



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche
Settore Scientifico Disciplinare CHEM-05/A

METABOLITI SECONDARI DA APIACEAE E ASPARAGACEAE ENDEMICHE CON POTENZIALE ATTIVITA' BIOLOGICA

**IL DOTTORE
ALESSANDRO VAGLICA**

**IL COORDINATORE
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI**

**IL TUTOR
PROF.SSA ANTONELLA MAGGIO**

**CO TUTOR
PROF.SSA ANTONELLA D'ANNEO**

**CICLO XXXVII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2025**

Sommario

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 6 |
| 1.1 STORIA DEI PRODOTTI NATURALI..... | 6 |
| 1.2 FARMACOGNOSIA: PASSATO E FUTURO..... | 8 |
| 1.2.1 Etnofarmacologia..... | 10 |
| 1.2.2 Prospettive future della Farmacognosia | 12 |
| 1.3 COME STUDIARE I PRODOTTI NATURALI?..... | 13 |
| 1.3.1 Raccolta e Conservazione delle Piante Medicinali | 14 |
| 1.3.2 Preparazione della Droga | 16 |
| 1.4 GLI ESTRATTI | 17 |
| 1.4.1 Procedure di Estrazione..... | 18 |
| 1.4.2 Isolamento Di Composti Puri Da Estratti | 20 |
| 1.5 OLI ESSENZIALI | 21 |
| 1.6 PRINCIPI ATTIVI E METABOLITI SECONDARI..... | 23 |
| 1.7 VIE BIOSINTETICHE | 24 |
| 1.7.1 Terpenoidi..... | 25 |
| 1.7.1.1 Emiterpeni | 27 |
| 1.7.1.2 Monoterpeni | 27 |
| 1.7.1.3 Sesquiterpeni..... | 30 |
| 1.7.2 Fenilpropanoidi..... | 31 |
| 1.7.2.1 Cumarine..... | 33 |
| 1.7.2.2 Flavonoidi..... | 34 |
| 1.7.2.2.1 Isoflavonoidi | 36 |
| 1.7.2.2.2 Omoisoflavonoidi | 37 |
| 1.8 APPLICAZIONI DELLO STUDIO DEI PRODOTTI NATURALI E DEI PRINCIPALI METABOLITI .. | 39 |
| 1.8.1 Chemotassonomia e Biodiversità | 40 |
| 1.8.1.1 Chemotassonomia | 40 |
| 1.8.1.2 Biodiversità | 41 |
| 1.8.1.3 Biodiversità della Sicilia | 42 |
| 1.8.1.4 Biodiversità del Sudafrica | 44 |
| 1.8.2 Ricerca sulle Piante Medicinali | 44 |
| 1.8.2.1 Prodotti naturali come antitumorali..... | 45 |
| 1.8.2.2 Carcinoma mammario | 46 |
| 1.8.3 Altre Applicazioni..... | 48 |
| 1.9 SCOPO DEL LAVORO | 49 |
| 2. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 51 |
| 2.1 APIACEAE..... | 51 |
| 2.1.1 <i>Ammi</i> L. | 53 |
| 2.1.1.1 <i>Ammi crinitum</i> Guss. e <i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam. | 54 |
| 2.1.2 <i>Bifora</i> Hoffm. | 56 |
| 2.1.2.1 <i>Bifora testiculata</i> (L.) Spreng. | 57 |
| 2.1.2.2 <i>Bifora testiculata</i> : Attività Citotossica | 58 |
| 2.1.3 <i>Cachrys</i> L. | 59 |
| 2.1.3.1 <i>Cachrys pungens</i> Jan ex Guss. e <i>Cachrys cristata</i> DC. | 60 |
| 2.1.4 <i>Crithmum</i> L. | 62 |
| 2.1.4.1 <i>Crithmum maritimum</i> L..... | 63 |
| 2.1.5 <i>Ferulago</i> W.D.J. Koch..... | 66 |
| 2.1.5.1 <i>Ferulago nodosa</i> subsp. <i>Geniculata</i> (Guss.) Troia e Raimondo: caratterizzazione degli estratti..... | 67 |

| | |
|--|------------|
| 2.1.5.2 <i>Ferulago nodosa</i> subsp. <i>geniculata</i> : Attività citotossica | 70 |
| 2.1.6 <i>Geocaryum</i> Coss. | 70 |
| 2.1.6.1 <i>Geocaryum capillifolium</i> (Guss.) Coss. | 73 |
| 2.1.7 <i>Laserpitium</i> L..... | 75 |
| 2.1.7.1 <i>Laserpitium siler</i> subsp. <i>siculum</i> : caratterizzazione degli estratti | 77 |
| 2.1.7.2 <i>Laserpitium siler</i> subsp. <i>siculum</i> : Attività Antitumorale | 81 |
| 2.1.7.3 <i>Laserpitium siler</i> subsp. <i>siculum</i> : Analisi FAME | 91 |
| 2.1.8 <i>Magydaris</i> W.D.J.Koch ex DC..... | 91 |
| 2.1.8.1 <i>Magydaris pastinacea</i> (Lam.) Paol | 92 |
| 2.1.9 <i>Oenanthe</i> L..... | 93 |
| 2.1.9.1 <i>Oenanthe fistulosa</i> L. | 94 |
| 2.1.10 <i>Pimpinella</i> L..... | 95 |
| 2.1.10.1 <i>Pimpinella peregrina</i> L. | 96 |
| 2.1.10.2 <i>Pimpinella peregrina</i> : Attività Antimicrobica e Antiossidante..... | 99 |
| 2.1.11 <i>Prangos</i> Lindley..... | 102 |
| 2.1.11.1 <i>Prangos trifida</i> (Mill.) Herrnst. & Heyn | 103 |
| 2.1.11.2 <i>Prangos trifida</i> : Attività Antimicrobica e Antiossidante | 105 |
| 2.1.12 <i>Seseli</i> L..... | 110 |
| 2.1.12.1 <i>Seseli endemici siciliani</i> : Caratterizzazione degli oli delle parti aeree | 111 |
| 2.1.12.2 <i>Seseli endemici siciliani</i> : Analisi GC-MS delle singole parti vegetative | 114 |
| 2.1.12.3 <i>Seseli tortuosum</i> subsp. <i>maritimum</i> e <i>S. bocconeii</i> : Attività Citotossica | 117 |
| 2.1.12.4 <i>Seseli tortuosum</i> subsp. <i>tortuosum</i> : Attività Citotossica | 120 |
| 2.1.12.5 <i>S. bocconeii</i> : Attività Pesticida | 122 |
| 2.1.13 <i>Thapsia</i> L..... | 124 |
| 2.1.13.1 <i>Thapsia garganica</i> subsp. <i>Messanensis</i> (Guss.) Brullo, Guglielmo, Pasta, Pavone and Salmeri | 125 |
| 2.1.14 <i>Tordylium</i> Tourn. ex L. | 128 |
| 2.1.14.1 <i>Tordylium apulum</i> L. | 128 |
| 2.1.14.2 <i>Tordylium apulum</i> : Attività antiossidante | 130 |
| 2.1.15 <i>Torilis</i> L..... | 132 |
| 2.1.15.1 <i>Torilis nodosa</i> (L.) Gaertn..... | 133 |
| 2.2 ASPARAGACEAE | 135 |
| 2.2.1 Hyacinthaceae | 136 |
| 2.2.1.1 <i>Eucomis L'Hér.</i> | 137 |
| 2.2.1.1.1 <i>Eucomis comosa</i> (Houtt.) Wehrh.: caratterizzazione degli estratti | 140 |
| 2.2.1.1.2 <i>Eucomis comosa</i> : derivati sintetici | 147 |
| 2.2.1.1.3 <i>Eucomis comosa</i> : Attività Citotossica | 150 |
| 3. CONCLUSIONI | 153 |
| 4. SEZIONE SPERIMENTALE | 155 |
| 4.1 MATERIALE VEGETALE | 155 |
| 4.2 PROCEDURE GENERALI PER I COMPOSTI VOLATILI | 158 |
| 4.2.1 Estrazione | 158 |
| 4.2.2 Analisi GC-FID oli essenziali | 159 |
| 4.3 PROCEDURE GENERALI PER I COMPOSTI NON-VOLATILI | 160 |
| 4.3.1 Estrazione e Isolamento | 160 |
| 4.3.1.1 <i>Ferulago nodosa</i> | 160 |
| 4.3.1.2 <i>Laserpitium siler</i> subsp. <i>siculum</i> | 161 |
| 4.3.1.3 <i>Eucomis comosa</i> | 161 |
| 4.3.2 Sintesi dei derivati | 163 |
| 4.3.2.1 Metilazione | 163 |
| 4.3.2.2 Acetilazione | 164 |
| 4.3.3 Caratterizzazione | 164 |
| 4.4 ATTIVITÀ BIOLOGICA | 165 |
| 4.4.1 Attività Pesticida | 165 |
| 4.4.1.1 <i>Insetti</i> | 165 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.1.2 Saggi di tossicità | 165 |
| 4.4.2 Attività Antimicrobica | 166 |
| 4.4.2.1 Ceppi batterici | 166 |
| 4.4.2.2 Saggi di attività antimicrobica | 166 |
| 4.4.2.3 Determinazione della concentrazione minima inibitoria (MIC) | 167 |
| 4.4.2.4 Doppia colorazione DAPI/PI e acquisizione di immagini al microscopio a fluorescenza | 167 |
| 4.4.3 Attività Antiossidante | 167 |
| 4.4.3.1 Test della capacità di scavenging del DPPH | 167 |
| 4.4.3.2 Test della capacità di scavenging dell'ABTS | 168 |
| 4.4.3.3 Test della capacità di scavenging di H ₂ O ₂ | 168 |
| 4.4.3.4 Coltura di cellule eucariotiche | 169 |
| 4.4.3.5 Test di citotossicità nelle cellule HaCat | 169 |
| 4.4.3.6 Test di rilevamento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule HaCat | 169 |
| 4.4.3.7 Enzimi antiossidanti nei PMN | 170 |
| 4.4.4 Attività Citotossica | 170 |
| 4.4.4.1 <i>Bifora testiculata</i> | 170 |
| 4.4.4.1.1 Linee cellulari | 170 |
| 4.4.4.1.2 Test di vitalità cellulare | 170 |
| 4.4.4.1.3 Test di citotossicità: saggio MTT | 171 |
| 4.4.4.2 <i>Ferulago nodosa</i> | 172 |
| 4.4.4.2.1 Colture Cellulari e Reagenti | 172 |
| 4.4.4.2.2 Valutazione della vitalità cellulare | 172 |
| 4.4.4.3 <i>Seseli</i> | 172 |
| 4.4.4.3.1 Colture Cellulari e Reagenti | 172 |
| 4.4.4.3.2 Valutazione della vitalità cellulare | 173 |
| 4.4.4.3.3 Analisi Statistica | 173 |
| 4.4.4.4 <i>Laserpitium siler subsp. siculum</i> | 174 |
| 4.4.4.4.1 Colture Cellulari | 174 |
| 4.4.4.4.2 Valutazione della vitalità cellulare | 174 |
| 4.4.4.4.3 Valutazione vacuoli autofagici mediante colorazione con monodansilcadaverina | 175 |
| 4.4.4.4.4 Valutazione dell'apoptosi | 175 |
| 4.4.4.4.5 Valutazione dei ROS intracellulari | 177 |
| 4.4.4.4.6 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) | 177 |
| 4.4.4.4.7 Western blotting | 178 |
| 4.4.4.4.8 Analisi Statistica | 180 |
| 4.4.4.5 <i>Eucomis comosa</i> | 180 |
| 4.4.4.5.1 Colture Cellulari | 180 |
| 4.4.4.5.2 Valutazione della vitalità cellulare | 181 |
| 5.APPENDICE..... | 183 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 236 |

Abstract

Questo progetto di ricerca si propone di approfondire la conoscenza sulle piante endemiche del Mediterraneo, con un focus particolare su quelle siciliane, e sulle piante di altre regioni ricche di biodiversità, come il Sudafrica. Lo studio si concentra sull'analisi dei metaboliti secondari di importanti famiglie botaniche, con un'attenzione specifica alle Apiaceae e alle Asparagaceae, note per la loro diversità chimica e il contenuto di composti bioattivi di rilevante interesse farmacologico.

Le piante siciliane, influenzate dall'unicità dei microclimi locali, sono state studiate per identificare metaboliti unici con potenziale applicativo, specialmente in campo oncologico. Parallelamente, l'indagine sulle Asparagaceae sudafricane ha permesso di isolare omoisoflavonoidi, composti promettenti come antiossidanti e antitumorali.

Un focus particolare è stato riservato agli oli essenziali di piante rare, che hanno mostrato applicazioni interessanti sia nella risoluzione di problematiche tassonomiche sia nel campo biologico, con attività antitumorali, antimicrobiche, antiossidanti e insetticide. L'approccio multidisciplinare ha incluso anche la valutazione della relazione struttura-attività dei composti naturali e la sintesi di derivati ottimizzati.

Questo lavoro rappresenta un contributo significativo alla valorizzazione della biodiversità chimica delle piante mediterranee e sudafricane, ponendo le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci e promuovendo al contempo la conservazione delle risorse naturali.

1. INTRODUZIONE

“Un prodotto naturale può essere definito come un organismo completo, che può includere piante, animali o microrganismi, che non ha subito alcun trattamento, se non eventualmente un semplice processo di conservazione come l'essiccamento. Tale prodotto può anche consistere in una parte specifica di un organismo, come una foglia o un fiore di una pianta, oppure una ghiandola o un qualsiasi organo di un animale. Anche un estratto di un organo o un essudato rientra nella categoria dei prodotti naturali, così come un composto puro isolato da una pianta, un animale o un microrganismo.”

1.1 STORIA DEI PRODOTTI NATURALI

Le piante hanno storicamente rappresentato una fonte cruciale di prodotti naturali impiegati come farmaci, con proprietà tossiche o curative spesso scoperte accidentalmente dall'uomo nel corso della sua ricerca alimentare (Pan et al. 2014). La scoperta che alcune piante possedevano capacità terapeutiche, mentre altre risultavano pericolosamente velenose, segnò un punto di svolta nella comprensione e nell'utilizzo delle risorse naturali a scopo medico (Calixto 2019). Queste conoscenze, acquisite in modo empirico, venivano tramandate di generazione in generazione, costituendo un insieme di saperi che ha favorito lo sviluppo delle prime pratiche mediche. Il compito di custodire queste conoscenze era spesso affidato a figure di grande importanza nelle società primitive come guaritori o sciamani (Ekor 2014). Questi individui non solo possedevano il sapere necessario per l'uso delle piante medicinali, ma lo trasmettevano ai propri successori, avvolgendo tali pratiche in un'aura di mistero e magia. Questo conferiva alla medicina tradizionale un carattere in parte esoterico, fenomeno che può essere osservato ancora oggi in diverse culture indigene (Ekor 2014). Le prime testimonianze storiche sull'uso delle piante come farmaci risalgono al III millennio a.C., con i Sumeri e gli Accadi che documentarono l'impiego di piante medicinali. Gli Egizi, noti per le loro avanzate tecniche di imbalsamazione, possedevano una vasta conoscenza delle proprietà conservanti delle piante, come evidenziato dal papiro di Ebers, risalente al 1550 a.C., che cita droghe ancora in uso, come i semi di ricino e la gomma arabica. Nell'epoca classica, autori come Ippocrate, considerato il padre della medicina, Teofrasto, Plinio il Vecchio, Dioscoride e Galeno apportarono contributi significativi alla descrizione delle piante medicinali e degli animali impiegati a fini terapeutici (Pan et al. 2014; Calixto 2019).



Figura 1. *Papiro di Ebers.*

Durante il Medioevo, l'uso delle piante medicinali conobbe una fase di stagnazione, con pochi progressi rilevanti. Tuttavia, l'invenzione della stampa nel XV secolo e l'epoca delle esplorazioni europee tra il XVI e il XVII secolo portarono alla pubblicazione di "erbari", testi che raccoglievano informazioni dettagliate e illustrate sulle piante medicinali. Nel XVIII secolo viene coniato per la prima volta il termine "farmacognosia" dal professor Johann Adam Schmidt, docente di Patologia Generale, Terapeutica, Materia Medica e Prescrizione di Medicine presso l'Accademia Medico-Chirurgica di Vienna. Derivato dal greco "*pharmakon*" (farmaco) e "*gnosis*" (conoscenza), il termine indicava la disciplina che si occupa dello studio delle droghe, originariamente limitata alle sostanze naturali (Sarker 2012).



Figura 2. *Rappresentazione dell'uso della Cannabis nella medicina cinese.*

Un ruolo cruciale per lo sviluppo della farmacognosia fu offerto da Linneo nel XVIII secolo, con l'introduzione di un sistema innovativo di classificazione delle piante, facilitando la catalogazione e lo studio delle specie medicinali (Calixto 2019). Un'ulteriore svolta fondamentale fu l'isolamento della morfina dall'oppio da parte di Friedrich Sertürner nel 1803, che cambiò totalmente il panorama delle droghe che era esclusivamente vincolato all'utilizzo di quest'ultime in forma di polveri o estratti semplici. Seguirono altre importanti scoperte, come l'isolamento della stricnina o la caffeina, la nicotina e la chinina, l'atropina, la cocaina e la digitalina, estratta dalle foglie di *Digitalis purpurea* nel 1868 (Cragg and Newman, 2013). Durante il XIX secolo, lo sviluppo della chimica organica permise di determinare la struttura chimica di molti composti isolati, consentendo una comprensione più approfondita dei meccanismi d'azione delle droghe (Newman and Cragg, 2020). Questo progresso scientifico accelerò ulteriormente nel XX secolo, quando i principali componenti delle droghe più importanti vennero isolati e le loro strutture chimiche chiarite.

I prodotti naturali hanno rappresentato a lungo una risorsa fondamentale e, ancora oggi, circa il 40% dei farmaci deriva da essi. Alcuni, come i glicosidi cardiaci, la morfina e gli antibiotici, non hanno molti sostituti sintetici, mentre altri, come gli steroidi, sono stati modificati chimicamente per migliorarne le proprietà terapeutiche (Atanasov et al. 2015). Inoltre, alcuni farmaci ottenuti esclusivamente attraverso sintesi chimica possono essere considerati di origine naturale, poiché la struttura di una sostanza naturale con attività farmacologica viene utilizzata come modello per il composto sintetico, mantenendo o addirittura migliorando le proprietà terapeutiche. Esempi sono la tubocurarina, un miorilassante derivato da un alcaloide naturale, e la lidocaina, un anestetico locale sviluppato a partire da studi su composti naturali (Butler et al. 2014). Questi esempi dimostrano l'importanza dei prodotti naturali nello sviluppo farmaceutico, sia come fonti dirette sia come modelli per nuove sintesi chimiche.

1.2 FARMACOGNOSIA: PASSATO E FUTURO

La farmacognosia, disciplina che si occupa dello studio delle sostanze naturali di origine biologica utilizzate in campo farmaceutico, ha visto una notevole evoluzione nel corso del XX secolo. I suoi obiettivi e approcci si sono trasformati in modo significativo, adattandosi ai progressi scientifici e alle esigenze del settore farmaceutico.

Prima della Seconda Guerra Mondiale, la ricerca in farmacognosia si concentrava principalmente sugli aspetti botanici, con particolare attenzione alla tassonomia e alla

morfologia delle piante. L'identificazione botanica delle droghe vegetali era cruciale per garantire la qualità, la sicurezza e l'efficacia dei rimedi derivati dalle piante. Questo approccio era essenziale in un'epoca in cui i rimedi a base vegetale rappresentavano una delle principali risorse terapeutiche disponibili.

Con lo sviluppo della chimica organica e l'avanzare delle tecniche analitiche, il focus si è progressivamente spostato sull'isolamento e sulla caratterizzazione dei composti bioattivi presenti nelle piante medicinali (Newman and Cragg, 2016). Questa transizione ha segnato una svolta significativa: la farmacognosia non si limitava più allo studio del materiale vegetale grezzo, ma si estendeva all'analisi chimica delle sue componenti attive. È importante distinguere in questo contesto tra "droghe" e "composti puri": la droga rappresenta il materiale vegetale grezzo (foglie, radici, cortecce) da cui si possono estrarre composti chimicamente puri, che costituiscono la base per lo sviluppo di farmaci moderni (Şahin and Kurtulbaş, 2024)

I composti isolati possono essere utilizzati in vari modi:

- Direttamente, come principi attivi nei farmaci.
- Modificati chimicamente, per ottimizzarne l'efficacia terapeutica o ridurre gli effetti collaterali.

Tuttavia, l'industria farmaceutica spesso preferisce la sintesi totale per la produzione su larga scala, grazie alla sua precisione e riproducibilità (Nicolau et al. 2000). Nonostante ciò, molte strutture chimiche di prodotti naturali si rivelano estremamente complesse, e per alcuni di essi non è ancora possibile sviluppare metodi di sintesi commercialmente vantaggiosi (Najmi et al. 2022).

Una soluzione promettente a questa sfida potrebbe derivare dall'integrazione di sintesi enzimatica e chimica. Grazie ai progressi della biologia molecolare, è possibile ottenere grandi quantità di enzimi biosinteticamente attivi, aprendo nuove possibilità per la produzione di composti bioattivi complessi (Wu et al. 2021). Questo approccio integrato, che combina biotecnologia e chimica, rappresenta un'area di ricerca in rapida espansione, con il potenziale di rivoluzionare la produzione sostenibile di farmaci derivati da prodotti naturali (Birchfield and McIntosh, 2020).

In conclusione, la ricerca in farmacognosia ha compiuto un viaggio che l'ha portata dai primi studi botanici alla moderna integrazione di chimica, biotecnologia e biologia molecolare. Questa evoluzione non solo ha ampliato la comprensione dei prodotti naturali, ma ha anche aperto la strada a nuove opportunità per lo sviluppo di farmaci innovativi, sostenibili e altamente efficaci.

1.2.1 Etnofarmacologia

La ricerca di nuovi farmaci spesso trae ispirazione dallo studio dei rimedi tradizionali, un ambito che rientra nella disciplina dell'etnofarmacologia (Heinrich and Gibbons, 2001). Questo campo si occupa sia dei "rimedi erboristici", sia dei preparati utilizzati dai guaritori tradizionali, come gli sciamani, nei paesi in via di sviluppo (Kinghorn et al. 1999). Un esempio notevole di successo in questo campo è l'artemisinina, un potente farmaco antimalarico derivato dalla *Artemisia annua*, pianta impiegata nella medicina tradizionale cinese da oltre 1700 anni per curare la malaria (Heinrich and Bremner, 2006).



Figura 3. *Artemisia annua*, tipicamente usata nella medicina tradizionale cinese.

La medicina tradizionale nei paesi in via di sviluppo è caratterizzata da una notevole diversità, con pratiche e credenze dei guaritori che variano ampiamente dipendentemente dall'area geografica di interesse. I maghi sono soliti utilizzare le piante per allontanare gli spiriti maligni, considerati responsabili di sventure, mentre gli erboristi si basano sull'idea che le piante contengano principi attivi capaci di alleviare dolori e curare malattie (Patwardhan et al. 2005). È proprio quest'ultima pratica che offre il maggiore potenziale per l'individuazione di nuovi composti farmacologicamente attivi (Heinrich et al. 2009).

Un programma di ricerca etnofarmacologica in un paese in via di sviluppo generalmente inizia con l'osservazione delle pratiche di un guaritore tradizionale da parte di un farmacologo clinico esperto (Bauer and Tittel, 1996). Durante questa fase, vengono

identificate numerose piante che sembrano avere effetti su diverse malattie, tenendo conto al contempo della possibilità di effetti collaterali associati all'uso delle piante in questione (Zhou et al. 2020).

Al fine di ottenere la massima efficacia, l'estratto vegetale viene spesso preparato seguendo le stesse modalità tradizionali impiegate dal guaritore, utilizzando, ad esempio, acqua come solvente principale. Fatto ciò, l'estratto viene sottoposto a un trial clinico controllato con placebo, su pazienti che preferiscono le cure tradizionali ai farmaci moderni. Se l'estratto dimostra un effetto terapeutico positivo, può diventare un promettente candidato per l'isolamento di un composto farmacologicamente attivo. Ulteriori studi chimici, farmacologici e clinici su tale composto portano alla scoperta di un nuovo farmaco (Heinrich and Gibbons, 2001).

Gli studi etnofarmacologici hanno portato allo sviluppo di numerosi farmaci di origine naturale, tra questi il più famoso è l'Iperico (*Hypericum perforatum*), utilizzato prima nella medicina tradizionale, e successivamente sottoforma di estratto idroalcolico come anti-depressivo (Zhou et al. 2020).



Figura 4. *Hypericum perforatum* utilizzato nella medicina tradizionale per curare la depressione.

Questa metodologia, che parte dall'osservazione empirica delle pratiche tradizionali e porta alla scoperta di nuovi farmaci, costituisce un importante collegamento tra la conoscenza tradizionale e la medicina moderna (Kinghorn et al. 1999).

1.2.2 Prospettive future della Farmacognosia

Lo stato attuale della farmacognosia riflette un crescente interesse verso le molecole bioattive presenti negli organismi naturali, con un'enfasi sempre maggiore sul loro potenziale applicativo in ambito terapeutico (Newman and Cragg, 2016).

Questo focus riflette l'evoluzione della disciplina, che negli ultimi decenni si è allontanata dall'approccio tradizionale per abbracciare una prospettiva più integrata e molecolare.

In questa direzione, Jan G. Bruhn e Lars Bohlin, della divisione di farmacognosia dell'Università di Uppsala in Svezia, hanno proposto di ridefinire la farmacognosia come farmacognosia molecolare formulando la seguente definizione: "*La farmacognosia è una scienza molecolare che esplora la relazione attività-struttura presente in natura con un potenziale farmaco*" (Butler et al. 2014).

Questa reinterpretazione pone al centro della disciplina lo studio delle molecole bioattive, focalizzandosi sull'isolamento, la caratterizzazione delle loro strutture chimiche e l'analisi della loro biosintesi (Koehn and Carter, 2005). La farmacognosia molecolare si distingue per un approccio multidisciplinare, che include non solo la ricerca sugli enzimi e sui geni coinvolti nella biosintesi dei metaboliti naturali (Butler and Buss, 2006), ma anche l'ampliamento del concetto di "rapporto struttura-attività". In questo contesto, tale rapporto non si limita più all'analisi chimico-fisica delle molecole, ma si estende alla comprensione dei meccanismi biosintetici e delle loro interazioni con l'attività biologica osservata (Harvey et al. 2015). Questo rende la farmacognosia molecolare strettamente connessa alla ricerca farmaceutica, delimitandone l'ambito alle molecole con reale potenziale farmacologico (Butler et al. 2014).

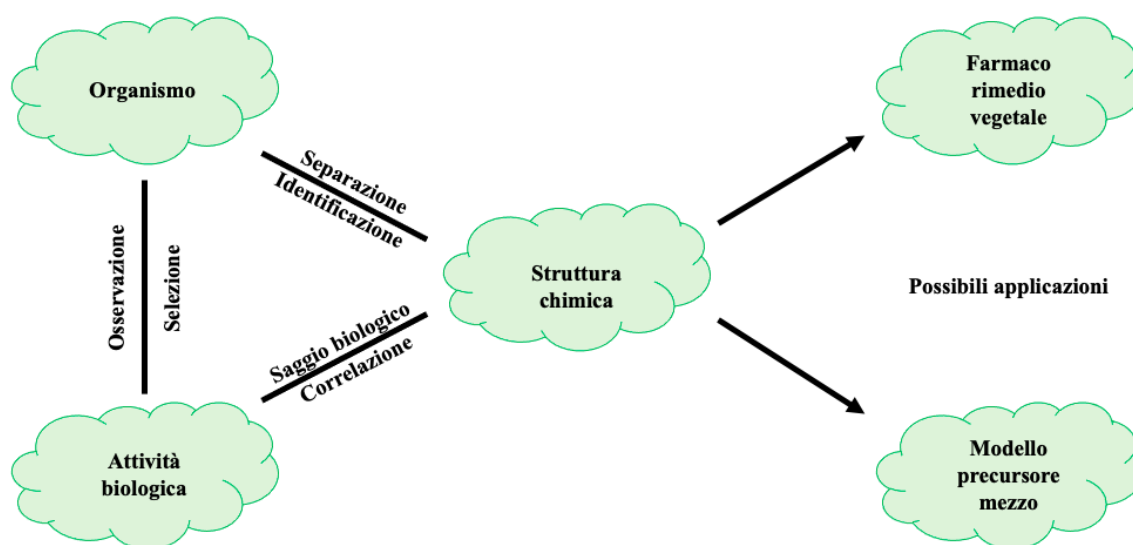


Figura 5. Processo di ricerca in farmacognosia: il processo inizia con l'identificazione di un organismo (alto a sinistra) che mostra una specifica attività biologica (basso a sinistra). Attraverso la separazione dei composti

dalla complessa biomassa, si arriva all'identificazione di una struttura chimica correlata all'attività osservata (centro). Questa struttura può poi essere utilizzata per lo sviluppo di un nuovo farmaco (alto a destra) o come modello, precursore o strumento nella ricerca di altri farmaci (basso a destra).

Nel contesto dell'industria farmaceutica, la scoperta di nuovi farmaci beneficia oggi dell'integrazione tra chimica combinatoria e tecniche avanzate di screening ad alta velocità (high-throughput screening, HTS) (Szymański et al. 2012). L'HTS permette di analizzare milioni di campioni all'anno, accelerando significativamente il processo di identificazione di nuovi composti con applicazioni cliniche. Questa combinazione di tecniche avanzate ha permesso di potenziare notevolmente l'efficacia delle ricerche farmacognostiche, orientandole verso la scoperta di nuovi composti terapeutici con applicazioni cliniche concrete.

In conclusione, la farmacognosia, reinterpretata in chiave molecolare, continua a essere una disciplina fondamentale nella scoperta di nuovi farmaci. Grazie all'integrazione di tecniche moderne di chimica, biologia molecolare e screening con i metodi tradizionali di isolamento e caratterizzazione, la farmacognosia molecolare non solo amplia la conoscenza dei prodotti naturali, ma accelera anche l'applicazione clinica dei composti bioattivi, rafforzandone il ruolo centrale nella ricerca farmaceutica contemporanea.

1.3 COME STUDIARE I PRODOTTI NATURALI?

Le droghe farmacologiche possono essere ottenute da piante spontanee o coltivate, con la scelta del metodo di produzione influenzata da fattori economici e ambientali (Chen et al. 2016). La raccolta da piante spontanee è conveniente quando queste sono abbondanti e i costi di raccolta bassi, mentre la coltivazione diventa necessaria in caso di scarsa disponibilità o costi elevati. Ad esempio, in Messico, le radici di *Dioscorea* per la produzione di steroidi sono raccolte da piante spontanee, mentre in Europa le foglie di *Digitalis*, usate per farmaci cardiotonici, provengono principalmente da coltivazioni (Alipour et al. 2021). Fattori ambientali possono rendere necessaria la coltivazione per evitare il rischio di estinzione di specie spontanee sovrasfruttate, come nel caso del paclitaxel, isolato dal *Taxus brevifolia*, la cui raccolta intensiva ha minacciato la specie (Schippmann et al. 2006). Ciò ha portato allo sviluppo di fonti rinnovabili o metodi alternativi di produzione. In futuro, molte piante medicinali oggi raccolte in natura potrebbero essere coltivate per garantire sostenibilità, uniformità qualitativa e soddisfare la crescente domanda globale, in un equilibrio tra economia, conservazione ambientale e mercato farmaceutico.

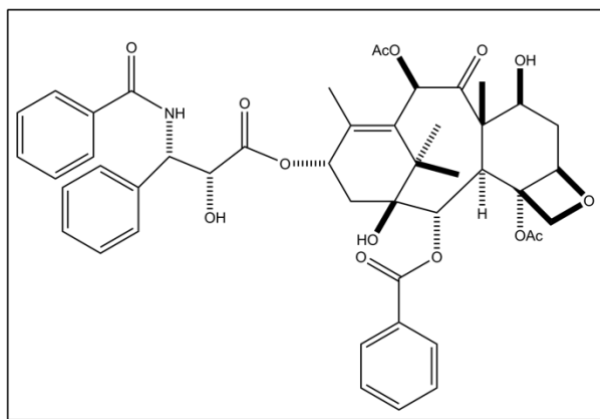


Figura 6. *Taxus Brevifolia* e paclitaxel.

1.3.1 Raccolta e Conservazione delle Piante Medicinali

La quantità di principi attivi in una pianta varia nel corso del suo ciclo di vita, influenzata dallo stadio di sviluppo e dal periodo vegetativo (Li et al. 2020). Di conseguenza, il momento della raccolta è cruciale per massimizzare la resa del principio attivo desiderato (Tlhapi et al. 2024). Ad esempio, in *Ephedra*, il contenuto di efedrina raggiunge il picco in autunno, mentre in *Duboisia myoporoides*, il contenuto di iosciamina può trasformarsi in scopolamina a seconda del periodo dell'anno (Ma et al. 2021). Determinare il "tempo balsamico", ossia il momento di massima concentrazione dei principi attivi, è fondamentale, anche se questo può variare in base all'organo della pianta, al ciclo vitale e all'età (Hazrati et al. 2024; Samat et al. 2020).



Figura 7. *Efedra e zoroastrismo. L'efedra è una pianta spesso associata allo zoroastrismo, l'antica religione persiana, per via del suo possibile utilizzo nei rituali religiosi sotto forma di una bevanda sacra chiamata haoma. L'haoma era descritto nei testi sacri dello zoroastrismo, l'Avesta, e aveva un ruolo fondamentale nei riti spirituali e liturgici.*

Dopo la raccolta, la conservazione del materiale vegetale è essenziale per preservare i principi attivi, specialmente quando la lavorazione immediata non è possibile (Nurshalina et al. 2022). Durante il deterioramento delle strutture intracellulari si attivano reazioni indesiderate, come ossidazione e idrolisi, che possono ridurre l'efficacia della droga (Belwal et al. 2022). L'essiccamento è il metodo più comune per prevenire tali effetti, poiché elimina l'umidità, riducendo il rischio di degradazione enzimatica e attacchi di muffe e batteri (Benjamin et al. 2022). Tuttavia, è necessario bilanciare la velocità di essiccamento con la sensibilità al calore dei principi attivi, come accade nella digitale, dove il calore eccessivo può ridurre l'attività farmacologica (Shonte et al. 2020; Belwal et al. 2022). Per materiali particolarmente delicati, come antibiotici e vaccini, si ricorre alla liofilizzazione, che mantiene il materiale a temperature molto basse durante la rimozione dell'acqua (Elnakar et al. 2021).

La conservazione ottimale può richiedere anche la stabilizzazione enzimatica prima dell'essiccamento, ad esempio tramite vapori di etanolo sotto pressione, per evitare danni ai principi attivi. Questo processo è fondamentale per garantire che i principi attivi rimangano intatti fino al momento dell'estrazione e della produzione dei farmaci (Nurshalina et al. 2022).



Figura 8. *Limonium* essiccato all'aria.

1.3.2 Preparazione della Droga

La prima fase del trattamento di una droga è la macinazione del materiale vegetale (Alsaud and Farid, 2020). Questo processo è cruciale per garantire un'estrazione efficace e uniforme dei principi attivi (Alsaud and Farid, 2020). La macinazione deve infatti ridurre il materiale vegetale in una polvere fine e uniforme. Una granulometria omogenea è fondamentale per un'estrazione completa e per evitare che alcune particelle rimangano non estratte (Giao et al. 2009). Le particelle più grandi tendono a richiedere più tempo per rilasciare i principi attivi; quindi, polveri non uniformi rallentano l'intero processo di estrazione.

Una maggiore area di superficie, inoltre, accelera il processo di estrazione, permettendo una maggiore efficienza nel recupero dei principi attivi.



Figura 9. *Polvere ottenuta dalla macinazione di Lepidium meyenii (Maca), una pianta medicinale.*

1.4 GLI ESTRATTI

Gli estratti vegetali sono preparazioni ottenute estraendo tutti i componenti solubili della droga mediante un solvente appropriato. Gli estratti secchi si ottengono con la completa rimozione del solvente, mentre gli estratti umidi e fluidi vengono preparati utilizzando miscele di acqua ed etanolo come solventi. Gli estratti umidi contengono tra il 15% e il 25% di acqua residua, mentre gli estratti fluidi sono concentrati in modo da contenere i componenti solubili della droga in una o due parti dell'estratto (Sashidaran et al. 2011).

Il processo di estrazione dipende da diversi fattori. I costituenti delle piante, generalmente contenuti all'interno delle cellule vegetali, richiedono che il solvente penetri nelle cellule, solubilizzi i principi attivi e attraversi la parete cellulare per miscelarsi con il solvente esterno. Questo stabilisce un equilibrio tra il soluto intracellulare e il solvente esterno (Sari and Velioglu, 2011). La velocità con cui si raggiunge l'equilibrio dipende da variabili come temperatura, pH, dimensione delle particelle e movimento del solvente. Temperature più alte e particelle di dimensioni minori accelerano il processo, mentre il movimento del solvente facilita la diffusione dei composti attraverso la parete cellulare. Anche il pH è un fattore cruciale per ottimizzare l'estrazione dei componenti desiderati (Nekkaa et al. 2021).



Figura 10. Estratto secco di *Siler siculum*.

Il solvente ideale per l'estrazione di principi attivi farmacologici dovrebbe possedere caratteristiche quali elevata selettività, alta capacità estrattiva, inerzia chimica, basso costo, sicurezza per l'uomo e l'ambiente, e volatilità completa per una rimozione senza residui. La selettività garantisce un'estrazione mirata del composto desiderato, evitando contaminazioni, mentre la capacità estrattiva consente di ottenere quantità significative del principio attivo. Inoltre, l'inerzia chimica previene reazioni indesiderate con i componenti della pianta, e un costo contenuto rende il processo economicamente sostenibile. Tuttavia, un'elevata selettività può essere difficile da raggiungere e non sempre auspicabile, specialmente quando i principi attivi non sono ben definiti. In tali casi, può essere preferibile un solvente con alta capacità estrattiva e bassa selettività (Xu et al. 2021; Tusek et al. 2018; Awad et al. 2021).

1.4.1 Procedure di Estrazione

Le principali procedure di estrazione sono:

1. **Macerazione:** Questa è la procedura di estrazione più semplice e può essere utilizzata sia per piccole quantità di materiale vegetale che per la produzione industriale. La macerazione semplice viene effettuata a temperatura ambiente, mescolando il materiale vegetale polverizzato con un solvente e lasciando la miscela per diversi giorni, con agitatore e mescolatore periodici. Successivamente, l'estratto viene separato dalle particelle vegetali tramite filtrazione. La procedura può essere ripetuta una o due volte con solvente fresco per aumentare il rendimento. Tuttavia,

la macerazione non garantisce un'estrazione completa dei composti desiderati. Nonostante un'attenta pressione sul materiale vegetale residuo, una certa quantità di soluto può rimanere non recuperata (Abubakar and Haque, 2020).

2. **Percolazione:** La percolazione è una tecnica in cui il materiale vegetale è posto in un percolatore, che assomiglia a un tubo dotato di un setaccio filtrante nella parte inferiore. Il solvente fresco viene introdotto nella parte superiore del tubo fino a quando l'estratto recuperato al fondo non contiene più soluto. Questo processo è lento e costoso, poiché richiede grandi quantità di solvente fresco. Tuttavia, è possibile ridurre il consumo di solvente attraverso la tecnica della ri-percolazione, in cui una serie di percolatori sono collegati in serie (Uwineza and Waśkiewicz, 2020).
3. **Estrazione controcorrente:** Questo processo continuo prevede che il materiale vegetale e il solvente si muovano in direzioni opposte. Esistono diversi tipi di estrattori per questo metodo. Nell'estrattore a vite, il materiale vegetale viene trasportato tramite una vite attraverso un tubo e viene a contatto con il solvente che è pompato in direzione opposta. Altri tipi di estrattori includono l'estrattore a carosello, l'estrattore a U e l'estrattore a pressione radiale.
4. **Estrazione con fluidi supercritici:** L'estrazione con fluidi supercritici (SFE, Supercritical Fluid Extraction) è una tecnica avanzata che sfrutta le proprietà uniche di un fluido supercritico, uno stato della materia che si verifica a temperature e pressioni superiori al punto critico, combinando caratteristiche sia liquide che gassose. Il fluido più comunemente utilizzato è l'anidride carbonica (CO₂), nota per la sua bassa tossicità, costo relativamente basso e facilità di rimozione dal prodotto finale (Uwineza and Waśkiewicz, 2020).



Figura 11. Estrazione per macerazione.

Gli estratti ottenuti attraverso queste procedure spesso contengono particelle solide residue che devono essere separate prima dell'ulteriore trattamento. I metodi comuni per rimuovere queste particelle includono decantazione, centrifugazione e filtrazione. Successivamente, gli estratti fluidi e umidi devono essere prontamente essiccati utilizzando un essiccatore o un evaporatore rotante (Zhang et al. 2018).

1.4.2 Isolamento Di Composti Puri Da Estratti

Il processo di isolamento di composti da un estratto vegetale può essere complesso, data la varietà di componenti presenti, di cui il composto desiderato spesso costituisce solo una frazione minima. Quando le proprietà del composto da isolare sono ben conosciute, è possibile ottimizzare la procedura di isolamento. La polarità guida la scelta del solvente e facilita la separazione cromatografica, mentre i composti basici o acidi si separano più facilmente rispetto alle sostanze neutre (Vij and Pathania, 2023). Per composti di diverse dimensioni molecolari, si possono utilizzare materiali gelatinosi come il Sephadex (da Silva et al. 2016). Per composti termolabili o facilmente idrolizzabili, è essenziale adottare condizioni delicate per evitare il degrado (Marston et al. 1990).

In genere, l'isolamento di un composto puro richiede più fasi di separazione, con metodi cromatografici come TLC, HPLC e gas-cromatografia per analisi e purificazione (Vij and Pathania, 2023; Marston et al. 1990).



Figura 12. Gas-cromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa.

Nel contesto di un programma finalizzato all'identificazione di principi attivi per nuovi farmaci di origine naturale, gli estratti vengono preparati da una varietà di organismi. L'attività farmacologica di questi estratti può essere valutata attraverso diversi test biologici, la scelta dei quali è determinata dagli obiettivi specifici del progetto (Gao et al. 2022). Tali test consentono di valutare l'attività farmacologica degli estratti e identificare quelli con il maggior potenziale terapeutico. Una volta individuata l'attività biologica desiderata, il passo successivo consiste nell'isolare i composti responsabili di tale attività. Tuttavia, questo processo può rivelarsi complesso a causa della scarsità di informazioni dettagliate sulle proprietà chimiche dei composti attivi. Per superare queste difficoltà, è fondamentale monitorare attentamente ogni fase dell'isolamento, testando costantemente le frazioni ottenute per valutarne l'attività biologica. Solo le frazioni che mostrano risultati positivi nei test biologici vengono ulteriormente separate e purificate, con l'obiettivo finale di isolare i composti puri.

Questo approccio, noto come isolamento basato su saggio biologico-mirato, si distingue per la sua efficienza nel guidare il processo di isolamento verso i composti effettivamente attivi, riducendo il rischio di investire risorse su frazioni inattive (Barba-Ostria et al. 2022).

1.5 OLI ESSENZIALI

Gli oli essenziali, noti anche come essenze, sono miscele complesse di sostanze organiche prevalentemente volatili, che contengono una vasta gamma di costituenti chimici. Questi includono idrocarburi (sia alifatici saturi che aromatici, oltre a terpeni di vario tipo e sesquiterpeni), alcoli, acidi, aldeidi, chetoni, esteri, eteri, fenoli, composti eterociclici e sostanze contenenti azoto o zolfo. Le essenze sono presenti in numerose piante, spesso localizzate in tessuti specifici come le ghiandole secretrici o i peli secretori (Aziz et al. 2018). E' possibile suddividere gli oli essenziali in due categorie principali:

- **Essenze preformate:** Le essenze più diffuse si trovano in diverse parti della pianta. Ad esempio, possono essere presenti nelle cellule dell'epidermide situate sulla superficie superiore di foglie, sepali e petali (come accade per la rosa e la tuberosa); nei peli secreti (come nel caso del geranio); oppure all'interno di ghiandole specializzate per la secrezione, e così via (Rani and Sharma, 2022).
- **Essenze non preformate:** Queste essenze si originano dalla scissione di sostanze più complesse, che si decompongono per idrolisi durante processi come la distillazione o la macerazione. Un esempio è il lauroceraso: durante la macerazione in acqua, l'enzima emulsina rompe il glucoside amigdalina, rilasciando glucosio,

aldeide benzoica e acido cianidrico, che costituiscono i componenti volatili caratteristici della pianta.

Gli oli essenziali sono caratterizzati da sostanze volatili e lipofile, liquide a temperatura ambiente, con scarsa solubilità in acqua ma buona solubilità in solventi organici. Presentano proprietà ottiche caratteristiche, come la rifrazione della luce e l'attività ottica, e spesso esibiscono un colore e una fluorescenza peculiari sotto luce ultravioletta. La loro estrazione può avvenire attraverso diverse tecniche, tra cui l'idrodissillazione, la distillazione in corrente di vapore, la spremitura a freddo, l'estrazione con solvente e l'enfleurage. La **distillazione in corrente di vapore** è il metodo più comune, in cui il vapore acqueo passa attraverso il materiale vegetale, liberando i composti volatili che vengono poi condensati in oli essenziali e acqua. Gli oli, essendo meno densi, galleggiano sull'acqua e vengono separati. L'**idrodissillazione** è simile alla distillazione in corrente di vapore, ma in questo caso il materiale vegetale viene immerso direttamente nell'acqua, una tecnica particolarmente utilizzata per estrarre essenze da materiali più duri, come legno o radici. La **spremitura a freddo** è invece impiegata principalmente per gli agrumi, dove la buccia viene pressata meccanicamente per liberare gli oli essenziali senza l'uso di calore. L'**estrazione con solvente** è utilizzata per piante delicate: il materiale vegetale viene trattato con un solvente organico, e dopo l'evaporazione del solvente si ottiene una "concrète" che viene ulteriormente raffinata per isolare l'olio essenziale. Infine, l'**enfleurage** è un metodo tradizionale utilizzato per fiori delicati, in cui i petali vengono posti su un grasso solido che assorbe l'olio essenziale; successivamente, il grasso viene trattato con alcool per estrarre l'olio.

Dopo l'estrazione, gli oli essenziali necessitano spesso di purificazione, un processo noto come deterpenazione. Questo passaggio rimuove gli idrocarburi terpenici meno odorosi, aumentando significativamente il potere odoroso dell'essenza, che può diventare fino a 30-70 volte più intensa rispetto all'estratto grezzo. Inoltre, la deterpenazione migliora la solubilità dell'essenza in alcol, ne aumenta il potere antisettico e ne prolunga la conservazione senza ispessimenti (Aziz et al. 2018).

Gli oli essenziali si possono ottenere, sebbene in quantità variabili, dalla quasi totalità delle piante. Le famiglie botaniche più ricche di essenze includono Asteraceae, Apiaceae, Rutaceae, Lauraceae, Liliaceae, Magnoliaceae, Pinaceae e Cupressaceae (Rani and Sharma, 2022). Le essenze ottenute da queste piante trovano applicazioni non solo in campo medico, ma anche in cosmetica, profumeria e aromaterapia, evidenziando l'importanza di una produzione di alta qualità e sostenibile.

Questa diversità nella composizione chimica e nelle proprietà biologiche rende le essenze una risorsa preziosa per molteplici settori, ma richiede anche un'attenta gestione nella raccolta e nella lavorazione per mantenere l'efficacia e la purezza dei prodotti finali.



Figura 13. *Idrodistillazione di un olio essenziale di Seseli bocconei.*

1.6 PRINCIPI ATTIVI E METABOLITI SECONDARI

La comprensione della biogenesi dei principi attivi nelle piante e in altri organismi viventi rappresenta un aspetto fondamentale della farmacognosia, in quanto consente di comprendere e chiarire: (i) i meccanismi che regolano la sintesi dei principi attivi, (ii) la relazione tra la produzione di principi attivi e la sintesi dei componenti cellulari comuni, (iii) il ruolo fisiologico di tali composti, e (iv) le connessioni filogenetiche tra le diverse specie vegetali. La presenza di principi attivi in specie diverse può fornire informazioni più precise sulle affinità morfologiche e sulle possibili origini evolutive condivise, rispetto alle analogie che derivano da evoluzioni convergenti (Maeda 2019). La conoscenza approfondita delle vie metaboliche e dei fattori che influenzano la formazione dei principi attivi è cruciale per migliorare (sia incrementando che stabilizzando) il contenuto di questi composti nelle piante medicinali (Figureido et al. 2022).

Gli esseri viventi utilizzano un numero relativamente ristretto di sostanze per i loro processi vitali, tra cui carboidrati, lipidi, acidi nucleici, coenzimi, proteine e vitamine. La biosintesi e la degradazione di queste sostanze, essenziali per lo sviluppo e il funzionamento delle strutture biologiche, costituiscono il metabolismo primario. Questo tipo di metabolismo è piuttosto uniforme tra tutte le forme di vita, dai batteri agli esseri umani, e i composti che ne derivano sono i metaboliti primari (Liao et al. 2023).

Le piante, tuttavia, sono spesso in grado di sintetizzare una vasta gamma di altre sostanze, che possono essere sia semplici che chimicamente complesse. La biosintesi di questi composti avviene attraverso vie metaboliche che coinvolgono intermedi del metabolismo primario e costituisce il metabolismo secondario (Guerriero et al. 2018). I **metaboliti**

secondari, prodotti in grandi quantità dalle piante, sono spesso ubiquitari e vengono sintetizzati in un organo specifico (come le radici) per essere poi accumulati in un altro (ad esempio, gli alcaloidi tropanici sono prodotti nelle radici ma si accumulano nelle foglie).

Il metabolismo secondario può essere suddiviso in due fasi: una prima fase che è comune al metabolismo primario e una seconda fase che utilizza un prodotto intermedio del metabolismo primario per sintetizzare, tramite diversi tipi di metabolismo secondario, metaboliti secondari che possono variare notevolmente tra le specie. La prima fase è ben documentata, mentre la seconda, che porta alla formazione di metaboliti secondari come alcaloidi, antrachinoni, tannini, saponine, fenoli e flavonoidi, è meno conosciuta. L'impiego di precursori marcati ha consentito di stabilire collegamenti tra gli intermedi del metabolismo primario e i metaboliti secondari, confermando che uno stesso prodotto intermedio può essere impiegato per la sintesi di metaboliti secondari molto differenti (Lajis et al. 2017). I metaboliti secondari possono anche derivare da difetti metabolici o imperfezioni biochimiche nella cellula.

La funzione dei metaboliti secondari è variegata e principalmente serve agli organismi vegetali per affrontare le sfide ambientali e competere per spazio e nutrienti. Lo sviluppo di composti appropriati stimola la mutazione e la combinazione casuale di materiale genetico, generando nuovi enzimi che catalizzano la sintesi di nuove sostanze. Questo porta allo sviluppo di strutture chimiche estremamente complesse, più ricche di stereochimica, anelli concatenati e gruppi funzionali rispetto a quelle derivate dalla chimica combinatoria umana (Xu et al. 2023). In ogni vegetale coesistono metaboliti primari, prodotti intermedi e metaboliti secondari; questi ultimi, considerati i più interessanti dal punto di vista farmacologico, sono comunemente chiamati principi attivi (Kopka et al. 2004).

1.7 VIE BIOSINTETICHE

La comprensione dei percorsi biosintetici dei prodotti naturali ha portato, in numerosi casi, all'isolamento e alla caratterizzazione di enzimi complessi, nonché all'identificazione e clonazione dei geni che codificano per tali enzimi. Questi sviluppi hanno aperto nuove strade per la scoperta di molecole bioattive. Nelle piante il processo "iniziale" è certamente la fotosintesi attraverso il quale l'anidride carbonica e l'acqua vengono convertite in carboidrati (un esempio è la cellulosa, che riveste una funzione strutturale) (Stirbet et al. 2020). Il metabolismo dei carboidrati, regolato dalla glicolisi e dal ciclo dell'acido citrico, fornisce l'energia necessaria per tutti i processi biologici e i carboidrati stessi servono come fonte di carbonio per la sintesi di composti organici nelle piante.

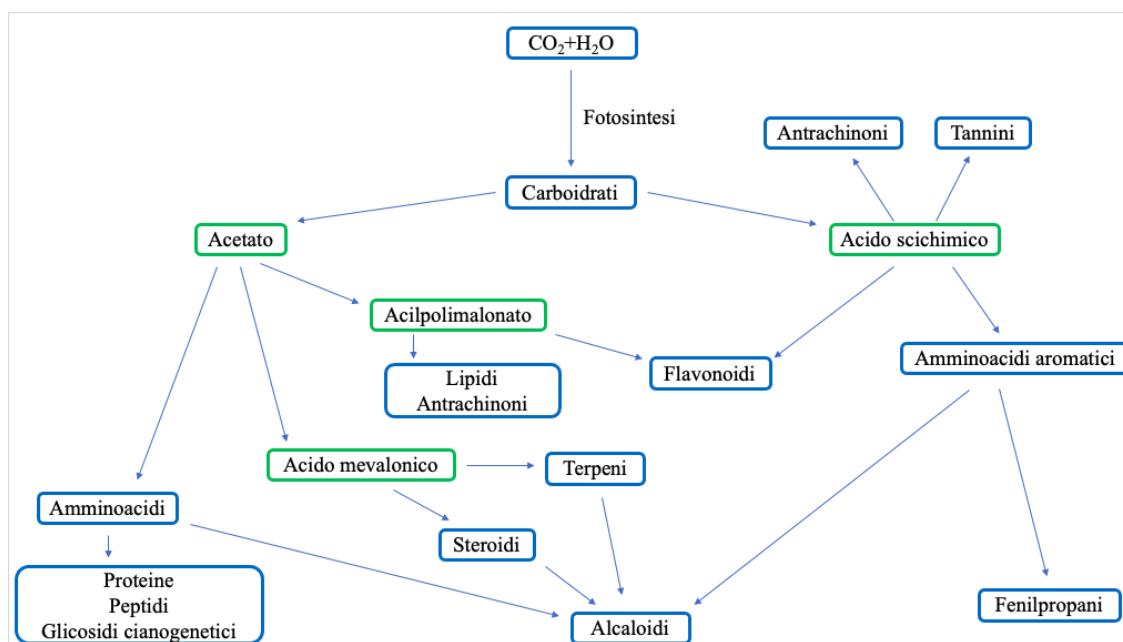


Figura 14. *Biogenesi dei metaboliti secondari.*

1.7.1 Terpenoidi

Una delle classi principali che si viene a produrre dalla via del mevalonato sono i terpenoidi. I terpenoidi rappresentano la classe più ampia (40.000) e diversificata di sostanze chimiche tra la moltitudine di composti prodotti dalle piante.

La principale funzione dei terpenoidi nelle piante, nonostante la grande varietà di funzioni di base nella crescita e nello sviluppo, è quella di regolare le interazioni chimiche e proteggere la pianta dai fattori abiotici e biotici presenti nell'ambiente che li circonda. Tradizionalmente, i terpenoidi di origine vegetale sono stati utilizzati nell'industria alimentare, farmaceutica, chimica e più recentemente sono stati sfruttati nello sviluppo di prodotti a base di biocarburanti (Bohlmann and Keeling, 2008).

Il successo evolutivo di questa classe di composti è in parte basato sulla semplicità di costruzione di molecole di diverse dimensioni.

I terpenoidi, infatti, vengono anche detti isoprenoidi, poiché costituiti da unità isopreniche con cinque atomi di carbonio (C₅H₈).

Secondo la regola dell'isoprene riconosciuta da Wallach e Rutzicka tra la fine del diciannovesimo e la metà del ventesimo secolo (HANDBOOK of essential oil), tutti i terpenoidi derivano dagli elementi costitutivi universali a cinque atomi di carbonio, l'isopentenil difosfato (IPP) e il suo isomero allilico dimetilallil difosfato (DMAPP).

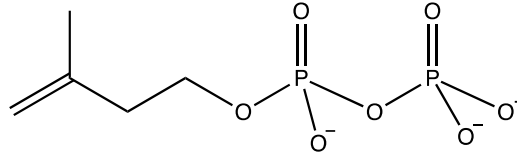


Figura 15. Struttura dell'isopentenil difosfato.

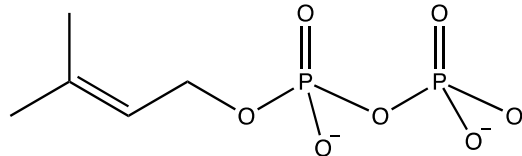


Figura 16. Struttura del dimetilallil difosfato.

Gli intermedi costruiti dalla condensazione di queste unità a cinque atomi di carbonio sono utilizzati come precursori per la biosintesi di terpenoidi (Tholl 2015).

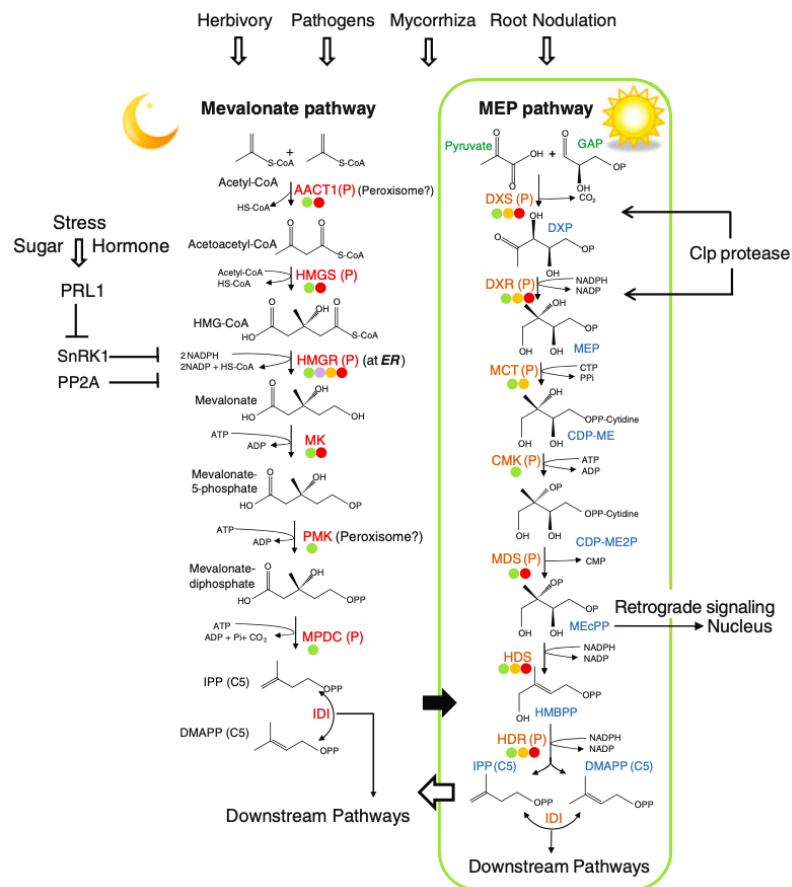


Figura 17. Vie biogenetiche del MVA e del MEP (Tholl 2015).

1.7.1.1 Emiterpeni

Gli emiterpeni sono i terpeni più piccoli e semplici con struttura C₅. L'isoprene è l'emiterpene più noto ed è emesso dalle foglie di molti alberi (conifere, pioppi, querce e salici) ed erbe aromatiche (*Hamamelis japonica*) (Evidente et al. 2015).

L'isoprene agisce come molecola di segnalazione e difesa, ed ha svolto un ruolo importante nell'industria della chimica sintetica per la sintesi di gomma, prodotti farmaceutici, aromi e potenziali biocarburanti.

L'isoprene è sintetizzato dall'Isoprene sintasi (IspS) appartenente ai TPS di classe I e sottofamiglia TPS-b che convertono il DMAPP in isoprene. Altri emiterpenoidi conosciuti situati nelle piante sono l'Acido tiglico, angelico e isovalerico (Yeom et al. 2018).

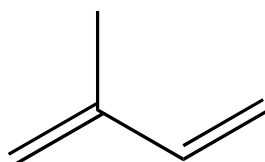


Figura 18. *Struttura dell'Isoprene.*

1.7.1.2 Monoterpeni

I monoterpeni sono composti C₁₀ aciclici o monociclici provenienti dal Geranilpirofosfato (GPP). I monoterpeni sono ben noti per il loro forte odore e le proprietà aromatiche che agiscono come componenti principali degli oli essenziali largamente utilizzati nell'industria cosmetica, dei profumi, alimentare e farmaceutica (Booth et al. 2017).

Possiedono anche proprietà per potenziare le piante nell'affrontare gli stress biotici e/o abiotici (Tholl 2015).

Mentolo, limonene, geraniolo, linalolo, eucaliptolo, borneolo e canfora sono alcuni dei più importanti rappresentanti dei monoterpenoidi. I monoterpeni sono generalmente prodotti dal GPP dall'azione della monoterpeni sintasi (mTPS) (Ruan et al. 2016).

Il meccanismo di reazione per tutti i mTPS coinvolge la reazione avviata dalla ionizzazione ione-dipendente del substrato con il metallo bivalente (solitamente Mg²⁺ o Mn²⁺).

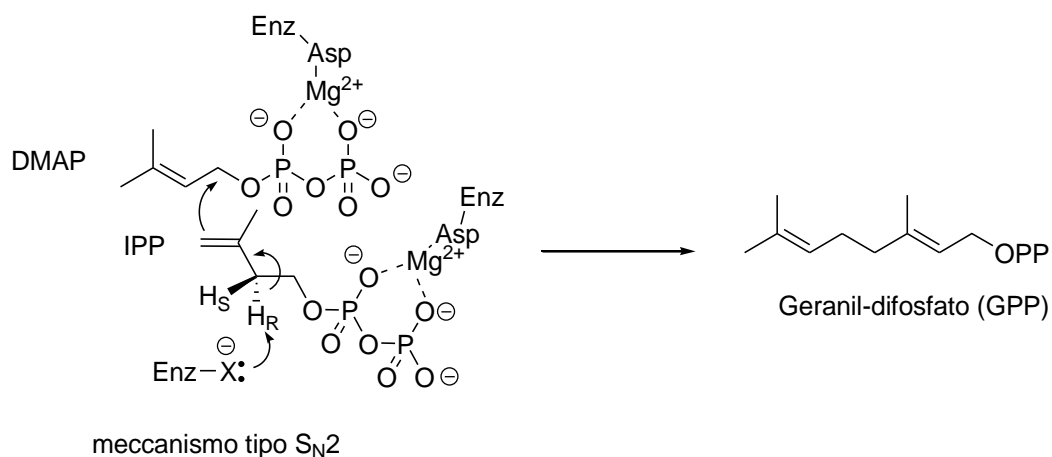


Figura 19. Meccanismo di reazione S_N2 enzima catalizzato per la formazione del GPP.

L'intermedio cationico risultante subisce inoltre, una serie di ciclizzazioni, spostamenti di Idruro o altri riarrangiamenti fino a quando la reazione è terminata dalla perdita di protoni o dall'aggiunta di un nucleofilo (Degenhardt et al. 2009). In alcuni casi, semplici monoterpeni formati dal GPP, possono subire diverse trasformazioni che portano a un prodotto finale diverso.

Ad esempio, il (-)-(4S)-limonene formato dalla Limonene sintasi subisce diverse trasformazioni da parte di vari enzimi situati in diversi compartimenti subcellulari che portano alla formazione del mentolo (Croteau et al. 2005).

Allo stesso modo, in alcune piante come la *C. roseus*, il geraniolo formato dalla geraniolo sintasi funge da precursore per la biosintesi degli iridoidi (Kumar et al. 2015).

Sebbene la maggior parte dei monoterpenoidi riportati finora siano sintetizzati dal classico substrato GPP, alcuni mTPS utilizzano il Neril pirofosfato (NPP) (isomero Z di GPP) per formare monoterpenoidi (Sun et al. 2016).

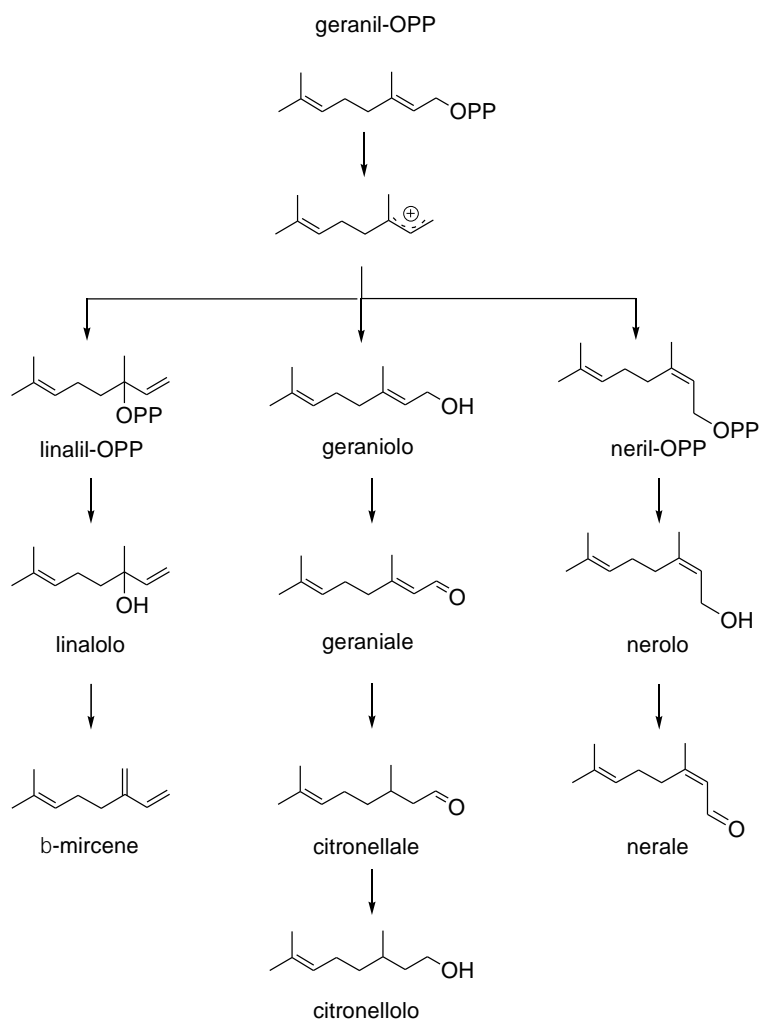


Figura 20. Riarrangiamenti con diverse reazioni del GPP per dare vita ad altri monoterpeni.

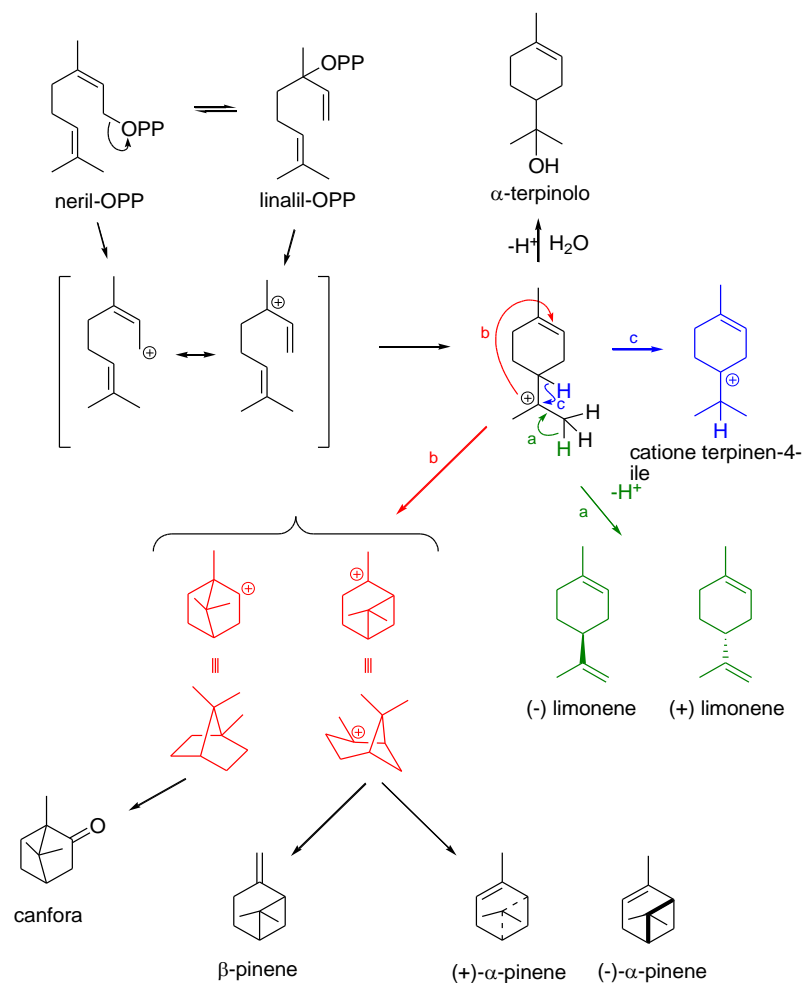


Figura 21. Ciclizzazioni dei monoterpeni a partire dal Neril pirofosfato.

1.7.1.3 Sesquiterpeni

I sesquiterpeni sono un gruppo di composti C₁₅ rappresentanti la classe più abbondante di terpeni. Sono composti aciclici, monociclici, biciclici o triciclici prodotti a partire dal Farnesil pirofosfato (FPP) attraverso l'attività catalitica delle Sesquiterpene sintasi (sTPS) (Chen et al. 2011).

Sono i costituenti dei profumi floreali e aiutano le piante a difendersi da erbivori e agenti patogeni. Ad esempio, i sesquiterpeni prodotti da un sTPS specifico si accumulano nello stigma dei fiori di petunia prima che si aprano per proteggerli dagli agenti patogeni.

I **lattoni sesquiterpenici** sono composti chimicamente distinti dai sesquiterpenoidi, che hanno le caratteristiche di un sistema α-metilene γ-lattone, e di carbonili α,β-insaturi o epossidi. Sia i sesquiterpenoidi, che i lattoni sesquiterpenici mostrano un'ampia gamma di funzioni biologiche come agenti antimicrobici, antinfiammatori e antitumorali (Abdallah and Quax, 2017).

Sesquiterpenoidi comuni sono il cariofillene, il farnesene, l' α -umulene, lo zingiberene, mentre i lattoni sesquiterpenoidi piú famosi sono l'artemisinina (antimalarica) e il Partenolide.

La conversione del Farnesil pirofosfato (FPP) in sesquiterpeni mediante l'sTPS, utilizza meccanismi di reazione a base carbocationica simili a quelli dei mTPS.

Tuttavia, a causa dello scheletro carbonioso piú grande del FPP e della presenza di tre, invece che di due doppi legami, aumenta la diversità strutturale dei prodotti (Figura 22) (Degenhardt et al. 2009).

In precedenza si pensava che tutti i sesquiterpeni fossero sintetizzati esclusivamente nel citosol, utilizzando l'FPP generato tramite la via del MVA. Tuttavia, alcuni articoli indicano la formazione di piccole quantità di sesquiterpeni nei plastidi (Wu et al. 2006).

Inoltre, ci sono diversi articoli che dimostrano il *cross-talk* metabolico tra la via dell'MVA e del MEP nella biosintesi dei sesquiterpeni (Hemmerlin et al. 2006).

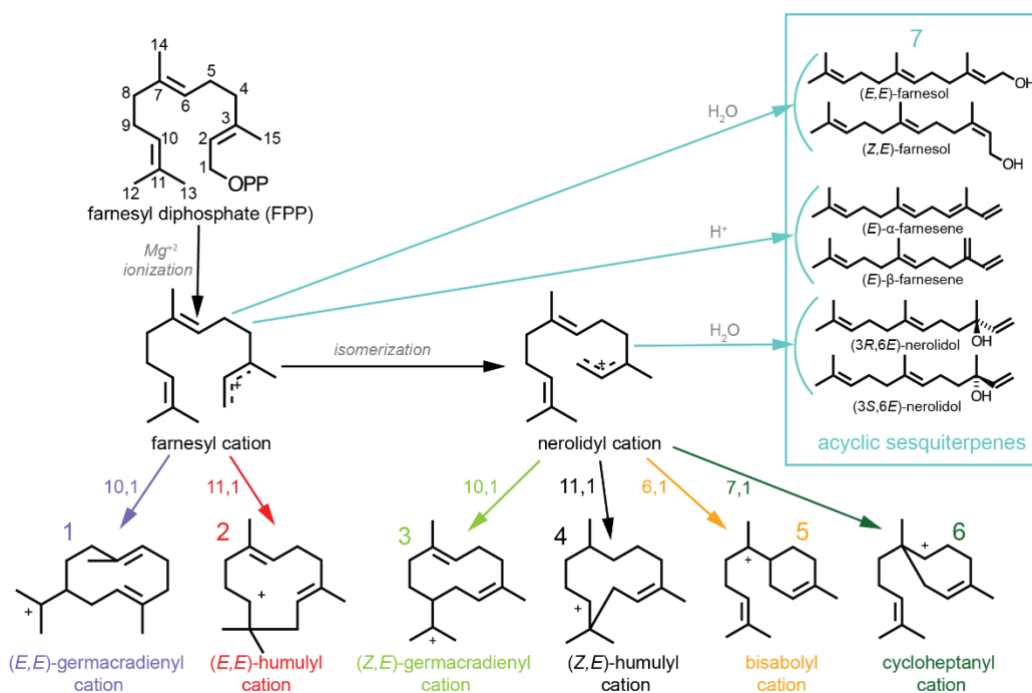


Figura 22. Ciclizzazioni del Farnesil e del Nerolidil pirofosfato.

1.7.2 Fenilpropanoidi

I fenilpropanoidi costituiscono una vasta e diversificata classe di composti naturali, derivati principalmente dagli aminoacidi aromatici tirosina e fenilalanina o dagli intermedi del metabolismo dell'acido scichimico. Questi composti sono caratterizzati da una struttura comune che include un anello fenilico legato a una catena laterale propilica, distinguendoli

chiaramente da altre classi di metaboliti secondari come alcaloidi e glicosidi cianogenetici, che contengono azoto.

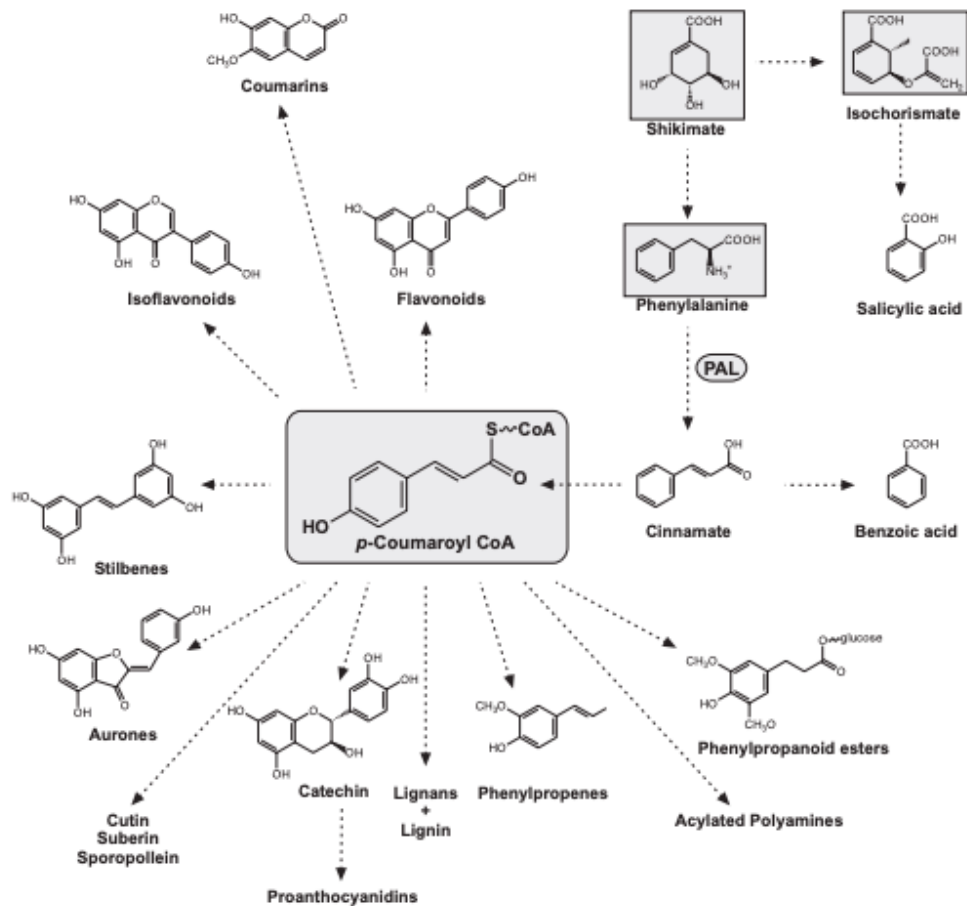


Figura 23. Via biosintetica dei Fenilpropanoidi (Vogt 2010).

