase* è esercitata dalla Lut.7-O-gluc. (IC_{50}=5,6 μg/mL), probabilmente poiché la molecola possiede un minor numero di residui saccaridici. La L7R (IC_{50}=63,5 μg/mL) e L7N (IC_{50}=17,9 μg/mL) sono caratterizzate da un diverso grado di inibizione; l'attività di L7N è circa 3 volte maggiore di quella della L7R; probabilmente ciò è dovuto alla diversa localizzazione spaziale del ramnosio che causa un maggiore ingombro sterico nell'interazione con il sito catalitico dell'enzima. Inoltre dati di letteratura evidenziano che il potere inibitorio dei glicosidi polifenolici è dovuto alla presenza dei due residui ossidrilici sull'anello aromatico dell'acido caffeico.

Tra il metabolita e la XO si stabiliscono diversi legami a idrogeno; un'ulteriore interazione avviene tra il gruppo carbonilico dell'acido caffeico e l'amminoacido serina presente nell'enzima.

I fenilpropanoidi, oltre al catecolo derivante dall'acido caffeico, hanno un gruppo feniletilico che migliora l'attività di inibizione grazie ad interazioni di natura idrofobica con i residui amminoacidici. Tuttavia, la struttura chimica dei fenilpropanoidi-glicosidi nel complesso sembrerebbe limitarne notevolmente l'attività inibitoria; infatti, PUAm e il composto nuovo possiedono un'attività più bassa di quella dei loro derivati flavonici. Tetraglic. possiede una maggiore attività inibitoria rispetto a PUAm (IC_{50}=301,5 μg/mL e IC_{50}=531,7 μg/mL rispettivamente), probabilmente a causa di una maggiore interazione con l'enzima. Nella Figura sono illustrati i possibili siti di interazione dei glicosidi polifenolici con il sito attivo dell'enzima XO.

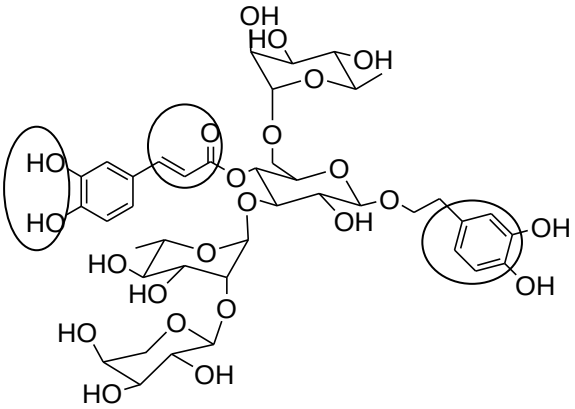


Fig. III.5: Possibili siti di interazione del composto nuovo con il sito catalitico dell'enzima XO

L'attività antilipoperossidasica è dovuta invece alla chelazione dei metalli di transizione e all'attività *scavenger* [37]. La chelazione dei metalli di transizione, così come l'attività *scavenger*, è legata alla presenza del catecolo e, nel caso dei flavoni, del gruppo ossidrilico in posizione C-3 e C-5 e della funzione carbonilica in posizione 4 [38]. I residui glicosidici sui flavonoidi riducono l'attività antiossidante poiché riducono l'idrofobicità della molecola, impedendo l'accesso ai radicali lipoperossidici che si originano dalle membrane.

La maggiore attività antilipoperossidasica è posseduta dal composto nuovo tetrasaccaridico (LPO_{50}=15,0 μg/mL), con attività specifica comparabile a quella della L7R. Il PUAm ha un'attività cinque volte inferiore al Tetraglic. (LPO_{50}=82,5 μg/mL); poiché hanno attività *scavenger* simili, la maggiore attività antilipoperossidasica potrebbe essere dovuta a una maggiore efficacia del tetrasaccaride nel chelare gli ioni metallici. La L7N, che possiede due residui saccaridici molto prossimi all'anello A del flavone, ha invece la minore attività antilipoperossidante.

Dai dati complessivi emerge che tra le molecole analizzate, il composto dotato del più ampio spettro di attività biologiche è il composto nuovo, mai isolato in precedenza.

I composti che possiedono attività antiossidante potrebbero rappresentare un valido supporto alle normali difese dell'organismo contro gli effetti deleterei provocati dallo stress ossidativo. La possibilità di somministrare con la dieta, o tramite preparazioni farmaceutiche, tali metaboliti potrebbe rappresentare un valido aiuto nella prevenzione o nel controllo della progressione di molte patologie degenerative, e per il miglioramento delle condizioni generali della salute dell'uomo. Sarebbe necessario verificare l'efficacia antiossidante dei composti isolati anche attraverso dosaggi *in vivo.*

I test in vitro effettuati vengono condotti in condizioni che non riflettono quelle fisiologiche tipiche dell'organismo, non tenendo in considerazione una serie di parametri che influenzano la biodisponibilità del principio attivo: l'assorbimento (la cui velocità varia a seconda della via di somministrazione), la resistenza al pH acido e agli enzimi gastrici (caratteristiche fondamentali per sostanze somministrate per via orale), il metabolismo delle sostanze esogene, etc. Modelli animali e/o studi condotti direttamente sull'uomo, ma anche l'utilizzo di sistemi cellulari modello, rappresentano sicuramente dei metodi di indagine migliori per valutare l'efficacia delle molecole antiossidanti nell'organismo umano.

PARTE SPERIMENTALE

Preparazione e Purificazione Decotto

100g di foglie di *Teucrium Polium*, prelevate a Colli a Volturno nell'ottobre del 2008, ed identificate dalla Dott. Paola Fortini del Dipartimento STAT (Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio) dell'Università degli studi del Molise, sono state fatte bollire in 2.5 L di acqua per circa un'ora, fino a riduzione del volume d'acqua a 1L, ottennedo un decotto dal colore marrone scuro, concentrato al rotavapor ottenendo un infuso dal peso secco di 15g; l'infuso acquoso è stato estratto con metanolo, (peso estratto MeOH 2g) e sottoposto a DCCC cloroformica, in cui la fase organica è costituita da $CHCl_3$/MeOH/H_2O, 7:13:8, nella fase ascendente (la fase discendente era la fase stazionaria) ottenendo 195 provette, riunite, sulla base del comportamento comune su TLC in 28 frazioni.

La frazione n. 13, è stata separata in HPLC a fase inversa, su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 7:3, ϕ= 1 ml/min, ottenendo 4 picchi; dagli spettri NMR è stato identificato il secondo e quarto picco come Teulamifina B (10), (1 mg e 2 mg). Il composto 10 è stato trovato anche nella frazione n.14, purificata in HPLC, su colonna C-18 μbondapack, con miscela MeOH:H_2O, 35:65, ϕ=0.8 ml/min, ottenendo un cromatogramma con 8 picchi maggiori e dagli spettri NMR è stato identificato il quinto picco come Teulamifina B, mg 2. Inoltre il composto 10 è stato ritrovato anche nella frazione n.15, MeOH:H_20,35:65, ϕ=0.8 ml/min, mg 0.9. La frazione n.18, è stata purificata in HPLC, su colonna C-18 μbandapack, MeOH:H_20, 1:9, ϕ=0.8 ml/min, ottenendo 8 picchi, l'ottavo dei quali, 8 mg, è stato ulteriormente purificato su colonna C-18, MeOH:H_2O, 3:7, ϕ=2 ml/min ottenendo 5 picchi il quarto dei quali identificato grazie agli spettri NMR come Teusalvina C (9), mg 0.7.

Estrazione pianta fresca *T. Polium*:

80 g di foglie della pianta *Teucrium Polium* sono state estratte per 3 volte con 700 ml di MeOH per volta; l'estratto MeOH ottenuto è stato filtrato (circa 2L) e portato a secco ottenendo 15g di estratto metanolico; sottoposto a metodica di Kupchan aggiungendo una soluzione di 500 ml di MeOH:H_2O, in rapporto 9:1 (450 ml MeOH, 50 ml di H_2O) ed estratto per 3 volte con 300 ml di esano per volta, ottenendo un estratto esanico di circa 3,2g. In seguito si modula la miscela 9:1, MeOH:H_2O, aggiungendo una quantità tale d'acqua fino ad arrivare a un rapporto 7:3 e si estrae per 3 volte con $CHCl_3$ (250 ml per volta) ottenendo 3,0g di estratto cloroformico, quindi si elimina tutto il MeOH dalla fase acquosa e si estrae per 3 volte con butanolo ottenendo circa 3.5g di estratto butanolico e 4.0 g di estratto acquoso.

Purificazione Estratto Butanolico:

2g di estratto butanolico sono stati purificati attraverso DCCC nelle seguenti condizioni: n-BuOH/Me_2CO/H_2O, 3:1:5, nella fase discendente (la fase ascendente è la fase stazionaria); eluendo 320 provette, riunite sulla base del comportamento comune su TLC in 32 frazioni. La frazione n. 7, è stata sottoposta ad HPLC, eluendo con miscela MeOH:H_2O 25:75, colonna C-18 μ-bondapack, ϕ=0.8 ml/min, ottenendo il composto 8-acetil Arpagide (7), mg 1.4 e il Teucardoside (8), mg 1.3; quest'ultimo è stato ritrovato anche nella frazione n. 8, cromatografata su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 25:75, ϕ=0.8 ml/min, ottenendo mg 2.4. La frazione n.9, della DCCC butanolica, è stata purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 35:65, ϕ=1.2 ml/min, ottenendo il composto nuovo (1), 4 mg. Il composto 1 è stato trovato anche nella frazione n.10, cromatografata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 3:7, ϕ=1ml/min, 2.2 mg. La frazione n. 12, è stata purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, eluente MeOH:H_2O 4:6, ϕ=1 ml/min, ottenendo il composto Poliumoside A (2), mg 2.1. Il composto Poliumoside A è stato ritrovato anche nella frazione n. 13, nella frazione n.15, (mg 4.5) e nella frazione n.16, (mg 5.2) eluendo con una miscela MeOH:H_2O, 40:60, ϕ=1 ml/min. La frazione n. 18 è stata eluita con MeOH:H_2O, e 0.1% TFA, 4:6, ϕ=1ml/min, ottenendo 4 mg, Luteolin 7-O-rutinoside (6). Il composto Lut-7-O-rut. è stato ritrovato anche nella frazione n.19, eluendo con miscela MeOH:H_2O, 35:65,0.1% TFA, ϕ=1 ml/min, ottenendone mg 3.4, e il composto Luteolina 7-O-neoesperidoside (5).

Quest'ultimo è stato trovato anche nella frazione n. 20 e n.21, purificate nelle stesse condizioni della frazione n.19, ottenendo 0.8 mg e 0.9 mg del composto (5). Dalla frazione n.27, è stato ottenuto il composto Luteolin-7-O-β-D-glucopiranoside (3), 2.1 mg. La frazione n.29, mg 14, è stata eluita con MeOH:H_2O, 35:65, 0.1% TFA, ϕ=1 ml/min, ottenendo il composto Luteolina 4'O-β-D-glucopiranoside (4), mg 1.7.

Procedure generali degli esperimenti

Gli spettri IR (KBr) sono stati misurati su uno spettrofotometro modello Brucker IFS-48. Gli spettri UV sono stati ottenuti in CH_3CN usando uno spettrofotometro Beckman DU70. La spettrometria di massa High-resolution fast atom bombardment (HRFAB-MS) è stata effettuata su strumento Fisons VG Prospec e la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica (ESI-MS) è stata realizzata su spettrometro con triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000. Il potere ottico roratorio è stato misurato su un polarimetro Jasko P-2000. Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati realizzati su un apparecchio Varian Unity INOVA a 500.13 e 125.77 MHz, rispettivamente. I chemical shifts erano riferiti al segnale del solvente metanolo deuterato (CD_3OD,δ_H 3.31 ppm). Le correlazioni omonucleari ^1H-^1H sono state determinate mediante esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari ^1H-^{13}C sono state determinate con esperimenti HSQC. Le correlazioni ^1H-^{13}C attraverso due e tre legami sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per $^{2,3}J$ di 8.0 Hz. Le analisi gas cromatografiche sono state realizzate su strumento Agilent Technologies 6850, Serie II gas cromatografo, con colonna capillare (HP-5, 30 m x 0.25 mm, 180°; velocità di flusso del gas carrier elio di 10 mL min^-1) e con detector FID che operava a 260°.

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 una pompa Waters 510, con un iniettore Waters U6K e un indice di rifrazione Waters 401 come rivelatore, usando una colonna C_{18} μ-bondapak (30 cm x 3.9 mm; i.d.; velocità di flusso di 1 mL min^{-1}; Waters, Milford, MA, USA); e colonna Luna C-18 (3μ, 150 mm x 4.60 mm i.d.; velocità di flusso di 1 mL min^{-1}; Phenomenex, Torrance, CA, USA). I profili di eluizione delle cromatografie su strato sottile TLC sono stati definiti tenendo conto dei valori di Rf ricavabili dalle TLC con Kiesegel 60 F_{254} e rilevate nebulizzando le TLC con una prima soluzione al 5% in

volume di H_2SO_4 in etanolo e una seconda soluzione al 5% in peso di vanillina in etanolo. Per la TLC sono state usate lastre di silice Merck del tipo Kieselgel 60 F_{254}, 0.25 mm. Le TLC sono state fatte migrare in eluente $CHCl_3$, MeOH, H_2O, in rapporto 80:18:2, per le frazioni meno polari; le frazioni più polari invece sono state invece fatte migrare in eluente: BuOH:CH_3COOH:H_2O, in rapporto 60:25.15.

DOSAGGI DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

Sono state prese in esame quattro attività biologiche: (*i*) l'attività *scavenger (Metodo-DPPH)*, (*ii*) il potere riducente (Metodo RP), (*iii*) l'attività di inibizione dell'enzima X*anthine Oxidase (Metodo XOI)* e (*iv*) l'attività antilipoperossidasica (Metodo ALP).

1- Metodo DPPH: il metodo misura l'attività *scavenger* dell'antiossidante, tramite lettura spettrofotometrica della riduzione del radicale 2,2-difenilpicrilidrazil ($DPPH^{\cdot}$) [32]. Infatti, la presenza dell'elettrone spaiato conferisce al radicale libero $DPPH^{\cdot}$ una colorazione violacea con valore massimo di assorbimento a 517 nm. La colorazione passa da viola a giallo quando una molecola dotata di attività *scavenger* cede un protone al radicale, determinando l'appaiamento dell'elettrone e generando la forma ridotta DPPH-H. Per cui l'attività scavenger sarà tanto più alta, quanto minore sarà l'assorbimento a 517 nm.

Preparazione dei campioni: la miscela di reazione conteneva quantità appropriate di campione antiossidante disciolto in 1000 μL finali di tampone A supplementato con 50% etanolo; la reazione veniva innescata in seguito all'aggiunta di $DPPH^{\cdot}$ ad una concentrazione finale 84 μM.

Dopo un tempo di incubazione di 30' al buio e a temperatura ambiente (17-23°C), si misura l'assorbimento a 517 nm. Il controllo positivo è condotto in presenza di un antiossidante standard, il BHT aggiunto ad una concentrazione finale di 35 mg/L. La concentrazione di antiossidante capace di neutralizzare il 50% delle molecole radicaliche presenti nella miscela di reazione è stata espressa come: IC_{50} (μg/mL)

2- Folin-Ciocalteau Total Phenolic Assay o RP (Reducing Power): Il potere riducente è stato determinato adattando il metodo 4 descritto da Hinneburg I. et al., 2006 [33]. Il dosaggio si basa sulla misurazione della capacità di ridurre determinati ioni metallici da parte delle molecole analizzate, sfruttando una reazione colorimetrica.

Il metodo misura il cambiamento di colore quando gli ossidi metallici vengono ridotti dagli antiossidanti polifenolici portando allo sviluppo di un colore blu, con un massimo di assorbimento a 765nm.

Preparazione dei campioni: la reazione era eseguita in 1 mL di tampone B supplementato con 5% (v/v) metanolo contenente $K_3[Fe(CN)_6]$ 1% (p/v) e quantità appropriate di campioni da analizzare. Dopo 30' di incubazione a 50°C, alla miscela di reazione si aggiungono 300 µL di TCA 10% (p/v) e dopo vigorosa agitazione, si centrifugava per 5' a 14000 g a 4°C. Si prelevano 400 µL di sopranatante e supplementati con 400 µL di H_2O e 100 µL di $FeCl_3$ 0,1% (p/v). La lettura dell'assorbanza si esegue a 765 nm, corrispondente al picco di assorbimento del "blu di Prussia". Il potere riducente è stato espresso come equivalenti di acido ascorbico.