I fenilpropanoidi sono ampiamente distribuiti in molte specie vegetali, dove svolgono ruoli cruciali sia nella fisiologia della pianta sia nelle interazioni ecologiche. Contribuiscono alla difesa contro patogeni e predatori, proteggono dai danni della radiazione ultravioletta e facilitano la comunicazione tra piante e impollinatori. Inoltre, molti di questi composti servono come precursori per la sintesi di polimeri vegetali complessi come la lignina, che è fondamentale per il supporto strutturale delle piante e per il trasporto dell'acqua (Noel et al. 2005).

Tra i principali fenilpropanoidi vi sono le cumarine, i lignani, i flavonoidi e i tannini, ognuno dei quali possiede un ampio spettro di attività biologiche. Le cumarine sono note per le loro proprietà anticoagulanti, fotosensibilizzanti e antimicrobiche. I lignani, invece, sono apprezzati per le loro attività antitumorali e antiossidanti. I flavonoidi, una delle sottoclassi più studiate, sono riconosciuti per le loro proprietà antinfiammatorie, cardioprotettive e

neuroprotettive. I tannini sono fondamentali per la difesa della pianta e sono noti per le loro proprietà astringenti e antiossidanti (Neelam et al. 2020).

La versatilità e la complessità dei fenilpropanoidi, derivante dalla loro biogenesi e varietà strutturale, ne fanno un oggetto di intenso studio sia per comprendere le loro funzioni biologiche nelle piante sia per esplorarne il potenziale terapeutico e applicativo in medicina e nell'industria farmaceutica.

1.7.2.1 Cumarine

Le cumarine sono una classe di composti aromatici derivati dal 5,6-benzo-2-pirone e sono ampiamente distribuite nel regno vegetale. Questi composti si trovano sia in forma libera che legata come glucosidi e sono stati identificati in circa 700 varietà, differenziandosi principalmente per i sostituenti presenti sull'anello benzenico (Maurya and Dubey, 2024). Le cumarine sono state individuate in un'ampia varietà di specie vegetali, appartenenti a più di 30 famiglie botaniche. Tra le piante più conosciute per la loro presenza troviamo *Anthoxanthum odoratum* (Poaceae), *Dipteryx odorata* e *D. oppositifolia* (Lamiaceae), *Melilotus officinalis* e *M. albus* (Lamiaceae), *Trifolium pratense* (Lamiaceae) e *Galium trifolium* (Rubiaceae) (Sharifi-Rad et al. 2021).

La biogenesi delle cumarine inizia con la formazione dell'acido cinammico, prodotto dalla fenilalanina attraverso la via dell'acido scichimico. L'acido cinammico subisce successive reazioni enzimatiche che portano alla formazione di vari composti fenilpropanoidi, tra cui le cumarine. Questi processi includono reazioni di idrossilazione e ciclizzazione, che determinano la struttura finale delle cumarine (Prusty and Kumar, 2020).

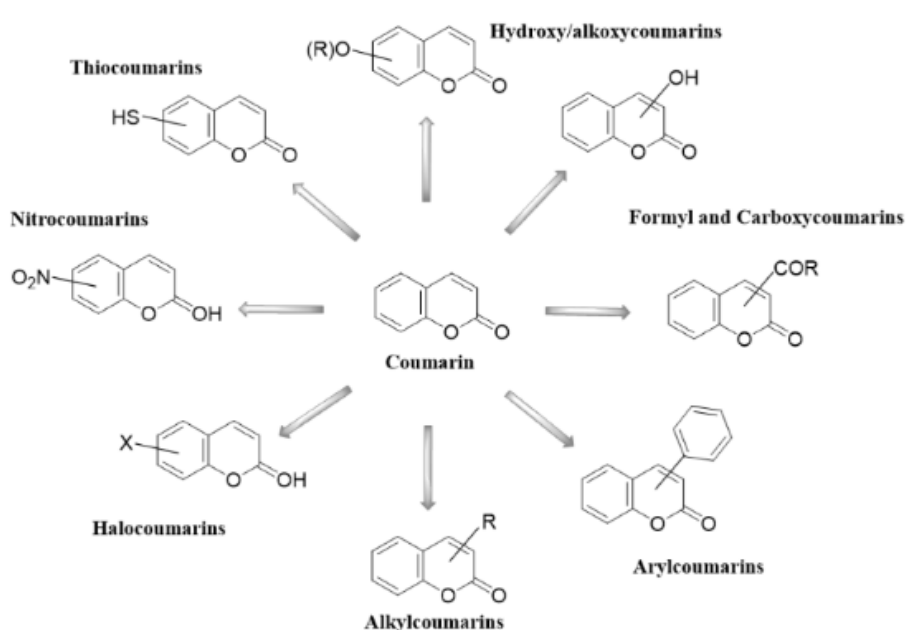


Figura 24. *Cumarina come punto di partenza dei principali derivati (Borges et al. 2005).*

Recenti studi hanno evidenziato che la sintesi delle cumarine è influenzata da condizioni ambientali e genetiche specifiche della pianta, il che può portare a una variazione significativa nella composizione e concentrazione di questi composti tra diverse specie e varietà.

La cumarina fu isolata per la prima volta dalla fava di Tonka, il seme di *Dipteryx odorata*, una pianta della Guinea conosciuta localmente come "coumarou" (Sarker and Nahar, 2017). Questa scoperta segnò un passo importante nello studio delle cumarine e della loro applicazione pratica. La cumarina si presenta come un solido cristallino incolore, con un odore caratteristico simile al fieno appena tagliato e un sapore amaro aromatico. Essa è solubile in alcol e può mostrare fluorescenza blu o blu-verde in soluzione ammoniacale sotto luce UV. Il suo profilo aromatico è stato storicamente apprezzato non solo per la produzione di fragranze, ma anche per il suo utilizzo in profumi e cosmetici, dove la sua stabilità e aroma distintivo hanno fatto di essa un ingrediente ricercato.

La cumarina e gli estratti di fava di Tonka sono stati storicamente impiegati per conferire aroma a bevande alcoliche, come il rum, oltre che in formulazioni farmaceutiche e alimentari (Annunziata et al. 2020). Tuttavia, l'uso della cumarina è stato limitato a causa delle sue proprietà epatotossiche e del potenziale cancerogeno, nonché delle sue interazioni con diversi farmaci. In particolare, le cumarine sono note per il loro effetto anticoagulante, che può interferire con la coagulazione del sangue e aumentare il rischio di emorragie se assunta in quantità eccessive o in combinazione con anticoagulanti farmacologici. Questa preoccupazione ha portato a restrizioni sull'uso della cumarina in prodotti alimentari e medicinali. Nonostante queste preoccupazioni, alcuni derivati della cumarina, come esculetina, umbelliferone, dicumarolo, psoralene, angelicina e scopoletina, continuano ad essere utilizzati nel campo farmaceutico per le loro attività terapeutiche, quali proprietà antinfiammatorie, anticoagulanti e antitumorali (Maurya and Dubey, 2024). Questi composti hanno dimostrato efficacia nel trattamento di varie condizioni, tra cui malattie cardiovascolari e infezioni, e la loro ricerca continua a rivelare potenziali applicazioni terapeutiche innovative.

1.7.2.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono una vasta classe di composti naturali, ampiamente distribuiti nelle felci e nelle piante superiori, dove si trovano sia in forma libera sia come glicosidi, con circa 4.000 strutture conosciute. Derivano principalmente dal flavone, un composto aromatico con

struttura di 2-fenil- γ -benzopirone. La biogenesi dei flavonoidi inizia con la sintesi del flavone, che può essere successivamente modificato per formare diversi sottogruppi di flavonoidi. Ad esempio, l'idrogenazione del flavone produce flavanone (2,3-di-idrossiflavone), mentre la sostituzione di un atomo di idrogeno con un gruppo ossidrilico in posizione 3 dell'anello pironico genera flavonolo (3-idrossiflavone). Altri derivati importanti includono il calcone e l'antocianidina (Falcone Ferreyra et al. 2012).

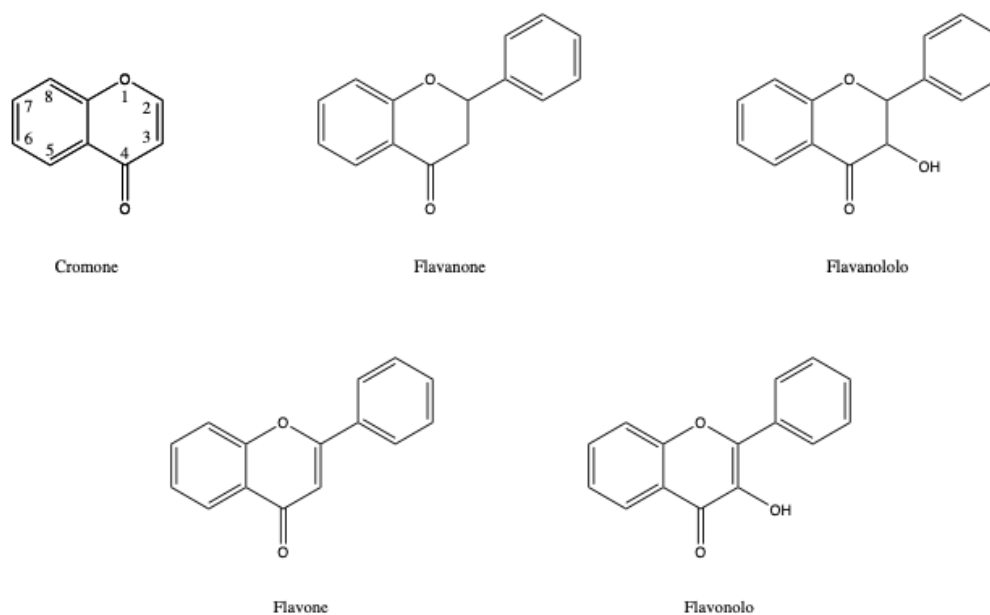


Figura 25. Struttura del cromone e delle differenti classi di flavonoidi.

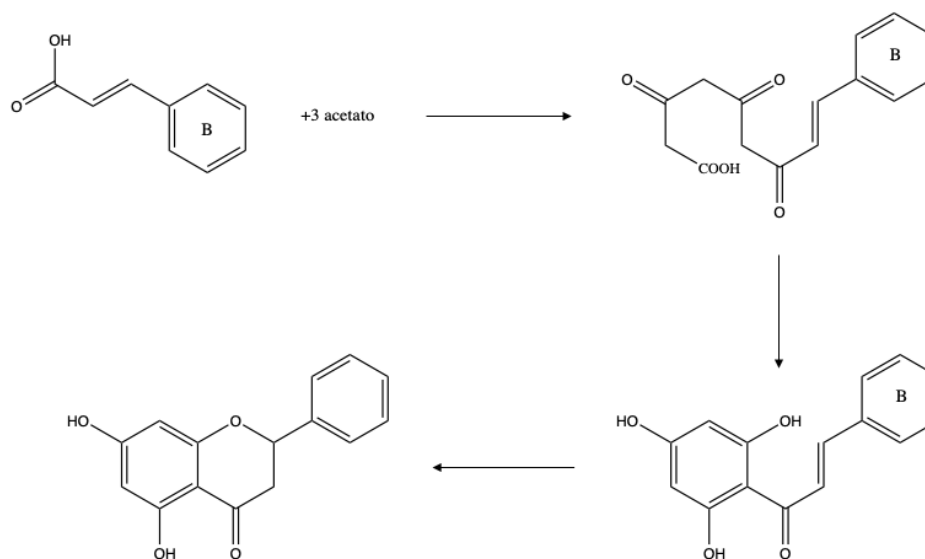


Figura 26. Biosintesi dei flavonoidi.

Dal punto di vista biosintetico, l'anello A del flavone deriva dall'acetato, mentre l'anello B proviene dall'acido scichimico. I tre atomi di carbonio che collegano gli anelli A e B sono forniti dal fosfoenolpiruvato. Le successive reazioni di idrossilazione e riduzione portano alla formazione dei vari flavonoidi, creando una grande diversità di strutture e funzioni (Falcone Ferreyra et al. 2012).

In passato, i flavonoidi erano considerati semplici pigmenti inerti, ma studi più recenti hanno rivelato le loro numerose funzioni essenziali nelle piante. Tra queste, la protezione dai raggi UV, la chelazione di metalli, e l'attività antiossidante e antienzimatica sono particolarmente importanti. I flavonoidi sono coinvolti anche in processi biologici complessi come il trasporto energetico, la regolazione della crescita, l'azione ormonale, la fotosintesi, la morfogenesi, la determinazione del sesso e le risposte difensive contro le infezioni. Contribuiscono anche a una varietà di colori in diverse parti della pianta, come frutti, fiori, semi, cortecce e radici, spaziando dal giallo e arancione al rosso e blu, a seconda della loro composizione chimica. L'intensità del colore giallo, per esempio, è proporzionale al numero di gruppi ossidrilici presenti nel flavonoide (Panche et al. 2016).

L'importanza terapeutica dei flavonoidi fu proposta per la prima volta dal biochimico ungherese Albert Szent-Györgyi quando nel 1935 scoprì l'azione vasoprotettiva della citrina, una miscela di esperidina ed eriodictiolo, flavonoidi presenti nella buccia di limone (*Citrus limon*) e nella paprica (*Capsicum annuum*). Oggi, oltre alla loro azione vasoprotettiva, i flavonoidi sono riconosciuti per una serie di effetti benefici sulla salute, tra cui azioni antiflogistiche, gastroprotettive, antitrombotiche, antitumorali, antibatteriche e antiepatotossiche. Per esempio, la silibina, un flavonoide presente nel cardo mariano (*Silybum marianum*), è nota per le sue proprietà epatoprotettive. Questi effetti sono attribuiti alla loro interazione con vari sistemi enzimatici e funzioni cellulari, rendendo i flavonoidi oggetto di crescente interesse nella ricerca farmacologica e nutraceutica (Rajasekar et al. 2023).

1.7.2.2.1 Isoflavonoidi

Gli isoflavonoidi, una sottoclasse dei flavonoidi, sono composti polifenolici presenti principalmente nelle leguminose come la soia e il trifoglio rosso. Svolgono ruoli essenziali nella crescita, nello sviluppo e nella difesa delle piante contro vari stress, oltre a offrire benefici per la salute umana (Veitch 2013; Wang et al. 2022).

Nelle interazioni tra piante e microrganismi, gli isoflavonoidi agiscono come molecole segnale percepite dai microrganismi stessi, facilitando comunicazioni cruciali per la simbiosi (Biala-Leonhard et al. 2021). Inoltre, funzionano come fitoalessine, inibendo la crescita e la

riproduzione di batteri e funghi, rafforzando così le difese della pianta contro i patogeni. Un esempio notevole è la loro capacità di attrarre i rizobi nelle radici delle leguminose, promuovendo relazioni simbiotiche che migliorano la crescita delle piante, riducono l'uso di fertilizzanti azotati e incrementano la fertilità del suolo (Abd-Alla et al. 2023).

Gli isoflavonoidi, dal punto di vista strutturale, sono una sottoclasse dei flavonoidi caratterizzata da una struttura a 15 atomi di carbonio organizzata in tre anelli: due aromatici (A e B) e un anello centrale eterociclico (C). La loro formula base è $C_{15}H_{10}O_2$, ma differiscono dai flavonoidi per il posizionamento del gruppo fenilico (anello B). Negli isoflavonoidi, l'anello B è attaccato alla posizione 3 dell'anello centrale eterociclico (C), invece che alla posizione 2, come avviene nei flavonoidi classici.

Questa differenza strutturale conferisce agli isoflavonoidi proprietà chimiche uniche che influenzano la loro funzione biologica. Ad esempio, gli isoflavonoidi mostrano una maggiore affinità per i recettori degli estrogeni umani rispetto ai flavonoidi, rendendoli efficaci come fitoestrogeni.

Questa caratteristica li rende utili in alimenti funzionali, nutraceutici e medicine per la prevenzione e il trattamento di diverse condizioni di salute, come la riduzione dei sintomi della menopausa, la protezione contro alcune forme tumorali e il miglioramento della salute cardiovascolare (Dixon 2004; Yu et al. 2021).

1.7.2.2 Omoisoflavonoidi

Gli omoisoflavonoidi rappresentano una classe distintiva di composti naturali, associati a diverse famiglie botaniche, tra cui Liliaceae, Asparagaceae, Fabaceae, Agavaceae e Polygonaceae. Questi composti, sebbene classificati come una sottoclasse dei flavonoidi, presentano caratteristiche uniche che li differenziano dagli isoflavonoidi classici, in parte a causa di un atomo di carbonio aggiuntivo nello scheletro della loro struttura (Bohler and Tamm, 1967). Il termine "omoisoflavonoidi" fu introdotto nel 1967 da Böhler e Tamm per descrivere i composti isolati da *Eucomis bicolor*, come la eucomina e l'eucomolo, che presentano un doppio legame esociclico o nessuna insaturazione, rispettivamente, e che sono distintivi per la loro struttura chimica rispetto agli isoflavonoidi tradizionali.

La biosintesi degli omoisoflavonoidi rappresenta una modifica ulteriore rispetto agli scheletri flavonoidici, come osservato da Dewick nel 1973. Dewick notò che, mentre i composti isoflavonoidici in natura spesso subiscono una migrazione 1,2-diaril, questa non si verifica durante la biosintesi degli omoisoflavonoidi, suggerendo una diversa via biosintetica. Nonostante diversi tentativi di classificazione e nomenclatura, la comprensione completa della biosintesi degli omoisoflavonoidi rimane in evoluzione (Dewick 1973).

Nel 1975, Dewick propose una classificazione basata sulla biosintesi, che fornì un punto di partenza utile per la categorizzazione, ma successivamente è stata ampliata e raffinata. Du Toit et al. (2010) tentarono una revisione che identificava quattro principali categorie strutturali di omoisoflavanoni: 3-benzil-4-cromanoni, 3-benzilidene-4-cromanoni, 3-benzil-3-idrossi-4-cromanoni e scillascilline. Tuttavia, questa classificazione non includeva gli omoisoflavanoni idrossilati in C-9, che erano stati precedentemente isolati nelle specie della famiglia Polygonaceae (Dewick 1975; López et al. 2006; Du Toit et al. 2010).

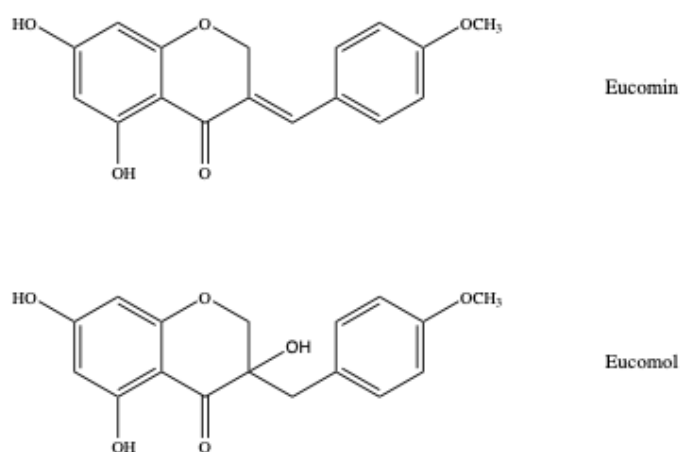


Figura 27. Struttura dell'eucomina e dell'eucomolo, i primi omoisoflavanoidi isolati da *Eucomis bicolor*.

Una classificazione più completa e attualmente accettata è stata proposta da Lin et al. (2014), che distingue cinque tipi di strutture degli omoisoflavanoidi: sappanina (Tipo I), scillascillina (Tipo II), brasilina (Tipo III), caesalpina (Tipo IV) e protosappanina (Tipo V).

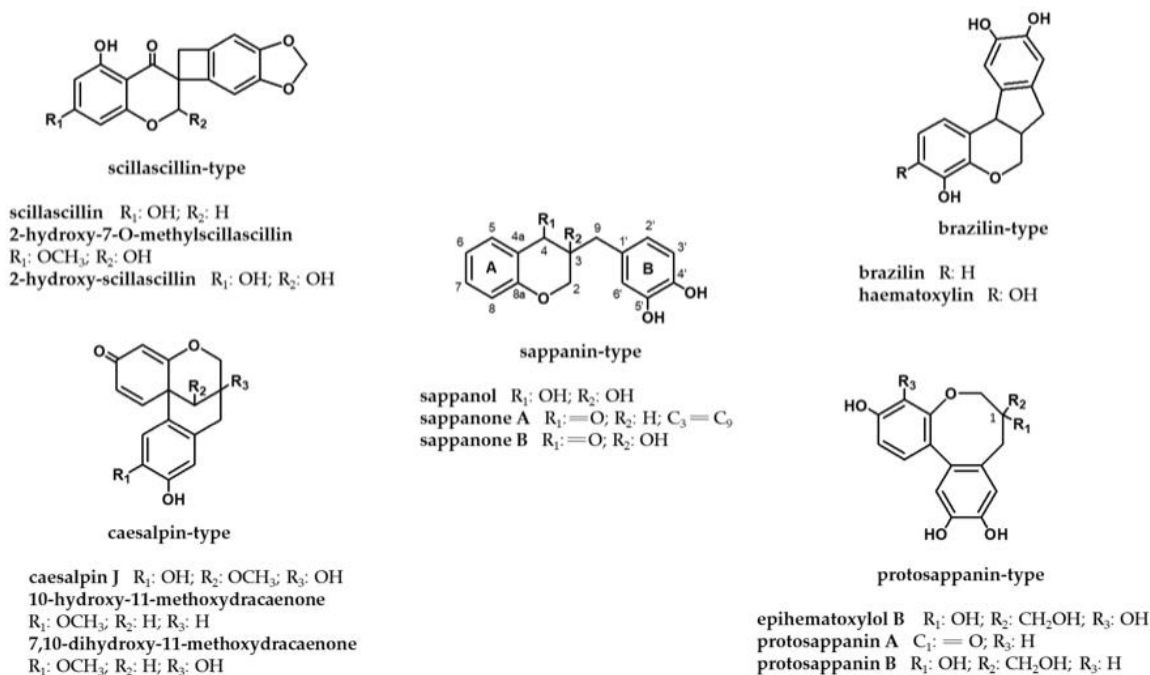


Figura 28. *Classificazione degli omyoflavonoidi con alcuni rappresentanti.*

Questa classificazione tiene conto della variabilità strutturale e dei sostituenti presenti sui diversi tipi di omyoflavonoidi. Nonostante esista una certa uniformità nella numerazione dei sostituenti per i tipi I-IV, per gli omyoflavonoidi protosappaninici (Tipo V) vi sono diverse convenzioni di numerazione che riflettono la complessità e la diversità di questa classe di composti (Nagai et al. 1986; Shu et al. 2011; Wang et al. 2014).

Le ricerche sulle proprietà biologiche degli omyoflavonoidi hanno rivelato attività significative, inclusi effetti antitumorali, antiossidanti, antidiabetici, antinfiammatori, antifungini e antibatterici. Questi composti stanno attirando crescente attenzione nel campo della biomedicina e della farmacologia per il loro potenziale terapeutico. L'approfondimento delle vie biosintetiche e delle strutture chimiche degli omyoflavonoidi continuerà a essere un'importante area di studio, promettendo di rivelare ulteriori dettagli sulla loro funzione e applicazione (Castelli and Lopez, 2017).

1.8 APPLICAZIONI DELLO STUDIO DEI PRODOTTI NATURALI E DEI PRINCIPALI METABOLITI

Le procedure fitochimiche, oggi fondamentali in quasi tutti i campi della scienza botanica, non hanno sempre goduto della stessa rilevanza. Sebbene indispensabili per la ricerca chimica e biochimica, solo negli ultimi trent'anni queste metodologie sono state pienamente integrate nelle discipline più strettamente legate alla biologia. Attualmente, settori come la

sistemica, la fitogeografia, l'ecologia e la paleobotanica, che in passato operavano in modo indipendente, si affidano sempre più alle analisi fitochimiche per risolvere problemi complessi e per ottenere una comprensione più profonda dei fenomeni studiati.

L'importanza di queste tecniche non si limita alla chimica o alla biochimica. Anche in ambiti applicativi come l'agricoltura, la nutrizione, l'industria alimentare e la ricerca farmaceutica, le procedure fitochimiche sono diventate strumenti consolidati e insostituibili. Tuttavia, il loro valore si estende anche a settori più fondamentali delle scienze vegetali, che ne traggono vantaggi significativi, migliorando la comprensione e la gestione delle risorse naturali. Alla luce di ciò, è evidente che il loro utilizzo continuerà a espandersi, contribuendo in modo crescente al progresso delle scienze botaniche e a una più efficiente applicazione delle conoscenze in ambito agricolo e industriale (Hostettmann and Marston, 2002).

1.8.1 Chemotassonomia e Biodiversità

1.8.1.1 Chemotassonomia

La chemotassonomia, o sistematica biochimica, è una disciplina che si colloca tra chimica e tassonomia, focalizzandosi sull'analisi chimica di piante e altri organismi viventi. Questa branca della scienza esamina in particolare i metaboliti secondari e le macromolecole, come flavonoidi, alcaloidi, terpeni e composti contenenti zolfo, per classificare e differenziare le specie. L'idea centrale alla base della chemotassonomia è che la distribuzione e la composizione dei metaboliti possano riflettere le relazioni filogenetiche tra le specie, offrendo così strumenti per risolvere questioni tassonomiche che non possono essere chiarite solo attraverso l'analisi morfologica.

La chemotassonomia si fonda sul presupposto che specie con legami evolutivi condivisi tendano a produrre metaboliti chimici simili. Questo perché, attraverso l'evoluzione, le specie imparentate sviluppano percorsi biochimici comparabili. Di conseguenza, l'analisi dei metaboliti secondari non solo aiuta a chiarire le affinità tra gruppi tassonomici, ma a fornire anche un'ulteriore dimensione per identificare e classificare le specie. Grazie all'uso di tecniche sofisticate per l'estrazione e la caratterizzazione di queste sostanze, la chemotassonomia si dimostra particolarmente preziosa quando le differenze morfologiche tra le specie sono minime o difficili da interpretare.

Un aspetto rilevante della chemotassonomia è il suo contributo alla conservazione della biodiversità. Offrendo una classificazione più accurata e una comprensione più profonda delle relazioni tra le specie, questa disciplina guida gli sforzi di conservazione, assicurando

il riconoscimento e la protezione delle specie sulla base delle loro caratteristiche chimiche uniche.

In conclusione, la chemotassonomia rappresenta una potente integrazione della chimica nella sistematica, migliorando la comprensione e classificazione della biodiversità vegetale. La sua applicazione pratica non solo arricchisce le conoscenze scientifiche, ma supporta anche la conservazione delle risorse naturali e lo sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici (Soltis et al. 1992).



Figura 29. Due esemplari di *Paeonia mascula subsp. russoi*.

1.8.1.2 Biodiversità

La biodiversità vegetale è un concetto complesso che va ben oltre il semplice conteggio delle specie presenti in un ecosistema. Tradizionalmente, si definisce biodiversità come la varietà di specie che abitano un determinato ambiente. Tuttavia, questa definizione si arricchisce e si complica quando si considerano le dimensioni molecolari ed ecologiche della biodiversità, soprattutto nel contesto delle piante.

- **A livello molecolare:** La biodiversità a livello molecolare si riferisce alla varietà di metaboliti secondari prodotti dalle piante. Questi composti non solo conferiscono caratteristiche uniche a ciascuna specie, ma riflettono anche relazioni evolutive complesse. Gli sviluppi nelle tecniche analitiche hanno permesso di scoprire che metaboliti chimici un tempo ritenuti esclusivi di gruppi tassonomici specifici possono essere trovati in organismi molto diversi tra loro. Questo fenomeno ha messo in luce la presenza di enzimi multifunzionali che sono capaci di produrre una vasta

gamma di metaboliti, suggerendo una notevole plasticità evolutiva e adattativa delle piante (Pietra 1995; Kushiro et al. 1999). L'analisi chimica dettagliata può rivelare connessioni evolutive che le tecniche genetiche attuali non sono ancora in grado di identificare completamente (Guella et al. 1997). Nonostante l'attenzione crescente verso altre aree scientifiche, come l'ecologia, l'alfa tassonomia rimane insufficiente. Solo una frazione delle specie esistenti è stata descritta, limitando significativamente la nostra comprensione della biodiversità vegetale (Winston et al. 2000).

- **A livello ecologico:** L'analisi della biodiversità a livello ecologico considera la distribuzione dei metaboliti secondari in relazione agli scheletri molecolari e alla loro diffusione geografica. È essenziale scegliere tra una distribuzione globale-tassonomica e una distribuzione locale-geografica. La distribuzione locale tende a fornire una visione più accurata delle dinamiche ecologiche, riflettendo meglio le peculiarità ambientali e climatiche che influenzano la produzione di metaboliti (Rodríguez et al. 2000). Specie rare o introdotte in nuovi ambienti climatici possono produrre metaboliti secondari particolarmente insoliti. In passato, la classificazione vegetale era spesso basata anche sulla famiglia tassonomica, ma con l'evoluzione delle tecniche analitiche, l'ordine tassonomico è diventato il livello più significativo per comprendere la distribuzione dei prodotti naturali. Questo approccio permette di identificare metaboliti unici che possono essere cruciali per l'ecologia e la conservazione delle specie.

La biodiversità, vista attraverso la lente molecolare ed ecologica, offre una prospettiva complessa e dettagliata sulle dinamiche di crescita e adattamento delle piante. La comprensione dei metaboliti secondari e della loro distribuzione non solo arricchisce il nostro sapere scientifico, ma ha anche importanti implicazioni per la conservazione e la gestione delle risorse naturali. L'approccio che integra la chimica e l'ecologia consente una valutazione più completa delle relazioni tra le specie e i loro ambienti, evidenziando l'importanza di una biodiversità chimica per la sostenibilità degli ecosistemi e la scoperta di nuove risorse naturali.

1.8.1.3 Biodiversità della Sicilia

La Sicilia, con i suoi quasi 26.000 km² di superficie, è l'isola più grande del Mediterraneo e la regione più estesa d'Italia. Questo vasto territorio, prevalentemente montuoso e collinare, è un mosaico di paesaggi diversi, che ospitano una straordinaria ricchezza floristica. La particolare posizione geografica, la complessa storia geologica e la varietà climatica hanno

conferito alla Sicilia un ruolo di primo piano nel panorama della biodiversità mediterranea, rendendola un luogo di grande interesse per studiosi e viaggiatori fin dai tempi più antichi. Sin dall'epoca prelinneana, illustri botanici come Silvio Boccone e Francesco Cupani hanno dedicato le loro ricerche alla flora siciliana, sfruttando i centri di studio situati spesso in edifici religiosi. Oggi, grazie anche al lavoro di questi pionieri, sappiamo che la flora vascolare dell'isola conta circa 2.700 taxa, inclusi endemismi unici e specie rare di rilevanza biogeografica. Questa diversità è particolarmente evidente nelle aree montuose, come i rilievi dei Peloritani, dei Nebrodi e delle Madonie, che rappresentano il prolungamento dell'Appennino Calabro, e sull'Etna, il vulcano attivo più alto d'Europa.

La flora siciliana riflette la grande varietà di substrati geologici, dalle argille mioceniche delle colline centrali e meridionali alle lave basaltiche dell'Etna. Questa complessità del suolo, unita alla varietà di microclimi presenti sull'isola, ha favorito lo sviluppo di un ricco patrimonio vegetale, caratterizzato da una notevole quantità di specie endemiche. Questi endemismi, che rappresentano un importante elemento di peculiarità della flora sicula, sono testimonianza di antichi collegamenti geografici con le regioni circostanti del Mediterraneo, intensificatisi nel corso delle ultime ere geologiche.

In sintesi, la Sicilia rappresenta un vero e proprio scrigno di biodiversità floristica, frutto di una lunga storia geologica e di un'incredibile varietà ambientale (Lojacono Pojero 1907).



Figura 30. *Erica sicula*, specie endemica siciliana.

1.8.1.4 Biodiversità del Sudafrica

Il Sudafrica, con una superficie di oltre 1,2 milioni di km², è riconosciuto a livello mondiale come una delle nazioni con la maggiore varietà di forme di vita, classificandosi al sesto posto per biodiversità. Questo territorio sterminato, caratterizzato da una vasta gamma di paesaggi che spaziano dalle montagne alle coste oceaniche, ospita una flora eccezionalmente ricca. La sua collocazione geografica, unita alla complessa evoluzione geologica e alla molteplicità di climi, ha reso il Sudafrica un punto di riferimento fondamentale per studiosi e amanti della natura.

Tre aree di rilevanza globale per la biodiversità si trovano in Sudafrica: la Regione Floristica del Capo, il Succulent Karoo e la regione Maputaland-Pondoland-Albany. La Regione Floristica del Capo, pur essendo la più piccola tra le regioni floristiche mondiali, vanta oltre 9.000 specie vegetali, delle quali circa il 70% è endemico, come le celebri *Proteae* e le *Ericae*. Questa regione, riconosciuta come Patrimonio dell'Umanità dall'UNESCO, è caratterizzata dal *fynbos*, una vegetazione arbustiva unica al mondo. Il Succulent Karoo, invece, è celebre per la straordinaria varietà di piante succulente, come le aloe e l'iconico albero faretra (*Aloe dichotoma*), adattate ai climi aridi.

La vegetazione sudafricana riflette la straordinaria varietà di suoli e condizioni climatiche che caratterizzano il paese. Dalle coste umide alle regioni desertiche, passando per le savane e le montagne, ogni ambiente ospita un patrimonio botanico unico. Un esempio emblematico è il Parco Nazionale della Table Mountain, che fa parte della Regione Floristica del Capo e accoglie una biodiversità che supera quella di intere nazioni, come la Nuova Zelanda o le isole britanniche.

In conclusione, il Sudafrica rappresenta come la Sicilia un autentico tesoro di biodiversità vegetale, frutto di una lunga storia evolutiva e di una varietà ecologica senza pari. La tutela di questi ecosistemi è di cruciale importanza per garantire la sopravvivenza delle numerose specie endemiche e rare che arricchiscono il patrimonio naturale del paese.

1.8.2 Ricerca sulle Piante Medicinali

Il regno vegetale rappresenta una riserva inestimabile di molecole biologicamente attive, con una lunga storia di utilizzo in medicina. Circa il 10% delle piante vascolari viene impiegato a scopo medicinale, e si stima che ci siano tra 35.000 e 50.000 specie di piante utilizzate per questo scopo (Joppa et al. 2011; Pimm et al. 2014). Centinaia di piante superiori sono oggi coltivate globalmente per ottenere sostanze utilizzate in medicina e farmacia (Kinghorn and Seo, 1996), e molte di queste proprietà terapeutiche sono state fondamentali per lo sviluppo

di farmaci. La ricerca sulle piante medicinali è infatti in continua espansione, con quasi il 50% dei farmaci attualmente in uso derivati da fonti vegetali. Nonostante i progressi compiuti, la ricerca sulle piante medicinali ha esplorato solo una piccola frazione delle piante con potenziale medicinale.

1.8.2.1 Prodotti naturali come antitumorali

Il cancro è una malattia complessa e dinamica, caratterizzata da una notevole eterogeneità cellulare. Questa eterogeneità si manifesta attraverso una vasta gamma di cellule con diverse caratteristiche morfologiche e fenotipiche, tra cui vari pattern di espressione genica, morfologia cellulare, metabolismo, capacità di proliferazione e metastasi (Dagogo-Jack and Shaw, 2017). Le terapie convenzionali, pur essendo ampiamente utilizzate, mostrano un'efficacia variabile a seconda del tipo istologico del tumore e sono spesso associate a significativi effetti collaterali. Di fronte a una morbilità e mortalità ancora elevate, nonostante i progressi della ricerca biomedica, diventa evidente la necessità di strategie terapeutiche più sicure ed efficaci (Azamjah et al. 2019). Questo è particolarmente importante in un contesto in cui molte delle terapie attuali si dimostrano inefficaci e possono causare effetti tossici. Tra le principali sfide nel trattamento del cancro vi sono la presenza di cellule staminali cancerose, la resistenza ai farmaci, la riprogrammazione epigenetica, gli effetti collaterali fuori bersaglio e le metastasi. In questo contesto, si stanno esplorando approcci innovativi per sviluppare strategie anticancro più efficaci e sicure, tra cui terapie mirate, immunoterapia, terapia genica, ablazione tumorale, ipertermia magnetica e l'uso di fitocomposti (Pucci et al. 2019).

Il regno vegetale rappresenta una delle principali risorse per l'isolamento di agenti con attività antitumorale. Attualmente, oltre 3000 specie vegetali sono catalogate per il loro potenziale anti-cancerogeno. A partire dagli anni '60, una ricerca intensiva e sistematica condotta dal National Cancer Institute degli Stati Uniti, insieme a studi di medicina tradizionale e etnofarmacologia, ha portato alla scoperta di numerosi principi naturali con proprietà citotossiche, antiossidanti e immunostimolanti, svelando nuove strutture chimiche e meccanismi d'azione.

Le piante, già riconosciute nei sistemi di medicina tradizionale per il loro ruolo cruciale, continuano a essere fondamentali in molte culture; infatti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che circa l'80% della popolazione in alcuni paesi africani e asiatici si affidi alla medicina tradizionale per le cure primarie. Non sorprende, quindi, che il mercato globale dei prodotti erboristici sia destinato a raggiungere i 5 trilioni di dollari entro il 2050. Questa riscoperta dei rimedi naturali ha contribuito significativamente allo sviluppo di numerosi

farmaci anticancro, fornendo anche una base per la progettazione di nuovi farmaci sicuri e innovativi, grazie alla comprensione delle interazioni sinergiche tra vari costituenti delle erbe anti-cancro. Alcuni esempi noti di farmaci derivati da piante includono gli alcaloidi vinblastina e vincristina, isolati dalla pervinca del Madagascar, che sono usati in oncologia clinica per inibire la polimerizzazione della tubulina e prevenire la formazione del fuso mitotico, portando all'arresto in metafase e all'apoptosi (Hussain et al. 2016).

La storia millenaria dell'uso delle piante come fonte di medicinali e nutrienti offre un vasto repertorio di prodotti naturali capaci di eliminare le cellule anomale risparmiando quelle sane, prevenendo così la tossicità fuori bersaglio tipica delle terapie convenzionali. Tra i fitocomposti di spicco vi sono curcumina, carotenoidi, genisteina, daidzeina, resveratrolo, acido ellagico, punicalagina e silibinina. Questi composti hanno dimostrato in studi in vitro e in vivo di possedere proprietà antinfiammatorie, antiproliferative, antimetastatiche, antivirali, pro-apoptotiche e capacità di scavenging dei radicali liberi (Lee et al. 2013).

La ricerca sui composti naturali come alternativa terapeutica per il cancro ha suscitato notevole interesse, grazie alla loro relativa sicurezza e alla capacità di colpire più bersagli molecolari all'interno delle cellule cancerose. Questi si sono rivelati efficaci contro vari tipi di cancro, compreso quello al seno, agendo attraverso meccanismi differenti come l'induzione dell'apoptosi, l'inibizione della replicazione del DNA, dell'attività telomerasi, della divisione mitotica delle cellule, dell'angiogenesi e della metastasi, oltre a promuovere la differenziazione nelle cellule cancerose (Aung et al. 2017; Hayakawa et al. 2020).

1.8.2.2 Carcinoma mammario

A livello globale, il carcinoma mammario è il tumore più frequentemente diagnosticato e rappresenta la principale causa di morte oncologica tra le donne. Con un'incidenza e un tasso di mortalità in costante aumento, nel 2008 circa 458.400 donne sono decedute a causa di questo tipo di cancro. La complessità biologica del carcinoma mammario, caratterizzata da una significativa eterogeneità, influisce notevolmente sulla risposta ai trattamenti terapeutici. Le forme meno aggressive del carcinoma mammario sono spesso positive ai recettori per gli ormoni estrogeni e progestinici, e rispondono bene alle terapie ormonali che mirano a sopprimere i segnali proliferativi attivati da questi ormoni. Al contrario, le forme triple-negative, che mancano di recettori per estrogeni, progestinici e Her-2, sono particolarmente aggressive e difficili da trattare con le terapie disponibili (Fisher et al. 2013; Waks and Winer, 2019).

La variazione dell'efficacia dei trattamenti tradizionali e dei loro effetti collaterali dipende dal tipo istologico del tumore. I tumori al seno possono essere costituiti da gruppi di cellule

con sensibilità diverse ai trattamenti e caratteristiche molecolari uniche. Pertanto, è cruciale caratterizzare accuratamente ogni sottotipo tumorale per individuare l'approccio terapeutico più appropriato (Mubtasim et al. 2022).

Il trattamento del carcinoma mammario si basa su diversi fattori, come il sottotipo molecolare, le caratteristiche fenotipiche del tumore, lo stadio della malattia e il grado di aggressività. Le terapie convenzionali si suddividono in locali e sistemiche: le prime, che includono chirurgia (mastectomia o lumpectomia) e radioterapia, mirano direttamente alla massa tumorale, mentre le seconde, come chemioterapia, terapia ormonale, immunoterapia e terapie mirate, sono somministrate per via sistemica per colpire le cellule tumorali ovunque nel corpo (Smolarz et al. 2022).

Nonostante la loro efficacia nella distruzione delle cellule tumorali, queste terapie spesso comportano complicazioni significative. La chemioterapia, ad esempio, blocca il ciclo cellulare senza distinguere tra cellule tumorali e sane, causando danni a tessuti come pelle, midollo osseo e tratto gastrointestinale (Chemotherapy Side Effects|American Cancer Society). La chirurgia, sebbene utile, non sempre elimina completamente il tumore e può portare a recidive. La radioterapia può danneggiare le cellule sane e contribuire a nuove condizioni neoplastiche. L'immunoterapia potrebbe innescare malattie autoimmuni a causa dell'iperattivazione delle cellule immunitarie, mentre le terapie mirate possono avere effetti collaterali su cellule normali che condividono caratteristiche con quelle tumorali (Tong et al. 2018).

Un ulteriore problema è rappresentato dalla resistenza ai farmaci e dalla mancanza di sistemi di somministrazione sicuri. L'efficacia delle terapie tradizionali è limitata dalla patologia tumorale, dall'architettura vascolare anomala del tumore e dalla tossicità dei trattamenti stessi (Moulder et al. 2008). Con proiezioni di oltre un milione di decessi e tre milioni di nuovi casi di cancro al seno entro il 2040 (Arnold et al. 2022), diventa cruciale sviluppare trattamenti più efficaci e sicuri.

Negli ultimi anni, è emerso che circa la metà dei casi di carcinoma mammario si verifica nei paesi in via di sviluppo, probabilmente a causa dell'adozione di stili di vita occidentali, come cambiamenti nei comportamenti riproduttivi, nelle abitudini alimentari e nell'esposizione agli estrogeni. In questo contesto, l'identificazione di nuovi composti con attività anti-proliferativa e citotossica, soprattutto per le forme più aggressive del carcinoma mammario, rappresenta un'importante area di ricerca. Tra le alternative terapeutiche emergenti, i composti naturali derivati dalle piante hanno mostrato un'efficacia particolare nella citotossicità contro le cellule tumorali, compresi i tumori del seno e altre neoplasie. Molti farmaci clinicamente stabiliti derivano da prodotti vegetali, e la scoperta di nuovi composti

naturali con potenziale attività antitumorale offre una promettente alternativa ai chemioterapici convenzionali, grazie alla loro selettività, basso costo e minore tossicità (Gollahon et al. 2011).

1.8.3 Altre Applicazioni

La fitochimica ha avuto un impatto significativo sulla comprensione della fisiologia vegetale, in particolare nella caratterizzazione delle strutture chimiche, delle origini biosintetiche e dei meccanismi d'azione degli ormoni naturali di crescita. Grazie alla collaborazione tra fisiologi e fitochimici, sono stati identificati cinque principali classi di regolatori della crescita nelle piante: auxine, citochinine, abscisine, gibberelline ed etilene. Questi composti sono fondamentali per la regolazione di processi come la divisione cellulare, l'allungamento delle cellule, la senescenza e la risposta agli stress ambientali (Horgan 1981).

In ambito patologico, le tecniche fitochimiche sono essenziali per la caratterizzazione delle fitotossine e delle fitoalessine. Le fitotossine, come la licomarasmina e l'acido fusarico, sono prodotte dalle piante in risposta a infezioni batteriche o fungine, mentre le fitoalessine sono metaboliti sintetizzati come difesa contro attacchi microbici. Questi composti sono cruciali nei meccanismi difensivi delle piante contro i patogeni (Durbin et al. 1981).

Nel contesto ecologico, i metaboliti secondari delle piante influenzano le interazioni tra piante, animali e altre piante. Composti come alcaloidi, glicosidi cardiaci, cianogeni e terpeni volatili possono modulare l'interazione ecologica fungendo da attrattivi o repellenti alimentari, alterando l'equilibrio ormonale degli insetti o offrendo difesa contro predatori e parassiti. Inoltre, fenomeni allelopatici, come l'emissione di cineolo e acidi fenolici, inibiscono la crescita di altre piante, influenzando la competizione interspecifica (Putnam and Tang, 1986).

La fitochimica ha anche contribuito alla genetica delle piante, con la caratterizzazione di pigmenti come antocianine, flavonoidi e carotenoidi, che hanno fornito informazioni sui percorsi biosintetici coinvolti nella loro sintesi. L'analisi fitochimica ha anche aiutato a mappare attributi chimici come alcaloidi e terpeni, migliorando la comprensione della loro ereditarietà. Inoltre, la fitochimica ha facilitato la scoperta di piante ibride e l'analisi della variazione genetica nelle popolazioni vegetali, contribuendo al miglioramento delle coltivazioni (Alston 1964; Harborne and Turner, 1984).

1.9 SCOPO DEL LAVORO

Nel corso di questa tesi viene approfondita la conoscenza delle piante endemiche del Mediterraneo, con un'attenzione particolare a quelle originarie della Sicilia. In primo luogo, viene descritto lo studio dei metaboliti secondari delle principali famiglie botaniche presenti in questa regione, con un focus specifico sulla famiglia delle Apiaceae, nota per la sua vasta gamma di composti bioattivi.

La scelta di analizzare le piante endemiche siciliane è giustificata dalla posizione strategica dell'isola e dalla varietà di microclimi, che fanno della Sicilia un autentico hotspot di biodiversità vegetale. Le piante endemiche di questa regione hanno sviluppato metaboliti unici in risposta alle pressioni ambientali locali, rivelando un potenziale significativo per applicazioni farmacologiche.

La tesi include inoltre lo studio di specie endemiche di altre aree ricche di biodiversità, come il Sudafrica, con un focus sulle piante della famiglia Asparagaceae. Questo approfondimento amplia il campo di studio mettendo in luce la diversità chimica e biologica dei metaboliti provenienti da ecosistemi diversi. Di queste piante viene analizzato il contenuto di omoisoflavonoidi, composti di grande interesse farmacologico, con particolare riferimento al loro potenziale applicativo nel trattamento di patologie oncologiche.

Un'ulteriore parte della tesi affronta l'analisi dei composti volatili, concentrandosi sugli oli essenziali estratti da piante rare. Questi oli, oltre a contribuire a una classificazione tassonomica più precisa delle specie, vengono valutati per il loro potenziale biologico.

Per quanto riguarda i composti non volatili, l'analisi si concentra sugli estratti di media polarità, dai quali vengono isolati diversi metaboliti. Tra questi, si presta particolare attenzione a potenziali precursori di farmaci antitumorali, con applicazioni specifiche nel trattamento del carcinoma mammario e del cancro al colon. La scelta di concentrarsi su queste patologie è motivata dalla loro elevata incidenza e dalla necessità continua di sviluppare nuove terapie più efficaci e mirate.

Un'ulteriore sezione è dedicata alla relazione struttura-attività dei composti naturali isolati. Il lavoro descrive la preparazione di derivati sintetici, basati sulle strutture originali, con l'obiettivo di ottimizzarne le proprietà biologiche. Un'attenzione particolare è riservata a composti come cumarine, sesquiterpeni e omoisoflavonoidi, noti per la loro rilevanza in farmacologia.

In conclusione, la tesi mette in luce l'importanza di esplorare e catalogare la biodiversità chimica delle piante endemiche siciliane e sudafricane, valorizzandone il potenziale applicativo in ambito medico. La combinazione di studi tassonomici, chimici e biologici evidenzia come tali analisi possano gettare le basi per lo sviluppo di farmaci innovativi,

contribuendo al contempo alla conservazione della biodiversità e alla valorizzazione delle risorse naturali locali. Il lavoro offre così un contributo significativo alla comprensione delle piante mediterranee e sudafricane, aprendo nuove prospettive per la ricerca scientifica e l'innovazione farmaceutica.

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo viene presentato il lavoro sperimentale condotto per l'isolamento e la caratterizzazione chimica e biologica dei metaboliti secondari. La trattazione è organizzata per famiglie botaniche e relativi generi, con un approfondimento particolare sugli endemismi siciliani. Viene analizzato il ruolo dei composti bioattivi come adattamenti alle specifiche pressioni ambientali locali.

Per ogni genere viene condotta un'analisi accurata, accompagnata da un confronto dettagliato con la letteratura, mettendo in relazione le piante studiate con specie affini già descritte.

Un'attenzione particolare è dedicata alla famiglia delle Apiaceae, evidenziando esempi di metaboliti dotati di proprietà farmacologiche rilevanti, e alla famiglia delle Asparagaceae, con un focus sugli omoisoflavonoidi, la loro diversità chimica e le loro applicazioni oncologiche.



Figura 31. Punti di raccolta delle Apiaceae siciliane presentate in questo lavoro.

2.1 APIACEAE

La famiglia delle Apiaceae (Umbelliferae) con 3780 specie distribuite in 444 generi è una delle più importanti famiglie di piante. Distribuite dalle regioni temperate settentrionali fino alle zone montuose e alle aree tropicali (Plants of World Online 2022). Ad essa appartengono un gran numero di piante che vengono utilizzate per scopi diversi tra cui medicina, bevande, spezie, repellenti, coloranti, cosmetici e fragranze. Nonostante la vasta distribuzione

geografica, le piante appartenenti a questa famiglia presentano caratteristiche strutturali omogenee. Tutte le Apiaceae sono piante erbacee aromatiche con steli infossati e foglie alterne, fiori piccoli e infiorescenze a forma di ombrello (Sayed-Ahmad et al. 2017). Si distinguono per i loro sapori e odori intensi, dovuti alla presenza di doti schizogenici che contengono oli essenziali, mucillagini e resine, presenti sia nelle parti aeree (foglie, steli e frutti) sia nelle radici (Berenbaum 1990).

La presenza di diversi metaboliti, tra cui cumarine, flavonoidi, saponine e terpenoidi, permette l'utilizzo di queste piante in diversi settori: alimentare (nutrizione, bevande e spezie), farmaceutico e cosmetico. Inoltre, molte di esse sono utilizzate nella medicina tradizionale per il trattamento di malattie gastrointestinali, riproduttive e respiratorie (Acimovic et al. 2015).

Gli oli essenziali estratti da queste piante, caratterizzati da alta resa e grande variabilità chimica, hanno dimostrato diverse proprietà biologiche. Oltre alle attività antibatteriche (Badalamenti et al. 2022a), antifungine (D'Agostino et al. 2021), antiossidanti (Badalamenti et al. 2020), antinfiammatorie (Badalamenti et al. 2021) e insetticida (Vaglica et al. 2022), il loro potenziale antitumorale è stato molto promettente (Lauricella et al. 2022).

Non meno rilevanti sono gli estratti non volatili, che mostrano anch'essi notevoli attività biologiche. In particolare, le cumarine isolate da alcune Apiaceae hanno evidenziato effetti antitumorali attraverso la modulazione dell'apoptosi e l'inibizione della proliferazione cellulare (Maurya and Dubey, 2024). I flavonoidi, abbondanti negli estratti metanolici e acetoni, hanno dimostrato proprietà antiossidanti e citotossiche su diverse linee cellulari tumorali, incluse quelle del colon e del seno (Rajasekar et al. 2023). Altri metaboliti, come i polisaccaridi e i composti fenolici, contribuiscono con effetti antinfiammatori, immunomodulatori e antimicrobici, ampliando il potenziale applicativo della famiglia delle Apiaceae nel contesto farmacologico.

Sebbene siano stati fatti importanti progressi nella chimica e farmacologia della famiglia delle Apiaceae, le informazioni sugli studi clinici, sul valore nutrizionale e sulla sicurezza non sono sufficienti. Sono necessari studi avanzati per esplorare il meccanismo dei loro effetti citotossici, difatti, molti prodotti sono stati isolati (alcuni dei quali per la prima volta) senza analisi biologiche e senza modifiche ulteriori.

2.1.1 *Ammi* L.

Il genere *Ammi* L. è composto da un piccolo gruppo di piante che fioriscono in estate e prosperano nel Nord Africa, nell'Europa meridionale e nell'Asia sudoccidentale. La tassonomia di questo genere è particolarmente complessa a causa della somiglianza morfologica con altri generi della stessa famiglia. Questa difficoltà è ulteriormente accentuata dalla variabilità intra-specifica e dalla presenza di ibridi naturali, che contribuiscono alla diversità fenotipica all'interno delle popolazioni.

Secondo Euro+Med Plantbase, il genere *Ammi* comprende sei taxa riconosciuti, distinti per le foglie simili a felci e i fiori delicati di colore avorio o crema, organizzati in ombrelle sferiche e raggruppate. Tra questi, *Ammi majus* L. e *Ammi visnaga* (L.) Lam. sono diffusi principalmente nella regione mediterranea (Euro+Med Plantbase 2023). *Ammi procerum* Lowe è stato segnalato a Gran Canaria, anche se la sua origine è incerta. *Ammi huntii* H. C. Watson e *Ammi trifoliatum* (H. C. Watson) Trel., invece, hanno un rilevante valore biogeografico in quanto endemici delle Azzorre, mentre *Ammi crinitum* Guss. è una specie esclusiva della Sicilia (Euro+Med Plantbase 2023; Pignatti et al. 2019).

D'altra parte, Plants of the World Online (POWO) riconosce solo *A. majus*, *A. trifoliatum* e *Ammi seubertianum* (H.C. Watson) Trel. come appartenenti al genere *Ammi*. Secondo questa fonte, *A. crinitum* (denominata *Visnaga crinita* (Guss.) Giardina & Raimondo) e *A. visnaga* (come *Visnaga daucoides* Gaertn.) sarebbero invece parte del genere *Visnaga* Mill. Date le discrepanze nella classificazione, sono necessarie ulteriori indagini chemotassonomiche e genetiche per chiarire la tassonomia di queste specie. L'interesse per queste piante deriva principalmente dall'ampio spettro di fitocomposti presenti e dalle loro notevoli attività biologiche. *Ammi majus* ha storicamente contribuito alla medicina tradizionale in diverse regioni (Batanouny 2005; El-Seedi et al. 2013; Al-Hadhrami et al. 2016), essendo una fonte di furanocumarine, proteine, flavonoidi, terpenoidi e di oli essenziali con diverse attività biologiche (Usmani et al. 2021). Allo stesso modo, *Ammi visnaga* ha trovato ampia applicazione nell'etnomedicina di alcuni territori (Bisset 1994; Hashim et al. 2014), con i suoi usi tradizionali, la presenza di metaboliti e relativa bioattività (Al-Snafi 2013; Khalil et al. 2020; Ahmed et al. 2021).

2.1.1.1 *Ammi crinitum* Guss. e *Ammi visnaga* (L.) Lam.



Figura 32. *Ammi crinitum* e *Ammi visnaga*.

Mentre *A. majus* è stato ampiamente investigato per le sue proprietà medicinali e composizione fitochimica, gli altri taxa del genere sono stati in gran parte trascurati dalla ricerca scientifica. Tra queste specie poco studiate, una delle più rare è *Ammi crinitum* Guss., endemica della Sicilia.

Di *Ammi crinitum* è stato ottenuto mediante idrodistillazione l'olio essenziale delle parti aeree e analizzato tramite GC-MS.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Ammi crinitum* ha prodotto un olio essenziale di colore giallo pallido (**Ac**). In totale sono stati identificati diciotto composti, che costituiscono il 94,9% dei componenti totali. Questi, riportati nella Tabella A1, sono stati classificati in quattro gruppi in base alla loro struttura chimica e determinati tramite gli indici di ritenzione su una colonna polare (DB-Wax). Gli idrocarburi monoterpeneici hanno costituito la classe principale, rappresentando l'81,8% dell'OE, con il sabinene (63,94%) come componente più abbondante. Nella stessa classe è stato rilevato anche un buon quantitativo di γ -terpinene (8,0%). I monoterpenei ossigenati hanno rappresentato la seconda classe più abbondante (4,7%), con il 4-terpineolo (3,7%) come principale componente. Gli idrocarburi sesquiterpenici sono stati presenti in quantità simile (4,8%), con il germacrene D (1,5%) come principale costituente di questa classe.

Di *Ammi visnaga*, noto per la presenza di metaboliti nelle ombrelle e nei frutti, sono invece stati ottenuti mediante idrodistillazione gli oli essenziali da fiori e fusti dell'accessione siciliana. L'idrodistillazione delle parti aeree di *Ammi visnaga* ha prodotto anch'essa un olio essenziale di colore giallo pallido (A ν). Complessivamente, sono stati identificati trentadue composti per ogni singola parte analizzata (94,7% dei componenti totali per i fiori, mentre 92,9% per i fusti), elencati nella Tabella A2, e suddivisi in cinque classi in base alla loro struttura chimica.

Per quanto riguarda i fiori, la classe principale è stata quella dei monoterpeni ossigenati (26,9%), rappresentata quasi totalmente dal linalolo (25,9%), seguita dagli esteri (24,8%) con il 2-metilbutil 2-metilbutanoato (12,9%). Altra classe degna di nota è stata quella dei diterpeni ossigenati (19,3%) con il verticillolo (19,3%) come componente maggioritario di questa classe e secondo più abbondante dell'olio.

Proprio i diterpeni ossigenati sono stati la classe più abbondante dell'OE dei fusti (38,2%), con il verticillolo (38,2%) come componente maggioritario dell'olio essenziale. Degni di nota come per l'OE dei fusti, la presenza di linalolo (9,5%) e 2-metilbutil 2-metilbutanoato (10,4%).

Il confronto con gli oli essenziali di altri due taxa del genere *Ammi*, finora studiati, ha rivelato differenze interessanti. Infatti, l'olio ottenuto dalle parti aeree di un'accessione tedesca di *A. majus*, sebbene ricco di idrocarburi monoterpenici, ha mostrato un profilo completamente diverso, con il mircene (31,4%), il limonene (9,0%) e il β -fellandrene (8,5%) come principali componenti, totalmente assenti nell'olio di A c (Glass 1975). Nessun olio di *A. majus* invece, ha mostrato la presenza di verticillolo.

Studi precedenti su varietà provenienti da Marocco, Tunisia e Algeria hanno mostrato che i principali costituenti degli oli essenziali di *A. visnaga* includono non-terpeni, monoterpeni e piccole quantità di diterpeni e sesquiterpeni, con isoamil-2-metilbutirrato, isoamil-isobutirrato, isobutil-2-metilbutirrato, 2-metilbutil-2-metilbutirrato, 2-metilbutil-isobutirrato e isoamil-isovalerato come principali metaboliti (Satrani et al. 2004; Zrira et al. 2008; Khadhri et al. 2011; Khalfallah et al. 2011; Keddad et al. 2016; Kamal et al. 2022). Tra i monoterpeni, sia ossigenati che idrocarbureici, il principale componente identificato è stato il linalolo, come nell'OE dei fiori di A ν , seguito in quantità minore da timolo, limonene e mircene (Lamiri et al. 2001; Zrira et al. 2008; Khadhri et al. 2011; Khalfallah et al. 2011; Soro et al. 2015; Keddad et al. 2016; Kamal et al. 2022). I risultati riportati in letteratura evidenziano chiaramente che la composizione principale degli oli essenziali di *A. visnaga* dipende molto dagli organi della pianta, dallo stadio di sviluppo, dal clima, dall'altitudine e dalla natura del suolo. In ogni caso, la composizione dell'accessione siciliana di *A. visnaga*

(Av) è risultata completamente diversa da quella di tutti gli altri esemplari studiati e da quella dell'OE di *A. crinitum* (Ac), specie endemica siciliana.

L'analisi fitochimica e tassonomica del genere *Ammi* evidenzia una complessità intrinseca dovuta alla variabilità intra-specifica, alla presenza di ibridi naturali e alle discrepanze tra diverse fonti tassonomiche. I dati raccolti sugli oli essenziali delle specie siciliane *Ammi crinitum* e *Ammi visnaga* offrono nuovi spunti per la caratterizzazione chimica di questo genere, mostrando profili distinti sia rispetto alle accessioni geograficamente diverse che all'interno delle stesse specie.

In particolare, l'endemica *A. crinitum* si distingue per l'elevata percentuale di sabinene e la mancanza di componenti come il verticillolo, evidenziando la sua unicità. Analogamente, *A. visnaga* dell'accessione siciliana presenta una composizione fitochimica significativamente diversa rispetto agli esemplari di altre regioni, con linalolo e verticillolo come componenti principali, sottolineando il ruolo dell'ambiente e delle condizioni locali nel determinare il contenuto metabolico.

Questi risultati non solo arricchiscono le conoscenze sulle specie di *Ammi*, ma suggeriscono anche potenziali applicazioni biotecnologiche, farmaceutiche e industriali da esplorare ulteriormente mediante studi genetici e chemotassonomici.

2.1.2 *Bifora* Hoffm.

Bifora Hoffm. è un genere cosmopolita di piante da fiore appartenente alla famiglia delle Apiaceae, all'interno della tribù delle Coriandreae (Terentieva et al. 2015). Questo genere è caratterizzato da una distribuzione disgiunta e comprende tre specie: due euroasiatiche (*Bifora radians* M. Bieb. e *Bifora testiculata* (L.) Spreng.) e una americana (*Bifora americana* (DC.) A. Gray) (POWO).

La prima specie, *Bifora radians*, è stata tradizionalmente utilizzata come spezia fin dall'antichità (Ozdemir and Alpınar, 2010) ed è ora riconosciuta per il suo ampio spettro di attività biologiche. Gli estratti delle varie parti aeree di questa pianta sono stati studiati per la loro attività antiossidante, il contenuto fenolico totale (Köroğlu et al. 2012) e le proprietà antimicrobiche contro *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Ozcelik et al. 2004). Gli estratti delle foglie di *B. radians* sono anche noti per la loro elevata attività insetticida contro parassiti come la cimice delle piante di latte, le zanzare, la dorifora della patata e la tignola dell'uva (Gokce et al. 2006; Karakoc and Gokce, 2012; Alkan et al. 2015).

Per quanto riguarda gli oli essenziali di *B. radians*, ricchi in aldeidi (Latrasse et al. 1991; Başer et al. 1998), studi hanno dimostrato le loro diverse attività biologiche tra cui, i loro

effetti antibatterici contro *Paenibacillus larvae* e le proprietà insetticide contro gli afidi delle rape adulti (Sampson et al. 2005; Ozkirim et al. 2012).

Non esistono informazioni disponibili sulla composizione chimica e l'attività biologica delle altre due specie del genere (*B. americana* e *B. testiculata*), tranne per uno studio di Evergetis che ha riportato la composizione chimica degli oli essenziali di un'accessione greca di *B. testiculata*, suggerendo questa pianta come una potenziale fonte di sostanze chimiche pregiate, in particolare aldeidi (Evergetis et al. 2015).

2.1.2.1 *Bifora testiculata* (L.) Spreng.



Figura 33. *Bifora testiculata*.

Data l'estesa attività biologica di *Bifora radians* e la scarsità di conoscenze riguardo alle altre due specie, è stata intrapresa un'indagine sulla composizione chimica dell'OE e sull'attività antitumorale dell'accessione siciliana di *Bifora testiculata* e del suo componente principale contro tre diverse linee cellulari tumorali.

L'olio essenziale di *Bifora testiculata* (**Bt**) estratto dalle parti aeree (fiori, steli, foglie) è risultato avere un colore giallo paglierino. Complessivamente, sono stati identificati ventisei composti, rappresentanti il 91,81% della composizione totale. La classe principale, che costituisce quasi tutto l'olio essenziale, è stata quella delle aldeidi (86,10%), con il *trans*-2-dodecenale come composto principale (67,49%). Altre aldeidi presenti in quantità significative sono risultate essere il *cis*-2-decenale (3,25%), il *trans*-4-undecenale (3,38%), il dodecanale (4,50%) e il *cis*-2-dodecenale (2,91%). La composizione è risultata essere differente dagli oli essenziali di *B. radians* ricchi prevalentemente di *trans*-2-tridecenale (variabile tra il 47-66%) e *trans*-2-tetradecenale (14-23%) (Latrasse et al. 1991; Başer et al.

1998). Rimane comunque alta la percentuale di aldeidi presenti negli OE di entrambe le specie.

Interessante è il fatto che l'OE dell'accessione greca di *B. testiculata*, pur presentando anch'esso aldeidi a catena più lunga, ha condiviso similarità con il campione raccolto in Sicilia, avendo il *trans*-2-dodecenale come composto principale, sebbene in quantità inferiore (56,3%) (Evergetis et al. 2015).

2.1.2.2 *Bifora testiculata*: Attività Citotossica

Il *trans*-2-dodecenale, è risultato essere presente anche in altri oli essenziali di Apiaceae, come quello di *Eryngium foetidum* (Forbes et al. 2013), ed è stato precedentemente studiato per le sue proprietà antitumorali, mostrando risultati promettenti. Per tale motivo, mediante saggio MTT è stato deciso di valutare l'effetto sia dell'OE che del *trans*-2-dodecenale contro tre diverse linee cellulari tumorali: la linea di carcinoma mammario (MDA-MB-231), la linea di melanoma maligno (A375) e la linea di adenocarcinoma del colon (CaCo2). I valori di IC₅₀ sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella 1. Attività citotossica OE *Bifora Testiculata* e *trans*-2-dodecenale.

| | Cell line (IC ₅₀ µg/ml) ^a | | |
|---------------------------------|---|-------------------|--------------------|
| | MDA-MB 231 ^b | A375 ^c | CaCo2 ^d |
| <i>B. testiculata</i> EO | 10.46 | 7.93 | 14.41 |
| <i>trans</i>-2-Dodecenal | 2.66 | 5.29 | 4.74 |
| Cisplatin | 3.45 | 0.55 | 3.28 |

^a IC₅₀ = The concentration of compound that affords a 50% reduction in cell growth (after 72 h of incubation).

^b Human breast adenocarcinoma cell line. ^c Human malignant melanoma cell line. ^d Human colon adenocarcinoma cell line.

Mentre **Bt** ha mostrato risultati abbastanza promettenti, il *trans*-2-dodecenale ha avuto prestazioni superiori, in particolare sulla linea di carcinoma mammario (MDA-MB-231), con un valore di IC₅₀ di 2,66 µg/ml, superando il controllo positivo con cisplatino.

Questi risultati evidenziano il potenziale dell'olio essenziale della *Bifora testiculata* siciliana, come fonte di nuovi agenti anticancro.

L'indagine sulla composizione chimica e sull'attività biologica dell'olio essenziale di *Bifora testiculata* ha permesso di evidenziare il ruolo chiave del *trans*-2-dodecenale come composto principale, differenziandosi sia dagli oli essenziali di *Bifora radians* che dalle accessioni di *B. testiculata* di altre regioni. La superiorità dell'accessione siciliana in termini di

concentrazione di aldeidi suggerisce un significativo potenziale di questa specie per applicazioni biotecnologiche e farmaceutiche.

L'attività antitumorale del *trans*-2-dodecenale, superiore al controllo positivo cisplatino, rappresenta un risultato particolarmente promettente, soprattutto contro il carcinoma mammario. Questi dati arricchiscono le conoscenze sul genere *Bifora*, dimostrando che accessioni locali possono costituire una fonte di composti bioattivi unici, analogamente a quanto osservato nel genere *Ammi*.

L'insieme delle evidenze sottolinea l'importanza di proseguire con studi approfonditi, combinando approcci chimici, biologici e genetici per valorizzare ulteriormente il potenziale di piante sottoutilizzate, sia per scopi terapeutici sia per applicazioni industriali.

2.1.3 *Cachrys* L.

Il genere *Cachrys* L., descritto inizialmente da Linneo, è un genere monotipico appartenente alla famiglia delle Apiaceae. La storia della sua nomenclatura è piuttosto complessa, poiché è condivisa con altri due generi: *Hippomarathrum* Link non P.G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., e *Prangos* Lindl., con delimitazioni vaghe e spesso contraddittorie a seconda degli autori. Alcuni studiosi, come Boissier nel 1872, Drude nel 1898, Fiori nel 1925, e più recentemente Fedchenko nel 1950 e Mouterde nel 1970 (Gruenberg-Fertig et al. 1973), hanno identificato e separato i tre generi come entità distinte.

Il genere *Cachrys* è distribuito in Nord Africa (ad eccezione dell'Egitto), Europa meridionale, Balcani, Turchia, Iran e Caucaso. Attualmente, secondo WFO (2024), solo undici specie sono riconosciute come accettate.

Nel "*De Materia Medica*", uno dei testi storici più influenti sull'uso dei farmaci a base di erbe, si riportano diverse proprietà farmacologiche per *Cachrys libanotis* L. (*Cachri*).

Infatti, l'erba, i semi e le radici di questa specie erano utilizzati per problemi gastrici, ginecologici, urologici, respiratori, muscolari, e per malattie dermatologiche e oftalmologiche (Staub 2017). Nel nord del Marocco, dove è conosciuta come "*Chebchaba*", le radici fresche di *C. libanotis*, tritate e mescolate con olio, venivano usate per preparare un unguento, applicato con massaggi nel trattamento dei reumatismi. (Bellakhdar 1997; Zahrae Redouan et al. 2020). Nell'Anatolia orientale, invece, *Cachrys microcarpus* (sin. *H. microcarpum*), conosciuta come "*Çakşır otu*", è una delle piante utilizzate nella preparazione del famoso formaggio erborinato di Van (Tunçtürk et al. 2011; Tunçtürk and Özgökçe, 2015).

Gli estratti delle parti aeree e delle radici delle specie di *Cachrys* hanno dimostrato di contenere diversi metaboliti non volatili come cumarine, flavonoidi, acidi carbossilici e altri

metaboliti, la cui presenza e le proprietà biologiche sono state recentemente oggetto di revisione (Musolino et al. 2023).

Sono stati pubblicati diversi studi sulla composizione degli oli essenziali di alcuni taxa, ma solo un numero limitato di ricerche riguarda la composizione degli oli essenziali delle parti aeree ottenute per idrodistillazione (Başer et al. 2000a; Özer et al. 2007; Khalilzadeh et al. 2007; Bouderdara et al. 2011; Matejić et al. 2012; Evergetis et al. 2015; Karakaya et al. 2019; Tahar et al. 2022; Maresca et al. 2023).

2.1.3.1 *Cachrys pungens* Jan ex Guss. e *Cachrys cristata* DC.



Figura 34. *Cachrys cristata*.



Figura 35. *Cachrys pungens*.

In Sicilia (Italia), sono presenti quattro taxa: *Cachrys libanotis* L., *Cachrys sicula* L., *Cachrys cristata* DC., e *Cachrys pungens* Jan ex Guss. (Euro+Med PlantBase 2024). Le informazioni disponibili in letteratura su *Cachrys pungens* sono scarse, mentre per quanto

riguarda *Cachrys cristata* non vi è nessun report sull'accessione Siciliana, pertanto è stata avviata un'indagine sulle loro composizioni fitochimiche.

L'idrodistillazione delle parti aeree fresche di *Cachrys pungens* ha prodotto un olio di colore giallo pallido (**Cp**). In totale, sono stati identificati quarantotto composti nell'olio di **Cp**, rappresentando il 98,74% dei componenti totali. I componenti sono elencati in Tabella A4, classificati in base agli indici di ritenzione su una colonna DB-5MS e suddivisi in cinque classi.

Cp è risultato avere principalmente idrocarburi monoterpenici (67,1%), con β -cis-ocimene (13,55%), sabinene (12,57%) e γ -terpinene (10,56%) come metaboliti più abbondanti sia della classe che dell'intero OE. Tra i monoterpeni ossigenati (14,76%), l'isotimolo metil etere è risultato essere il principale componente (9,00%). Per quanto riguarda i sesquiterpeni (7,30%), solo β -eudesmolo (1,95%) e germacrene D (1,83%) meritano menzione.

L'idrodistillazione delle parti aeree fresche di *Cachrys cristata* ha prodotto anch'esso un olio di colore giallo pallido (**Cc**). In totale, sono stati identificati dieci composti in **Cc**, rappresentando il 97,62% dei componenti totali.

Nonostante la composizione percentuale delle classi sia molto simile a quella di **Cp** (vedasi ad esempio gli idrocarburi monoterpenici al 67,53%), la composizione reale è apparsa abbastanza differente avendo come metaboliti principali di questa classe β -myrcene (45,34%), *allo*-ocimene (10,90%) e α -Pinene (7,32%), assenti o presenti in minor quantità in **Cp**.

Altro metabolita degno di nota nella composizione di **Cc** è stato la mesitaldeide (23,47%), assente in **Cp** e in tutti gli altri oli essenziali del genere *Cachrys*, eleggendo tale metabolita come possibile marker della specie.

In relazione alla composizione degli oli essenziali ottenuti dalle parti aeree di specie di *Cachrys* provenienti da diverse aree geografiche, sono stati pubblicati diversi articoli che riguardano sei taxa differenti. La Tabella A5 riporta le composizioni degli oli essenziali dei taxa studiati fino ad ora. Gli oli essenziali, ottenuti tramite idrodistillazione, hanno mostrato profili piuttosto differenti.

Entrambe le accessioni di *C. sicula*, provenienti da Algeria e Spagna, hanno mostrato un'alta concentrazione di idrocarburi monoterpenici (95,6%-74,8%), simile a **Cp** e **Cc**: i principali costituenti delle piante algerine erano isomeri del pinene (29,3%), sabinene (17,8%) e mircene (12,0%) (Tahar et al. 2022), mentre le piante spagnole si sono dimostrate ricche di

γ -terpinene, *p*-cimene, sabinene e α -pinene (Palá-Paúl et al. 2002). Nei metaboliti principali è dunque apparso più simile a **Cp** piuttosto che **Cc**.

Al contrario, gli oli essenziali di *C. microcarpos* provenienti da Turchia (Özer et al. 2007; Karakaya et al. 2019) e Iran (Sefidkon and Shaabani, 2003; Khalilzadeh et al. 2007) sono stati caratterizzati da elevate quantità di sesquiterpeni, con *trans*- β -cariofillene tra i principali costituenti. Quest'ultimo (25,6%) insieme all'ossido di cariofillene (9,4%) sono emersi come i principali metaboliti dell'OE di *C. boissieri* raccolto in Turchia (Başer et al. 2000a).

I risultati sulla composizione degli oli essenziali di *C. cristata* provenienti da Grecia, Serbia, Turchia e Creta hanno mostrato dati particolari. Infatti, le accessioni cretesi si sono rivelate particolarmente ricche di β -mircene (54,2-45,3%) come **Cp**, ma praticamente privi di terpenoidi ossigenati (Evergetis et al. 2015; Maresca et al. 2023). L'OE delle piante raccolte in Grecia ha mostrato una ricchezza in idrocarburi monoterpenici (oltre l'80%) (Koutsaviti et al. 2015), a discapito però di un contenuto di β -mircene piuttosto basso (3,0%), con β -cis-ocimene (44,2%) e δ -3-carene (8,7%) come costituenti principali. Un profilo completamente diverso è stato riportato per l'olio dell'accessione serba di *C. cristata* (Matejić et al. 2012), totalmente privo di idrocarburi monoterpenici e ricco di sesquiterpeni (78,6%).

Dal confronto con la letteratura è stato possibile trovare delle similitudini tra **Cp** e gli oli essenziali di *C. sicula*, e tra **Cc** e l'accessione cretese di *C. cristata*. Sebbene siano emerse alcune differenze nei profili chimici, queste somiglianze suggeriscono la possibilità di un percorso evolutivo comune tra queste specie. Questo percorso potrebbe essere stato influenzato da fattori ambientali e geografici specifici delle regioni di crescita, che hanno contribuito a modellare le caratteristiche chimiche distintive di ciascun olio essenziale. Ulteriori studi filogenetici e biogeografici potrebbero approfondire la comprensione delle relazioni evolutive tra queste specie e chiarire come queste differenze chimiche si siano sviluppate nel tempo.

2.1.4 *Crithmum* L.

Il genere *Crithmum*, appartenente alla famiglia delle Apiaceae, è noto soprattutto per la specie *Crithmum maritimum*, comunemente chiamata finocchio marino o finocchio di mare. *Crithmum maritimum* L. è una pianta alofita perenne, commestibile, che cresce prevalentemente in aree costiere rocciose, moli, e, raramente, su spiagge sabbiose. Si trova lungo tutta la costa mediterranea ed è particolarmente diffusa in Paesi come Francia, Turchia, Tunisia, Italia, Croazia, Grecia e Spagna, oltre che sulla costa atlantica del Portogallo (Atia et al. 2011; POWO 2024).

Il finocchio di mare ha un aroma e un sapore simili al finocchio ed è utilizzato in cucina come erba aromatica, oltre ad essere impiegato in medicina tradizionale e cosmetici. Le sue applicazioni medicinali variano in base alla parte utilizzata della pianta: le parti aeree sono impiegate sotto forma di infusi, decotti e succhi per prevenire o alleviare disturbi gastrointestinali, infiammazioni, malattie della pelle, infezioni e problemi epatici e genitourinari (Renna 2018; Zafeiropoulou et al. 2021).

Le proprietà benefiche del finocchio marino sono riconosciute anche dal Ministero della Salute italiano, il che lo rende un alimento interessante (Piatti et al. 2023).

Questa pianta, che prospera in condizioni di scarsa disponibilità idrica, bassa fertilità del suolo e alta salinità, rappresenta una risorsa sostenibile nelle condizioni mediterranee, dove tali limitazioni sono esacerbate dalla crisi climatica.

Sono stati condotti diversi studi sugli estratti e sugli oli di *C. maritimum*, dimostrando il loro potenziale culinario e terapeutico. L'olio fisso estratto dai semi di finocchio di mare è composto principalmente da acido oleico, linoleico e palmitico, ed è paragonabile a oli di alta qualità come quello d'oliva. Gli estratti idro-etanolici delle foglie mostrano un ricco profilo fitochimico, con una varietà di polifenoli solubili, tra cui il cirsioliolo, un flavonolo identificato per la prima volta in questa specie. L'olio essenziale, ricco di composti bioattivi, è stato trovato avere diverse proprietà antibatteriche, antiossidanti, insetticide, antitumorali e anti-infiammatorie (Generalić Mekinić et al. 2016; Polatoğlu et al. 2016; Alves-Silva et al. 2020).

2.1.4.1 *Crithmum maritimum* L.



Figura 36. *Crithmum maritimum*.

Sebbene siano già numerosi gli studi che hanno analizzato gli oli essenziali di *C. maritimum*, la conoscenza delle variazioni chimiche legate a specifici habitat rimane incompleta. Per colmare questa lacuna e ampliare il panorama delle informazioni disponibili, sono state analizzate le composizioni chimiche degli oli essenziali di quattro accessioni di *C. maritimum*, mai studiate in precedenza, raccolte in aree geografiche diverse: Isola delle Femmine (Italia, S43), Croazia (S44), Montenegro (S45) e Israele (S46).

Questo studio non solo mira a identificare le caratteristiche chimiche uniche delle accessioni analizzate, ma si propone anche di confrontarle con i dati già esistenti, contribuendo così a una comprensione più globale del potenziale biochimico di questa pianta. L'analisi delle specificità chimiche tra le accessioni offre inoltre l'opportunità di esplorare il ruolo dell'ambiente nella determinazione del profilo chimico, fornendo indizi preziosi per futuri utilizzi sostenibili e sicuri della pianta.

Questa ricerca rappresenta un passo avanti nella valorizzazione delle risorse naturali autoctone e pone le basi per approfondimenti volti a sfruttare le proprietà degli oli essenziali di *C. maritimum* in modo consapevole e rispettoso della biodiversità.

L'olio essenziale ottenuto tramite idrodistillazione delle parti aeree di *Crithmum maritimum* raccolto a Isola delle Femmine (S43) è risultato di colore giallo acceso. Sono stati identificati complessivamente ventitré composti, che rappresentano il 97,6% dei componenti totali, classificati in cinque classi, in base alla loro struttura (Tabella A6). Gli idrocarburi monoterpici rappresentano la classe principale (72,0%), con γ -terpinene (49,0%), *p*-cimene (13,6%) e β -fellandrene (4,1%) come composti predominanti. La seconda classe più abbondante è stata quella dei monoterpini ossigenati (25,4%), in cui il timolo metil etere (24,5%) è stato il principale componente. Le altre classi, come gli idrocarburi sesquiterpici e sesquiterpini ossigenati, sono risultati pressoché assenti.

L'olio essenziale della seconda popolazione raccolta in Croazia (S44) ha mostrato una composizione simile, con ventotto composti identificati che hanno rappresentato il 97,3% dei componenti totali (Tabella A6). Anche in questo caso, gli idrocarburi monoterpici sono stati la classe predominante (95,1%), ma la composizione chimica ha evidenziato differenze significative rispetto al campione S43. In particolare, il limonene è emerso come il composto principale (79,0%), seguito dal β -fellandrene (8,0%), mentre il γ -terpinene ha rappresentato solo l'1,4% della composizione totale.

L'olio essenziale di *C. maritimum* proveniente dal Montenegro (S45) ha evidenziato la presenza di venticinque composti, rappresentando il 97,2% dei componenti totali (Tabella A6). Sebbene simile al campione S44, le percentuali hanno mostrato lievi variazioni. Nel campione S45, gli idrocarburi monoterpenici hanno costituito l'87,8%, con il limonene (50,0%) e il β -fellandrene (28,3%) come principali costituenti. Inoltre, la quantità di γ -terpinene è risultata leggermente superiore (4,0%) rispetto a quella osservata in S44.

L'olio essenziale ottenuto dalle parti aeree di *C. maritimum* raccolte in Israele (S46) ha mostrato ventisei composti, rappresentando il 94,6% del totale (Tabella A6). Come negli altri oli analizzati, gli idrocarburi monoterpenici sono risultati essere la classe dominante (90,6%), con limonene (43,1%), γ -terpinene (27,0%) e α -pinene (15,3%) come principali metaboliti.

Il confronto dei dati analizzati ha evidenziato una buona somiglianza tra i campioni, poiché in tutti i casi gli idrocarburi monoterpenici hanno costituito la classe principale con percentuali piuttosto comparabili. Tuttavia, l'olio di Isola delle Femmine (S43) si è distinto per la predominanza di γ -terpinene, a differenza degli altri campioni in cui il limonene è risultato il composto principale.

Diversi studi hanno riportato la composizione chimica degli oli essenziali di *C. maritimum*. In particolare, i campioni S44 e S45 hanno mostrato un profilo volatile simile a quello di un campione raccolto in Dalmazia, Croazia (S2), caratterizzato da un elevato contenuto di limonene (58,4%) e γ -terpinene (2,8%), ma con una quantità significativa di sabinene (26,5%), assente nei campioni S44 e S45 (Kulišić-Bilušić et al. 2010).

Il campione S46, pur avendo il limonene come composto principale, ha mostrato differenze significative per una maggiore percentuale di γ -terpinene (27,0%) e α -pinene (15,3%), valori simili a quelli di un campione proveniente dalla Grecia (S9), che conteneva il 19,2% di γ -terpinene e il 7,5% di α -pinene (Rossi et al. 2007). Anche in questo caso, il sabinene, presente nel campione greco, è risultato assente nel campione S46.

Il campione S43 ha invece mostrato una composizione simile a quella di un campione raccolto a Sorrento, Italia (S15), in cui γ -terpinene è stato il composto principale (49,0% e 36,6%, rispettivamente), seguito dal timolo metil etere (24,5% e 28,8%) e dal *p*-cimene (13,6% e 9,6%) (Pacias et al. 2021).

Questi dati sottolineano l'importanza di analizzare il profilo chimico degli oli essenziali di *C. maritimum* per comprenderne meglio le variabilità chimiche e i potenziali utilizzi applicativi. Difatti, le differenze osservate tra le diverse popolazioni di *C. maritimum* supportano la teoria che fattori ecologici e genetici possano influire sulla sintesi dei

metaboliti secondari, contribuendo a una variabilità chimica che può essere sfruttata per selezionare le varietà più promettenti per applicazioni commerciali.

2.1.5 *Ferulago* W.D.J. Koch

Il genere *Ferulago* W.D.J. Koch è da lungo tempo noto nella medicina tradizionale, principalmente come rimedio per disturbi gastrointestinali, come l'ulcera. La prima documentazione delle sue proprietà medicinali risale al IV secolo a.C., quando *Ferulago campestris* fu citata nel *Corpus Hippocraticum* di Ippocrate. Tra le varie specie di questo genere, *Ferulago angulata* è quella maggiormente utilizzata nella medicina etnica. In Iran, ad esempio, il suo impiego medicinale è stato ampiamente documentato per trattare dolori digestivi, emorroidi e come tonico, oltre che per le sue proprietà afrodisiache.

Tra la tribù dei curdi che abita nelle regioni di Abdanan e Dehloran, nell'ovest dell'Iran, le foglie di *F. angulata* sono impiegate come spezia, antisettico e per rinfrescare l'aria. In Turchia, i fiori di questa specie sono utilizzati come sedativi e nel trattamento di ulcere, malattie digestive e tumori. Inoltre, sono adoperati come spezia in insalate e, occasionalmente, nella produzione del formaggio alle erbe di Van, dove servono come additivo naturale per prevenire il deterioramento e mantenere il sapore gradevole.

Le specie di *Ferulago* sono state usate fin dall'antichità anche in Turchia per trattare disturbi come vermi intestinali, emorroidi, ulcere, morsi di serpente, malattie della milza e mal di testa. Le gomme estratte dalle incisioni delle radici di alcune specie vengono utilizzate come condimento e carminativo. Nonostante ciò, queste piante sono principalmente conosciute per le loro proprietà afrodisiache e come foraggio, che contribuisce ad incrementare la produttività degli animali.

Le parti aeree e le radici delle specie di *Ferulago* sono state oggetto di numerosi studi fitochimici (Badalamenti et al. 2021). Tra i principali metaboliti non volatili isolati, si trovano flavonoidi, terpenoidi e cumarine, con le cumarine che emergono come metaboliti distintivi di questo genere e responsabili dell'attività antitumorale delle specie di *Ferulago*. Negli ultimi anni, le cumarine hanno mostrato un ampio potenziale terapeutico, in particolare nel campo della terapia oncologica, con meccanismi di azione che includono l'inibizione dell'anidrasi carbonica, il targeting della via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR, l'inibizione della resistenza ai farmaci (MDR) e l'induzione dell'apoptosi (Das et al. 2021; Wang et al. 2021; Zhang et al. 2021).

Inoltre, il genere *Ferulago* si è rivelato altamente produttivo nella produzione di oli essenziali. Questi oli, grazie agli elevati rendimenti, vengono utilizzati per isolare una varietà di composti, come diterpeni, sesquiterpeni, aldeidi e idrocarburi, ed esibiscono notevoli

attività biologiche, tra cui proprietà antibatteriche (Moghaddam et al. 2018), antiossidanti (Badalamenti et al. 2020) e antitumorali (Ben Salem et al. 2016).

2.1.5.1 *Ferulago nodosa* subsp. *Geniculata* (Guss.) Troia e Raimondo: caratterizzazione degli estratti



Figura 37. *Ferulago nodosa* subsp. *geniculata*.

Ferulago nodosa (L.) Boiss. è una specie diffusa nell'area balcanico-tirrenica, presente a Creta, in Grecia, Albania e probabilmente in Macedonia (The World Flora, 2022).

La classificazione della popolazione occidentale disgiunta della Sicilia come sottospecie endemica, *F. nodosa* subsp. *geniculata* (Guss.) Troia e Raimondo, è piuttosto controversa (Ilardi et al. 2023). Finora, la forma dei frutti e la dimensione del polline sono le particolarità morfologiche che caratterizzano l'accessione siciliana. In uno studio precedente sono stati isolati grandivittin, octadeca-9(Z),17-dien-12,14-diyn-1-acetossido-11,16-diolo, esteri ferulolici, 2,3,4-trimetilbenzaldeide, e acido 2,3,4-trimetilbenzoico dalle parti aeree di questa accessione di *F. nodosa* (Badalamenti et al. 2021).

Recentemente, è stata segnalata l'identificazione di un nuovo derivato ferulolico nelle parti aeree dell'accessione siciliana di *F. nodosa* (Badalamenti et al. 2022b), e di conseguenza, è stata decisa l'indagine del profilo fitochimico delle radici della stessa accessione e di testare i prodotti isolati per valutarne il potenziale antiproliferativo.

Il materiale vegetale, raccolto a Noto (SR) nel mese di giugno del 2020, dopo essere stato accuratamente lavato, è stato tagliato a strisce sottili e congelato a -20°C. In seguito, per una settimana, la parte vegetale è stata sottoposta ad un ciclo di liofilizzazione tale da eliminare tutta l'acqua presente.

Il prodotto ottenuto dalla liofilizzazione è stato finemente pestato attraverso un mortaio di ceramica ed estratto con acetone, a temperatura ambiente e al buio. L'operazione di estrazione è stata ripetuta tre volte.

Dopo opportuna filtrazione, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e a temperature inferiori ai 40 °C, ciò allo scopo di evitare che il calore potesse apportare modificazioni alle sostanze termolabili eventualmente presenti.

L'estratto è stato poi sottoposto a cromatografia su colonna usando come fase stazionaria gel di silice disattivato con il 15% di acqua fredda, e come eluente la miscela etere etilico/etere di petrolio in rapporto 7:3-8:2, con percentuali crescenti di etere etilico. Al termine di questa operazione sono state isolate diverse frazioni di cui alcune mostravano su TLC la presenza di prodotti potenzialmente interessanti.

Come sistema di rilevamento, è stato utilizzato il sistema generale anisaldeide/H₂SO₄.

In particolare sono state studiate le frazioni più polari e separate mediante colonna cromatografica con eluente 8:2-7:3 cicloesano/acetato di etile. Sono stati ottenuti prevalentemente due prodotti (**F1**) e (**F2**).

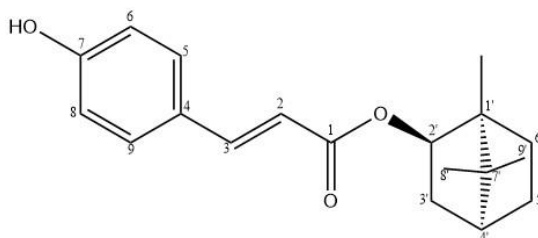


Figura 38. *Pressafonin-A (F1).*

Pressafonin-A (**F1**) [α]₂₆^D -3.9 (CHCl₃, c 0.50) (158 mg) è stata ottenuta come una polvere gialla e ad essa è stata assegnata la formula molecolare C₁₉H₂₄O₃ mediante analisi HPLC-MS (m/z 301.1789 [M + H]⁺). La presenza di un carbonile α,β -insaturo, di un anello aromatico e di un gruppo ossidrilico sono stati confermati mediante assorbimento UV a 228 e 315 nm. Il gruppo carbonilico si presenta sottoforma di unità esterea, da quanto si evince nello spettro carbonico della molecola in questione al segnale a 168.08 ppm. Lo spettro ¹³C-NMR e gli esperimenti bidimensionali indicano che l'unità monoterpénica ((-)-borneol) è legata alla funzione carbonilica di tipo estereo. I carboni del monoterpene sono stati

assegnati a tre unità metiliche a $\delta C = 18.86$ (C-8'), 19.71 (C-9'), 13.54 (C-10'), tre unità metileniche a $\delta C = 28.06$ (C-5'), 27.25 (C-6'), 36.86 (C-6'), due metini a $\delta C = 80.07$ (C-2'), 44.99 (C-4'), e due carboni quaternari a C-1' e C-7'. Lo spettro protonico ha mostrato un'unità *p*-cumarica a $\delta H = 6.33-7.63$ (ognuno per un protone, d, $J = 12.8$ Hz). Le assegnazioni relative alle risonanze spettroscopiche degli spettri protonico e carbonico sono state inoltre confermate dalle analisi bidimensionali DEPT, COSY, HMBC e HSQC. Quindi alla struttura in esame è stata assegnata la formula di un (-)-bornil *p*-cumarato, che viene comunemente chiamato pressafonin-A (Cheng et al. 2010).

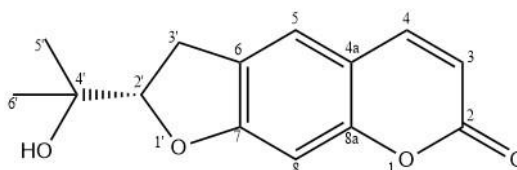


Figura 39. (+)-*Marnesina* (**F2**).

Il prodotto (**F2**) (300 mg) è un solido giallo amorfo con formula molecolare $C_{14}H_{14}O_4$ deducibile dallo spettro di massa a m/z 247.0964 $[M + H]^+$.

Lo spettro 1H -NMR del composto sopra rappresentato mostra segnali caratteristici per una cumarina lineare con anello furanico a cinque termini, caratterizzata dalla presenza di un gruppo ossidrilico in posizione C-4' ($\delta C = 71.69$). In posizione C-4' risultano legati due metili [C-5' ($\delta C = 24.36$) e C-6' ($\delta C = 26.18$)]. Lo scheletro cumarinico è formato da tre anelli condensati, un doppio legame in posizione 3,4 coniugato ad un sistema di tipo estereo ($\delta C_2 = 161.68$ ppm).

La struttura, in accordo con i dati di letteratura (Tetsuhiro et al. 2003) viene indicata con il nome comune di (+)-marnesina, (Figura 39).

2.1.5.2 *Ferulago nodosa* subsp. *geniculata*: Attività citotossica

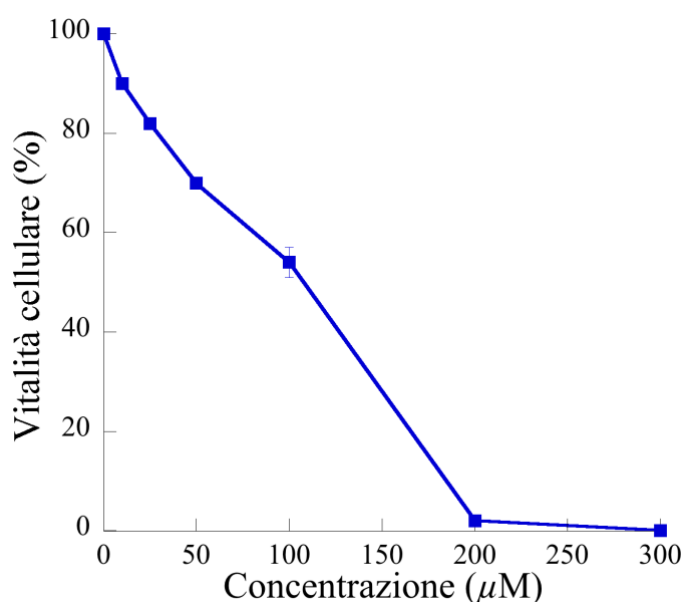


Figura 40. Effetto di F2 sulla vitalità cellulare di HCT116. Le cellule di carcinoma del colon HCT116 sono state incubate in presenza di diverse concentrazioni di F2 per 48 ore come riportato nella Sezione Sperimentale. Successivamente, la percentuale di vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il saggio MTT.

Per valutare gli effetti citotossici di questi ultimi, sono stati eseguiti test di vitalità cellulare MTT su linee cellulari di cancro al colon HCT116. Per questo scopo sono state aggiunte alle cellule diverse dosi di composti (10-300 μM), e l'incubazione è stata protratta per 48 h in presenza dei prodotti prima di procedere con l'analisi di vitalità cellulare. Tra i prodotti ottenuti la (+)-marnesina è risultata essere quella più attiva riducendo la vitalità delle cellule del cancro del colon in maniera dose-dipendente. Infatti, l'effetto compare già con 25 μM , mentre utilizzando dosi di 50 e 100 μM la vitalità residua è risultata rispettivamente del 70% e del 54%. Questo effetto è risultato più evidente a dosi più elevate (200-300 μM).

2.1.6 *Geocaryum* Coss.

I generi *Geocaryum* Coss., *Conopodium* W.D.J. Koch e *Bunium* L., appartenenti alla famiglia delle Apiaceae, sono difficili e complessi da delimitare, essendo distinti solo per lievi differenze legate alla struttura dei frutti (Pignatti et al. 2018). Secondo POWO (2024), il genere *Geocaryum* comprende dieci taxa originari di Grecia, Italia, Sicilia e Jugoslavia, mentre i tredici taxa di *Conopodium* hanno una distribuzione più ampia, che include Belgio, Corsica, Francia, Gran Bretagna, Irlanda, Italia, Norvegia, Portogallo, Spagna e Nord Africa (POWO) (Figura 41). Il genere *Bunium* L. comprende 53 specie. Il nome del genere deriva

dal termine greco *βούβιον* (bounion), che significa "grumo", a causa della tipica grandezza dei suoi tuberi (Mohammadhosseini et al. 2021).

| Species | Synonymous | Distibution | Status |
|--|--|--|--------|
| <i>G. capillifolium</i> (Guss.) Coss. | | Greece, Italy, Sicily, Yugoslavia | acc. |
| <i>G. creticum</i> (Boiss. & Heldr.) Engstrand | | Kriti | unpl. |
| <i>G. cynapioides</i> (Guss.) Engstrand | <i>G. bornmuelleri</i> (H. Wolff) Engstrand; <i>G. tenuifolium</i> (Salzm. ex DC.) Coss.; <i>G. tuberosum</i> (W.D.J.Koch) Engstrand | Albania, Bulgaria, Greece, Italy, Yugoslavia | unpl. |
| <i>G. divaricatum</i> (Boiss. & Orph.) Engstrand | | Greece | acc. |
| <i>G. euboicum</i> (Rech. f.) Engstrand | | Greece | unpl. |
| <i>G. macrocarpum</i> (Boiss. & Spruner) Engstrand | <i>G. cynapioides</i> subsp. <i>macrocarpum</i> (Boiss. & Spruner) Menemen; <i>G. stylosum</i> (Boiss.) Engstrand | Albania, East Aegean Is., Greece, Turkey | unpl. |
| <i>G. parnassicum</i> (Boiss. & Heldr.) Engstrand | | Greece | unpl. |
| <i>G. peloponesiacum</i> Engstrand | | Greece | unpl. |
| <i>G. pindicola</i> (Hauskn.) Engstrand | | Greece | unpl. |
| <i>G. pumilum</i> (Sm.) Nyman | | Greece | acc. |

| Species | Synonymous | Distibution | Status |
|--|---|--|--------|
| <i>C. arvense</i> (Coss.) Calest. | <i>C. denudatum</i> var. <i>ramosum</i> (Costa) Willk. ex Costa; <i>C. majus</i> subsp. <i>ramosum</i> (Costa) Silvestre; <i>C. marcetii</i> M. Hiroe; <i>C. marianum</i> Marcet; <i>C. ramosum</i> Costa | Portugal, Spain | acc. |
| <i>C. baetica</i> Boiss. | | Spain | unpl. |
| <i>C. bunioides</i> (Boiss.) Calest. | | Morocco, Spain | acc. |
| <i>C. bunioides</i> subsp. <i>aranii</i> (López Udias & Mateo) Rivas Mart. | | Spain | acc. |
| <i>C. bunioides</i> subsp. <i>atlantis</i> (Humbert & Maire) Molero | | Morocco | acc. |
| <i>C. bunioides</i> var. <i>gredensis</i> (Pau) López Udias & Mateo | <i>C. butinioides</i> Boiss. & Reut. | Spain | acc. |
| <i>C. glaberrimum</i> (Desf.) Engstrand | | Algeria, Morocco, Tunisia | acc. |
| <i>C. majus</i> (Gouan) Loret | <i>C. daucifolium</i> Rouy & E.G.Camus; <i>C. denudatum</i> (DC.) W.D.J.Koch; <i>C. semipubens</i> Sennen; <i>C. silaifolium</i> Rouy & E.G.Camus | Belgium, Corse, France, Great Britain, Ireland, Italy, Norway, Portugal, Spain | acc. |
| <i>C. majus</i> subsp. <i>marizianum</i> (Samp.) López Udias & Mateo | <i>C. marizianum</i> Samp. | Portugal, Spain | acc. |
| <i>C. marianum</i> Lange | <i>C. elatum</i> Willk.; <i>C. flexuosum</i> M.Hiroe; <i>C.</i> | Algeria, Morocco, Portugal, Spain | acc. |

| | | | |
|--|---|----------------------------------|------|
| <i>C. pyrenaicum</i> (Loisel.) Miégev. | jahandiezii Sennen & Mauricio <i>C. bourgaei</i> Coss.; <i>C. denudatum</i> var. <i>tremedale</i> Pau; <i>C. denudatum</i> var. <i>vaginatatum</i> Rouy & E.G.Camus; <i>C. majus</i> subsp. <i>bourgaei</i> (Coss.) Rivas Goday & Borja; <i>C. majus</i> subsp. <i>mutabile</i> (Miégev.) P. Fourn.; <i>C. majus</i> subsp. <i>richteri</i> (Rouy) P.Fourn.; <i>C. mutabile</i> Miégev.; <i>C. pumilum</i> Nyman; <i>C. richteri</i> Rouy; <i>C. subcarneum</i> Bourg. | France, Morocco, Portugal, Spain | acc. |
| <i>C. subcarneum</i> (Boiss. & Reut.) Boiss. & Reut. | <i>C. brachycarpum</i> Boiss. ex Lange | Portugal, Spain | acc. |
| <i>C. thalictrifolium</i> (Boiss.) Calest. | | Spain | acc. |

acc. = accepted species; unpl. = unpleased species

Figura 41. *Taxa di Geocaryum e Conopodium.*

Gli habitat principali delle specie di *Bunium* includono l'Europa, il Mediterraneo, l'Asia centrale e l'India. Numerosi studi sono stati pubblicati sui metaboliti non volatili delle specie di *Bunium*, riportando diverse classi di composti naturali come acidi grassi, terpenoidi, saponine, cumarine, antrachinoni, tannini, flavonoidi, acidi organici, saccaridi e proteine. La loro presenza, così come l'uso etnobotanico e medicinale delle specie di *Bunium*, sono stati recentemente rivisti (Mohammadhosseini et al. 2021).

Per quanto riguarda l'uso popolare delle specie degli altri due generi, solo *Conopodium majus* (Gouan) Loret (Parada et al. 2011) e *Geocaryum cynapioides* (Guss.) Engstrand (Yeşil et al. 2019) sono stati segnalati come alimentari in Spagna e Turchia, rispettivamente. Non esistono studi sui metaboliti non volatili di alcuna specie di questi due generi.

2.1.6.1 *Geocaryum capillifolium* (Guss.) Coss.



Figura 42. *Geocaryum capillifolium*.

Geocaryum capillifolium (Guss.) Coss., Note Pl. Crit. 113 (1851). [Bas. *Myrrhis capillifolia* Guss.; *Conopodium capillifolium* (Guss.) Boiss.; *Bunium capillifolium* (Guss.) Bertol.] è una pianta erbacea perenne, con una distribuzione legata ai rilievi del Mediterraneo occidentale (W Medit. Mont.), ed è conosciuta nella Penisola Iberica, nelle montagne del nord Algeria, in Grecia e in Italia, dove si trova limitata alle regioni della Toscana, Abruzzo, Molise e Sicilia (Tutin 1981; Pignatti et al. 2018).

Per quanto riguarda la composizione chimica degli oli essenziali, sono stati pubblicati pochi studi su *Geocaryum* e *Conopodium*, mentre le specie del genere *Bunium* sono state oggetto di numerose indagini. Non esiste alcuna ricerca pubblicata sulla composizione dell'olio essenziale dell'accessione siciliana di *G. capillifolium*. Pertanto, nel contesto della ricerca sulle Apiaceae mediterranee si è deciso di investigare la composizione dell'olio essenziale di *G. capillifolium*, raccolto in Sicilia.

L'idrodistillazione delle parti aeree in fiore di *Geocaryum capillifolium*, raccolte nei Monti delle Madonie, in Sicilia, ha prodotto un olio di colore giallo pallido (**Gc**). Complessivamente, sono stati identificati trentasette composti, rappresentanti il 93,0% del totale, elencati in Tabella A8, in base ai loro indici di ritenzione su una colonna DB-5MS e suddivisi in cinque classi secondo la loro struttura chimica.

Gli idrocarburi sesquiterpenici (78,5%) hanno rappresentato la classe principale, con *cis-β-farnesene* (31,2%), *trans-β-cariofillene* (20,0%) e *germacrene D* (8,5%) come principali costituenti.

Gli idrocarburi monoterpenici (4,9%) e i sesquiterpeni ossigenati (5,3%) sono apparsi presenti in quantità simili, con *cis-β-ocimene* (3,2%) e ossido di *cariofillene* (2,2%) come principali delle due classi. I monoterpeni ossigenati (1,0%) sono stati, invece, scarsamente rappresentati.

L'unico altro studio su questa specie ha riguardato una popolazione della Grecia (Evergetis et al. 2009). Questo OE, interessante per la sua azione contro gli insetti (Evergetis et al. 2009; 2012; Chizzola 2010; Ebadollahi 2013; Osanloo et al. 2019), ha mostrato un profilo completamente diverso rispetto a **Gc**. L'olio essenziale è risultato ricco di idrocarburi monoterpenici, con *α-pinene* (37,8%), *sabinene* (29,2%), *p-cimene* (4,6%) e *limonene* (4,1%) come metaboliti principali, e quasi privo di sesquiterpeni, con solo *trans-β-cariofillene* (3,3%) presente in quantità moderate.

D'altra parte, la composizione di **Gc** è stata simile a quella degli oli essenziali di due accessioni di *Geocaryum cynapioides* (Guss.) Engstrand, raccolte in Serbia, dove è stata riportata una grande quantità di derivati del farnesene, come per **Gc**.

Anche l'OE di *Conopodium glaberrimum* (Desf.) Engstrand (sin. *Balansaea glaberrima* Desf. e Lange) dall'Algeria ha mostrato una ricca presenza di idrocarburi sesquiterpenici (50,3%), pur presentando un profilo chimico completamente diverso da **Gc**.

Tra tutti gli oli derivati dalle parti aeree delle specie di *Bunium* studiati finora, solo *B. carioides* (Boiss.) Hausskn. ex Bornm. e *B. elegans* (Fenzl) Freyn (Jassbi et al. 2005), entrambi raccolti in Iran, hanno mostrato una grande quantità di idrocarburi sesquiterpenici, (*trans-β-cariofillene* (26,6% e 38,0%, rispettivamente) e *germacrene D* (22,1% e 24,1%, rispettivamente)], sebbene non siano stati rilevati derivati del farnesene.

Gli altri oli di *Bunium* hanno mostrato o una maggiore quantità di sesquiterpeni ossigenati (principalmente ossido di *cariofillene*), come *B. alpinum* Waldst. & Kit. e *B. ferulaceum* Sm. dall'Algeria (Hayet et al. 2017), e *B. elegans* (Fenzl) Freyn dalla Turchia (Ozturk et al. 2020), oppure una predominanza di idrocarburi monoterpenici, come *B. cylindricum* (Boiss. et hohen.) Drude. (Masoudi et al. 2005), *B. luristanicum* Rech.f. (Sefidkon et al. 2014) e *B. persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. (Jahansooz et al. 2014; Khanavi et al. 2017; Zarrinpashne and Gorji Kandi, 2018).

2.1.7 *Laserpitium L.*

Il genere *Laserpitium* L. comprende circa venti specie erbacee perenni aromatiche. Queste piante sono principalmente endemiche della regione mediterranea e dell'Asia sudoccidentale, sebbene la loro distribuzione si estenda dalle Isole Canarie all'Iran e alla Siberia (Hartvig 1986). Nella *Flora Europaea*, il genere comprende circa quattordici specie, distribuite prevalentemente nelle regioni montuose delle parti meridionali e centrali del continente (Tutin 1968). Una delle specie più conosciute è *Laserpitium siler* L., noto anche come laserpizio o *Siler montanum* Crantz. Si trova nelle pareti rocciose ad un'altitudine di circa 1400 metri nelle zone submeridionali-montane dell'Europa centrale (Nikolic 1973).

Le specie di *Laserpitium* sono caratterizzate dalla presenza di radici fusiformi, che si trasformano in un rizoma corto e ispessito nella parte superiore. Producono piccoli fiori bianchi o rosa e frutti schizocarpici ricchi di oli essenziali (Micevski 2005). Questi frutti e altre parti della pianta sono stati utilizzati nella preparazione di rimedi medicinali tradizionali. Ad esempio, *Laserpitium carduchorum* Hedge & Lamond è utilizzata come spezia e per il trattamento delle infezioni del tratto urinario, mentre le resine gommose derivate dalle radici di *Laserpitium gallicum* L. sono impiegate nella gestione di tumori e verruche (Appendino et al. 1993; Dastan et al. 2016).

Le radici e i rizomi di *Laserpitium latifolium* L., noti come "*Radix Gentianae albae*" (Hegi 1906), e di *Laserpitium siler*, noto come "*raskovnik*" (Randelovic 2000), hanno una notevole storia nella medicina tradizionale, usati per migliorare la digestione e trattare disturbi gastrointestinali, disfunzioni cardiache ed epatiche, tubercolosi e reumatismi (PoPović et al. 2013; Chen et al. 2015). In particolare, le preparazioni amare a base di queste piante sono impiegate anche come tonici per i disturbi del sonno e la depressione grave (Lechner et al. 2006; Bogucka-Kocka et al. 2019). Nei Balcani, le radici fresche di *L. siler* sono state tradizionalmente utilizzate per curare la cataratta e come antidoto per i morsi di serpente (Janackovic et al. 2019). Nella regione alpina, venivano utilizzate per la preparazione di tonici rinfrescanti e rinforzanti, nonché per la produzione di collutori per il trattamento del mal di denti (PoPović et al. 2015a). In Austria e Germania, i frutti di *L. siler* venivano utilizzati come spezia amara per le loro proprietà aromatiche, e l'intera pianta era considerata un ottimo nutrimento per il bestiame (Hegi 1906).

Studi recenti hanno sottolineato le attività citotossiche, antinfiammatorie, antibatteriche e antimicotiche di alcune specie di *Laserpitium* (Chizzola et al. 1999; PoPović et al. 2015a). Estratti di *Laserpitium zernyi* Hayek e *Laserpitium ochridanum* Micevski hanno dimostrato effetti citotossici su linee cellulari di cancro al seno (PoPović et al. 2013).

L'uso esteso delle specie di *Laserpitium* nella medicina erboristica tradizionale ha spinto ad indagini sulla loro composizione chimica e attività biologica.

Per quanto riguarda i composti volatili, le specie del genere *Laserpitium* sono note per l'elevato contenuto di oli essenziali. Questi oli appartengono prevalentemente al chemotipo monoterpenoide, caratterizzato anche da un'alta concentrazione di idrocarburi (Petrović et al. 2009; Tirillini et al. 2009; Mitic et al. 2015). Gli oli essenziali, che sono incolori o blu, contengono spesso elevate concentrazioni di α/β -pinene, sabinene, limonene, terpinen-4-olo, α -bisabololo, viridiflorolo e camazulene (Chizzola et al. 2007; Kapetanos et al. 2008; PoPović et al. 2015b; Mileski et al. 2017).

Gli oli essenziali di *L. siler* subsp. *montanum* e subsp. *siculum* (Spreng.) Santang., F.Conti & Gubellini, raccolti in cinque diverse località geografiche, sono stati sottoposti ad analisi GC-MS e PCA. I risultati hanno rivelato che gli oli della subsp. *siculum* appartengono a un unico chemotipo (perillaldeide/camazulene/sabinene), mentre quelli della subsp. *montanum* appartengono a vari chemotipi (*trans*-anetolo, limonene e sabinene) (Maggi et al. 2017).

L'olio essenziale dai frutti di *L. latifolium* è ricco di pinene e altri idrocarburi monoterpenici ciclici, mentre l'olio essenziale delle radici di questa specie non è ancora stato caratterizzato (Micevski et al. 2005). *Laserpitium ochridanum* Micevski, endemico del monte Galičica in Macedonia del Nord, è stato trovato contenere oli essenziali ricchi di α -pinene, camazulene e α -bisabololo nelle sue radici e rizomi (PoPović et al. 2014).

Per quanto riguarda i composti non volatili, varie specie di *Laserpitium* contengono flavonoidi, fenilpropanoidi, sesquiterpenoidi ossigenati, cumarine e daucani (Bohlmann and Thefeld, 1970; Smitalova et al. 1984; Appendino et al. 1986). Questi composti sono noti per possedere una gamma di effetti benefici, tra cui proprietà ipotensive, antiossidanti, antimicrobiche, antinfiammatorie, antiproliferative, antitumorali e antidiabetiche (Merfort et al. 2011; Stankovic et al. 2016; Rimpelova et al. 2019). I composti fenolici e i lattoni sesquiterpenici sono i principali metaboliti secondari attivi responsabili delle proprietà medicinali (Dastan et al. 2016). Sebbene i fenoli siano considerati responsabili della bioattività delle specie Apiaceae (Guvenalp et al. 2017; Chen et al. 2021; Kiziltas et al. 2021), ciò è stato documentato specificamente solo per *Laserpitium krapffi* Crantz (Bogucka-Kocka et al. 2019). La letteratura ha dimostrato che *L. siler* e altre specie di *Laserpitium* sono ricche di lattoni sesquiterpenici, in particolare dei tipi eudesmanolide, germacranolide e soprattutto guaianolide slovanolide (Smitalova et al. 1984; Appendino et al. 1986; Milosavljevic et al. 1999), il che è di notevole importanza chemotassonomica.

L. siler, *L. zernyi*, *L. marginatum* e *L. ochridanum* sono stati osservati accumulare lattoni guaianolidi, principalmente del tipo slovanolide. Al contrario, solo le radici e i rizomi di *L.*

latifolium hanno dimostrato produrre laserpitina, laserpitinolo, isolaserpitina e esteri di daucani correlati (Milosavljevic et al. 1999). Risultati recenti indicano che, a differenza delle radici, le parti aeree di *L. zernyi* è ricca di esteri di daucani, tra cui la laserpitina e nuovi derivati del 8-daucene-2,4,10-triolo (Micevski 2005).

La sintesi di questi metaboliti complessi è un processo impegnativo, evidenziando l'importanza della loro estrazione dalle piante. All'interno della famiglia Apiaceae, incluso il genere *Laserpitium* (Harmatha et al. 2013), questi lattoni sono importanti fonti naturali. Derivati dai sesquiterpeni germacrene A-D (Drew et al. 2009), la configurazione dei lattoni (6b,7a/6b,7b) differisce da quella osservata nella famiglia Asteraceae (6a,7b) (Simonsen et al. 2013), fungendo da marker fitochimico per distinguere le relazioni chemiotassonomiche in entrambe le famiglie (Harmatha et al. 2013). La presenza di guaianolidi ossidati in C-8 e C-10 è una caratteristica chemiotassonomica della tribù Laserpitieae, tipica delle specie di *Laserpitium* studiate in Serbia (Smitalova et al. 1984; Milosavljevic et al. 1999). Le proprietà terapeutiche degli α -metilene- e dei guaianolidi con un residuo carbonilico α,β -insaturo sono state oggetto di notevole ricerca. Il loro meccanismo d'azione coinvolge interazioni con tioli in peptidi, proteine ed enzimi (Drew et al. 2009; Simonsen et al. 2013). Queste proprietà includono attività antinfiammatorie, immunomodulatrici (Harmatha et al. 2013), antimicrobiche (PoPović et al. 2015a) e citotossiche (Drew et al. 2009; PoPović et al. 2015a)

2.1.7.1 *Laserpitium siler* subsp. *siculum*: caratterizzazione degli estratti



Figura 43. *Laserpitium siler* subsp. *siculum*.

Dato il significato biologico del genere *Laserpitium* e la limitata conoscenza attuale riguardo ai loro componenti chimici e attività biologiche, è stato deciso di valutare le proprietà citotossiche dei lattoni sesquiterpenici isolati dall'estratto delle radici di *Laserpitium siler* subsp. *siculum*, mai investigati (Hegi 1906).

Le radici di *L. siler* subsp. *siculum* sono state raccolte a maggio 2020, durante la fase di fioritura, ed estratte secondo la metodologia descritta nella Sezione Sperimentale, portando all'isolamento di quattro lattoni sesquiterpenici (**1-4**) e di un triterpenoide (**5**).

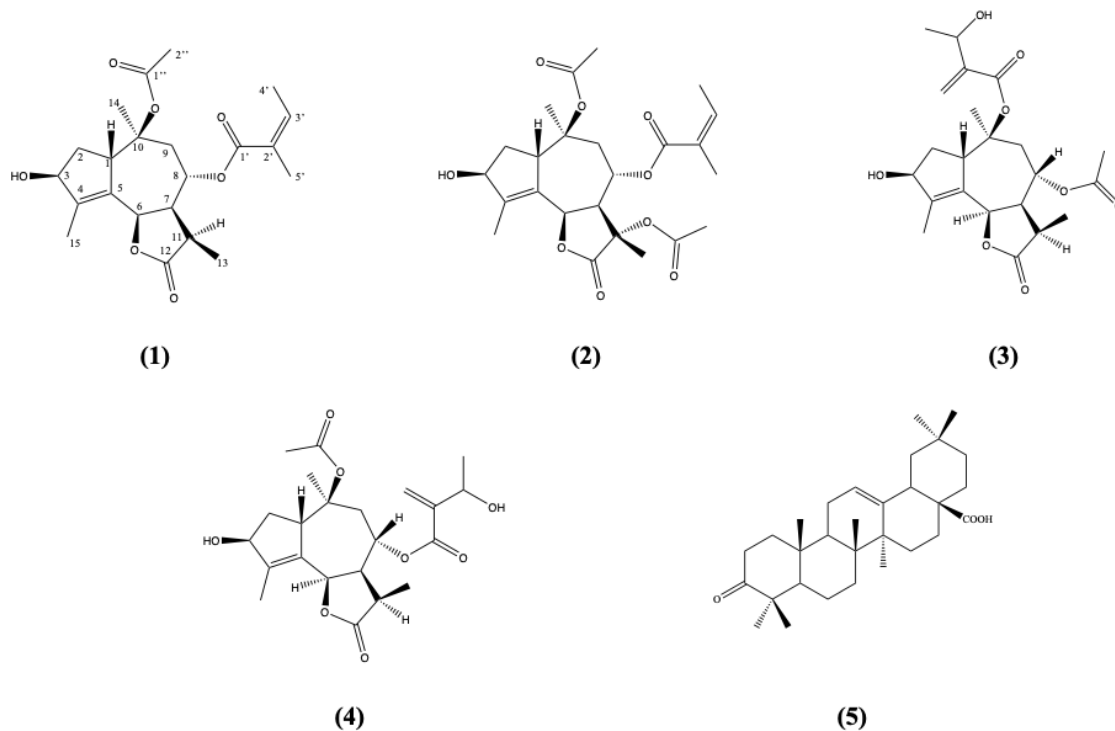


Figura 44. Strutture dei composti **1-5**.

Il composto **1** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{22}H_{30}O_7$, deducibile dal picco HRESI-MS positivo a m/z 429.1929 $[M + Na]^+$ (massa teorica 406.4702 Da). Gli spettri 1H -NMR e ^{13}C -NMR hanno mostrato segnali caratteristici di un carbonile del tipo lattone ($\delta C = 177.98$, C-12), oltre alla presenza di un doppio legame tra C-4 e C-5, evidenziato dai segnali a $\delta C = 148.21$ e 131.64 . Il gruppo metile C-13 in posizione β è stato rilevato a $\delta H = 11.28$, confermando la struttura di un lattone sesquiterpenico. Le correlazioni HMBC hanno permesso di chiarire ulteriormente la struttura: è stata osservata una correlazione tra C-4 e H-2, tra C-5 e H-7 (per confermare la posizione del doppio legame) e tra C-13 e H-7 (per identificare il gruppo metile). I sostituenti presenti includono un gruppo idrossile in C-3 ($\delta C = 79.31$, $\delta H = 4.77$), un gruppo acetato in C-10 e un gruppo angeloloile in C-8. Tali assegnazioni sono state supportate tramite confronto con segnali riportati in letteratura e attraverso correlazioni HMBC tra H-8 e C-1'.

La stereochimica della frazione lattonica è stata confermata coerente con la biogenesi, grazie alle costanti di accoppiamento osservate e alla correlazione NOESY tra H-6 e H-7. I restanti sostituenti sono stati identificati tramite correlazioni NOESY. Il composto **1** (Figura 44) è

stato identificato come acido 2-butenico, 2-metil-, 6-(acetiolossi)-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidrossi-3,6,9-trimetil-2-ossoazuleno[4,5-b]furan-4-il estere. Questo composto non era mai stato isolato da piante del genere *Laserpitium* ed era stato precedentemente segnalato solo nelle parti aeree di *Seseli vayredanum* Font Quer (Barrero et al. 1994).

Il composto **2** è stato ottenuto come polvere bianca e assegnato alla formula molecolare $C_{24}H_{32}O_9$ tramite analisi HRESI-MS (m/z 487.1939 $[M + Na]^+$; massa teorica 464.2040 Da). Come per il composto iniziale, la maggior parte dei segnali osservati per il composto **2** era comparabile a quelli precedentemente documentati. Tuttavia, la presenza di un nuovo sostituente acetato, identificato dalla variazione nel segnale di C-11 ($\delta C = 79.19$), ha richiesto un'analisi separata. La posizione dei due gruppi acetato è stata assegnata sulla base di una correlazione NOESY tra H-1 e H-2". La stereochimica di C-11 è stata determinata tramite l'osservazione di una correlazione NOESY tra H-13, H-8 e H-1. La frazione angeloile è stata nuovamente confermata in posizione α tramite l'analisi delle costanti di accoppiamento. Il composto **2** (Figura 44) è stato identificato come acido 2-butenico, 2-metil-, 3,6-bis(acetiolossi)-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidrossi-3,6,9-trimetil-2-ossoazuleno[4,5-b]furan-4-il estere, e non era mai stato isolato da altre piante.

I composti **3** e **4** sono stati ottenuti come polvere bianca in una miscela che non poteva essere separata né tramite cromatografia su colonna, né tramite TLC preparativa. Tuttavia, è stato possibile caratterizzarli e identificarli tramite HPLC-MS e diverse integrazioni dei picchi nella spettroscopia NMR. Per entrambi, è stata assegnata la formula molecolare $C_{22}H_{30}O_8$ tramite analisi HRESI-MS (m/z 445.1833 $[M + Na]^+$; massa teorica 422.1940 Da). I due prodotti hanno mostrato una struttura lattone sesquiterpenica identica a quella osservata nei due prodotti precedenti, con l'eccezione dei due sostituenti in C-10 e C-8, che erano precedentemente occupati da gruppi acetato e angeloile, ora sostituiti da un gruppo acetato e da un gruppo 3-idrossi-2-metilenbutanoato. Questa distinzione è stata identificata tramite la comparsa di nuovi segnali ($\delta C-1' = 164.96$, $\delta C-2' = 143.97$, $\delta C-3' = 123.81$, $\delta C-4' = 67.04$, $\delta C-5' = 22.62$). I due composti differiscono tra loro per i due sostituenti, che sembrano essere invertiti nelle rispettive strutture. È stato possibile discernere le due strutture grazie alle correlazioni HMBC dei due diversi carbonili dei gruppi sostituenti con H-8. La stereochimica è stata confermata in modo analogo a quanto impiegato per i composti precedenti. Il composto **3** è stato identificato come (3R,3aR,4S,6S,6aS,8S,9bR)-4-acetiolossi-8-idrossi-3,6,9-trimetil-2-osso-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidrossi-azuleno[4,5-b]furan-6-il 3-idrossi-2-metilenbutanoato, mentre il composto **4** come

(3R,3aR,4S,6S,6aS,8S,9bR)-6-acetiolossi-8-idrossi-3,6,9-trimetil-2-osso-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decahidroazuleno[4,5-b]furan-4-il 3-idrossi-2-metilenbutanoato. L'isolamento dei composti **3** e **4** rappresenta una novità.

Il composto **5**, con formula molecolare C₃₀H₄₆O₃, confermato tramite analisi HPLC-MS (*m/z* 455.6899 [M + H]⁺, massa teorica 454.6856 Da), è risultato essere un triterpenoide noto, l'acido oleanonico. La struttura del triterpenoide è stata identificata sulla base del numero di segnali (trenta per i triterpeni) osservati nello spettro ¹³C-NMR e dell'abbondanza di protoni nella zona di campo alto dello spettro ¹H-NMR. I segnali principali che hanno facilitato la caratterizzazione accurata del prodotto sono stati il segnale di H-12 a $\delta = 5.28$ del doppio legame, il carbonio del gruppo carbossilico C-28 a $\delta = 182.99$ e il carbonile C-3 a $\delta = 217.61$, identificati tramite correlazione HMBC con H-1 e H-5. Tutti i segnali sono stati confermati dai dati riportati in letteratura (Tang et al. 2014).

2.1.7.2 *Laserpitium siler subsp. siculum*: Attività Antitumorale

Poiché, fino ad oggi, non esistono in letteratura dati riguardanti la citotossicità di questi composti, in una fase iniziale dello studio sono stati testati i vari lattoni sesquiterpenici parallelamente a e diverse concentrazioni su cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231 (una linea cellulare di carcinoma mammario triplo negativo) e ne sono stati valutati gli effetti.

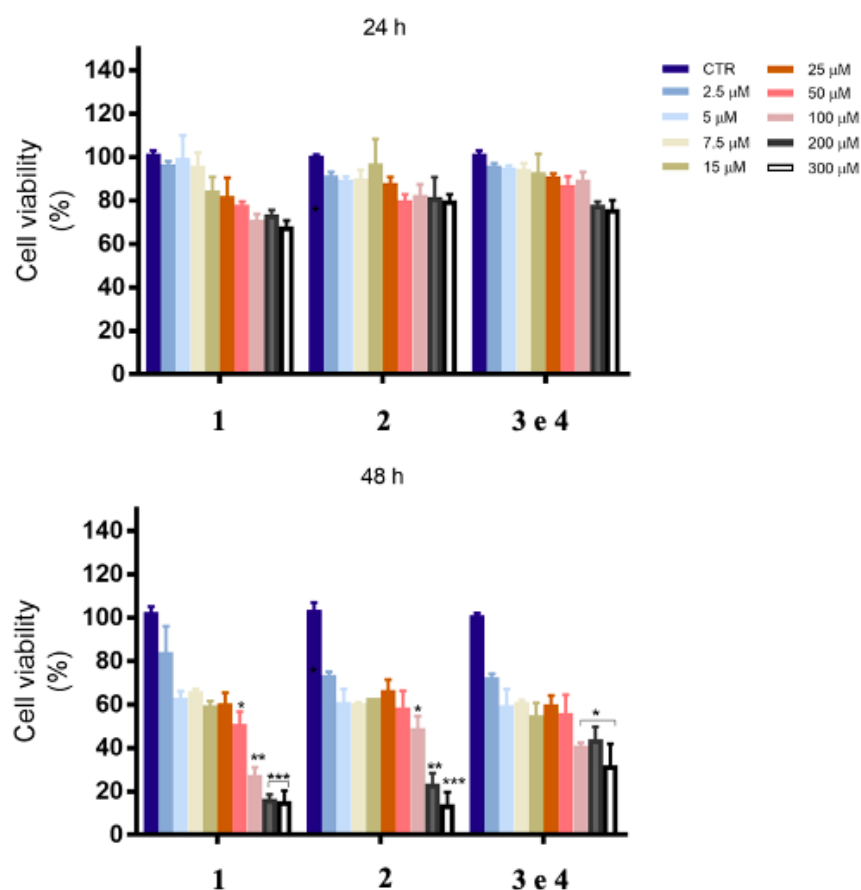


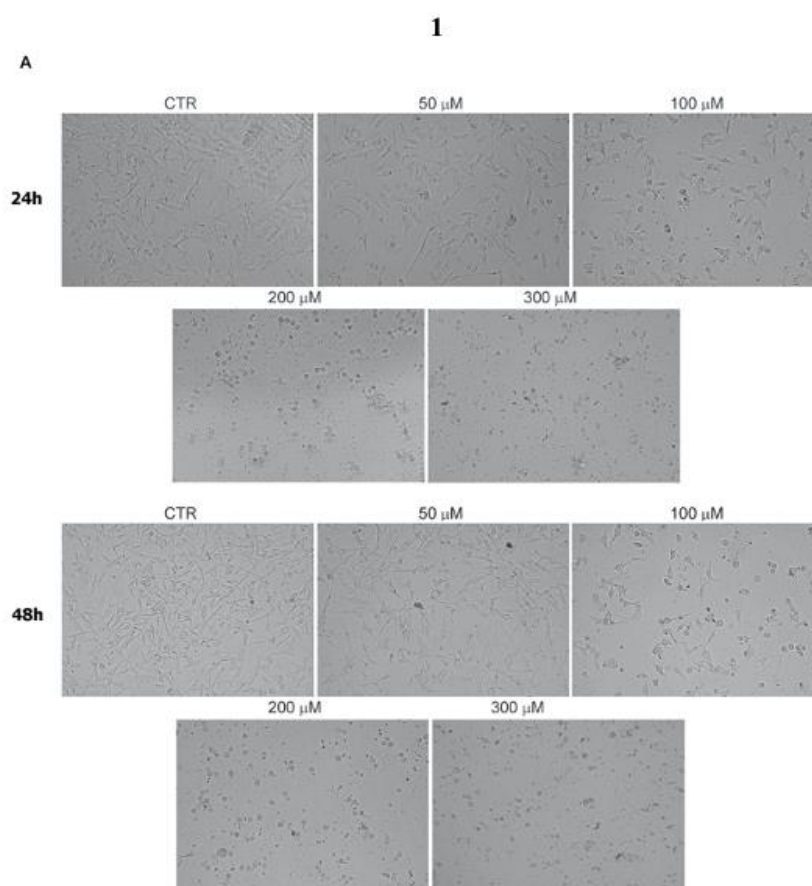
Figura 45. Il trattamento con i composti 1, 2 e 3 e 4 provoca una diminuzione della vitalità delle cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231. La Figura mostra l'effetto citotossico dei composti di *Laserpitium siler subsp. siculum*, evidenziando una dipendenza sia dalla dose che dal tempo di esposizione, come valutato attraverso il test di vitalità cellulare MTT. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in quantità di $8 \times 10^3 \mu\text{L}$ e incubate con diverse concentrazioni dei composti per 24 e 48 ore. I risultati sono espressi come media \pm SD, con significatività statistica indicata da (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo.

Per valutare l'effetto citotossico dei lattoni sesquiterpenici 1, 2 e 3 e 4 sulle cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231, sono stati eseguiti saggi di vitalità cellulare impiegando il test MTT, come descritto nella sezione sperimentale. Le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti dei composti (2,5-300 μM) per 24 e 48 ore.

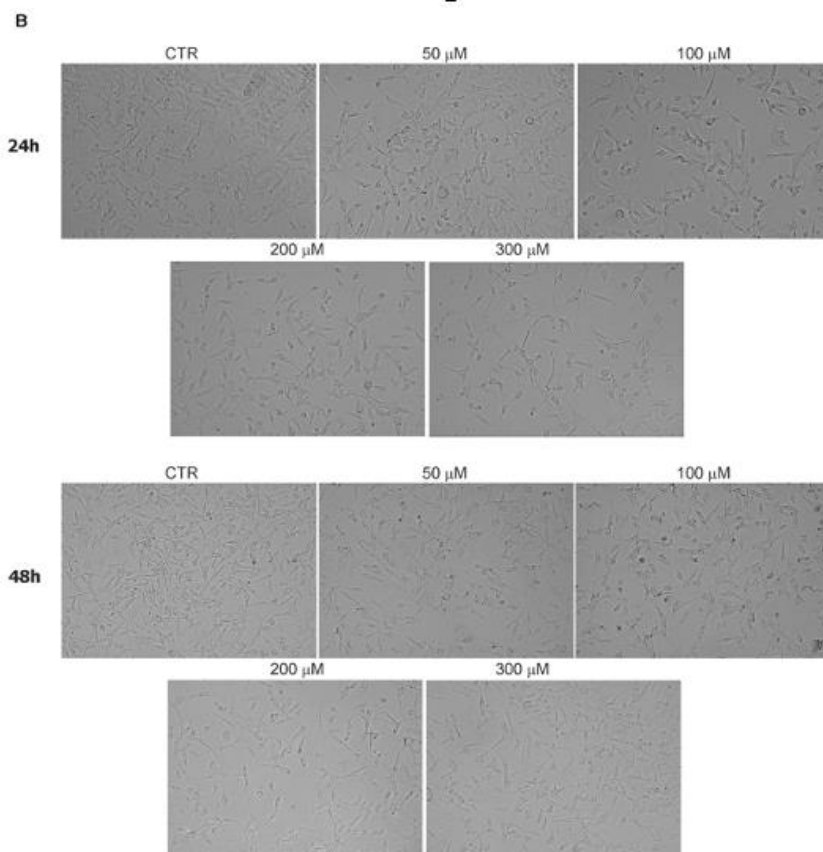
Come evidenziato dai dati illustrati in Figura 45, tutti e tre i campioni hanno provocato una riduzione significativa della vitalità delle cellule MDA-MB-231 in maniera dipendente sia dalla dose che dal tempo di esposizione. Dopo 24 ore, l'effetto dei composti è risultato moderato con le dosi più elevate (100, 200 e 300 μM) che hanno ridotto la vitalità cellulare a circa l'80% in media.

A 48 ore, i composti hanno mostrato effetti citotossici moderati alle dosi più basse (2,5 μM - 25 μM). Tuttavia, il trattamento con il composto **1** alla concentrazione 50 μM ha determinato una riduzione della vitalità cellulare di circa il 50%, mentre con la dose 100 μM la vitalità residua si è ridotta al 27,5%. Alla stessa concentrazione, i composti **2** e **3** e **4** hanno portato la vitalità rispettivamente al 49% e al 41%. Questi risultati dimostrano che, alla dose 100 μM , il composto **1** ha mostrato la maggiore attività citotossica rispetto agli altri.

Considerando la somiglianza tra le strutture dei composti testati, il maggiore effetto citotossico del composto **1** sembra essere legato alla presenza del gruppo angelole in posizione 8 e all'assenza del gruppo acetato in posizione 11.



2



3 e 4

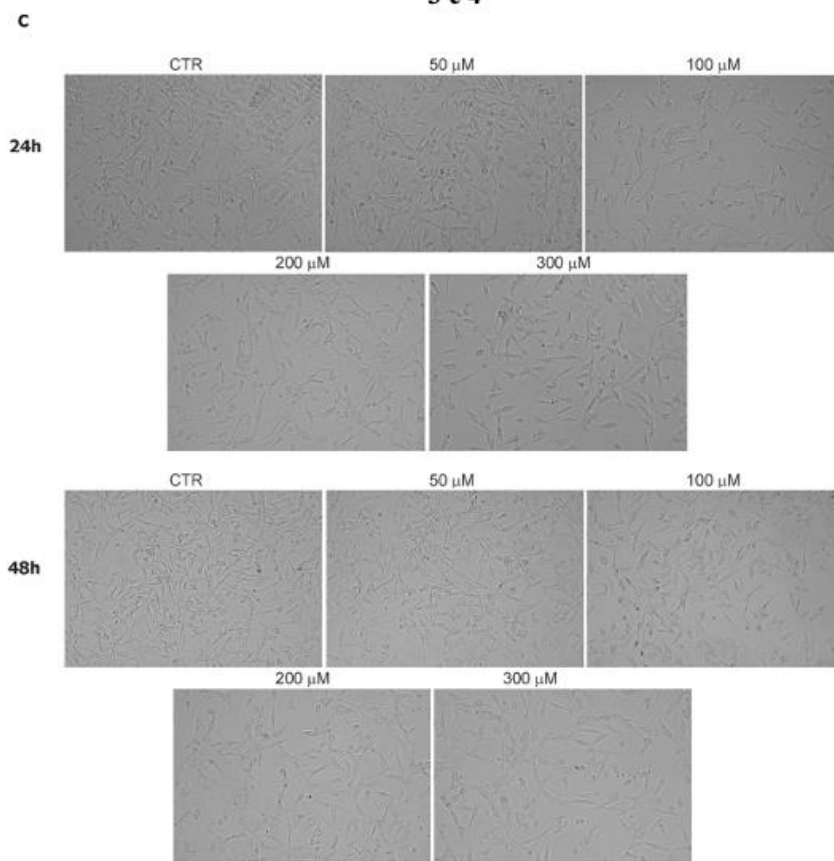


Figura 46. Valutazione della morfologia delle cellule MDA-MB-231 dopo trattamento con il composto **1**. Le immagini riportate nei pannelli A, B e C illustrano i cambiamenti morfologici delle cellule in seguito al trattamento con i diversi composti. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, con una densità di $8 \times 10^3 / 200 \mu\text{L}$, e trattate per 24 e 48 ore. Le immagini sono state acquisite con un ingrandimento di 200X utilizzando un microscopio invertito OPTIKA IM3FL4, equipaggiato con il sistema di acquisizione immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia).

Per valutare l'impatto dei composti sulla morfologia cellulare, le cellule MDA-MB-231 trattate con **1**, **2** e **3** e **4** sono state osservate tramite microscopio ottico in campo chiaro. Come illustrato nelle Figure 46A, 46B e 46C, il trattamento con i diversi composti ha portato a una riduzione del numero di cellule già dopo 24 ore, con un effetto più marcato dopo 48 ore. Le immagini rivelano differenze significative negli effetti morfologici indotti dai lattoni sesquiterpenici testati, suggerendo diverse modalità d'azione. In particolare, mentre **2** e **3** e **4** (Figure 46B e 46C) mostrano un rallentamento della proliferazione cellulare, solo **1** (Figura 46A) induce chiaramente la morte cellulare già a 24 ore di trattamento.

L'analisi degli effetti citotossici e morfologici dei lattoni sesquiterpenici ha evidenziato che tra i composti testati, **1** riduce significativamente la vitalità delle cellule MDA-MB-231 a 48 ore di trattamento, rispetto a **2** e **3** e **4**. Per approfondire le cause di queste differenti modalità d'azione, si è indagato se i lattoni sesquiterpenici potessero indurre autofagia. L'autofagia è stata inizialmente valutata 24 ore dopo il trattamento delle cellule con i composti mediante la colorazione con monodansilcadaverina (MDC), un colorante fluorescente verde che si lega ai lipidi della membrana degli autofagosomi.

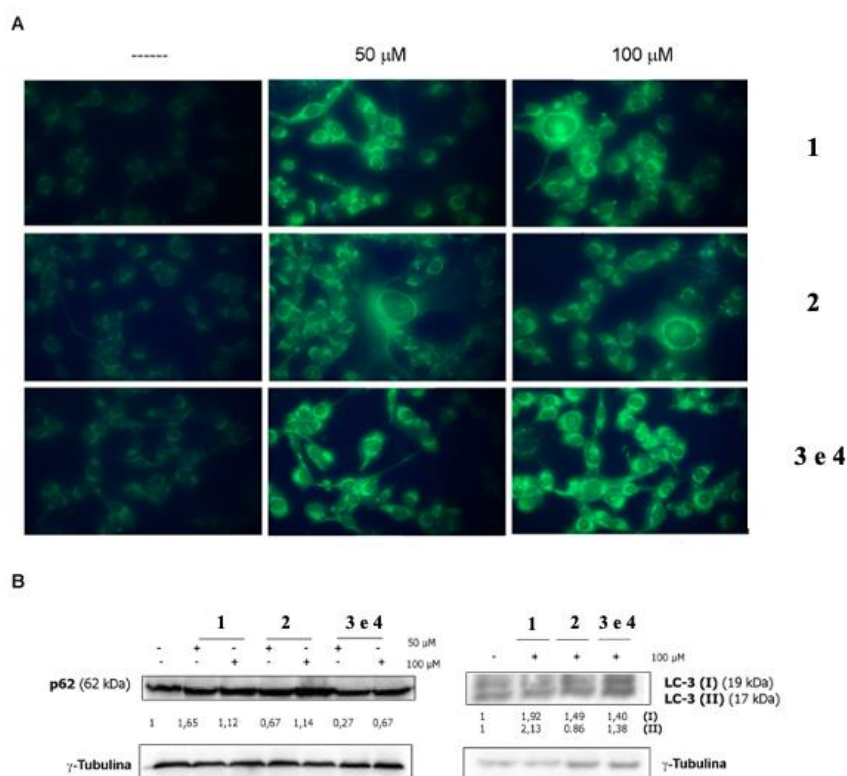


Figura 47. Il trattamento con i lattoni sesquiterpenici di *Laserpitium siler* induce autofagia a 24 h. Il pannello A mostra la presenza di vacuoli autofagici, evidenziata attraverso colorazione con monodansilcadaverina (MDC). Le cellule sono state seminate in multiwells da 96 pozzetti in numero di $8 \times 10^3 / 200 \mu\text{L}$ e trattate con i composti per 24h. Tutte le acquisizioni sono state condotte con un ingrandimento 400X utilizzando un microscopio invertito OPTIKA IM3FL4 dotato del sistema di acquisizione di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia). Nel pannello B è mostrata l'analisi di western blotting. Le cellule sono state trattate con i composti alla concentrazione di 50 μM e di 100 μM per 24h, sono state poi lisate e analizzate mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici per le proteine di interesse. Il blot della γ -tubulina è stato riportato come controllo dell'omogeneità di caricamento.

Come mostrato nella Figura 47, dopo 24 ore tutti i composti hanno indotto un incremento dell'autofagia rispetto alle cellule di controllo, evidenziato dalla presenza di vacuoli autofagici con fluorescenza verde brillante. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi di western blotting, che ha mostrato un aumento dei livelli di p62 e LC3 II, due markers di autofagia, già alla concentrazione di 50 μM , con un ulteriore incremento a 100 μM .

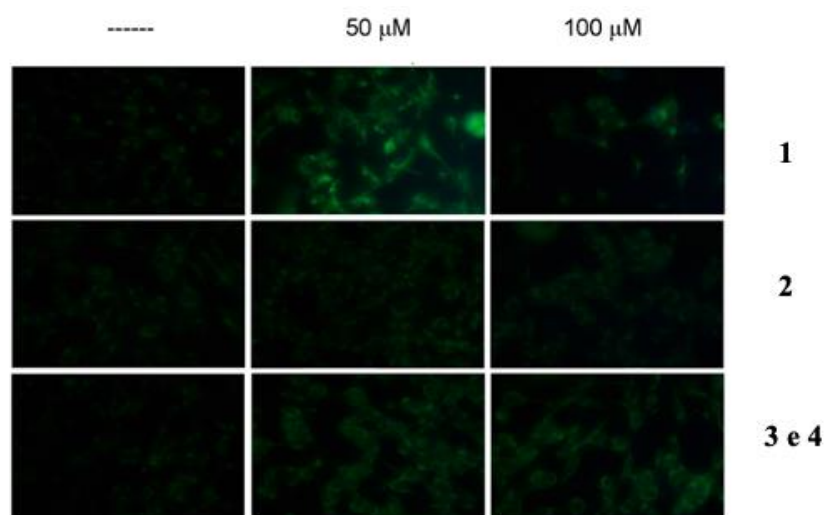


Figura 48. La figura mostra la scomparsa dei vacuoli autofagi dopo un trattamento prolungato con i sesquiterpeni lattonici. Le cellule sono state seminate in multiwells da 96 pozzetti in numero di $8 \times 10^3 / 200 \mu\text{L}$ e trattate con i composti per 48h. La valutazione dei vacuoli autofagici è stata eseguita mediante colorazione con monodansilcadaverina (MDC). Tutte le acquisizioni sono state condotte con un ingrandimento 400X utilizzando un microscopio invertito OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia).

Tuttavia, estendendo il trattamento a 48 ore, si è osservato un cambiamento significativo, come riportato in Figura 48. Oltre alla quasi totale scomparsa dei vacuoli autofagici, è stata rilevata un'alterazione nella morfologia cellulare, suggerendo il passaggio a un diverso meccanismo di morte cellulare. Questi risultati hanno portato a ipotizzare che l'autofagia, inizialmente attivata come risposta al trattamento, non fosse più sostenuta nel lungo periodo, inducendo le cellule a transitare verso altre forme di morte cellulare. Considerando che dopo 48 ore il composto più efficace nella riduzione della vitalità cellulare e nell'induzione della morte è **1**, è stata condotta un'analisi dell'apoptosi mediante colorazione con Acridina Orange (AO) ed Etidio Bromuro (EB), come descritto nella sezione sperimentale.

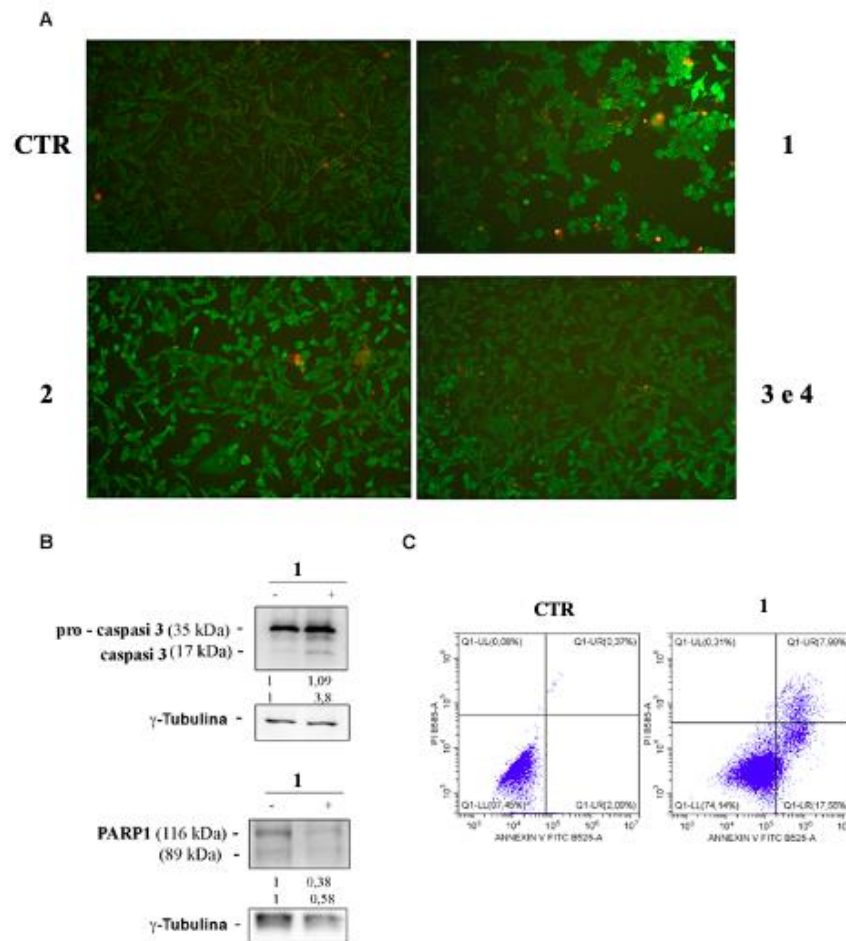


Figura 49. Il trattamento con il composto **1** induce morte cellulare per apoptosi. Nel pannello **A** è mostrata l'analisi dell'apoptosi effettuata mediante l'uso di Acridina Orange ed Etidio Bromuro. Le cellule sono state seminate in multiwells da 6 in numero di 1.2×10^5 /2 mL e trattate con i composti per 48h. Tutte le acquisizioni sono state condotte con un ingrandimento 200X utilizzando un microscopio invertito OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia). Nel pannello **B** è mostrata l'analisi di western blotting. Le cellule sono state trattate con il composto **1** alla concentrazione di 100 μ M, sono state poi lisate e analizzate mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici per le proteine di interesse. Il blot della γ -tubulina è stato riportato come controllo dell'omogeneità di caricamento. Il pannello **C** mostra l'analisi citofluorimetrica effettuata utilizzando due diversi fluorocromi: annessina V coniugata con fluoresceinaisotiocianato (FITC) e ioduro di propidio (PI). I dati sono stati acquisiti con il citofluorimetro CytoFLEX, utilizzando il software di analisi CytExpert.

Le cellule trattate con tutti e tre i composti sono state analizzate, e i risultati riportati in Figura 49 mostrano, attraverso la doppia colorazione AO/EB, la differenza tra cellule vive e in apoptosi. AO colora di verde sia le cellule vive che morte, mentre EB colora di rosso-arancio solo quelle con membrana compromessa. Le immagini nel pannello **A** di Figura 49 evidenziano numerosi spot rosso-arancioni nelle cellule trattate con **1**, suggerendo che questo composto induce apoptosi, con un effetto meno pronunciato nelle cellule trattate con **2** e **3** e **4**.

Per approfondire l'azione di **1**, è stata eseguita un'ulteriore analisi di western blotting per caspasi-3 e PARP-1, due markers associati all'apoptosi. I risultati hanno dimostrato che il trattamento con **1** aumenta l'attività della caspasi-3, un enzima chiave nell'apoptosi, e riduce i livelli di PARP-1, substrato che viene degradato durante questo processo. Queste evidenze molecolari supportano l'ipotesi che **1** induca apoptosi dopo 48 ore di trattamento.

Un'ulteriore conferma è stata ottenuta mediante citofluorimetria utilizzando Annessina V coniugata con FITC e ioduro di propidio (PI). Questo metodo sfrutta l'abilità dell'annessina V di legarsi alla fosfatidilserina esposta sulla superficie cellulare durante l'apoptosi, emettendo fluorescenza verde, mentre PI penetra solo nelle cellule con membrana compromessa, emettendo fluorescenza rossa. I risultati, mostrati nel pannello C di Figura 49, evidenziano che il 25,55% delle cellule trattate con **1** è positivo per l'apoptosi. Tra queste, il 17,56% delle cellule è in fase precoce di apoptosi (Ann V⁺/PI⁻), caratterizzata dalla traslocazione della fosfatidilserina, mentre il restante 7,99% è in fase avanzata, con positività sia per Annessina V-FITC che per PI (Ann V⁺/PI⁺).