3- Metodo XOI (*Xanthine Oxidase* Inhibition): il metodo misura la capacità dell'antiossidante di inibire l'enzima *Xanthine Oxidase*; la XO è l'enzima responsabile dell'ossidazione della *Ipoxanthine* a *Xanthine* e successivamente ad acido urico; la reazione procede utilizzando l'ossigeno dell' H_2O come accettore finale degli elettroni e determina la produzione dell'anione superossido e di perossido di idrogeno. La misurazione viene eseguita tramite lettura spettrofotometrica a 295 nm, utilizzando la *Xanthine* come substrato.

Preparazione dei campioni: la miscela di reazione era costituita da 1000 µL di tampone B in metanolo 10 % (v/v) contenenti 40 µM di XO e quantità scalari di ciascun campione da analizzare. La reazione veniva innescata in seguito all'aggiunta di XO alla concentrazione finale di 1,2 mg/mL. L'attività dell'enzima è stata seguita in cinetica, registrando l'assorbimento a 295 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbe l'acido urico. Il controllo negativo è stato effettuato in assenza dell'enzima. Il potere inibitorio dell'attività dell'enzima XO è stato espresso come IC_{50}, ovvero la concentrazione di analita, espressa in µg/mL, in grado di inibire del 50% l'attività dell'enzima.

4- Metodo ALP o TBARS (*Assay Lipo Peroxidation o ThioBarbituric Acid Reactive Substances*): metodo utilizzato per avere una stima della perossidazione lipidica delle membrane. Per valutare l'attività protettiva contro la perossidazione lipidica esercitata dalle molecole in esame è stato adattato il dosaggio spettrofotometrico descritto da Zarghami et al., 2004, [34].

Si misura la formazione del prodotto di ossidazione, la malonildialdeide (MDA), che in presenza di acido tiobarbiturico (TBA), forma un addotto MDA-TBA che assume una colorazione rosa, con picco di assorbimento a 532 nm.

Preparazione dei campioni: la miscela di reazione conteneva un'emulsione di acido linoleico (AL) 23mM, $FeCl_2$ 0,4 mM, tween 20 0,70% (v/v) e appropriate quantità di campione da analizzare in 1 mL di tampone fosfato 200 mM, pH 7.8. Il controllo positivo è stato condotto in presenza di trolox alla concentrazione finale 0,25 mM. Dopo incubazione a 37°C per 24 h, sono stati prelevati 250 µL di miscela di reazione e trattati con 100 µL di BHT 0,8 g/L, 50 µL di HCl 10% (v/v) e 50 µL TBA 1% (v/v). Per avviare la reazione tra MDA e TBA, la miscela è stata incubata a 100°C per 20'. Dopo aver fatto raffreddare in ghiaccio, si è proceduto con l'estrazione dell'addotto MDA-TBA, aggiungendo 900 µL di n-butanolo e agitando vigorosamente su vortex per 5'. 600 µL di fase butanolica sono stati prelevati dopo centrifugazione per 5' a 14000 g a 4°C e utilizzati .per la lettura dell'assorbanza a 532 nm.

L'attività protettiva delle molecole analizzate contro la lipoperossidazione è stata espressa come la quantità di sostanza in µg/mL che determina il 50% dell' inibizione del processo ossidativo a carico dell'acido linoleico in queste condizioni di reazione (LPO_{50}): LPO_{50} (µg/mL).

MATERIALI TESTS ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

Tutti i prodotti chimici erano di grado analitico. Il difenil-1-picril-idrazile (DPPH), l'acido ascorbico, l'acido tiobarbiturico (TBA), l'esaferricianuro di potassio III ($K_3[Fe(CN)_6]$), il tween 20, l'acido linoleico e l'acido ascorbico sono stati forniti dalla Sigma- Aldrich.

Il (BHT) è stato fornito dalla SΛFC; il trolox è stato acquistato dalla Calbiochem.

I solventi butanolo, etanolo e metanolo sono stati acquistati rispettivamente dalla Sigma-Aldrich, Carlo Erba e dalla Romil; la *Xanthine* e l'enzima *Xanthine oxidase* sono stati forniti dalla Fulka.

Nel corso del lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti tamponi:

Tampone A: 0,1M Tris HCl pH 7,8; **Tampone B**: 50 mM KPO_4 + 0,1mM EDTA, pH 7,8.

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR del Poliumoside A (2), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H/ppm (*J* in Hz)	δ_C/ppm (*J* in Hz)
Acido caffeico		
1	-	127.8
2	7.05 s	115.7
3	-	147.1
4	-	150.0
5	6.77, d, (8.0)	115.2
6	6.95, dd, (8.0)	123.4
7	7.59, d, (16.0)	148.4
8	6.29, d, (16.0)	114.4
9	-	167.7
Aglicone		
1’	-	129.9
2’	6.70, d, (2.5)	116.2
3’	-	144.8
4’	-	143.5
5’	6.67, d, (8.0)	115.4
6’	6.57, dd, (8.0)	119.4
7’	2.80, t, (8.0)	35.5
8’	3.98-3.73, m	72.7
Glucosio		
1	4.37, d, (8.0)	103.9
2	3.38,dd, (8,8.5)	75.8
3	3.80,dd, (8.5,9.5)	81.4
4	4.99,t, (9.5)	70.0
5	3.68,m	74.3
6	3.75-3.47,m, (10.5)	67.3
Ramnosio I		
1’	5.18, d, (1.0)	102.8
2’	3.91,dd, (1.3)	72.2
3’	3.97, dd, (3.0, 9.5)	71.9
4’	3.28, t, (9.5)	73.4
5’	2.54,m	70.2
6’	1.08, d, (6.0)	18.1
Ramn. II		
1’’	4.62, d, (1.0)	101.9
2’’	3.84, dd, (1.3)	71.6
3’’	3.68, dd,(3.0, 9.5)	71.8
4’’	3.34, t, (9.5)	73.6
5’’	3.59, m	69.6
6’’	1.20, d, (6.0)	17.6

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR della Luteolina-7-O-β-D-glucopiranoside (3) e della Luteolina 4'-O-β-D–glucopiranoside (4), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H/ppm, (3) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (3)	δ_H/ppm, (4) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (4)
1	-	-	-	-
2	-	166.6	-	165.2
3	6.61, s	103.9	6.62, s	104.0
4	-	183.9	-	183.6
4a	-	106.8	-	105.4
5	-	162.7	-	163.0
6	6.51,s	100.9	6.22, d, (2.1)	100.3
7	-	164.5	-	165.9
8	6.81, s	95.7	6.46, s	95.1
8a	-	158.7	-	159.2
1'	-	123.1	-	127.1
2'	7.41, d, (2.5)	113.9	7.47, ovl	114.8
3'	-	146.8	-	148.5
4'	-	151.0	-	149.7
5'	6.92, d, (8.0)	116.5	7.33, d, (8.7)	117.8
6'	7.43,dd, (8.0)	120.1	7.48, d, (2.3)	119.7
Glucosio				
1''	5.07, d, (7.9)	101.4	4.93, d, (7.2)	101.7
2''	3.49, m, (8.3)	74.5	3.43, m, (8.3)	73.7
3''	3.50, m, (8.5)	77.6	3.64, m, (9.5)	76.3
4''	3.41, m, (9.4)	71.3	3.18, m, (9.5)	70.2
5''	3.55,m, (1.9, 5.9)	78.1	3.40, ovl	77.2
6''	3.93-3.73, m, (4.2, 12.2)	62.2	3.49-3.73, m, (4.2,12.2)	61.6

ovl=segnale sovrapposto

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR della Luteolina 7-O-β-D-neoesperidoside (5), e della Luteolina-7-O-rutinoside (6), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H/ppm, (5) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (5)	δ_H/ppm, (6) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (6)
1	-	-	-	-
2	-	165.7	-	165.4
3	6.60,s	103.9	6.61, s	103.9
4	-	183.2	-	183.9
4a	-	105.8	-	106.8
5	-	161.9	-	162.7
6	6.46,d, (2.1)	106.0	6.47,d, (2.1 Hz)	100.9
7	-	163.5	-	164.5
8	6.76,d,(2.1)	94.2	6.75,d, (2.1 Hz)	95.8
8a	-	157.9	-	159.1
1’	-	122.7	-	123.1
2’	7.40, ovl	114.9	7.41, ovl	114.0
3’	-	146.0	-	146.7
4’	-	150.1	-	151.0
5’	6.90,d, (8.7)	117.1	6.92, d, (8.7)	116.4
6’	7.42, d, (2.3)	119.5	7.43, d, (2.3)	120.2
Glucosio				
1’’	5.20,d, (8.0)	100.0	5.04, d, (7.2)	100.5
2’’	3.70,m, (8.9)	78.8	3.74,m, (8.9)	73.1
3’’	3.95,dd, (2.1, 9.5)	72.2	4.05,d, (9.3)	70.7
4’’	3.65,m, (8.5)	77.5	3.64,d, (8.2)	76.2
5’’	3.54,m,(2.5,12.1)	78.3	3.48, m,(10.3)	75.5
6’’	3.72,3.41,m, (5.3,12.1)	62.3	3.72-3.35,m, (4.9, 11.7)	66.2
Ramnosio				
1’’’	5.28, br s, (1.2)	101.6	4.72,s, (1.6)	101.9
2’’’	3.91,br s, (1.8)	70.3	3.90,br s, (1.6)	70.4
3’’’	3.71, ovl(1.8)	71.3	3.65, br s, (1.6)	70.2
4’’’	3.64, m, (8.5)	74.3	3.35, m, (8.2)	73.1
5’’’	3.41, m, (8.5)	71.1	3.84,m, (8.2)	69.2
6’’’	1.33, d, (6.3)	17.9	1.19,d, (6.1)	17.6

ovl=segnale sovrapposto

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR dell' 8-acetl-Arpagide (7) e del Teucardoside (8), CD_3OD, 500 MHz

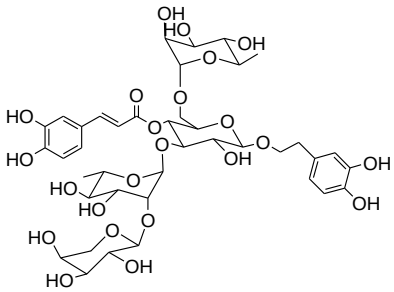
Posizione	δ_H/ppm, (7) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (7)	δ_H/ppm, (8) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (8)
1	6.08, s	93.4	5.84, d, (2.4)	92.9
2	-	-	-	-
3	6.39, d, (6.3)	142.8	6.45, d, (6.3)	144.3
4	4.93, dd (1.4, 6.3)	105.8	4.99, dd, (1.1, 6.4)	103.0
5	-	72.2	-	77.0
6	3.70, dd, (4.4, 4.6 Hz)	76.6	-	203.9
7	$H_{7\alpha}$, 1.95, dd, (4.4, 15.1) $H_{7\beta}$, 2.17, d, (15.1)	44.8	5.97, s	129.0
8	-	87.7	-	175.6
9	2.86, s	54.3	3.55, s	55.2
10	1.47,s	21.3	2.27, s	18.1
11	-	176.8		
12	2.03, s	24.3		
Glucosio				
1'	4.60, d (7.80)	99.0	4.60, d (7.8)	99.3
2'	3.20, t (8.5)	74.5	3.28, m (8.4)	74.7
3'	3.38, m (8.5)	77.6	3.37, m (8.4)	77.9
4'	3.29, m (10.1)	71.2	3.38,m (10.2)	71.6
5'	3.30, m (10.1)	78.1	3.31, m (10.2)	78.2
6'	3.89-3.69, dd (1.2, 11.9)	62.7	3.92-3.67, dd (1.2, 11.9)	62.7
Ramnosio				
1''			5.45, d (1.8)	97.5
2''			3.84, m (1.8)	72.6
3'			3.72, m (1.8)	71.9
4'			3.36, m (8.5)	73.6
5'			3.36, m (8.7)	70.2
6'			1.19, d (6.5)	17.9

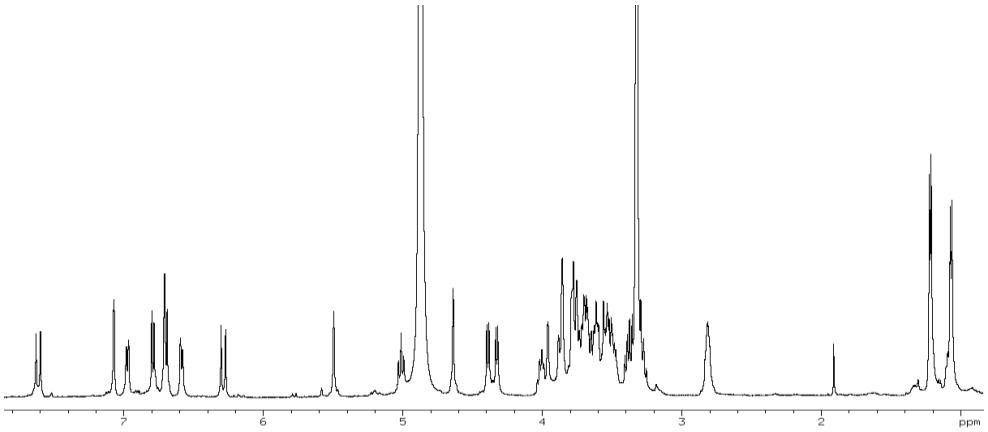
Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR della Teusalvina C (9), e della Teulamifina B, (10), CD_3OD, 500 MHz

Posizione	δ_H/ppm, (9) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (9)	δ_H/ppm (10) (*J* in Hz)	δ_c/ppm (10)
1	1.09,d (5.4)	19.7	1.38,m-2.39,ovl	21.2
2	1.67-2.22ovl	26.4	2.22,ovl	25.9
3	5.77,s	131.2	5.85,s	130.5
4	-	144.2	-	140.3
5	-	48.5	-	42.3
6	4.41,s	67.3	4.26,t, (1.5, 4.0)	70.1
7	1.63-1.98,ovl	35.2	1.60,t-1.85,d, (10.7)	37.8
8	2.33, ovl	35.8	2.49,ovl	51.2
9	-	53.9	-	50.9
10	2.08 ovl	43.9	2.74,d (11.7)	37.1
11	2.62-2.44,m (14.8,8.3)	45.9	2.15-2.43,ovl	37.0
12	5.50,t, (8.3)	72.9	4.84,t, (4.0,10.3)	62.9
13	-	126.8	-	131.8
14	6.38,s	140.8	6.49,s	109.4
15	7.58, s	145.1	7.45,s	144.3
16	7.54,s	140.8	7.48,s	139.6
17	1.11,d (6.7)	16.3	0.79,d, (6.5)	16.6
18	4.17, m	65.2	4.21,t-3.97,d, (11.5)	64.9
19	4.51, d-3.82,d (11.6)	66.7	4.36,d-4.46,d, (11.0)	50.9
20	-	179.7	-	175.4