È noto che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono stimolare l'autofagia, ma quando il danno ossidativo eccede la capacità di riparazione della cellula, i ROS possono attivare l'apoptosi, favorendo la morte cellulare programmata, specialmente in situazioni di stress prolungato (Li et al. 2015). Di conseguenza, una parte successiva ha previsto l'analisi della produzione di ROS dopo 1, 2 e 4 ore di trattamento con il composto **1**. Per misurare tale produzione, è stato utilizzato il 2',7'-diidrodiclorofluoresceina diacetato (H2DCFDA), un composto che, come descritto nella Sezione sperimentale, viene convertito in una molecola fluorescente dalle esterasi cellulari in presenza di specie radicaliche.

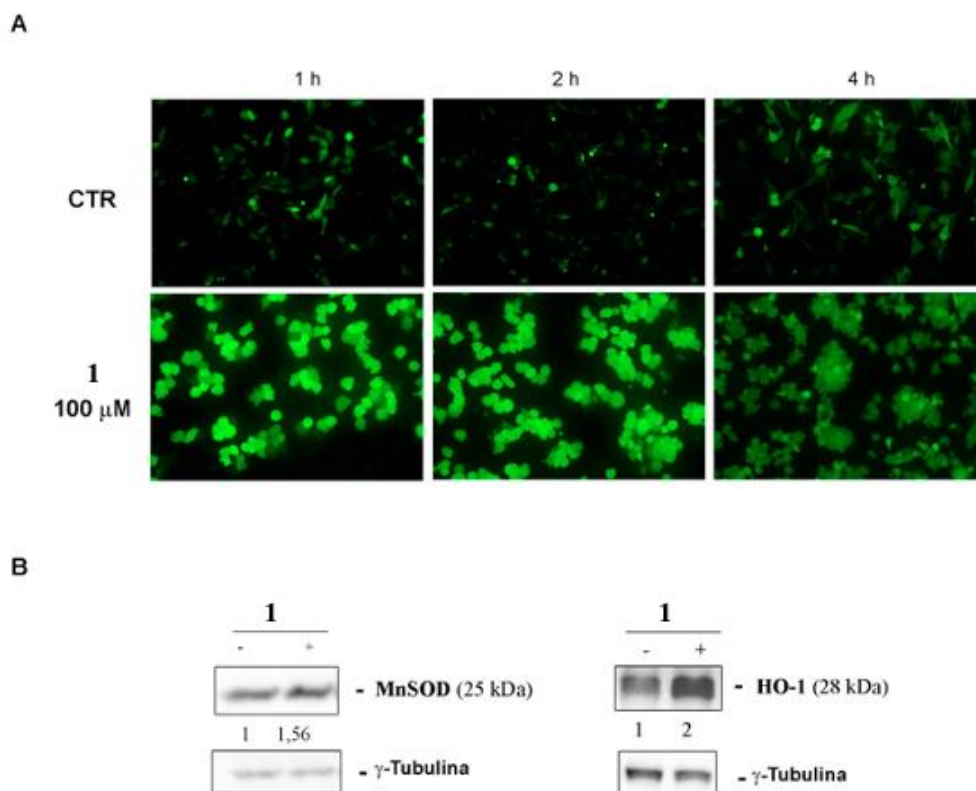


Figura 50. Nel pannello A della figura è riportata la produzione di ROS valutata impiegando il fluorocromo H2DCFDA e mediante microscopia a fluorescenza utilizzando un filtro FITC, tutte le acquisizioni sono state condotte con un ingrandimento 200X utilizzando un microscopio invertito OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia). Le cellule sono state seminate in multiwells da 96 pozzetti in numero di $10^4/200 \mu\text{L}$ e trattate con il composto **1** per i tempi sopra indicati. Nel pannello B è mostrata l'analisi di western blotting. Le cellule sono state trattate con il composto **1** alla concentrazione di $100 \mu\text{M}$, sono state poi lisate e analizzate mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici per le proteine di interesse. Il blot della γ -tubulina è stato riportato come controllo dell'omogeneità di caricamento.

Come illustrato in Figura 50, dopo solo un'ora o due di trattamento con **1**, le cellule mostrano una marcata fluorescenza verde brillante rispetto al controllo, indicando un significativo aumento della produzione di ROS. Questo risultato è stato ulteriormente confermato dalle analisi di western blotting, che hanno evidenziato un incremento nell'espressione di due enzimi: la superossido dismutasi mitocondriale (MnSOD) e l'eme ossigenasi 1 (HO-1). MnSOD è essenziale nel neutralizzare l'anione superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), mentre HO-1 è un enzima chiave nel degradare l'eme.

Poiché i ROS possono indurre apoptosi e sono spesso associati a danno mitocondriale (El-Osta and Circu, 2016) è stato opportuno valutare l'integrità del potenziale di membrana mitocondriale, utilizzando il colorante JC-1, che è un indicatore sensibile alle variazioni del potenziale mitocondriale. I risultati hanno mostrato una significativa dissipazione del

potenziale di membrana nelle cellule trattate con **1**, suggerendo una compromissione della funzione mitocondriale. Questo fenomeno è un indicatore critico di stress mitocondriale e rappresenta un evento precoce nei processi apoptotici, poiché la perdita del potenziale di membrana mitocondriale compromette l'omeostasi energetica, compromettendo la sopravvivenza della cellula. A conferma di queste osservazioni, l'analisi di western blotting ha rivelato che il trattamento con **1** determina una riduzione dei livelli di VDAC 1 (Voltage-Dependent Anion Channel), una proteina canale situata nella membrana mitocondriale esterna, che regola il flusso di metaboliti e ioni tra citosol e mitocondrio, controllando così l'accesso di molecole chiave per il metabolismo energetico e la segnalazione della morte cellulare (Camara et al. 2017). La riduzione di VDAC 1 nelle cellule trattate suggerisce che questa proteina possa essere coinvolta nel processo di morte cellulare, contribuendo alla destabilizzazione della funzione mitocondriale e favorendo la progressione verso l'apoptosi.

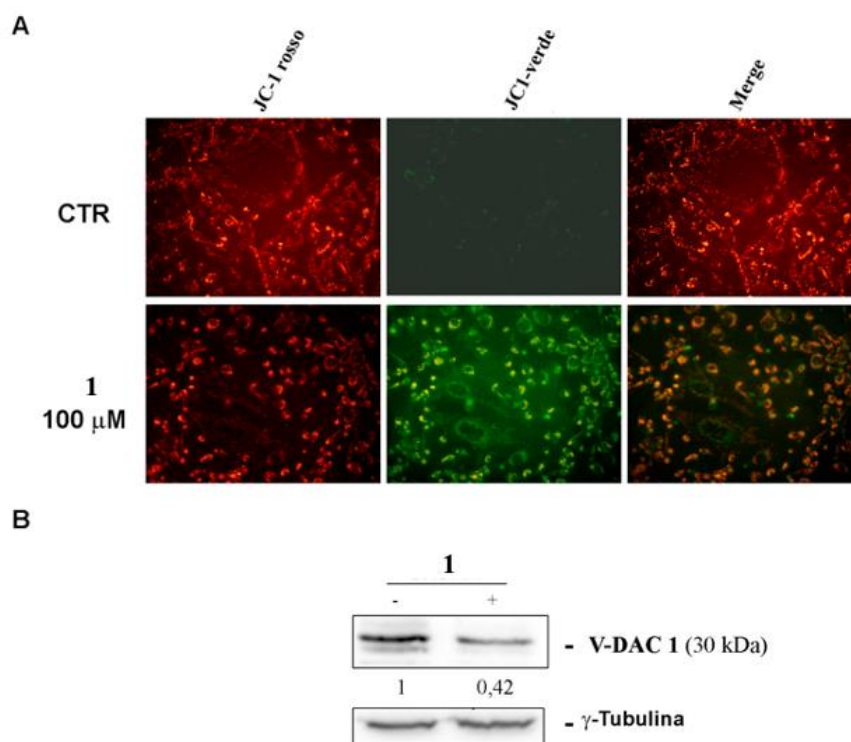


Figura 51. Nel pannello A della figura è mostrato l'effetto del trattamento con **1** sulla dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, analizzata mediante microscopia a fluorescenza, utilizzando JC-1 come marcatore. Le cellule sono state seminate in multiwells da 96 pozzetti in numero di $10^4/200 \mu\text{L}$ e trattate con i composti **1** per i tempi sopra indicati. Tutte le acquisizioni sono state condotte con un ingrandimento 200X utilizzando un microscopio invertito OPTIKA IM3FLA dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia). Nel pannello B è mostrata l'analisi di western blotting. Le cellule sono state trattate con il composto **1** alla concentrazione di $100 \mu\text{M}$, sono state poi lisate e analizzate mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici per le proteine di interesse. Il blot della γ -tubulina è stato riportato come controllo dell'omogeneità di caricamento.

2.1.7.3 *Laserpitium siler subsp. siculum*: Analisi FAME

Al fine di investigare anche le frazioni meno polari sono stati preparati dei fatty acid methyl esters (FAME) e analizzati mediante analisi GC-MS. In Tabella 2 i risultati ottenuti: la prima frazione (**FAME1**) ottenuta dalla cromatografia su colonna ha presentato una maggiore quantità di acidi grassi, in particolare, acido palmitico (48.46%) e acido stearico (19.37%), mentre la seconda frazione (**FAME2**) è stata caratterizzata prevalentemente da esaidrofarnesil acetone (28.88%) e acido arachidonico (25.50%).

Tabella 2. FAME di due frazioni apolari dell'estratto di *Laserpitium siler subsp. siculum*.

| Compounds | KI | KI ^{lit} | FAME1 | FAME2 |
|--|------|-------------------|-------|-------|
| Carvacrol | 1307 | 1312 | 6.02 | - |
| α -Terpineol acetate | 1335 | 1337 | 2.71 | - |
| Butylated Hydroxytoluene | 1485 | 1497 | 1.03 | - |
| 1,3-Ditert-butyl-2-methoxy-5-methylbenzene | 1516 | - | 0.85 | - |
| Methyl laurate | 1519 | 1527 | 1.11 | 1.50 |
| Dimethyl azelate | 1542 | 1548 | 2.16 | - |
| Caryophyllene oxide | 1591 | 1594 | - | 2.02 |
| Methyl tridecanoate | 1617 | 1622 | 0.75 | - |
| Methyl myristate | 1702 | 1707 | 3.37 | 4.41 |
| Methyl 12-methyltetradecanoate | 1775 | 1786 | 3.07 | - |
| Hexahydrofarnesyl acetone | 1811 | 1827 | - | 28.88 |
| Methyl palmitate | 1920 | 1927 | 48.46 | 15.30 |
| Ethyl palmitate | 1970 | 1975 | 7.32 | - |
| Methyl heptadecanoate | 2003 | 2009 | 3.78 | - |
| <i>cis</i> -Vaccenic acid | 2104 | 2116 | - | 3.06 |
| Methyl stearate | 2128 | 2130 | 19.37 | 15.1 |
| Methyl arachidate | 2315 | 2318 | - | 25.50 |
| Methyl behenate | 2521 | 2527 | - | 4.23 |

2.1.8 *Magydaris* W.D.J.Koch ex DC.

Il genere *Magydaris* W.D.J.Koch ex DC. appartiene alla famiglia delle Apiaceae ed è rappresentato in Europa e nel bacino del Mediterraneo da sole due specie: *Magydaris pastinacea* (Lam.) Paol. e *Magydaris panacifolia* (Vahl.) Lange (Euro+Med Plantbase).

Oltre agli studi fitochimici e biologici che hanno caratterizzato alcune specie del genere *Magydaris*, è importante considerare anche il loro ruolo ecologico e il potenziale applicativo in un'ottica di sostenibilità. Le specie di *Magydaris*, come altre Apiaceae mediterranee, svolgono un ruolo cruciale negli ecosistemi xerofili grazie alla loro capacità di adattarsi a suoli aridi e poveri di nutrienti, fungendo da stabilizzatori del suolo e offrendo risorse fondamentali, come nettare e polline, per gli insetti impollinatori. Questo aspetto è particolarmente rilevante alla luce della crescente perdita di biodiversità e del declino delle popolazioni di impollinatori, specialmente in aree sensibili come il bacino del Mediterraneo.

2.1.8.1 *Magydaris pastinacea* (Lam.) Paol



Figura 52. *Magydaris pastinacea*.

Magydaris pastinacea (Lam.) Paol., è presente in Sicilia, Sardegna, Corsica, Baleari e Nord Africa (Tunisia, Algeria e Marocco) (Euro+Med Plantbase; Pignatti et al. 1982). Questa pianta, che può raggiungere un'altezza compresa tra 1 e 2 metri, è caratterizzata da un fusto striato e da grandi foglie con infiorescenze con 40-50 peduncoli, che portano fiori bianchi. Studi precedenti su questa specie hanno portato all'isolamento di vari glucosidi dai rizomi freschi (Cerri et al. 1995; 1988) e di alcune cumarine note dai frutti (Camarda et al. 1996). Più recentemente, sono state indagate le attività antibatteriche e anticoagulanti delle cumarine isolate dai fiori (Rosselli et al. 2006).

Non ci sono però studi relativi ai componenti volatili di *Magydaris pastinacea* pertanto è stato preparato l'olio essenziale delle foglie di cui è stata valutata la composizione chimica.

L'idrodistillazione delle foglie di *Magydaris pastinacea*, raccolte a Monte Pizzuta, in Sicilia, ha prodotto un olio di colore giallo pallido (**Mp**). Complessivamente, sono stati identificati trentadue composti, rappresentanti il 91,06% del totale, elencati in Tabella A9, in base ai loro indici di ritenzione su una colonna DB-Wax e suddivisi in sette classi secondo la loro struttura chimica.

Gli idrocarburi monoterpenici sono risultati essere la classe principale (75,75%), con metaboliti principali il γ -terpinene (16,96%), β -myrcene (15,97%), β -cymene (12,42%) e 3-Carene (8,76%).

Le altre classi sono risultati avere una percentuale di composizione inferiore al 5%.

Oli essenziali di *Magydaris tomentosa* (Desf.) DC. raccolti in Sicilia e Algeria, sono risultati totalmente differenti da **Mp**. L'OE del campione raccolto in Sicilia è risultato essere più ricco in diterpenoidi (61,9%), con cembrene (28,2%) e α -springene (17,5%) come principali costituenti, presenti in tracce in **Mp**.

Anche l'accessione di *M. tomentosa* raccolta in Algeria, è risultata differente da **Mp**, avendo come classe principale quella dei sesquiterpeni ossigenati (70,4%), con (*E*)-nerolidolo (35,4%) e α -costolo (13,3%) come maggioritari (Khaoukha et al. 2014).

Non vi sono al momento altri articoli riguardanti oli essenziali del genere *Magydaris*.

La scarsità di studi sugli oli essenziali del genere *Magydaris* apre prospettive promettenti per futuri approfondimenti volti a valutare il potenziale biologico e applicativo di questi metaboliti. In particolare, ulteriori indagini potrebbero contribuire non solo alla comprensione della variabilità chimica tra le diverse specie e accessioni, ma anche alla valorizzazione di queste piante per usi farmacologici, cosmetici o alimentari, in linea con quanto osservato per altre Apiaceae mediterranee.

2.1.9 *Oenanthe* L.

Il genere *Oenanthe* comprende piante acquatiche perenni, emicriptofite e talvolta elofite, che possono raggiungere altezze comprese tra 30 e 100 cm. Questo genere è costituito da circa 40 specie distribuite nelle regioni temperate dell'emisfero settentrionale, in Europa, Asia occidentale, India e Africa settentrionale (Leurquin 2007). Il nome *Oenanthe* deriva dal greco e significa "fiore del vino", in riferimento al fatto che la pianta può indurre uno stato di stordimento simile all'ubriachezza. Questo effetto è stato documentato in casi di avvelenamento provocato da *Oenanthe crocata* L., una specie che cresce prevalentemente in Sardegna, all'interno dell'area mediterranea.

Oenanthe crocata è una delle piante più velenose in Europa, con una tossicità dovuta principalmente alla presenza di composti chiamati enantotossine. Questi composti agiscono

sul sistema nervoso centrale, causando sintomi come convulsioni, spasmi muscolari, e il cosiddetto *risus sardonicus*, un'espressione facciale involontaria che ricorda un sorriso forzato, tipicamente associata all'avvelenamento grave. La pianta è particolarmente pericolosa perché tutte le sue parti, incluse le radici e i semi, contengono alti livelli di tossine. Nonostante la sua tossicità, l'*Oenanthe crocata* viene talvolta confusa con piante commestibili come il sedano o il prezzemolo, aumentando il rischio di avvelenamento. Oltre alla *Oenanthe crocata*, altre specie del genere *Oenanthe* sono meno conosciute, ma la maggior parte di esse condivide caratteristiche simili, come l'adattamento a habitat umidi e la capacità di crescere lungo corsi d'acqua e zone paludose. Il genere è di interesse per la fitotossicologia a causa del rischio di intossicazioni accidentali che rappresenta, specialmente nelle aree rurali dove il contatto con la vegetazione selvatica è più frequente (Appendino et al. 2009).

2.1.9.1 *Oenanthe fistulosa* L.



Figura 53. *Oenanthe fistulosa*.

Per approfondire ed ampliare la conoscenza del genere *Oenanthe* è stata studiata la componente volatile di *Oenanthe fistulosa* L., mediante analisi GC-MS.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Oenanthe fistulosa*, raccolte a Bosco Ficuzza, in Sicilia, ha prodotto un olio di colore giallo (**Of**). Complessivamente, sono stati identificati ventotto composti, rappresentanti il 98,3% del totale, elencati in Tabella A10, in base ai loro

indici di ritenzione su una colonna DB-5MS e suddivisi in cinque classi secondo la loro struttura chimica.

Gli idrocarburi monoterpenici sono risultati essere la classe principale (59,8%), con metaboliti principali il β -*cis*-ocimene (21,6%), sabinene (9,3%), β -*trans*-ocimene (8,4%) e sylvestrene (8,2%). La seconda classe più abbondante invece è stata quella degli idrocarburi sesquiterpenici (26,3%), con β -elemene (7,9%), δ -guaiene (5,7%) e β -copaene (3,9%), come sesquiterpeni maggioritari. Miristicina (6,1%) e apiolo (3,9%) sono stati i costituenti maggioritari della classe "Other" (10,1%). Le altre classi si sono dimostrate avere una percentuale di composizione inferiore al 2%.

Pochi sono i report riguardanti gli oli essenziali di piante appartenenti al genere *Oenanthe*. La maggior parte di questi inoltre risulta differente da **Of**. *Oenanthe javanica* raccolta in Malesia ricca di sesquiterpeni e diterpeni come α -copaene (18,3%) e incensolo (26,4%) è risultata totalmente differente da **Of** (Pattiram et al. 2011), così come un esemplare di *Oenanthe pimpinelloides* raccolta a Creta, ricca esclusivamente di *o*-cymene (17,8%) e γ -terpinene (43,4%) presente in **Of** al 5,3% (Evergetis and Haroutounian, 2014). **Of** risulta diversa da *Oenanthe divaricata* raccolta a Madeira, in cui limonene (16,0%), β -caryofillene (15,3%) e β -bisabolene (17,7%) sono stati i componenti maggioritari (Pino et al. 2004).

Le uniche similitudini sono state notate con due accessioni differenti di *Oenanthe crocata*, provenienti dal Portogallo e dalla Sardegna, ricche in sabinene (29,0-25,7%), β -*cis*-ocimene (12,3-11,0%), e β -*trans*-ocimene (31,3-26,2%), quindi uguali ad **Of** nei metaboliti principali, ma con una diversa percentuale di β -*cis*-ocimene e β -*trans*-ocimene (Bicchi et al. 2009; Valente et al. 2013).

Queste differenze nella composizione chimica possono riflettere variazioni ecologiche, climatiche, e genetiche, sottolineando la necessità di ulteriori studi per comprendere meglio i fattori che influenzano la biosintesi dei metaboliti secondari in questo genere. Tali indagini non solo arricchiscono le conoscenze sulla biodiversità chimica di *Oenanthe*, ma offrono anche spunti promettenti per il potenziale sfruttamento degli oli essenziali in ambiti farmacologici, alimentari, e industriali.

2.1.10 *Pimpinella* L.

Il genere *Pimpinella* L., appartenente alla famiglia delle Apiaceae, comprende circa 150 specie distribuite principalmente nell'emisfero settentrionale (Heywood 1971). In Turchia, il genere è ben rappresentato, con 23 specie (di cui 5 endemiche), 2 sottospecie e 2 varietà, per un totale di 27 taxa (Mathew 1972), mentre in Sicilia 4 sono le specie endemiche: *Pimpinella tragium* subsp. *lithophila* (Schischk.), *Pimpinella lutea* Desf., *Pimpinella*

anisoides V.Brig., e *Pimpinella peregrina* L. Gli oli essenziali e gli estratti delle specie di *Pimpinella* sono noti per il loro alto contenuto di derivati fenilpropanoidi. Una delle caratteristiche distintive di questi composti è la presenza dello scheletro 2-idrossi-5-metossi-1-(*E*)-propenilbenzene, noto come pseudoisoeugenolo, che è unico di questo genere (Kubeczka 1997).

Un'importante area di studio degli oli essenziali di *Pimpinella* riguarda la presenza di sesquiterpenoidi e fenilpropanoidi C12 con strutture uniche. Questi metaboliti possono essere sfruttati per sviluppare nuovi agenti utili in agricoltura e medicina (Tabanca et al. 2004; 2005a). I fenilpropanoidi presenti in *Pimpinella* hanno dimostrato diverse attività biologiche, tra cui proprietà antigerminative, insetticide, acaricide, nonché deboli attività antitumorali, antimalariche, antimicrobiche e antifungine (Kleiman et al. 1988; Tabanca et al. 2003). Studi precedenti hanno analizzato gli oli essenziali estratti da diverse parti di *Pimpinella aurea* coltivata in Iran (Askari et al. 2005a, Assadian et al. 2005). Inoltre, studi recenti hanno evidenziato la composizione chimica, la diversità genetica e le attività biologiche degli oli essenziali di diverse specie di *Pimpinella* (Tabanca et al. 2005b).

2.1.10.1 *Pimpinella peregrina* L.



Figura 54. *Pimpinella peregrina*.

Tra le specie di maggior interesse, *Pimpinella peregrina* L. ha trovato un ampio utilizzo nella medicina tradizionale. Le specie di *Pimpinella*, incluse quelle come *P. peregrina*, sono da tempo apprezzate nella medicina tradizionale per le loro proprietà terapeutiche. Oltre a essere ampiamente utilizzate in ambito farmaceutico e nell'industria alimentare, queste piante continuano a mostrare un potenziale significativo nello sviluppo di nuove terapie

naturali per una varietà di disturbi psichiatrici e neurodegenerativi (Gülçin et al. 2003; Tepe et al. 2006; Ertan Anli and Bayram, 2010).

L'olio essenziale di *P. peregrina* viene tutt'ora ampiamente utilizzato per aromatizzare bevande tradizionali come raki, ouzo, pastis e arak. In uno studio condotto da Aydin et al., è stato esaminato l'effetto dell'inalazione dell'olio essenziale delle parti aeree di *P. peregrina* su deficit di memoria, ansia e depressione indotti da scopolamina in un modello di ratto per il morbo di Alzheimer (AD) (Aydin et al. 2016).

I risultati hanno mostrato che i ratti trattati con l'OE di *P. peregrina* hanno presentato miglioramenti significativi rispetto ai gruppi trattati solo con scopolamina, suggerendo potenziali effetti neuroprotettivi nel trattamento di ansia, depressione e deficit di memoria. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi biochimici e istologici per confermare l'efficacia di *P. peregrina* nel contesto del morbo di Alzheimer.

A tal proposito considerando il potenziale biologico delle piante appartenenti al genere *Pimpinella*, e data l'assenza di studi sugli endemismi siciliani, si è ritenuto opportuno investigare il profilo volatile dell'olio essenziale ottenuto dalle diverse parti aeree.

L'idrodistillazione dei fiori (**Ppf**) e degli steli (**Pps**) di *Pimpinella Peregrina*, raccolte a Villalba, in Sicilia, ha prodotto due oli di colore giallo. Complessivamente, sono stati identificati ventiquattro composti per i fiori e ventisette per i fusti, rappresentanti il 90,85% e 91,06% del totale, elencati in Tabella A11, in base ai loro indici di ritenzione su una colonna DB-5MS e suddivisi in cinque classi secondo la loro struttura chimica.

Gli idrocarburi sesquiterpenici sono risultati essere la classe principale in entrambi gli oli essenziali (75,06% per **Ppf**, e 55,37% per **Pps**) avendo in entrambi i casi come composto principale *trans- α -bergamotene* (67,85% per **Ppf**, e 41,90% per **Pps**). In **Ppf** è stata inoltre rilevata una discreta quantità di monoterpeni ossigenati (11,28%), totalmente assenti in **Pps**, con grandlure IV (10,03%) come principale componente di questa classe.

Pps, invece, è risultato più ricco in sesquiterpeni ossigenati (27,76%) totalmente assenti in **Ppf**. Tra questi l' *α -bisabolol* (15,08%) è risultato essere il più abbondante, tanto da essere il secondo prodotto maggioritario dell'OE degli steli. Gli unici studi su oli essenziali di *Pimpinella Peregrina*, entrambi raccolti in Turchia, hanno mostrato profili differenti tra di loro.

Il primo, di Aydin et al. presentava come componenti maggioritari dell'OE delle parti aeree di *P. peregrina*, *trans-pinocarveolo* (35,1%), *preyeyjerene* (15,1%), *α -cubebene* (12,4%), *Epi-bicyclosquiphellandrene* (7,5%), *α -terpineolo* (6,7%), e *allo-ocimene* (4,0%), totalmente assenti sia in **Ppf** che **Pps** (Aydin et al. 2016).

Il secondo, di Tabanca et al. invece, presentava prevalentemente caryophyllene (4,7-5,1%), assente nei campioni siciliani, e *trans*- β -bergamotene (70,3-40,9%, rispettivamente nei fiori e negli steli), presente in **Pps** e **Ppf** nel suo isomero *trans*- α -bergamotene (Tabanca et al. 2006).

Non esistono altri studi su specie di *P. peregrina*.

La composizione degli oli essenziali di altre specie di *Pimpinella* ha mostrato caratteristiche distintive. Gli oli essenziali di *Pimpinella tragiium* Vill. provenienti dall'Iran hanno rivelato una maggiore concentrazione di idrocarburi sesquiterpenici nei fusti (68,5%) e una minore concentrazione nei fiori (34,2%), dove i monoterpeni (38,6%) erano la classe principale di metaboliti. I principali composti identificati erano il germacrene D (34,7%) nei fusti e il β -pinene (23,8%) nei fiori; entrambi i composti sono risultati completamente assenti nelle accessioni siciliane **Pps** e **Ppf** (Askari et al. 2005b).

Anche gli oli essenziali di *Pimpinella tragiium* raccolti in Macedonia hanno mostrato idrocarburi sesquiterpenici (59,7%) come classe predominante nei frutti, con β -bisabolene (57,2%) come composto maggioritario (Slavkovska et al. 2022). Questo composto è stato riscontrato anche nell'olio essenziale dei frutti di *Pimpinella tragiium* subsp. *lithophila* (29,8%) (Tabanca et al. 2006).

Gli oli essenziali di *P. tragiium* subsp. *lithophila* sono stati anche ricchi di nor-sesquiterpeni come il geijerene (32,2%) e il pregeijerene (8,3%), metaboliti comuni in altre sottospecie di *Pimpinella tragiium*, tra cui *P. tragiium* subsp. *glauca* e *P. tragiium* subsp. *polyclada* (Maggio et al. 2013; Tabanca et al. 2004).

Gli oli essenziali di *Pimpinella lutea* Desf. dalla Tunisia si sono dimostrati più simili a **Pps** e **Ppf**, con *trans*- α -bergamotene (1,5-18,0%) come uno dei metaboliti principali. Tuttavia, altri composti dominanti, come l'acora-3,7(14)-dien e il muurolo-4,10(14)-dien-1- β -al, sono risultati assenti (Al-Hmadi et al. 2021).

Analizzando gli oli essenziali delle specie del genere *Pimpinella*, è emerso che una delle caratteristiche più distintive delle accessioni siciliane è l'elevata concentrazione di α -bergamotene, potenziale marker della specie. Questo composto è stato identificato in sole cinque specie non endemiche di *Pimpinella*. Le concentrazioni più alte di α -bergamotene, superiori a quelle di **Ppf**, sono state riscontrate in *P. affinis* Ledeb. (90,19%), *P. tragioides* (Boiss.) Benth. & Hook.f. ex Drude (77,1%) e *P. aurea* DC (72,8%) provenienti dall'Iran (Assadian et al. 2005; Askari and Safidon, 2007; Dashtianeh et al. 2013).

Anche se in concentrazioni inferiori rispetto a **Ppf**, l' α -bergamotene, è stato identificato anche in *P. saxifraga* (20,1%) e in un'altra accessione di *P. affinis* (56,2%) (Masoudi et al. 2009; Rahmani et al. 2008).

2.1.10.2 *Pimpinella peregrina*: Attività Antimicrobica e Antiossidante

Sono state esaminate le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali estratti dalle parti aeree di *Pimpinella peregrina*, in particolare dai fiori (**Ppf**) e dagli steli (**Pps**). Entrambi gli oli essenziali sono stati testati mediante metodo della diffusione su disco, conteggio cellulare e determinazione della concentrazione minima inibitoria (MIC) contro batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Bacillus subtilis* PY79) e Gram-negativi (*Escherichia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* PAO1), con un'ulteriore analisi dei possibili bersagli cellulari.

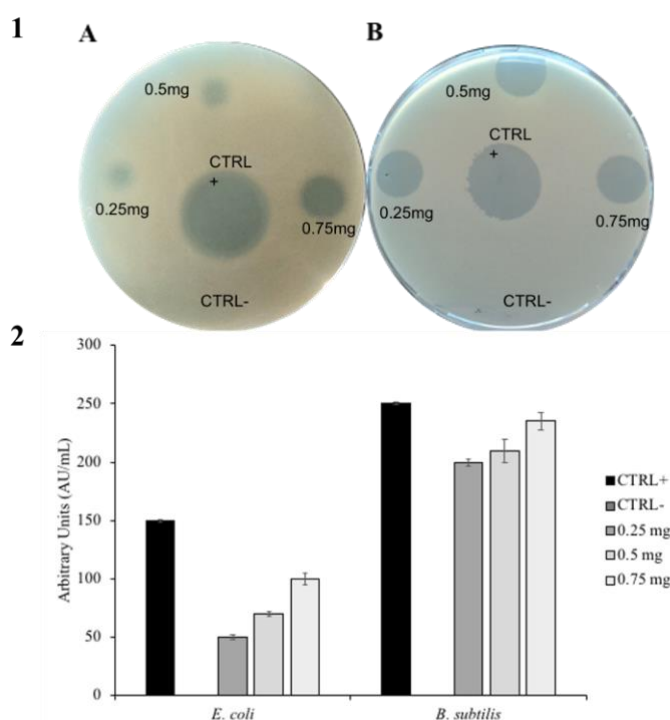


Figura 55. Zona di inibizione di **Ppf** contro (A) *E. coli*, (B) *B. subtilis*. Il controllo positivo è Ampicillina, mentre il controllo negativo è dimetilsolfossido (DMSO 80%). 2: La zona di inibizione mostrata nel pannello 1 è espressa in AU/mL. I valori sono espressi come media di tre esperimenti distinti; le deviazioni standard erano sempre inferiori al 10%.

Pps non ha mostrato attività antimicrobica significativa, come indicato dall'assenza di zone di inibizione. Al contrario, **Ppf** ha inibito efficacemente la crescita di entrambi i tipi di batteri, con zone di inibizione ben visibili (Figura 55, pannello A), evidenziando una maggiore sensibilità su *B. subtilis* rispetto a *E. coli* (Figura 55, pannello B). Tale attività ha motivato ulteriori analisi sull'efficacia antimicrobica di **Ppf**. Il conteggio batterico ha confermato una forte attività dose-dipendente, soprattutto contro i batteri Gram-positivi, con massima efficacia contro *B. subtilis*.

Il batterio *Bacillus subtilis*, noto per il suo uso industriale, rappresenta anche un rischio per la salute a causa delle sue spore, che possono causare malattie alimentari e problemi respiratori. Queste spore rappresentano sia un problema sanitario che economico (Bailey and Von Holy, 1993). Le spore possono inoltre causare reazioni respiratorie, incluse risposte allergiche di tipo I e III (Flindt 1969). La presenza di tali spore sottolinea quindi la necessità di agenti antimicrobici efficaci.

Ulteriori test di microdiluzione su **Ppf** hanno rivelato valori di MIC tra 0,25 e 20 mg/mL sui ceppi testati (Tabella 3). Un'attività antimicrobica simile è stata riportata per altre specie di *Pimpinella*; ad esempio, *Pimpinella saxifraga* ha mostrato MIC tra 0,78 e 125 mg/mL contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Ksouda et al. 2019). Gli estratti di *Pimpinella anisum* hanno inoltre mostrato forti effetti antibatterici contro *S. aureus*, ma non contro *P. aeruginosa* o *E. coli* (Gülçin et al. 2003).

Tabella 3. Valori della concentrazione minima inibitoria (MIC, mg/mL) di **Ppf** contro un pannello di batteri Gram-positivi e Gram-negativi. I valori sono stati ottenuti da un minimo di tre esperimenti indipendenti.

| Ceppi batterici | MIC [mg/mL] |
|----------------------|-------------|
| <i>E. coli</i> | 10 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 20 |
| <i>B. subtilis</i> | 0.25 |
| <i>S. aureus</i> | 18 |

In **Ppf**, l'attività antimicrobica potrebbe essere attribuita alla presenza di α -bergamotene e monoterpeni ossigenati.

Studi indicano che l' α -bergamotene possiede forti proprietà antibatteriche e antiossidanti, mentre i monoterpeni ossigenati hanno dimostrato un'ampia efficacia antimicrobica su vari ceppi batterici (Kotan et al. 2007).

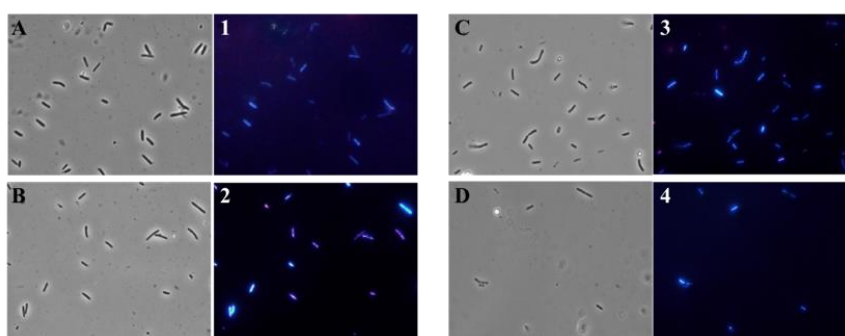


Figura 56. I pannelli mostrano immagini al microscopio a fluorescenza di cellule batteriche di *E. coli* (A-B) e *B. subtilis* (C-D) ottenute da immagini al microscopio ottico, e di *E. coli* (1-2) e *B. subtilis* (3-4) ottenute da immagini al microscopio a fluorescenza. Cellule batteriche non trattate (A-C, 1-3); cellule trattate con **Ppf** (B-D, 2-4).

Per chiarire il meccanismo d'azione di **Ppf**, è stata effettuata una microscopia a fluorescenza. Le cellule di *E. coli* e *B. subtilis* sono state colorate con DAPI e ioduro di propidio per valutare l'integrità della membrana. Le cellule non trattate hanno mostrato membrane intatte, mentre quelle trattate con **Ppf** (Figura 56, pannello 2) emettevano fluorescenza rossa, indicando danni alla membrana in *E. coli*. Tuttavia, *B. subtilis* non ha mostrato danni alla membrana (Figura 56, pannello 4), suggerendo diversi bersagli cellulari per **Ppf** nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

I monoterpenei ossigenati sono noti per danneggiare le membrane batteriche, specialmente nei Gram-negativi, disgregando la capsula polisaccaridica e aumentando la fluidità e permeabilità della membrana (Helander et al. 1998; Aelenei et al. 2016). I monoterpenei come timolo, carvacrolo, *p*-cimene e α -terpinene, grazie alla loro natura lipofila, interrompono la frazione lipidica delle membrane plasmatiche microbiche, permettendo loro di penetrare nelle cellule e interagire con strutture intracellulari cruciali per l'attività antibatterica (Baginska et al. 2023). L'azione antimicrobica di **Ppf** è probabilmente dovuta alla sinergia tra monoterpenei ossigenati e altri componenti minori, agendo sia sulle membrane microbiche sia su possibili bersagli intracellulari aggiuntivi.

Gli oli essenziali del genere *Pimpinella* sono stati indicati anche come promettenti antiossidanti naturali, utili per applicazioni mediche, incluso il trattamento anti-età (Nasir and Yabalak, 2021). Studi precedenti hanno mostrato che *P. tragiium* presenta un'attività antiossidante superiore rispetto ad acido gallico in alcuni test (Maggio et al. 2013). Per tale motivo è stato valutato il potere antiossidante di **Ppf**.

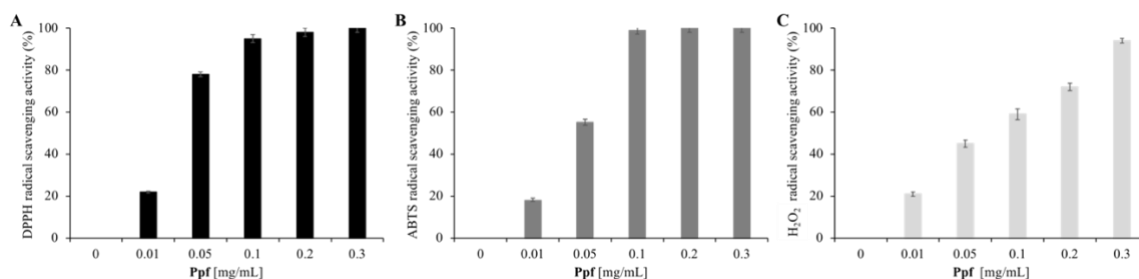


Figura 57. Attività antiossidante di **Ppf**.

Nel pannello A di Figura 57, la soluzione DPPH appare viola in assenza di **Ppf**; all'aumentare della concentrazione di OE (0,01-10,3 mg/mL), è aumentata la percentuale di eliminazione dei radicali. Il radicale DPPH viene neutralizzato dalla molecola antiossidante, che dona un atomo di idrogeno, formando un prodotto incolore. Nel pannello B, la soluzione ABTS è verde senza **Ppf** e, in presenza di antiossidanti, diventa incolore. Nel pannello C viene mostrata la percentuale di attività di eliminazione del perossido di idrogeno (H₂O₂); a differenza degli altri due test, la soluzione H₂O₂ rimane incolore. **Ppf** ha dimostrato una forte attività anti-DPPH e anti-ABTS, eliminando quasi il 100% dei radicali a una concentrazione di 0,3 mg/mL, mentre l'attività anti-H₂O₂, alla stessa concentrazione, è risultata leggermente inferiore (circa 96%).

Anche altre specie, come *P. anisum*, hanno mostrato un potenziale antiossidante significativo attribuito alla presenza di monoterpeni ossigenati (Gülçin et al. 2003).

Infine, i test su cheratinociti umani hanno mostrato che **Ppf** non ha effetti significativi sulla vitalità cellulare a 0,1 mg/mL e un effetto limitato su ROS, ma nessun effetto protettivo in condizioni di stress ossidativo indotto da perossido di idrogeno.

2.1.11 *Prangos* Lindley

Il genere *Prangos* Lindley appartenente alla famiglia delle Apiaceae, sottogruppo Apioideae, secondo Plants of the World Online (2024), comprende 48 specie accettate, distribuite ampiamente dall'area del Portogallo fino al Tibet. Il centro principale di diversità di questo genere è situato nella regione Irano-Turaniana (Pimenov and Tikhomirov, 1983). Questo genere è strettamente correlato a *Cachrys* L., *Bilacunaria* Pimenov & V. N. Tikhom. e *Hippomarathrum* Link (Lyskov et al. 2017; POWO 2024).

Le specie di *Prangos* rivestono una grande importanza come spezie e piante medicinali, specialmente in Iran, Turchia e Iraq. Le parti aeree, le radici e gli oli essenziali di diverse specie vengono utilizzati sia per uso interno che esterno. L'uso più comune è legato all'alleviamento di dolori gastrointestinali, ma in passato sono state usate come afrodisiache, coagulanti, carminative e toniche (Mottaghipisheh et al. 2020). Negli ultimi anni, è aumentato il numero di studi sugli effetti biologici delle specie di *Prangos*. (Mottaghipisheh et al. 2020). In letteratura sono presenti numerose informazioni relative ai metaboliti non volatili di diverse specie di *Prangos*, riportando la presenza di cumarine, furocumarine lineari e angolari, flavonoidi, terpenoidi e pironi in 16 specie del genere (Mottaghipisheh et al. 2020). Recentemente è stata pubblicata una review sui metaboliti non volatili (cumarine e flavonoidi) di *P. ferulacea* (L.) Lindl. e sulle loro proprietà biologiche (Bruno et al. 2019).

Per quanto riguarda gli oli essenziali, la specie più studiata è *P. ferulacea* (L.) Lindl., sebbene anche specie come *P. acaulis*, *P. odontalgica*, *P. asperula*, *P. cheilanthifolia* e altre siano state oggetto di indagini (Mottaghipisheh et al. 2020).

Gli oli essenziali del genere *Prangos* hanno mostrato, nel tempo, significative attività antiossidanti e antibatteriche. Per esempio, l'olio essenziale di *P. pabularia* ha dimostrato una notevole attività antibatterica a largo spettro, con concentrazioni inibitorie minime (MIC) comprese tra 2,06 e 5,00 $\mu\text{g/mL}$ (Banday et al. 2022). Altri oli essenziali di *P. peucedanifolia* hanno mostrato moderate attività antifungine e antibatteriche contro *Trichophyton rubrum* e batteri come *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Brusotti et al. 2013). Oli essenziali di specie come *P. heyntiae* e *P. uechtrizii* hanno anche dimostrato un notevole potenziale antiossidante (Zengin et al. 2022).

2.1.11.1 *Prangos trifida* (Mill.) Herrnst. & Heyn



Figura 58. *Prangos trifida*.

Prangos trifida (Mill.) Herrnst. & Heyn, una pianta erbacea perenne, è diffusa nella penisola iberica, Francia meridionale, Italia (limitata alla zona del confine ligure-francese), Balcani, Bulgaria e Crimea (Jury 2003). Solo due studi precedenti sono incentrati sull'ottenimento di fitocostituenti da *P. trifida*: uno ha identificato tre furocumarine (imperatorina, isoimperatorina e prantschimgin) con potenziali effetti inibitori sulle funzioni dei macrofagi coinvolti nei processi infiammatori (Abad et al. 2001); l'altro ha analizzato gli oli essenziali di quattro popolazioni spagnole (Palá-Paül et al. 2004).

Data la scarsità di informazioni sull'accessione italiana di *Prangos trifida* (**Pt**), e la mole di informazioni sull'attività biologica degli oli essenziali del genere *Prangos*, si è deciso di studiare la composizione chimica dell'OE (**Pt**), e di valutarne il potenziale antiossidante e antimicrobico.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Prangos trifida* ha prodotto un olio essenziale di colore giallo pallido. Complessivamente, sono stati identificati venticinque composti, rappresentanti il 91,30% della composizione totale. I componenti, elencati in Tabella A12 in base ai loro indici di ritenzione su una colonna DB-5MS, sono stati suddivisi in cinque classi chimiche: idrocarburi monoterpenici (71,26%), monoterpeni ossigenati (1,68%), idrocarburi sesquiterpenici (16,74%), sesquiterpeni ossigenati (1,31%) e diterpeni ossigenati (0,31%).

Pt si è rivelato particolarmente ricco di idrocarburi monoterpenici (71,26%), di cui i principali componenti sono stati il *cis*- β -ocimene (18,12%), l' α -fellandrene (12,14%), il silvestrene (11,32%), il *p*-menta-1,3,8-triene (9,56%) e l' α -pinene (8,85%). Gli idrocarburi sesquiterpenici, rappresentanti il 16,74% della composizione totale, sono stati caratterizzati principalmente da germacrene D (5,53%) e zingiberene (5,32%), mentre i monoterpeni ossigenati e i sesquiterpeni ossigenati sono stati presenti in quantità minori (rispettivamente 1,68% e 1,31%).

In linea con i risultati di **Pt**, le analisi delle composizioni chimiche degli oli essenziali ottenuti da *P. trifida* provenienti da Rivas-Vaciamadrid e Los Santos de Humosa, in Spagna (Palá-Paül et al. 2004), hanno rivelato un'elevata presenza di *cis*- β -ocimene (20,50-51,50%). Al contrario, nelle piante raccolte a Chinchón e Colmenar de Oreja, il *cis*- β -ocimene era completamente assente. Inoltre, gli altri due principali componenti di **Pt**, α -fellandrene e silvestrene, erano presenti in quantità minime in tutte e quattro le accessioni spagnole (Palá-Paül et al. 2004). È interessante notare che il limonene e il γ -terpinene, tra i principali costituenti delle piante spagnole, non sono stati presenti in **Pt**.

Il confronto tra la composizione chimica dell'olio di *P. trifida* italiana e gli oli di altre specie di *Prangos* ha mostrato che, sebbene molti taxa fossero ricchi di idrocarburi monoterpenici, il *cis*- β -ocimene era presente in quantità significative solo in *P. ferulacea* dall'Iran (Razavi et al. 2010) e in *P. pabularia* (Tabanca et al. 2016), evidenziando una possibile affinità di **Pt** con quest'ultime. D'altra parte, l' α -fellandrene è stato rilevato come uno dei principali composti in *P. asperula* dal Libano (Loizzo et al. 2008; Mneimne et al. 2016; Khoury et al. 2018), *P. peucedanifolia* dall'Iraq (Brusotti et al. 2013), *P. platychlaena* dalla Turchia (Uzel et al. 2006; Tabanca et al. 2018), *P. uechritzii* dalla Turchia (Başer et al. 2000b; Uzel et al. 2006) e in alcune accessioni di *P. ferulacea* (Bruno et al. 2019).

2.1.11.2 *Prangos trifida*: Attività Antimicrobica e Antiossidante

In letteratura sono presenti solo pochi studi sulle attività biologiche di *Prangos trifida* (Mill.) Herrnst. et Heyn, poiché è una pianta rara e in via di estinzione (Samigullin et al. 2018). Tuttavia, alcune ricerche dimostrano che gli estratti o i componenti delle specie del genere *Prangos* esercitano notevoli attività antibatteriche, antifungine, antiossidanti, antinfiammatorie, ipoglicemizzanti e analgesiche (Uzel et al. 2006). Per tale motivo è stato valutato l'effetto antimicrobico dell'accessione italiana di **Pt.** L'OE è stato testato utilizzando il metodo di diffusione su disco, il conteggio delle cellule per realizzare curve dose-risposta, il saggio MIC e la microscopia a fluorescenza. Nel primo esperimento, l'olio è stato impiegato contro due ceppi indicatori: il batterio Gram-positivo *Staphylococcus aureus* ATCC6538P e il Gram-negativo *Escherichia coli* DH5 α .

La caratterizzazione dell'OE di *P. trifida* ha rivelato la presenza di composti appartenenti alle classi di idrocarburi monoterpenici, monoterpeni ossigenati, idrocarburi sesquiterpenici, sesquiterpeni ossigenati e diterpeni ossigenati, noti per le loro proprietà antimicrobiche (Mottaghipisheh et al. 2020).

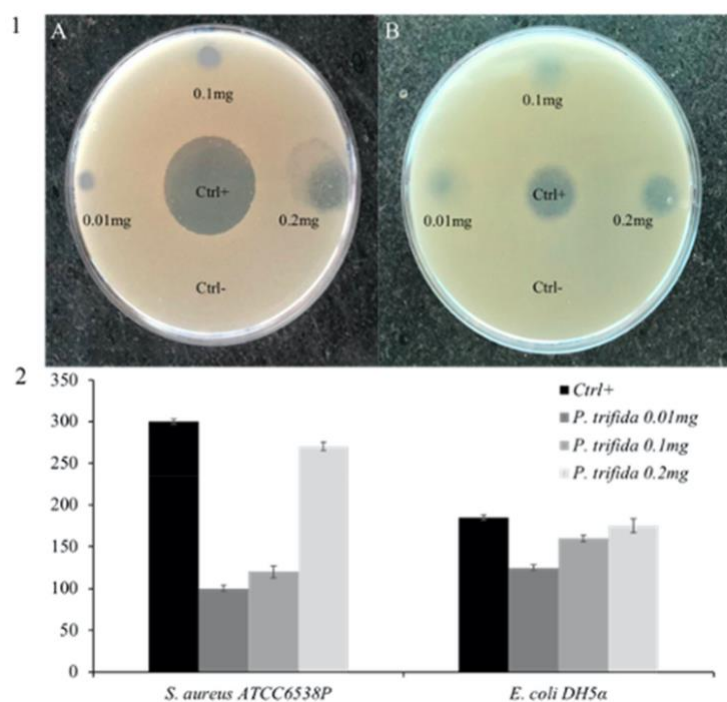


Figura 59. Il Pannello 1 mostra l'alone di inibizione dell'olio di *P. trifida* contro (A) *S. aureus* ATCC6538P e (B) *E. coli*. Il controllo positivo è rappresentato dall'ampicillina, mentre il controllo negativo è il dimetilsolfossido (DMSO 80%). Nel Pannello 2, l'alone di inibizione mostrato nel Pannello 1 è espresso in AU/mL. I valori sono espressi come media di tre esperimenti distinti, con deviazioni standard sempre inferiori al 10%.

Come mostrato nella Figura 59, l'olio essenziale è risultato attivo sia contro batteri Gram-negativi che Gram-positivi, riuscendo a inibire la crescita batterica formando un alone di inibizione quasi comparabile a quello dell'antibiotico ampicillina. Il DMSO all'80% utilizzato per risospendere l'olio ha rappresentato il controllo negativo, senza influenzare la crescita microbica (pannello 1, A e B). Nel pannello 2 della Figura 59 è riportata un'analisi quantitativa degli aloni di inibizione.

Per approfondire lo studio dell'attività antimicrobica dell'olio essenziale di *P. trifida*, è stato ampliato il pannello dei ceppi indicatori, includendo i Gram-positivi *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Bacillus subtilis* PY79, *Bacillus cereus* ATCC10987 e i Gram-negativi *Escherichia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* PAOI e *Salmonella typhimurium* ATCC14028.

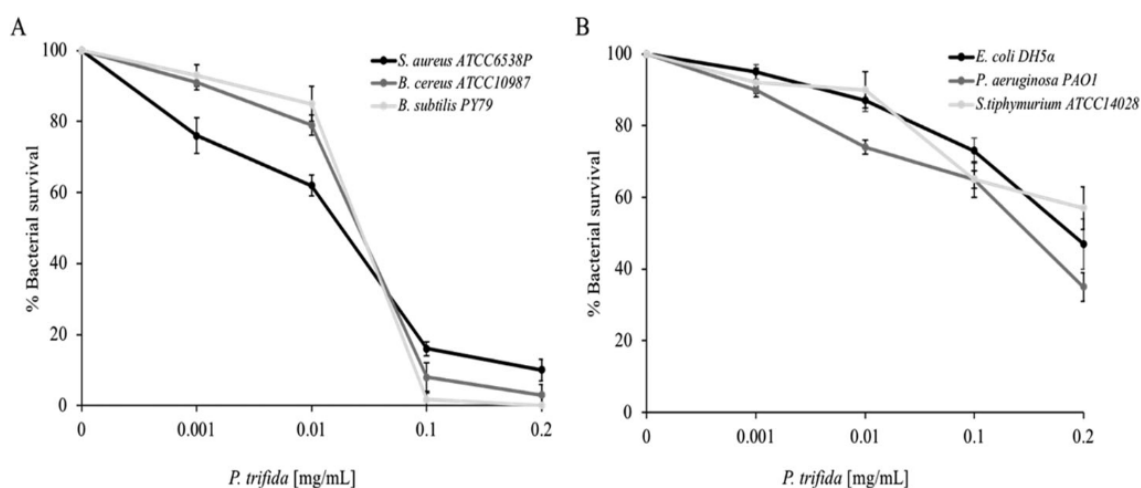


Figura 60. Attività antimicrobica di *P. trifida* a diverse concentrazioni (0; 0,001; 0,01; 0,1 e 0,2 mg/mL) valutata mediante conteggio delle colonie, dopo 4 ore di incubazione, contro (A): *S. aureus* ATCC6538P, *B. cereus* ATCC10987 e *B. subtilis* PY79; (B): *E. coli* DH5 α , *P. aeruginosa* PAOI, *S. typhimurium* ATCC14028. La percentuale di sopravvivenza batterica è rappresentata sull'asse delle ordinate (y). Gli esperimenti sono stati eseguiti in tre prove indipendenti.

Gli esperimenti condotti con il metodo del conteggio vitale hanno permesso di creare curve dose-risposta, che hanno mostrato un'attività antimicrobica dipendente dalla dose, in particolare contro i ceppi Gram-positivi (Figura 60).

Tabella 4. Valori della concentrazione minima inibente (MIC, mg/mL) di *P. trifida* contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi. I valori sono stati ottenuti da un minimo di tre esperimenti indipendenti.

| Strains | MIC [mg/mL] |
|---------------------------------|-------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC6538P | >0.2 |
| <i>B. cereus</i> ATCC10987 | 0.2 |
| <i>B. subtilis</i> PY79 | 0.12 |
| <i>E. coli</i> DH5 α | >0.2 |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO1 | >0.2 |
| <i>S. tiphymurium</i> ATCC14028 | >0.2 |

L'attività antimicrobica dell'olio è stata valutata anche con il metodo della microdiluizione in brodo. I valori di concentrazione minima inibitoria (MIC) sono stati compresi tra 0,12 e 0,20 mg/mL per i batteri Gram-positivi, come riportato nella Tabella 4, con le concentrazioni più basse osservate nei bacilli Gram-positivi. Risultati simili sono stati riportati per altre specie del genere *Prangos*, come *P. ferulacea*, che ha mostrato un valore MIC di 2 ppm contro *S. aureus* e *B. cereus* (Akbari et al. 2010). L'attività antibatterica degli oli essenziali ricchi di monoterpeni è ampiamente documentata: ad esempio, l'olio di *Melaleuca alternifolia*, ricco di monoterpeni ciclici, ha dimostrato un'ampia attività antimicrobica contro *S. aureus* ed *E. coli* (Cox et al. 2001; Jerković et al. 2012).

Per questo motivo, è plausibile attribuire l'attività antimicrobica di *P. trifida* principalmente alla presenza dei monoterpeni (71,60%). Tuttavia, risulta complesso collegare l'efficacia di una miscela così articolata a un singolo componente o a un gruppo specifico, poiché vi sono evidenze che i componenti minori possano svolgere un ruolo fondamentale, probabilmente attraverso un effetto sinergico tra i vari costituenti (Mneimne et al. 2016). È probabile, quindi, che la bioattività dell'olio essenziale sia il risultato di una sinergia tra i composti presenti (Mottaghipisheh et al. 2020).

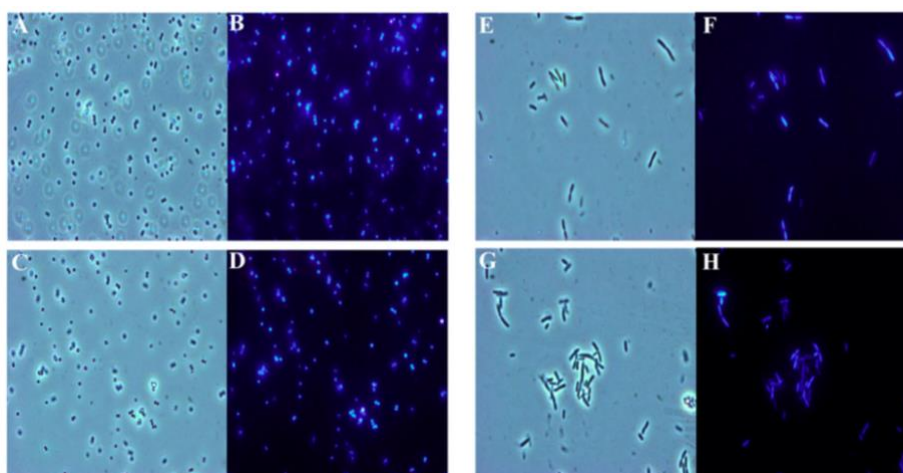


Figura 61. I pannelli nella figura mostrano cellule batteriche di *S. aureus* ATCC6538P (A, B, C, D) osservate al microscopio ottico (A, C) e al microscopio a fluorescenza (B, D). Cellule batteriche non trattate (A, B); cellule trattate con *P. trifida* (C, D). Cellule batteriche di *E. coli* DH5a (E, F, G, H) osservate al microscopio ottico (E, G) e al microscopio a fluorescenza (F, H). Cellule batteriche non trattate (E, F); cellule trattate con *P. trifida* (G, H).

Per approfondire ulteriormente l'attività antimicrobica e identificare un eventuale bersaglio specifico dell'olio di *P. trifida*, sono stati eseguiti esperimenti di microscopia a fluorescenza su cellule di *S. aureus* ed *E. coli*, come mostrato in Figura 61. Le cellule batteriche di controllo sono risultate intatte e di colore grigio scuro in microscopia a contrasto di fase ottico (Figura 61: pannelli A ed E), sviluppando fluorescenza blu nei pannelli B ed F. Le cellule trattate con l'olio di *P. trifida* non hanno mostrato alterazioni nella forma o nel colore (pannelli C e G), con un segnale di fluorescenza blu dovuto alla colorazione con DAPI, comparabile al controllo (pannelli D e H). Non è stato rilevato alcun danno alle membrane cellulari, poiché non si è sviluppata fluorescenza rossa dovuta all'entrata del colorante IP. Sebbene molti oli essenziali agiscano alterando la permeabilità della membrana batterica, sono possibili altri meccanismi. Ad esempio, uno studio di Wang et al. ha dimostrato che l'OE di zenzero può inibire l'espressione energetica di alcuni geni legati al metabolismo batterico, al ciclo dell'acido tricarbossilico, alle proteine legate alla membrana cellulare e al metabolismo del DNA (Wang et al. 2020).

Gli effetti terapeutici di numerose piante medicinali e verdure, comunemente usate sia come alimenti che nella medicina tradizionale per trattare diverse malattie, sono spesso attribuiti ai loro componenti antiossidanti. Studi precedenti hanno dimostrato che le piante del genere *Prangos* possono rappresentare una buona fonte di antiossidanti naturali per scopi medicinali (Dokovic et al. 2004; Kogure et al. 2004; Çoruh et al. 2007).

In uno studio condotto in Iran, è stata valutata l'attività di eliminazione dei radicali liberi degli estratti idroalcolici ottenuti da dieci campioni di *P. ferulacea* (Bagherifar et al., 2019). Questo studio ha evidenziato inoltre la presenza di monoterpeni idrocarburi (α - e β -pinene, δ -3-carene e β -fellandrene) come principali composti degli oli essenziali in quasi tutti i campioni di *P. ferulacea*, i quali si sono rivelati potenti antiossidanti.

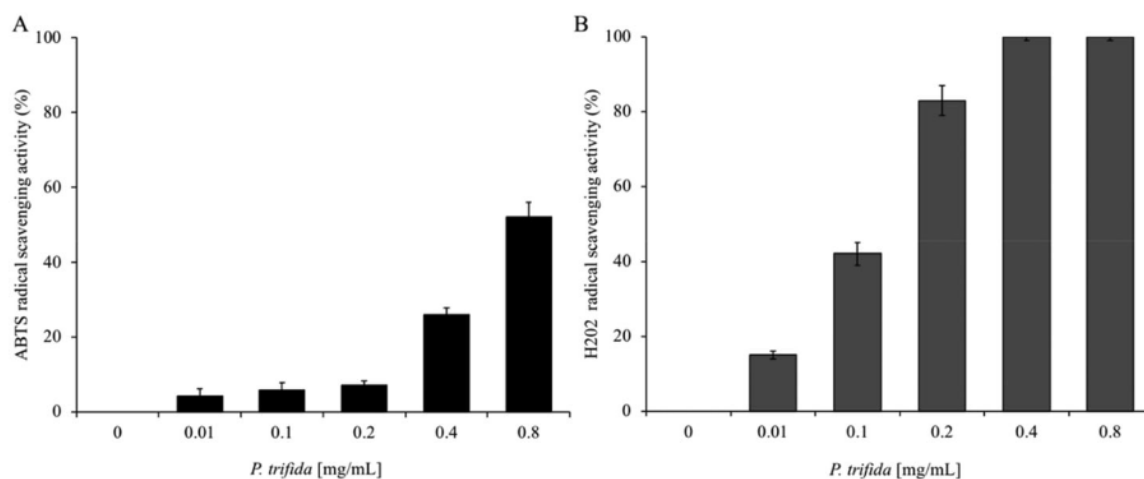


Figura 62. Attività antiossidante di *P. trifida*. (A) L'attività di eliminazione dei radicali è stata misurata dopo 10 minuti di incubazione e riportata come % di ABTS rimosso rispetto al controllo. (B) L'attività di eliminazione del perossido di idrogeno è stata misurata dopo 30 minuti di incubazione e riportata come % di H₂O₂ rimosso rispetto al controllo. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm SE (n = 5).

Considerando la presenza di idrocarburi monoterpeneici anche in **Pt**, è stata valutata la capacità di eliminazione dei radicali liberi. La Figura 62 mostra un aumento dell'attività di eliminazione dei radicali ABTS e H₂O₂ in funzione dell'incremento della concentrazione di OE (0,01–0,80 mg/mL).

Tabella 5. IC₅₀: concentrazione che ha inibito il 50% dei radicali liberi; ABTS: 2,20-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-acido solfonico); H₂O₂: perossido di idrogeno. Il controllo positivo era rappresentato dall'acido ascorbico per ABTS e dal resveratrolo per H₂O₂.

| Sample | IC ₅₀ of ABTS method (mg/mL) | IC ₅₀ of H ₂ O ₂ method (mg/mL) |
|-------------------|---|--|
| <i>P. trifida</i> | 0.8 | 0.11 |
| Positive control | 0.03 | 0.05 |

I dati riportati in Figura 62 sono espressi come valori di IC₅₀ nella Tabella 5, che rappresentano la concentrazione di olio essenziale necessaria per ridurre del 50% i radicali ABTS e H₂O₂. L'olio essenziale di *P. trifida* ha mostrato un'efficace attività anti-H₂O₂ con valori di IC₅₀ pari a 0,11 mg/mL, mentre ha avuto il massimo effetto anti-radicalico (valore IC₅₀ di 0,80 mg/mL) contro i radicali ABTS.

Diversi studi fitochimici, raccolti nella revisione di Mottaghipisheh, hanno evidenziato le ampie potenzialità terapeutiche dell'olio essenziale di *P. trifida*, come l'attività antimicrobica, fitotossica, antiossidante, ecc. (Mottaghipisheh et al. 2020).

Questi risultati suggeriscono che le piante del genere *Prangos* rappresentano una fonte ricca di composti fitochimici, con promettenti applicazioni sia in ambito terapeutico che economico. Con l'aumento della domanda di prodotti naturali, molte specie del genere *Prangos* vengono coltivate per usi che spaziano dalla medicina tradizionale, al mercato alimentare, all'industria cosmetica, fino all'uso ornamentale. I risultati ottenuti in questo studio aprono inoltre la strada a futuri approfondimenti sulle potenzialità di *Prangos* in vari settori.

2.1.12 *Seseli* L.

Il genere *Seseli* L., appartenente alla famiglia delle Apiaceae, è composto da erbe aromatiche di grande importanza economica, utilizzate come alimenti, spezie, condimenti e piante ornamentali (Küpeli et al. 2006). È ampiamente distribuito in Europa, Africa, Asia, Nord America e Australia e conta ottantasette specie e sottospecie accettate secondo The Plant List (2022), mentre la *Flora Europaea* ne riporta trentaquattro specie per l'Europa (Tutin et al. 1968).

Diverse specie di *Seseli* sono note fin dall'antichità per i loro effetti benefici sulla salute. Le radici di *S. mairei* Wolff., una pianta originaria della Cina, conosciuta come "*Zhu Ye Fang Feng*", vengono tradizionalmente utilizzate per trattare infiammazioni, gonfiore, reumatismi, dolori e raffreddori comuni (Hu et al. 1990). In India, i semi di *S. indicum* Wight & Arn. sono apprezzati per le loro proprietà antielmintiche, carminative, stomachiche e stimolanti (Tandan et al. 1990). Nella medicina popolare turca, il frutto di *S. tortuosum* L. è usato come emmenagogo e contro la flatulenza (Baytop 1999), e nel XIII secolo d.C., in Arabia Saudita, questa specie era impiegata come contraccettivo (Kaya et al. 2003). Inoltre, le foglie di *S. libanotis* (L.) W.D.J. Koch., chiamate "*Kelemkesir*" o "*Kelemenkesir*" in Turchia, vengono consumate come verdura (Baytop 1999).

Nel XVI e XVII secolo, Matthioli e Tabernaemontanus raccomandavano il succo delle radici di *Seseli* come rimedio per i dolori articolari (Adams et al. 2009), mentre l'intera pianta veniva utilizzata per preservare il formaggio, donandogli un aroma caratteristico [Öztürk and Ercişli, 2006]. Le specie di *Seseli* sono state ampiamente impiegate nella medicina tradizionale europea, mostrando una vasta gamma di proprietà terapeutiche, tra cui attività antibatteriche, antifungine, repellenti per insetti, emmenagoghe, anti-flatulenza, antinfiammatorie, antinocicettive, antitumorali e antireumatiche, oltre a effetti protettivi sul DNA dei linfociti umani (Ilić et al. 2015).

Un elemento distintivo del genere *Seseli* è la presenza di piranocumarine lineari o angolari con comprovate proprietà antinfiammatorie e antivirali (Tandan et al. 1990; Xie et al. 1999; Chun et al. 2016).

Le specie di *Seseli*, quindi, rappresentano una risorsa importante non solo per l'industria alimentare e ornamentale, ma anche per le loro applicazioni in campo medico grazie alla loro vasta gamma di proprietà terapeutiche.

2.1.12.1 *Seseli* endemici siciliani: Caratterizzazione degli oli delle parti aeree



Figura 63. *Seseli bocconeii*.



Figura 64. *S. tortuosum* subsp. *maritimum*.



Figura 65. *S. tortuosum* subsp. *tortuosum*

In Sicilia, sono state identificate solo tre specie di *Seseli*: *S. bocconei* Guss., *S. tortuosum* subsp. *tortuosum* e *S. tortuosum* subsp. *maritimum* (Guss.), mai studiate dal punto di vista fitochimico.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Seseli bocconei* Guss. ha prodotto un olio essenziale di colore giallo pallido (**Sb**). In totale sono stati identificati ventitré composti, che rappresentano il 91,96% dei componenti totali, elencati in Tabella A13 secondo i loro indici di ritenzione su una colonna DB-Wax e classificati in quattro categorie in base alle loro strutture chimiche. Gli idrocarburi monoterpenici costituiscono la principale classe, rappresentando il 55,98% dell'olio, con sabinene (17,46%), limonene (16,38%) e sylvestrene (11,69%) come componenti più abbondanti. Gli idrocarburi sesquiterpenici, la seconda classe più rappresentata (33,74%), con una quantità significativa di germacrene D (18,48%), il principale metabolita dell'olio. I terpenoidi ossigenati, sia monoterpeni che sesquiterpeni, sono risultati presenti in quantità molto ridotte, rispettivamente 1,98% e 0,26%, con il 4-terpineolo (1,98%) come principale costituente di queste due classi.

Il confronto tra **Sb** e gli oli essenziali di altri taxa di *S. bocconei* Guss. (*S. bocconei* subsp. *praecox* Gamisans) ha permesso di fare osservazioni interessanti. Infatti, sebbene le tre accessioni sarde di *S. bocconei* subsp. *praecox* studiate finora (Marongiu et al. 2006) abbiano mostrato, similmente a **Sb**, un basso contenuto di terpenoidi ossigenati, solo l'OE delle piante raccolte nell'area di Buggerru ha evidenziato quantità simili di idrocarburi monoterpenici (53,0%), con sabinene (20,1%) come principale prodotto, e idrocarburi sesquiterpenici (26,0%). D'altra parte, l'accessione raccolta nell'area di Carloforte è apparsa dominata dagli idrocarburi monoterpenici (>80%), mentre nelle piante raccolte ad Ogliastro predominavano

gli idrocarburi sesquiterpenici (53,0%) (Marongiu et al. 2006). In tutte le accessioni, sia il limonene che il sylvestrene sono stati totalmente assenti.

È interessante notare che il sabinene è stato il componente principale anche di altri oli essenziali di specie di *Seseli*, come *S. globiferum* Vis. dal Montenegro (Janačković et al. 2011; Stojković et al. 2008), *S. rhodopeum* Valen. e *S. rigidum* Waldst. & Kit. dalla Bulgaria (Todorova et al. 2012; 2013), *S. gummiferum* ssp. *ilgazense* A. Duran, Ö. Çetin & M. Öztürk dalla Turchia (Kurkcuoglu et al. 2018) e *S. libanotis* dalla Polonia (Skalicka-Wozniak et al. 2010).

Nonostante il germacrene D sia il costituente principale di **Sb**, esso è stato riscontrato in quantità significative solo nelle accessioni serbe di *S. peucedanoides* (M. Bieb.) Koso-Pol. (Petrović et al. 2019) e in *S. annuum* L. (Kovacevic et al. 2016; Milosavljević et al. 2007).

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Seseli tortuosum* L. subsp. *tortuosum* ha prodotto un olio essenziale di colore giallo pallido (**Stt**). In totale, sono stati identificati venti composti, rappresentanti il 96,34% dei componenti totali, elencati in Tabella A13 secondo i loro indici di ritenzione su una colonna DB-Wax e classificati in cinque classi basate sulle loro strutture chimiche. Gli idrocarburi monoterpenici hanno costituito la classe principale, rappresentando l'87,12% dell'olio, con β -pinene (15,81%), α -pinene (14,63%), 3-carene (14,58%), sylvestrene (11,18%) e *p*-cimene (11,14%) come componenti più abbondanti, presenti in quantità simili. I monoterpeni ossigenati, la seconda classe più rappresentata (4,71%), ha avuto come principale costituente il timolo metil etere (2,21%). Gli idrocarburi sesquiterpenici e i sesquiterpeni ossigenati si sono dimostrati presenti in quantità molto ridotte, rispettivamente 2,19% e 2,32%, con il farnesolo (2,10%) come principale componente di queste due classi.

L'olio essenziale di *S. tortuosum* subsp. *maritimum* (**Stm**) conteneva ventidue composti. Anche questo, come **Stt**, è risultato molto ricco di idrocarburi monoterpenici (83,24%), con β -pinene (19,84%), α -pinene (18,52%), sylvestrene (17,45%) e *p*-cimene (12,60%) come principali componenti. In questo caso, è interessante notare l'assenza totale di 3-carene. I monoterpeni ossigenati e gli idrocarburi sesquiterpenici sono stati presenti in quantità simili (rispettivamente 4,25% e 4,24%), con 2-isopropil-1-metossi-4-metilbenzene (2,52%) e γ -elemene (3,18%) come principali componenti di queste due classi.

Il confronto tra **Stt** e **Stm** e gli oli essenziali di altri taxa di *Seseli* ha portato a osservazioni interessanti. Infatti, sia il β -pinene che l' α -pinene sono risultati presenti in quantità significative nelle parti aeree di tutte le altre accessioni e sottospecie di *S. tortuosum* studiate

finora (Bader et al. 2003; Habibi et al. 2003; Kaya et al. 2003; Beeby et al. 2020), così come in diversi altri taxa, tra cui *S. globiferum* (Janačković et al. 2011), *S. bocconi* subsp. *praecox* (Marongiu et al. 2006), *S. montanum* subsp. *tommasinii*, *S. campestre* (Başer et al. 2000c; Kaya et al. 2010), *S. pallasi*, *S. rigidum* dalla Serbia (Savikin-Fodulović et al. 2006; Marčetić et al. 2012) e *S. peucedanoides* dal Montenegro (Bulatović et al. 2006).

Nonostante il *p*-cimene sia uno dei componenti principali di entrambi gli oli (**Stt** e **Stm**), è stato trovato in quantità moderate solo nelle parti aeree delle accessioni portoghesi di *S. tortuosum* (Beeby et al., 2020), di *S. tortuosum* subsp. *kiabii* (Habibi et al. 2003), di *S. bocconi* subsp. *praecox* (Marongiu et al. 2006) e di *S. libanotis* subsp. *armenicum* (Masoudi et al. 2006). D'altra parte, il sylvestrene è stato rilevato in quantità significative solo in *S. bocconei* dalla Sicilia (**Sb**) (Badalamenti et al. 2022c, Vaglica et al. 2022), mentre il 3-carene non è mai stato identificato in precedenza tra i metaboliti significativi (>3%) di tutti i taxa di *Seseli* studiati fino ad oggi.

2.1.12.2 Seseli endemici siciliani: Analisi GC-MS delle singole parti vegetative

Sono stati preparati anche gli oli essenziali delle diverse parti vegetative delle tre specie endemiche siciliane.

Il processo di idrodistillazione delle diverse parti vegetative di *Seseli bocconei*, compresi fiori (**FSb**), foglie (**LSb**) e steli (**SSb**), ha prodotto oli essenziali di colore giallo acceso. Dalle analisi GC-MS sono stati identificati venti composti nei fiori (95,03% del totale dei componenti), quattordici nelle foglie (91,07%) e dodici nei steli (91,22%) (Tabella A14). Gli oli essenziali isolati dalle parti aeree di *S. bocconei* hanno mostrato una significativa diversità nella loro composizione chimica. **FSb** è risultato possedere prevalentemente idrocarburi monoterpenici, con sylvestrene (33,62%), limonene (25,16%) e sabinene (19,22%) come costituenti principali. Al contrario, **LSb** principalmente da idrocarburi sesquiterpenici, con germacrene D (36,49%) e δ -cadinene (16,78%) come composti predominanti. **SSb** ha mostrato una composizione unica, costituita da una combinazione di idrocarburi monoterpenici (37,95%) e idrocarburi sesquiterpenici (53,27%), con germacrene D (24,53%), limonene (16,80%) e sabinene (15,26%) come componenti dominanti.

I dati ottenuti sono coerenti con i precedenti risultati sugli oli essenziali delle parti aeree di *S. bocconei*, in cui sabinene (17,46%), sylvestrene (11,69%) e germacrene D (18,48%) sono stati i componenti principali. Infatti, anche questa composizione differisce significativamente da quella degli oli essenziali estratti dalle parti aeree di *S. bocconi* subsp.

praecox, raccolti a Buggerru (Sardegna), che contenevano come unico componente comune il sabinene (20,10%). Gli oli essenziali di *S. bocconi* subsp. *praecox* erano caratterizzati anche dalla presenza di diversi terpeni ossigenati, come *trans*- β -terpineolo (6,30%), himachalolo (4,40%) e terpin-4-olo acetato (4,10%), assenti negli oli essenziali di *S. bocconi* (Marongiu et al. 2006).

Il processo di idrodistillazione delle varie parti vegetative di *S. tortuosum* subsp. *maritimum*, comprese fiori (**FStm**), steli (**SStm**) e radici (**RStm**), ha prodotto oli essenziali di colore giallo. Dalle analisi GC-MS sono stati identificati diciotto composti nei fiori (95,69% del totale dei componenti), nove nei steli (94,12%) e dodici nelle radici (91,32%) (Tabella A15). Come osservato per *S. bocconi*, anche per *S. tortuosum* subsp. *maritimum* sono state riscontrate significative differenze nella composizione chimica. **FStm** è risultato ricco di idrocarburi monoterpenici (51,91%) e altri composti non terpenici (29,38%), con β -cimene (24,32%), α -pinene (13,67%), sylvestrene (13,38%), α -terpinene (8,48%) e β -pinene (7,19%) come composti principali. Diversamente, **SStm** è risultato composto prevalentemente da idrocarburi monoterpenici (89,95%), con β -pinene (32,69%), α -pinene (23,75%) e sylvestrene (21,84%), già individuati in **FStm**, ma in quantità minori. Tra i principali componenti, è stato trovato anche il canfene (9,57%), assente nel campione precedente.

RStm ha mostrato una composizione diversa; infatti, gli idrocarburi monoterpenici (73,48%) non sono stati prevalenti come negli steli, ma è stata rilevata anche una buona quantità di altri composti non terpenici (13,09%). I composti più abbondanti sono stati α -pinene (32,75%), β -*cis*-ocimene (22,93%) e *allo*-ocimene (14,36%). Queste composizioni sono state coerenti con i risultati precedenti dell'OE delle parti aeree di *S. tortuosum* subsp. *maritimum*, dove i principali prodotti sono stati β -pinene (19,84%), α -pinene (18,52%), sylvestrene (17,45%) e β -cimene (12,60%).

Confrontando con altre accessioni di *S. tortuosum* provenienti dalla Turchia, è stato possibile dimostrare la differenza tra queste ultime e le accessioni siciliane: la composizione dell'olio essenziale dei fiori turchi includeva *trans*-sesquilandulolo (37,00%) e sabinene (19,00%) (Ozkirim et al. 2012), totalmente assenti in **FStm**.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Seseli tortuosum* subsp. *tortuosum* (**Stt**), ottenuta da tre diverse parti della pianta (fiori, steli e radici), ha prodotto oli essenziali di colore giallo paglierino. Complessivamente, sono stati identificati ventitré composti, dodici per l'olio essenziale dei fiori (**FStt**) (96,61% della composizione totale), dodici per l'olio essenziale

degli steli (**SStt**) (96,48%) e undici per l'olio delle radici (**RStt**) (92,07%). Tutti i composti identificati sono riportati Tabella A16. Sebbene i tre oli essenziali abbiano mostrato una percentuale simile della classe principale (idrocarburi monoterpenici), le loro composizioni chimiche risultavano molto diverse fra loro. **FStt**, rispetto agli altri due, è stato meno abbondante in idrocarburi monoterpenici (79,98%), con *p*-cimene (31,83%), α -pinene (11,43%), β -pinene (9,29%) e α -terpinene (9,25%) come principali componenti di questa classe. Gli idrocarburi sesquiterpenici sono stati rappresentati principalmente da γ -elemene (4,94%), mentre i sesquiterpeni ossigenati dal farnesolo (6,01%) e i monoterpeni ossigenati dall'anisolo (5,05%).

L'olio essenziale degli steli (**SStt**) ha mostrato un'abbondanza maggiore di idrocarburi monoterpenici (91,21%), con 3-carene (19,71%), β -pinene (19,32%), sylvestrene (17,20%) e α -pinene (16,36%) come metaboliti principali. La seconda classe più abbondante è stata quella dei monoterpeni ossigenati (4,56%), con il timolo metil etere (3,41%) come composto principale.

Infine, l'olio essenziale delle radici (**RStt**) è risultato differente dagli altri due, mostrando una quantità simile di idrocarburi monoterpenici (87,94%), ma con percentuali differenti di α -pinene (32,98%), β -pinene (13,65%) e 3-carene (11,57%), avendo inoltre β -ocimene (16,29%) e *allo*-ocimene (6,58%), composti assenti negli altri oli essenziali.

I dati ottenuti sono coerenti con i risultati precedenti sull'OE delle intere parti aeree di *S. tortuosum* subsp. *tortuosum*, dove i componenti principali sono stati β -pinene (15,81%), α -pinene (14,63%), 3-carene (14,58%), sylvestrene (11,18%) e *p*-cimene (11,14%). Tuttavia, né il β -*cis*-ocimene né l'*allo*-ocimene sono stati presenti in **Stt**, che invece sono risultati componenti principali in **RStt**.

Per quanto riguarda altre ricerche sugli oli essenziali di *S. tortuosum* L., la letteratura offre solo studi condotti sugli oli delle sole parti aeree, senza considerare le diverse parti separate della pianta, quindi non è possibile fare un confronto diretto con i dati di questo lavoro. Tuttavia, è possibile trarre alcune conclusioni, come il fatto che l'olio essenziale delle parti aeree di *S. tortuosum* raccolto in Iran ha mostrato una quantità significativa di β -fellandrene (14,9%), assente in **FStt** e **SStt** (Habibi et al. 2003). È interessante notare che l'olio di **SStt** è risultato diverso anche da quello di *S. tortuosum* raccolto in Turchia, che presentava una maggiore quantità di α -pinene (35,90%) e *trans*-sesquilandulolo (8,40%) (Kaya et al. 2003), e differente anche da quello raccolto a Pisa, in Italia, che conteneva principalmente mircene (29,20%) e acorenone (6,30%), composti assenti in **FStt** e **SStt** (Bader et al. 2003). I dati ottenuti sopra hanno inoltre mostrato differenze tra **Stt** e le altre due specie endemiche siciliane di *Seseli*: *S. tortuosum* subsp. *maritimum*, precedentemente discussa, e *S. bocconi*,

che ha mostrato una distribuzione quasi equa di idrocarburi monoterpenici (37,95%) e idrocarburi sesquiterpenici (53,27%), con germacrene D (24,53%) come principale metabolita.

2.1.12.3 *Seseli tortuosum* subsp. *maritimum* e *S. bocconei*: Attività

Citotossica

Per verificare se gli oli essenziali estratti da *Seseli tortuosum* subsp. *maritimum* possedessero effetti citotossici, le cellule di cancro al colon HCT116 sono state trattate per 48 ore con diverse dosi (da 125 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) di oli essenziali dei fiori, steli e radici di *S. tortuosum* subsp. *maritimum*. I dati sono stati confrontati anche con l'effetto esercitato dalla stessa gamma di concentrazione di oli essenziali estratti da fiori, foglie e steli di *S. bocconei*. Al termine del trattamento, la vitalità cellulare è stata valutata tramite il test MTT, che misura l'attività delle deidrogenasi mitocondriali (Lauricella et al. 2016).

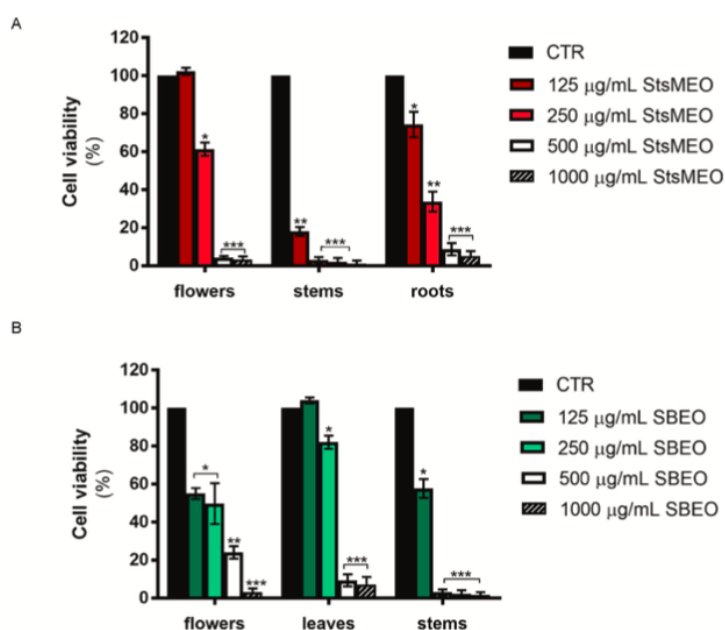


Figura 66. Effetti citotossici degli oli essenziali preparati da diverse parti di *S. tortuosum* subsp. *maritimum* (StsMEO) e *S. bocconei* (SBEO) sulle cellule di cancro al colon HCT116. La vitalità cellulare è stata calcolata dopo 48 ore di incubazione con varie dosi di StsMEO (pannello A), preparato da fiori, steli e radici, e SBEO estratto da fiori, foglie e steli (pannello B). I dati riportati nel grafico a barre sono espressi come media \pm SD di esperimenti eseguiti in triplicato. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ rispetto alla condizione non trattata.

I dati riportati nel pannello A della Figura 66 hanno dimostrato che gli oli essenziali di tutte le parti di *S. tortuosum* subsp. *maritimum* sono in grado di ridurre in modo marcato la vitalità delle cellule HCT116. In particolare, **SStm** è risultato il più attivo nell'inibire la vitalità delle cellule tumorali. Infatti, il trattamento delle cellule HCT116 con 125 $\mu\text{g/mL}$ di OE dei fusti

di *S. tortuosum* subsp. *maritimum* ha ridotto la vitalità cellulare dell'82%, mentre alla stessa dose **FStm** non ha esercitato effetti tossici e **RStm** ha ridotto la vitalità cellulare solo del 14%. Questi risultati potrebbero essere spiegati considerando la diversa composizione chimica di fiori, fusti e radici.

L'analisi degli effetti citotossici esercitati sulle cellule di cancro al colon HCT116 dagli oli essenziali preparati da diverse parti (fiori, foglie e steli) di *S. bocconeii* (pannello B della Figura 66) ha fornito prove che tutti gli oli essenziali esaminati di *S. bocconeii* hanno ridotto la vitalità cellulare. In particolare, come osservato per **StsMEO**, **SSb** è risultato il più efficace tra quelli testati di *S. bocconeii*. Infatti, già con una dose di 250 µg/mL, quasi tutte le cellule (97%) sono risultate morte. Tuttavia, confrontando gli effetti degli oli essenziali preparati dai fusti di *S. tortuosum* e *S. bocconeii*, i dati hanno mostrato che quelli ottenuti da *S. tortuosum* hanno avuto un'attività antiproliferativa più elevata rispetto a quelli estratti da *S. bocconeii*.

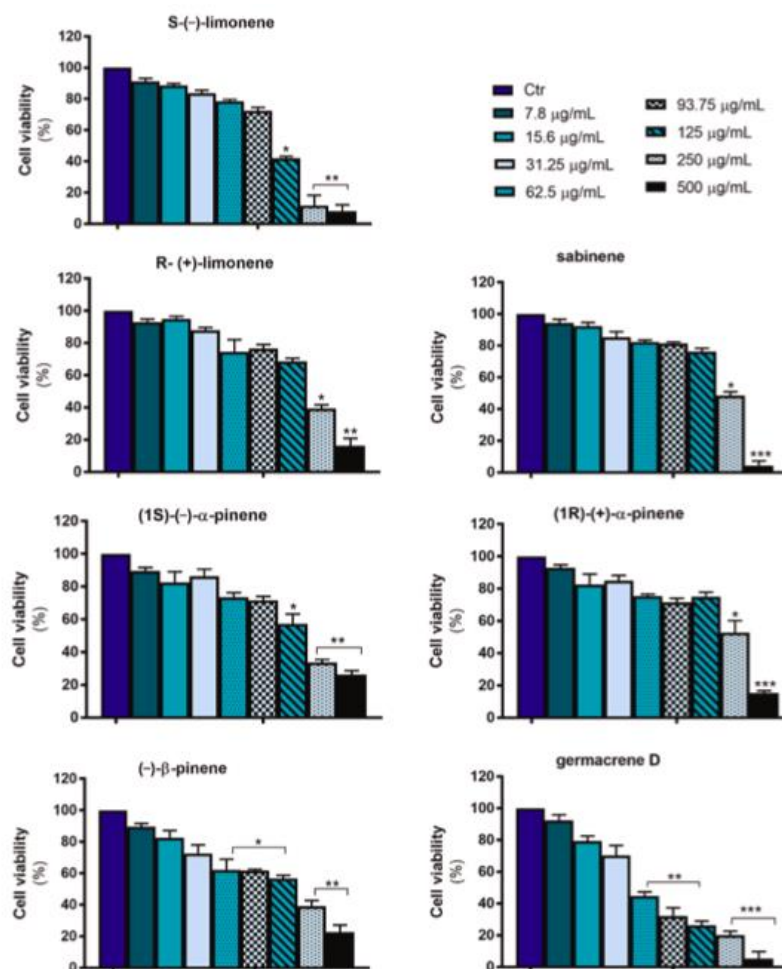


Figura 67. Analisi degli effetti citotossici dei principali fitocostituenti presenti negli oli essenziali di *S. tortuosum* subsp. *maritimum* e *S. bocconeii*. Le cellule di cancro al colon HCT116 sono state trattate con i composti indicati per 24 ore, dopodiché la vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTT come descritto

nei metodi. I dati riportati nel grafico a barre sono espressi come media \pm SD di esperimenti eseguiti in triplicato. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ rispetto alla condizione non trattata.

Per chiarire l'effetto citotossico degli oli essenziali dei fusti testati, è stato valutato l'impatto dei principali componenti sulla vitalità delle cellule di cancro al colon. Sono stati acquistati da Sigma-Aldrich *S*-(-)-limonene, *R*-(+)-limonene, sabinene, (1*S*)-(-)- α -pinene, (1*R*)-(+)- α -pinene e (-)- β -pinene, mentre il germacrene D è stato ottenuto al 62% da campioni freschi di olio essenziale di *Kundmannia sicula*. Confrontando l'effetto di diverse dosi di ciascun composto sulla vitalità delle cellule HCT116, si è osservato che tutti hanno ridotto la vitalità cellulare in modo dose-dipendente (Figura 67). Interessante che gli effetti siano stati già evidenti dopo 24 ore di incubazione.

Tabella 6. Valori di IC_{50} dei principali fitocostituenti degli oli essenziali di *Seseli tortuosum* subsp. *maritimum* e *S. bocconei*, testati su cellule di cancro al colon.

| Main Compounds | IC_{50} |
|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>S</i> -(-)-Limonene | 128.50 $\mu\text{g/mL}$ |
| <i>R</i> -(+)-Limonene | 167.09 $\mu\text{g/mL}$ |
| Sabinene | 253.06 $\mu\text{g/mL}$ |
| (1 <i>S</i>)-(-)- α -Pinene | 214.87 $\mu\text{g/mL}$ |
| (1 <i>R</i>)-(+)- α -Pinene | 228.20 $\mu\text{g/mL}$ |
| (-)- β -Pinene | 157.52 $\mu\text{g/mL}$ |
| Germacrene D | 47.93 $\mu\text{g/mL}$ |

Tuttavia, l'effetto citotossico più significativo è stato osservato quando le cellule HCT116 sono state incubate in presenza di germacrene D. Infatti, calcolando il valore di IC_{50} per tutti i composti testati (Tabella 6), si è notato che il germacrene D è stato in grado di ridurre la vitalità cellulare raggiungendo in 24 ore un IC_{50} di 47,93 $\mu\text{g/mL}$. Diversamente, tale effetto si è verificato a dosi più elevate quando le cellule tumorali sono state incubate con gli altri composti presenti negli oli essenziali di *S. tortuosum* subsp. *maritimum* e *S. bocconei*.

2.1.12.4 *Seseli tortuosum* subsp. *tortuosum*: Attività Citotossica

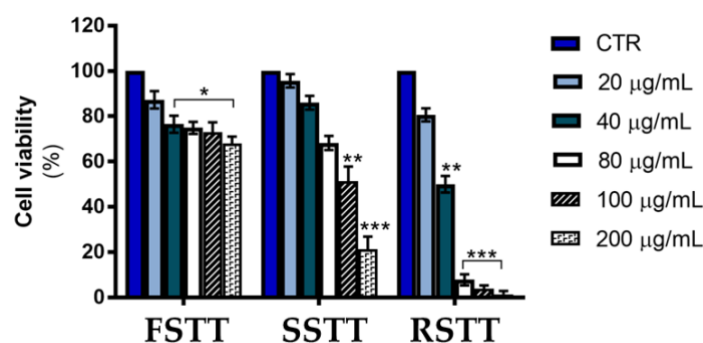


Figura 68. Gli effetti citotossici esercitati da *FStt*, *SStt* e *RStt* sulle cellule di carcinoma del colon *HCT116* sono stati analizzati dopo 24 ore di trattamento con diverse dosi di ciascun olio essenziale. La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il saggio MTT. I dati riportati nel grafico a barre sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) di esperimenti eseguiti in triplicato. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ rispetto alle cellule non trattate.

Per verificare se anche gli oli essenziali di *Seseli tortuosum* subsp. *tortuosum* potessero esercitare un'attività antiproliferativa nelle cellule tumorali, è stato condotto un saggio di vitalità cellulare MTT su *HCT116*. Le cellule sono state trattate per 24 ore con dosi differenti (intervallo 20-200 $\mu\text{g/mL}$) di oli essenziali estratti dai fiori (**FStt**), radici (**RStt**) e fusti (**SStt**), prima di procedere con l'analisi della vitalità cellulare. I dati riportati in Figura 68 hanno evidenziato che tutti gli oli essenziali riducono la vitalità delle cellule in modo dose-dipendente. Tuttavia, confrontando gli effetti dei diversi oli, si è osservato che **SStt** e **RStt** hanno esercitato un notevole effetto citotossico sulle cellule *HCT116*, con **RStt** il più efficace, mentre effetti modesti sono stati osservati con **FStt**. Infatti, alla dose di 100 $\mu\text{g/mL}$, la vitalità delle cellule *HCT116* è stata ridotta del 95% con **RStt**, del 42% con **SStt** e solo del 22% con **FStt**.

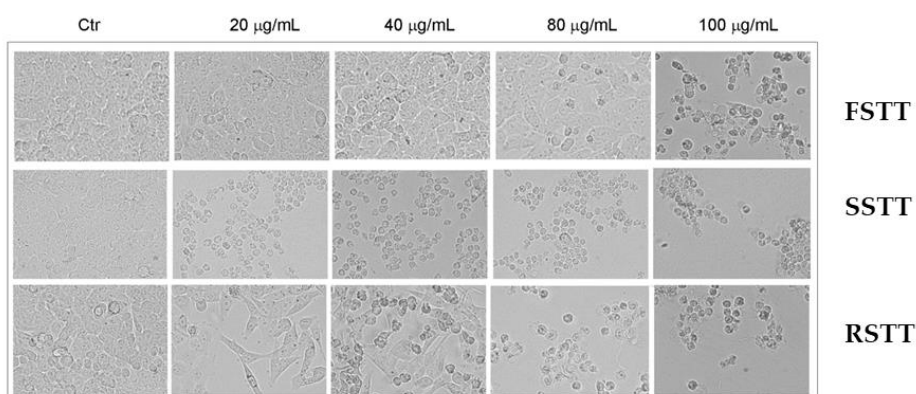


Figura 69. Gli effetti morfologici esercitati dagli oli essenziali preparati da *FStt*, *SStt* e *RStt* sulle cellule di carcinoma del colon *HCT116* sono stati osservati dopo l'incubazione con i rispettivi EO. Le immagini sono

state acquisite con un ingrandimento di 200X utilizzando il microscopio OPTIKA IM3FL4, dotato di un sistema di fotocamera digitale (OPTIKA).

Questi dati sono stati confermati dalle immagini al microscopio, che hanno mostrato come il trattamento delle cellule tumorali con oli essenziali di radici e fusti, fosse accompagnato da cambiamenti morfologici, tra cui il restringimento cellulare e la riduzione del numero di cellule.

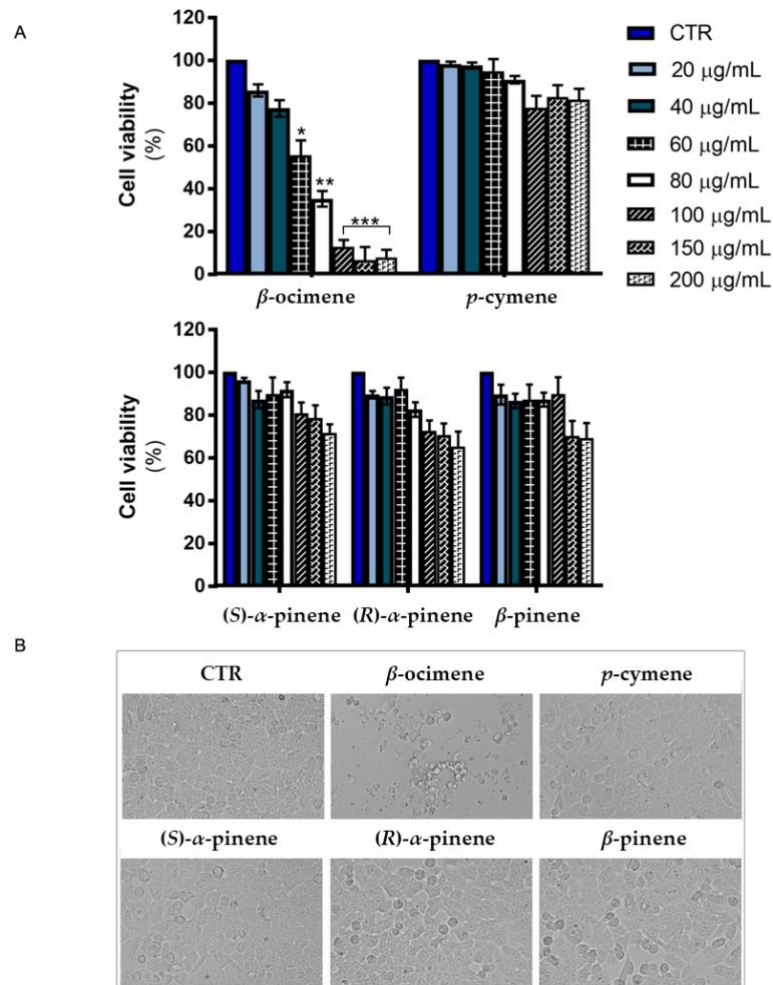


Figura 70. Analisi dell'impatto dei principali fitocomposti identificati negli OE di *STt* sulla vitalità delle cellule di carcinoma del colon HCT116. (A) Le cellule di carcinoma del colon HCT116 sono state trattate con i composti indicati per 24 ore, quindi la vitalità cellulare è stata valutata tramite il saggio MTT come riportato nei metodi. I dati riportati nel grafico a barre sono espressi come media \pm SD di esperimenti eseguiti in triplicato. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ rispetto alla condizione non trattata; (B) Effetti morfologici esercitati dalla dose di 100 $\mu\text{g/mL}$ dei principali fitocomposti (β -ocimene, *p*-cimene, (S)- α -pinene, (R)- α -pinene e β -pinene) presenti negli OE sulle cellule di carcinoma del colon HCT116. Le immagini sono state scattate con un ingrandimento di 200X tramite il microscopio OPTIKA IM3FL4.

Per chiarire quali composti potessero essere responsabili degli effetti citotossici degli oli essenziali di *S. tortuosum*, è stato valutato l'impatto dei principali componenti sulla vitalità delle cellule HCT116 (Figura 70A). Confrontando l'effetto di dosi differenti (20-200 $\mu\text{g/mL}$) di ciascun composto, è stato osservato che il β -*cis*-ocimene ha mostrato l'effetto citotossico più significativo. Infatti, calcolando la concentrazione inibitoria media (IC_{50}) per questo composto, è stato trovato un valore di $\text{IC}_{50} = 64.52 \mu\text{g/mL}$ dopo 24 ore di trattamento. Questo effetto è stato confermato anche da analisi morfologiche al microscopio ottico (Figura 70B), che hanno evidenziato un chiaro effetto citotossico nelle cellule trattate con β -*cis*-ocimene. Infatti, l'incubazione in presenza di β -*cis*-ocimene ha causato una riduzione del numero di cellule e il restringimento cellulare, due caratteristiche tipiche della morte cellulare programmata. Al contrario, nessun effetto citotossico significativo è stato osservato quando altri composti (*p*-cimene, (*S*)- α -pinene, (*R*)- α -pinene e β -pinene) sono stati testati sulle cellule HCT116.

2.1.12.5 *S. bocconei*: Attività Pesticida

Degli oli essenziali di *S. bocconei* è stato valutato anche il potenziale pesticida nei confronti due parassiti dei prodotti immagazzinati, *Sitophilus oryzae* e *Callosobruchus maculatus*.

I valori di LT_{50} calcolati per gli oli estratti dai fusti e dalle foglie di *S. bocconei* nei confronti degli adulti di *S. oryzae* sono stati rispettivamente 53.38 e 42.97 ore dal trattamento, mentre gli oli essenziali dei fiori non hanno indotto una mortalità diversa dal solvente. In modo simile, i valori di LT_{50} calcolati per gli oli essenziali dei fusti e delle foglie nei confronti degli adulti di *C. maculatus* sono stati rispettivamente 45.23 e 42.97 ore, mentre gli oli essenziali dei fiori anche qui, non hanno mostrato una mortalità diversa dal solvente.

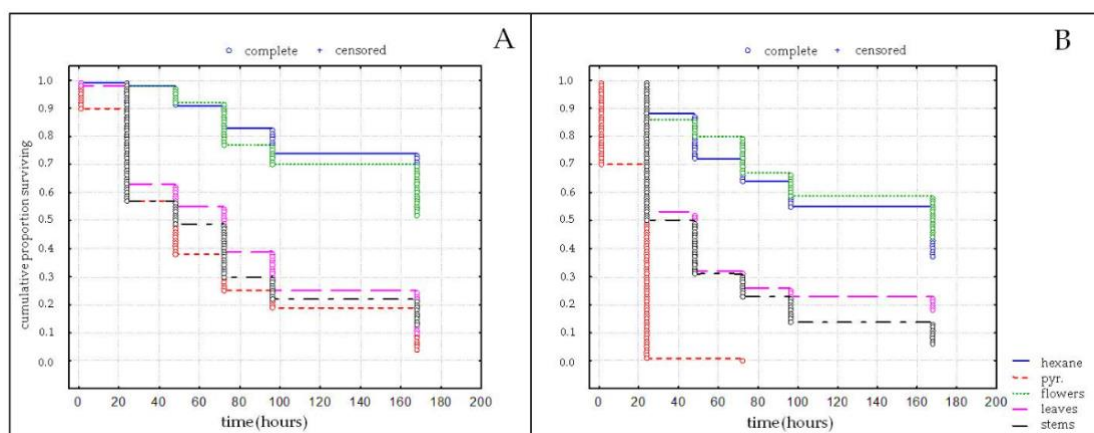


Figura 71. Le curve di sopravvivenza degli adulti di *Sitophilus oryzae* (A) e *Callosobruchus maculatus* (B), trattati con soluzioni in esano al 10% di oli essenziali di *Seseli bocconei* provenienti da diverse parti della pianta, sono rappresentate in figura. In dettaglio, la linea verde indica gli OE estratti dai fiori, la linea viola

quelli dagli steli, e la linea nera quelli dalle foglie. Il solvente esano è stato utilizzato come controllo negativo (linea blu), mentre il piretro è stato impiegato come controllo positivo (linea rossa).

Gli effetti dell'uso degli oli essenziali delle diverse parti aeree di *S. bocconei* sul tempo di sopravvivenza di *S. oryzae* e *C. maculatus* sono riportati nella Figura 71. In entrambi gli esperimenti, è stato osservato un effetto significativo degli oli testati sulla mortalità delle due specie di insetti. In particolare, *S. oryzae* ha mostrato differenze molto significative nella mortalità degli adulti ($\chi^2 = 165.81$; $df = 4$; $p < 0.001$), con tassi di sopravvivenza degli individui trattati con oli essenziali di *S. bocconei* da fusti e foglie, simili a quelli trattati con piretro (Figura 71, Pannello A). Anche gli adulti di *C. maculatus* hanno mostrato tassi di sopravvivenza diversi tra i trattamenti ($\chi^2 = 226.15$; $df = 4$; $p < 0.001$), con i tassi di sopravvivenza più bassi determinati dal piretro, ma significativamente inferiori negli individui trattati con gli oli essenziali dei fusti e delle foglie di *S. bocconei*, rispetto al solvente e a quello ottenuto dai fiori (Figura 71).

I dati del bioassay di tossicità hanno evidenziato che **SSb** e **LSb** hanno un effetto tossico sulle due specie di insetti testate, mentre **FSb** non ha mostrato una mortalità diversa dal solvente. Considerando il tipo di biosaggio condotto, non è stato possibile determinare se la tossicità mostrata dagli oli essenziali fosse determinata dal contatto, dall'attività fumigante o da entrambi. In particolare, contro *S. oryzae*, gli oli essenziali di fusti e delle foglie hanno mostrato una tossicità simile a quella del piretro e superiore a quella osservata negli insetti trattati con il solvente. Invece, la tossicità osservata negli adulti di *C. maculatus* è risultata inferiore rispetto al piretro, ma comunque superiore a quella determinata dal solvente. Gli oli essenziali dei fusti e delle foglie di *S. bocconei* hanno mostrato valori di mortalità corretta dopo 96 ore pari a 66.22% e 70.27%, rispettivamente, contro *S. oryzae*, e 58.18% e 74.55%, rispettivamente, contro *C. maculatus*.

Sebbene siano stati testati gli oli essenziali nella loro interezza e non i loro singoli componenti, i risultati ottenuti potrebbero essere attribuibili all'elevato contenuto di sesquiterpeni presenti, e alla ridotta abbondanza di tali composti nei fiori. In particolare, il sesquiterpene comune a foglie e fusti è stato il germacrene D, presente in percentuali superiori al 35% in **LSb** e intorno al 25% in **SSb**. Studi precedenti hanno evidenziato che gli oli essenziali ricchi di questo composto hanno attività insetticida. Ad esempio, gli oli essenziali di *Artemisia capillaris* e *A. mongolica*, contenenti rispettivamente il 10% e l'8% di germacrene D, hanno mostrato tossicità (sia per contatto che fumigante) contro il punteruolo del mais, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) (Iiu et al. 2010), mentre quelli ottenuti da *Artemisia campestris*, contenenti il 9% di germacrene D, hanno evidenziato

una notevole tossicità contro *Culex quinquefasciatus* e una tossicità moderata contro *Musca domestica* (Ammar et al. 2020). Inoltre, gli oli essenziali di *Lantana camara* (Sundufu and Shoushan, 2004), con un'alta percentuale di germacrene D, hanno mostrato tossicità verso *Callosobruchus chinensis* (Saxena et al. 1992).

Uno studio recente di Pereira et al. ha mostrato che le nanosfere derivate dagli oli essenziali dei frutti di *Zanthoxylum rhoifolium*, contenenti l'8% di germacrene D, hanno evidenziato attività biocida promettente verso *Bemisia tabaci* (Pereira et al. 2022). Un altro studio recente di De Oliveira et al. ha dimostrato che il germacrene D inibisce l'acetilcolinesterasi, causando la morte larvale di *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, e ha mostrato minore tossicità verso fauna acquatica non bersaglio rispetto all'insetticida sintetico temephos (De Oliveira et al. 2022). Gli oli essenziali testati e i principali componenti presenti, in particolare il germacrene D e altri sesquiterpeni, potrebbero essere considerati candidati promettenti per ulteriori studi in condizioni di laboratorio e semi-campo, con l'obiettivo di sviluppare strumenti alternativi per la gestione dei parassiti. In questo contesto, i problemi legati alla produzione e distribuzione dei pesticidi a base vegetale rappresentano le principali sfide, insieme alla necessità di avviare una campagna di sensibilizzazione che affronti l'uso degli insetticidi a base vegetale con le comunità locali e gli agricoltori (Grzywacz et al. 2014).

2.1.13 *Thapsia* L.

Il genere *Thapsia* L., appartenente alla tribù delle *Laserpitiae* all'interno della famiglia delle Apiaceae, comprende quattordici specie secondo le più recenti ricerche filogenetiche (Weitzel et al. 2014). Queste specie sono principalmente distribuite nella regione mediterranea, nel Nord Africa e nella penisola iberica. Il nome *Thapsia* sembra derivare da *Thapsos*, un antico villaggio siciliano che gli antichi Greci consideravano il luogo di origine della pianta. La pianta in questione, chiamata silfio, probabilmente *Thapsia garganica*, era una pianta medicinale con proprietà purgative ed emetiche che veniva esportata dalla colonia greca di Cirene (Greive 1996).

Thapsia garganica L. è una specie distribuita nella regione mediterranea, in Nord Africa, nell'Europa meridionale (Grecia, Baleari, Italia, Sicilia, Sardegna) e in Turchia (Euro+Med PlantBase 2024).

L'utilizzo della resina estratta dalle radici di *Thapsia garganica* L. risale a tempi antichi. Le sue proprietà curative contro malattie respiratorie, catarro e dolori reumatici sono state descritte da autori come Teofrasto (372-287 a.C.), Dioscoride (circa 50 d.C.) e Plinio il Vecchio (24-79 d.C.), e successivamente anche nella medicina araba ed europea (Casiglia et al. 2016). Oggi, questa pianta è largamente impiegata nella medicina tradizionale del Nord

Africa. In Algeria, le radici di *Thapsia garganica* L., conosciute localmente come “*Deries*, *Adarys*, *Bounnafaa*”, sono utilizzate esternamente per trattare infiammazioni articolari, irritazioni cutanee ed eczema (Bouasla and Bouasla, 2017). L'infusione della pianta viene utilizzata anche per problemi respiratori (Hadj-Said and Bouazza, 2023) e dolori reumatici (Miara et al. 2019). Un'infusione delle parti aeree viene consumata tre volte alla settimana per curare infezioni della vescica e infiammazioni renali (Taïbi et al. 2021).

In Marocco, l'infuso della radice è impiegato per trattare tumori al seno, alla prostata e al fegato (Amrati et al. 2021), e un uso simile è stato registrato anche in Algeria (Taïbi et al. 2020).

Diversi composti biologicamente attivi, come i sesquiterpenoidi, sono stati identificati negli estratti non volatili di *T. garganica* (Drew et al. 2009; Andersen et al. 2015). Inoltre, in campioni provenienti dall'Algeria sono stati trovati flavonoidi con proprietà antiossidanti (Chibani et al. 2014), mentre in esemplari raccolti a Ibiza (Spagna) è stata rilevata la presenza di fenilpropanoidi aventi proprietà citotossiche (Liu et al. 2006) e lipidi (Liu et al. 2004). Le radici di popolazioni della Libia sono risultate particolarmente ricche di cumarine (Larsen and Sandberg, 1970).

2.1.13.1 Thapsia garganica subsp. Messanensis (Guss.) Brullo, Guglielmo, Pasta, Pavone and Salmeri



Figura 72. *Thapsia garganica subsp. messanensis*.

Numerosi studi hanno analizzato la composizione dell'olio essenziale estratto da diverse parti di *T. garganica*, tra cui radici, frutti, fiori, fusti, foglie e semi (Avato 1991; Avato and

Rosito 2002; Ladjel et al. 2011; Drew et al. 2012; Evergetis and Haroutounian, 2014; Hassen et al. 2015; Casiglia et al. 2016; Hachem et al. 2017; Khemis et al. 2023). Tuttavia, nessuno di questi studi ha preso in esame la sottospecie *Thapsia garganica* subsp. *messanensis* (**Tgm**), una pianta molto rara, endemica della Sicilia, che cresce in una zona piuttosto limitata della Sicilia nord-orientale (Brullo et al. 2008).

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Thapsia garganica* subsp. *messanensis* ha prodotto un olio essenziale di colore blu (**Tgm**). Complessivamente, sono stati identificati quarantacinque composti, rappresentanti il 99,0% del totale dei componenti. Tali composti, elencati nella Tabella A17 in base agli indici di ritenzione su una colonna DB-5MS, sono stati classificati in sei categorie principali sulla base delle loro strutture chimiche.

Tgm si distingue per l'elevato contenuto di sesquiterpenoidi (52,4%), con gli idrocarburi sesquiterpenici che costituiscono la principale classe chimica (46,7%). Tra questi, i composti più abbondanti sono risultati essere il 1,4-dimetilazulene (17,0%) e il camazulene (10,1%), i due metaboliti principali dell'olio. Sono stati rilevati anche altri sesquiterpeni, tra cui γ -elemene (4,3%) e δ -cadinene (3,4%), in quantità considerevoli. Anche gli idrocarburi risultano ben rappresentati (17,7%), con il 3-metilnonano (7,0%) e l'undecano (4,6%) come principali costituenti. Tra i composti carbonilici (17,1%), i più rilevanti sono stati il butil eptanoato (4,9%) e il nonanale (3,7%).

Il confronto tra la composizione dell'olio essenziale di **Tgm** e quella dell'OE della popolazione siciliana di *Thapsia garganica* (Casiglia et al. 2016), nonché con altre popolazioni di *Thapsia garganica* riportate in letteratura (Tabella A18), ha evidenziato diversi aspetti interessanti. Il 1,4-dimetilazulene, principale costituente di **Tgm**, è stato rilevato in quantità moderate (7,0%-6,1%) nelle parti aeree di *Thapsia garganica* raccolte in Algeria (Ladjel et al. 2011) e in Italia (Avato 1991), entrambe caratterizzate da un'elevata presenza di *p*-vinilguaiacolo. Quantità maggiori di questo composto sono state invece trovate nei semi di piante raccolte in Tunisia (51,3%) (Khemis et al. 2023) e nelle foglie della popolazione siciliana (18,5%) (Casiglia et al. 2016). Il camazulene, secondo metabolita più abbondante in **Tgm** (10,1%), è stato identificato come principale costituente negli oli essenziali estratti dai fiori e dalle foglie della popolazione siciliana di *T. garganica* (58,3% e 49,2%, rispettivamente) (Casiglia et al. 2016), mentre quantità moderate sono state rilevate nei semi (4,0%) (Khemis et al. 2023) e nelle parti aeree (0,3%) di *T. garganica* raccolte in Tunisia (Hassen et al. 2015), caratterizzate anche da un'elevata quantità di biciclogermacrene. Altri taxa di *Thapsia* studiati, come *T. maxima* Mill. (Avato et al. 1992;

Avato and Smitt, 2000), *T. minor* Hoffgg. e Link (Gonçalves et al. 2012), e *T. villosa* L. (Avato et al. 1996a; 1996b; Avato and Smitt, 2000; Rufino et al. 2015), non hanno mostrato una presenza significativa di derivati dell'azulene.

Il 1,4-dimetilazulene è stato chiaramente identificato come un artefatto formatosi durante il processo di distillazione, derivante dal guaianolide slovanolide, un metabolita isolato da *Thapsia garganica* (Smitt et al. 1986). Anche il camazulene è considerato un artefatto, formatosi attraverso reazioni idrolitiche e di eliminazione a partire da lattoni guaiani proazulenici come matricina, artabsina, epimaticicina e analoghi. Tale composto si forma durante il processo di distillazione ed è responsabile del caratteristico colore blu dell'olio distillato (Appendino and Gariboldi, 1982; Ramadan et al. 2006).

Nonostante *Thapsia garganica* subsp. *messanensis* sia una pianta piuttosto rara, sarà di grande interesse in futuro approfondire lo studio degli estratti non volatili, al fine di identificare i sesquiterpeni proazulenici presenti in natura e i diversi sesquiterpeni noti in letteratura per la loro peculiarità e il loro ampio spettro di attività biologiche.

2.1.14 *Tordylium* Tourn. ex L.

Il genere *Tordylium* Tourn. ex L. è diffuso in quasi tutti i paesi che si affacciano sul Mediterraneo. Queste piante sono ampiamente utilizzate nella medicina tradizionale, specialmente nella parte orientale del Mediterraneo, oltre a essere comunemente consumate come alimento. Il genere *Tordylium* comprende venti specie accettate secondo POWO, di queste sono native siciliane soltanto due: *Tordylium apulum* L. e *Tordylium maximum* L. (POWO 2024).

2.1.14.1 *Tordylium apulum* L.



Figura 73. *Tordylium apulum*.

Tordylium apulum L., una specie steno-mediterranea, è presente in quasi tutti i paesi che circondano il Mediterraneo e appartiene alla famiglia delle Apiaceae (Apioideae). Si tratta di una pianta erbacea annuale che può raggiungere un'altezza di 50-60 cm, con uno stelo eretto, costolato, più o meno rigido, ramificato, con peli morbidi e sparsi, più concentrati alla base e più radi verso l'alto.

T. apulum è ampiamente utilizzato come spezia in Grecia, dove è conosciuto con il nome di "kalfalithra" (Kofinas et al. 1998a). Alcune ricerche sui metaboliti non volatili di questa specie hanno portato all'isolamento e identificazione di diverse cumarine e quattro flavonoidi, alcuni dei quali hanno dimostrato proprietà antifungine e citotossiche (Kofinas et al. 1998a; 1998b). Inoltre, è stata effettuata una determinazione quantitativa del contenuto di flavonoidi come miricetina, quercetina, kaempferolo, isoramnetina e luteolina su piante raccolte in Grecia (Trichopoulou et al. 2000).

Anche in Italia il consumo di questa pianta come alimento è stato documentato. In Italia centrale, *T. apulum*, conosciuto con vari nomi vernacolari (zampa d'oca, pimpinellone, ombrellini pugliesi o saporitella), viene utilizzato in insalate o per aromatizzare torte salate e zuppe. Nella medicina popolare era raccomandato per prevenire la caduta dei capelli, trattare malattie nervose, stimolare la mestruazione e come espettorante (Ranfa et al. 2015). Un uso simile è stato riportato dagli Albanesi etnici (*Arbëreshë*) nell'area del Vulture, in Italia meridionale (Pieroni et al. 2002). Gli estratti delle foglie della varietà italiana di *T. apulum* hanno mostrato buone proprietà antiossidanti (Savo et al. 2019) con una notevole attività inibitoria (>50%) nel saggio di perossidazione lipidica (Pieroni et al. 2002). Data la mancanza di lavori sull'accessione siciliana di *T. apulum*, e l'ampio utilizzo di quest'ultima nella cultura alimentare e medicinale tradizionale, si è deciso di investigarne la composizione chimica le proprietà antiossidanti dell'olio essenziale ottenuto dalle parti aeree.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Tordylium apulum* (**Ta**) ha prodotto un olio essenziale di colore giallo pallido. In totale, sono stati identificati sedici composti, rappresentanti il 96,47% della composizione totale. Nella Tabella A19, i componenti sono stati elencati in base ai loro indici di ritenzione su una colonna DB-Wax e classificati in cinque classi chimiche: idrocarburi monoterpenici (68,84%), idrocarburi sesquiterpenici (10,78%), sesquiterpeni ossigenati (0,85%), diterpeni ossigenati (0,42%) e altre sostanze (15,58%). L'olio essenziale si è rivelato particolarmente ricco di idrocarburi monoterpenici (68,84%), con β -*cis*-ocimene (64,99%) come principale componente. L'octil esanoato (14,40%) è stato identificato come secondo composto più abbondante, mentre gli idrocarburi sesquiterpenici (10,78%) sono stati rappresentati principalmente da α -cariofillene (7,25%) e β -cariofillene (2,66%). I sesquiterpeni ossigenati e i diterpeni ossigenati sono apparsi in quantità minori (0,85% e 0,42%, rispettivamente).

Confrontando i dati con la letteratura, è emerso che la composizione chimica dell'OE analizzato differisce notevolmente rispetto a quella degli altri oli di *T. apulum* studiati fino a ora. Ad esempio, nel campione raccolto in Attica (Atene, Grecia), si è riscontrata la presenza di octil esanoato (11,73%), in quantità paragonabile a quella identificata nel nostro studio, e di α -cariofillene (1,52%) e β -cariofillene (7,09%). Tuttavia, il componente principale dell'olio essenziale greco è risultato essere α -umulene (28,71%) (Kofinas et al. 1993), a differenza di quello di **Ta** che è stato il β -*cis*-ocimene (64,99%).

Questo metabolita, il β -*cis*-ocimene, è stato trovato in un solo altro studio, in cui il materiale vegetale era stato raccolto a Montemalba (Perugia, Italia), dove i principali costituenti

dell'olio essenziale sono risultati essere α -umulene (11,4%) e β -cis-ocimene (17,3%) (Tirillini et al. 2006). Tuttavia, la quantità di β -cis-ocimene riportata non è stata così abbondante come quella rilevata nell'accessione siciliana.

Un altro studio sull'olio essenziale di *T. apulum* riguarda piante raccolte in Turchia. In questo caso, i principali composti sono stati octil esanoato (44,0%), octil ottanoato (34,5%) e octanolo (16,5%). Di questi, i primi due sono stati rilevati in **Ta** ma in quantità minori, mentre l'octanolo è stato completamente assente (Başer et al. 2012).

La composizione degli oli essenziali di altre specie di *Tordylium*, in particolare *T. pustulosum* Boiss., *T. elegans*, *T. pestalozzae* Boiss., *T. syriacum* L., e *T. hasselquistiae* DC., ha evidenziato una caratteristica comune: la presenza di octil esanoato e octil ottanoato (Kürkçüoğlu et al. 2002; Kürkçüoğlu et al. 2015). Questi metaboliti, riscontrati anche nella varietà siciliana di *T. apulum*, seppur in quantità minori (14,40% e 1,18%, rispettivamente), possono essere considerati come marcatori del genere.

Tuttavia, la peculiarità della varietà siciliana di *T. apulum* è la presenza in grande quantità di β -cis-ocimene, trovato solo, ma in quantità minore, nelle piante dell'Italia centrale di *T. apulum* (Tirillini et al. 2006), e assente in tutte le altre specie finora analizzate.

2.1.14.2 Tordylium apulum: Attività antiossidante

I livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'attività degli enzimi antiossidanti SOD (superossido dismutasi) e CAT (catalasi) nei neutrofili polimorfonucleati (PMN) normali e sottoposti a stress indotto da opsonized zymosan (OZ) sono stati misurati per valutare gli effetti dell'olio essenziale di *Tordylium apulum*.

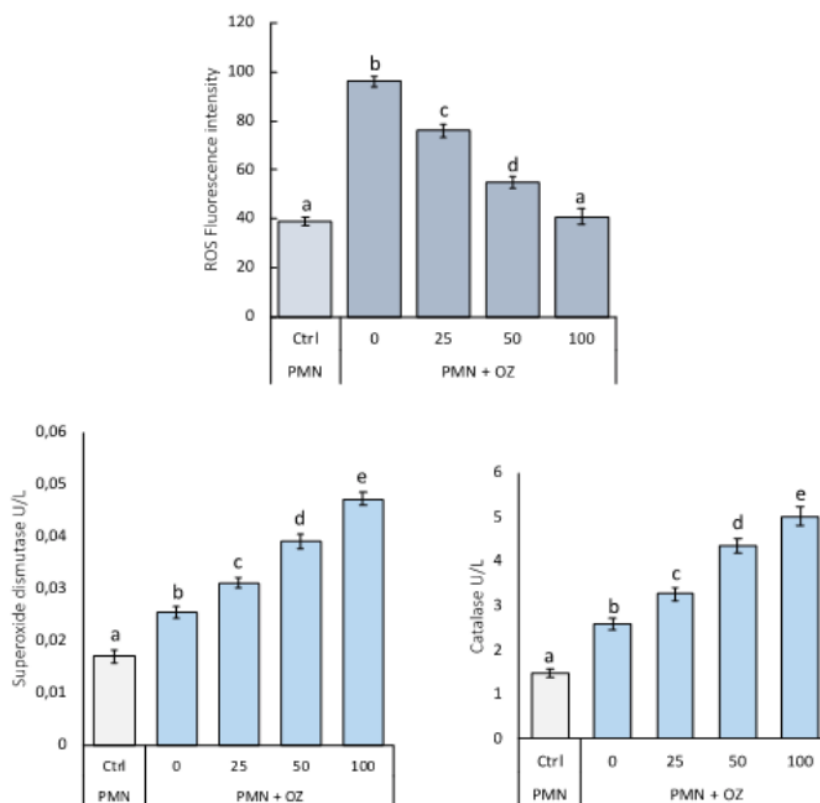


Figura 74. Effetto dell'OE di *T. apulum* a diverse concentrazioni su PMN stressati con OZ.

Come illustrato in Figura 74, lo stress indotto da OZ determina un aumento significativo dei livelli di ROS rispetto ai PMN non trattati con OZ (controllo). Il trattamento con l'OE su PMN sottoposti a stress di OZ riduce progressivamente i livelli di ROS. Già con un trattamento di 25 μg di OE, si osserva una riduzione significativa dei livelli di ROS, mentre con 100 μg di OE, i livelli di ROS si avvicinano a quelli del gruppo di controllo (PMN non stressati).

Anche l'attività degli enzimi antiossidanti nei PMN trattati con **Ta** segue lo stesso andamento. Come si può notare dalla Figura 74, l'attività di CAT e SOD aumenta in modo statisticamente significativo con l'aumento della concentrazione di olio essenziale.

Gli effetti dell'olio essenziale sulla modulazione dei livelli di ROS sono probabilmente dovuti alla presenza di diversi costituenti e/o a un effetto sinergico tra i composti presenti. Sebbene i componenti principali siano generalmente considerati i principali responsabili dell'attività antiossidante, non si può ignorare il ruolo chiave che alcuni componenti minori possono avere nel ridurre o aumentare tale attività (Ruberto and Baratta, 2000).

L'olio essenziale di *Tordylium apulum* ha dunque dimostrato un'interessante attività antiossidante, rendendolo un candidato promettente per future applicazioni in ambito cosmetico e parafarmaceutico.

2.1.15 *Torilis* L.

Il genere *Torilis* L., comprende quindici specie accettate, comunemente conosciute come prezzemolo dei fossi. Le specie di questo genere sono originarie dell'Eurasia e del Nord Africa, ma sono state introdotte anche in altri continenti (POWO 2024).

Le piante di questo genere sono ampiamente note per i loro usi etnofarmacologici. In particolare, le foglie di *Torilis leptophylla* (L.) Rchb.f. sono state utilizzate per trattare disturbi gastrointestinali sia in Iran (Seyyednejad and Motamedi, 2010) sia in Pakistan (Abbasi et al. 2015). In Pakistan, anche il succo delle radici e le foglie di *Torilis nodosa* (L.) Gaertn. (sin. *Tordylium nodosum* L.), localmente nota come "*Hoso beta*", sono impiegati contro i disturbi gastrointestinali (Adnan et al. 2015; Tariq et al. 2015) e problemi epatici. *Torilis japonica* (Houtt.) DC. e *Torilis arvensis* (Huds.) Link, chiamata "*Sultany butay*", è invece utilizzata per trattare reumatismi, diarrea e come rimedio contro i morsi di serpente (Aziz-Ul-Ikram et al. 2015).

Gli studi etnobotanici su *T. japonica* hanno evidenziato diversi effetti farmacologici. I frutti, tradizionalmente usati in Giappone, hanno proprietà medicinali e vengono impiegati nel trattamento di diverse patologie, tra cui reumatismi, infertilità e problemi dermatologici. In Corea e Cina, la pianta è utilizzata per affrontare problemi come amnesia, prurito, acidosi, malattie femminili e scabbia (Rahimpour et al. 2023). In Pakistan, dove è conosciuta con il nome "*Lahndara*", il decotto dei semi e delle radici è impiegato per curare malattie della pelle e l'indigestione (Amjad et al. 2020).

Alcune specie di *Torilis* vengono utilizzate anche a scopo alimentare. In Grecia, ad esempio, *Torilis arvensis* viene usata come spezia (Hadjichambis et al. 2008), mentre in Croazia le parti aeree di *T. nodosa*, conosciuta come "*svičica*", vengono bollite e consumate come verdura (Łuczaj et al. 2013). Nella regione dell'Istria, le foglie giovani e le radici di *T. japonica*, chiamata localmente "*lappolina*" o "*petrosello*", vengono raccolte tra aprile e maggio e usate come alimento (Pericin 2020). Nella regione himalayana, le foglie di *T. leptophylla* sono bollite e consumate come verdura (Abbasi et al. 2016).

Tra i principali costituenti fitoterapici non volatili delle specie di *Torilis* troviamo flavonoidi (Harborne 1967; Güzel et al. 2011; Youssef et al. 2023), sesquiterpeni ossigenati (Itokawa et al. 1985; Park et al. 2006; Lee et al. 2008; Kim et al. 2010; Song et al. 2018) e cumarine (Saad et al. 1995a; Ezzat et al. 2012). Studi recenti hanno esaminato diverse attività biologiche dei metaboliti ottenuti dalle specie di *Torilis*, tra cui proprietà antibatteriche, anti-epatotossiche, sporicide e antivirali (Nasreen et al. 2023).

2.1.15.1 *Torilis nodosa* (L.) Gaertn.



Figura 75. *Torilis nodosa*.

Pochi studi sono stati condotti sulla composizione degli oli essenziali di questo genere (Fujita 1990; Halim et al. 1990; Saad et al. 1995b; Bigdeli et al. 2004; Masoudi et al. 2012; Chen et al. 2013; Kharkwal et al. 2017; Widelski et al. 2021), che saranno trattati più dettagliatamente in seguito.

In Sicilia (Italia), sono stati identificati sette taxa, tra cui *Torilis africana* Spreng., *Torilis arvensis* (Huds.) Link subsp. *arvensis*, *Torilis elongata* (Hoffmanns. & Link) Samp., *Torilis japonica* (Houtt.) DC., *Torilis nemoralis* (Brullo) Brullo & Giusso, *Torilis pseudonodosa* Bianca e *Torilis nodosa* (L.) Gaertn. (Euro+Med PlantBase 2024), il cui olio essenziale non è mai stato precedentemente studiato.

L'idrodistillazione delle parti aeree di *Torilis nodosa* ha prodotto un olio essenziale di colore giallo pallido (**Tn**). Complessivamente, nell'olio essenziale sono stati identificati trentacinque composti, rappresentanti il 93,8% del totale dei componenti. Questi composti, elencati nella Tabella A20 secondo i loro indici di ritenzione su una colonna DB-5MS, sono stati suddivisi in sette classi in base alla loro struttura chimica.

L'olio essenziale di *T. nodosa* è risultato particolarmente ricco di alcoli alifatici (37,5%), in cui spiccano l'1-octadecanolo (29,3%) come metabolita più abbondante e l'1-esadecanolo (7,9%). Gli idrocarburi sesquiterpenici sono stati la classe predominante dell'olio, con una percentuale del 49,8%. In questa classe, sono stati rilevati buone quantità di β -elemene (25,9%), β -cariofillene (6,6%) e *cis*- β -farnesene (4,7%). Al contrario, i monoterpeni (1,1%) e i sesquiterpeni ossigenati (1,2%) sono risultati essere presenti in quantità minori.

Il confronto con la composizione di altri oli essenziali estratti da specie del genere *Torilis*, riportati in letteratura (Tabella A21), offre diversi spunti interessanti. Fino ad oggi, sono stati pubblicati solo sei articoli sulla composizione chimica degli oli essenziali ottenuti tramite idrodistillazione delle parti aeree (Tabella A21). Questi riguardano *T. arvensis* (Huds.) Link dall'Iran (Bigdeli et al. 2004), *T. japonica* (Houtt.) DC dalla Cina (Chen et al. 2013), Giappone (Fujita 1990), India (Kharkwal et al. 2017), e *T. leptophylla* (L.) Reichenb dall'Iran (Masoudi et al. 2012).

Tutti gli oli analizzati hanno mostrato una bassa quantità di monoterpeni e una predominanza di sesquiterpeni. In *T. arvensis* e in *T. japonica* proveniente dal Giappone, la classe principale è stata quella degli idrocarburi sesquiterpenici (62,9% e 81,6%, rispettivamente), mentre in *T. japonica* della Cina e dell'India, e in *T. leptophylla*, si è riscontrata una quantità simile di idrocarburi sesquiterpenici e sesquiterpeni ossigenati. Il β -elemene, principale sesquiterpene in **Tn**, è stato presente in quantità rilevanti solo in *T. japonica* dalla Cina (8,2%) e dalla Polonia (18,1%), mentre il principale metabolita di *T. arvensis*, l'(*E*)- β -farnesene (27,7%) (Bigdeli et al. 2004), è stato riscontrato in quantità minore (4,7%), simile a quella di *T. leptophylla* (3,2%) (Masoudi et al. 2012). Va sottolineato che il 1-octadecanolo, il costituente principale dell'olio di *T. nodosa*, così come il 1-esadecanolo (7,9%), non è mai stato identificato negli oli delle altre specie di *Torilis*.

I dati ottenuti hanno mostrato la grande differenza di questa specie con le altre del genere *Torilis*, ma ulteriori informazioni sono necessarie dal momento in cui nessuna delle accessioni siciliane è stata studiata.

2.2 ASPARAGACEAE

Le Asparagaceae, conosciute come la famiglia dell'asparago, sono una famiglia di piante da fiore che comprende 114 generi per un totale di circa 2.900 specie, classificate nell'ordine Asparagales delle monocotiledoni. Il nome della famiglia deriva dall'asparago da giardino commestibile, *Asparagus officinalis*. Questa famiglia comprende sia piante da giardino comuni quali l'asparago, la yucca, la campanula e l'hosta, che piante da appartamento come la sansevieria, il tronchetto della felicità, la pianta ragno e il felce piumoso.

La definizione dei generi e l'assegnazione delle specie ai generi all'interno della famiglia Asparagaceae (sottofamiglia *Scilloideae*) hanno creato non pochi problemi ai tassonomisti sin dai tempi di Linneo. Più di 3500 specie sono state riportate nel corso del tempo, delle quali solo 1000 sono generalmente accettate. Poiché la maggior parte dei caratteri morfologici mostra una variazione continua, i caratteri floreali sono i più utilizzati per la delimitazione delle specie, ma possono essere indicatori inaffidabili a causa della pressione selettiva delle strategie di impollinazione (Pfosser and Speta, 1999). Tuttavia, è probabile che una caratterizzazione citogenetica dettagliata, inclusa la cariomorfologia, possa fornire dati tassonomici di supporto per il presente scenario. Tale conoscenza precisa dell'architettura citogenetica può potenzialmente aiutare a valutare la diversità genetica, fornire dati tassonomici aggiuntivi e servire come informazioni di base per ulteriori analisi genomiche.

In precedenti sistemi di classificazione, le specie ora riconosciute come parte delle Asparagaceae erano spesso trattate come appartenenti alla famiglia delle Liliaceae. Il sistema APG II del 2003 offriva due opzioni per la circoscrizione della famiglia: Asparagaceae *sensu lato* che combinava sette famiglie precedentemente riconosciute, o Asparagaceae *sensu stricto*, che comprendeva un numero limitato di generi, in particolare *Asparagus* e *Hemiphyllacus*, ma comunque un totale di alcune centinaia di specie.

Il sistema APG III del 2009 ha permesso solo la classificazione in senso ampio (Chase et al. 2009). Un altro articolo pubblicato contemporaneamente ha proposto sette sottofamiglie corrispondenti alle famiglie originariamente separate.

Le sottofamiglie sono:

- Agavoideae: comprende la famiglia Agavaceae e Hesperocallidaceae (agavi, yucche, alberi di Joshua).
- Aphyllanthoideae: corrisponde alla famiglia Aphyllanthaceae.
- Asparagoideae: corrisponde alla famiglia Asparagaceae *sensu stricto*.
- Brodiaeoideae: corrisponde alla famiglia Themidaceae.
- Lomandroideae: corrisponde alla famiglia Laxmanniaceae.

- Nolinoideae: corrisponde alla famiglia Ruscaceae.
- Scilloideae: corrisponde alla famiglia Hyacinthaceae (giacinti, campanule e scille) (Goldblatt and Manning, 2011).

Quest'ultima è stata la famiglia oggetto della presente ricerca.

L'importanza delle Asparagaceae non si limita alla diversità delle specie, ma si estende anche ai loro usi medicinali e ornamentali. Molte specie di questa famiglia sono utilizzate in orticoltura per la loro bellezza e adattabilità a vari ambienti, mentre altre, come l'asparago, hanno un valore significativo nell'alimentazione umana. Le Asparagaceae sono note per la loro capacità di adattarsi a diversi climi e condizioni di suolo, il che le rende piante ideali per giardini e spazi verdi urbani. Inoltre, molte specie sono utilizzate in medicina tradizionale e moderna. Ad esempio, l'asparago è noto per le sue proprietà diuretiche e depurative. Altre piante della famiglia sono state studiate per le loro potenziali proprietà antitumorali e antinfiammatorie.

2.2.1 Hyacinthaceae

La sottofamiglia delle Hyacinthaceae, precedentemente parte delle Liliaceae, e dal 2011 assegnata alla famiglia delle Asparagaceae, comprende circa 70 generi e 1000 specie di erbe perenni che crescono da bulbi caratterizzati da una tunica membranosa e diverse squame bulbose (Mulholland et al. 2013; Hodgkiss 2014). La distribuzione è quasi cosmopolita, ma il Sudafrica rappresenta uno dei principali centri di diversità, ospitando circa metà delle specie mondiali (Koorbanally et al. 2006).

In Sudafrica, la maggior concentrazione di specie si trova nella regione floristica del Capo, con quasi 200 specie, principalmente nel Karoo e nel fynbos delle province settentrionali e occidentali. Le praterie montane del Sudafrica orientale, insieme allo Swaziland e al Lesotho, ospitano invece molte specie di *Ledebouria* ed *Eucomis*. Un secondo centro di diversità si trova nel bacino del Mediterraneo.

Le Hyacinthaceae, insieme alle Amaryllidaceae, sono tra le famiglie di piante bulbose più importanti in etnomedicina e medicina tradizionale lungo la costa orientale dell'Africa meridionale. Diversi generi, come *Bowiea*, *Eucomis*, *Ledebouria*, *Scilla* e *Urginea*, sono valorizzati per le loro proprietà medicinali, farmaceutiche e ornamentali. Le piante di questa famiglia sono state storicamente utilizzate per trattare malattie come febbre reumatica, sifilide, distorsioni, cancro e persino per pratiche di magia (Mottaghipisheh et al. 2020).

In Sudafrica, molte specie vengono raccolte in natura senza regolamentazioni, riducendo così la densità e la diversità genetica delle popolazioni selvatiche (McCartan 1999). Un'indagine sul mercato di Durban ha rilevato che sette specie di Hyacinthaceae sono tra le

più richieste, tra cui *Merwillia plumbea*, *Eucomis autumnalis* e *Bowiea volubilis*, che figurano tra le dieci più vendute (Mander 1998, citato da Koorbanally et al. 2006).

Alcune specie, come quelle di *Drimia* e *Bowiea*, sono altamente tossiche ma vengono impiegate in piccole dosi nella medicina tradizionale per trattare diverse malattie. Ad esempio, i bulbi di *Drimia robusta* Baker sono utilizzati dagli Zulu come clistere per febbri, come diuretici e per trattare malattie uterine (Pujol 1990). Inoltre, questa pianta è usata come amuleto protettivo contro spiriti maligni dai guaritori spirituali (Koorbanally 2000).

Il genere *Eucomis* è molto apprezzato nella medicina tradizionale per il trattamento di reumatismi, infiammazioni e malattie mentali, ma è anche soggetto a raccolta intensiva per il commercio (Afolayan and Adebola, 2004).

2.2.1.1 *Eucomis* L'Hér

Il genere *Eucomis* L'Hér, appartenente alla famiglia delle Hyacinthaceae, comprende 41 generi distribuiti in Europa, Sud America e Africa. In Africa meridionale, sono presenti 27 generi e circa 200 specie, molte delle quali concentrate nella Regione Floristica del Capo, in Sudafrica (Pooley 2005). Tra questi, *Eucomis* è un genere endemico della regione. Sebbene la maggior parte delle specie fiorisca in estate, alcune, come *Eucomis regia*, fioriscono in inverno. Il nome del genere deriva dal nome greco "*eukomes*", che significa "dalla testa bella" in riferimento alle brattee simili a foglie che coronano gli steli fiorali. Per questa caratteristica, *Eucomis* è comunemente conosciuta come "giglio ananas", poiché le sue infiorescenze ricordano la forma di questo frutto (Compton 1990).



Figura 76. Distribuzione delle piante endemiche appartenenti al genere *Eucomis*.

Distribution and ethnobotanical uses of members of the genus *Eucomis* found in South Africa.

| Species | Province (s) | Plant part(s) | Traditional uses |
|---|----------------------|----------------------|--|
| <i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chitt. (synonym <i>Eucomis undulate</i>) | FS, KZN, EC, M, G | Leaves, bulbs, roots | Colic, flatulence, kidney and bladder problems, nausea, coughs syphilis, abdominal distension |
| <i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chitt. subspecies <i>amaryllidifolia</i> (Baker) Reyneke | L, FS, EC | NA | NA |
| <i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chitt. subspecies <i>autumnalis</i> | EC, L | Leaves, bulbs | Administered as enemas to treat lower backache, biliousness, urinary diseases, post-operative recovery, fevers and fractures |
| <i>Eucomis autumnalis</i> (Mill.) Chitt. subspecies <i>clavata</i> (Baker) Reyneke | KZN, FS, M, G, L, NW | Bulbs | Administered as enemas to treat lower backache, biliousness, urinary diseases, post-operative recovery, fevers and fractures |
| <i>Eucomis bicolor</i> Baker | EC, KZN | Bulbs | Colic and purgative |
| <i>Eucomis comosa</i> (Houtt.)Wehrh. (synonym <i>Eucomis punctate</i>) | EC, KZN | Bulbs, roots | For rheumatism, teething infants and purgative |
| <i>Eucomis comosa</i> (Houtt.)Wehrh. variety <i>comosa</i> | WC, EC, KZN | Bulbs, roots | Rheumatism and teething in infants |
| <i>Eucomis comosa</i> (Houtt.)Wehrh. variety <i>striata</i> (Don) Willd. | EC, L | NA | NA |
| <i>Eucomis humilis</i> Baker | KZN | NA | NA |
| <i>Eucomis montana</i> Compton | M | NA | NA |
| <i>Eucomis pallidiflora</i> Baker subspecies <i>pallidiflora</i> | EC, M | Bulbs | Mental diseases |
| <i>Eucomis pallidiflora</i> subspecies <i>pole-evansii</i> (N.E.Br.) Reyneke ex J. C. Manning | M | Bulbs | Erectile dysfunction, tuberculosis, blood clotting, cough |
| <i>Eucomis regia</i> L'Hér. | NC, WC | Bulbs, roots | Venereal diseases, diarrhea, cough, biliousness and prevent premature childbirth |
| <i>Eucomis schijffii</i> Reyneke | EC, KZN | Bulbs | Venereal diseases, diarrhea, coughs and used as enema for biliousness, prevention of pre-mature birth, lower back pains |
| <i>Eucomis vandermerwei</i> I. Verd. | M, L | NA | NA |
| <i>Eucomis zambesiaca</i> Baker | L | NA | NA |

NA—Not Available, EC—Eastern Cape, FS—Free State, G—Gauteng, KZN—KwaZulu-Natal, L—Limpopo, M—Mpumalanga, WC—Western Cape.

Figura 77. Usi etnobotanici dei membri del genere *Eucomis* presenti in Sud Africa.

Le specie del genere *Eucomis* sono ampiamente utilizzate nella medicina tradizionale per trattare una varietà di disturbi, tra cui malattie respiratorie, veneree, reumatismi e altre patologie (Hutchings et al. 1996). Tuttavia, il loro uso intensivo, combinato con la lenta capacità di propagazione, ha portato al declino di molte specie, alcune delle quali sono ora considerate minacciate o in pericolo. Per questo motivo, le proprietà medicinali delle specie di *Eucomis* sono state studiate sia in vitro che in vivo, rivelando potenzialità anti-infiammatorie, antibatteriche, antistaminiche e angioprotettive (Heller and Tamm, 1981; Amschler et al. 1996). Tali proprietà sono attribuite principalmente ai omoisoflavanoni, composti fitoterapici presenti in queste piante.

L'ampia gamma di fitocomposti isolati da *Eucomis* sottolinea il suo valore come possibile fonte di nuovi farmaci per il trattamento di infezioni batteriche, fungine e patologie legate al dolore. Studi hanno dimostrato che l'efficacia degli estratti dipende da variabili come il solvente di estrazione e modalità di conservazione (Taylor and Van Staden, 2002; Stafford

et al. 2005). Oltre alle proprietà antinfiammatorie, *Eucomis* ha mostrato promettenti attività antitumorali e citotossiche. Per esempio, gli estratti metanolici di *Eucomis autumnalis* hanno evidenziato una buona attività contro cellule tumorali epatiche umane (IC₅₀ di 7,8 mg/ml), simile ai valori ottenuti con il controllo positivo (Bisi-Johnson et al. 2011). Inoltre, il glicoside eucosterolo, isolato da *Eucomis bicolor*, ha dimostrato capacità di inibire specifici processi cellulari associati alla crescita tumorale (Mimaki et al.,1994). Test in vivo sono tuttavia necessari per validare ulteriormente l'utilizzo di *Eucomis* come agente anticancro, che potrebbe offrire minori effetti collaterali rispetto ai trattamenti sintetici.

Anche l'attività fitotossica è stata oggetto di indagine: gli estratti di *Eucomis autumnalis* non sono risultati tossici per foglie di pisello fino a una concentrazione di 2 mg/mL, mentre concentrazioni inferiori (1 mg/mL) hanno inibito la germinazione delle spore (Pretorius et al. 2002).

Il genere *Eucomis* rappresenta dunque una risorsa preziosa per lo sviluppo di nuovi farmaci grazie alle sue molteplici attività biologiche, comprese proprietà anti-infiammatorie, antitumorali e antibatteriche. Tuttavia, il crescente sfruttamento di queste specie nei mercati tradizionali e la raccolta incontrollata dalle popolazioni selvatiche minacciano la loro sopravvivenza. È essenziale promuovere misure di conservazione e studiare metodi sostenibili di coltivazione e utilizzo per preservare il patrimonio genetico e fitoterapico del genere *Eucomis*. Parallelamente, ulteriori ricerche in vivo e cliniche sono fondamentali per tradurre il potenziale farmacologico di queste piante in trattamenti efficaci e sicuri.

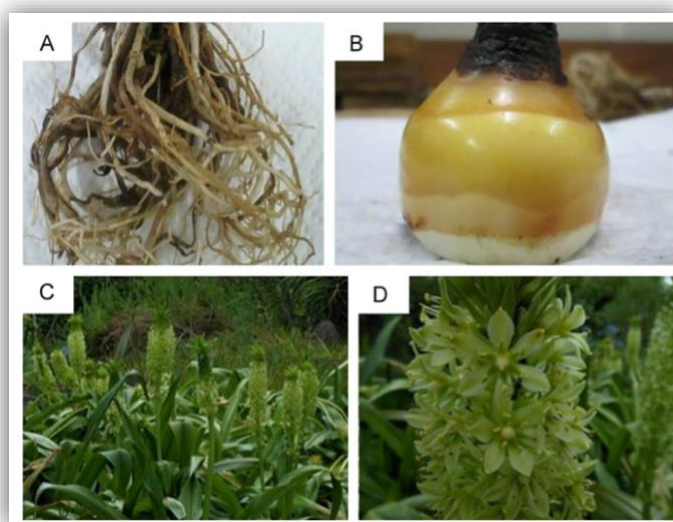


Figura 78. *Morfologia dell'Eucomis. A – radici; B – bulbi; C – intera pianta; D – infiorescenza.*

2.2.1.1.1 *Eucomis comosa* (Houtt.) Wehrh.: caratterizzazione degli estratti



Figura 79. *Eucomis comosa*.

Eucomis comosa (Houtt.) Wehrh. (sin. *Eucomis punctata* L'Hér.) è riconosciuta per i suoi utilizzi nel commercio di piante medicinali tradizionali sia nella Provincia del Capo Orientale, dove è conosciuta come *umphompho* (Dold and Cocks, 2002), sia a nord, a Durban, nella regione del KwaZulu-Natal (Von Ahlefeldt et al. 2003). Gerstner ha riportato l'uso di *E. comosa* nella medicina etnica zulu, sotto il nome di *ubuhlungu-becanti*, osservando che le preparazioni a base di bulbi venivano utilizzate per trattare i reumatismi (Gerstner 1939). Watt e Breyer-Brandwijk hanno documentato un'applicazione simile da parte dei Xhosa, che utilizzavano decotti di bulbo per trattare questa stessa patologia, una pratica confermata più recentemente da Simon e Lamla (Watt and Breyer-Brandwijk, 1962; Simon and Lamla, 1991). L'uso transculturale dei bulbi della stessa specie per il trattamento del reumatismo, un disturbo caratterizzato da infiammazione e dolore, suggerisce una base razionale per la scelta di *E. comosa* nella medicina tradizionale.

Gli unici studi fitochimici sugli estratti di *E. comosa* sono stato eseguiti da Heller, Du Toit e Koorbanally, che hanno isolato dieci composti di struttura omoisoflavanonica, di cui sono stati valutati i potenziali antinfiammatori e antibatterici (Heller and Tamm, 1978; Du Toit et al. 2005; 2007; Koorbanally et al. 2006).

Proprio per l'assenza di estensivi lavori e composti isolati da *Eucomis comosa* ne è stato investigato l'estratto in diclorometano.

Partendo da una miscela esano/diclorometano 5:5 come eluente della colonna cromatografica su Silice, sono state ottenute 410 frazioni, da cui tramite opportune combinazioni e successive separazioni è stato possibile ottenere otto prodotti puri di natura omoisoflavanonica (**EC1-8**).

Particolare attenzione, come si evince dalla Tabella S2, è stata data alle frazioni di media polarità, tralasciando le meno polari ricche di acidi grassi e ftalati, e quelle più polari, dominate dalla presenza di glicosidi.

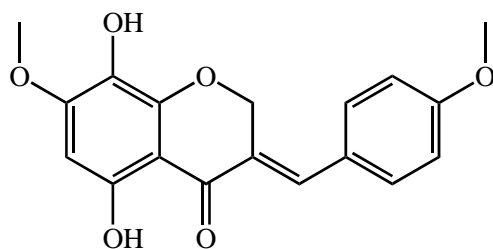


Figura 80. *Struttura EC1.*

Il composto **EC1** è risultato essere un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{18}H_{16}O_6$. L'analisi degli spettri 1H -NMR e ^{13}C -NMR ha evidenziato i segnali caratteristici di una struttura omoisoflavanoidica, come descritto da Schwikkard (Schwikkard et al. 2019). Questa struttura presenta sistemi aromatici sostituiti con due gruppi metossilici e due gruppi ossidrilici. In particolare, i segnali 1H -NMR a $\delta H = 7.31$ (d, $J = 8.9$ Hz) e 7.01 (d, $J = 8.9$ Hz), insieme ai segnali ^{13}C -NMR a $\delta C = 126.9$, 132.0 e 114.4 , confermano la presenza di una struttura aromatica 1,4-disostituita, indicando un sistema simmetrico nell'anello B.

Un'analisi dettagliata ha permesso di identificare un gruppo $-OCH_3$ in posizione 4' ($\delta C = 161.1$), confermato tramite correlazione HMBC con i protoni del gruppo metossi a $\delta H = 3.87$. Il protone in posizione 9 a $\delta H = 7.86$, un valore tipico per i doppi legami di tipo *E*, ha fornito ulteriore supporto alla struttura omoisoflavanoidica tramite correlazioni HMBC con il carbonio 1' ($\delta C = 126.9$) e con il carbonio lattonico in posizione 4 ($\delta C = 184.9$). Quest'ultimo ha mostrato anche una correlazione con i protoni in posizione 2 a $\delta H = 5.40$ (d, $J = 1.2$ Hz), confermando ulteriormente la struttura proposta.