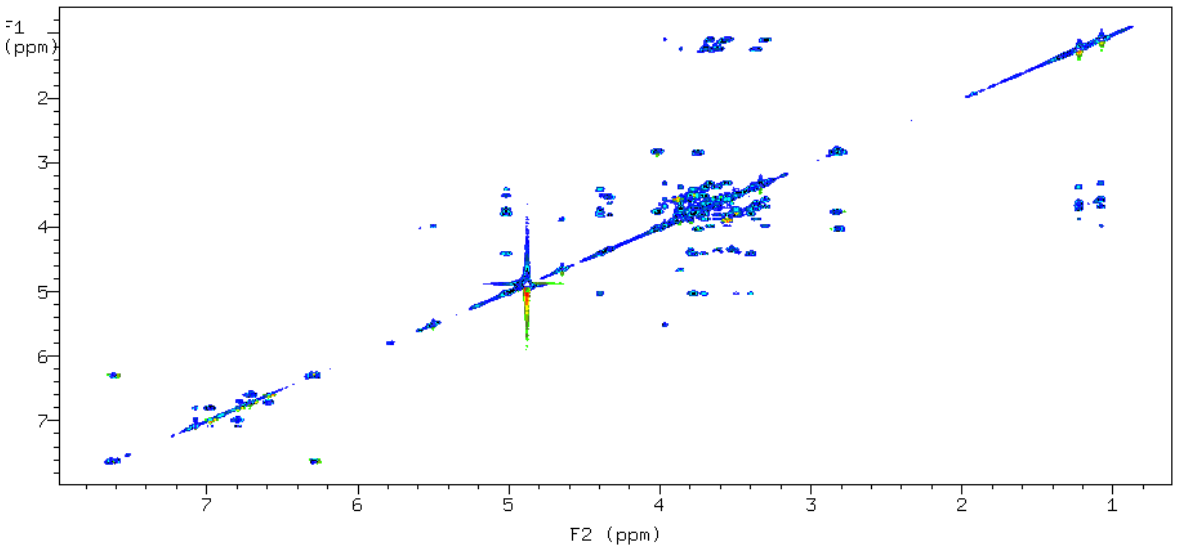
ovl=segnale sovrapposto

^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 1- Composto Nuovo

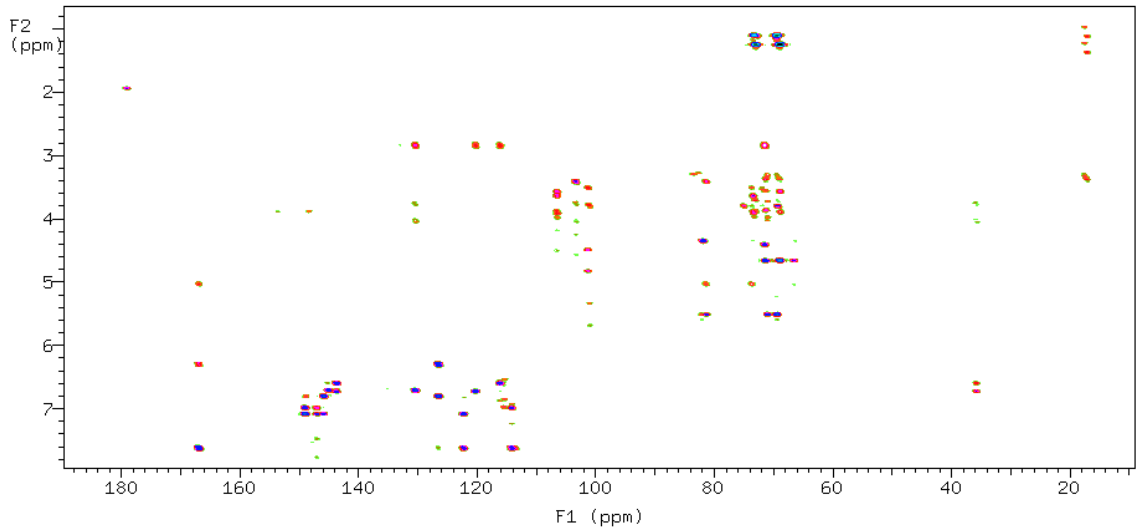




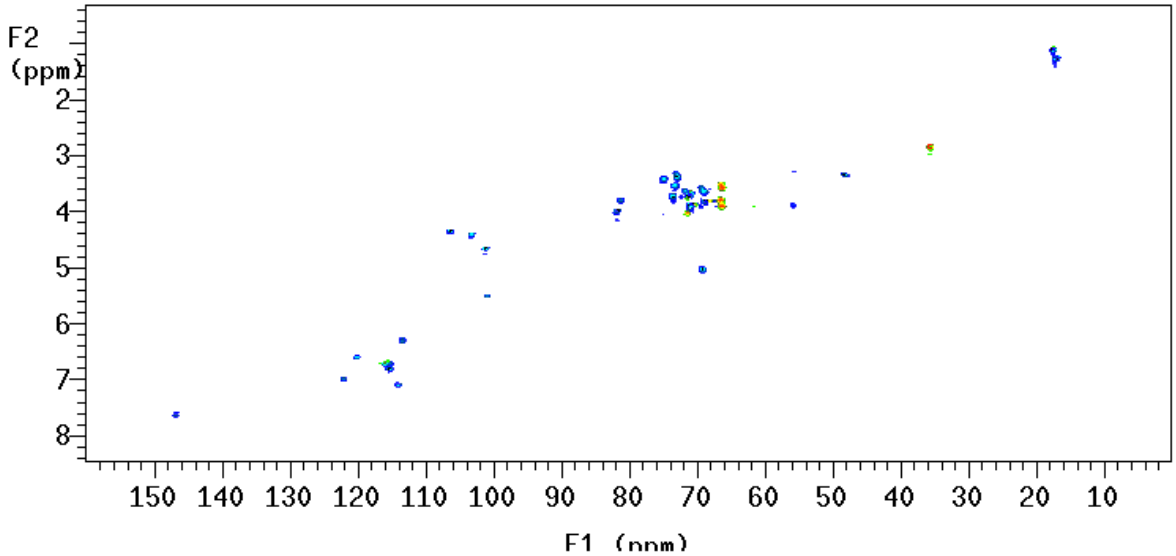
2D NMR TOCSY, CD_3OD, 500 MHz, 1- Composto Nuovo



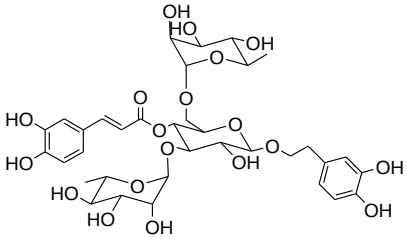
2D NMR HMBC, CD_3OD, 500 MHz, 1- Composto Nuovo

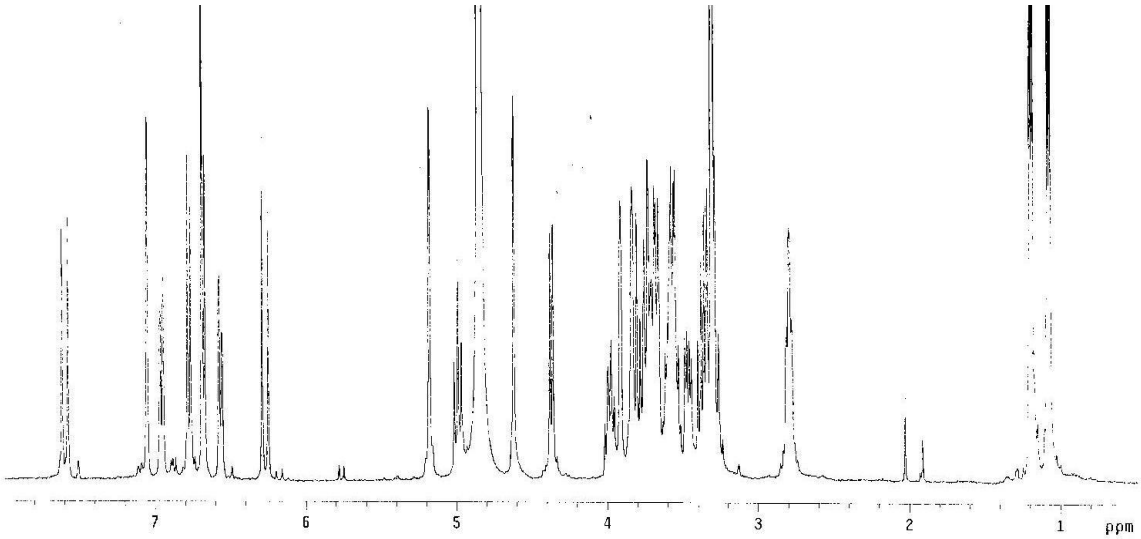


2D NMR HSQC, CD_3OD, 500 MHz, 1- Composto Nuovo

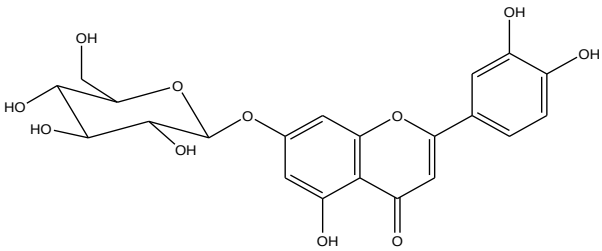


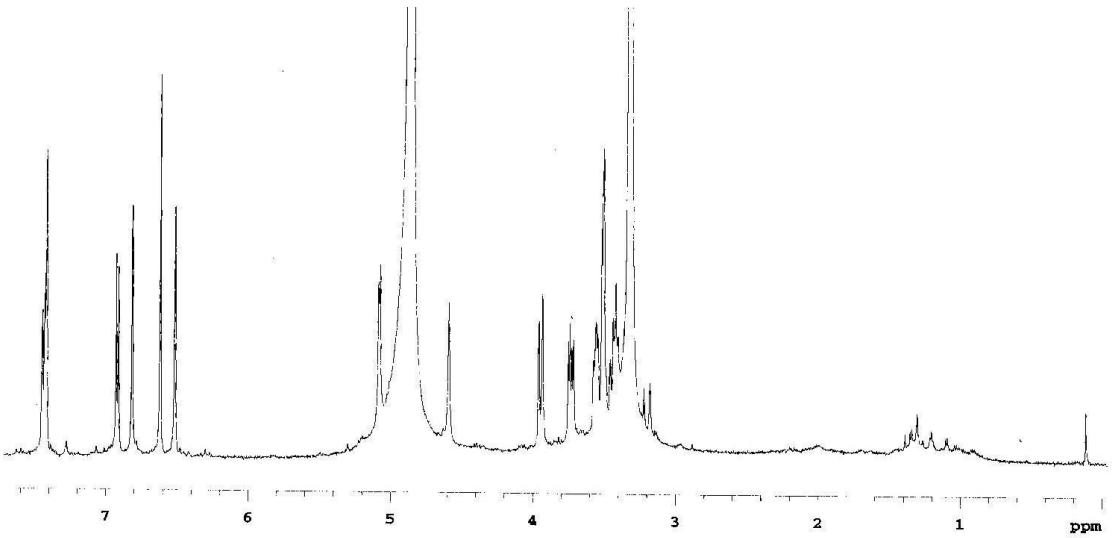
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 2- Poliumoside A



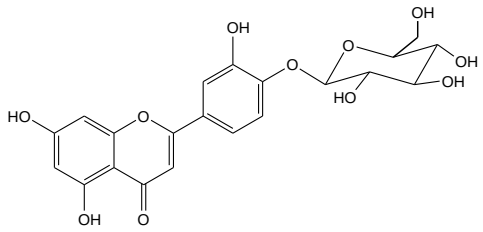


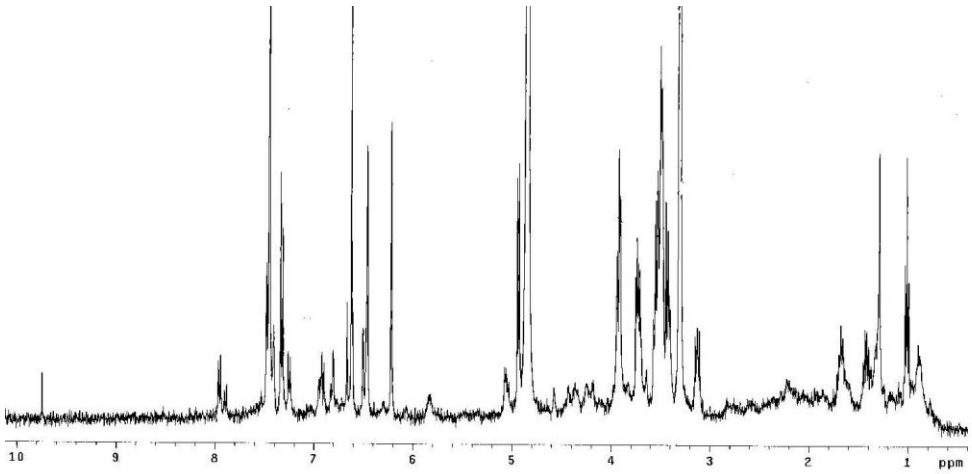
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 3-Luteolina-7-O-β-D-glucopiranoside



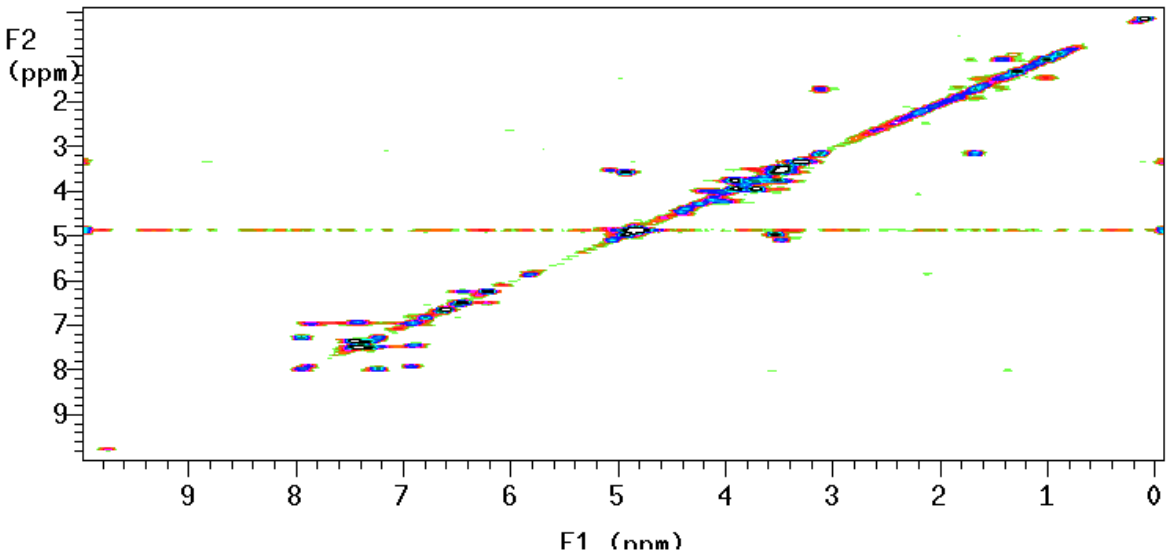


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 4- Luteolina 4'-O-β-D-glucopiranoside

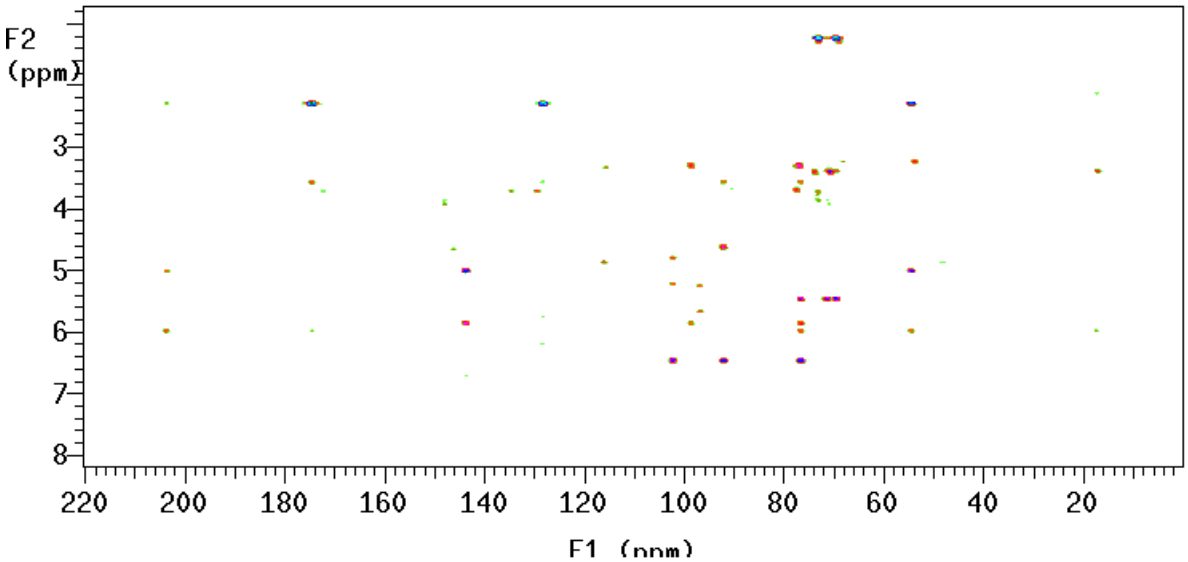




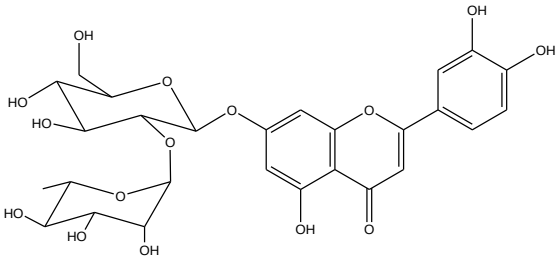
2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 4- Luteolina 4'-O-β-D-glucopiranoside

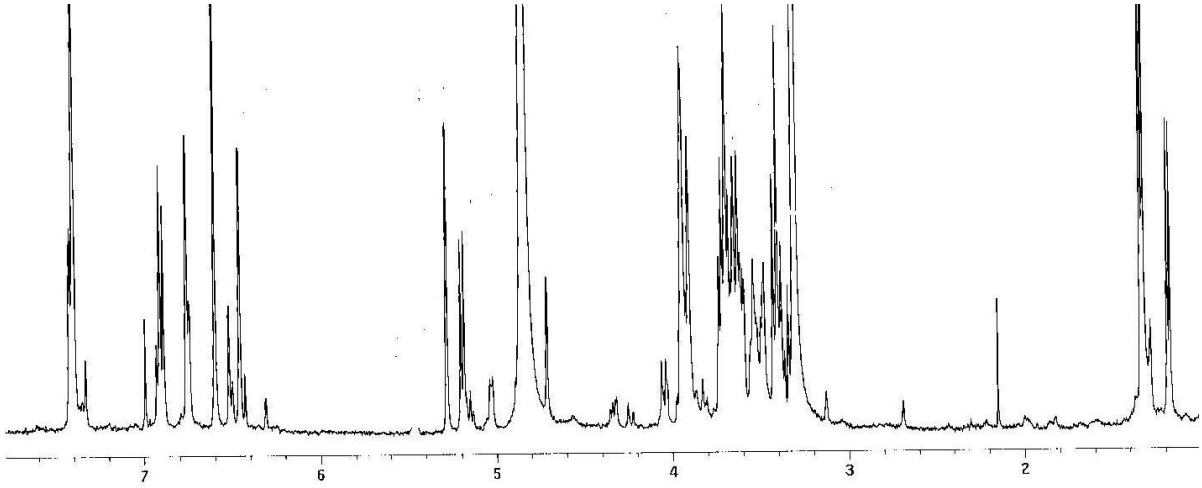


2D NMR HMBC, CD_3OD, 500 MHz, 4- Luteolina 4'-O-β-D-glucopiranoside

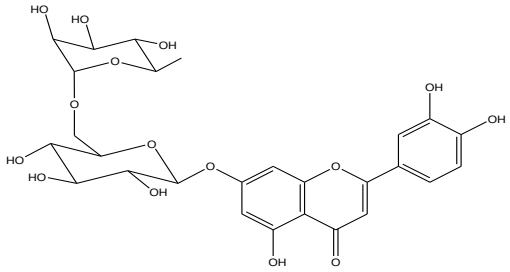


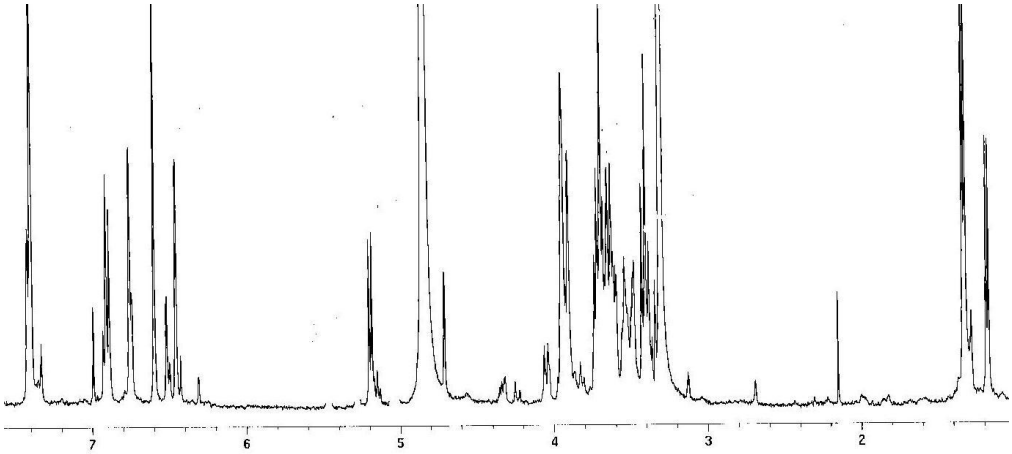
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 5- Luteolina 7-O-neoesperidoside



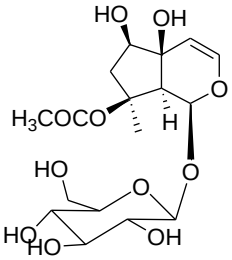


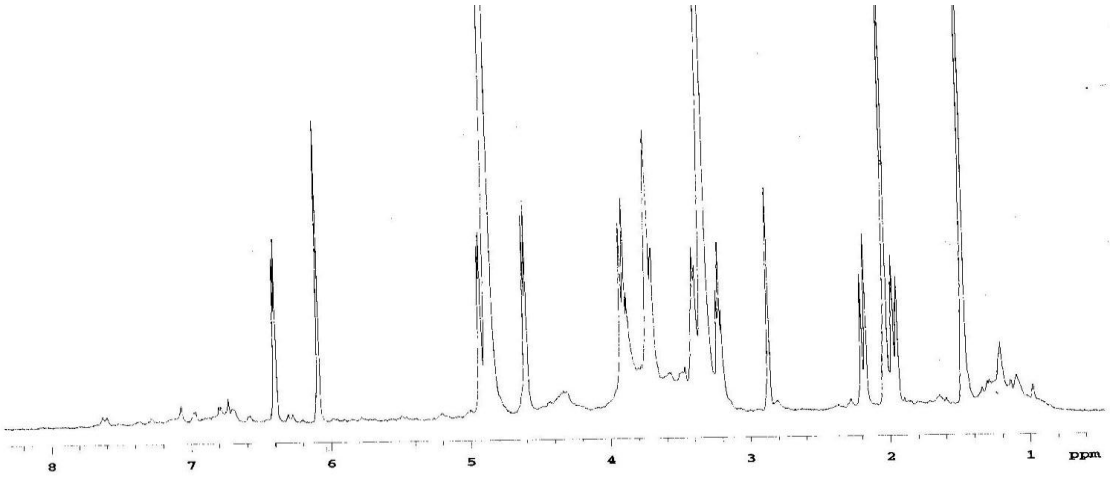
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 6- Luteolina-7-O-rutinoside



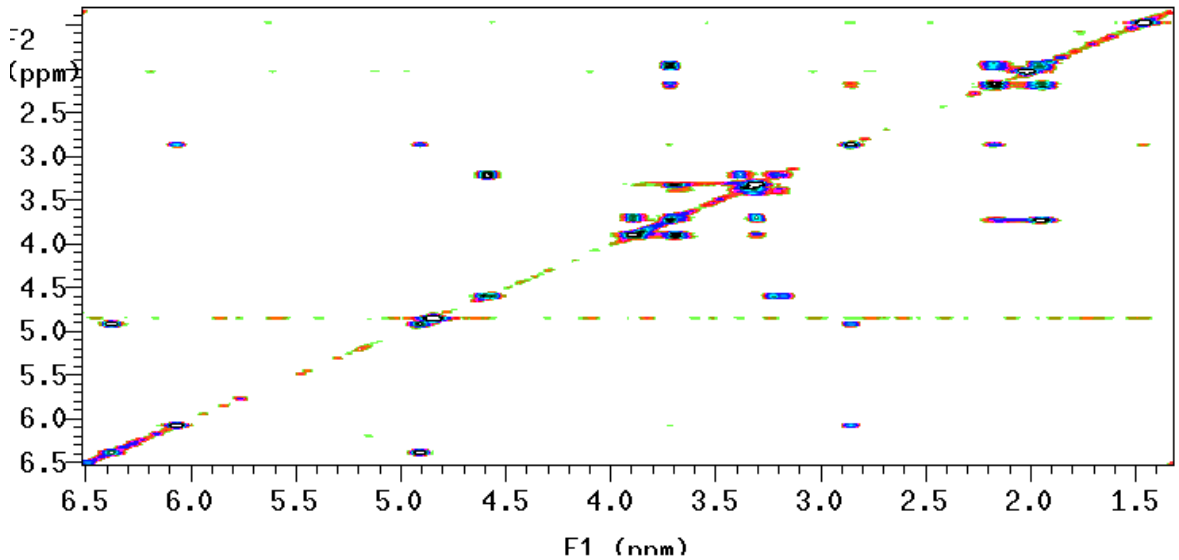


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 7- 8 acetil Arpagide

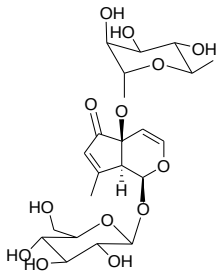


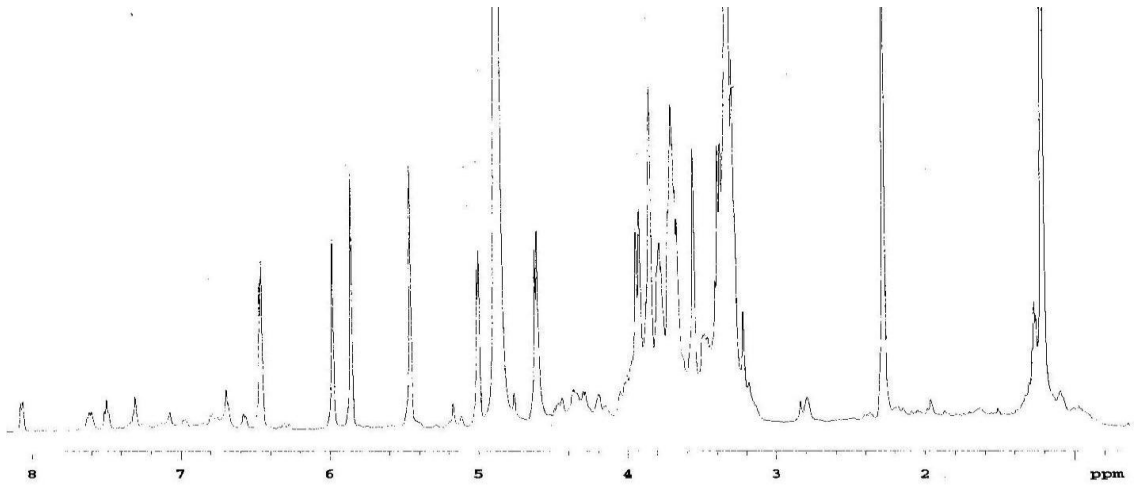


2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 7- 8 acetil Arpagide

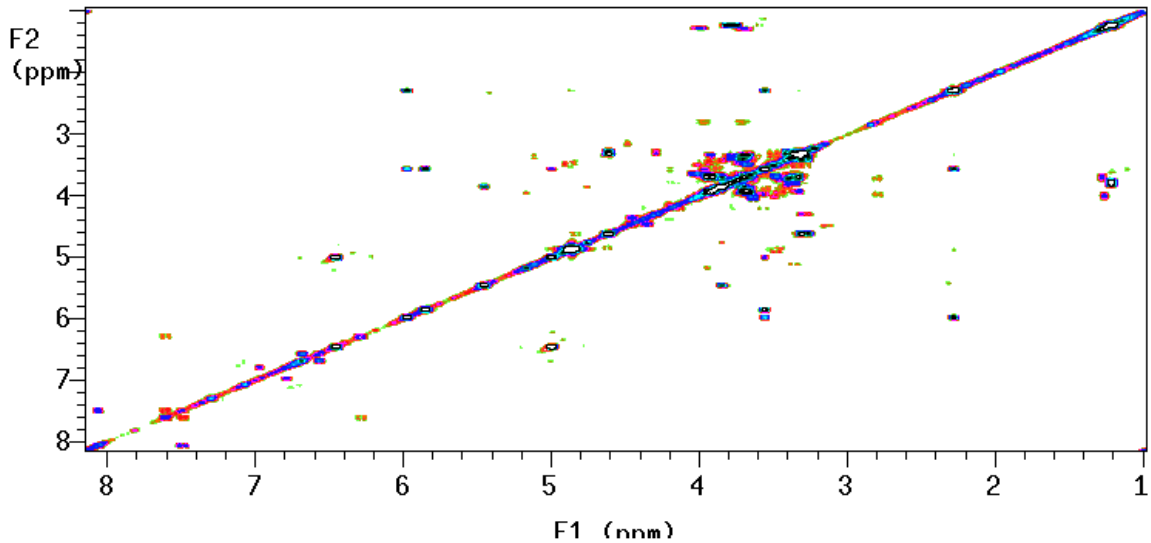


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 8- Teucardoside

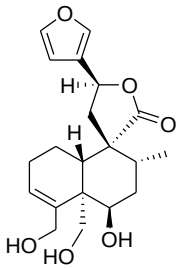


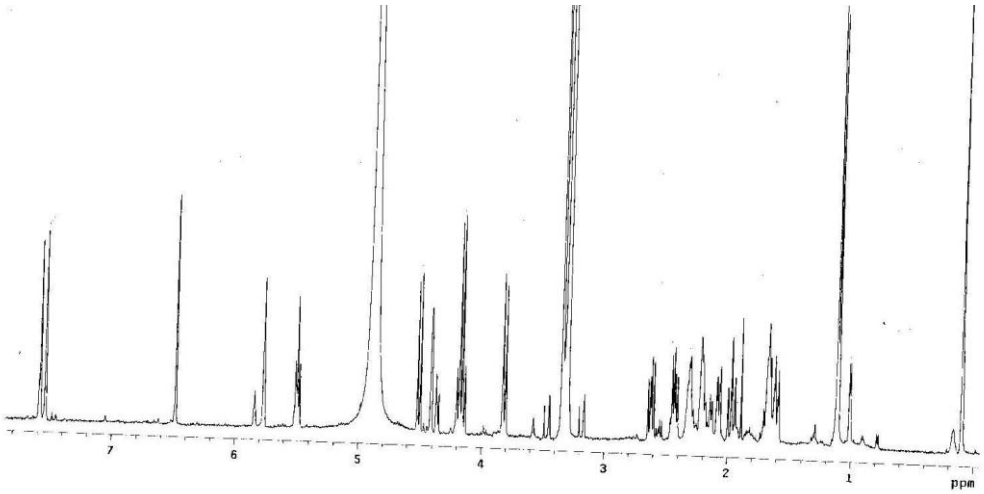


2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 8- Teucardoside

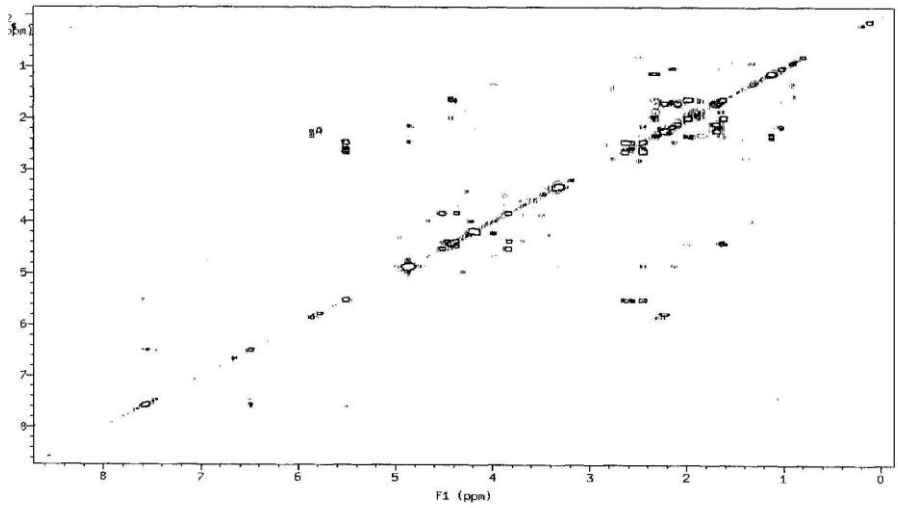


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 9- Teusalvina C

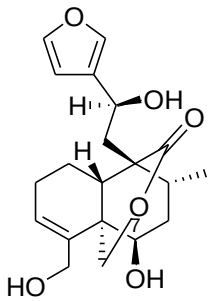


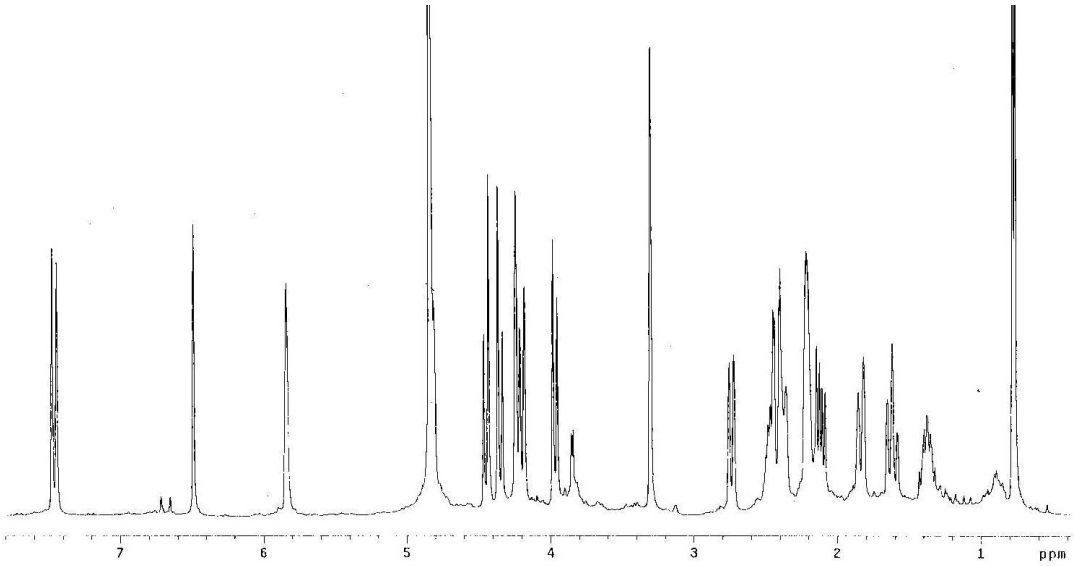


2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 9- Teusalvina C



^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 10- Teulamifina B





BIBLIOGRAFIA

[1] *F.U. Afifia, B. Al-Khalidi, E. Khalil,* Studies on the in vivo hypoglycemic activities of two medicinal plants used in the treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine following intranasal administration, *Journal of Ethnopharmacology 100 (2005) 314–318*

[2] *F. Sharififar, G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini,* Major flavonoids with antioxidant activity from Teucrium polium L. *Food Chemistry 112 (2009) 885–888*

[3] *Kovacevic, N.N., Lakusic, B.S., Ristic, M.S., 2001*, Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro, *Journal of Essential Oil Research 13, 163–165*.