Dopo aver completato lo studio degli anelli B e C, si è passati all'analisi dell'anello A. Uno dei segnali distintivi degli omoisoflavanoidi derivati dal genere *Eucomis* è stato il segnale del protone ossidrilico a $\delta H = 12.60$, associato al carbonio in posizione 5. Questo segnale appare a campi bassi a causa del legame a idrogeno con il carbonio lattonico in posizione 4. Il protone a $\delta H = 6.15$ è stato attribuito alla posizione 6 sulla base delle correlazioni HMBC con i carboni C-5 e C-7 ($\delta C = 127.5$), che risulta ulteriormente correlato ai protoni del secondo gruppo $-OCH_3$ a $\delta H = 3.85$.

Infine, il secondo gruppo ossidrilico è stato assegnato al carbonio in posizione 8 ($\delta C = 161.7$).

Gli altri segnali sono stati caratterizzati attraverso spettroscopie bidimensionali NMR, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY, per una descrizione completa della struttura molecolare.

Il composto **EC1** non risulta essere stato mai isolato da nessuna pianta.

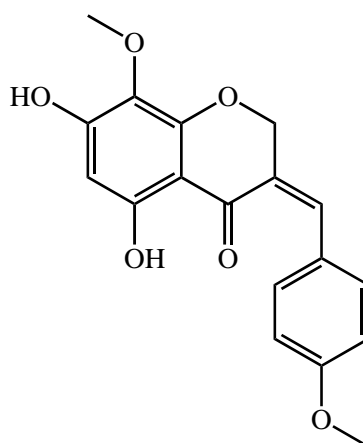


Figura 81. *Struttura EC2.*

Il composto **EC2** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{18}H_{16}O_6$.

EC2 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e del prodotto precedente **EC1**.

I segnali dei protoni appaiono leggermente spostati rispetto al prodotto analogo **EC1**, soprattutto quelli relativi agli anelli B e C. In particolare, il protone in posizione 9 mostra un segnale a $\delta H = 6.90$, rispetto a $\delta H = 7.86$ di **EC1**. Questo valore, come confermato dai dati di letteratura, è caratteristico degli omoisoflavonoidi con un doppio legame di tipo *Z* tra il C-3 e il C-9. La posizione del protone H-9 è stata confermata, come per **EC1**, grazie alle sue correlazioni HMBC con il carbonio C-1' ($\delta C = 126.5$) e con il carbonio lattonico C-4 ($\delta C = 187.1$).

L'anello A, invece, risulta pressoché invariato rispetto a **EC1**, a eccezione dell'inversione delle posizioni dei sostituenti -OH e -OCH₃ in 7 e 8. Infine, per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati caratterizzati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

Il prodotto **EC2**, identificato dunque come l'isomero *Z*, della ben più nota struttura 4'-O-Methyl-punctatin, risulta essere nuovo e mai ottenuto da altre piante.

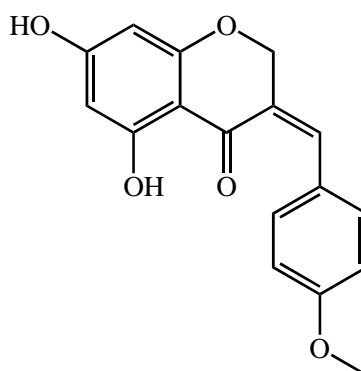


Figura 82. *Struttura EC3.*

Il composto **EC3** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{17}H_{14}O_5$.

EC3 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e dei prodotti precedenti.

EC3 è risultato essere molto simile a **EC2**, difatti la maggior parte dei segnali sono stati identificati con il confronto dei dati spettroscopi precedentemente ottenuti. Degni di nota sono stati l'assenza di un gruppo metossi ($-OCH_3$) in posizione 8, e la presenza di un nuovo protone aromatico a $\delta H = 5.92$, che tramite correlazioni HMBC è stato assegnato proprio alla posizione 8.

Il resto della struttura è risultato essere identico a quello di **EC2**. Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC3 è risultato essere il Z-Eucomin, isolato precedentemente solo da *Eucomis bicolor* (Heller et al. 1976), *Eucomis autumnalis* (Schwikkard et al. 2019), e *Caesalpinia digyna* (Roy et al. 2012).

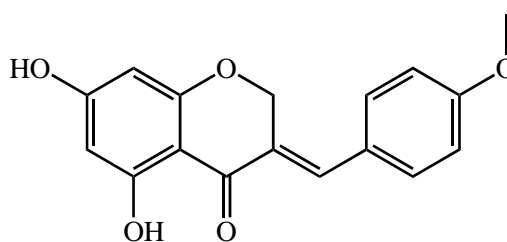


Figura 83. *Struttura EC4.*

Il composto **EC4** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{17}H_{14}O_5$.

EC4 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e del precedente prodotto **EC3**.

Il prodotto ha presentato come visto per **EC3** solo tre sostituenti (due gruppi ossidrilici e uno metossile). La posizione dell' $-OCH_3$ anche qui, è stata confermata essere nell'anello B,

grazie alla correlazione HMBC tra i protoni del gruppo metossi a $\delta H = 3.86$ e il carbonio in posizione 4' a $\delta C = 161.1$.

La principale differenza con **EC3** è stata dunque lo spostamento dei segnali dei protoni in posizione 2 ($\delta H = 5.30$) e in posizione 9 ($\delta H = 7.73$), suggerendo un cambio di conformazione in *E* rispetto a **EC3**, confermato dai dati di letteratura e dal confronto con il primo prodotto **EC1**, che presentava gli stessi segnali e dunque la stessa isomeria.

EC4 è risultato essere il *E*-Eucomin, isolato precedentemente da *Eucomis bicolor* (Heller et al. 1976), *Eucomis autumnalis* (Schwickard et al. 2019), *Haematoxylum campechianum* (Lin et al. 2008), *Caesalpinia digyina* (Roy et al. 2012), *Caesalpinia millettii* (Chen and Yang, 2007) e *Caesalpinia mimosoides* (He et al. 2017).

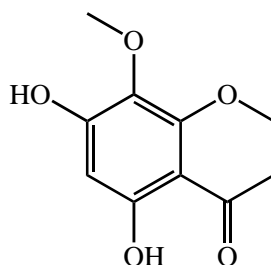


Figura 84. *Struttura EC5.*

Il composto **EC5** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{10}H_{10}O_5$.

EC5 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e dei precedente prodotti.

Rispetto agli omoisoflavonoidi precedenti, **EC5** è risultato avere molti meno segnali, soprattutto quelli riguardanti la zona aromatica dell'anello B, facendone intuire l'assenza.

Il prodotto ottenuto è stato ritenuto dunque un probabile prodotto di degradazione, privo dell'anello B e dunque con una struttura simil-cromanonica. Presentando un solo segnale protonico aromatico a $\delta H = 6.12$, si è ipotizzato una tripla sostituzione del classico anello cromanonico. Ciò è stato confermato dai segnali dei due protoni ossidrilici a $\delta H = 6.39$ e $\delta H = 11.91$, e dal segnale dei protoni metossilici a $\delta H = 3.87$. Le esatte posizioni sono state determinate mediante correlazioni HMBC e dal confronto con la letteratura. Il prodotto **EC5** difatti è risultato essere il 5,7-diidrossi-8-metossicroman-4-one, isolato precedentemente solo ed esclusivamente da *Eucomis comosa* (Heller and Tamm, 1978).

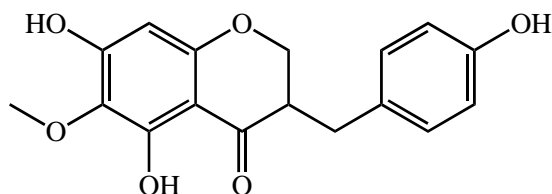


Figura 85. *Struttura EC6.*

Il composto **EC6** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{17}H_{16}O_6$.

EC6 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e dei precedenti prodotti.

Rispetto ai precedenti prodotti **EC6** è risultato avere una struttura omoisoflavonoidica simile, ma con molti più segnali nella zona alifatica. Ciò insieme all'assenza dei segnali protonici e carboniosi nella classica zona dello spettro dei doppi legami, ha permesso di confermare l'assenza del doppio legame tra i carboni in posizione 3 e in posizione 9, vista in quasi tutti i precedenti prodotti isolati (**EC1-4**).

La posizione dei nuovi segnali protonici in zona alifatica è stata confermata essere in posizione 9, dalla correlazione HMBC tra i carboni aromatici dell'anello B ($\delta C = 130.6$ e $\delta C = 130.1$) e quest'ultimi ($\delta H = 3.16$ (dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz), $\delta H = 2.70$ (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz)), e dalla loro correlazione con il carbonio carbonilico di tipo lattonico a $\delta C = 198.9$, che risultava leggermente spostato a campi più bassi rispetto ai precedenti prodotti.

Confermati i segnali del carbonio e dei protoni in posizione 9, è stato possibile determinare anche i restanti segnali dell'anello C.

Per quanto riguarda i sostituenti, questa volta il gruppo metossile è risultato essere solo uno e non correlato ai protoni aromatici dell'anello B, bensì a al carbonio in posizione 6 $\delta C = 128.5$, a sua volta identificato come tale, grazie alla correlazione con il protone ossidrilico in posizione 5 ($\delta H = 12.28$).

L'unico protone aromatico integrante per un'unità è stato assegnato all'anello A, in posizione 8, grazie alla combinata correlazione di quest'ultimo e dei protoni in posizione 2, con il segnale del carbonio 8a.

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC6 è risultato essere il 3,9-diidroeucommalina, isolato precedentemente da una pianta appartenente alla famiglia delle Meliaceae, una delle Amaryllidaceae, e sedici delle Asparagaceae (6 *Scilla*, 3 *Ledebouria*, 2 *Muscari*, 2 *Merwillia*, 1 *Eucomis*, 1 *Chionodoxa* e 1 *Bellevalia*).

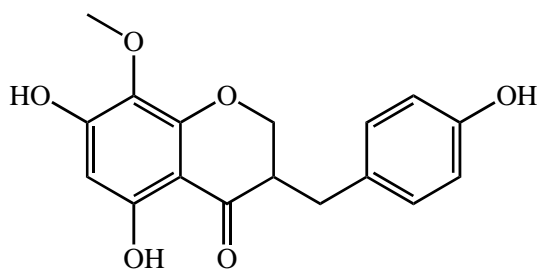


Figura 86. *Struttura EC7.*

Il composto **EC7**, il prodotto ottenuto in maggiore quantità dall'estratto di *Eucomis comosa*, è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{17}H_{16}O_6$.

EC7 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e con **EC6**.

Gli spettri 1H -NMR e ^{13}C -NMR hanno mostrato pressoché gli stessi segnali di **EC6**, con delle lievi differenze per quanto riguarda i segnali dell'anello A. Infatti, una volta appurato mediante le opportune verifiche come sopra riportato delle correlazioni HSQC e HMBC dei segnali degli anelli B e C, si è passati all'osservazione dei sostituenti e dei segnali dell'anello A.

In primo luogo, uno spostamento notevole è stato rilevato nel protone ossidrilico in posizione 5, che risulta ora cadere a $\delta H = 11.98$, e con esso anche il protone ($\delta H = 6.13$) che in **EC6** era stato assegnato alla posizione numero 8. Per tale motivo si è supposto che il protone questa volta fosse in posizione 6 e il gruppo metossile invertito ad esso e dunque in posizione 8. È stato possibile confermare ciò, grazie alle correlazioni HMBC tra C-5.

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC7 è risultato essere il 3,9-diidropunctatina, isolato precedentemente sia dall'*Eucomis comosa* (Farkas et al. 1971; Du Toit et al. 2005), sia da *Chionodoxa luciliae* (Corsaro et al. 1992), *Muscari comosum* (Adinolfi et al. 1985) e *Bellevalia flexuosa* (El-Elimat et al. 2018).

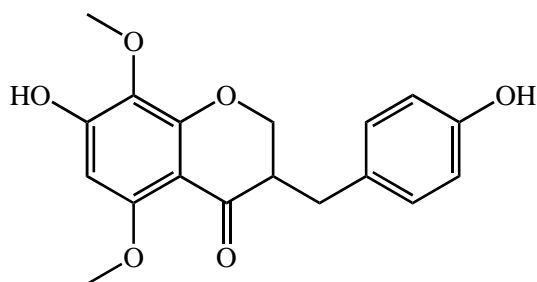


Figura 87. *Struttura EC8.*

Il composto **EC8** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{18}H_{18}O_6$.

EC8 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e con **EC7**.

EC8 presenta difatti gli stessi segnali di **EC7**, fatta eccezione per alcuni presenti nell'anello A. Degna di nota infatti, è l'assenza del segnale del protone ossidrilico che forma un legame a idrogeno col carbonile in posizione 4, in favore della presenza di un nuovo gruppo metossile ($\delta C = 56.1$, $\delta H = 3.86$). L'ipotesi di sostituzione, rispetto a **EC7**, del gruppo ossidrilico con il gruppo metossile è stata confermata grazie alle diverse correlazioni HMBC tra i protoni dell'-OCH₃ e il carbonio in posizione 5 ($\delta C = 159.0$), e quest'ultimo e il protone aromatico in posizione 6 ($\delta H = 6.18$).

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC8, il 4*H*-1-Benzopirano-4-one, 2,3-diidro-7-idrossi-3-[(4-idrossifenil)metil]-5,8-dimetossi-, è risultato essere un composto non noto, mai isolato da nessun prodotto vegetale.

2.2.1.1.2 *Eucomis comosa*: derivati sintetici

Dopo aver estratto e isolato i composti omoisoflavonoidici da *Eucomis comosa*, è emerso dall'analisi della letteratura (Schwikkard et al. 2019) che le modifiche strutturali, in particolare le metilazioni e le acetilazioni, possono incrementare l'attività biologica di questa classe di molecole. Tali modifiche possono, infatti, migliorare la stabilità, la solubilità e la capacità di interazione con i target biologici, rendendo i composti più efficaci in ambito farmacologico.

Sulla base di queste evidenze, è stato quindi deciso di sintetizzare derivati metilati e acetilati a partire dal prodotto maggioritario (**EC7**), con l'obiettivo di esplorare come queste trasformazioni influenzino l'attività biologica. Questa strategia ha consentito di ottenere una serie di derivati con potenziali proprietà farmacologiche migliorate, contribuendo così allo sviluppo di nuovi candidati per la ricerca biomedica e all'approfondimento della comprensione della struttura-attività degli omoisoflavonoidi.

In primo luogo sono state effettuate due metilazioni con diazometano (una delle quali in forte eccesso), a partire dal prodotto **EC7**. La prima reazione ha portato alla formazione del prodotto di-metilato **EC9** (un gruppo metossile era già presente nella struttura di partenza).

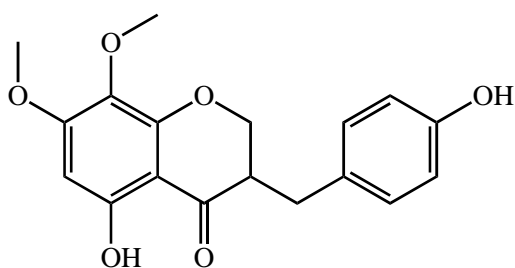


Figura 88. *Struttura EC9.*

Il composto **EC9** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{18}H_{18}O_6$.

EC9 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e con **EC7**.

I segnali sono stati pressoché identici a quelli di **EC7** ad eccezione di uno spostamento del segnale del carbonio 7 (ora a $\delta C = 161.3$), e la comparsa di un nuovo gruppo $-OCH_3$ ($\delta C = 56.5$, $\delta H = 3.89$), che ha confermato l'avvenuta metilazione del prodotto di partenza. La posizione del gruppo metossile in 7 è stata confermata dalle diverse correlazioni HMBC.

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC9 è risultato essere il 7-O-methyl-3,9-dihydropunctatin, isolato precedentemente da *Muscari comosum* (Barone et al. 1983), *Bellevalia longistyla* (Delazar et al. 2002), *Scilla scilloides* (Wang et al. 2014), *Bellevalia flexuosa* (El-Elimat et al. 2018), *Ledebouria revoluta* (Moodley et al. 2006), *Eucomis montana* (Koorbanally et al. 2006b), *Ledebouria cooperi* (Pohl et al. 2001), *Drimiopsis maculata* (di cui è stato valutato l'alto potenziale anti-infiammatorio e anti-batterico) (Du Toit et al. 2005; 2007) e *Bellevalia eigii* (di cui è stato valutato l'alto potenziale anti-tumorale su cellule MDA-MB-435 e HT-29) (Alali et al. 2015).

La seconda reazione con forte eccesso di diazometano ha portato alla formazione del prodotto tetra-metilato **EC10** (un gruppo metossile era già presente nella struttura di partenza).

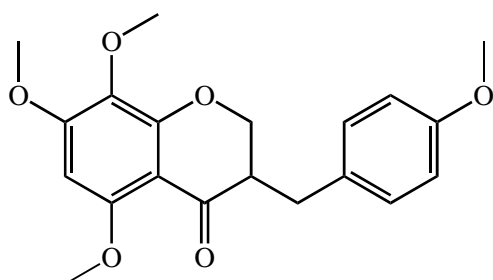


Figura 89. *Struttura EC10.*

Il composto **EC10** è un solido bianco amorfo con formula molecolare C₂₀H₂₂O₆.

EC10 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e con **EC9**.

I segnali sono stati pressoché identici a quelli di **EC9** ad eccezione di uno spostamento del segnale del carbonio 5 (ora a $\delta C = 159.6$), e la comparsa di due nuovi gruppo -OCH₃ ($\delta C = 57.2/57.1$, $\delta H = 3.89/3.81$), che ha confermato l'avvenuta metilazione del prodotto di partenza. La posizione del gruppo metossile in 5 e in 4' è stata confermata dalle diverse correlazioni HMBC.

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC10 è risultato essere il 2,3-Dihydro-5,7,8-trimethoxy-3-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4H-1-benzopyran-4-one, mai isolato da nessuna pianta e sintetizzato solo due volte utilizzando dimetil solfato/K₂CO₃, a partire da dei prodotti isolati da *Muscari comosum* e *Eucomis punctata* (Finckh and Tamm, 1970; Adinolfi et al. 1984).

In secondo luogo, è stata effettuata una acetilazione a partire da **EC7**, trattandola con anidride acetica a 60°C, da cui sono stati ottenuti due prodotti, il di-acetilato **EC11** e il tri-acetilato **EC12**.

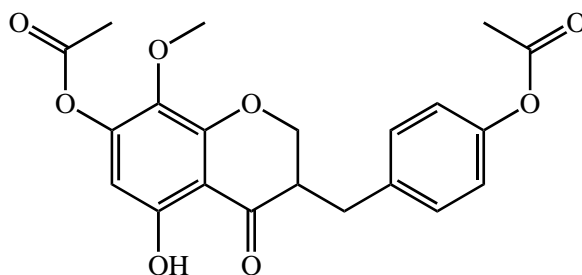


Figura 90. *Struttura EC11.*

Il composto **EC11** è un solido bianco amorfo con formula molecolare C₂₁H₂₀O₈.

EC11 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e con **EC7**.

I segnali sono stati pressoché identici a quelli di **EC7** ad eccezione di uno spostamento del segnale del carbonio 6 (ora a $\delta C = 103.5$), del carbonio 7 (ora a $\delta C = 151.9$), del carbonio 8 (ora a $\delta C = 132.8$), e dei carboni dell'anello B. La comparsa di segnali di due gruppi acetili ($\delta C_{Ac7} = 168.3/20.7$ e $\delta C_{Ac7} = 169.7/21.1$), ha confermato l'avvenuta acetilazione in due siti dei tre possibili del prodotto di partenza. Le posizioni dei due nuovi gruppi acetili sono state

confermate essere in corrispondenza dei vecchi ossidrili in posizione 7 e 4', grazie alle diverse correlazioni HMBC e per esclusione, grazie al segnale protonico dell'unico ossidrile libero, ovvero quello in posizione 5 ($\delta H = 11.65$).

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC11 è risultato essere dunque il derivato di-acetilato di **EC7**, prodotto non noto in letteratura e dunque mai isolato, ne sintetizzato.

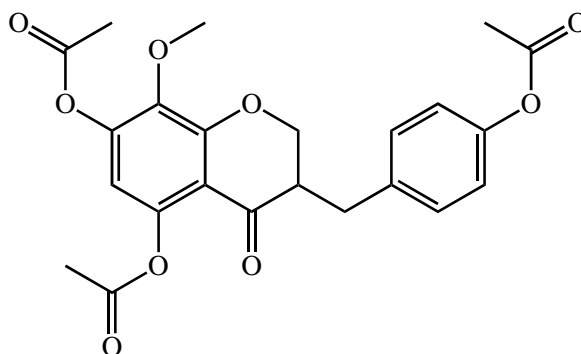


Figura 91. *Struttura EC12.*

Il composto **EC12** è un solido bianco amorfo con formula molecolare $C_{23}H_{22}O_9$.

EC12 è stato caratterizzato mediante spettroscopie NMR mono- e bi- dimensionali e dal confronto con i dati di letteratura e con **EC11**.

Rispetto a **EC11** è stata riscontrata una variazione solo per quanto riguarda i segnali dell'anello A. La presenza di un nuovo gruppo acetile è stata confermata grazie ai nuovi segnali a $\delta C = 169.9/20.7$ tipici dei gruppi acetili, e la sua posizione attestata in 5 grazie all'assenza del segnale del protone ossidrilico presente invece in **EC11**.

Per una descrizione completa della struttura molecolare, gli altri segnali sono stati confermati mediante spettroscopie NMR bidimensionali, come HSQC, COSY, HMBC e NOESY.

EC12 è risultato essere dunque il derivato tri-acetilato di **EC7**, prodotto non noto in letteratura e dunque mai isolato, ne sintetizzato.

2.2.1.1.3 *Eucomis comosa: Attività Citotossica*

Dal momento che, fino ad oggi, non sono disponibili in letteratura dati relativi alla citotossicità di questi composti, in una fase preliminare dello studio sono stati analizzati i vari omoisoflavonoidi a diverse concentrazioni in parallelo su cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231, valutandone gli effetti. A tal fine, sono state aggiunte alle cellule

differenti dosi dei composti (5-300 μM) e l'incubazione è stata prolungata per 48 ore in presenza dei prodotti, prima di procedere con l'analisi della vitalità cellulare.

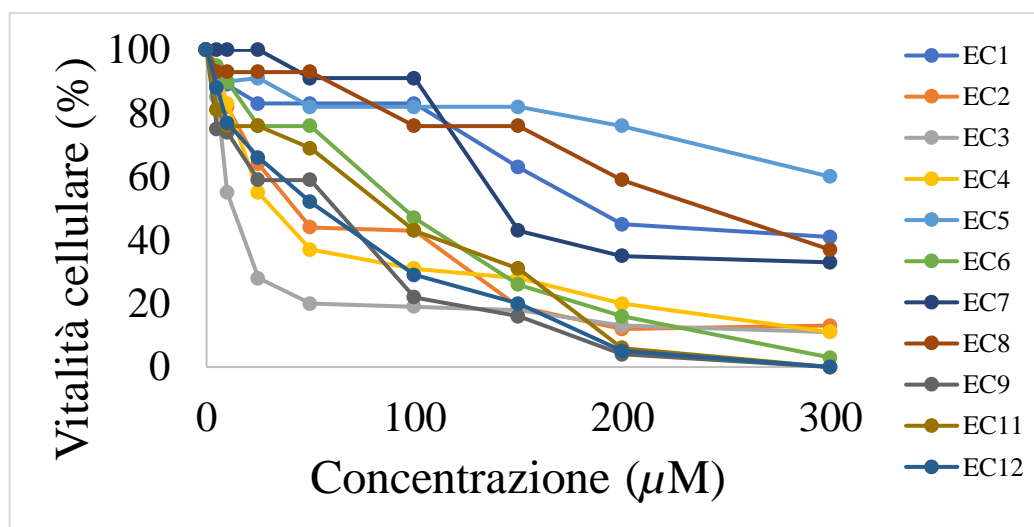


Figura 92. Effetto degli omoisoflavonoidi sulla vitalità cellulare di MDA-MB-231. Le cellule di carcinoma mammario sono state incubate in presenza di diverse concentrazioni di **EC1-12** per 48 ore come riportato nella Sezione Sperimentale. Successivamente, la percentuale di vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il saggio MTT.

Tutti i composti hanno mostrato un effetto dose-dipendente nella riduzione della vitalità cellulare. Tra i prodotti di origine naturale, quelli che hanno avuto l'impatto minore sulla vitalità cellulare sono stati **EC5**, l'unico privo dell'anello B, ed **EC8**, l'unico omoisoflavonoide con un gruppo metossile in posizione 5 invece di un gruppo ossidrilico. È interessante che **EC6** si è dimostrato più attivo rispetto al suo isomero **EC7**, che presenta il gruppo metossile in posizione 8 anziché in posizione 6, riducendo la vitalità cellulare del 53% alla concentrazione di 100 μM . In generale i risultati migliori sono stati ottenuti dagli omoisoflavonoidi con un'insaturazione tra la posizione 3 e 9. Tra questi, **EC2** ed **EC3**, ovvero quelli con un'insaturazione di tipo "Z", si sono distinti per la loro efficacia, con **EC3** particolarmente promettente: privo del gruppo metossile in posizione 8 rispetto a **EC2**, ha ridotto la vitalità cellulare del 72% già alla concentrazione di 25 μM .

Infine, un'osservazione rilevante riguarda **EC4**, che a basse concentrazioni ha superato **EC2** in efficacia, suggerendo che la presenza di un'insaturazione di tipo "Z", a parità di struttura, abbia un'influenza inferiore rispetto all'assenza di un gruppo metossile vicino a un gruppo ossidrilico sull'anello A.

Per quanto riguarda i prodotti di origine sintetica, sono risultati tutti più attivi del prodotto di partenza **EC7**. Il prodotto **EC9** ha ridotto la vitalità cellulare del 78% alla concentrazione

di 100 μM , rispetto a **EC7**, che alla stessa concentrazione aveva causato solo il 9% di riduzione di vitalità cellulare.

I risultati ottenuti evidenziano che le metilazioni, già ampiamente descritte in letteratura per altri omoisoflavonoidi, rappresentano una strategia efficace per aumentare l'attività biologica. Anche le acetilazioni hanno portato a derivati con attività migliorata, suggerendo che queste modifiche possano ulteriormente ampliare il ventaglio di possibili ottimizzazioni strutturali. Tuttavia, i composti acetilati sembrano essere meno efficaci rispetto ai derivati metilati, sottolineando la necessità di un'analisi approfondita della relazione struttura-attività per ogni modifica specifica.

Nel complesso, questi risultati contribuiscono in modo significativo alla comprensione del ruolo delle modifiche strutturali nella modulazione dell'attività biologica degli omoisoflavonoidi. Tali evidenze forniscono una solida base per future indagini volte a identificare nuovi candidati terapeutici e a sviluppare strategie di ottimizzazione più mirate per questa classe di composti.

3. CONCLUSIONI

La ricerca condotta si inserisce in un quadro più ampio volto ad approfondire la conoscenza delle piante endemiche del Mediterraneo, con un'attenzione particolare a quelle originarie della Sicilia, e ad analizzare il loro potenziale per applicazioni farmacologiche. In particolare, lo studio si concentra sui metaboliti secondari di una delle principali famiglie botaniche presenti in questa regione, quella delle Apiaceae, caratterizzate da una vasta gamma di composti bioattivi.

La scelta di analizzare le piante endemiche siciliane nasce dalla posizione strategica dell'isola e dalla sua varietà di microclimi, che la rendono un autentico hotspot di biodiversità vegetale. Accanto a questo, viene studiata anche la biodiversità di altre aree ricche, come il Sudafrica, con un particolare focus sulle piante della famiglia Asparagaceae, note per il loro contenuto di omoisoflavonoidi, composti di grande interesse farmacologico, soprattutto per il trattamento di patologie oncologiche.

Ciò si collega direttamente all'obiettivo primario del gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro negli ultimi tre anni, ovvero individuare metaboliti dotati di attività antitumorale o di interesse chemotassonomico. In questo contesto, l'integrazione di studi tassonomici e chimici si è rivelata indispensabile per esplorare e caratterizzare in modo più approfondito le specificità della flora endemica siciliana.

Attraverso un approccio multidisciplinare che integra tecniche avanzate di analisi chimica e biologica, è stato possibile distinguere e caratterizzare in modo più dettagliato le diverse specie vegetali, mettendo in luce il legame tra biodiversità, chimica dei metaboliti e adattamenti evolutivi. Questi risultati non solo arricchiscono la conoscenza tassonomica, ma sottolineano anche il valore intrinseco della biodiversità nel favorire lo sviluppo di risorse naturali innovative per applicazioni terapeutiche.

In particolare, l'analisi delle Apiaceae siciliane, tra cui le specie di *Ammi*, *Bifora*, *Cachrys*, *Crithmum* e *Seseli*, ha evidenziato una grande variabilità chimica nei metaboliti secondari, testimoniando l'importanza delle pressioni selettive locali nella diversificazione di composti bioattivi.

Tra i risultati più significativi, spiccano oli essenziali di *Bifora testiculata*, *Pimpinella peregrina*, *Prangos trifida*, *Seseli bocconei*, *Seseli tortuosum tortuosum*, *Seseli tortuosum maritimum*, e *Tordylium apulum*.

Questi oli essenziali, infatti, hanno mostrato un'ampia gamma di attività biologiche, quali proprietà antitumorali, antimicrobiche e antiossidanti, offrendo nuove opportunità per future applicazioni terapeutiche.

Particolarmente rilevante è stato il comportamento del *trans*-2-dodecenale, componente principale dell'olio essenziale di *B. testiculata*, che ha dimostrato un'attività citotossica superiore al cisplatino su cellule di carcinoma mammario (MDA-MB-231).

Anche l'olio essenziale di *Pimpinella peregrina*, ricco di sesquiterpeni come il *trans*- α -bergamotene, si è distinto per una forte attività antimicrobica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi, in particolare *Bacillus subtilis*, e per un'elevata capacità antiossidante.

Analogamente, gli oli essenziali di *Prangos trifida* e delle specie di *Seseli* hanno mostrato attività biologiche promettenti. L'olio essenziale di *P. trifida* si è distinto per l'alto contenuto di idrocarburi monoterpenici come *cis*- β -ocimene e α -fellandrene, con significative proprietà antimicrobiche, mentre quelli di *Seseli* hanno evidenziato una sinergia tra i loro componenti principali, con effetti antiproliferativi rilevanti su cellule tumorali HCT116.

Parallelamente, l'analisi si è estesa ai composti non volatili, concentrandosi su metaboliti di media polarità come cumarine e lattoni sesquiterpenici. Tra i composti più promettenti, la (+)-Marnesina (**F2**), isolata da *Ferulago nodosa*, e un lattone sesquiterpenico (**1**), estratto da *Laserpitium siler* subsp. *siculum*, hanno evidenziato attività citotossica dose-dipendente su cellule tumorali di cancro al colon e carcinoma mammario, ponendosi come precursori di potenziali farmaci a basso costo.

Per quanto riguarda le Asparagaceae sudafricane, sono stati isolati diversi composti omoisoflavonoidici mai descritti in precedenza, tra cui due (**EC3** ed **EC4**) che hanno mostrato un potente effetto citotossico, attribuito alla presenza di un doppio legame Z tra i carboni in posizione 3 e 9. Modifiche strutturali come metilazioni e acetilazioni hanno ulteriormente migliorato le loro proprietà biologiche, dimostrando il ruolo cruciale della chimica sintetica nell'ottimizzazione di nuovi candidati farmacologici.

Questi risultati, che includono anche la relazione struttura-attività dei composti isolati, sottolineano l'importanza degli studi tassonomici, chimici e biologici per comprendere le relazioni evolutive tra le specie e per valorizzare la biodiversità locale e globale. L'attenzione dedicata alle piante rare e ai loro oli essenziali ha messo in luce proprietà come l'attività insetticida e antitumorale, evidenziando il doppio ruolo di questi prodotti naturali: strumenti di studio tassonomico e risorse per applicazioni industriali e terapeutiche.

Infine, la tesi dimostra come l'esplorazione delle piante endemiche del Mediterraneo e di ecosistemi ricchi come quello sudafricano possa gettare le basi per lo sviluppo di farmaci innovativi, contribuendo al contempo alla conservazione della biodiversità. Le implicazioni terapeutiche dei composti isolati, soprattutto in oncologia e nelle malattie infettive, aprono nuove prospettive per la ricerca scientifica e per l'innovazione farmacologica, valorizzando le peculiarità di ambienti unici come la flora siciliana e sudafricana.

4. SEZIONE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALE VEGETALE

Ammi crinitum è stata raccolta a Torre Salsa, Sicilia (Italia) (37°21'53" N, 13°21'07" E, 40 m s.l.m.) all'inizio di Aprile 2022. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109757) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Ammi visnaga è stata raccolta a Marcanzotta, Sicilia (Italia) (37°55'23" N, 12°30'06" E, 88 m s.l.m.) all'inizio di Giugno 2024. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia.

Bifora testiculata è stata raccolta a Villalba, Caltanissetta, Sicilia (Italia) (37°38'42" N, 13°50'17" E, 700 m s.l.m.) all'inizio di Maggio 2023. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia.

Cachrys pungens è stata raccolta sui monti Peloritani, Messina, Sicilia (Italia) (38°13'02" N, 15°32'00" E, 280 m s.l.m.) all'inizio di Maggio 2023. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Alessandro Crisafulli, Università degli Studi di Messina, e dal Prof. Rosario Schicchi, Università degli Studi di Palermo. L'esemplare del voucher (PAL 109765) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Cachrys cristata è stata raccolta a Monte Castelluccio, Messina, Sicilia (Italia) (38°06'53" N, 14°53'27" E, 400 m s.l.m.) all'inizio di Maggio 2022. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109757) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Crithmum maritimum è stata raccolta a Isola delle Femmine, Palermo, Sicilia (Italia) (38°11'01" N, 13°14'06" E, 3 m s.l.m.), all'inizio di Agosto 2023; a Sakarum Beach, Dugi Otok, Croazia (44°08'03" N 14°52'24" E 1 m s.l.m) a Luglio 2023; Drobni Pijerak, vicino Budva, Montenegro (44°08'03" N 14°52'24" E 3 m s.l.m) a Luglio 2023; e a Caesarea, Israele, (32°29'58" N 34°53'27" E 7 m s.l.m) a Luglio 2023. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. Gli esemplari dei

voucher (PAL 109780-109781-109782-109783) sono stati depositati presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Ferulago nodosa subsp. *geniculata* è stata raccolta a Noto Antica, Siracusa, Sicilia (Italia) (36°57'27" N, 15°02'19" E, 384 m s.l.m.) all'inizio di Aprile 2019. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109707) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Geocaryum capillifolium è stata raccolta sulle Madonie a Mandria del Conte, Sicilia (Italia) (37°52'39" N, 14°00'08" E, 1280 m s.l.m.) all'inizio di Luglio 2023. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109780) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Laserpitium siler subsp. *siculum* è stata raccolta sulle Madonie, a Contrada Quacella, Sicilia (Italia) (37°50'45" N, 14°01'13" E, 1500 m s.l.m.) all'inizio di Maggio 2020. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109716) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Magydaris pastinacea è stata raccolta a Monte Pizzuta, Sicilia (Italia) (37°59'33" N, 13°15'44" E, 300 m s.l.m.) all'inizio di Giugno 2022. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia.

Oenanthe fistulosa è stata raccolta a Bosco Ficuzza, Sicilia (Italia) (37°52'58" N, 13°23'37" E, 600 m s.l.m.) all'inizio di Giugno 2024. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia.

Pimpinella peregrina è stata raccolta a Bosco Ficuzza, Sicilia (Italia) (37°53'07" N, 13°23'20" E, 689 m s.l.m.) all'inizio di Maggio 2023. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 113557) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Prangos trifida è stata raccolta a Rocchetta Nervina, Liguria (Italia) (43°53'21" N, 07°36'02" E, 300 m s.l.m.) all'inizio di Giugno 2022. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109757) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Seseli tortuosum subsp. *tortuosum* è stata raccolta a Mojo Alcantara, Sicilia (Italia) (37°54'36" N, 15°02'56" E, 640 m s.l.m.) all'inizio di Dicembre 2021. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109751) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Seseli tortuosum subsp. *maritimum* è stata raccolta a Capo Feto, Mazzara del Vallo, Sicilia (Italia) (37°39'34" N, 12°31'56" E, 1 m s.l.m.) all'inizio di Dicembre 2021. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109750) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Seseli bocconei è stata raccolta a Capo Zafferano, Sicilia (Italia) (38°06'36" N, 13°31'56" E, 14 m s.l.m.) all'inizio di Ottobre 2021. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 2865/2021) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Thapsia garganica L. subsp. *messanensis* è stata raccolta vicino Dinnammare, Messina, Sicilia (Italia) (38°12'21" N, 15°29'54" E, 580 m s.l.m.) all'inizio di Gennaio 2024. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Rosario Schicchi, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109763) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Tordylium apulum è stata raccolta a Romitello, Sicilia (Italia) (38°02'23" N, 13°10'13" E, 948 m s.l.m.) all'inizio di Maggio 2022. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 113478) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Torilis nodosa è stata raccolta a Rocca Busambra, Sicilia (Italia) (37°51'08" N, 13°25'15" E, 700 m s.l.m.) all'inizio di Aprile 2024. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof.

Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL 109781) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

Eucomis comosa è stata raccolta ai Royal botanical garden di Kew, Regno Unito (51°28'44" N, 0°17'42" O, 10 m s.l.m.) all'inizio di Ottobre 2023.

4.2 PROCEDURE GENERALI PER I COMPOSTI

VOLATILI

4.2.1 Estrazione

I materiali vegetali freschi sono stati tagliati manualmente in piccoli frammenti e successivamente sottoposti a idrodistillazione mediante apparato di Clevenger per 3 ore, secondo la procedura standard descritta nella Farmacopea Europea (2020). Gli oli essenziali ottenuti sono stati anidrificati con solfato di sodio anidro, filtrati e posti in freezer a -20°C, fino al momento dell'analisi. Le rese degli oli essenziali sono riportate in Tabella S1.

Tabella S1. *Rese % oli essenziali.*

| Materiale vegetale | Parte vegetale | Resa (%) (w/w) |
|--|-----------------------|-----------------------|
| <i>Ammi crinitum</i> | Parti aeree | 0.50 |
| <i>Ammi visnaga</i> | Fiori | 0.70 |
| | Fusti | 0.30 |
| <i>Bifora testiculata</i> | Parti aeree | 0.20 |
| <i>Cachrys pungens</i> | Parti aeree | 0.08 |
| <i>Cachrys cristata</i> | Parti aeree | 0.04 |
| <i>Crithmum maritimum</i> (Italia) | Parti aeree | 0.85 |
| <i>Crithmum maritimum</i> (Croazia) | Parti aeree | 0.14 |
| | Parti aeree | 0.24 |
| <i>Crithmum maritimum</i> (Montenegro) | Parti aeree | 0.24 |
| <i>Crithmum maritimum</i> (Israele) | Parti aeree | 0.10 |
| <i>Geocaryum capillifolium</i> | Parti aeree | 0.04 |
| <i>Magydaris pastinacea</i> | Foglie | 0.04 |
| <i>Oenanthe fistulosa</i> | Parti aeree | 0.03 |
| <i>Pimpinella peregrina</i> | Fiori | 0.16 |

| | | |
|------------------------------------|-------------|------|
| | Fusti | 0.05 |
| <i>Prangos trifida</i> | Parti aeree | 0.30 |
| | Parti aeree | 0.17 |
| <i>Seseli tortuosum subsp.</i> | Fiori | 0.26 |
| <i>tortuosum</i> | Fusti | 0.15 |
| | Radici | 0.13 |
| | Parti aeree | 0.18 |
| <i>Seseli tortuosum subsp.</i> | Fiori | 0.22 |
| <i>maritimum</i> | Fusti | 0.15 |
| | Radici | 0.34 |
| | Parti aeree | 0.15 |
| <i>Seseli bocconeii</i> | Fiori | 0.73 |
| | Foglie | 0.20 |
| | Fusti | 0.13 |
| <i>Thapsia garganica L. subsp.</i> | | |
| <i>messanensis</i> | Parti aeree | 0.04 |
| <i>Tordylium apulum</i> | Parti aeree | 0.10 |
| <i>Torilis nodosa</i> | Parti aeree | 0.06 |

4.2.2 Analisi GC-FID oli essenziali

Ai fini delle analisi sono stati utilizzati due diversi cromatografi, uno con colonna polare e un altro con colonna apolare.

Nel primo caso, l'analisi GC-MS è stata eseguita utilizzando un gascromatografo Shimadzu QP 2010 plus dotato di un autoiniettore AOC-20i (Shimadzu, Kyoto, Giappone), equipaggiato con un rilevatore FID, una colonna capillare (DB-Wax) di 30 m×0,25 mm i.d., spessore del film 0,25 µm e un elaboratore di dati.

Il programma del forno era il seguente: incremento della temperatura da 40 °C per 5 minuti, a una velocità di 2 °C/min fino a 260 °C, quindi mantenimento isoterma per 20 minuti. Come gas portante è stato utilizzato l'elio (1 mL/min). Le temperature dell'iniettore e del rilevatore erano impostate rispettivamente a 250 °C e 290 °C. È stato iniettato 1 µL di una soluzione di olio (3% EO/esano v/v) in modalità split 1.0; intervallo MS 40-600.

Le percentuali riportate nelle diverse tabelle di composizione sono state calcolate utilizzando il TIC (Total Ion Current) del MS. I parametri erano i seguenti: voltaggio di ionizzazione, 70 eV; energia del moltiplicatore di elettroni, 2000 V; temperatura della linea di trasferimento, 295 °C; ritardo del solvente, 4 minuti. Gli indici di ritenzione lineare (LRI)

sono stati determinati utilizzando i tempi di ritenzione degli n-alcani (C8-C40) e i picchi sono stati identificati tramite confronto con gli spettri di massa e gli indici di ritenzione relativi nei database WILEY275, NIST 17, ADAMS e FFNSC2.

Nel secondo caso, l'analisi GC-MS è stata condotta utilizzando un sistema Agilent 7000C GC, equipaggiato con una colonna capillare in silice fusa Agilent DB-5 MS (30 m x 0,25 mm i.d.; spessore del film 0,25 μm), accoppiata a un rivelatore di massa selettivo a singolo quadrupolo Agilent MSD 5973 (voltage di ionizzazione 70 eV; energia del moltiplicatore di elettroni 2000 V; temperatura della linea di trasferimento 295 °C; ritardo solvente: 4 min). Il programma del forno era il seguente: aumento della temperatura da 40 °C per 5 minuti, a una velocità di 2 °C/min fino a 260 °C, poi mantenimento isoterma per 20 minuti. Come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio (1 mL/min). Le temperature dell'iniettore e del rivelatore erano impostate rispettivamente a 250 °C e 290 °C. È stato iniettato 1 μL di una soluzione di olio essenziale (3% EO/esano v/v) in modalità splitless; intervallo MS 40-600.

Le percentuali riportate nelle diverse tabelle di composizione sono state calcolate utilizzando il TIC (Total Ion Current) dal MS. Gli indici di ritenzione di Kovats (KI) sono stati determinati utilizzando i tempi di ritenzione di n-alcani (C8-C40), e i picchi sono stati identificati mediante confronto con spettri di massa e indici di ritenzione relativi nei database WILEY275, NIST 17, ADAMS e FFNSC2.

4.3 PROCEDURE GENERALI PER I COMPOSTI NON-VOLATILI

4.3.1 Estrazione e Isolamento

4.3.1.1 *Ferulago nodosa*

Una volta rimosse manualmente le foglie e il fusto, le radici di *F. nodosa* (1530 g) sono state accuratamente lavate, tagliate in strisce sottili e congelate a -20 °C. Successivamente, per una settimana, la parte vegetale è stata sottoposta a un ciclo di liofilizzazione per eliminare tutta l'acqua presente, ottenendo 980 g di materiale vegetale secco.

Il prodotto ottenuto dalla liofilizzazione è stato finemente macinato utilizzando un mortaio di ceramica ed estratto con acetone (2 L \times 3 volte), a temperatura ambiente e al buio. Dopo un'adeguata filtrazione, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e a temperature inferiori a 40 °C, per evitare che il calore causasse alterazioni a eventuali sostanze termolabili presenti. L'estratto (11 g) è stato sottoposto a cromatografia su colonna utilizzando gel di

silice inattivato con il 15% di acqua fredda come fase stazionaria, e miscele di etere di petrolio/etere etilico nei rapporti 1:1, 3:7, 2:8 e 1:9 v/v come eluente. Al termine di questa operazione sono state isolate diverse frazioni, alcune delle quali mostravano la presenza di prodotti potenzialmente interessanti alla TLC. Il sistema anisaldeide/H₂SO₄ è stato utilizzato come sistema di rilevazione. Sono stati isolati due prodotti principalmente un terpenoide, la pressafonina-A (**F1**, 150 mg), e una cumarina, la marmesina (**F2**, 300 mg).

4.3.1.2 *Laserpitium siler subsp. siculum*

A seguito della rimozione manuale delle foglie e dei fusti, le radici di *L. siler subsp. siculum* (1400 g) sono state meticolosamente lavate, tagliate in strisce sottili e congelate a una temperatura di -20 °C. Successivamente, il materiale vegetale è stato sottoposto a un ciclo di liofilizzazione per un periodo di una settimana, con l'obiettivo di eliminare tutta l'acqua presente. Questo processo ha portato alla produzione di 800 g di materiale vegetale secco. Il prodotto liofilizzato è stato finemente macinato utilizzando un mortaio di ceramica ed estratto con acetone (2 L × 3 volte) a temperatura ambiente e al buio. Dopo la filtrazione, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e a temperature inferiori a 40 °C per evitare che il calore causasse alterazioni a eventuali sostanze termolabili presenti. L'estratto (7 g) è stato sottoposto a cromatografia su colonna utilizzando gel di silice inattivato con il 15% di acqua fredda come fase stazionaria, con miscele di cicloesano ed etilacetato nei rapporti 8:2, 6:4, 8:2 e 9:1 (v/v) come eluente. Al termine di questo processo, sono state isolate diverse frazioni, alcune delle quali hanno mostrato il potenziale per prodotti interessanti, come osservato attraverso la cromatografia su strato sottile (TLC). Il sistema anisaldeide/H₂SO₄ è stato impiegato come sistema di rilevazione. Sono stati isolati cinque prodotti (**1–5**), quattro lattoni sesquiterpenici: Acido 2-butenico, 2-metil-, 6-(acetilossi)-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidro-8-idrossi-3,6,9-trimetil-2-ossoazuleno[4,5-b]furano-4-il estere (**1**, 177 mg); Acido 2-butenico, 2-metil-, 3,6-bis(acetilossi)-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidro-8-idrossi-3,6,9-trimetil-2-ossoazuleno[4,5-b]furano-4-il estere (**2**, 31 mg); 4-acetossi-8-idrossi-3,6,9-trimetil-2-osso-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidroazuleno[4,5-b]furano-6-il 3-idrossi-2-metilenbutanoato e 6-acetossi-8-idrossi-3,6,9-trimetil-2-osso-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decaidroazuleno[4,5-b]furano-4-il 3-idrossi-2-metilenbutanoato (**3** e **4**, 23 mg); e un triterpenoide, l'acido oleanonico (**5**, 44 mg).

4.3.1.3 *Eucomis comosa*

A seguito della rimozione manuale delle foglie e dei fusti, i bulbi di *Eucomis comosa* (400 g) sono stati meticolosamente tagliate in strisce sottili e congelati a una temperatura di -20

°C. Il prodotto tagliato è stato finemente macinato ed estratto in diclorometano (2 L × 3 volte) a temperatura ambiente e al buio. Dopo la filtrazione, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e a temperature inferiori a 40 °C per evitare che il calore causasse alterazioni a eventuali sostanze termolabili presenti. L'estratto (3 g) è stato sottoposto a cromatografia su colonna utilizzando gel di silice come fase stazionaria, con miscele di esano e diclorometano, poi diclorometano ed etilacetato, etilacetato e acetone, e infine acetone e metanolo, con gradiente di polarità, ottenendo così 410 frazioni. Al termine di questo processo, sono state isolate diverse frazioni, alcune delle quali hanno mostrato il potenziale per prodotti interessanti, come osservato attraverso la cromatografia su strato sottile (TLC). Il sistema anisaldehyde/H₂SO₄ è stato impiegato come sistema di rilevazione.

Tabella S2 *Frazioni e relativi prodotti ottenuti mediante separazione su colonna cromatografica di un estratto in diclorometano di E. comosa.*

| Numero di Frazioni | Solventi | Prodotti |
|---------------------------|------------------------------|--|
| 0-8 | Esano/DCM 5:5 | Acidi grassi |
| 9-16 | Esano/DCM 3:7 | |
| 17-35 | DCM | |
| | | EC1 |
| | | EC2 |
| 35-85 | DCM/Acetato di etile 9:1 | EC3 |
| | | EC4 |
| | DCM/Acetato di etile | EC5 |
| 86-98 | 8.5:1.5 | EC6 |
| 99-125 | DCM/Acetato di etile 8:2 | EC7 |
| 126-154 | DCM/Acetato di etile 7:3 | Prodotti precedentemente isolati in miscela |
| 155-183 | DCM/Acetato di etile 6:4 | |
| 184-215 | DCM/Acetato di etile 4:6 | |
| 216-285 | Acetato di etile | EC8 |
| 286-309 | Acetato di etile/Acetone 8:2 | |
| 310-335 | Acetone | |
| 336-348 | Acetone/Metanolo 5:5 | Glicosidi |
| 349-364 | Acetone/Metanolo 2:8 | |
| 365-410 | Metanolo | |

Sono stati isolati otto prodotti (**EC1-8**) con struttura omoisoflavonoidica: 4*H*-1-Benzopirano-4-one, 2,3-diidro-5,8-diidrossi-7-metossi-3-[(4-metossifenil)metilene]-, (3*E*)- (**EC1**, 7,0 mg); 4*H*-1-Benzopirano-4-one, 2,3-diidro-5,7-diidrossi-8-metossi-3-[(4-metossifenil)metilene]-, (*Z*)- (**EC2**, 53,6 mg); *Z*-Eucomin (**EC3**, 69,0 mg); *E*-Eucomin (**EC4**, 21,2 mg); 5,7-diidrossi-8-metossicroman-4-one (**EC5**, 14,3 mg); 3,9-diidroeucomnalina (**EC6**, 72,2 mg); 3,9-diidropunctatina (**EC7**, 262,5 mg); 4*H*-1-Benzopirano-4-one, 2,3-diidro-7-idrossi-3-[(4-idrossifenil)metil]-5,8-dimetossi- (**EC8**, 16,0 mg).

4.3.2 Sintesi dei derivati

4.3.2.1 Metilazione

Il composto **EC9** è stato preparato dal composto **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) e CH₂N₂ (≈ 2,0 mL). **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) è stato per prima dissolto in etere etilico a 0 °C. Dopo, CH₂N₂ (≈ 2,0 mL) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a 0 °C per 5 ore, terminate le quali il solvente è stato rimosso a pressione ridotte e sottovuoto. Il residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica utilizzando come miscela eluente cicloesano-EtOAc (8:2, v/v) dando **EC9** (27,0 mg, 73,8%) ed il prodotto di partenza **EC7**.

Il composto **EC10** è stato preparato dal composto **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) e CH₂N₂ (≈ 10,0 mL). **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) è stato per prima dissolto in etere etilico a 0 °C. Dopo, CH₂N₂ (≈ 10,0 mL) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a 0 °C per 5 ore, terminate le quali il solvente è stato rimosso a pressione ridotte e sottovuoto. Il residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica utilizzando come miscela eluente cicloesano-EtOAc (7:3, v/v) dando **EC10** (35,0 mg, 88,2%), il prodotto di partenza **EC7** ed **EC9**.

Il composto **EC9** è stato sintetizzato a partire dal composto **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) utilizzando CH₂N₂ (circa 2,0 mL). Inizialmente, **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) è stato sciolto in etere etilico a 0 °C. Successivamente, è stato aggiunto CH₂N₂ (circa 2,0 mL), e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 0 °C per 5 ore. Al termine, il solvente è stato rimosso mediante riduzione della pressione e sottovuoto. Il residuo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando una miscela eluente composta da cicloesano ed EtOAc (8:2, v/v). Questo processo ha portato all'ottenimento del composto **EC9** (27,0 mg, resa 73,8%) e del composto di partenza **EC7**.

Il composto **EC10** è stato ottenuto partendo sempre dal composto **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) e utilizzando CH_2N_2 (circa 10,0 mL). **EC7** (35,0 mg, 0,11 mmol) è stato inizialmente dissolto in etere etilico a 0 °C, a cui è stato poi aggiunto CH_2N_2 (circa 10,0 mL). La miscela reattiva è stata agitata a 0 °C per 5 ore. Successivamente, il solvente è stato eliminato sotto vuoto e a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato purificato tramite cromatografia su colonna, impiegando una miscela eluente di cicloesano ed EtOAc (7:3, v/v). Questo procedimento ha permesso di isolare il composto **EC10** (35,0 mg, resa 88,2%), insieme al prodotto di partenza **EC7** e al composto **EC9**.

4.3.2.2 Acetilazione

I composti **EC11** ed **EC12** sono stati sintetizzati a partire dal composto **EC7** (78,7 mg, 0,25 mmol) e anidride acetica (35,0 μL , 0,37 mmol). **EC7** (78,7 mg, 0,25 mmol) è stato inizialmente disciolto in etere etilico, a cui è stata successivamente aggiunta l'anidride acetica (35,0 μL , 0,37 mmol). La miscela reattiva è stata mantenuta sotto agitazione a 60 °C per 3 ore. Al termine della reazione, il solvente è stato rimosso tramite evaporazione sotto vuoto e a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato purificato utilizzando cromatografia su colonna con una miscela eluente di diclorometano ed EtOAc (9:1, v/v), ottenendo il composto **EC11** (52,4 mg, resa 52,5%) e il composto **EC12** (32,8 mg, resa 30,0%).

4.3.3 Caratterizzazione

I poteri rotatori sono stati misurati con CHCl_3 con un polarimetro digitale JASCO P-1010; Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati a 400/100 MHz in CDCl_3 , se non diversamente indicato, su spettrometri Bruker, utilizzando il segnale del solvente residuo ($\delta = 7.27$ in ^1H e $\delta = 77.00$ in ^{13}C per CDCl_3) come riferimento. Gli esperimenti DEPT, ^1H - ^1H -COSY, HMBC, HSQC, DEPT e NOESY sono stati eseguiti utilizzando microprogrammi Bruker. Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando un'apparecchiatura HPLC/ESI/Q-TOF HRMS. Le condizioni dell'HPLC erano le seguenti: acqua, acetonitrile e acido formico erano di grado HPLC/MS; il sistema HPLC era un Agilent 1260 Infinity; è stata utilizzata una colonna C18 a fase inversa (ZORBAX Extended-C18 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm) con una colonna di guardia di sicurezza Phenomenex C18 (4 mm \times 3 mm); il flusso era di 0.4 mL/min e la temperatura della colonna era impostata a 30 °C. Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Q-TOF di massa accurato Agilent 6540 UHD dotato di una sorgente Dual AJS ESI funzionante sia in modalità negativa che positiva. Per la cromatografia su colonna è stato utilizzato gel Merck Si (70–230 mesh), disattivato con il

15% di H₂O. Le TLC sono state eseguite su gel di silice (Merck, Kieselgel 60 F254, 0.25 e 0.50 mm). Le macchie sono state visualizzate mediante esposizione alla luce UV (254, 366 nm) e spruzzando con una soluzione di 4-anisaldeide in EtOH acido. Tutti i reagenti e solventi organici utilizzati, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (San Louis, MO, USA).

4.4 ATTIVITÀ BIOLOGICA

4.4.1 Attività Pesticida

4.4.1.1 Insetti

Le colture di *S. oryzae* e *C. maculatus* sono state allevate presso l'Università di Palermo (Italia), Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, in una camera climatica a 25 ± 2 °C, 50–60% di umidità relativa e con un fotoperiodo di 16:8 luce. Le specie sono state allevate separatamente in gabbie di plastica (25 × 25 × 40 cm) con due fori coperti da rete (5 cm di diametro) per la ventilazione e sono state alimentate con una miscela di semi di legumi (*C. maculatus*) o con una miscela di farina di grano e riso 1:1 p/p (*S. oryzae*).

4.4.1.2 Saggi di tossicità

I saggi per valutare la tossicità degli oli essenziali dei fiori, delle foglie e dei fusti di *Seseli bocconei* contro *S. oryzae* e *C. maculatus* sono stati condotti utilizzando piastre Petri in vetro (diametro 9 cm). Gli oli essenziali dei fiori, delle foglie e dei fusti di *S. bocconei* sono stati dissolti separatamente in *n*-esano (>99%, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per ottenere una concentrazione del 10%. Un'aliquota di 100 μL di soluzione è stata delicatamente pipettata sulla superficie inferiore delle piastre Petri per coprirla interamente. Dopo l'evaporazione del solvente (2 min), gli adulti sono stati collocati all'interno delle piastre Petri insieme a 2 g di alimento (lo stesso utilizzato per l'allevamento), che sono state immediatamente chiuse. Per ogni replica sono stati utilizzati venti adulti di *S. oryzae* o *C. maculatus* di età compresa tra 2 e 8 giorni. Ogni saggio è stato replicato dieci volte per ciascuna specie e per ciascun OE. Come controllo negativo, un numero identico di repliche è stato condotto pipettando 100 μL di *n*-esano, mentre come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione di piretro al 10% in esano. Dopo l'avvio dei saggi, le piastre Petri contenenti gli adulti sono state trasferite in una cella climatica a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo di 16:8 luce. La tossicità di ciascun OE è stata valutata in termini di tempo di sopravvivenza, contando gli individui morti dopo 1, 24, 48, 72, 96 e 168 ore dall'inizio dell'esperimento per stimare il tempo letale cinquantina (LT₅₀) utilizzando l'analisi probit (Throne et al. 1995). Inoltre, i dati ottenuti sono stati analizzati

utilizzando un'analisi del tempo di sopravvivenza di Kaplan–Meier tramite Statistica 10.0 per Windows (Statsoft 2001, Vigonza, PD, Italia).

4.4.2 Attività Antimicrobica

4.4.2.1 Ceppi batterici

Sono stati utilizzati ceppi Gram-positivi: *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Bacillus subtilis* PY79, *Bacillus cereus* ATCC10987, e ceppi Gram-negativi: *Escherichia coli* DH5a, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Salmonella tiphymurium* ATCC14028, per valutare l'attività antimicrobica.

4.4.2.2 Saggi di attività antimicrobica

La presenza di molecole antimicrobiche negli oli essenziali (OE) di *P. peregrina* e *P. trifida* è stata valutata utilizzando un test di diffusione su agar basato su un metodo Kirby-Bauer modificato (Bauer et al. 1966). In sintesi, tre diverse quantità di OE (0,25, 0,5 e 0,75 mg) sono state poste su piastre di agar Luria-Bertani ricoperte con circa 10 mL di agar soffice (0,70%) premiscelato con un ceppo Gram-positivo, *B. subtilis* o *S. aureus*, e un ceppo Gram-negativo, *E. coli*, cresciuti per 24 ore a 37 °C. Il controllo negativo consisteva in dimetilsolfossido (DMSO) all'80%, utilizzato per risospendere i diversi oli essenziali, mentre il controllo positivo era rappresentato dall'antibiotico ampicillina. Le piastre sono state incubate per tutta la notte a 37 °C e l'attività antimicrobica è stata calcolata utilizzando la formula fornita di seguito.

$$A/mL = \frac{\text{Diameter of the zone of clearance(mm)} \times 1000}{\text{Volume taken in the well } (\mu\text{L})}$$

Una colonia di ceppi Gram-positivi e Gram-negativi è stata risospesa in 5 mL di terreno LB (Difco, Detroit, MI) e incubata per tutta la notte a 37 °C. La coltura in fase stazionaria è stata diluita 1:100 in tampone fosfato. I campioni sono stati preparati con un volume finale di 500 μL , contenente cellule batteriche a 1/25 del volume finale ed oli essenziali a varie concentrazioni (0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 16 mg/mL per *Pimpinella*, mentre 0,001; 0,01; 0,1 e 0,2 mg/mL per *Prangos*). I campioni senza OE hanno servito da controllo positivo, mentre il controllo negativo consisteva in cellule batteriche con DMSO all'80%. Dopo 4 ore di incubazione a 37 °C con agitazione, sono state preparate diluizioni seriali (1:100, 1:1000) di tutti i campioni, poi placcate su agar-LB in piastre Petri e incubate per tutta la notte a 37 °C.

Il giorno successivo, i tassi di sopravvivenza batterica sono stati stimati contando il numero di colonie (Di Napoli et al. 2023). Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato, e il risultato riportato rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti (valore $p < 0,05$).

4.4.2.3 Determinazione della concentrazione minima inibitoria (MIC)

Le concentrazioni minime inibitorie (MIC) dei diversi oli essenziali contro i ceppi batterici selezionati sono state determinate utilizzando il metodo di microdiluizione stabilito dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Circa 5×10^5 UFC/mL sono state aggiunte a 95 μ L di brodo Mueller-Hinton (CAM-HB; Difco), con o senza diverse concentrazioni (0,1–30 mg/mL) di OE dei fiori di *P. peregrina* e di OE di *P. trifida* (0,001–1 mg/mL). Dopo un'incubazione notturna a 37 °C, i valori MIC sono stati registrati come la più bassa concentrazione di oli essenziali che ha impedito qualsiasi crescita batterica visibile a 600 nm. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato, e il risultato riportato rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti.

4.4.2.4 Doppia colorazione DAPI/PI e acquisizione di immagini al microscopio a fluorescenza

Per la doppia colorazione, 100 μ L di colture batteriche di *E. coli* e *S. subtilis* (per *P. peregrina*) e 1 mL di *S. aureus* e *E. coli* (per *P. trifida*) sono stati incubati al buio per 4 ore a 37 °C con agitazione, in presenza o assenza di **Ppf** a concentrazioni di 4 mg/mL e 0,1 mg/mL, e in presenza o assenza di **Pt** a una concentrazione di 0,20 mg/mL, rispettivamente. Dopo l'incubazione, 10 μ L di coltura batterica sono stati mescolati con una soluzione contenente 3 μ g/mL di 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro (DAPI) e 20 μ g/mL di ioduro di propidio (PI). I campioni sono stati osservati utilizzando un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Giappone) dotato di filtro DAPI (eccitazione/emissione: 358/461 nm). I tempi di acquisizione standard sono stati impostati a 1000 ms per la doppia colorazione DAPI/PI. Le immagini sono state catturate utilizzando una fotocamera digitale Olympus DP70 (Castagliuolo et al. 2023).

4.4.3 Attività Antiossidante

4.4.3.1 Test della capacità di scavenging del DPPH

L'attività di scavenging del radicale DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) è stata misurata seguendo il metodo descritto da Kedare (Kedare and Singh, 2011). Concentrazioni variabili dell'estratto di **Ppf** (0–0,3 mg/mL) sono state aggiunte a un volume finale di 1 mL di

metanolo al 100% contenente 0,1 mM di DPPH appena preparato (con assorbanza $\leq 1,0$). La miscela di reazione è stata incubata per 30 minuti a 25 °C e l'assorbanza è stata misurata a 517 nm. L'attività di scavenging del DPPH è stata calcolata utilizzando l'equazione di Mazzoli (Mazzoli et al. 2019):

$$\text{DPPH}(\%) = (1 - \text{AS}/\text{AC}) \times 100,$$

dove **AS** è l'assorbanza della soluzione di DPPH reagita con il campione, e **AC** è l'assorbanza della soluzione di DPPH da sola.

4.4.3.2 Test della capacità di scavenging dell'ABTS

Questo test è stato condotto seguendo il metodo di Re (Re et al. 1999) con modifiche per la rimozione dei cationi radicalici ABTS. Una soluzione stock è stata preparata mescolando 7 mM di ABTS e 2,45 mM di persolfato di potassio in acqua, seguita da incubazione al buio a temperatura ambiente per 16 ore prima dell'uso. La soluzione concentrata di ABTS è stata diluita con soluzione tampone fosfato (PBS) per ottenere un'assorbanza finale di 0,72 ($\pm 0,02$) a 734 nm. Successivamente, 1 mL della soluzione di ABTS è stato aggiunto a 100 μL di diversi OE a concentrazioni variabili (0–0,8 mg/mL). Dopo un'incubazione di 10 minuti al buio, l'assorbanza è stata misurata a 734 nm usando uno spettrofotometro UV/Vis PharmaSpec 1700 (Shimadzu). L'inibizione percentuale del radicale ABTS è stata calcolata usando la formula:

$$\text{ABTS}^+(\%) = (1 - \text{AS}/\text{AC}) \times 100,$$

dove **AC** è l'assorbanza della soluzione di ABTS e **AS** è l'assorbanza del campione a 734 nm. La concentrazione necessaria per il 50% di inibizione è stata determinata e rappresentata come IC_{50} . Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato e il risultato riportato rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti.

4.4.3.3 Test della capacità di scavenging di H_2O_2

La stabilità del perossido di idrogeno è stata misurata monitorando l'assorbanza a 240 nm di 1 mL di soluzione di perossido di idrogeno appena preparata (50 mM di tampone fosfato di potassio, pH 7,0; 0,036% p/p H_2O_2). La determinazione quantitativa dell'attività di scavenging di H_2O_2 è stata valutata tramite la riduzione dell'assorbanza a 240 nm, come descritto da Beers e Sizer (Beers and Sizer, 1952; Petruk et al. 2018). In breve, concentrazioni variabili di **Ppf** e **Pt** (0–0,8 mg/mL) sono state incubate a 20 °C in 1 mL di soluzione di perossido di idrogeno. Dopo 30 minuti, aliquote sono state centrifugate per 1

minuto a 13.000 g, e la concentrazione di perossido di idrogeno nel surnatante è stata determinata misurando l'assorbanza a 240 nm. La percentuale di perossido di idrogeno rimossa è stata calcolata come:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\%) = (1 - \text{AS}/\text{AC}) \times 100,$$

dove **AC** è l'assorbanza della soluzione di perossido di idrogeno e **AS** è l'assorbanza del campione a 240 nm.

4.4.3.4 Coltura di cellule eucariotiche

Le cellule HaCat (cheratinociti umani) sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Euroclone, Milano, Italia), integrato con il 10% di siero fetale bovino (Euroclone, Milano, Italia), 2 mM di L-glutammina (Euroclone, Milano, Italia) e 1% di penicillina-streptomicina (Euroclone, Milano, Italia). Le cellule sono state cresciute a 37 °C con il 5% di CO₂.

4.4.3.5 Test di citotossicità nelle cellule HaCat

Le cellule HaCat sono state seminate in piastre a 96 pozzetti e incubate per una notte a 37 °C con il 5% di CO₂. Il mezzo è stato poi sostituito con un mezzo fresco contenente **Ppf** (0,1 mg/mL) o DMSO (Merk Life Science, Darmstadt, Germania) come controllo. Dopo 4 ore di incubazione a 37 °C, il mezzo coltivato è stato sostituito con DMEM senza rosso fenolo (Euroclone, Milano, Italia) e con MTT (20 mM) e incubato per 4 ore a 37 °C. I sali di formazano insolubili risultanti sono stati disciolti in DMSO e quantificati misurando l'assorbanza a $\lambda = 570$ nm usando un lettore di micropiastre Synergy H4 Hybrid (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.4.3.6 Test di rilevamento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule HaCat

Le cellule HaCat sono state seminate in piastre a 96 pozzetti e incubate per una notte a 37 °C con il 5% di CO₂. Le cellule sono state trattate con OE (0,1 mg/mL) o DMSO come controllo. Dopo 4 ore, le cellule sono state pretrattate per 45 minuti con 2',7'-diclorofluorescina diacetato (30 μ M) (Merk Life Science, Darmstadt, Germania) risospeso in DMEM senza rosso fenolo, integrato con il 2% di siero fetale bovino. Successivamente, le cellule sono state esposte a H₂O₂ (1 mM) per 1,5 ore prima della rilevazione dei ROS

intracellulari. L'intensità della fluorescenza (485/528 nm) è stata misurata usando un lettore di micropiastre Synergy H4 Hybrid.

4.4.3.7 Enzimi antiossidanti nei PMN

I PMN sono stati trattati con oli essenziali di *T. apulum* in presenza e assenza di OZ (0,5 mg/mL) seguendo il protocollo di Napolitano (Napolitano et al. 2022). L'attività della superossido dismutasi (SOD) e della catalasi (CAT) è stata determinata utilizzando kit commerciali (BioAssay System, San Diego, CA, USA). L'attività degli enzimi è stata espressa in U/L (Barbosa et al. 2016). Gli oli essenziali di *T. apulum* sono stati testati a concentrazioni di 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. La produzione di ROS e le attività antiossidanti sono state esaminate mediante analisi di varianza (ANOVA) unidirezionale, seguita dal test post-hoc di confronto multiplo di Tukey. In Figura 74, i valori sono presentati come media \pm errore standard; numeri non accompagnati dalla stessa lettera sono significativamente diversi per $p < 0,05$.

4.4.4 Attività Citotossica

4.4.4.1 *Bifora testiculata*

4.4.4.1.1 Linee cellulari

Le linee cellulari A375 (Human malignant melanoma cell line) e MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma cell line) sono state coltivate in Dulbecco medium (DMEM), supplementato con 100 IU/ml penicillina, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomina, 2 mM L-glutamina e 10% di siero fetale bovino inattivato (HI-FBS). La linea cellulare CaCo2 (Human colon adenocarcinoma cell line) è stata coltivata in DMEM supplementato con 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL penicillina, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomina, 1% aminoacidi non essenziali (NEAA) e 10% HI-FBS. Le colture sono state mantenute in incubatore a 37 °C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Il mantenimento delle colture cellulari è stato effettuato mediante distacco delle cellule con Tripsina/EDTA e diluizione in terreno fresco prima del raggiungimento dello stato di confluenza cellulare (circa 80 % di confluenza).

4.4.4.1.2 Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante osservazione delle cellule al microscopio a contrasto di fase, in presenza del colorante Blu Tripiano allo 0,4 % in PBS. Esso permette di discriminare le cellule vitali da quelle morte in quanto viene assunto solo da queste ultime: le cellule vive appaiono chiare e rifrangenti, perché la membrana integra risulta essere

impermeabile al colorante, mentre quelle morte risultano scure, in quanto il colorante riesce a penetrare la membrana cellulare.

La conta delle cellule è stata effettuata con la camera di conta Fuchs-Rosenthal: 30 μ l di sospensione cellulare sono stati miscelati con 30 μ l di soluzione Blu Tripano. Il numero totale di cellule, ottenuto moltiplicando il valore medio della conta per il fattore di correzione 104, dipendente dalle caratteristiche della camera di conta, corrisponde al numero di cellule presenti in un ml di sospensione cellulare.

4.4.4.1.3 Test di citotossicità: saggio MTT

Il saggio dell'MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2yl)-2,5-difeniltetrazolo bromide) sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali di ridurre il sale di tetrazolio di colore giallo, in cristalli di formazano di color viola. La reazione pertanto può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive e la quantità di formazano prodotta, misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm, è proporzionale al numero di cellule vive (Page et al. 1998). 100 μ L della sospensione cellulare, preparata alla densità pari a 2×10^4 cellule/mL, sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti. Dopo 24h, sono stati aggiunti nel medium l'olio essenziale di *Bifora testiculata* e il *trans*-2-dodecenale a diverse concentrazioni in un range compreso tra 0,78 e 200 μ g/mL.

Le piastre sono state incubate per 72h. La proliferazione cellulare è stata determinata mediante il metodo colorimetrico MTT.

10 μ L della soluzione MTT, preparata ad una concentrazione di 5 mg/ml in PBS (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4), sono stati aggiunti in ogni pozzetto dopo 72h di incubazione e la piastra è stata incubata a 37°C per altre 4h. La riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima succinato deidrogenasi determina la formazione di cristalli di formazano di colore blu sul fondo dei pozzetti. Al termine del tempo di incubazione il supernatante è stato allontanato e sono stati aggiunti 100 μ L per pozzetto di dimetilsulfossido (DMSO). La piastra è stata posta in agitazione per circa 15 min in modo da solubilizzare i cristalli e il colore sviluppato è stato letto mediante spettrofotometro FLUOstar Omega (BMG Labtech Milan, Italy) alla lunghezza d'onda di 540 nm. La vitalità cellulare è stata calcolata come rapporto percentuale tra l'assorbanza del campione rispetto al veicolo (etanolo). L'IC₅₀ rappresenta la concentrazione del campione che mostra un effetto inibente la proliferazione cellulare del 50%.

I valori di IC₅₀ sono stati calcolati con il programma GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.4.4.2 *Ferulago nodosa*

4.4.4.2.1 *Colture Cellulari e Reagenti*

La linea cellulare di carcinoma del colon umano HCT116 è stata ottenuta dall'*Istituto Scientifico Tumori* (Genova, Italia) e coltivata come monostrato in terreno DMEM (cod. cat. ECM0749L, Euroclone SpA), integrato con il 10% (v/v) di FCS inattivato al calore (cod. cat. ECS0180L; Euroclone SpA), 1% di aminoacidi non essenziali (cod. cat. ECB3054D; Euroclone SpA), 2 mM di glutammina (cod. cat. ECB3000D; Euroclone SpA) e 1% di soluzione di penicillina/streptomina (cod. cat. ECB3001D; Euroclone SpA). Le cellule sono state seminate in 200 μ L di DMEM su piastre a 96 pozzetti e lasciate aderire durante la notte nel terreno di coltura prima del trattamento. I terreni e i reagenti per la coltura cellulare sono stati acquistati da Euroclone SpA. Tutti gli altri reagenti chimici sono stati forniti da Millipore Sigma.

4.4.4.2.2 *Valutazione della vitalità cellulare*

La vitalità delle cellule esposte al trattamento, con diverse dosi di prodotti estratti da *F. nodosa*, è stata valutata mediante il test MTT (Pratelli et al. 2022). In breve, 10⁴ cellule/pozzetto sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti, come precedentemente descritto (Lo Galbo et al. 2021), e trattate per 48 ore con **F1** e **F2**. Al termine, 4 μ L di soluzione MTT (preparata dissolvendo 5 mg in 1 mL di PBS) sono stati aggiunti al terreno di coltura e la piastra è stata incubata per 2 ore a 37 °C al buio. Successivamente, le cellule sono state lisate in un buffer di lisi (Lauricella et al. 2016) e l'assorbanza è stata letta a 570 e 690 nm utilizzando un lettore automatico di piastre ELISA (OPSYS MR; Dynex Technologies).

4.4.4.3 *Seseli*

4.4.4.3.1 *Colture Cellulari e Reagenti*

Tutti i composti puri, come α -pinene, β -pinene, *S*-(-)-limonene, *R*-(+)-limonene, sabinene e β -ocimene, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, 82,024 Taufkirchen, Germania).

Le cellule di carcinoma del colon umano HCT116 sono state acquistate dall'*Interlab Cell Line Collection* (ICLC, Genova, Italia). Le cellule sono state mantenute in monostrato in flask da 75 cm² in terreno RPMI 1640, integrato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS), 2 mM di L-glutammina, 100 U/mL di penicillina e 50 μ g/mL di streptomina in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in aria a 37 °C, come riportato in

precedenza (Lauricella et al. 2019). Prima dei trattamenti, le cellule sono state staccate utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA (0,5 mg/mL di tripsina e 0,2 mg/mL di EDTA) e seminate in piastre a 96 pozzetti come descritto di seguito.