[4] *G.N. Krishna Kumari, S. Aravind, J. Balachandran, M.R. Ganesh,S. Soundarya Devi, S.S. Rajan, R. Malathi, K. Ravikumar* Antifeedant neo-clerodanes from Teucrium tomentosum Heyne. (Labiatae), *Phytochemistry 64 (2003) 1119–1123*

[5] *S. Zhou, H. Koh, Y. Gao, Z. Gong, E. Lee,* Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly, *Life Sciences 74 (2004) 935–968*

[6] *Kouzi, S.A., McMurtry, R.J., Nelson, S.D.*, Hepatotoxicity of germander (*Teucrium chamaedrys* L.) and one of its constituent neoclerodane diterpenes teucrin A in the mouse. *Chemical Research and Toxicology* 1994.*7 (6), 850–856*.

[7] *Laliberte, L., Villeneuve, J.P., 199,*. Hepatitis after the use of germander, a herbal remedy. *Canadian Medical Association Journal* 154 (11), 1689–1692

[8] *Fau, D., Lekehal, M., Farrell, G., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Haouzi, D., Pessayre, D.*, 1997. Diterpenoids from germander, an herbal medicine, induce apoptosis in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology 113 (4), 1334–1346*.

[9] *Baytop, T*. (1984). Therapy with medicinal plants (past and present). Istanbul: Istanbul University Publications.

[10] *U.M. Pagnoni, A. Pinetti, R. Trave, L. Garanti. Australian* J. Chem., 29, 1375 (1976).

[11] *J. Ruhdorfer, H. Rimpler*. Tetrahedron Lett., 22, 839 (1981).

[12] *Ali-Shtayeh, M.S., Yaniv, Z., Mahajna, J.,*. Survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 221–232, *2000*.

[13] *Gharaibeh, M.N., Elayan, H.H., Salhab, A.S.,* Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 24, 93–99, *1984.*

[14] *Talpur, N., Echard, B., Ingram, C., Baghci, D., Preuss, H.,* Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. *Diabetes and Obesity Metabolism 7, 193–199, 2005.*

[15] *Kupchan SM, Britton RW, Ziegler MF, Sigel CW.* Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. J. Org. Chem. 1973; 38: 178-179.

[16] *Andary C., Wylde R., Heitz A., Rascol P., Laffite C.,* Poliumoside A, a caffeic glycoside ester from *Teucrium belium, Phytochemistry, 24,362-364,* 1985

[17] Tetrahedron, 34, 1389, (1978), *Markham R., Terai B., Geiger H. and Mabry*

[18] *Kellam S., Mitchell K., Murray H., Walker L,* Luteolin and 6-Hydroxyluteolin glicosides from *Hebe Stricta*, Phytochemistry, 1993, 33, 867-869

[19] *Djoukeng et al*., Flavonoids in *Citrus* leaves, *Journal of Agric. & Food Chemistry, 56, 11091-11094,* 2008

[20] *Kim M., Chung H., Choi s.,* Isolation of Luteoline 7-O- Tutinoside and Esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts ao Artemisia montan, *Medicinal chemistry & Natural Products, 23, 237-239, 2000*

[21] *Sebastien Hannedouche, Edouard Stanislas, Claude Moulis, Isabelle Fouraste*, Iridoids from *Caryopteris x clandonensis, Phytochemistry 54 (2000) 807-809*

[22] Iridois from *Teucrium Yemense*, Arch. Pharm.,21-785-786, 1998

[23] *Tetr.Letters 1981, 22, 839-842,* Teucardosid, a new iridoid from *Teucrium Arduini L*

[24] *Erdal Bedira, Deniz Tasdemira, Oliver Zerbeb, Otto Stich*erb, Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium*, Phytochemistry 51 (1999) 921-925

[25] *Bruno, M., Fazio, C., Piozzi, F., Rodriguez, B., & de la Torre, M.C.* (1995). Phytochemistry, 40, 1481.

[26] Malakov, *Boneva, Papanov,* Teulamifin B, a neoclerodane diterpenoid from *T. Lamifolium* and *T. polium*. Phyt. 27, 1141-1143, 1988

[27] *Karioti A., Skaltsa H., Heilmann J., Sticher O,* Acylated flavonoides and phenyl ethanoid, glycosides from *Marrubium velutinum*, Phytochemistry, 64, 665-660, 2003

[28] *Hara S, Okabe H, Mihashi K.* Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4-(R) carboxylates. Chem. Pharm. Bull. 1987; 35: 501-506.

[29] *M. Garcia, E. Borkowski, M. Sosa* , Iridoids as allelochemicals and DNA polymerase inhibitors, J. *Nat. Prod. 2004, 67, 357-361*.

[30] *Hannedouche, S., Jacquemond-Collet, I., Fabre, N., Stanislas, E., Moulis, C.*, 1999. Iridoid keto-glycosides from *Caryopteris x clan donensis, Phytochemistry 51 (6), 767-769*.

[31] *Lesser M.P*. (2006) "Oxidative stress in marine environments" . *Biochenistry and Phisiological Ecology, Annu. Rev. Physiol.* 68: 253-278

[32] *Gulcin I., Elmastas M., Aboul-Enein H.* (2007). "Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum Basilicum* L. Family Lamicaceae) assayed by different methodologies". *Phytotherapy Research*,21: 354-361

[33] *Hinnerburg I., Dorman H.J.D., Hiltunen R.* (2006)."Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices". *Food Chemistry*, 97: 122-129

[34] *Zarghami N. et Khosrowbeygi A.M.S.*(2004). "Evaluation of lipid peroxidation as an indirect measure of oxidative stress in seminal plasma". *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2: 34-39

[35] *DeGraft-Jhonson J., Koloddziejczyk K.,Krol M., Krol B., Nowak P., Nowak D.* (2007) "Ferric-Reducing ability power of selected plant poliphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption". *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100: 345-352

[36] *Chang Y.C., Lee F.W., Chen C.S., Huang S.T., Tsai S.H., Huang S.H., Lin C.M.* (2007) "Structure-activity relationship of C3-C6 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavengig activities". *Free Radical Biology & Medicine* 43: 1541-1551

[37] *Van Acker S.A.B.E., Van Der Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van Der Vugh W.J.F., Bast A.* (1996). "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids". *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 331-342

[38] *Pietta Pier-Giorgio* (1999) "Flavonoids as antioxidants". *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042, Plumb G.W., Price K.R., Williamson G. (1999) "Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea". *Redox Rep*. 4: 13-16

CAPITOLO IV

ANALISI DEGLI ESTRATTI DI *Satureja montana*

Descrizione *Satureja montana*

Satureja montana è una pianta arbustiva appartenente al genere *Satureja* e alla specie *montana.*

Fig. IV.1

Nome comune: Satureia, Santoreggia montana, Erba peverella

Famiglia: *Lamiaceae* (*Labiatae*)

La Santoreggia era conosciuta già dagli antichi romani col nome di *Satureia*, che significava "Erba dei satiri" per la sua pelosità che richiamava quella dei satiri, ma anche per le sue notevoli proprietà afrodisiache. E' un piccolo arbusto con rami alti fino ai 30 cm, con molte foglie di forma ovale e ricoperte di una leggera peluria bianchiccia.

Satureja montana L., è un erba nativa delle regioni Mediterranee, ma attualmente è diffusa in tutta Europa, Russia e Turchia; sin dall'antichità nelle regioni dell'area Mediterranea è stata utilizzata in cucina per le sue caratteristiche aromatiche.

La *Satureja montana* cresce spontanea nelle regioni dell'Italia centro-settentrionale fino a 1500 m di altitudine, presenta portamento cespuglioso ed è provvista di radice fittonante e fusto ascendente alto fino a 40 cm, poco ramificato. Le foglie sono opposte, lanceolate, strette, lucide e bordate da una leggera peluria. I fiori sono bianco-rosati, piccoli, raccolti in spighe al lato delle foglie; fiorisce da luglio a settembre, mentre il frutto è un tetrachenio di colore nero, formato da 4 acheni ovali punteggiati da piccoli granuli.

Tra le specie più diffuse di Santoreggia vi sono: la *Satureja montana* L. e la *Satureja hortensis* L., entrambe appartenenti alla famiglia delle *Labiatae*; la *Satureja hortensis* è essenzialmente erbacea, più piccola e di colore verde meno intenso rispetto alla *Satureja montana*; entrambe vengono molto utilizzate per le loro proprietà terapeutiche e aromatiche.

Le foglie, fortemente aromatiche, vengono usate per dare sapore a piatti di carne, pesce e legumi, in particolare fave, fagioli, ceci e lenticchie. Le foglie, i fiori e gli stemi inoltre vengono usati anche per preparare tea e nella medicina omeopatica per le sue attività carminative, espettoranti, fungicide, digestive, e carminative [1].

In cucina per il suo sapore quasi piccante che ricorda il timo, viene utilizzata per aromatizzare varie pietanze che tra l'altro rende più digeribili; conservano meglio le loro proprietà curative se conservata in mazzetti e sminuzzata al momento dell'uso. La santoreggia si utilizza inoltre cruda o come infuso: per la stanchezza, i problemi digestivi, le infiammazioni dell'apparato intestinale e per le bronchiti. Le compresse dell'infuso sono ottime per le rughe in particolare se fatte insieme alla salvia. Il decotto di santoreggia aggiunto all'acqua del bagno è ottimo per tonificare e purificare la pelle.
I principi attivi in essa maggiormente presenti sono: tannini, vitamina A, calcio, potassio; invece l'olio essenziale contiene: borneolo, canfora, carvacrolo, cimene, e terpinene.

In erboristeria la Santoreggia viene usata per la preparazione di infusi per combattere diarrea, digestioni difficili, disturbi gastrointestinali, per fluidificare il catarro, per lavare ferite e piaghe, e come collutorio per la gola e la cavità orale infiammata. Le foglie fresche sminuzzate e applicate sulle punture di insetti calmano il dolore. La Santoreggia per il suo piacevole aroma, viene usata anche in liquoreria e profumeria; l'olio essenziale è molto utilizzato in profumeria.

Della Santoreggia si utilizzano le foglie raccolte prima della fioritura e le infiorescenze raccolte in piena fioritura; sia le foglie che i fiori possono essere essiccati in luoghi asciutti, ben ventilati e bui.

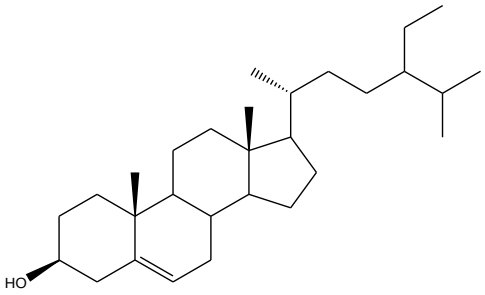
Il suo infuso frizionato sui capelli, fortifica il bulbo pilifero e tiene lontano i pidocchi. Un infuso delle cime fiorite di santoreggia favorisce la digestione, attenua i dolori allo stomaco, riduce la flatulenza e agisce contro la diarrea. In cosmetica si può impiegare la Santoreggia per preparare un impacco di foglie sminuzzate che esercita un'azione astringente e antisettica utile per le pelli impure, oppure in aggiunta nell'acqua del bagno, toglie la stanchezza, tonifica, purifica e deodora il corpo e usata nel pediluvio fa diminuire il gonfiore delle caviglie.

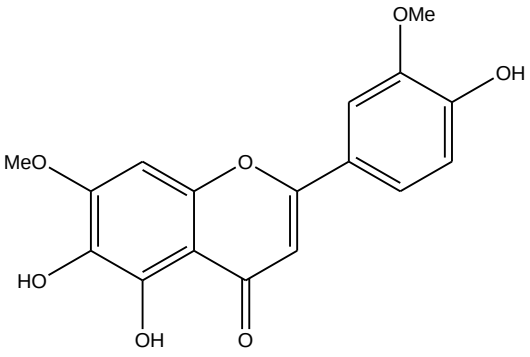
Il genere *Satureja* è molto diffuso anche nelle nazioni dell'Iran; infatti è molto utilizzata anche dagli abitanti delle regioni del sud dell'Iran [2] per le sue proprietà analgesiche e antisettiche, invece nella medicina popolare l'infuso delle sue parti aeree è utilizzato per la cura del mal di denti; possiede inoltre proprietà antiinfiammatorie, antimicrobiche, antiossidanti e anti ipoglicemiche. L'attività antimicrobica dell'estratto etanolico della *Satureja montana* è stata dimostrata attraverso test su molte specie di batteri e alcune specie di funghi; in particolare l'attività maggiore è esercitata nei confronti di batteri quali: *Bacillus subtilis, Sarcina flava, Candida tropicalis e Candida krusei* [3]. E' stato inoltre studiata la composizione fenolica degli estratti di *Satureja* utilizzando HPLC a fase inversa con rivelatore a diodo, su colonna C-8, con miscela di acetonitrile- acido acetico- acqua; sono stati determinati il contenuto totale di acidi fenolici negli estratti di etil acetato e di butanolo: 47.59 e 96.70 µg/g, rispettivamente. Flavanoli, catechine e epicatechine erano presenti nell'estratto di etil acetato in quantità di 622.47 e 16.29 µg/g, rispettivamente; mentre l'estratto butanolico conteneva questi flavanoli in quantità del 239.08 e 199.82 µg/g [4].

Alcuni studi relativi alla composizione chimica del genere *Satureja* rivelano la presenza di flavonoidi in *Satureja thymbra* e *Satureja spinosa* [5]; invece dal genere *Satureja vulgaris* [6] sono stati isolati iridoidi glucosidici.

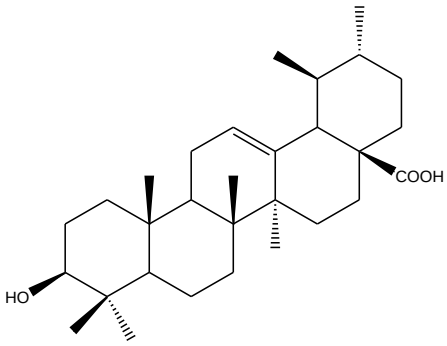
Mono-sesquiterpenoidi e diterpenoidi con lo scheletro labdanico, e derivati dell' isopimarano sono stati isolati nella *Satureja gilliesii* [7, 8]. L'acido oleanolico, l'acido ursolico, e glicosidi flavanolici sono stati isolati da *Satureja acinos, Satureja montana* e *Satureja obovata* [9].

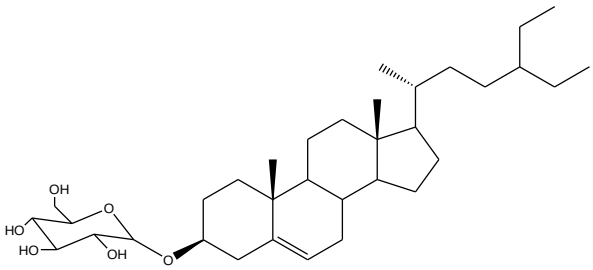
Sono stati caratterizzati dall'estratto diclorometanico delle parti aeree di *S. khuzistanica* [2] composti quail: β-sitosterolo, acido ursolico e 4',5,6-triidrossi-3', 7-dimetossiflavone, Daucosterina.





β-Sitosterolo **4', 5, 6-Triidrossi-3', 7-dimetossiflavone**



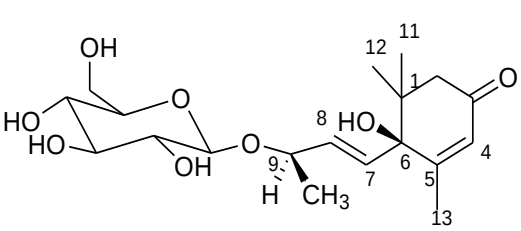


Acido Ursolico **Daucosterina**

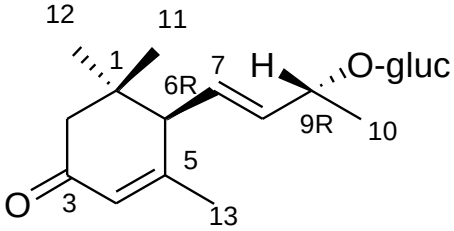
Il composto acido ursolico ha attività anti-inflammatoria su animali di laboratorio; mentre di recente è stata osservata anche attività antitumorale [10]. E' stata studiata inoltre l'attività antimicrobica degli estratti di *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii*. Gli estratti di etere di petrolio, cloroformio e etil acetato presentano attività inibitoria sia verso batteri grampositivi che gram-negativi. In letteratura si riportano studi relativi all'attività antiossidante scavenger e antilipoperossidasica degli estratti di *Satureja* [11] utilizzando tecniche di risonanza spettroscopica elettrica di spin (ESR); l'estratto con la migliore attività è quello butanolico.

CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DEI METABOLITI ISOLATI DA *Satureja montana*

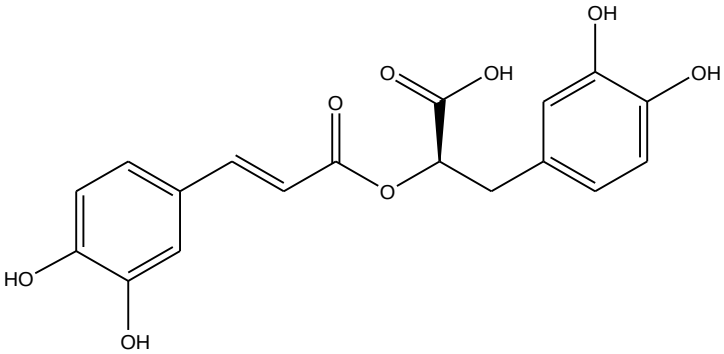
Dall'estratto metanolico delle foglie di *Satureja montana* sono stati isolati 3 composti. Le foglie di *Satureja montana* sono state estratte con metanolo e l'estratto ottenuto è stato sottoposto a metodica di Kupchan [12] ottenendo quattro estratti: n-esano, $CHCl_3$, n-BuOH e un residuo acquoso. Dall' estratto *n*-BuOH, in seguito a purificazione attraverso DCCC (cromatografia liquida in controcorrente a gocce) e HPLC sono stati isolati e identificati il composto noto 6S, 9S, Roseoside (1) [13], 6R, 7E, 9R, 9 β-D-glucopiranosil, 4,7 megastigmadien-3 one (2) [14], e l'acido rosmarinico (3) [15]. In figura IV.2 vengono riportati i composti isolati (1–3):



6S-9S-Roseoside; 1



Composto 2;



Acido Rosmarinico; 3

Fig. IV.2

Nello spettro di massa ESI^+ del composto **1** si osserva uno ione a *m/z*=387 u.m.a. e unitamente allo spettro ^{13}C-NMR si determina che la formula molecolare del composto è $C_{19}H_{30}O_8$.

Nello spettro IR si osservano bande a 1720 cm^{-1}, relative alla presenza di una funzione carbonilica e a 1660 cm^{-1} relative alla presenza di doppi legami olefinici.

Nello spettro protonico si osserva il segnale singoletto relativo al protone olefinico H-4 (δ_H 5.84 ppm), i doppietti a δ_H 2.16 e 2.47 ppm relativi ai protoni alchilici H_2-2, il segnale doppietto del protone olefinico H-7 (δ_H 5.98 ppm, *J*=15.6 Hz) e il segnale doppio doppietto del protone del doppio legame H-8 (δ_H 5.73 ppm, *J*=15.6 Hz); sulla base dei valori delle costanti di accoppiamento si stabilisce che il legame $\Delta^{7,8}$ è di tipo trans; sono inoltre presenti due segnali singoletto relativi ai metili CH_3 nelle posizioni 11 e 12 (δ_H 1.02 e 1.04 ppm rispettivamente); e due doppietti a δ_H 1.29 e 1.94 ppm relativi ai metili in 10 e in 13. E' inoltre presente il segnale a δ_H 4.27 ppm relativo al protone anomerico di un glucosio legato con un legame di tipo β (7.2 Hz), presente in forma piranosidica (sulla base dei valori delle costanti di accoppiamento). Si è stabilito che il glucosio appartiene alla serie sterica D in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto 1 [15] e dalla successiva analisi gas-gramatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard. Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza e le risonanze dei protoni e dei rispettivi atomi di carboni del glucosio. Nello spettro COSY si osserva che il protone H-7 (δ_H 5.98 ppm) è correlato con il protone H-8 (δ_H 5.73 ppm) e che gli H_3-13 (δ_H 1.94 ppm) erano accoppiati con il protone olefinico H-4 (δ_H 5.84 ppm) e che il protone H-9 (δ_H 4.54 ppm) era correlato con gli H_3-10 (δ_H 1.29 ppm). Nello spettro HMBC invece si osserva che gli H_2-2 (δ_H 2.16 e 2.47 ppm) erano correlati con i carboni C-1 (δ 42.4 ppm), C-3 (δ 201.1 ppm), C-4 (δ127.1ppm), C-11 (δ 23.4 ppm), C-12 (δ 24.6 ppm).

Attraverso lo spettro HMBC è stato inoltre possibile stabilire la posizione del legame del glucosio: il protone anomerico (δ 4.27 ppm) è infatti correlato con il carbonio C-9, (δ 74.6 ppm), del megastigmano. Infine un'esperimento HSQC ha consentito di correlare ciascun atomo di protone con il rispettivo atomo di carbonio e di stabilire, insieme al confronto di dati di letteratura [13] che la struttura del composto 1 è quella del Roseoside. (Tab. ^1H-NMR e ^{13}C-NMR composto 1, pag. 173).

DETERMINAZIONE STEREOCHIMICA ROSEOSIDE

Per determinare la sterochimica del roseoside isolato si è proceduto al confronto dei dati ^{13}C-NMR del composto isolato con quello dei suoi quattro stereoisomeri sintetizzati in un lavoro di letteratura [13].

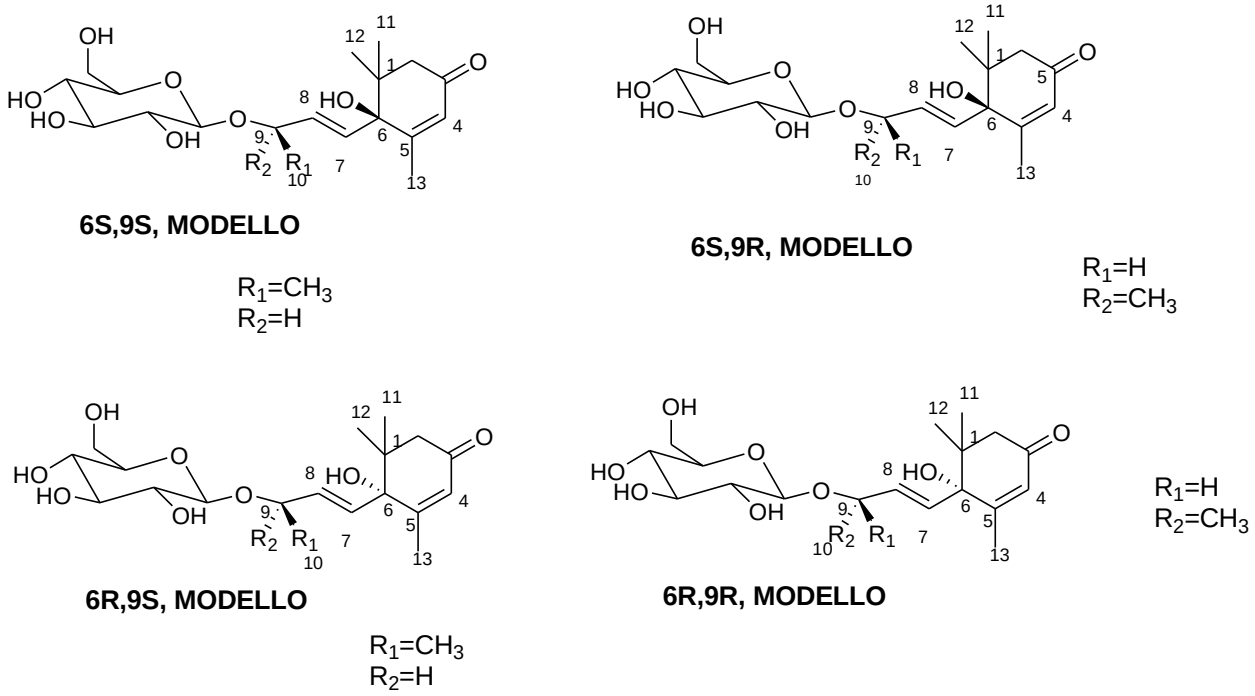


Fig. IV.3: Modelli di sintesi (in letteratura) [13].

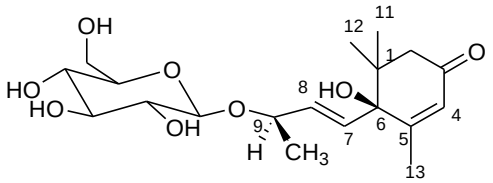
posizione	δ_C (Composto 1)
7	**133.7**
8	**133.7**
9	**74.6**
10	**22.2**
11	**23.4**
12	**24.6**
13	**19.5**

Tab. IV.1 Dati ^{13}C-NMR composto **1**

Pos.	δ_C/ppm **6S,9S, ROSEOSIDE**	δ_C/**ppm** **6S,9R, Modello**	δ_C/**ppm** **6R,9S, Modello**	δ_C/ppm **6R,9R Modello**
7	**133.8**	131.5	134.1	131.6
8	**133.7**	135.2	133.8	135.0
9	**74.6**	77.3	74.7	76.9
10	**22.2**	21.2	22.2	21.2
11	**23.5**	23.4	23.4	23.4
12	**24.7**	24.7	24.8	24.6
13	**19.6**	19.5	19.4	19.7

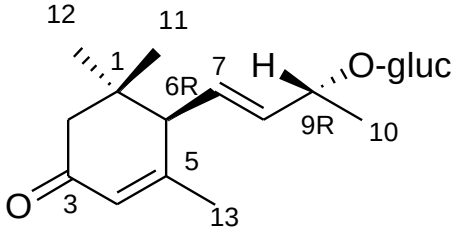
Tab. IV.2 Confronto dati ^{13}C-NMR

Dal confronto si osserva che i dati ^{13}C-NMR del composto 1 sono più simili a quelli del 6S, 9S, Roseoside; la struttura del composto 1 è quindi:



1- 6S,9S- Roseoside

I dati spettroscopici del composto **2** erano molto simili a quelli del composto 1; ancora una volta era presente lo scheletro del megastigmano, l'unica differenza rispetto al composto 1 è dovuta all'assenza dell'OH in posizione 6. Anche in questo caso nello spettro protonico si osserva il segnale del protone olefinico H-7 (δ_H 5.75 ppm, *J*=15.6 Hz) e il segnale doppio doppietto del protone H-8 (δ_H 5.89 ppm, *J*=15.6 Hz); anche in questo caso il legame $\Delta^{7,8}$ è di tipo trans (E).



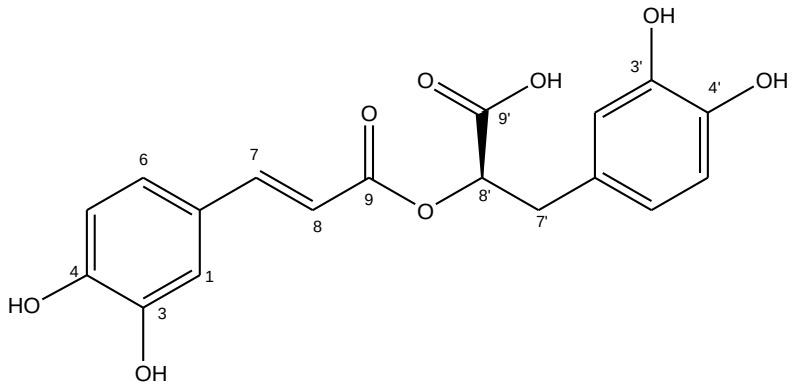
2- 6R, 7E, 9R, 9 β-D-glucopiranosil, 4,7 megastigmadien-3 one

Nello spettro COSY si osserva che il protone H-7 (δ_H 5.75 ppm) è correlato con il protone H-8 (δ_H 5.89 ppm) e con il protone H-6 (δ_H 2.70 ppm), e nell'esperimento HMBC si osserva che quest'ultimo è correlato con i carboni C-5 (δ 161.7), C-7 (δ 126.6 ppmn) e C-8 (δ 138.5 ppm). La presenza di un protone anomerico a δ_H 4.2 ppm rivela anche in questo caso la presenza di un glucosio legato con un legame di tipo β (7.0 Hz), presente in forma piranosidica (sulla base dei valori delle costanti di accoppiamento). Si è stabilito che il glucosio appartiene alla serie sterica D in seguito a una reazione di idrolisi acida del composto 1 [16] e dalla successiva analisi gas-cromatografica, confrontando i tempi di ritenzione dei derivati tiazolidinici formati con quelli dei rispettivi standard. Dallo spettro COSY e TOCSY è stato possibile determinare la sequenza e le risonanze dei protoni e dei rispettivi atomi di carboni del glucosio. In base allo spettro HMBC si è potuto stabilire che anche in tal caso il monosaccaride era legato al carbonio 9 del megastigmano. Lo spettro di massa ESI^+ rivela la presenza di uno ione pseudo molecolare a *m/z*= 381 u.m.a. che conferma il peso molecolare del composto.

I dati NMR coincidono con quelli riportati in letteratura [14]; inoltre in letteratura si riporta che la configurazione assoluta del carbonio 9 è stata determinata attraverso il Metodo di Mosher, (Dale and Mosher, 1973), convertendo il composto nei corrispondenti diesteri diastereoisomerici dell'MTPA [14] e dal confronto dei chemical shifts dei protoni H-8 e H-10 sia negli esteri R ed S e dal calcolo dei corrispondenti $\Delta\delta_{S-R}$ si stabilisce che la configurazione del carbonio 9 è di tipo R .

La configurazione R al carbonio 6 viene determinata in letteratura attraverso uno spettro di Dicroismo circolare, che mostra un effetto Cotton positivo, indicando una configurazione di tipo R in C-6 [14]. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 2, pag. 174).

Acido rosmarinico (3):



3- Acido Rosmarinico

Lo spettro di massa ESI^+ del composto **3** mostra uno ione pseudo molecolare a *m/z*= 361 u.m.a. e insieme allo spettro ^{13}C-NMR si è stabilito che la formula molecolare del composto è $C_{18}H_{16}O_8$. Nello spettro IR si osservano bande di assorbimento tipiche di gruppi ossidrilici (3380 cm^{-1}), di esteri α-β insaturi (1680, 1620 cm^{-1}) e di sistemi aromatici (1640, 1620, 1530 cm^{-1}). Lo spettro protonico evidenzia i segnali caratteristici di una unità di acido caffeico con geometria E del doppio legame. Sono presenti 3 protoni aromatici che risuonano a δ_H 7.04, 6.75 e 6.96 ppm, di un sistema ABX e due protoni di un doppio legame olefinico con geometria trans di un sistema AB (δ_H 7.58 e d 6.24 ppm, *J*= 15.6 Hz) e una unità 3',4', diidrossi-fenil-etanoica (con tre protoni aromatici a δ_H 6.71, 6.55, 6.65 ppm, di un sistema ABX).