4.4.4.3.2 Valutazione della vitalità cellulare

Per valutare gli effetti degli oli essenziali di *Seseli* e dei principali composti sulla vitalità delle cellule HCT116, le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti ($7 \times 10^3/200 \mu\text{L}/\text{pozzetto}$) e, dopo 24 ore, trattate con diverse dosi di tutti gli EO o dei principali composti. Dopo 48 ore di trattamento, la vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio colorimetrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro], come riportato (Lauricella et al. 2003). In particolare, 10 μL di MTT (5,5 mg/mL) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, e le cellule sono state incubate a 37 °C per 2 ore. Successivamente, dopo la rimozione del terreno, 100 μL di buffer di lisi (20% di sodio dodecil solfato in 50% N,N-dimetilformammide) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Alla fine, l'assorbanza del formazano è stata misurata direttamente a 570 nm con 690 nm come lunghezza d'onda di riferimento utilizzando un lettore automatico di piastre ELISA (OPSYS MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). La vitalità cellulare è stata espressa come percentuale del valore OD delle cellule trattate con oli essenziali rispetto ai campioni non trattati usati come controllo (100% vitalità). Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato, e i dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. La determinazione dei valori di IC_{50} è stata effettuata utilizzando il software Graphpad Prism 7.0 (San Diego, CA, USA), come precedentemente riportato (Notaro et al. 2023).

L'analisi degli effetti morfologici indotti dai trattamenti è stata visualizzata con un microscopio OPTIKA IM3FL4 equipaggiato con un sistema di acquisizione immagini digitale (OPTIKA). Le immagini sono state catturate utilizzando il software OPTIKA PROVIEW (versione x64, 4.11.20805.20220506).

4.4.4.3.3 Analisi Statistica

I dati sono stati rappresentati come media \pm SD e le analisi sono state eseguite utilizzando il *t-test* di Student e l'analisi della varianza a una via. Sono stati effettuati confronti tra il controllo (non trattato) e tutti i campioni trattati. La soglia di significatività statistica è stata fissata a $P < 0,05$.

4.4.4.4 *Laserpitium siler subsp. siculum*

4.4.4.4.1 *Colture Cellulari*

La linea cellulare utilizzata è una linea di carcinoma mammario triplo negativo MDA-MB-231. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm², in presenza di terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 10% precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti), L-glutamina (2 mM) all'1% di antibiotico-antimicotico (100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina and 250 ng/mL amfotericina B). Per consentirne la crescita, le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C, in una atmosfera costituita dal 95% di aria e al 5% di anidride carbonica. Queste condizioni consentono alle cellule di proliferare adese al substrato di polistirene delle fiasche disponendosi in monostrato.

Al fine di valutare gli effetti indotti dai composti, le cellule sono state prima distaccate con la soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/mL di tripsina e 1 mg/mL di EDTA) diluita in PBS (Phosphate buffered saline: NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4) alla concentrazione 1X. Al termine le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (1.2x10⁵ cellule/2 mL di terreno di coltura in ogni pozzetto) o da 96 pozzetti (7x10³ cellule/200 µl di terreno di coltura in ogni pozzetto) in rapporto agli esperimenti da condurre.

Dopo il piastramento, le cellule sono state lasciate aderire al substrato per 24 h, dopodiché sono state trattate con i composti a diverse concentrazioni e tempi. Per ogni esperimento è stato condotto parallelamente un test di controllo, utilizzando cellule trattate esclusivamente con il veicolo in cui sono stati solubilizzati i composti utilizzati.

4.4.4.4.2 *Valutazione della vitalità cellulare*

La vitalità cellulare è stata analizzata con il Saggio di vitalità MTT. Per eseguire tale saggio le cellule sono state prima seminate in piastre da 96 pozzetti (piastrandolo in ogni pozzetto (8x10³ cellule/200 µl di terreno di coltura) e dopo 24 h, al fine di permettere l'adesione cellulare, sono state trattate con i composti per diversi tempi.

Al termine del trattamento si è proceduto con l'aggiunta del composto MTT. La soluzione di MTT è stata preparata solubilizzando il sale in PBS caldo (5,5 mg/mL di PBS, Ca²⁺ Mg²⁺ free). 10 µl di questa soluzione sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. La piastra è stata successivamente riposta al buio in incubatore a 37 °C al 5% di CO₂ per circa 2 h. Trascorso il tempo di incubazione il terreno è stato rimosso interamente e sono stati aggiunti 100 µl di un tampone di lisi (40% N,N-dimethylformamide, 20% SDS, pH 7.4) per ciascun pozzetto. Successivamente, la piastra è stata delicatamente agitata con un agitatore per piastre per

permettere la lisi delle cellule. Al termine del processo, è stata effettuata una valutazione spettrofotometrica utilizzando un lettore per micropiastre ELISA (OPSYS MR, Dynex Technologies) a una lunghezza d'onda di 570 nm. Come prova bianca è stato utilizzato un pozzetto contenente solo il tampone di lisi. I risultati sono stati espressi come percentuale di vitalità residua rispetto al controllo non trattato, considerato come avente il 100% di vitalità.

4.4.4.4.3 Valutazione vacuoli autofagici mediante colorazione con monodansilcadaverina

La formazione di organelli vescicolari acidi è stata evidenziata attraverso colorazione con monodansilcadaverina (MDC), una molecola fluorescente verde utile a riconoscere i vacuoli autofagici come strutture *dot-like* distinte, che si presentano con una colorazione verde intensa e rilevabile tramite microscopia a fluorescenza. La MDC tende ad accumularsi nei compartimenti acidi come gli autofagosomi, legando in particolare i lipidi presenti sulla membrana di questi organelli. Per questo esperimento le cellule sono state seminate (8×10^3 cellule/200 μ L di terreno di coltura) in piastre da 96 pozzetti per 24h e dopo il trattamento con i composti, sono state colorate direttamente in piastra con MDC 0,05 mM in PBS per 10 minuti a 37 °C al buio e analizzate al microscopio a fluorescenza OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia), utilizzando il filtro DAPI.

4.4.4.4.4 Valutazione dell'apoptosi

La colorazione con arancio di acridina e bromuro di etidio (AO/EB) è impiegata per rilevare i cambiamenti nucleari e la formazione di corpi apoptotici, distintivi dell'apoptosi. Le cellule vengono esaminate al microscopio a fluorescenza e conteggiate per misurare il livello di apoptosi.

L'arancio di acridina è un colorante vitale che colora di verde sia le cellule vive che quelle morte. Il bromuro di etidio, invece, colora di rosso solo le cellule che hanno perso l'integrità della membrana. Le cellule vive appariranno verdi con nuclei regolari.

Le cellule in fase iniziale di apoptosi appariranno giallo-verdi e mostreranno punti verdi brillanti nei nuclei, dovuti alla condensazione della cromatina e alla frammentazione nucleare. Le cellule in fase avanzata di apoptosi incorporeranno anche il bromuro di etidio, apparendo arancioni, con nuclei condensati e spesso frammentati. Le cellule necrotiche si colorano di arancio-rosso, ma mostreranno una morfologia nucleare simile a quella delle cellule vive, senza cromatina condensata.

Per questo esperimento, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a una densità di 8×10^3 cellule per 200 μ L di terreno di coltura e incubate per 24 h. Dopo il trattamento con

i composti, sono stati aggiunti direttamente alla piastra 10 μL della soluzione AO/EB (contenente 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di AO e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di EB in PBS) ed incubati a 37 °C per circa 5 minuti. Dopo aver allontanato il terreno ed effettuato un lavaggio in PBS, le cellule sono state visualizzate utilizzando un microscopio a fluorescenza OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia).

Per determinare come i composti studiati inducano la morte cellulare, vengono impiegati due diversi fluorocromi: annessina V coniugata con fluorescein isotiocianato (FITC) e ioduro di propidio (PI). Questo metodo sfrutta la capacità dell'annexina di legarsi alla fosfatidilserina (PS) ed emettere fluorescenza verde grazie al fluoroforo coniugato FITC. La fosfatidilserina è un fosfolipide che si trova normalmente sul lato interno della membrana cellulare. Durante l'apoptosi, la fosfatidilserina viene esposta sulla superficie esterna della cellula, permettendo all'annexina V di legarsi. Tuttavia, questo legame può avvenire anche in assenza di apoptosi, poiché durante la necrosi la membrana plasmatica si rompe, permettendo all'annexina di penetrare e legarsi alla PS attraverso i pori della membrana danneggiata.

Per verificare l'integrità della membrana cellulare, viene aggiunto un altro fluorocromo: lo ioduro di propidio (PI). Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA che emette fluorescenza rossa quando la membrana cellulare è compromessa e il colorante può entrare nella cellula. Le cellule che risultano negative sia all'annexina V-FITC sia allo PI sono vive, poiché la loro membrana intatta impedisce ai fluorocromi di legarsi. Le cellule positive all'annexina V-FITC e negative allo PI sono in fase precoce di apoptosi, caratterizzate dalla traslocazione della fosfatidilserina. Le cellule negative all'annexina V-FITC ma positive allo PI sono necrotiche, in quanto mostrano solo la rottura della membrana plasmatica. Infine, le cellule positive sia all'annexina V-FITC che allo PI sono in fase avanzata di apoptosi.

Per effettuare questo saggio è stato impiegato il kit Annexin V-FITC e Propidium iodide acquistati presso Miltenyi Biotec Srl. In particolare, le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti ($1,5 \times 10^5$ cellule/2 mL di terreno di coltura). Il giorno seguente le cellule sono state trattate con i composti ed il trattamento è stato protratto per 48 h. Al termine le cellule sono state recuperate e centrifugate a 800 rpm per 10 minuti, scartato il surnatante sono stati aggiunti 500 μL di binding buffer 10x (preparato dalla soluzione stock 20x, fornita dal kit, in acqua).

Successivamente è stata effettuata la conta cellulare per ottenere 10^5 cellule/campione, aggiunto il volume di cellule calcolato, il binding buffer per un volume finale di 100 μL e

2,5 μL del reattivo fluorocromo annessina V FITC in un tubo eppendorf. Viene incubato 15 min al buio e a temperatura ambiente, in seguito viene effettuato un lavaggio con 1 mL di binding buffer e una centrifugazione a 800 rpm per 10 minuti. In seguito, viene scartato il surnatante in modo da eliminare il fluorocromo non legato. Infine, viene risospeso il pellet in 500 μL binding buffer, aggiunti 1,25 μL di PI ed effettuata la lettura al citofluorimetro CytoFLEX, utilizzando il software di analisi CytExpert.

4.4.4.4.5 Valutazione dei ROS intracellulari

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata misurata usando 2',7'-diidrodiclorofluoresceinadiacetato (H_2DCFDA Molecular Probes; Eugene, OR).

Il suddetto composto contiene due gruppi acetile ed è in grado di attraversare la membrana cellulare grazie alla sua natura lipofila. Quando entra nella cellula, le esterasi cellulari rimuovono i gruppi acetile trasformando l' H_2DCFDA in un composto non fluorescente, che viene ossidato dai ROS e convertito in 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), una sostanza che emette un colore verde fluorescente. Per questo esperimento le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti (1×10^4 cellule/200 μL di terreno di coltura) e trattate con i lattoni sesquiterpenici per tempi brevi. Al termine del trattamento il terreno di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 500 μL di una soluzione 15 μM di H_2DCFDA .

La piastra è stata riposta in incubatore a 37 °C per circa 15 minuti. Al termine dell'incubazione, il fluorocromo è stato sostituito con 500 μL /pozzetto di PBS e le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVUEW (OPTIKA Srl, Italia) e utilizzando il filtro FITC (FITC, fluoresceina isotiocianato) con una lunghezza d'onda d'eccitazione di 485 nm e lunghezza d'onda d'emissione di 530 nm.

4.4.4.4.6 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi\text{m}$)

La riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi\text{m}$) è uno degli eventi intracellulari che si verificano durante l'apoptosi e coincide con un aumento della permeabilità mitocondriale. Il $\Delta\psi\text{m}$ è stato misurato secondo quanto fornito dal protocollo della Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) utilizzando il fluorocromo JC-1, ovvero il 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina ioduro, una sonda cationica lipofila in grado di attraversare le membrane cellulari.

A basse concentrazioni, dovute a un $\Delta\psi\text{m}$ ridotto, dato che le cellule non sono vitali, il JC-1 è in forma monomeric (JC-1 monomeri) e si accumulano prevalentemente nel citosol e producendo una fluorescenza verde che viene osservata mediante filtro FITC.

A concentrazioni elevate, dovute a un $\Delta\psi_m$ alto, il colorante si accumula all'interno degli organelli e forma aggregati (JC-1 aggregati) che emettono una fluorescenza rosso-arancione, osservabile mediante filtro rodamina. Di conseguenza, una diminuzione della fluorescenza degli aggregati indica una depolarizzazione, mentre un aumento indica una iperpolarizzazione.

Per valutare l'effetto dei composti sul $\Delta\psi_m$, le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule/200 μ L di terreno di coltura). In seguito al trattamento con i composti le cellule sono state incubate per 15 minuti a 37 °C con una soluzione contenente JC-1. Dopo aver allontanato il terreno ed effettuati due lavaggi in PBS, le cellule sono state visualizzate utilizzando un microscopio a fluorescenza OPTIKA IM3FL4 dotato di un sistema di immagini OPTIKA PROVIEW (OPTIKA Srl, Italia).

4.4.4.4.7 Western blotting

Le cellule MDA-MB-231 sono state piastrate in multiwells da 6 (1.2×10^5 /2 mL di terreno di coltura) ed in seguito ai trattamenti con i composti sono state lavate con PBS, staccate con Tripsina-EDTA (0,25X), prelevate e centrifugate a 800 rpm per 10 minuti. Dopo la centrifugazione il supernatante è stato allontanato ed i pellet contenenti le cellule sono stati lisati con un tampone dissociante RIPA buffer preparato in PBS (pH 7.4) e contenente NP40 all'1%, sodio deossicolato 0.5%, SDS 0.1 %. A questo tampone dissociante sono stati aggiunti inibitori delle proteasi: aprotinina 25 μ g/mL, fluoruro di fenilmetansulfonile (PMSF) 1 mM, leupeptina 25 μ g/mL e pirofosfato di sodio 0.2 mM. Successivamente, i lisati cellulari così ottenuti sono stati sonicati (3 cicli da 10 secondi, intervallati da 5 secondi) ad una intensità di 10 REV (Soniprep 150). Il contenuto proteico degli estratti cellulari è stato determinato mediante il metodo di Bradford, impiegando una curva standard di albumina.

Per ciascun campione, 40 μ g di proteine sono stati preparati in Sample Buffer (Tris-HCl 50 mM, β -mercaptoetanolo 100 mM, SDS al 2%, Blu di Bromofenolo allo 0.1%, Glicerolo al 10%, pH finale 6.8). Dopo denaturazione per 5 minuti a 95 °C, i campioni sono stati caricati, insieme a standard di proteine a peso molecolare noto, su pozzetti formati dal gel di poliacrilammide (al 7.5%, 10%, 12% o 15% in rapporto al peso molecolare della proteina da valutare) e sottoposti a scorrimento elettroforetico verticale a 150V (20mA) per circa 2 ore in presenza del buffer di scorrimento Tris Glicina 1X (25 mM tris base, 250 mM glicina pH 8.3, 0.1%SDS).

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS) è una tecnica impiegata per separare le diverse proteine presenti in una miscela di campioni derivati da soluzioni di cellule lisate. In queste condizioni, grazie all'azione del detergente anionico SDS, le proteine acquisiscono una carica negativa, uniformando così la loro carica elettrica e consentendo la migrazione verso il polo positivo esclusivamente in base al loro peso molecolare. L'SDS-PAGE è composto dal resolving gel (o gel di risoluzione) e dallo stacking gel (o gel di compattamento). Entrambi contengono una miscela di acqua, acrilammide al 29%, N,N-metil bisacrilammide all'1%, tris-HCl, SDS, ammonio persolfato (AP: Trizma base 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5mM, pH 9.5) e TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiammina). La differenza risiede nel fatto che lo stacking gel possiede un pH di 6.8 che consente il compattamento delle proteine caricate all'interno dei pozzetti creati dai pettini disposti nella parte superiore del gel; il resolving gel possiede, invece, un pH superiore di 8.8 che invece consente alle proteine di separarsi in base al loro peso molecolare. L'acrilammide è un composto monomero solubile in acqua, neurotossico, cancerogeno e fotosensibile. L'N,N'-metilenbisacrilammide è anch'esso un composto abbastanza tossico contenente due doppi legami che partecipano alla reazione di polimerizzazione, e forma legami trasversali con le catene adiacenti di acrilammide. Entrambi i composti devono essere maneggiati con la massima attenzione. La polimerizzazione forma una struttura a reticolo dotata di pori a grandezza variabile che dipendono dalla concentrazione dei due composti (acrilammide e metilenbisacrilammide). I gel sono stati preparati poco prima dell'uso e i due composti di acrilammide riescono a copolimerizzare grazie alla presenza di un iniziatore che è l'AP e di un catalizzatore che è il TEMED. Lo scorrimento avviene poi in un buffer di TrisGlicina 1X (25 mM tris base, 250 mM glicina pH 8.3, 0.1% SDS).

Al termine dello scorrimento elettroforetico le proteine sono state trasferite, mediante elettroblotting (100V per circa 2 ore), su un filtro di nitrocellulosa (Pharmacia Biotech) in presenza di Transfer Buffer (Glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS allo 0.037% e Metanolo al 20%). Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine ed il loro contenuto omogeneo nei singoli campioni, il filtro di nitrocellulosa è stato colorato con il Rosso Ponceau 1X (un colorante che colora reversibilmente in rosso le proteine. Tale colore è stato poi rimosso dal filtro dopo una serie di lavaggi prima con acqua distillata e poi in TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 allo 0.005%, a pH 7.5) ed è stata preparata la soluzione di "blocking" (TBST e latte 2,5% o 5%) in cui è stato immerso il filtro per 1h. Terminata la fase del "blocking" sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno in TBST ed al filtro

è stato poi aggiunto l'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse (1 µg/mL di TBST) e l'incubazione è stata protratta per una notte a 4 °C.

Gli anticorpi primari impiegati per l'identificazione di LC-3, Caspasi 3 sono stati acquistati presso Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA) V-DAC-1, PARP-1 ed MnSOD sono stati acquistati presso Santa Cruz Biotechnology (St.Cruz, CA), mentre l'anticorpo Anti-p62 acquistato presso Sigma Aldrich Corporation (USA), infine HO-1 è stato acquistato presso Enzo Life Sciences (Milano, Italia).

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario il filtro è stato sottoposto a tre lavaggi successivi in TBST per eliminare eventuali residui di anticorpo non legato ed è stato incubato per 1h con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Il rilevamento delle bande è stato infine effettuato in chemiluminescenza (ECL) un sistema che si basa su una reazione di ossidazione che avviene nel filtro grazie all'utilizzo di sostanze contenute nel kit di reagenti (Amersham™ contenente Luminol-Enhancer solution e Peroxide Solution). L'HRP coniugata all'anticorpo secondario catalizza la reazione di ossidazione del luminolo in presenza di perossido di idrogeno. Il luminolo, che si trova in uno stato eccitato, immediatamente dopo la reazione decade emettendo una intensa chemiluminescenza.

Il segnale ottenuto tramite sviluppo in ECL è rilevato tramite il ChemiDoc ed elaborato con l'utilizzo del software "Quantity One".

4.4.4.4.8 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA), e i risultati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). Per valutare le differenze significative tra i campioni trattati e non trattati è stato utilizzato il test t di Student. Sono state considerate significative le differenze con un valore di $p < 0.05$.

4.4.4.5 Eucomis comosa

4.4.4.5.1 Colture Cellulari

La linea cellulare utilizzata è una linea di carcinoma mammario triplo negativo MDA-MB-231. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm², in presenza di terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 10% precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti), L-glutammina (2 mM) all'1% di antibiotico-antimicotico (100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina and 250 ng/mL amfotericina B). Per consentirne la crescita, le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C, in una atmosfera costituita dal 95% di aria e al 5% di anidride carbonica.

Queste condizioni consentono alle cellule di proliferare adese al substrato di polistirene delle fiasche disponendosi in monostrato.

Al fine di valutare gli effetti indotti dai composti, le cellule sono state prima distaccate con la soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/mL di tripsina e 1 mg/mL di EDTA) diluita in PBS (Phosphate buffered saline: NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4) alla concentrazione 1X. Al termine le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (1.2x10⁵ cellule/2 mL di terreno di coltura in ogni pozzetto) o da 96 pozzetti (7x10³ cellule/200 µl di terreno di coltura in ogni pozzetto) in rapporto agli esperimenti da condurre.

Dopo il piastramento, le cellule sono state lasciate aderire al substrato per 24 h, dopodiché sono state trattate con i composti a diverse concentrazioni e tempi. Per ogni esperimento è stato condotto parallelamente un test di controllo, utilizzando cellule trattate esclusivamente con il veicolo in cui sono stati solubilizzati i composti utilizzati.

4.4.4.5.2 Valutazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata analizzata con il Saggio di vitalità MTT. Per eseguire tale saggio le cellule sono state prima seminate in piastre da 96 pozzetti (piastrandolo in ogni pozzetto (8x10³ cellule/200 µl di terreno di coltura) e dopo 24 h, al fine di permettere l'adesione cellulare, sono state trattate con i composti per diversi tempi.

Al termine del trattamento si è proceduto con l'aggiunta del composto MTT. La soluzione di MTT è stata preparata solubilizzando il sale in PBS caldo (5,5 mg/mL di PBS, Ca²⁺ Mg²⁺ free). 10 µl di questa soluzione sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. La piastra è stata successivamente riposta al buio in incubatore a 37 °C al 5% di CO₂ per circa 2 h. Trascorso il tempo di incubazione il terreno è stato rimosso interamente e sono stati aggiunti 100 µl di un tampone di lisi (40% N,N-dimethylformamide, 20% SDS, pH 7.4) per ciascun pozzetto. Successivamente, la piastra è stata delicatamente agitata con un agitatore per piastre per permettere la lisi delle cellule. Al termine del processo, è stata effettuata una valutazione spettrofotometrica utilizzando un lettore per micropiastre ELISA (OPSYS MR, Dynex Technologies) a una lunghezza d'onda di 570 nm. Come prova bianca è stato utilizzato un pozzetto contenente solo il tampone di lisi. I risultati sono stati espressi come percentuale di vitalità residua rispetto al controllo non trattato, considerato come avente il 100% di vitalità.

5.APPENDICE

TABELLE COMPOSIZIONI OLI ESSENZIALI

Tabella A1. *Composizione OE Ammi crinitum (Ac).*

| No. | Compounds ^a (%) | LRI ^b | LRI ^c | LRI ^d | KRI ^e | Area (%) |
|-----------------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------|
| 1 | 2-Thujene | 1026 | 1035 | 920 | 1050 | 2.8 |
| 2 | β -Pinene | 1085 | 1099 | 974 | 1125 | 0.8 |
| 3 | Sabinene | 1111 | 1115 | 991 | 1134 | 63.9 |
| 4 | α -Terpinene | 1169 | 1179 | 1013 | 1192 | 2.7 |
| 5 | Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene,2,7,7,- trimethyl | 1180 | - | 899 | 1200 | 3.6 |
| 6 | γ -Terpinene | 1243 | 1255 | 1056 | 1254 | 8.0 |
| 7 | 4-Terpineol | 1587 | 1595 | 1179 | 1627 | 3.7 |
| 8 | Alloaromadendrene | 1552 | 1661 | 1458 | 1657 | 0.8 |
| 9 | α -Amorphene | 1670 | 1675 | 1484 | 1670 | 0.4 |
| 10 | γ -Muurolene | 1700 | 1704 | 1480 | 1701 | 0.8 |
| 11 | Germacrene D | 1702 | 1706 | 1487 | 1708 | 1.5 |
| 12 | δ -Cadinene | 1764 | 1773 | 1523 | 1767 | 1.1 |
| 13 | α -Calacorene | 1927 | 1936 | 1539 | 1904 | 0.2 |
| 14 | Geranyl tiglate | 2088 | 2096 | 1673 | 2097 | 1.0 |
| 15 | Viridiflorol | 2098 | 2104 | 1592 | 2100 | 0.3 |
| 16 | δ -Cadinol | 2183 | 2185 | 1674 | 2233 | 0.9 |
| 17 | τ -Cadinol | 2201 | 2204 | 1654 | 2240 | 2.2 |
| 18 | α -Cadinol | 2247 | 2255 | 1676 | 2259 | 0.2 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | | | 81.8 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | | | 4.7 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | | | 4.8 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | | | 3.6 |
| Total | | | | | | 94.9 |

^a Components listed in order of elution on an DB-Wax column; ^b Linear retention index on a DB-Wax polar column; ^c Linear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>); ^d Linear retention index on a DB-5MS apolar column; ^e Kovats retention index.

Tabella A2. *Composizione oli essenziali di Ammi visnaga (Av).*

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Flowers Area (%) | Stems Area (%) |
|-----------------------------------|--|-----------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| 1 | Isobutyl isobutyrate | 900 | 900 | 1.2 | 1.1 |
| 2 | 2-Thujene | 926 | 931 | 2.0 | 2.7 |
| 3 | α -Pinene | 932 | 935 | 0.4 | 0.5 |
| 4 | Sabinene | 974 | 976 | 1.6 | 0.7 |
| 5 | β -Pinene | 980 | 980 | 0.1 | 0.1 |
| 6 | β -Myrcene | 989 | 990 | 1.4 | 1.9 |
| 7 | Isobutyl 2-methylbutyrate | 1002 | 1004 | 2.7 | 1.7 |
| 8 | Isobutyl isopentanoate | 1005 | 1005 | 1.2 | 0.5 |
| 9 | Isopentyl butyrate | 1019 | 1020 | 5.3 | 5.4 |
| 10 | <i>p</i> -Cymene | 1022 | 1022 | 0.2 | 0.3 |
| 11 | Sylvestrene | 1028 | 1028 | 1.7 | 1.5 |
| 12 | β - <i>cis</i> -Ocimene | 1040 | 1040 | 3.3 | 2.1 |
| 13 | β - <i>trans</i> -Ocimene | 1050 | 1050 | 7.1 | 4.1 |
| 14 | γ -Terpinene | 1059 | 1062 | 0.1 | 0.2 |
| 15 | Terpinolene | 1079 | 1087 | 1.1 | 0.1 |
| 16 | 2-Methylbutyl 2-methylbutanoate | 1104 | 1107 | 12.6 | 10.4 |
| 17 | Linalol | 1107 | 1107 | 25.1 | 9.5 |
| 18 | Allo-Ocimene | 1120 | 1120 | 0.4 | 0.2 |
| 19 | Terpinen-4-ol | 1174 | 1176 | 0.2 | 0.3 |
| 20 | α -Terpineol | 1189 | 1189 | 1.1 | 0.7 |
| 21 | Lavandulyl acetate | 1278 | 1283 | 0.3 | 0.6 |
| 22 | Benzyl isobutanoate | 1287 | 1288 | 0.2 | 0.5 |
| 23 | <i>exo</i> -2-hydroxycineole acetate | 1330 | 1341 | 0.2 | - |
| 24 | α -Copaene | 1366 | 1376 | 0.3 | 0.2 |
| 25 | β -Bourbonene | 1376 | 1380 | 0.3 | 0.8 |
| 26 | Benzyl 2-methylbutyrate | 1375 | 1382 | 0.6 | 1.0 |
| 27 | β - <i>cis</i> -Farnesene | 1436 | 1443 | 0.3 | 0.6 |
| 28 | Epi-Bicyclosesquiphellandrene | 1466 | 1469 | 2.9 | 3.4 |
| 29 | Citronellyl butyrate | 1495 | 1503 | 0.3 | 1.4 |
| 30 | β -Sesquiphellandrene | 1509 | 1509 | 0.5 | 0.7 |
| 31 | butanoic acid, 2-methyl-, 3,7-dimethyl- 6-octenyl ester | 1555 | 1560 | - | 0.6 |
| 32 | Dodecyl butyrate | 1749 | 1761 | 0.7 | 0.9 |
| 33 | Verticillol | 2100 | 2106 | 19.3 | 38.2 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 19.4 | 14.4 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 26.9 | 11.1 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 4.3 | 5.7 |

| | | |
|------------------------------|-------------|-------------|
| Oxygenated Diterpenes | 19.3 | 38.2 |
| Esters | 24.8 | 23.5 |
| Total | 94.7 | 92.9 |

^a Components listed in order of elution on an DB-5MS column; ^b Kovats indices on a DB-5MS apolar column; ^c Kovats indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A3. *Composizione OE Bifora testiculata (Bt).*

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Area (%) |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| 1 | <i>trans</i> -2-Hexenal | 852 | 855 | 0.13 |
| 2 | Octanal | 1002 | 1006 | 0.06 |
| 3 | <i>p</i> -Cymene | 1020 | 1022 | 0.01 |
| 4 | Sylvestrene | 1025 | 1028 | 0.01 |
| 5 | β -Ocimene | 1048 | 1050 | 0.02 |
| 6 | <i>trans</i> -3-Undecene | 1086 | 1088 | 0.04 |
| 7 | Nonanal | 1102 | 1102 | 0.07 |
| 8 | <i>cis</i> -4-Decenal | 1192 | 1193 | 0.03 |
| 9 | <i>trans</i> -4-Decenal | 1195 | 1197 | 0.08 |
| 10 | Decanal | 1205 | 1207 | 1.95 |
| 11 | <i>cis</i> -2-Decenal | 1253 | 1255 | 3.25 |
| 12 | <i>trans</i> -2-Decenal | 1257 | 1263 | 0.17 |
| 13 | 2-Octylfuran | 1280 | 1284 | 0.11 |
| 14 | Tridecane | 1295 | 1300 | 0.14 |
| 15 | Undecanal | 1303 | 1310 | 0.14 |
| 16 | <i>cis</i> -2-Undecenal | 1347 | 1350 | 0.03 |
| 17 | <i>trans</i> -2-Undecenal | 1360 | 1361 | 0.42 |
| 18 | <i>trans</i> -4-Undecenal | 1396 | - | 3.38 |
| 19 | Dodecanal | 1408 | 1412 | 4.50 |
| 20 | <i>cis</i> -2-Dodecenal | 1460 | 1464 | 2.91 |
| 21 | <i>trans</i> -2-Dodecenal | 1465 | 1472 | 67.49 |
| 22 | <i>trans</i> -2-Tridecenal | 1550 | 1553 | 0.79 |
| 23 | Dodecanoic acid | 1564 | 1567 | 0.83 |
| 24 | 13-Tetradecenal | 1602 | 1608 | 0.32 |
| 25 | Tetradecanal | 1604 | 1613 | 0.38 |
| 26 | <i>trans</i> -2-Dodecenoic acid | 1631 | - | 4.55 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 0.04 |
| Aldehydes | | | | 86.10 |
| Other | | | | 5.67 |
| Total | | | | 91.81 |

^a Components listed in order of elution on an DB-5MS column; ^b Kovats indices on a DB-5MS apolar column; ^c Kovats indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A4. Composizioni oli essenziali *Cachrys pungens* (Cp) e *Cachrys cristata* (Cc).

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Area (%) | |
|-----|--|-----------------|-----------------|----------|-------|
| | | | | Cp | Cc |
| 1 | β -Thujene | 921 | 929 | 0.68 | - |
| 2 | α -Pinene | 930 | 930 | 3.59 | 7.32 |
| 3 | Camphene | 953 | 953 | 0.24 | - |
| 4 | Sabinene | 974 | 975 | 12.57 | 0.23 |
| 5 | β -Pinene | 981 | 981 | 1.21 | - |
| 6 | β -Myrcene | 990 | 991 | 2.04 | 45.34 |
| 7 | α -Phellandrene | 1005 | 1005 | 0.53 | - |
| 8 | 3-Carene | 1010 | 1011 | - | 0.30 |
| 9 | α -Terpinene | 1012 | 1016 | 2.16 | - |
| 10 | <i>p</i> -Cymene | 1024 | 1026 | 7.15 | - |
| 11 | Sylvestrene | 1029 | 1029 | 3.26 | - |
| 12 | β - <i>cis</i> -Ocimene | 1040 | 1040 | 13.55 | - |
| 13 | β - <i>trans</i> -Ocimene | 1048 | 1050 | 7.97 | 3.44 |
| 14 | γ -Terpinene | 1062 | 1062 | 10.56 | - |
| 15 | <i>trans</i> -Menth-2-en-1-ol | 1077 | 1083 | 0.24 | - |
| 16 | Terpinolene | 1086 | 1088 | 6.48 | - |
| 17 | Linalool | 1097 | 1098 | 0.45 | - |
| 18 | <i>p</i> -Mentha-1,3,8-triene | 1115 | 1118 | 0.11 | - |
| 19 | Cosmene | 1129 | 1130 | 0.05 | - |
| 20 | Allo-Ocimene | 1130 | 1131 | - | 10.90 |
| 21 | 3,4-dimethyl-2,4,6-octatriene | 1131 | 1132 | 2.51 | - |
| 22 | <i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol | 1146 | 1146 | 0.16 | - |
| 23 | endo-Borneol | 1177 | 1178 | 0.13 | - |
| 24 | Terpinen-4-ol | 1184 | 1184 | 2.56 | - |
| 25 | α -Terpineol | 1196 | 1197 | 0.43 | - |
| 26 | <i>trans</i> -Piperitol | 1212 | 1216 | 0.10 | - |
| 27 | Thymol methyl ether | 1225 | 1235 | 0.67 | - |
| 28 | Isothymol methyl ether | 1240 | 1244 | 9.00 | - |
| 29 | 1-Decanol | 1272 | 1276 | 0.10 | - |
| 30 | Bornyl acetate | 1284 | 1185 | 0.76 | - |
| 31 | <i>trans</i> -Pinocarvyl acetate | 1293 | 1297 | 0.05 | - |
| 32 | Carvacrol | 1299 | 1300 | 0.21 | - |
| 33 | Mesitaldehyde | 1335 | 1338 | - | 23.47 |
| 34 | δ -Elemene | 1330 | 1339 | 0.08 | 2.11 |
| 35 | α -Copaene | 1374 | 1377 | 0.11 | - |
| 36 | β -Bourbonene | 1383 | 1386 | 0.62 | - |
| 37 | β -Cubebene | 1385 | 1387 | 0.15 | - |
| 38 | Benzyl valerate | 1393 | 1396 | 1.87 | - |
| 39 | 1,4-Dimethoxy-2- <i>tert</i> -butylbenzene | 1408 | 1408 | 0.05 | - |
| 40 | Caryophyllene | 1417 | 1418 | 0.35 | 1.35 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|------|------|--------------|--------------|
| 41 | <i>β</i> -Copaene | 1427 | 1427 | 0.14 | - |
| 42 | Alloaromadendrene | 1442 | 1442 | 0.11 | 0.12 |
| 43 | <i>β</i> -Himachalene | 1474 | 1477 | 0.17 | - |
| 44 | Germacrene D | 1479 | 1480 | 1.83 | - |
| 45 | Elixene | 1492 | 1492 | 0.76 | - |
| 46 | <i>trans</i> -nerolidol | 1555 | 1558 | 0.16 | - |
| 47 | Spathulenol | 1573 | 1576 | 0.16 | - |
| 48 | Caryophyllene oxide | 1580 | 1583 | 0.12 | - |
| 49 | Isoaromadendrene oxide | 1581 | 1590 | 0.11 | - |
| 50 | <i>τ</i> -Muurolol | 1647 | 1650 | 0.48 | - |
| 51 | <i>β</i> -Eudesmol | 1651 | 1651 | 1.95 | - |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 67.51 | 67.53 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 14.76 | 23.47 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 4.32 | 6.04 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 2.98 | - |
| Other | | | | 9.17 | - |
| Total | | | | 98.74 | 97.62 |

^a Components listed in order of elution on an DB-5MS column; ^b Kovats indices on a DB-5MS apolar column; ^c Kovats indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A5. *Principali componenti (>3) dei taxa del genere Cachrys.*

| Taxa | Origin | p. | Compounds | MH | OM | SH | OS | O | Ref. |
|---------------------|--------|----|--|------|------|------|------|------|------------------------|
| <i>C. alpina</i> | Turkey | fr | α -humulene (33.1), <i>p</i> -cymene (9.3), α -phellandrene (9.1), germacrene D (8.2), α -pinene (6.3) | 34.2 | 1.6 | 55.9 | 6.0 | 0.3 | Başer et al. 2004 |
| | | | β -caryophyllene (25.6), caryophyllene oxide (9.4), α -pinene (8.8), α -humulene (5.6), germacrene D (5.2), bomyl acetate (4.7), caryophylladienol-II (3.6), myrcene (54.2), bicyclogermacrene (15.7), germacrene D (14.8), β -caryophyllene (4.9), β -phellandrene (3.8) | 16.7 | 7.5 | 44.8 | 10.1 | 1.5 | Başer et al. 2000 |
| <i>C. boissieri</i> | Turkey | ap | β -myrcene (45.3), 2,4,6-trimethylbenzaldehyde (23.5), <i>allo</i> -ocimene (10.9), α -pinene (7.3), γ -murolene (3.6), (<i>Z</i>)- β -ocimene (3.4) | 60.8 | - | 36.0 | - | 0.7 | Evergetis et al. 2015 |
| | | | (<i>Z</i>)- β -ocimene (44.2), δ -3-carene (8.7), γ -terpinene (6.0), terpinolene (5.2), α -pinene (3.7), sabinene (3.7), myrcene (3.0) | 67.6 | | 6.0 | | 23.9 | Maresca et al. 2023 |
| <i>C. cristata</i> | Crete | ap | (<i>Z</i>)- β -ocimene (30.5), <i>p</i> -cymene (10.7), δ -3-carene (8.8), α -pinene (7.2), γ -terpinene (6.9), terpinolene (6.7), β -caryophyllene (4.8), myrcene (3.8), sabinene (3.5), β -vetivone (3.2), <i>p</i> -tolualdehyde (39.6), (<i>Z</i>)- β -ocimene (15.2), α -phellandrene (11.7), (<i>E</i>)- β -ocimene (7.9), phytol (13.1), germacrene D (12.9), β -caryophyllene (9.7), β -bourbonene (8.5), caryophyllene oxide (7.3), germacrene D (4.15), 5,10(14)-trien-1 α -ol (5.6), α -cadinol (3.5), β -bisabolene (3.1), suberosin (19.7), germacrene D (12.3), germacrene B (10.0), octacosane (4.2), β -caryophyllene (4.1), α -cadinol (3.0), hexadecanoic acid (11.6), nonacosane (8.0), germacrene D (6.1), myristicin (4.4), α -pinene (3.4) | 80.7 | t | 14.1 | 4.4 | t | Koutsaviti et al. 2015 |
| | | | Greece | l | 82.2 | 1.0 | 11.7 | 4.9 | t |
| <i>C. cristata</i> | Greece | s | β -caryophyllene (4.8), myrcene (3.8), sabinene (3.5), β -vetivone (3.2), <i>p</i> -tolualdehyde (39.6), (<i>Z</i>)- β -ocimene (15.2), α -phellandrene (11.7), (<i>E</i>)- β -ocimene (7.9), phytol (13.1), germacrene D (12.9), β -caryophyllene (9.7), β -bourbonene (8.5), caryophyllene oxide (7.3), germacrene D (4.15), 5,10(14)-trien-1 α -ol (5.6), α -cadinol (3.5), β -bisabolene (3.1), suberosin (19.7), germacrene D (12.3), germacrene B (10.0), octacosane (4.2), β -caryophyllene (4.1), α -cadinol (3.0), hexadecanoic acid (11.6), nonacosane (8.0), germacrene D (6.1), myristicin (4.4), α -pinene (3.4) | 47.4 | 3.1 | 1.3 | 2.4 | 40.5 | Koutsaviti et al. 2015 |
| | | | Serbia | ap | 0 | 2.5 | 45.7 | 32.9 | 19.0 |
| <i>C. cristata</i> | Serbia | fr | 4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol (5.6), α -cadinol (3.5), β -bisabolene (3.1), suberosin (19.7), germacrene D (12.3), germacrene B (10.0), octacosane (4.2), β -caryophyllene (4.1), α -cadinol (3.0), hexadecanoic acid (11.6), nonacosane (8.0), germacrene D (6.1), myristicin (4.4), α -pinene (3.4) | 0 | 0.7 | 48.3 | 36.7 | 14.3 | Matejić et al. 2012 |
| | | | Turkey | fr | 13.7 | 1.1 | 23.1 | 14.6 | 39.1 |

| | | | | | | | | | |
|-----------------------|---------|----|---|-----------|----------|---------|---------|---------|-----------------------------|
| <i>C. libanotis</i> | Algeria | ap | germacrene-D (18.0), γ -terpinene (6.4), <i>p</i> -cymene (5.5), caryophyllene oxide (5.1), limonene (5.1), spathulenol (4.1), β -pinene (4.0), α -copaene (4.0), neophytadiene (3.8), myrvene (3.2), sabinene (3.1) β -caryophyllene (31.4) caryophyllene oxide (23.1), | 28.5 | 3.4 | 34.5 | 10.9 | 3.8 | Bouderdara et al. 2011 |
| | Turkey | ap | fenchyl alcohol (9.1), α -humulene (4.9), β -phellandrene (4.6), germacrene D (4.2), α -pinene (3.0), caryophyllenol-II (3.0) bornyl acetate (19.9), caryophyllene oxide (7.7), β -caryophyllene (6.3), <i>trans</i> -verbenol (5.5), pinocarvone (4.2), β -elemene (3.6), germacrene D (3.4) | 19.4 | 9.1 | 41.7 | 28.5 | - | Karakaya et al. 2019 |
| <i>C. microcarpos</i> | Turkey | ap | α -pinene (15.9), β -caryophyllene (15.7), β -phellandrene (7.8), germacrene-D (6.8), bornyl acetate (5.6), zingiberene (5.3), sabinene (4.8), β -sesquiphellandrene (4.1), α -humulene (3.2) β -caryophyllene (26.4), γ -muurolene (19.0%), linalool (6.1), camphene (4.3), zingiberene (4.1), β -bourbonene (3.9), thymol (3.6), geraniol (3.2), β -sesquiphellandrene (3.1) γ -muurolene (19.2%), β -caryophyllene (18.5), thymol (6.9), camphene (6.4), linalool (5.9), bornyl acetate (5.4), α -copaene (3.3), β -bourbonene (3.3), β -pinene (3.1) | 3.2 | 50.2 | 21.2 | 10.3 | - | Özer et al. 2007 |
| | Iran | ap | β -pinene (17.9), sabinene (17.8), myrcene (12), α -pinene (11.4), germacrene D (9.3), β -caryophyllene (4.0), 4-terpineol (3.8) γ -terpinene (17.5–27.2), <i>p</i> -cymene (21.0–24.0), myrcene (6.0–17.7), α -pinene (3.9–17.5), (<i>Z</i>)- β ocimene (6.2–12.9), <i>trans</i> -limonene oxide (0.4–9.7), sabinene (3.1–3.9), limonene (t–3.9), tricyclene (0.7–3.1) | 42.0 | 8.4 | 39.2 | 4.2 | 1.4 | Khalilzadeh et al. 2007 |
| | Iran | l | α -pinene (19.1–21.8), γ -terpinene (1.8–21.6), myrcene (15.0–18.8), | 14.1 | 19.0 | 64.9 | 0.8 | - | Sefidkon and Shaabani, 2003 |
| | Iran | fl | | 14.2 | 18.9 | 54.4 | 2.0 | - | Sefidkon and Shaabani, 2003 |
| <i>C. sicula</i> | Algeria | ap | | 74.8 | 6.4 | 15.9 | 1.5 | - | Tahar et al. 2022 |
| | Spain | fl | | 91.4-80.9 | 10.9-1.7 | 4.0-2.4 | 0.8-0.5 | 3.1-0.8 | Pala-Paul et al. 2002 |
| | Spain | fr | | 91.8-91.3 | 7.7-7.6 | 0.7-0.3 | - | 3.1-0.7 | Pala-Paul et al. 2002 |

| | | |
|--|--|--|
| | | (<i>E</i>)- β -ocimene (1.8–17.2), sabinene (4.0–13.1), <i>p</i> -cymene (7.3–7.5), (<i>Z</i>)- β ocimene (2.7– 7.0), α -thujene (5.9–6.7), terpinen-4-ol (0.6–5.6), <i>p</i> -mentha- 1,5-dien-8-ol (0.2–5.3) <i>p</i> -cymene (17.8–36.7), myrcene (6.1–18.8), sabinene (4.4–18.5), Spain s+l α -pinene (8.1–16.3), γ -terpinene 87.7 4.0- 3.1- 0.3- 5.3- Pala-Paul et 6.2–15.7), (<i>Z</i>)- β ocimene (3.8– 10.5) 2.7 0.4 0.1 0.7 al. 2002 |
| | | sabinene (10.3–21.3), γ -terpinene (18.0–19.6), myrcene (15.2–17.9), Spain um <i>p</i> -cymene (12.2–15.7), α -pinene 95.6- 3.8- 0.9- 1.1- Pala-Paul et (12.9–15.5), (<i>Z</i>)- β -ocimene (3.2– 94.5 2.5 05 - 0.6 al. 2002 8.6), α -thujene (3.7–4.7), limonene (2.5–3.4) |

MH = Monoterpene Hydrocarbons; **OM** = Oxygenated Monoterpenes; **SH** = Sesquiterpene Hydrocarbons; **OS** = Oxygenated Sesquiterpenes; **O** = others; p. = parts; ap = aerial parts; fl = flowers; fr = fruits; l = leaves; r = roots; s = stems; um = umbels.

Tabella A6. Composizioni oli essenziali *Crithmum maritimum* raccolti a Isola delle Femmine (S43), Croazia (S44), Montenegro (S45), e Israele (S46).

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | S43 ^d | S44 ^d | S45 ^d | S46 ^d |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | β -Thujene | 920 | 929 | 0.5 | 0.2 | 0.4 | 0.4 |
| 2 | α -Pinene | 931 | 936 | 3.6 | 4.9 | 0.5 | 15.3 |
| 3 | Camphene | 953 | 950 | tr | 0.10 | tr | 0.17 |
| 4 | β -Phellandrene | 971 | 977 | 4.1 | 8.0 | 28.3 | 0.6 |
| 5 | β -Myrcene | 981 | 986 | nd | nd | nd | 0.8 |
| 6 | β -Pinene | 982 | 996 | 0.9 | 0.9 | 1.8 | 0.8 |
| 7 | Octanal | 1005 | 1007 | nd | 0.2 | nd | 0.3 |
| 8 | α -Phellandrene | 1010 | 1011 | nd | nd | 0.3 | nd |
| 9 | α -Terpinene | 1017 | 1022 | 0.3 | 0.1 | 1.6 | 0.2 |
| 10 | <i>p</i> -Cymene | 1029 | 1037 | 13.6 | nd | nd | nd |
| 11 | Limonene | 1032 | 1049 | nd | 79.0 | 50.0 | 43.1 |
| 12 | <i>cis</i> - β -Ocimene | 1041 | 1056 | nd | tr | nd | 1.6 |
| 13 | γ -Terpinene | 1059 | 1064 | 49.0 | 1.4 | 4.0 | 27.0 |
| 14 | Terpinolene | 1089 | 1085 | tr | 0.2 | 0.9 | 0.2 |
| 15 | <i>cis</i> -Sabinene hydrate | 1101 | 1099 | tr | tr | 0.4 | nd |
| 16 | <i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol | 1122 | 1124 | tr | tr | 0.5 | nd |
| 17 | <i>trans</i> -allocimene | 1131 | 1131 | tr | 0.2 | nd | 0.2 |
| 18 | <i>cis</i> -Limonene oxide | 1134 | 1137 | nd | 0.2 | 0.1 | tr |
| 19 | <i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol | 1145 | 1143 | nd | tr | 0.2 | nd |
| 20 | Terpinen-4-ol | 1180 | 1180 | 0.6 | 1.2 | 5.7 | 0.1 |
| 21 | α -Terpineol | 1187 | 1193 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | tr |
| 22 | <i>cis</i> -Dihydrocarvone | 1195 | 1195 | nd | 0.1 | nd | nd |
| 23 | <i>cis</i> -Piperitol | 1211 | 1207 | nd | tr | 0.2 | nd |
| 24 | <i>trans</i> -Carveol | 1217 | 1219 | nd | 0.1 | tr | nd |
| 25 | Thymol methyl ether | 1235 | 1250 | 24.5 | nd | nd | 0.5 |
| 26 | Carvacrol | 1298 | 1294 | 0.1 | nd | nd | nd |
| 27 | β -Bourbenene | 1382 | 1373 | nd | nd | nd | 0.1 |
| 28 | Damascenone | 1384 | 1374 | nd | nd | 0.1 | nd |
| 29 | β -Elemene | 1392 | 1403 | nd | nd | nd | 0.1 |
| 30 | β -Caryophyllene | 1415 | 1431 | tr | tr | nd | 0.2 |
| 31 | γ -Elemene | 1425 | 1446 | tr | tr | nd | 0.7 |
| 32 | Germacrene D | 1480 | 1496 | tr | nd | nd | 1.3 |
| 33 | Cuparene | 1502 | 1498 | nd | tr | tr | 0.2 |
| 34 | β -Bisabolene | 1506 | 1502 | tr | 0.1 | 0.1 | nd |
| 35 | β -Sesquiphellandrene | 1519 | 1518 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | nd |
| 36 | β -Himachalene | 1527 | 1524 | nd | nd | tr | 0.3 |
| 37 | Spathulenol | 1574 | 1567 | tr | 0.2 | tr | tr |
| 38 | Dillapiole | 1622 | 1618 | tr | tr | 1.6 | tr |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 72.0 | 95.1 | 87.8 | 90.6 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 25.4 | 1.9 | 7.5 | 0.6 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 0.1 | 0.3 | 0.2 | 2.8 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | - | 0.2 | - | - |
| Other | | | | - | - | 1.8 | - |
| Total | | | | 97.6 | 97.3 | 97.2 | 94.0 |

^aComponents listed in order of elution on a DB-5MS apolar column; ^bKIs based on literature (<https://webbook.nist.gov/>), ^cExperimental KIs on a DB-5MS apolar column; ^dArea (%) values (tr < 0.01 %); nd: not detected.

Tabella A7. *Principali componenti oli essenziali Crithmum maritimum.*

| No | Origin | v.p. | Compounds | MH | OM | SH | OS | O |
|-----|------------------------------------|---------------|---|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| S1 | Algeria, Bejaia | July | γ -terpinene (50.5), thymol methyl ether (33.6), <i>p</i> -cymene (12.6) | 65.3 | 33.7 | - | - | - |
| S2 | Croatia, Dalmatia | June | limonene (58.4), sabinene (26.5), terpinen-4-ol (5.6), γ -terpinene (2.8) | 93.4 | 5.6 | - | - | - |
| S3 | France, Corsica, Mandriolu | | γ -terpinene (42.2), β -phellandrene (20.3), dillapiole (7.9), thymol methyl ether (7.3), <i>p</i> -cymene (6.4), sabinene (5.2), α -pinene (2.2) | 77.5 | 7.3 | - | - | 7.9 |
| S4 | France, Brittany, Finistere | Sept | dillapiole (55.7), γ -terpinene (14.0), thymol methyl ether (11.8), sabinene (4.7), myristicin (4.4), <i>p</i> -cymene (3.5), α -pinene (2.3) | 26.5 | 13.0 | - | - | 60.4 |
| S5 | France, Brittany, Finistere | Sept | γ -terpinene (33.0), thymol methyl ether (22.0), dillapiole (17.5), <i>p</i> -cymene (8.7), α -pinene (6.4), sabinene (6.0) | 57.3 | 23.7 | - | - | 18.1 |
| S6 | Greece, Chios | June- Aug | γ -terpinene (22.8), limonene (20.4), sabinene (15.1), β -phellandrene (8.6), <i>cis</i> - β -ocimene (8.1), carvacrol methyl ether (6.2), β -pinene (2.8), terpinen-4-ol (2.5) | 84.5 | 6.9 | 1.8 | 0.1 | - |
| S7 | Greece, Larissa | April- May | β -phellandrene (15.5-30.9), γ -terpinene (17.5-19.6), sabinene (15.8-17.6), <i>p</i> -cymene (16.7), thymol methyl ether (7.6-9.3), terpinen-4-ol (4.8), α -terpinene (3.9), α -phellandrene (2.6), myrcene (2.2-2.3) | 79.0 - 81.7 | 14.0 - 16.1 | 0.2- - 3.0 | 0.2- - 0.3 | 0.3- - 2.0 |
| S8 | Greece, Magnesia | | sabinene (49.4), γ -terpinene (31.4), α,β -pinene (9.6), limonene (2.7) | 95.8 | 1.5 | - | - | - |
| S9 | Greece, N. Euboea, Artemisio | Aug | limonene (43.5), sabinene (21.7), γ -terpinene (19.2), α -pinene (7.5), terpinen-4-ol (3.0) | 93.9 | 4.3 | 0.3 | - | - |
| S10 | Greece, Crete, Agia Marina | June- Aug | sabinene (38.0), limonene (12.8), β -phellandrene (18.5), γ -terpinene (17.1), terpinen-4-ol (3.9) | 93.5 | 6.3 | - | - | - |
| S11 | Greece, Crete | June- Aug | γ -terpinene (35.4), sabinene (21.8), thymol methyl ether (19.7), limonene (6.4) | 76.8 | 22.4 | - | - | - |
| S12 | Greece, Kos Island | | sabinene (35.6), β -phellandrene (22.5), γ -terpinene (18.7), thymol methyl ether (10.9), terpinen-4-ol (3.1) | 81.8 | 14.2 | 0.51 | - | - |
| S13 | Greece, Melos | June- Aug | γ -terpinene (33.3), limonene (28.5), thymol methyl ether (13.7), α -pinene (7.7), <i>cis</i> - β -ocimene (6.5), sabinene (3.3), bicyclogermacrene (2.8) | 80.8 | 14.0 | 3.1 | 0.2 | 0.2 |

| | | | | | | | | |
|-----|--|--------------|---|-------------------|--------------|-----|-----|--------------|
| S14 | Italy, Campania, Naples | June- Aug | γ -terpinene (39.4), carvacrol methyl ether (25.8), dillapiole (11.5), isoterpinolene (6.5), <i>p</i> -cymene (6.2) | 55.9 | 26.6 | - | - | 11.5 |
| S15 | Italy, Campania, Sorrento | Apr | γ -terpinene (36.6), thymol methyl ether (28.8), <i>p</i> -cymene (9.6), β -pinene (7.5), α -pinene (4.7), dillapiole (0.2) | 64.7 | 30.9 | 1.6 | - | 0.8 |
| S16 | Italy, Liguria | May | γ -terpinene (66.2), thymol methyl ether (13.5), α -pinene (7.4), <i>p</i> -cymene (5.2), 1,8-cineole (4.8), dillapiole (1.0) | 78.9 | 18.3 | - | - | 1.0 |
| S17 | Italy, Liguria | June | γ -terpinene (47.1), 1,8-cineole (15.6), thymol methyl ether (14.2), <i>p</i> -cymene (4.8), sabinene (4.4), dillapiole (1.1) | 59.2 | 29.8 | - | - | 1.1 |
| S18 | Italy, Liguria | July | γ -terpinene (68.0), thymol methyl ether (17.7), <i>p</i> -cymene (5.7), 1,8-cineole (2.4), dillapiole (0.5) | 77.6 | 20.1 | - | - | 0.5 |
| S19 | Italy, Liguria | Sept | γ -terpinene (41.1), sabinene (30.0), thymol methyl ether (12.0), <i>p</i> -cymene (5.7), dillapiole (1.6) | 79.8 | 12.9 | - | - | 1.6 |
| S20 | Italy, Liguria | Dec | γ -terpinene (48.8), thymol methyl ether (16.2), dillapiole (9.5), <i>p</i> -cymene (8.8), sabinene (5.1), α -pinene (4.0), 1,8-cineole (2.2) | 66.7 | 18.4 | - | - | 9.5 |
| S21 | Italy, Marche, Camerano | April | γ -terpinene (50.0), thymol methyl ether (18.2), <i>p</i> -cymene (8.9), limonene (8.9), sabinene (5.0), α -pinene (2.6), dillapiole (2.5) | 77.7 | 19.1 | - | - | 2.5 |
| S22 | Italy, Marche, Senigallia | Aug | limonene (38.4), γ -terpinene (19.9), sabinene (12.4), dillapiole (8.1), <i>cis</i> - β -ocimene (4.8), carvacrol methyl ether (4.2), terpinen-4-ol (3.1), <i>p</i> -cymene (2.6) | 83.3 | 7.9 | 0.2 | - | 8.3 |
| S23 | Italy, Sicily, Catania | May | thymol methyl ether (25.5), γ -terpinene (22.9), limonene (22.3), <i>p</i> -cymene (4.3), α -pinene (3.2) | 56.7 | 26.1 | 2.2 | - | 3.9 |
| S24 | Italy, Sicily, Palermo, Addaura | June | thymol acetate (14.4), β -myrcene (13.7), <i>p</i> -cymene (11.7), β -phellandrene (6.6), α -pinene (5.5), 2,3,4-trimethylacetophenone (5.3), camphene (5.2), terpinen-4-ol (3.5), 2-methyl-6-(2-propenyl)phenol (3.3), bornyl acetate (2.7), thymol (2.6) | 45.1 | 40.0 | 1.9 | 0.5 | 2.5 |
| S25 | Portugal, Viana do Castelo | May- Oct | dillapiole (14.5-46.6), γ -terpinene (16.8-32.9), sabinene (7.0-21.2), thymol methyl ether (10.1-14.4), <i>p</i> -cymene (3.4-7.7), α -pinene (2.2-5.9), <i>cis</i> - β -ocimene (2.4-3.1), terpinen-4-ol (2.0-2.9) | 36.0 - 64.9 | 13.- 20.9 | - | - | 14.- 45.4 |

| | | | | | | | | |
|-----|---|---------------|---|------|------|-----|------|---------|
| S26 | Portugal, S. Martinho do Porto | May- Oct | γ -terpinene (29.5-44.1), sabinene (17.4-31.5), thymol methyl ether (13.7-18.5), <i>p</i> -cymene (4.1-8.3), <i>cis</i> - β -ocimene (2.5-7.5), terpinen-4-ol (3.6-6.0), α -pinene (2.0-4.7), dillapiole (2.0-2.3), α -terpinene (2.0) | 70.4 | 18.7 | - | - | 0-2.3 |
| S27 | Portugal, Boca do Inferno | May- Oct | γ -terpinene (24.9-38.1), sabinene (22.8-34.4), thymol methyl ether (12.4-17.5), terpinen-4-ol (3.1-7.8), <i>p</i> -cymene (3.8-7.2), dillapiole (2.5-5.8), <i>cis</i> - β -ocimene (2.2-5.4), α -terpinene (2.0-2.5) | 67.8 | 19.2 | - | - | 1.7-5.8 |
| S28 | Portugal, Praia da Ilha do Pessegueiro | May- Oct | dillapiole (20.2-41.5), γ -terpinene (20.4-35.2), sabinene (8.6-22.0), thymol methyl ether (11.7-15.1), <i>p</i> -cymene (3.9-5.6), terpinen-4-ol (2.0-5.2), <i>cis</i> - β -ocimene (2.0-4.7), α -pinene (2.2-3.4) | 40.3 | 15.9 | - | - | 20.3 |
| S29 | Portugal, Almogrove | May- Oct | γ -terpinene (36.0-43.0), sabinene (18.5-25.7), thymol methyl ether (13.1-16.6), <i>p</i> -cymene (5.0-7.5), <i>cis</i> - β -ocimene (2.8-6.7), terpinen-4-ol (3.4-5.6), α -pinene (2.5-4.6), dillapiole (0.1-1.5) | 76.9 | 18.7 | - | - | 0.1-1.6 |
| S30 | Portugal, Setubal | | sabinene (35.3), γ -terpinene (29.9), thymol methyl ether (18.9), <i>p</i> -cymene (5.2), <i>cis</i> - β -ocimene (4.0) | 78.0 | 21.5 | - | - | 0.4 |
| S31 | Portugal, Nazaré | | γ -terpinene (33.6), sabinene (32.0), thymol methyl ether (15.7), <i>p</i> -cymene (3.9), terpinen-4-ol (3.4), <i>cis</i> - β -ocimene (2.7), dillapiole (0.1) | 78.0 | 20.1 | 0.1 | - | 0.1 |
| S32 | Spain, San Sebastian | June- Aug | dillapiole (35.1), thymol methyl ether (20.4), γ -terpinene (14.9), sabinene (8.1), <i>p</i> -cymene (2.2) | 28.1 | 23.5 | 0.2 | - | 36.3 |
| S33 | Tunisia, Kelibia | Aug | dillapiole (40.2), thymol methyl ether (20.6), γ -terpinene (19.3), β -phellandrene (6.6), <i>p</i> -cymene (5.7), terpinen-4-ol (2.3), thymol methyl ether (40.4), γ -terpinene (30.6), dillapiole (14.3), <i>p</i> -cymene (9.9), sabinene (2.2), | 33.7 | 22.9 | - | - | 40.2 |
| S34 | Tunisia, Monastir | Aug | sabinene (26.9), limonene (24.2), γ -terpinene (19.3), <i>p</i> -cymene (5.3), terpinen-4-ol (9.0), methyl chavicol (3.4), dillapiole (0.1) | 42.1 | 40.8 | 1.0 | - | 14.3 |
| S35 | Turkey, Bolu | Aug | thymol methyl ether (8.1-29.8), γ -terpinene (8.2-25.5), terpinen-4-ol (2.7-21.2), dillapiole (1.9-21.0), sabinene (13.0-20.5), β -phellandrene (6.3-12.8), α -terpineol (3.3), <i>p</i> -cymene (4.4-5.8), <i>cis</i> - β -ocimene (4.6-5.3), limonene (2.2-2.7) | 81.1 | 16.5 | - | 0.3 | 1.2 |
| S36 | Turkey, Silifke | June- July | | 40.4 | 12.4 | 0- | 0.1- | 1.9- |
| | | | | 68.3 | 54.3 | 1.3 | 1.8 | 21.1 |

| | | | | | | | | |
|-----|-----------------------|-------|--|------|------|------|------|------|
| S37 | Turkey, Bodrum | June- | γ -terpinene (8.8-35.2), thymol methyl ether | 22.5 | 10.9 | 0.9- | 0.1- | 0.1- |
| | | July | (7.7-17.2), limonene (15.4-15.9), <i>cis</i> - β -ocimene (2.2-12.7), spathulenol (0-8.4), <i>p</i> -cymene (4.5-7.2), β -phellandrene (4.9-6.4), phytol (0-6.0), nonacosane (0-5.4), dillapiole (0-0.7) | - | - | 4.1 | 13.8 | 14.9 |
| S38 | Turkey, Gazipasa | April | <i>p</i> -cymene (27.1), thymol methyl ether (9.2), γ -terpinene (8.3), cryptone (4.0), limonene (3.9) | 41.4 | 16.8 | 0.1 | - | 12.7 |
| S39 | Turkey, Sipahili | June | γ -terpinene (35.5), β -phellandrene (21.4), sabinene (12.6), thymol methyl ether (8.4) <i>p</i> -cymene (8.3), limonene (4.6), <i>cis</i> - β -ocimene (2.5) | 89.5 | 20.1 | 0.2 | - | - |
| S40 | Turkey, Yesilovack | June | γ -terpinene (32.4), β -phellandrene (22.3), dillapiole (9.7), sabinene (9.1), thymol methyl ether (8.6), <i>p</i> -cymene (7.6), <i>cis</i> - β -ocimene (3.2) | 79.7 | 9.3 | 0.3 | - | 9.7 |
| S41 | Turkey, Antalya | June | β -phellandrene (30.0), thymol methyl ether (24.6), <i>cis</i> - β -ocimene (14.3), <i>p</i> -cymene (12.8), estragole (3.1), fenchone (2.5), limonene (2.1) | 64.1 | 35.2 | 0.4 | - | - |
| S42 | Turkey, Mersin | June | γ -terpinene (24.3), dillapiole (20.6), β -phellandrene (13.7), sabinene (11.7), thymol methyl ether (8.7) <i>p</i> -cymene (7.0), α -terpineol (3.5), <i>cis</i> - β -ocimene (3.1) | 64.8 | 13.3 | - | - | 20.6 |

MH = Monoterpene Hydrocarbons; **OM** = Oxygenated Monoterpenes; **SH** = Sesquiterpene Hydrocarbons; **OS** = Oxygenated Sesquiterpenes; **O** = others; v.p.= vegetative period.

Tabella A8. *Composizione OE Geocaryum capillifolium (Gc).*

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Area (%) |
|---------------------------------|--|-----------------|-----------------|-------------|
| 1 | Heptanal | 897 | 877 | 0.5 |
| 2 | α -Pinene | 928 | 931 | 0.2 |
| 3 | Sabinene | 969 | 972 | 0.2 |
| 4 | β -Myrcene | 989 | 988 | 0.4 |
| 5 | Octanal | 1000 | 999 | 1.6 |
| 6 | <i>trans</i> - β -Ocimene | 1037 | 1035 | 0.5 |
| 7 | <i>cis</i> - β -Ocimene | 1048 | 1040 | 3.2 |
| 8 | γ -Terpinene | 1055 | 1058 | 0.1 |
| 9 | Linalool | 1097 | 1095 | 0.4 |
| 10 | Nonanal | 1101 | 1101 | 0.4 |
| 11 | <i>allo</i> -Ocimene | 1127 | 1132 | 0.3 |
| 12 | <i>trans</i> -2-Nonenal | 1155 | 1161 | 0.2 |
| 13 | α -Terpineol | 1185 | 1189 | 0.2 |
| 14 | Bornyl formate | 1221 | 1220 | 0.4 |
| 15 | <i>trans</i> -2-Decenal | 1258 | 1254 | 0.4 |
| 16 | α -Cubebene | 1346 | 1351 | 0.2 |
| 17 | α -Copaene | 1372 | 1371 | 0.2 |
| 18 | β -Elemene | 1392 | 1393 | 5.9 |
| 19 | (E)-β-Caryophyllene | 1426 | 1417 | 20.0 |
| 20 | Alloaromandrene | 1441 | 1450 | 0.4 |
| 21 | α -Caryophyllene | 1452 | 1452 | 4.2 |
| 22 | <i>cis</i>-β-Farnesene | 1473 | 1458 | 31.2 |
| 23 | Germacrene D | 1487 | 1477 | 8.5 |
| 24 | Eudesma-4(14),11-diene | 1489 | 1488 | 0.3 |
| 25 | α -Muurolene | 1493 | 1498 | 0.5 |
| 26 | α -Farnesene | 1510 | 1509 | 1.5 |
| 27 | δ -Cadinene | 1513 | 1523 | 0.8 |
| 28 | β -Sesquiphellandrene | 1526 | 1524 | 4.2 |
| 29 | Cadina-1,4-diene | 1531 | 1533 | 0.3 |
| 30 | α -Cadinene | 1536 | 1534 | 0.4 |
| 31 | Spathulenol | 1567 | 1561 | 0.3 |
| 32 | Caryophyllene oxide | 1579 | 1576 | 2.2 |
| 33 | Ethyl crysanthemate | 1588 | - | 0.5 |
| 34 | <i>trans</i> -Longipinocarveol | 1631 | 1634 | 1.0 |
| 35 | δ -Cadinol | 1637 | 1633 | 0.5 |
| 36 | τ -Muurool | 1650 | 1655 | 0.8 |
| 37 | <i>cis</i> - α -Santalol | 1711 | 1688 | 0.5 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 4.9 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 1.0 |

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Sesquiterpene Hydrocarbons | 78.5 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | 5.3 |
| Other | 3.6 |
| <hr/> | |
| Total | 93.0 |

^aComponents listed in order of elution on a DB-5MS apolar column; ^bExperimental on a DB-5MS apolar column. ^cLRI based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A9. *Composizione OE Magydaris pastinacea (Mp).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | Area (%) |
|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|--------------|
| 1 | α -Pinene | 997 | 1017 | 2.00 |
| 2 | 3-Thujene | 1022 | 1035 | 4.26 |
| 3 | Camphene | 1049 | 1053 | 0.31 |
| 4 | β -Pinene | 1082 | 1099 | 0.55 |
| 5 | Sabinene | 1097 | 1115 | 3.10 |
| 6 | 3-Carene | 1128 | 1143 | 8.76 |
| 7 | β -Myrcene | 1152 | 1163 | 15.97 |
| 8 | Limonene | 1185 | 1194 | 4.41 |
| 9 | Sylvestrene | 1200 | 1205 | 5.35 |
| 10 | γ -Terpinene | 1235 | 1248 | 16.96 |
| 11 | β -Cymene | 1257 | 1261 | 12.42 |
| 12 | 3-Hexen-1-ol acetate | 1321 | 1337 | 0.40 |
| 13 | Allo-Ocimene | 1370 | 1382 | 1.66 |
| 14 | Tetradecane | 1400 | - | 0.33 |
| 15 | 1-Terpinen-4-ol | 1592 | 1595 | 1.37 |
| 16 | Caryophyllene | 1600 | 1608 | 1.72 |
| 17 | Germacrene D | 1724 | 1726 | 1.73 |
| 18 | α -Bisabolene | 1754 | 1759 | 0.97 |
| 19 | β -Phenylethyl butyrate | 1920 | 1930 | 0.23 |
| 20 | Phenethyl isovalerate | 1946 | 1955 | 0.78 |
| 21 | Eugenyl methyl ether | 2015 | 2030 | 0.19 |
| 22 | β -Bisabolol | 2124 | 2134 | 0.28 |
| 23 | Phenylethyl caproate | 2130 | 2134 | 0.26 |
| 24 | α -Bisabolol | 2221 | 2232 | 0.89 |
| 25 | α -Cadinol | 2236 | 2255 | 0.86 |
| 26 | α -Springene | 2243 | - | 0.73 |
| 27 | Nerolidyl acetate | 2269 | 2271 | 0.52 |
| 28 | 1-Hexadecanol | 2365 | 2384 | 0.33 |
| 29 | 1-Nonadecanol | 2370 | - | 0.48 |
| 30 | Cinnamyl n-Hexanoate | 2443 | 2445 | 1.61 |
| 31 | Kaur-16-n-18-yl acetate | 2509 | - | 1.45 |
| 32 | Geranyllinalol | 2542 | 2551 | 0.18 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 75.75 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 1.37 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 4.42 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 4.16 |
| Diterpene Hydrocarbons | | | | 0.73 |
| Oxygenated Diterpenes | | | | 1.63 |
| Other | | | | 3.00 |

Total**91.06**

^aComponents listed in order of elution on an DB-Wax column; ^bLinear retention index on a DB-Wax polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>);

Tabella A10. *Composizione OE Oenanthe fistulosa (Of).*

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Area (%) |
|-----------------------------------|--|-----------------|-----------------|-------------|
| 1 | 2-Thujene | 926 | 931 | 0.1 |
| 2 | α -Pinene | 932 | 935 | 0.1 |
| 3 | Sabinene | 974 | 976 | 9.3 |
| 4 | β -Pinene | 980 | 980 | 4.6 |
| 5 | Octanal | 1001 | 1006 | 0.1 |
| 6 | α -Terpinene | 1011 | 1021 | 0.3 |
| 7 | Sylvestrene | 1028 | 1028 | 8.2 |
| 8 | β -cis-Ocimene | 1040 | 1040 | 21.6 |
| 9 | β -trans-Ocimene | 1050 | 1050 | 8.4 |
| 10 | γ -Terpinene | 1059 | 1062 | 5.3 |
| 11 | Terpinolene | 1079 | 1087 | 0.1 |
| 12 | Allo-Ocimene | 1120 | 1120 | 1.8 |
| 13 | Terpinen-4-ol | 1169 | 1176 | 0.5 |
| 14 | β -Elemene | 1380 | 1389 | 7.9 |
| 15 | β -Caryophyllene | 1416 | 1420 | 2.9 |
| 16 | α -Bergamotene | 1425 | 1426 | 1.2 |
| 17 | α -Humulene | 1428 | 1428 | 0.3 |
| 18 | β -cis-Farnesene | 1436 | 1443 | 1.6 |
| 19 | β -Copaene | 1457 | 1460 | 3.9 |
| 20 | β -Selinene | 1469 | 1478 | 0.7 |
| 21 | <i>cis,trans</i> - α -Farnesene | 1476 | 1478 | 1.2 |
| 22 | δ -Guaiene | 1485 | 1490 | 5.7 |
| 23 | β -Bisabolene | 1487 | 1497 | 0.6 |
| 24 | δ -Cadinene | 1494 | 1509 | 0.3 |
| 25 | Myristicin | 1504 | 1520 | 6.1 |
| 26 | Caryophyllene oxide | 1547 | 1567 | 0.3 |
| 27 | α -Acorenol | 1633 | 1633 | 1.3 |
| 28 | Apiol | 1656 | 1674 | 3.9 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 59.8 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 0.5 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 26.3 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 1.6 |
| Other | | | | 10.1 |
| Total | | | | 98.3 |

^aComponents listed in order of elution on an DB-5MS column; ^bKovats indices on a DB-5MS apolar column; ^cKovats indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A11. *Composizione oli essenziali Pimpinella Peregrina (Pp): fiori (Ppf) e fusti (Pps).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | Ppf (%) | Pps (%) |
|-----|--|------------------|------------------|---------|---------|
| 1 | Isobutyl isobutyrate | 913 | 916 | 0.12 | - |
| 2 | Sabinene | 968 | 970 | 0.34 | - |
| 3 | β -Myrcene | 989 | 991 | 0.06 | - |
| 4 | Eucalyptol | 1024 | 1030 | 0.17 | - |
| 5 | Phenylethanal | 1034 | 1038 | 0.04 | - |
| 6 | β - <i>trans</i> -Ocimene | 1044 | 1046 | 0.07 | - |
| 7 | γ -Terpinene | 1054 | 1058 | 0.03 | - |
| 8 | α -Cyclocitral | 1094 | 1095 | 0.03 | - |
| 9 | Linalool | 1097 | 1098 | 0.02 | - |
| 10 | Nonanal | 1101 | 1102 | 0.07 | 0.29 |
| 11 | 1,3,4-trimethyl-3-cyclohexene-1-carbaldehyde | 1136 | 1136 | 0.75 | - |
| 12 | <i>trans</i> -3-Hexenyl butyrate | 1143 | 1145 | 0.05 | - |
| 13 | β -Cyclocitral | 1188 | 1193 | 0.28 | - |
| 14 | Decanal | 1202 | 1205 | - | 0.18 |
| 15 | Grandlure IV | 1227 | - | 10.03 | - |
| 16 | 5-Methoxysalicylaldehyde | 1315 | 1318 | 0.21 | 0.11 |
| 17 | δ -Elemene | 1334 | 1338 | 0.06 | 0.06 |
| 18 | 6-Methoxy-3-methylbenzofuran | 1359 | - | 3.52 | 0.16 |
| 19 | α -Copaene | 1372 | 1375 | - | 0.46 |
| 20 | Isoledene | 1377 | 1377 | - | 0.12 |
| 21 | β -Damascenone | 1379 | 1380 | - | 0.09 |
| 22 | β -Elemene | 1388 | 1391 | - | 0.15 |
| 23 | Aristolene | 1416 | 1420 | 1.20 | 2.40 |
| 24 | <i>trans</i> - α -Bergamotene | 1437 | 1439 | 67.85 | 41.90 |
| 25 | β - <i>cis</i> -Farnesene | 1454 | 1454 | 0.31 | - |
| 26 | β -Himachalene | 1477 | 1478 | 0.39 | 0.83 |
| 27 | β -Cadinene | 1480 | 1481 | 0.25 | 0.80 |
| 28 | α -Curcumene | 1482 | 1487 | - | 1.19 |
| 29 | α - <i>cis</i> -Bisabolene | 1502 | 1504 | - | 0.59 |
| 30 | β -Bisabolene | 1507 | 1508 | 3.78 | 3.24 |
| 31 | β -Sesquiphellandrene | 1521 | 1522 | 1.22 | 1.21 |
| 32 | γ -Bisabolene | 1532 | 1534 | - | 2.42 |
| 33 | <i>trans</i> -Farnesene epoxide | 1574 | - | - | 0.71 |
| 34 | Caryophyllene oxide | 1577 | 1580 | - | 1.18 |
| 35 | Spathulenol | 1612 | 1619 | - | 3.45 |
| 36 | δ -Cadinol | 1637 | 1640 | - | 1.29 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------|------|--------------|--------------|
| 37 | <i>τ</i> -Cadinol | 1651 | 1654 | - | 2.10 |
| 38 | <i>α</i> -Cadinol | 1652 | 1654 | - | 1.17 |
| 39 | <i>α</i> -Bisabolol | 1685 | 1685 | - | 15.08 |
| 40 | <i>α</i> - <i>cis</i> -Bergamotol | 1693 | 1694 | - | 2.69 |
| 41 | Hexadecanoic acid | 1975 | 1977 | - | 7.36 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 0.50 | - |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 11.28 | - |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 75.06 | 55.37 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | - | 27.76 |
| Other | | | | 4.01 | 8.10 |
| Total | | | | 90.85 | 91.23 |

^aComponents listed in order of elution on an DB-5MS non-polar column; ^bLinear retention index on a DB-5MS non-polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A12. *Composizione OE Prangos Trifida (Pt).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | Area (%) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|--------------|
| 1 | 2-Thujene | 903 | 920 | 0.44 |
| 2 | α -Pinene ^d | 921 | 935 | 8.85 |
| 3 | Camphene | 947 | 951 | 0.24 |
| 4 | Sabinene | 973 | 974 | 0.67 |
| 5 | β -Pinene | 974 | 976 | 1.84 |
| 6 | β -Myrcene | 985 | 990 | 2.72 |
| 7 | α -Phellandrene ^d | 992 | 1005 | 12.14 |
| 8 | α -Terpinene | 999 | 1015 | 0.26 |
| 9 | <i>p</i> -Mentha-1,3,8-triene | 1013 | - | 9.56 |
| 10 | Sylvestrene ^d | 1028 | 1032 | 11.32 |
| 11 | trans- β -Ocimene | 1041 | 1047 | 3.29 |
| 12 | β -Ocimene ^d | 1046 | 1048 | 18.12 |
| 13 | allo-Ocimene | 1124 | 1130 | 1.81 |
| 14 | cis-Verbenol | 1130 | 1135 | 0.27 |
| 15 | cis-Sabinol | 1145 | 1147 | 0.68 |
| 16 | 2,6-Dimethyl-3,5,7-octatrien-2-ol | 1183 | 1187 | 0.73 |
| 17 | α -Copaene | 1371 | 1379 | 0.38 |
| 18 | Caryophyllene | 1412 | 1414 | 2.74 |
| 19 | α -Bergamotene | 1420 | 1431 | 0.76 |
| 20 | Germacrene D | 1467 | 1474 | 5.53 |
| 21 | Zingiberene | 1501 | 1507 | 5.32 |
| 22 | β -Sesquiphellandrene | 1522 | 1534 | 2.01 |
| 23 | Spathulenol | 1573 | 1576 | 0.78 |
| 24 | Caryophyllene oxide | 1579 | 1583 | 0.53 |
| 25 | Phytol | 2102 | 2111 | 0.31 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 71.26 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 1.68 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 16.74 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 1.31 |
| Oxygenated Diterpenes | | | | 0.31 |
| Total | | | | 91.30 |

^aComponents listed in order of elution on a DB-5MS apolar column; ^bLinear retention index on a DB-5MS apolar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>); ^dCo-injection with authentic standards.