Si osservano inoltre i segnali multipletto a δ_H 3.05-3.10 ppm relativi ai protoni H_2-7'e il segnale tripletto a δ_H 5.20 ppm relativo al protone H-8'. Nello spettro COSY si osserva che il protone H-2 (δ_H 7.04 ppm), del primo sistema aromatico, è accoppiato con i protoni H-5 (δ_H 6.75) e H-6 (δ_H 6.96). Il protone H-7 (δ_H 7.58) è accoppiato con il protone H-8 (δ_H 6.24 ppm), i protoni H_2-7' (3.09-3.10 ppm) sono accoppiati con il protone H-8' (δ_H 5.20 ppm), e H-6' (δ_H 6.55) è accopppiato con H-2' (δ_H 6.71) e H-5' (δ_H 6.65). Nello spettro HMBC si osserva che il protone H-2 (δ_H 7.04 ppm) correla con i carboni C-3 (δ 147.4 ppm), C-4 (δ 150.4 ppm), C-6 (δ 122.7 ppm), C-7 (δ 147.3 ppm), e che il protone H-5 (δ 6.77 ppm) correla con C-1 (δ 127.8 ppm), C-3 (δ 147.4 ppm), C-4 (δ 150.4 ppm); H-6 (δ_H 6.96 ppm) correla con i carboni: C-2 (δ 114.7 ppm), C-4 (δ 150.4 ppm), C-7 (δ 147.3 ppm), mentre H-7 (δ_H 7.58 ppm) correla con i carboni C-1 (δ 127.8 ppm), C-2 (δ 114.7 ppm), C-6 (δ 122.7 ppm), C-8 (δ 114.2), C-9 (δ 168.3); H-8 (δ 6.24 ppm) correla con C-1 (δ 127.8 ppm).

Inoltre dallo spettro HMBC si è stabilito la posizione del gruppo COOH, poiché era presente un picco di correlazione tra il carbonio del gruppo carbossilico C-9' (173.2 ppm) e il carbonio C-8' (76.2 ppm). La configurazione del carbonio C-8' è stata stabilita essere R confrontando il potere ottico rotatorio del composto 3 (di valore negativo) con i dati riportati in letteratura [15].

Infine un esperimento HSQC ha consentito di stabilire le correlazioni tra ciascun protone con il rispettivo atomo di carbonio, e insieme ai dati di letteratura [15] si è stabilito che la struttura del composto 3 è quella dell'acido Rosmarinico. (Tab. ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR composto 3, pag. 175).

VALUTAZIONE DELLE ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTI DEGLI ESTRATTI DI *Satureja motana* L.

Valutazione dell'attività scavenger:

Dall'analisi del potere *scavenger* dei quattro estratti di *Satureja montana* è emerso che l'estratto che presenta la maggiore attività è l'estratto butanolico; un analogo risultato era stato ottenuto anche dall'analisi degli estratti di *Teucrium polium*.

Estratti	**IC_{50} (µg/mL)**
Esano	106.5
$CHCl_3$	449.5
BuOH	**20.3**
H_2O	118.8

Tab.IV.3 - Attività scavenger degli estratti di *Satureja montana*

Valutazione del potere riducente:

Dall'analisi del potere riducente è emerso che l'estratto dotato della maggiore attività antiossidante è quello butanolico. Il risultato ottenuto è concorde con quello osservato per *Teucrium polium* L., la cui attività riducente era, di fatto, concentrata principalmente nell'analogo estratto butanolico.

Estratti	**Eq. Ac. Asc.**
Esano	0.06
$CHCl_3$	0.16
BuOH	**0.35**
H_2O	0.06

Tab. IV.4 - Attività riducente degli estratti di *Satureja montana*

Attività di inibizione della XO:

Dall'analisi del potere inibitorio degli estratti nei confronti dell'attività dell'enzima XO è emerso che l'estratto in grado di determinare il maggiore grado di inibizione sull'enzima è quello butanolico; questo dato rappresenta una ulteriore conferma della maggiore attività antiossidante dell'estratto butanolico, come già osservato dall'analisi degli estratti di *Teucrium polium*. Per l'estratto cloroformico e l'estratto acquoso non è stata riscontrata alcuna significativa attività di inibizione nei confronti dell'enzima XO. Anche inquesto caso è stato presupposto che l'inibizione fosse di tipo competitivo, così come riportato per studi analoghi presenti in letteratura.

Estratti	**IC_{50} (µg/mL)**
Esano	579.7
$CHCl_3$	n.a.
BuOH	**331.9**
H_2O	n.a.

Tab. IV.5 - Valori IC_{50} degli estratti di *Satureja montana*, n.a.: campione non attivo

Attività antilipoperossidasica

La valutazione dell'attività antilipoperossidasica degli estratti ha evidenziato che in questo caso, la maggiore attività è posseduta dall'estratto cloroformico; tale risultato è significativamente diverso da quanto osservato nell'analisi degli estratti di *T. polium*, in cui l'estratto maggiormente attivo era quello butanolico (LPO_{50} 65,7µg/mL);

Estratti	**IC_{50} (µg/mL)**
Esano	333.7
$CHCl_3$	**16.1**
BuOH	38.0
H_2O	n.a.

Tab. IV.6 - Valori LPO_{50} degli estratti di *S. montana*

In conclusione, dall'analisi comparativa delle diverse attività antiossidanti analizzate, cioè il potere scavenger (DPPH), il potere riducente (RP), l'attività di inibizione della XO (XOI) e l'attività antilipoperossidasica (ALP), è emerso che tra i quattro estratti di *S. montana* L., la maggiore attività antiossidante è posseduta dall'estratto butanolico. Per tal motivo si è deciso di concentrare l'attenzione limitatamente alla valutazione delle proprietà antiossidanti dell'estratto butanolico.

VALUTAZIONE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DELLE FRAZIONI DELLA DCCC

L'estratto butanolico è stato ulteriormente purificato attraverso cromatografia DCCC e dall'eluizione della DCCC sono state ottenute 37 frazioni, in seguito riunite in 7 *pool* sulla base dell'analisi in TLC, come riportato in tabella.

RIUNIONE	FRAZIONE
A	1-6
B	7-10
C	11-16
D	17-21
E	22-28
F	29-33
G	34-37

Tab. IV.7 - Riunioni frazioni DCCC dell'estratto BuOH di *S. montana*

Dall'analisi del potere *scavenger*, è emerso che le frazioni possiedono in generale un'attività specifica significativamente inferiore rispetto a quella rilevata per le analoghe frazioni ottenute dall'estratto butanolico di *Teucrium polium*.

Riunioni	IC_{50} (µg/mL)
A	>5000
B	1434.0
C	**288.9**
D	**168.2**
E	**235.2**
F	327.9
G	446.4

Tab. IV.8 - Valori IC_{50} frazioni DCCC dell'estratto BuOH di *S. montana*

Dai dati ottenuti emerge che la maggiore attività di tipo *scavenger* è concentrata nelle frazioni *C*, *D* ed *E*; il potere riducente è concentrato principalmente nella frazione *F*, mentre le frazioni *A* e *B* risultano assolutamente prive di potere riducente; invece le frazioni maggiormente attive nel contrastare l'attività dell'enzima XO sono *F* (IC_{50} 32,9 µg/mL) e *G* (IC_{50} 1,8 µg/mL)..

L'attività protettiva delle frazioni contro la perossidazione lipidica è stata valutata secondo la procedura descritta nella parte sperimentale; i valori di attività, espressi come LPO_{50}, sono riassunti in Tabella:

Riunioni	**LPO_{50} (µg/mL)**
A	>4000
B	969.1
C	419.0
D	**184.4**
E	**151.7**
F	n.d.
G	104.1

Tab. IV.9 - Valori LPO_{50} delle frazioni ottenute dalla DCCC dell'estratto BuOH di *Satureja montana*

Le indagini preliminari sulle attività anti-ossidanti possedute dagli estratti di *Satureja montana* L. mettono in evidenza come essi siano nel loro insieme meno efficaci degli estratti di *Teucrium polium* L.

Estratto	**DPPH (IC_{50}, µg/mL)**	**RP (Eq.Ac.Asc.)**	**XOI (IC_{50}, µg/mL)**	**ALP (LPO_{50}, µg/mL)**
BuOH (*T.polium*)	**8,6**	**0,41**	**35,4**	**39,8**
BuOH(*S.montana*)	20.3	0.36	331.9	48.0

PARTE SPERIMENTALE

Estrazione *Satureja montana*

200 g di foglie di *Satureja montana* sono state estratte per 3 volte con 700 ml di MeOH per volta; l'estratto MeOH ottenuto è stato filtrato (circa 2L) e portato a secco ottenendo 10g di estratto metanolico; sottoposto a metodica di Kupchan aggiungendo una soluzione di 500 ml di MeOH:H_2O, in rapporto 9:1 (450 ml MeOH, 50 ml di H_2O) ed estratto per 3 volte con 300 ml di esano per volta, ottenendo un estratto esanico di circa 3,2g. In seguito si modula la miscela 9:1, MeOH: H_2O, aggiungendo una quantità tale d'acqua fino ad arrivare a un rapporto 7:3 e si estrae per 3 volte con $CHCl_3$ (250 ml per volta) ottenendo 2,0g di estratto cloroformico, quindi si elimina tutto il MeOH dalla fase acquosa e si estrae per 3 volte con butanolo ottenendo circa 2.5g di estratto butanolico e 3.0g di estratto acquoso.

Purificazione Estratto Butanolico

2g di estratto butanolico sono stati purificati attraverso DCCC nelle seguenti condizioni: n-BuOH/Me_2CO/H_2O, 3:1:5, nella fase discendente (la fase ascendente è la fase stazionaria); eluendo 290 provette, riunite sulla base del comportamento comune su TLC in 37 frazioni.

La frazione n. 15, è stata sottoposta ad HPLC, eluendo con miscela MeOH:H_2O 20:80, colonna C-18 μ-bondapack, ϕ=1.0 ml/min, ottenendo il composto (1), 6S,9S, Roseoside, mg 4. La frazione n.32, della DCCC butanolica, è stata purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 40:60, ϕ=1.0 ml/min, ottenendo il composto (2), 2.3 mg. La frazione n.34, della DCCC butanolica, è stata purificata in HPLC su colonna C-18 μbondapack, con eluente MeOH:H_2O, 30:70, ϕ=1.0 ml/min, ottenendo il composto (3), acido Rosmarinico, 2.3 mg.

Procedure generali degli esperimenti

Gli spettri IR (KBr) sono stati misurati su uno spettrofotometro modello Brucker IFS-48. Gli spettri UV sono stati ottenuti in CH_3CN usando uno spettrofotometro Beckman DU70. La spettrometria di massa High-resolution fast atom bombardment (HRFAB-MS) è stata effettuata su strumento Fisons VG Prospec e la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica (ESI-MS) è stata realizzata su spettrometro con triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000. Il potere ottico roratorio è stato misurato su un polarimetro Jasko P-2000. Gli spettri ^1H e ^{13}C-NMR sono stati realizzati su un apparecchio Varian Unity INOVA a 500.13 e 125.77 MHz, rispettivamente. I chemical shifts erano riferiti al segnale del solvente metanolo deuterato (CD_3OD,δ_H 3.31 ppm). Le correlazioni omonucleari ^1H-^1H sono state determinate mediante esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari ^1H-^{13}C sono state determinate con esperimenti HSQC. Le correlazioni ^1H-^{13}C attraverso due e tre legami sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per $^{2,3}J$ di 8.0 Hz. Le analisi gas cromatografiche sono state realizzate su strumento Agilent Technologies 6850, Serie II gas cromatografo, con colonna capillare (HP-5, 30 m x 0.25 mm, 180°; velocità di flusso del gas carrier elio di 10 mL min$^-$1) e con detector FID che operava a 260°. 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 una pompa Waters 510, con un iniettore Waters U6K e un indice di rifrazione Waters 401 come rivelatore, usando una colonna C_{18} μ-Bondapak (30 cm x 3.9 mm; i.d.; velocità di flusso di 1 mL min^{-1}; Waters, Milford, MA, USA); e colonna Luna C-18 (3μ, 150 mm x 4.60 mm i.d.; velocità di flusso di 1 mL min^{-1}; Phenomenex, Torrance, CA, USA). I profili di eluizione delle cromatografie su strato sottile TLC sono stati definiti tenendo conto dei valori di Rf ricavabili dalle TLC con Kiesegel 60 F_{254} e rilevate nebulizzando le TLC con una prima soluzione al 5% in volume di H_2SO_4 in etanolo e una seconda soluzione al 5% in peso di vanillina in etanolo. Per la TLC sono state usate lastre di silice Merck del tipo Kieselgel 60 F_{254}, 0.25 mm. Le TLC sono state fatte migrare in eluente $CHCl_3$, MeOH, H_2O, in rapporto 80:18:2, per le frazioni meno polari; le frazioni più polari invece sono state fatte migrare in eluente: BuOH:CH_3COOH:H_2O, in rapporto 60:25.15.

DOSAGGI DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

1- Metodo DPPH: misura l'attività *scavenger* dell'antiossidante, tramite lettura spettrofotometrica della riduzione del radicale 2,2-difenilpicrilidrazil ($DPPH^{\cdot}$) [17].

Preparazione dei campioni: la miscela di reazione conteneva quantità appropriate di campione antiossidante disciolto in 1000 μL finali di tampone A supplementato con 50% etanolo; la reazione veniva innescata in seguito all'aggiunta di $DPPH^{\cdot}$ ad una concentrazione finale 84 μM. Dopo un tempo di incubazione di 30' al buio e a temperatura ambiente (17-23°C), si misura l'assorbimento a 517 nm. Il controllo positivo è condotto in presenza di un antiossidante standard, il BHT aggiunto ad una concentrazione finale di 35 mg/L. La concentrazione di antiossidante capace di neutralizzare il 50% delle molecole radicaliche presenti nella miscela di reazione è stata espressa come: IC_{50} (μg/mL).

2- Folin-Ciocalteau Total Phenolic Assay o RP (Reducing Power): [18]. Il dosaggio si basa sulla misurazione della capacità di ridurre determinati ioni metallici da parte delle molecole analizzate, sfruttando una reazione colorimetrica.

Preparazione dei campioni: la reazione era eseguita in 1 mL di tampone B supplementato con 5% (v/v) metanolo contenente $K_3[Fe(CN)_6]$ 1% (p/v) e quantità appropriate di campioni da analizzare. Dopo 30' di incubazione a 50°C, alla miscela di reazione si aggiungono 300 μL di TCA 10% (p/v) e dopo vigorosa agitazione, si centrifugava per 5' a 14000 g a 4°C. Si prelevano 400 μL di sopranatante supplementati con 400 μL di H_2O e 100 μL di $FeCl_3$ 0,1% (p/v). La lettura dell'assorbanza si esegue a 765 nm, corrispondente al picco di assorbimento del "blu di Prussia". Il potere riducente è stato espresso come equivalenti di acido ascorbico (Eq. Ac. Asc.).

3- Metodo XOI (*Xanthine Oxidase* Inhibition): il metodo misura la capacità dell'antiossidante di inibire l'enzima *Xanthine oxidase*.

Preparazione dei campioni: la miscela di reazione era costituita da 1000 μL di tampone B in metanolo 10 % (v/v) contenenti 40 μM di *Xanthine* e quantità scalari di ciascun campione da analizzare. La reazione veniva innescata in seguito all'aggiunta di XO alla concentrazione finale di 1,2 mg/mL.

L'attività dell'enzima è stata seguita in cinetica, registrando l'assorbimento a 295 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbe l'acido urico.

Il controllo negativo è stato effettuato in assenza dell'enzima. Il potere inibitorio dell'attività dell'enzima XO è stato espresso come IC_{50}, ovvero la concentrazione di analita, espressa in μg/mL, in grado di inibire del 50% l'attività dell'enzima.

4- Metodo ALP o TBARS [19] (*Assay Lipo Peroxidation o ThioBarbituric Acid Reactive Substances*): metodo utilizzato per avere una stima della perossidazione lipidica delle membrane.

Preparazione dei campioni: la miscela di reazione conteneva un'emulsione di acido linoleico (AL) 23mM, $FeCl_2$ 0,4 mM, tween 20 0,70% (v/v) e appropriate quantità di campione da analizzare in 1mL di tampone fosfato 200 mM, pH 7.8. Il controllo positivo è stato condotto in presenza di trolox alla concentrazione finale di 0,25 mM. Dopo incubazione a 37°C per 24 h, sono stati prelevati 250 μL di miscela di reazione e trattati con 100 μL di BHT 0,8 g/L, 50 μL di HCl 10% (v/v) e 50 μL TBA 1% (v/v). Per avviare la reazione tra MDA e TBA, la miscela è stata incubata a 100°C per 20'. Dopo aver fatto raffreddare in ghiaccio, si è proceduto con l'estrazione dell'addotto MDA-TBA, aggiungendo 900 μL di n-butanolo e agitando vigorosamente su vortex per 5'. 600 μL di fase butanolica sono stati prelevati dopo centrifugazione per 5'a 14000 g a 4°C e utilizzati .per la lettura dell'assorbanza a 532 nm. L'attività protettiva delle molecole analizzate contro la lipoperossidazione è stata espressa come la quantità di sostanza in μg/mL che determina il 50% dell'inibizione del processo ossidativo a carico dell'acido linoleico in queste condizioni di reazione (LPO_{50}): LPO_{50} (μg/mL)

MATERIALI TESTS ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

Tutti i prodotti chimici erano di grado analitico. Il difenil-1-picril-idrazile (DPPH), l'acido ascorbico, l'acido tiobarbiturico (TBA), l'esaferricianuro di potassio III ($K_3[Fe(CN)_6]$), il tween 20 l'acido linoleico e l'acido ascorbico sono stati forniti dalla Sigma- Aldrich. Il (BHT) è stato fornito dalla SΛFC; il trolox è stato acquistato dalla Calbiochem. I solventi butanolo, etanolo e metanolo sono stati acquistati rispettivamente dalla Sigma-Aldrich, Carlo Erba e dalla Romil.

La *Xanthine* e l'enzima *Xanthine oxidase* sono stati forniti dalla Fulka. Nel corso del lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti tamponi:

Tampone A: 0,1M Tris HCl pH 7,8; -**Tampone B**: 50 mM KPO_4 + 0,1mM EDTA, pH 7,8.

^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 6S,9S, Roseoside (1)

Pos.	δ_H /ppm (*J* in Hz)	δ_C
1	-	42.4
2	2.16-2.47, d (17.1)	50.7
3	-	201.1
4	5.84, s	127.1
5	-	167.1
6	-	80.0
7	5.98, d (15.6)	133.7
8	5.73, dd (7.8,15.6)	133.7
9	4.54, m	74.6
10	1.29, d (6.3)	22.2
11	1.02, s	23.4
12	1.04, s	24.6
13	1.94, d (1.6)	19.5
Gluc		
1’	4.27, d (7.2)	100.9
2’	3.10-3.28, m	75.0
3’	3.10-3.28, m	73.2
4’	3.10-3.28, m	71.7
5’	3.10-3.28, m	78.1
6’	3.56, dd (5.9-12.2) brs; 3.80, dd (2.0,12.2) brd	62.9

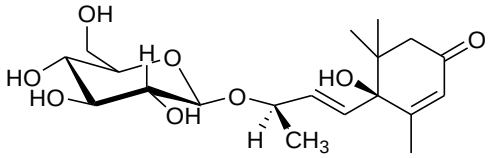
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500 MHz, 6R, 7E, 9R, 9 β-D-glucopiranosil, 4,7, megastigmadien-3one (2)

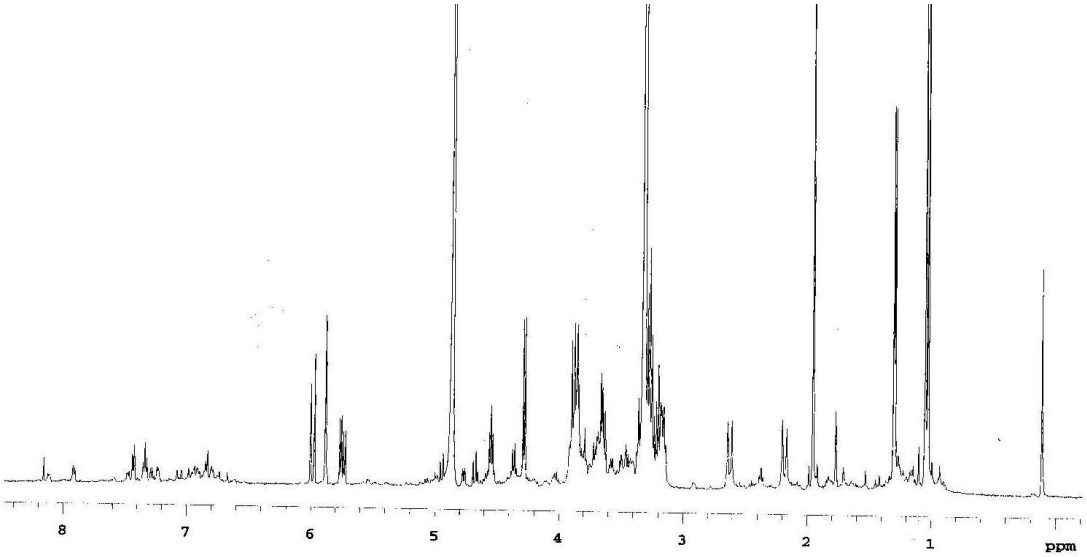
posizione	δ_H /ppm (*J* in Hz)	δ_C/ppm
1	-	36.0
2	2.05-2.49, d (16.8)	47.4
3	-	199.0
4	5.89, s	125.7
5	-	161.7
6	2.70, d (8.2)	55.3
7	5.75,dd, (15.6, 8.2)	126.6
8	5.89,dd (15.6, 8.2)	138.5
9	4.49, t	74.9
10	1.23,s	23.5
11	1.03,s	27.0
12	0.99,s	27.8
13	1.97,s	23.4
Gluc		
1’	4.20, d (7.0)	100.7
2’	3.12-3.26, m	75.3
3’	3.11-3.24, m	73.6
4’	3.15-3.32, m	71.9
5’	3.10-3.28, m	78.4
6’	3.54, dd (5.9-12.2) brs; 3.70, dd (2.0,12.2) brd	62.3

Dati ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR, CD_3OD, 500 MHz, Acido Rosmarinico (3)

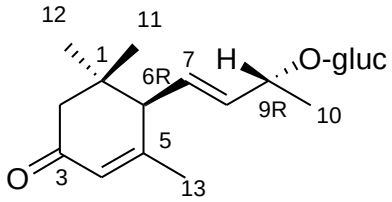
Posizione	δ_H/ppm (*J* in Hz)	δ_C (*J* in Hz)
Acido caffeico		
1	-	127.8
2	7.04 s	114.7
3	-	147.4
4	-	150.4
5	6.77, d, (8.1)	116.3
6	6.96, dd, (2.4, 8.1)	122.7
7	7.58, d, (15.6)	147.3
8	6.24, d, (15.6)	114.2
9	-	168.3
Aglicone		
1’	-	131.3
2’	6.71 s	116.7
3’	-	144.7
4’	-	143.1
5’	6.65, d, (7.8)	116.2
6’	6.55, d, (7.8)	120.7
7’	3.05-3.10, m	36.2
8’	5.20, m	76.2
9’	-	173.2

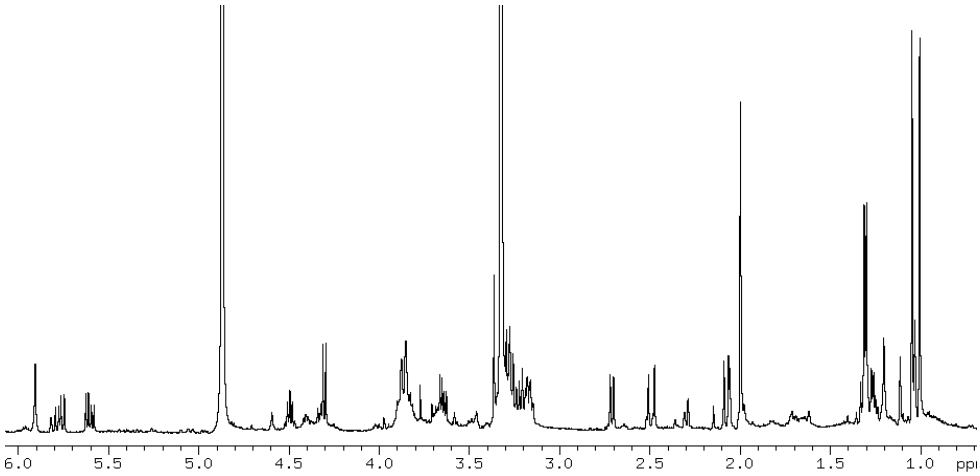
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500MHz, 1- 6S, 9S, Roseoside



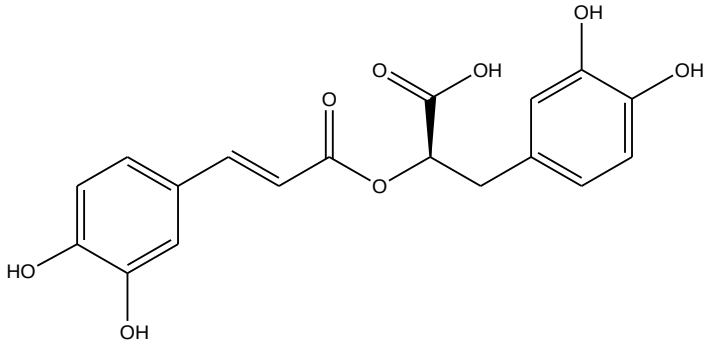


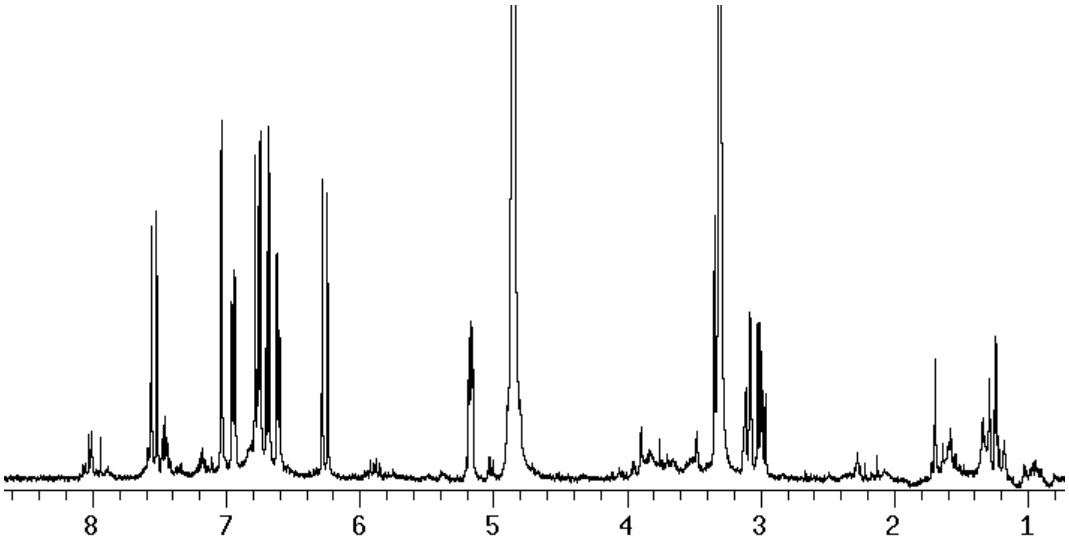
^{1}H-NMR, CD_3OD, 500 MHz, Composto 2



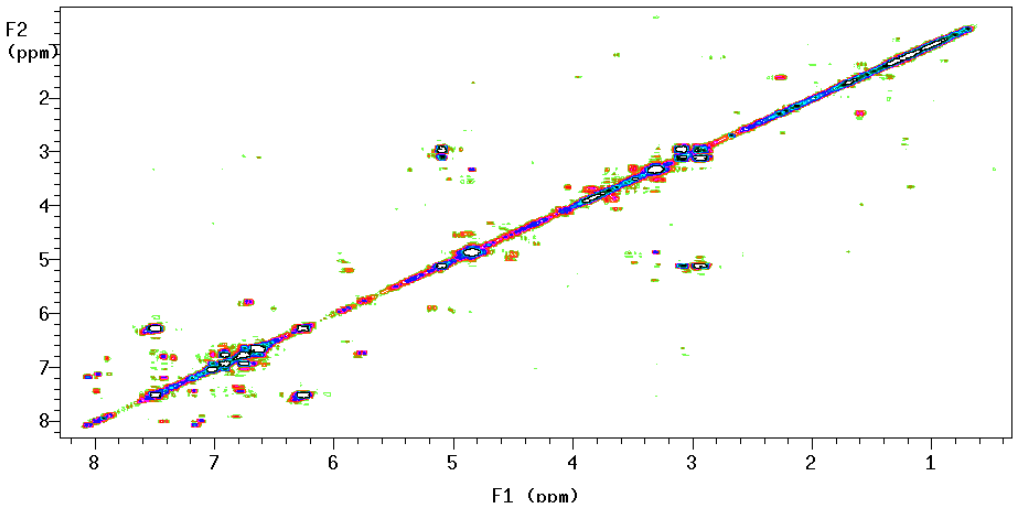


^{1}H-NMR, CD_3OD, 500 MHz, 3- Acido Rosmarinico





2D NMR COSY, CD_3OD, 500 MHz, 3-Acido Rosmarinico



BIBLIOGRAFIA

[1] Lawless, J. *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*; Barnes & Noble books: New York, 1999; pp 218-219.

[2] *F. Moghaddam, M. Farimani, S. Salahvarzi, G. Amin*, Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja khuzistanica*, eCAM 2007;4(1)95–98

[3] *S. Pepeljnjak, G. Stanic, P. Potocki*, Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Satureja montana* ssp. *montana*

[4] *Cetkovic, Mandic, Canadanovic-Brunet, Jasna, Djilas, Sonja, Tumbas, Vesna*, HPLC Screening of Phenolic Compounds in Winter Savory (*Satureja montana L.*) Extracts , *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 30, 293-306*

[5] *Skoula M, Grayer RJ, Kite GC*. Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa*. *Biochem Syst Ecol 2005;33:541–4*

[6] *Bianco A, Lamesi S, Passacantilli P*. Iridoid glucosides from *Satureja vulgaris*. *Phytochemistry 1984;23:121–3*

[7] *Labbe C, Castillo M, Connolly JD*, Mono and sesquiterpenoids from *Satureja gilliesii*. *Phytochemistry, 1993;2:441–4*

[8] *Labbe C, Castillo M, Fainia F, Coll J, Connolly JD*, Rearranged isopimarenes and other diterpenoids from *Satureja gilliesii*. *Phytochemistry, 1994;36:735–8*

[9] *Escudero J, Lopez C, Rabanal RM, Valverde* , Secondary metabolites from *Satureja* species. New triterpenoid from *Satureja acinos, J Nat Prod, 1985;48:128–31*

[10] *Liu J*. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol 1995;49:57–*68.

[11] *G. Ćetković, J. Čanadanović, S. Djilas , V. Tumbas, D. Cvetković,* Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts, *Int. J. Mol. Sci. 2007, 8, 1013-1027*

[12] *Kupchan SM, Britton RW, Ziegler MF, Sigel CW.* Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. J. Org. Chem. 1973; 38: 178-179.

[13] *Yajima, Oono, Nakagawa, NuKada*. A simple sunthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17 (2009), 189-194*

[14] *B. D'Abrosca, M. Della Greca, A. Fiorentino, P. Monaco, P. Oriano, F. Temussi*, Structure elucidation and phytotoxicity of C13 nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*, *Phytochemistry 65 (2004) 497–505*

[15] Yinrong Lu and L. Yeap Foo Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*, P*ytochemistry, Volume 51, Issue 1, 10 May 1999, Pages 91-94*

[16] *Hara S, Okabe H, Mihashi K.* Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4-(R) carboxylates. *Chem. Pharm. Bull. 1987; 35: 501-506*

[17] *Gulcin I., Elmastas M., Aboul-Enein H.* (2007). "Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum Basilicum* L. Family Lamicaceae) assayed by different methodologies". *Phytotherapy Research*,21: 354-361

[18] *Hinnerburg I., Dorman H.J.D., Hiltunen R.* (2006)."Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices". *Food Chemistry*, 97: 122-129

[19] *Zarghami N. et Khosrowbeygi A.M.S.*(2004). "Evaluation of lipid peroxidation as an indirect measure of oxidative stress in seminal plasma". *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2: 34-39