Tabella A13. Composizione oli essenziali *Seseli tortuosum* subsp. *tortuosum* (*Stt*), *S. tortuosum* subsp. *maritimum* (*Stm*), e *Seseli bocconeii* (*Sb*).

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | LRI ^d | Stt ^e | Stm ^e | Sb ^e |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | | 87.12 | 83.24 | 55.98 |
| 1 | α -Pinene ^f | 1004 | 1017 | 936 | 14.63 | 18.52 | - |
| 2 | 3-Thujene | 1015 | 1030 | 940 | - | - | 5.12 |
| 3 | Camphene | 1023 | 1037 | 951 | 3.27 | 4.60 | - |
| 4 | β -Pinene ^f | 1078 | 1091 | 978 | 15.81 | 19.84 | 1.64 |
| 5 | Sabinene | 1101 | 1115 | 972 | 7.42 | 1.01 | 17.46 |
| 6 | 3-Carene | 1154 | 1158 | 1009 | 14.58 | - | - |
| 7 | α -Phellandrene | 1165 | 1174 | 1005 | - | 2.20 | 0.16 |
| 8 | β -Myrcene | 1173 | 1176 | 988 | 4.32 | 1.04 | 2.04 |
| 9 | α -Terpinene ^f | 1187 | 1190 | 1015 | 3.23 | 4.39 | 1.49 |
| 10 | Limonene | 1189 | 1193 | 1024 | 1.31 | 1.59 | 16.38 |
| 11 | Sylvestrene ^e | 1191 | 1205 | 1027 | 11.18 | 17.45 | 11.69 |
| 12 | β -Cymene ^e | 1240 | 1248 | 1025 | 11.14 | 12.60 | - |
| 13 | Ocimene | 1377 | 1382 | 1042 | 0.23 | - | - |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | | 4.71 | 4.25 | 1.98 |
| 14 | Pinocarvone | 1567 | 1575 | 1156 | 0.22 | - | - |
| 15 | Isobornyl acetate | 1573 | 1584 | 1285 | - | 0.12 | - |
| 16 | Isothymol methyl ether | 1590 | 1595 | 1215 | 1.76 | 2.52 | - |
| 17 | 4-Terpineol | 1581 | 1593 | 1185 | 0.52 | - | 1.98 |
| 18 | Thymol methyl ether | 1601 | 1607 | 1228 | 2.21 | 1.61 | - |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | | 2.19 | 4.24 | 33.74 |
| | α -Cubebene | 1451 | 1461 | 1345 | - | - | 0.50 |
| 19 | δ -Elemene | 1467 | 1479 | 1351 | - | - | 1.69 |
| 20 | α -Copaene | 1484 | 1500 | 1377 | - | - | 0.67 |
| 21 | α -Bourbonene | 1521 | 1528 | 1400 | - | - | 0.16 |
| 22 | β -Cubebene | 1535 | 1545 | 1380 | - | - | 0.60 |
| 23 | β -Guurjunene | 1587 | 1600 | 1432 | - | - | 3.32 |
| 24 | γ -Elemene | 1640 | 1650 | 1444 | 1.73 | 3.18 | - |
| 25 | β -Farnesene | 1655 | 1674 | 1480 | - | 0.11 | - |
| 26 | γ -Muurolene | 1673 | 1684 | 1460 | - | - | 2.31 |
| 27 | Humulene | 1677 | 1687 | 1467 | - | - | 0.14 |
| 28 | Germacrene D | 1692 | 1700 | 1488 | 0.46 | 0.24 | 18.48 |
| 29 | α -Himachalene | 1695 | 1704 | 1510 | - | 0.22 | - |
| 30 | α -Muurolene | 1727 | 1740 | 1500 | - | - | 1.13 |
| 31 | Valencene | 1747 | 1751 | 1513 | - | 0.27 | - |

| | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|------|------|------|--------------|--------------|--------------|
| 32 | γ -Cadinene | 1769 | 1780 | 1513 | - | - | 4.74 |
| 33 | α -Bisabolene | 1771 | 1784 | 1532 | - | 0.22 | - |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | | 2.32 | 3.48 | 0.26 |
| 34 | τ -Cadinol | 2143 | 2155 | 1616 | - | - | 0.11 |
| 35 | α -Cadinol | 2201 | 2212 | 1654 | - | - | 0.10 |
| 36 | δ -Cadinol | 2209 | 2219 | 1647 | - | - | 0.05 |
| 37 | Farnesyl acetate | 2217 | 2222 | 1834 | 0.22 | 2.15 | - |
| 38 | Farnesol | 2313 | 2318 | 2345 | 2.10 | 1.33 | - |
| Other | | | | | - | 0.09 | - |
| 39 | Benzyl valerate | 1915 | 1920 | 1421 | - | 0.09 | - |
| Total | | | | | 96.34 | 95.30 | 91.96 |

^aComponents listed in order of elution on a DB-Wax column; ^bLinear retention indices on a DB-Wax polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>); ^dLinear retention index on a DB-5MS apolar column; ^ePercentage amounts of the separated compounds calculated from integration of the peaks; ^fCo-injection with authentic standards.

Tabella A14. *Composizione oli essenziali diverse parti vegetative Seseli bocconei (Sb): fiori (FSb), foglie (LSb) e fusti (SSb).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | FSb ^d | LSb ^d | SSb ^d |
|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | α -Pinene | 1002 | 1017 | 0.89 | 0.88 | 4.41 |
| 2 | 3-Thujene | 1014 | 1030 | 5.13 | - | - |
| 3 | β -Pinene ^e | 1079 | 1099 | 1.71 | 0.72 | 1.48 |
| 4 | Sabinene ^e | 1095 | 1115 | 19.22 | 1.34 | 15.26 |
| 5 | α -Phellandrene | 1156 | 1174 | 0.76 | - | - |
| 6 | β -Myrcene ^e | 1159 | 1176 | 1.45 | - | - |
| 7 | α -Terpinene | 1163 | 1179 | 3.69 | - | - |
| 8 | Limonene ^e | 1177 | 1193 | 25.16 | 3.03 | 16.80 |
| 9 | Sylvestrene | 1194 | 1205 | 33.62 | - | - |
| 10 | α -Cubebene | 1442 | 1461 | - | 0.84 | 0.23 |
| 11 | δ -Elemene | 1469 | 1479 | 0.13 | - | 1.76 |
| 12 | α -Copaene | 1495 | 1500 | - | 2.07 | 1.78 |
| 13 | elixene | 1497 | 1514 | - | 1.56 | - |
| 14 | Isodene | 1499 | - | - | 1.50 | 3.09 |
| 15 | epi-bicyclosquiphellandrene | 1617 | 1633 | - | 3.64 | - |
| 16 | α -Amorphene | 1659 | 1679 | - | 7.30 | 3.21 |
| 17 | γ -Muurolene | 1666 | 1684 | - | 7.83 | 9.08 |
| 18 | Germacrene D ^e | 1698 | 1706 | 3.27 | 36.49 | 24.53 |
| 19 | α -Muurolene | 1731 | 1740 | - | 7.09 | - |
| 20 | δ -Cadinene | 1738 | 1744 | - | 16.78 | 9.59 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 91.63 | 5.97 | 37.95 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 3.40 | 85.10 | 53.27 |
| Total | | | | 95.03 | 91.07 | 91.22 |

^aComponents listed in order of elution on an DB-Wax column; ^bLinear retention indices on a DB-Wax polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>); ^dPercentage amounts of the separated compounds calculated from integration of the peaks; ^eCo-injection with authentic standards.

Tabella A15. *Composizione oli essenziali diverse parti Seseli tortuosum subsp. maritimum (Stm): fiori (FStm), fusti (SStm) e radici (RStm).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | FStm ^d | SStm ^d | RStm ^d |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | α -Pinene ^e | 1004 | 1017 | 13.67 | 23.75 | 32.75 |
| 2 | Camphene | 1023 | 1037 | - | 9.57 | - |
| 3 | β -Pinene ^e | 1078 | 1091 | 7.19 | 32.69 | - |
| 4 | Undecane | 1094 | 1100 | - | - | 2.50 |
| 5 | Sabinene | 1101 | 1115 | 1.95 | - | - |
| 6 | 3-Carene | 1154 | 1158 | 0.04 | - | - |
| 7 | α -Phellandrene | 1165 | 1174 | 4.13 | 0.12 | - |
| 8 | β -Myrcene | 1173 | 1176 | - | 2.16 | 0.94 |
| 9 | α -Terpinene | 1187 | 1190 | 8.48 | - | - |
| 10 | Limonene | 1189 | 1193 | 3.07 | - | - |
| 11 | Sylvestrene ^e | 1191 | 1205 | 13.38 | 21.84 | - |
| 12 | β -Cymene | 1240 | 1248 | 24.32 | - | - |
| 13 | β -Ocimene | 1241 | 1250 | - | - | 22.93 |
| 14 | Allo-Ocimene | 1375 | 1382 | - | - | 14.36 |
| 15 | Isobornyl acetate | 1573 | 1584 | - | 0.26 | - |
| 16 | 2-Isopropyl-1-methoxy-4-methylbenzene | 1590 | 1595 | 4.88 | - | - |
| 17 | Thymol methyl ether | 1601 | 1607 | - | 3.35 | 4.93 |
| 18 | γ -Elemene | 1640 | 1650 | 6.15 | - | - |
| 19 | β -Farnesene | 1655 | 1674 | 0.21 | - | 3.03 |
| 20 | Germacrene D | 1692 | 1700 | 0.47 | - | - |
| 21 | α -Himachalene | 1695 | 1704 | 0.42 | - | - |
| 22 | Valencene | 1747 | 1751 | - | 0.56 | - |
| 23 | α -Bisabolene | 1771 | 1784 | 0.42 | - | - |
| 24 | Curcumene | 1783 | 1786 | - | - | 0.79 |
| 25 | 1,4-Dimethoxy-2-tert-butylbenzene | 1861 | 1870 | - | - | 3.52 |
| 26 | Dodecyl acetate | 1890 | 1893 | - | - | 0.39 |
| 27 | Benzyl valerate | 1915 | 1920 | 0.18 | - | - |
| 28 | Octanoic acid | 2074 | 2083 | - | - | 4.25 |
| 29 | Farnesyl acetate | 2217 | 2222 | 4.16 | - | - |
| 30 | α -Bisabolol | 2228 | 2232 | - | - | 0.93 |
| 31 | Farnesol | 2313 | 2318 | 2.57 | - | - |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 51.91 | 89.95 | 73.48 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | - | 0.26 | - |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 7.67 | 0.56 | 3.82 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 6.73 | - | 0.93 |
| Other | | | | 29.38 | 3.35 | 13.09 |

| | | | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Total | 95.69 | 94.12 | 91.32 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|

^aComponents listed in order of elution on an DB-Wax column; ^bLinear retention indices on a DB-Wax polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>); ^dPercentage amounts of the separated compounds calculated from integration of the peaks; ^eCo-injection with authentic standards.

Tabella A16. *Composizione oli essenziali diverse parti Seseli tortuosum subsp. tortuosum (Stt): fiori (FStt), fusti (SStt) e radici (RStt).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | FStt ^d | SStt ^d | RStt ^d |
|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | α -Pinene ^e | 1005 | 1007 | 11.43 | 16.36 | 32.98 |
| 2 | Camphene | 1026 | 1037 | - | 5.04 | - |
| 3 | β -Pinene ^e | 1079 | 1091 | 9.29 | 19.32 | 13.65 |
| 4 | Sabinene | 1105 | 1109 | 6.92 | 7.69 | - |
| 5 | 3-Carene | 1157 | 1158 | 5.05 | 19.71 | 11.57 |
| 6 | β -Myrcene ^e | 1174 | 1176 | 2.44 | 5.53 | 2.82 |
| 7 | α -Terpinene | 1183 | 1190 | 9.25 | - | - |
| 8 | Limonene ^e | 1185 | 1191 | 3.77 | - | - |
| 9 | Sylvestrene | 1192 | 1202 | - | 17.20 | 4.05 |
| 10 | <i>p</i> -Cymene | 1245 | 1248 | 31.83 | - | - |
| 11 | β -Ocimene | 1241 | 1246 | - | - | 16.29 |
| 12 | Allo-Ocimene | 1377 | 1382 | - | 0.36 | 6.58 |
| 13 | Fenchyl acetate | 1478 | 1481 | - | - | 0.66 |
| 14 | Pinocarvone | 1567 | 1575 | - | 0.34 | - |
| 15 | Isobornyl acetate | 1570 | 1574 | - | - | - |
| 16 | 4-Terpineol | 1581 | 1585 | - | 0.81 | - |
| 17 | Anisole | 1592 | 1595 | 5.05 | - | - |
| 18 | Thymol methyl ether | 1601 | 1607 | - | 3.41 | - |
| 19 | γ -Elemene | 1645 | 1650 | 4.94 | - | 0.79 |
| 20 | Germacrene D | 1696 | 1703 | - | 0.71 | 2.10 |
| 21 | Octanoic acid | 2073 | 2073 | - | - | 0.58 |
| 22 | Farnesyl acetate | 2213 | 2220 | 0.63 | - | - |
| 23 | Farnesol | 2316 | 2318 | 6.01 | - | - |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 79.98 | 91.21 | 87.94 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 5.05 | 4.56 | 0.66 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 4.94 | 0.71 | 2.89 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 6.64 | - | - |
| Other Compounds | | | | - | - | 0.58 |
| Total | | | | 96.61 | 96.48 | 92.07 |

^aComponents listed in order of elution on an DB-Wax column; ^bLinear retention indices on a DB-Wax polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>); ^dPercentage amounts of the separated compounds calculated from integration of the peaks; ^eCo-injection with authentic standards.

Tabella A17. *Composizione OE Thapsia garganica L. subsp. messanensis (Tgm).*

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Area (%) |
|-----|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| 1 | Octane | 806 | 800 | 1.2 |
| 2 | 1.6-Dimethylhepta-1.3.5-triene | 859 | 837 | 1.3 |
| 3 | 2-Hexenal | 867 | 854 | 1.6 |
| 4 | Nonane | 897 | 900 | 1.8 |
| 5 | β -Thujene | 923 | 929 | 0.8 |
| 6 | α -Pinene | 931 | 938 | 3.0 |
| 7 | 3-Methyl nonane | 973 | 962 | 7.0 |
| 8 | β -Pinene | 976 | 980 | 1.7 |
| 9 | β -Myrcene | 988 | 988 | 0.9 |
| 10 | Decane | 998 | 1000 | 0.6 |
| 11 | <i>p</i> -Cymene | 1024 | 1023 | 0.6 |
| 12 | Limonene | 1029 | 1031 | 1.9 |
| 13 | <i>cis</i> - β -Ocimene | 1038 | 1040 | 0.5 |
| 14 | <i>trans</i> - β -Ocimene | 1048 | 1052 | 0.3 |
| 15 | γ -Terpinene | 1060 | 1062 | 0.5 |
| 16 | 2-Methyl decane | 1066 | 1072 | 0.9 |
| 17 | Terpinolene | 1086 | 1088 | 0.3 |
| 18 | Undecane | 1102 | 1100 | 4.6 |
| 19 | Nonanal | 1109 | 1104 | 3.7 |
| 20 | 3-Methyl undecane | 1172 | 1171 | 1.0 |
| 21 | Butyl hexanoate | 1192 | 1187 | 0.4 |
| 22 | Dodecane | 1199 | 1200 | 0.6 |
| 23 | Methyl citronellate | 1259 | 1261 | 3.3 |
| 24 | Butyl heptanoate | 1263 | 1271 | 4.9 |
| 25 | 2-Undecanone | 1291 | 1291 | 0.3 |
| 26 | Methyl geraniate | 1319 | 1323 | 2.0 |
| 27 | α -Cubebene | 1343 | 1339 | 0.2 |
| 28 | α -Longipinene | 1346 | 1330 | 0.4 |
| 29 | Cyclosativene | 1365 | 1357 | 0.2 |
| 30 | α -Copaene | 1372 | 1372 | 2.3 |
| 31 | β -Bourbonene | 1379 | 1375 | 1.1 |
| 32 | β -Cubebene | 1383 | 1396 | 0.7 |
| 33 | β -Caryophyllene | 1413 | 1417 | 1.2 |
| 34 | β -Elemene | 1424 | 1434 | 0.5 |
| 35 | Humulene | 1450 | 1454 | 0.6 |
| 36 | Germacrene D | 1475 | 1472 | 2.8 |
| 37 | β -Selinene | 1482 | 1484 | 0.8 |
| 38 | γ -Elemene | 1490 | 1486 | 4.3 |

| | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 39 | α -Bulnesene | 1506 | 1509 | 1.2 |
| 40 | δ -Cadinene | 1512 | 1515 | 3.4 |
| 41 | 1.4-Dimethyl azulene | 1551 | 1555 | 17.0 |
| 42 | Benzyl heptanoate | 1611 | 1620 | 0.9 |
| 43 | τ -Cadinol | 1636 | 1639 | 2.2 |
| 44 | <i>cis</i> - α -Santalol | 1648 | 1658 | 3.5 |
| 45 | Chamazulene | 1723 | 1722 | 10.1 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 10.5 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 46.7 |
| Oxygenated sesquiterpenes | | | | 5.7 |
| Carbonylic compounds | | | | 17.1 |
| Hydrocarbons | | | | 17.7 |
| Other | | | | 1.3 |
| Total | | | | 99.0 |

^aComponents listed in order of elution on an DB-5MS column; ^bKovats indices on a DB-5MS apolar column; ^cKovats indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A18. *Composizione oli essenziali Thapsia garganica.*

| Parts | Origin | Compounds | Ref. |
|------------------------------|----------------------|--|----------------------------------|
| roots ^a | France | δ -cadinene (16.7%), β -myrcene (2.9%), δ -guaiene (2.3%), 2-nonenal (2.2%), β -citral (2.2%), β -elemene (2.1%) | Drew et al. 2012 |
| roots ^b | France | δ -cadinene (34.8%), elemol (25.2%), 2-ethylhexanol (4.9%), heptanal (4.1%), δ -guaiene (3.1%), β -myrcene (2.8%) | |
| fruits ^b | France | acetophenone (22.1%), geranyl acetate (7.9%), sulcatone (3.7%) heptanal (3.7%), hexanol (3.1%) | |
| flower s ^b | France | 2-ethylhexanol (18.3%), β -myrcene (10.8%), geranyl acetate (10.1%), β -citral (6.1%), 1-octanol (4.8%), nonal (4.2%), α -terpinene (3.5%), 2-hexenal (3.5%), sulcatone (3.0%) | |
| roots ^c | Italy | elemicin (53.7–73.0%), latifolone (19.6–32.7%), ferulic acid derivatives (2.6–6.6%), myristicin (1.3–3.2%) | Avato and Rosito, 2002 |
| flower s ^c | Algeria | <i>p</i> -vinylguaiacol (62.3%), linalool (7.2%), 1,4-dimethylazulene (6.6%), limonene (5.3%) | Ladjel et al. 2011 |
| leaves ^c | Algeria | <i>p</i> -vinylguaiacol (61.6%), linalool (6.5%), 1,4-dimethylazulene (6.3%), limonene (5.1%) | |
| stems ^c | Algeria | <i>p</i> -vinylguaiacol (59.0%), 1,4-dimethylazulene (6.2%), linalool (6.1%), limonene (4.9%) | |
| roots bark ^c | Algeria | myristicin (15.1%), β -thujone (14.9%), elemicin (13.1%), linalool (7.7%), tetradecanoic acid (5.2%), benzyl salicylate (5.2%), acetic acid (3.7%), <i>cis</i> -linalool oxide (3.7%), α -terpineol (3.3%), geraniol (2.6%), methyl 3-hydroxybutanoate (2.3%), <i>trans</i> -linalool oxide (2.0%), | Hachem et al. 2017 |
| flower s ^c | Sicily, Italy | chamazulene (58.3%), humulene oxide II (9.0%), tricosane (8.2%), pentacosane (8.2%), pentacosene-1 (7.5%), 1,4-dimethylazulene (4.7%), curzerene (2.3%) | Casiglia et al. 2016 |
| leaves ^c | Sicily, Italy | chamazulene (49.2%), 1,4-dimethylazulene (18.5%), (<i>E</i>)-phytol (6.3%), neophytadiene (5.1%), pentacosane (4.9%), furanoeremophil-1-one (3.9%) | |
| flower s ^c | Italy | <i>p</i> -vinylguaiacol (48.0%), coumarin (12.7%), linalool (11.6%), 1,4-dimethylazulene (7.0%), phenylacetaldehyde (4.8%), geraniol (3.1%), α -terpineol (3.1%) | Avato 1991 |
| fruits ^c | Italy | <i>p</i> -vinylguaiacol (61.3%), linalool (8.6%), 1,4-dimethylazulene (6.3%), geraniol (4.2%), 7-acetyl-1,4-dimethylazulene (4.0%) | |
| aerial parts ^c | Greece | tricosane (17.9%), <i>n</i> -heneicosane (17.4%), α -pinene (14.5%), sabinene (14.2%), pentadecane (12.5%), δ -3-carene (5.8%) | Evergetis and Haroutounian, 2014 |
| roots ^c | Tunisia (Morgane) | bicyclogermacrene (21.6%), (<i>E</i>)-phytol (4.5%), hexadecanoic acid (4.0%), geraniol (3.8%), pentadecanal (3.7%), borneol (3.1%) | Hassen et al. 2015 |

| | | | |
|--------------------------|------------------------------|---|-----------------------|
| flower s ^c | Tunisia (Morgane) | bicyclogermacrene (27.1%), linalool (9.1%), geranial (6.7%), (<i>E</i>)- phytol (4.2%), hexadecanoic acid (3.8%), longifolene (3.5%), <i>trans</i> -sabinene hydrate (3.3%) | |
| flower s ^c | Tunisia (Oued Rmal) | bicyclogermacrene (27.1%), tricosane (22.9%), α -kaurane (13.2%), linalool (5.2%), geranial (4.1%), hexadecanoic acid (3.4%) | |
| flower s ^c | Tunisia (Utique) | epicubenol (15.7%), β -sesquiphellandrene (12.1%), cadina-1,4- diene (6.6%), α -cadinol (3.9%), α -cedrol (3.6%), epicedrol (3.6%), β -elemene (3.3%), | |
| flower s ^c | Tunisia (Ghar El Mehl) | bicyclogermacrene (24.1%), tricosane (7.4%), hexadecanoic acid (6.4%), geranial (6.2%) | |
| leaves ^c | Tunisia (Morgane) | bicyclogermacrene (30.8%), linalool (10.9%), hexadecanoic acid (5.8%), (<i>E</i>)-phytol (5.2%), tetradecanol (3.3%), geranial (3.1%), | |
| stems ^c | Tunisia (Morgane) | bicyclogermacrene (35.1%), isoeugenol (16.6%), geranial (14.8%), tricosane (8.2%), (<i>E</i>)-phytol (3.5%) | |
| seeds ^c | Tunisia | 1,4-dimethylazulene (51.3%), methyl palmitate (8.2%), methyl linoleate (6.2%), costol (5.1%), linolenic acid (4.8%), ethyl hexadecanoate (4.5%), chamazulene (4.0%), ethyl oleate (2.7%), butyl hexadecanoate (2.0%) | Khemis et al. 2023 |

^aSteam distillation; ^bSPME; ^cHydrodistillation

Tabella A19. *Composizione OE Tordylium apulum (Ta).*

| No. | Compounds ^a | LRI ^b | LRI ^c | Area (%) |
|-----------------------------------|----------------------------|------------------|------------------|--------------|
| 1 | α -Pinene | 1008 | 1014 | 0.72 |
| 2 | β -Pinene | 1109 | 1118 | 0.31 |
| 3 | Limonene | 1183 | 1198 | 1.18 |
| 4 | β -trans-Ocimene | 1237 | 1243 | 1.64 |
| 5 | β -cis-Ocimene | 1242 | 1246 | 64.99 |
| 6 | β -Caryophyllene | 1605 | 1612 | 2.66 |
| 7 | α -Caryophyllene | 1676 | 1687 | 7.25 |
| 8 | Germacrene D | 1700 | 1706 | 0.87 |
| 9 | α -trans-Bergamotol | 1789 | - | 0.09 |
| 10 | Octyl hexanoate | 1821 | 1829 | 14.40 |
| 11 | Caryophyllene oxide | 1943 | 1947 | 0.01 |
| 12 | Octyl caprylate | 2018 | 2020 | 1.18 |
| 13 | δ -Cadinol | 2215 | 2219 | 0.20 |
| 14 | α -Bisabolol | 2222 | 2232 | 0.39 |
| 15 | Farnesyl acetone | 2374 | 2384 | 0.16 |
| 16 | Phytol | 2614 | 2622 | 0.42 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 68.84 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 10.78 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 0.85 |
| Oxygenated Diterpenes | | | | 0.42 |
| Other | | | | 15.58 |
| Total | | | | 96.47 |

^aComponents listed in order of elution on an DB-Wax column; ^bLinear retention index on a DB-Wax polar column; ^cLinear retention indices based on literature (<https://webbook.nist.gov/>).

Tabella A20. *Composizione OE Torilis nodosa (Tn).*

| No. | Compounds ^a | KI ^b | KI ^c | Area (%) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| 1 | 3-Hexen-1-ol | 857 | 848 | 0.2 |
| 2 | Heptanal | 877 | 897 | 0.3 |
| 3 | 1-Octen-3-ol | 978 | 977 | 0.1 |
| 4 | 2-Pentyl-furan | 994 | 989 | 0.4 |
| 5 | Octanal | 999 | 999 | 0.8 |
| 6 | Limonene | 1028 | 1023 | 0.2 |
| 7 | β -cis-Ocimene | 1040 | 1046 | 0.1 |
| 8 | γ -Terpinene | 1058 | 1054 | 0.1 |
| 9 | Terpinolene | 1084 | 1084 | 0.2 |
| 10 | Linalool | 1095 | 1097 | 0.1 |
| 11 | Nonanal | 1101 | 1101 | 1.2 |
| 12 | <i>trans</i> -2-Nonenal | 1157 | 1155 | 1.1 |
| 13 | 4-Terpineol | 1173 | 1170 | 0.1 |
| 14 | α -Terpineol | 1189 | 1183 | 0.1 |
| 15 | Decanal | 1202 | 1202 | 0.1 |
| 16 | β -Citronellol | 1226 | 1225 | 0.1 |
| 17 | Thymol methyl ether | 1231 | 1230 | 0.1 |
| 18 | <i>trans</i> -2-Decenal | 1254 | 1257 | 0.2 |
| 19 | 2-Undecanone | 1292 | 1290 | 0.1 |
| 20 | δ -Elemene | 1338 | 1333 | 1.7 |
| 21 | α -Copaene | 1375 | 1371 | 0.3 |
| 22 | β-Elemene | 1398 | 1393 | 25.9 |
| 23 | β -Caryophyllene | 1417 | 1415 | 6.6 |
| 24 | γ -Elemene | 1425 | 1430 | 3.1 |
| 25 | α -Caryophyllene | 1452 | 1448 | 2.6 |
| 26 | <i>cis</i> - β -Farnesene | 1458 | 1456 | 4.7 |
| 27 | α -Amorphene | 1475 | 1472 | 0.6 |
| 28 | Germacrene D | 1477 | 1475 | 1.9 |
| 29 | α -Farnesene | 1503 | 1506 | 1.6 |
| 30 | β -Sesquiphellandrene | 1522 | 1520 | 0.8 |
| 31 | Spathulenol | 1572 | 1570 | 0.4 |
| 32 | Caryophyllene oxide | 1576 | 1574 | 0.6 |
| 33 | Globulol | 1590 | 1606 | 0.2 |
| 34 | 1-Hexadecanol | 1878 | 1879 | 7.9 |
| 35 | 1-Octadecanol | 2084 | 2084 | 29.3 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | 0.6 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | 0.5 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | 49.8 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | 1.2 |

| | |
|---------------------------|-------------|
| Carbonyl compounds | 3.8 |
| Alcohols | 37.5 |
| Other | 0.4 |
| <hr/> | |
| Total | 93.8 |

^aComponents listed in order of elution on a DB-5MS apolar column; ^bKIs based on literature (<https://webbook.nist.gov/>). ^cExperimental KIs on a DB-5MS apolar column.

Tabella A21. *Principali costituenti (>3%) degli oli essenziali ottenuti mediante idrodistillazione del genere Torilis.*

| Taxa | P. | Origin | Compounds | MH | OM | SH | OS | O | Ref. |
|---|----------|--------|---|-----|-----|------|------|------|----------------------|
| <i>T. arvensis</i> (Huds.) Link. | ap | Iran | (<i>E</i>)- β -farnesene (27.7), <i>ar</i> -curcumene (19.5), himachalol (9.4), β -cedrene (5.9) | - | - | 62.9 | 17.1 | - | Bigdeli et al. 2004 |
| <i>T. arvensis</i> (Huds.) Link. | lv | Egypt | (<i>E</i>)- β -farnesene (32.5), (<i>Z</i>)- α -farnesene (13.6), β -cubebene (12.8), β -caryophyllene (8.4), nuciferyl acetate (6.6) | 0.7 | 0.4 | 75.8 | 11.9 | 2.1 | Saad et al. 1995 |
| <i>T. arvensis</i> (Huds.) Link. | st | Egypt | (<i>E</i>)- β -farnesene (42.3), β -cubebene (13.3), β -caryophyllene (4.9), (<i>Z</i>)- α -farnesene (3.4) | 0.1 | - | 71.1 | 18.0 | 3.1 | Saad et al. 1995 |
| <i>T. arvensis</i> (Huds.) Link. | fr | Egypt | unknown (52.9), β -bisabolene (6.8), β -caryophyllene (5.5), thymol (3.6) | 4.7 | 6.1 | 19.9 | 64.2 | - | Halim et al. 1990 |
| <i>T. japonica</i> (Houtt.) DC | ap | China, | β -eudesmene (22.9), α -selinene (12.9), eudesm-7(11)-en-4-ol (10.4), β -elemene (8.2), caryophyllene oxide (3.9), β -cubebene (3.8), β -caryophyllene (3.6) | - | - | 58.8 | 35.0 | 2.6 | Chen et al. 2003 |
| <i>T. japonica</i> (Houtt.) DC | ap | Japan | germacrene D (71.8-62.3), α -humulene (13.2-2.4), bicyclogermacrene (5.2-3.2), β -caryophyllene (4.6-1.6) | 4.4 | 0.3 | 84.5 | 4.8 | 1.8 | Fujita 1990 |
| <i>T. japonica</i> (Houtt.) DC | lv st | Japan | germacrene D (57.0), α -humulene (8.7), bicyclogermacrene (5.3), β -caryophyllene (3.5), β -elemene (3.5) | 2.3 | 0.6 | 81.9 | 6.4 | 6.7 | Fujita 1990 |
| <i>T. japonica</i> (Houtt.) DC | fr | Japan | germacrene D (60.3), α -humulene (13.2), β -caryophyllene (3.7) | 1.5 | 0.4 | 81.6 | 7.9 | 4.4 | Fujita 1990 |
| <i>T. japonica</i> (Houtt.) DC | ap | India | germacrene D (25.9), α -humulene (14.6), β -caryophyllene (11.3), nootkatone (10.8), caryophyllene oxide (5.1), (<i>E,E</i>)- α -farnesene (4.1) | 0.4 | 0.4 | 59.5 | 32.3 | 1.7 | Kharkwal et al. 2017 |
| <i>T. japonica</i> (Houtt.) DC | ap | Poland | 1,6-germacradien-5-ol (38.5), β -elemene (18.1), β -caryophyllene (11.0), germacrene D (9.3), α -germacrene (8.3) | - | - | 48.8 | 38.5 | - | Widelski et al. 2021 |
| <i>T. leptophylla</i> (L.) Reichenb | ap | Iran | spathulenol (15.7), <i>trans</i> - α -bergamotene (10.4), germacrene D (8.9), <i>trans</i> - α -ambrinol (4.7), β -caryophyllene (4.7), hexadecanoic acid (3.5), (<i>E</i>)- β -farnesene (3.2), 14-hydroxy-9- <i>epi</i> - β -caryophyllene (3.2), β -pinene (3.0) | 5.8 | 4.4 | 36.6 | 30.3 | 14.2 | Masoudi et al. 2012 |

ap = aerial parts ; fl = flowers; lv = leaves; st. = stems; fr = fruits.

TABELLE DATI SPETTROSCOPICI

Tabella A22. *Dati NMR prodotto 1.*

| | δC | δH |
|-------------|------------------|--|
| C1 | 49.98 | 3.27 br d (J=8.3 Hz) |
| C2 | 37.95 | β =2.59 dd (J= 13.8, 6.4 Hz) α =1.70 ddd (J=13.8, 8.3, 6.8 Hz) |
| C3 | 79.31 | 4.77 dd (J=6.8, 6.4 Hz) |
| C4 | 148.21 | - |
| C5 | 131.64 | - |
| C6 | 75.12 | 5.34 d (J=6.3 Hz) |
| C7 | 48.47 | 2.80 ddd (J=9.6, 7.6, 6.3 Hz) |
| C8 | 66.28 | 5.23 dd (J=9.6 Hz) |
| C9 | 43.82 | α =1.77 dd (J=9.6, 15.4 Hz) β =2.66 d (J=15.4 Hz) |
| C10 | 83.97 | - |
| C11 | 39.92 | 2.99 dq (J=7.6 Hz) |
| C12 | 177.98 | - |
| C13 | 11.28 | 1.22 d (J=7.6 Hz) |
| C14 | 21.64 | 1.39 s |
| C15 | 11.21 | 1.86 m |
| C1' | 166.14 | - |
| C2' | 127.37 | - |
| C3' | 138.90 | 6.05 qq (J=7.2, 1.3 Hz) |
| C4' | 15.64 | 1.96 dq (J=7.2, 1.3 Hz) |
| C5' | 20.31 | 1.84 dq (J=1.3, 1.3 Hz) |
| C1'' | 171.4 | - |
| C2'' | 22.61 | 2.09 s |

Tabella A23. Dati NMR prodotto 2.

| | C | H |
|--------------|----------|--|
| C1 | 52.46 | 3.18 br d (J=8.3 Hz) |
| C2 | 36.46 | β =2.52 dd (J= 14.1, 7.1 Hz) α =1.73 ddd (J=14.1, 8.3, 7.1 Hz) |
| C3 | 79.69 | 4.74 dd (J=7.1, 6.4 Hz) |
| C4 | 150.61 | - |
| C5 | 130.90 | - |
| C6 | 73.15 | 5.64 d (J=10.5 Hz) |
| C7 | 48.99 | 3.54 dd (J=10.5, 10.5 Hz) |
| C8 | 66.19 | 5.50 dd (J=10.5, 10.5 Hz) |
| C9 | 40.62 | α =1.50 dd (J=10.5, 15.6 Hz) β =2.90 d (J=15.6 Hz) |
| C10 | 83.50 | - |
| C11 | 79.19 | - |
| C12 | 173.96 | - |
| C13 | 20.75 | 1.57 s |
| C14 | 20.20 | 1.31 s |
| C15 | 12.16 | 1.93 m |
| C1' | 166.23 | - |
| C2' | 127.13 | - |
| C3' | 139.44 | 6.12 qq (J= 7.2, 1.3 Hz) |
| C4' | 15.71 | 1.98 dq (J=7.2, 1.3 Hz) |
| C5' | 20.29 | 1.85 (1.3, 1.3 Hz) |
| C1'' | 178.98 | - |
| C2'' | 20.83 | 2.08 s |
| C1''' | 170.10 | - |
| C2''' | 22.56 | 2.12 s |

Tabella A24. Dati NMR prodotto 3.

| | C | H |
|-------------|----------|--|
| C1 | 49.82 | 3.24 br d (J=8.3 Hz) |
| C2 | 37.97 | β =2.62 dd (J= 13.8, 6.4 Hz) α =1.70 ddd (J=13.8, 8.3, 6.8 Hz) |
| C3 | 79.22 | 4.78 dd (J=6.8, 6.4 Hz) |
| C4 | 148.54 | - |
| C5 | 131.38 | - |
| C6 | 74.94 | 5.35 d (J=6.3 Hz) |
| C7 | 48.51 | 2.84 ddd (J=9.6, 7.6, 6.3 Hz) |
| C8 | 67.36 | 5.25 t (J=9.6 Hz) |
| C9 | 43.81 | β =2.68 d (J=15.6 Hz) α =1.73 dd (J=9.5, 15.6 Hz) |
| C10 | 83.81 | - |
| C11 | 39.92 | 3.00 dq (J=7.6 Hz) |
| C12 | 177.78 | - |
| C13 | 11.22 | 1.20 d (J=7.6 Hz) |
| C14 | 21.63 | 1.39 s |
| C15 | 11.22 | 1.87 m |
| C1' | 164.96 | - |
| C2' | 143.97 | - |
| C3' | 123.81 | b=5.85 d a=6.10 d |
| C4' | 67.04 | 4.60 q |
| C5' | 22.62 | 1.36 s |
| C1'' | 170.97 | - |
| C2'' | 22.20 | 2.08 s |

Tabella A25. Dati NMR prodotto 4.

| | C | H |
|-------------|----------|--|
| C1 | 49.82 | 3.24 br d (J=8.3 Hz) |
| C2 | 37.97 | β =2.62 dd (J= 13.8, 6.4 Hz) α =1.70 ddd (J=13.8, 8.3, 6.8 Hz) |
| C3 | 79.22 | 4.78 dd (J=6.8, 6.4 Hz) |
| C4 | 148.54 | - |
| C5 | 131.38 | - |
| C6 | 74.94 | 5.35 d (J=6.3 Hz) |
| C7 | 48.51 | 2.84 ddd (J=9.6, 7.6, 6.3 Hz) |
| C8 | 67.21 | 5.26 t (J=9.6 Hz) |
| C9 | 43.71 | β =2.66 d (J=15.6 Hz) α =1.75 dd (J=9.5, 15.6 Hz) |
| C10 | 83.81 | - |
| C11 | 39.92 | 3.00 dq (J=7.6 Hz) |
| C12 | 177.78 | - |
| C13 | 11.22 | 1.20 d (J=7.6 Hz) |
| C14 | 21.63 | 1.39 s |
| C15 | 11.22 | 1.87 m |
| C1' | 165.02 | - |
| C2' | 143.97 | - |
| C3' | 123.93 | b=5.85 d a=6.10 d |
| C4' | 67.04 | 4.60 q |
| C5' | 22.58 | 1.36 s |
| C1'' | 170.90 | - |
| C2'' | 22.20 | 2.08 s |

Tabella A26. Dati NMR prodotto 5.

| | C | H |
|------------|----------|--------------------------|
| C1 | 39.13 | a = 1.49 m b = 1.83 m |
| C2 | 34.14 | 2.54-2.37 m |
| C3 | 217.61 | - |
| C4 | 46.88 | - |
| C5 | 55.36 | 1.31 dd |
| C6 | 19.58 | 1.55-1.48 m |
| C7 | 32.41 | 1.52-1.59 m |
| C8 | 39.31 | - |
| C9 | 47.43 | 1.64 dd |
| C10 | 36.81 | - |
| C11 | 22.97 | a = 1.26 m b = 1.99 m |
| C12 | 122.43 | 5.29 t |
| C13 | 143.64 | - |
| C14 | 41.79 | - |
| C15 | 27.70 | a = 1.14 m b = 1.73 m |
| C16 | 23.55 | a = 1.63 m b = 1.99 m |
| C17 | 46.58 | - |
| C18 | 41.13 | 2.85 dd ($J=11.4$ Hz) |
| C19 | 45.85 | a = 1.16 m b = 1.65 m |
| C20 | 30.67 | - |
| C21 | 33.83 | a = 1.22 m b = 1.49 m |
| C22 | 32.21 | a = 1.49 m b = 1.78 m |
| C23 | 26.47 | 1.09 s |
| C24 | 21.44 | 1.04 s |
| C25 | 15.01 | 1.06 s |
| C26 | 16.96 | 0.83 s |
| C27 | 25.81 | 1.16 s |
| C28 | 182.99 | - |
| C29 | 33.04 | 0.92 s |
| C30 | 23.51 | 0.94 s |

Tabella A27. Dati NMR prodotto ECI.

| | C | H |
|------------------------------|----------|------------------------|
| 2 | 67.4 | 5.40 (d, $J = 1.2$ Hz) |
| 3 | 127.9 | - |
| 4 | 184.9 | - |
| 4a | 103.7 | - |
| 5 | 160.7 | - |
| 6 | 96.5 | 6.15 (s) |
| 7 | 127.5 | - |
| 8 | 161.7 | - |
| 8a | 152.7 | - |
| 9 | 137.8 | 7.86 (brs) |
| 1' | 126.9 | - |
| 2' | 132.0 | 7.31 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 3' | 114.4 | 7.01 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 4' | 161.1 | - |
| 5' | 114.4 | 7.01 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 6' | 132.0 | 7.31 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| -OCH₃ (7) | 61.9 | 3.85 (s) |
| -OCH₃ (4') | 55.1 | 3.87 (s) |
| -OH (5) | - | 12.60 (s) |

Tabella A28. Dati NMR EC2.

| | C | H |
|-------------------------|----------|------------------------|
| 2 | 75.4 | 4.99 (d, $J = 1.2$ Hz) |
| 3 | 125.3 | - |
| 4 | 187.1 | - |
| 4a | 104.6 | - |
| 5 | 161.2 | - |
| 6 | 96.0 | 6.14 (s) |
| 7 | 157.5 | - |
| 8 | 127.3 | - |
| 8a | 152.8 | - |
| 9 | 141.2 | 6.90 (brs) |
| 1' | 126.5 | - |
| 2' | 133.1 | 7.82 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 3' | 113.6 | 6.90 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 4' | 161.2 | - |
| 5' | 113.6 | 6.90 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 6' | 133.1 | 7.82 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| -OCH₃ | 61.6 | 3.88 (s) |
| -OCH₃ | 55.4 | 3.85 (s) |
| -OH (5) | - | 12.58 (s) |
| -OH (7) | - | 6.37 (s) |

Tabella A29. Dati NMR EC3.

| | C | H |
|----------------|----------|------------------------|
| 2 | 75.0 | 4.90 (d, $J = 1.2$ Hz) |
| 3 | 125.4 | - |
| 4 | 187.1 | - |
| 4a | 104.7 | - |
| 5 | 165.4 | - |
| 6 | 96.8 | 5.95 (d, $J = 2.3$ Hz) |
| 7 | 164.3 | - |
| 8 | 94.5 | 5.92 (d, $J = 2.3$ Hz) |
| 8a | 162.9 | - |
| 9 | 140.9 | 6.86 (brs) |
| 1' | 126.9 | - |
| 2' | 133.1 | 7.82 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 3' | 113.1 | 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 4' | 161.0 | - |
| 5' | 113.1 | 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 6' | 133.1 | 7.82 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| -OCH3 | 56.0 | 3.84 (s) |
| -OH (5) | - | 12.80 (s) |

Tabella A30. Dati NMR EC4.

| | C | H |
|--------------|----------|------------------------|
| 2 | 67.3 | 5.30 (d, $J = 1.2$ Hz) |
| 3 | 128.2 | - |
| 4 | 185.1 | - |
| 4a | 102.5 | - |
| 5 | 162.9 | - |
| 6 | 96.0 | 5.86 (d, $J = 2.3$ Hz) |
| 7 | 167.1 | - |
| 8 | 94.8 | 5.80 (d, $J = 2.3$ Hz) |
| 8a | 165.1 | - |
| 9 | 136.7 | 7.73 (brs) |
| 1' | 129.9 | - |
| 2' | 132.2 | 7.35 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 3' | 114.2 | 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 4' | 161.1 | - |
| 5' | 114.2 | 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| 6' | 132.2 | 7.35 (d, $J = 8.9$ Hz) |
| -OCH3 | 54.4 | 3.86 (s) |

Tabella A31. Dati NMR EC5.

| | C | H |
|-------------------------|----------|------------------------|
| 2 | 66.9 | 4.55 (t, $J = 6.3$ Hz) |
| 3 | 36.7 | 2.81 (t, $J = 6.3$ Hz) |
| 4 | 195.7 | - |
| 4a | 103.5 | - |
| 5 | 160.3 | - |
| 6 | 95.9 | 6.12 (s) |
| 7 | 157.9 | - |
| 8 | 127.6 | - |
| 8a | 153.4 | - |
| -OCH₃ | 61.7 | 3.87 (s) |
| -OH (5) | - | 11.91 (s) |
| -OH (7) | - | 6.39 (s) |

Tabella A32. Dati NMR EC6.

| | C | H |
|-------------------------|----------|---|
| 2 | 69.3 | a = 4.26 (dd, $J = 11.4, 4.5$ Hz) b = 4.09 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 47.2 | 2.79 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.5, 4.5$ Hz) |
| 4 | 198.9 | - |
| 4a | 102.8 | - |
| 5 | 154.6 | - |
| 6 | 128.5 | 6.05 (s) |
| 7 | 158.9 | - |
| 8 | 95.3 | - |
| 8a | 157.5 | - |
| 9 | 32.2 | a = 3.16 (dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz) b = 2.70 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 130.2 | - |
| 2' | 130.6 | 7.10 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 3' | 115.8 | 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 4' | 154.9 | - |
| 5' | 115.8 | 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 6' | 130.6 | 7.10 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| -OCH₃ | 61.2 | 3.94 (s) |
| -OH (5) | - | 12.28 (s) |

Tabella A33. Dati NMR EC7.

| | C | H |
|-------------------------|----------|---|
| 2 | 69.6 | a = 4.36 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz) b = 4.20 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 47.1 | 2.84 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.3, 4.3$ Hz) |
| 4 | 198.1 | - |
| 4a | 102.6 | - |
| 5 | 160.4 | - |
| 6 | 96.2 | 6.13 (s) |
| 7 | 158.1 | - |
| 8 | 127.6 | - |
| 8a | 153.3 | - |
| 9 | 32.3 | a = 3.16 (dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz) b = 2.70 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 129.8 | - |
| 2' | 130.5 | 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 3' | 115.9 | 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 4' | 154.8 | - |
| 5' | 115.9 | 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 6' | 130.5 | 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| -OCH₃ | 61.7 | 3.84 (s) |
| -OH (5) | - | 11.98 (s) |

Tabella A34. Dati NMR EC8.

| | C | H |
|-------------------------|----------|---|
| 2 | 69.3 | a = 4.37 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz) b = 4.19 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 48.6 | 2.76 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.3, 4.3$ Hz) |
| 4 | 191.9 | - |
| 4a | 105.6 | - |
| 5 | 159.0 | - |
| 6 | 92.1 | 6.18 (s) |
| 7 | 155.3 | - |
| 8 | 128.0 | - |
| 8a | 155.7 | - |
| 9 | 32.1 | a = 3.19 (dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz) b = 2.62 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 130.7 | - |
| 2' | 130.2 | 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 3' | 115.7 | 6.78 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 4' | 154.6 | - |
| 5' | 115.7 | 6.78 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 6' | 130.2 | 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| -OCH₃ | 56.1 | 3.86 (s) |
| -OCH₃ | 61.5 | 3.86 (s) |

Tabella A35. Dati NMR EC9.

| | C | H |
|-----------------------------|----------|---|
| 2 | 69.3 | a = 4.35 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz) b = 4.21 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 47.0 | 2.83 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.3, 4.3$ Hz) |
| 4 | 198.3 | - |
| 4a | 102.3 | - |
| 5 | 160.3 | - |
| 6 | 93.0 | 6.11 (s) |
| 7 | 161.3 | - |
| 8 | 129.3 | - |
| 8a | 153.7 | - |
| 9 | 32.0 | a = 3.16 (dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz) b = 2.72 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 129.5 | - |
| 2' | 130.3 | 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 3' | 115.6 | 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 4' | 154.8 | - |
| 5' | 115.6 | 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 6' | 130.3 | 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| -OCH₃ | 61.3 | 3.79 (s) |
| -OCH₃ (7) | 56.5 | 3.89 (s) |
| -OH (5) | - | 12.06 (s) |

Tabella A36. Dati NMR EC10.

| | C | H |
|-------------------------|----------|---|
| 2 | 70.8 | a = 4.38 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz) b = 4.16 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 50.1 | 2.78 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.3, 4.3$ Hz) |
| 4 | 191.1 | - |
| 4a | 107.4 | - |
| 5 | 159.6 | - |
| 6 | 91.9 | 6.41 |
| 7 | 160.2 | - |
| 8 | 132.4 | - |
| 8a | 157.9 | - |
| 9 | 33.1 | a = 3.14 (dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz) b = 2.66 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 132.5 | - |
| 2' | 131.7 | 7.24 |
| 3' | 115.3 | 6.92 |
| 4' | 160.1 | - |
| 5' | 115.3 | 6.92 |
| 6' | 131.7 | 7.24 |
| -OCH₃ | 61.6 | 3.97 |
| -OCH₃ | 57.2 | 3.89 |
| -OCH₃ | 57.1 | 3.81 |
| -OCH₃ | 56.2 | 3.71 |

Tabella A37. Dati NMR EC11.

| | C | H |
|-----------------------------|----------|---|
| 2 | 69.4 | a = 4.43 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz) b = 4.24 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 46.8 | 2.96 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.3, 4.3$ Hz) |
| 4 | 198.8 | - |
| 4a | 106.5 | - |
| 5 | 158.6 | - |
| 6 | 103.5 | 6.27 (s) |
| 7 | 151.9 | - |
| 8 | 132.8 | - |
| 8a | 154.7 | - |
| 9 | 31.8 | a = 3.27 (dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz) b = 2.78 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 135.0 | - |
| 2' | 130.1 | 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 3' | 121.9 | 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 4' | 149.6 | - |
| 5' | 121.9 | 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 6' | 130.1 | 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| -OCH₃ | 61.2 | 3.77 (s) |
| -OH (5) | - | 11.65 (s) |
| Ac | 168.3 | - |
| Ac | 169.7 | - |
| -CH₃ (Ac) | 20.7 | 2.34 (s) |
| -CH₃ (Ac) | 21.1 | 2.31 (s) |

Tabella A38. Dati NMR EC12.

| | C | H |
|-----------------------------|----------|---|
| 2 | 69.4 | a = 4.46 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz) b = 4.26 (dd, $J = 11.4, 7.3$ Hz) |
| 3 | 47.9 | 2.88 (dddd, $J = 10.2, 7.3, 4.3, 4.3$ Hz) |
| 4 | 191.1 | - |
| 4a | 110.9 | - |
| 5 | 145.6 | - |
| 6 | 98.2 | 6.48 (s) |
| 7 | 148.6 | - |
| 8 | 138.9 | - |
| 8a | 156.4 | - |
| 9 | 31.7 | a = 3.26 (dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz) b = 2.66 (dd, $J = 13.9, 10.2$ Hz) |
| 1' | 135.4 | - |
| 2' | 130.1 | 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 3' | 121.9 | 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 4' | 149.5 | - |
| 5' | 121.9 | 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| 6' | 130.1 | 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz) |
| -OCH₃ | 61.2 | 3.87 (s) |
| Ac | 169.6 | - |
| Ac | 169.6 | - |
| Ac | 167.9 | - |
| -CH₃ (Ac) | 20.7 | 2.39 (s) |
| -CH₃ (Ac) | 21.1 | 2.34 (s) |
| -CH₃ (Ac) | 21.3 | 2.31 (s) |

6. BIBLIOGRAFIA

Abad MJ, De las Heras B, Silvan AM, Pascual R, Bermejo P, Rodriguez B, Villar AM. Effects of furocoumarins from *Cachrys trifida* on some macrophages functions. J Pharm Pharmacol. 2001. 53(8):1163–1168.

Abbasi AM, Shah MH, Li T, Fu X, Guo X, Liu RH. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables. J Ethnopharmacol. 2015. 162:333-345.

Abbasi AM, Shah MH, Khan MA. Wild edible vegetables of lesser Himalayas: Ethnobotanical and nutraceutical aspects. Springer, Cham, Switzerland. 2016.

Abd Samat NMA, Ahmad S, Awang Y, Bakar RAH, Hakiman M. Alterations in Herbage Yield, Antioxidant Activities, Phytochemical Contents, and Bioactive Compounds of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus Nutans* L.) with Regards to Harvesting Age and Harvesting Frequency. Molecules. 2020. 25(12):2833.

Abd-Alla MH, Al-Amri SM, El-Enany AWE. Enhancing rhizobium–legume symbiosis and reducing nitrogen fertilizer use are potential options for mitigating climate change. Agriculture. 2023. 13:2092.

Abdallah II, Quax WJ. A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. KnE Life Sci. 2017. 81–98.

Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. J Pharm Bioallied Sci. 2020. 12(1):1-10.

Aćimović MG, Kostadinović LM, Popović SJ, Dojcinović NS. Apiaceae seeds as functional food. J Agric Sci. 2015. 60:237-246.

Adams M, Berset C, Kessler M, Hamburger M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J Ethnopharmacol.* 2009. 121(3):343–359.

Adinolfi M, Barone G, Belardini M, Lanzetta R, Laonigro G, Parrilli M. 3-Benzyl-4-chromanones from *Muscari comosum*. *Phytochem.* 1984. 23:2091–2093.

Adinolfi M, Barone G, Lanzetta R, Laonigro G, Mangoni L, Parrilli M. 1985. 3-Benzyl-4-chromanones from *Muscari comosum*. *Phytochem.* 1985. 24:624-626.

Adnan M, Bibi R, Azizullah A, Andaleeb R, Mussarat S, Tariq A, Ullah R, AbdElsalam NM, Khan AL, Begum S. Ethnomedicinal plants used against common digestive problems. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2015. 12:99-117.

Aelenei P, Miron A, Trifan A, Bujor A, Gille E, Aprotosoiaie AC. Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. *Molecules.* 2016. 3:19.

Afolayan AJ, Adebola PO. In vitro propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. *Afr J Biotechnol.* 2004. 3(12):683-687.

Ahmed SST, Fahim JR, Abdelmohsen UR, Hamed ANE Chemical and Biological Potential of *Ammi visnaga* (L.) Lam. and *Apium graveolens* L.: A Review (1963-2020). *J Adv Biomedical Pharm Sci.* 2021. 4(3):160-176.

Akbari MT, Esmaeili A, Zarea A, Saad N, Bagheri F. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves, stems and flowers of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. grown in Iran. *Bulg Chem Commun.* 2010. 42:36–39.

Al-Hadhrami RMS, Al-Muniri RMS, Hossain MA. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of polar solvent extracts from leaves of *Ammi majus* used by the Omanis. *Pacific. Sci Rev A Nat Sci Eng.* 2016. 18:62-65.

Al-Hmadi H, Mokni REI, Joshi RK, Ashour ML, Hammami S. The impact of geographical location on the chemical compositions of *pimpinella lutea* desf. Growing in Tunisia. Appl Sci (Switzerland). 2021. 11:7739.

Al-Snafi AE. Chemical constituents and pharmacological activities of *Ammi majus* and *A. visnaga*. A review. 2013. Int J Pharm Ind Res. 3:257-265.

Alali F, El-Elimat T, Albataineh H, Al-Balas Q, Al-Gharaibeh M, Falkinham JO, Chen W, Swanson SM, Oberlies NH. Cytotoxic homoisoflavones from the bulbs of *Bellevalia eigii*. J Nat Prod. 2015. 78:1708-1715.

Alkan M, Gokce A, Kara K. Contact Toxicity of Six Plant Extracts to Different Larval Stages of Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* SAY (Col: Chrysomelidae)). J Agric Sci. 2015. 23:309-316.

Alsaud N, Farid M. Insight into the Influence of Grinding on the Extraction Efficiency of Selected Bioactive Compounds from Various Plant Leaves. Appl Sci. 2020. 10(18):6362.

Alston RE. In Biochemistry of Phenolic Compounds (ed. J.B. Harborne), Academic Press, London, pp. 171-204. 1964.

Alves-Silva J, Guerra I, Gonçalves M, Cavaleiro C, Cruz M, Figueirinha A, Salgueiro L. Chemical composition of *Crithmum maritimum* L. essential oil and hydrodistillation residual water by GC-MS and HPLC-DAD MS/MS, and their biological activities. Ind Crops Prod. 2020. 149:112329.

Amjad MS, Zahoor U, Bussmann RW, Altaf M, Gardazi SMH, Abbasi AM. Ethnobotanical survey of the medicinal flora of Harighal, Azad Jammu & Kashmir, Pakistan. J Ethnobiol Ethnomed. 2020. 16:65.

Ammar S, Noui H, Djamel S, Madani S, Maggi F, Bruno M, Romano D, Canale A, Pavela R, Benelli G. Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides? Environ Sci Pollut Res Int. 2020. 27(21):26594-26604.

Amrati FEZ, Bourhia M, Slighoua M, Mohammad Salamatullah A, Alzahrani A, Ullah R, Bari A, Bousta D. Traditional medicinal knowledge of plants used for cancer treatment by communities of mountainous areas of Fez-Meknes-Morocco. *Saudi Pharm J.* 2021. 29:1185-1204.

Amschler G, Frahm AW, Hatzelmann A, Kilian U, Muller-Doblies D, Muller- Doblies U. Spirocyclic nortriterpenes from the bulbs of *Veltheimia viridifolia*. *Planta Med.* 1996. 62:534–539.

Andersen TB, Lopez CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT. Thapsigargin from *Thapsia* L. to mipsagargin. *Molecules.* 2015. 20:6113-6127.

Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(13):4618.

Appendino G, Gariboldi P. The stereochemistry of matricin and 4-epimatricin, proazulene sesquiterpene lactones from *Artemisia arborescens*. *Phytochemistry.* 1982. 21:2555-2557.

Appendino G, Valle MG, Caniato R, Cappelletti EM. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium garganicum*. *Phytochemistry.* 1986. 25:1747-1749.

Appendino G, Cravotto G, Nano GM. Sesquiterpene lactones from *Laserpitium gallicum*, *Phytochemistry.* 1993. 33:883-886.

Appendino G, Pollastro F, Verotta L, Ballero M, Romano A, Wyrembek P, Szczuraszek K, Mozrzykmas JW, Tagliatela-Scafati O. Polyacetylenes from Sardinian *Oenanthe fistulosa*: A molecular clue to *Risus sardonius*. *J Nat Prod.* 2009. 72(5):962-965.

Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Gralow JR, Cardoso F, Siesling S, Soerjomataram I. Current and Future Burden of Breast Cancer: Global Statistics for 2020 and 2040. *Breast.* 2022. 66:15-23.

Askari F, Sefidkon F, Mozafarian V. Essential oil composition of *Pimpinella aurea* D.C. from Iran. *Flavour Fragr J.* 2005a. 20:115-117.

Askari F, Sefidkon F. Volatile components of *Pimpinella tragioides* vill. from Iran. Iran J Pharm Res. 2005b. 4:117-120.

Askari F, Sefidkon F. Essential Oil Composition of *Pimpinella tragioides* (Boiss.) Benth. et Hook. From Iran. J Essent Oil Res. 2007. 19:54-56.

Assadian F, Masoudi S, Nematollahi F, Rustaiyan A, Larijani K, Mazloomifar H. Volatile constituents of *Xanthogalum purpurascens* Ave-Lall., *Eryngium caeruleum* M.B., and *Pimpinella aurea* DC.: Three Umbelliferae herbs growing in Iran. J Essent Oil Res. 2005. 17(3):243-245.

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol Adv. 2015. 33(8):1582-1614.

Atia A, Barhoumi Z, Mokded, R, Abdely C, Smaoui A. Environmental ecophysiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). J Med Plants Res. 2011. 5:3564–3571.

Aung TN, Qu Z, Kortschak, RD, Adelson DL. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. Int J Mol Sci. 2017. 18:656.

Avato P. Essential oil of *Thapsia garganica*. Planta Med. 1991. 57:585-586.

Avato P, Jacobsen N, Smitt UW. Chemotaxonomy of *Thapsia maxima* Miller. Constituents of the essential oil of the fruits. J Ess Oil Res. 1992. 4:467-473.

Avato P, Trabace G, Smitt UW. Essential oils from fruits of three types of *Thapsia villosa*. Phytochemistry. 1996a. 43:609-612.

Avato P, Trabace G, Smitt UW. Composition of the essential oils of fruits from polyploid types of *Thapsia villosa* L.: Chemotaxonomic evaluation. J Ess Oil Res. 1996b. 8:123-128.

Avato P, Smitt UW. Composition of the essential oils from the roots of *Thapsia maxima* Miller and *T. villosa* L. J Ess Oil Res. 2000. 12:303-309.

Avato P, Rosito I. Essential oils from the roots of *Thapsia garganica*. J Ess Oil Res. 2002. 14:20-22.

Awad AM, Kumar P, Ismail-Fitry MR, Jusoh S, Ab Aziz MF, Sazili AQ. Green Extraction of Bioactive Compounds from Plant Biomass and Their Application in Meat as Natural Antioxidant. Antioxidants (Basel). 2021. 10(9):1465.

Aydin E, Hritcu L, Dogan G, Hayta S, Bagci E. The effects of inhaled *Pimpinella peregrina* essential oil on scopolamine-induced memory impairment, anxiety, and depression in laboratory rats. Mol Neurobiol. 2016. 53:6557-6567.

Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study. Asian Pac J Cancer Prev. 2019. 20:2015-2020.

Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, Rafatullah M, Ganash M, Kamal MA, Ashraf GM. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. Curr Drug Metab. 2018. 19(13):1100-1110.

Badalamenti N, Ilardi V, Rosselli S, Bruno M, Maggi F, Leporini M, Falco T, Loizzo MR, Tundis R. *Ferulago nodosa* subsp. *geniculata* (Guss.) Troia & Raimondo: isolation of essential oil and evaluation of its bioactivity. Molecules. 2020. 25:3249.

Badalamenti N, Ilardi V, Rosselli S, Bruno M. The ethnobotany, phytochemistry and biological properties of genus *Ferulago* – a review. J Ethnopharmacol. 2021. 274:114050.

Badalamenti N, Modica A, Ilardi V, Bruno M, Maresca V, Zanfardino A, Di Napoli M, Castagliuolo G, Varcamonti M, Basile A. *Daucus carota* subsp. *maximus* (Desf.) Ball from Pantelleria, Sicily (Italy): isolation of essential oils and evaluation of their bioactivity. Nat Prod Res. 2022a. 36:5842-5847.

Badalamenti N, Vaglica A, Maggio A, Bruno M. A new ferulol derivative isolated from the aerial parts of *Ferulago nodosa* (L.) Boiss. growing in Sicily (Italy). *Nat Prod Res.* 2022b. 13:1-7.

Badalamenti N, Vaglica A, Ilardi V, Bruno M. The chemical composition of essential oil from *Seseli bocconi* (Apiaceae) aerial parts growing in Sicily (Italy). *Nat Prod Res.* 2022c. In Press. 1–5.

Bader A, Caponi C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. Acorenone in the essential oil of flowering aerial parts of *Seseli tortuosum* L. *Flavour Fragr J.* 2003. 18(1):57–58.

Bagherifar S, Sourestani MM, Zolfaghari M, Mottaghipisheh J, Zomborszki ZP, Csupor D. Chemodiversity of volatile oil contents of various parts of 10 Iranian Prangos ferulacea accessions, with analysis of antiradical potential. *Nat Prod Commun.* 2019. 14(5).

Baginska S, Golonko A, Swislocka R, Lewandowski W. Monoterpenes as medicinal agents: exploring the pharmaceutical potential of P-cymene, P-cymenene, And Γ -Terpinene. *Acta Pol Pharm.* 2023. 80:879-892.

Bailey CP, von Holy A. Bacillus spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microb.* 1993. 10:287-294.

Banday JA, Rather Z, Yattoo GN, Hajam MA, Bhat SA, Santhanakrishnan VP, Farazi A, Rather MA, Rasool S. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis, antioxidant, antiproliferative and antibacterial activities of the essential oil of *Prangos pabularia*. *Microb Pathog.* 2022. 166:105540.

Barba-Ostria C, Carrera-Pacheco SE, Gonzalez-Pastor R, Heredia-Moya J, Mayorga-Ramos A, Rodríguez-Pólit C, Zúñiga-Miranda J, Arias-Almeida B, Guamán LP. Evaluation of Biological Activity of Natural Compounds: Current Trends and Methods. *Molecules.* 2022. 27(14):4490.

Barbosa PO, Pala D, Silva CT, de Souza MO, do Amaral JF, Vieira RAL, Folly GA, Volp ACP, de Freitas RN. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular

antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. *Nutrition*. 2016. 32:674–680.

Barone G, Belardini M, Lanzetta R, Laonigro G, Parrilli M. 7-O-Methyl-3,9-dihdropunctatin: a new homoisoflavanone from *Muscari comosum*. *Rendiconto dell'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche, Naples*. 1983. 50:297-298.

Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Seseli vayredanum*. *Phytochemistry*. 1994. 37(5):1351-1358.

Başer KHC, Demirçakmak B, Ermin N, Demirci F, Boydag I. The essential oil of *Bifora radians* Bieb. *J Essent Oil Res*. 1998. 10:451-452.

Başer KHC, Özek T, Aytac Z. Essential oil of *Hippomarathrum boissieri* Reuter et Hausskn. *J Essent Oil Res*. 2000a. 12(2):231-232.

Baser KHC, Demirci B, Demirci F, Bedir E, Weyerstahl P, Marschall H, Duman H, Aytac Z, Hamann MT. A new bisabolene derivative from the essential oil of *Prangos uechtrizii* fruits. *Planta Med*. 2000b. 66(7):674–677.

Baser KHC, Ozek T, Kurkcuoglu M, Aytac Z. Essential oil of *Seseli campestre* Besser. *J Essent Oil Res*. 2000c. 12(1):105–107.

Başer KHC, Demirc B, Özek T, Duman H. Composition of microdistilled essential oils of *Tordylium apulum* L. and *T. pustulosum* Boiss. *J Essent Oil Res*. 2012. 24:347-350.

Batanouny KH. *A Guide to Medicinal Plants in North Africa*. IUCN Center for Mediterranean Cooperation Malaga, Spain. 2005.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966. 45:493–496.

Bauer R, Tittel G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine*. 1996. 2(3):193-8.

Baytop T. Therapy with plants in Turkey (past and present), 2nd ed. Istanbul: Nobel Medical Book House. 1999.

Beeby E, Magalhaes M, Pocas J, Collins T, Lemos MFL, Barros L, Ferreira ICFR, Cabral C, Pires IM. Secondary metabolites (essential oils) from sand-dune plants induce cytotoxic effects in cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2020. 258:112803.

Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952. 195:133–140.

Bellakhdar J. Doctoral Thesis. Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au maroc: la situation actuelle, les produits' les sources du savoir. University of Metz, France. 1997.

Belwal T, Cravotto C, Prieto MA, Venskutonis PR, Daglia M, Devkota HP, Baldi A, Ezzat SM, Gómez-Gómez L, Salama SS, Campone L, Rastrelli L, Echave J, Jafari SM, Cravotto G. Effects of different drying techniques on the quality and bioactive compounds of plant-based products: a critical review on current trends. *Drying Techn.* 2022. 40(8):1539–1561.

Ben Salem S, Znati M, Jabrane A, Casanova J, Ben Jannet H. Chemical composition, antimicrobial, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of the root essential oil from the Tunisian *Ferula lutea* (Poir) Maire (Apiaceae). *J Essent Oil-Bear Plants.* 2016. 19(4):897– 906.

Benjamin MAZ, Ng SY, Saikim FH, Rusdi NA. The Effects of Drying Techniques on Phytochemical Contents and Biological Activities on Selected Bamboo Leaves. *Molecules.* 2022. 27(19):6458.

Berenbaum MR. Evolution of specialization in insect-umbellifer associations. *Annu Rev Entomol.* 1990. 35:319-343.

Biała-Leonhard W, Zanin L, Gottardi S, de Brito Francisco R, Venuti S, Valentinuzzi F, Mimmo T, Cesco S, Bassin B, Martinoia E, Pinton R, Jasiński M, Tomasi N. Identification of an Isoflavonoid Transporter Required for the Nodule Establishment of the *Rhizobium-Fabaceae* Symbiotic Interaction. *Front Plant Sci.* 2021. 12:758213.

Bicchi C, Rubiolo P, Ballero M, Sanna C, Matteodo M, Esposito F, Zinzula L, Tramontano E. HIV-1-inhibiting activity of the essential oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. *Planta Med.* 2009. 75(12):1331-5.

Bigdeli M, Rustaiyan A, Masoudi S. Composition of the essential oil of *Torilis arvensis* (Huds.) Link. from Iran. *J Essent Oil Res.* 2004. 16:526-527.

Birchfield AS, McIntosh CA. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. *Curr Plant Biol.* 2020. 24:100163.

Bisi-Johnson MA, Obi CL, Hattori T, Oshima Y, Li S, Kambizi L, Eloff JN, Vasaikar SD. Evaluation of antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal plants. *BMC Complement Altern. Med.* 2011. 11:14.

Bisset NG. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. CRC Press Boca Raton, FL. 1994.

Bogucka-Kocka A, Vorobets N, Chrzęszcz M, Pietrzak W, Szewczyk K. Polyphenol Composition of Extracts of the Fruits of *Laserpitium Krapffii* Crantz and Their Antioxidant and Cytotoxic Activity. *Antioxidants (Basel)*. 2019. 8(9):363.

Bohler P, Tamm Ch. The homo-isoflavones, a new class of natural product. Isolation and structure of eucomin and eucomol. *Tetrahedron Lett.* 1967. 36:3479–3483.

Bohlmann F, Thefeld W. Naturally occurring coumarin derivatives. Dihydroseselin derivatives from *Laserpitium archangelica*. *Tetrahedron Lett.* 1970. 41:3577-3580.

Bohlmann J, Keeling CI. Terpenoid Biomaterials. *Plant J Cell Mol Biol.* 2008. 54(4):656–669.

Booth JK, Page JE, Bohlmann J. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *PLoS One.* 2017. 12(3):e0173911.

- Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr Med Chem*. 2005. 12(8):887-916.
- Bouasla A, Bouasla I. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine*. 2017. 36:68-81.
- Bouderdara N, Elomri A, Djarri L, Medjroubi K, Seguin E, Vérité P. Chemical composition of the essential oil of *Cachrys libanotis* from Algeria. *Nat Prod Commun*. 2011. 6(1):115-117.
- Brullo S, Guglielmo A, Pasta S, Pavone P, Salmeri C. Note citotassonomiche sul genere *Thapsia* L. (Apiaceae). *Informatote Botanico Italiano*. 2008. 40(Suppl. 3):41-48.
- Bruno M, Ilardi V, Lupidi G, Quassinti L, Bramucci M, Fiorini D, Venditti A, Maggi F. The nonvolatile and volatile metabolites of *Prangos ferulacea* and their biological properties. *Planta Med*. 2019. 85(11-12):815–824.
- Brusotti G, Ibrahim MF, Dentamaro A, Gilardoni G, Tosi S, Grisoli P, Dacarro C, Guglielminetti ML, Hussain FH, Caccialanza G, Vidari G. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile fractions from leaves and flowers of the wild Iraqi Kurdish plant *Prangos peucedanifolia* FENZL. *Chem Biodivers*. 2013. 10(2):274-80.
- Bulatovic VM, Savikin-Fodulovic KP, Zdunic GM, Popovic MP. Essential oil of *Seseli peucedanoides* (MB) Kos. *Pol. J Ess Oil Res*. 2006. 18(3):286–287.
- Butler MS, Buss AD. Natural products--the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol*. 2006. 71(7):919-29.
- Butler MS, Robertson AAB, Cooper MA. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep*. 2014. 31:1612-1661.
- Calixto JB. The role of natural products in modern drug discovery. *An Acad Bras Ciênc*. 2019.91:e20190105.

Camara AKS, Zhou Y, Wen PC, Tajkhorshid E, Kwok WM. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Front Physiol.* 2017. 8:460.

Camarda L, Di Stefano V, Lentini F, Mazzola P. Coumarins from the fruits of *Magydaris pastinacea*. *Fitoterapia.* 1996. 67:282.

Casiglia S, Riccobono L, Bruno M, Rosselli S, Senatore F, Senatore F. Chemical composition of the essential oil from *Thapsia garganica* L. (Apiaceae) grown wild in Sicily and its antimicrobial activity. *Nat Prod Res.* 2016. 30:1042-1052.

Castagliuolo G, Di Napoli M, Vaglica A, Badalamenti N, Antonini D, Varcamonti M, Bruno M, Zanfardino A, Bazan G. *Thymus Richardii* Subsp. *nitidus* (Guss.) Jals Essential Oil: An Ally against Oral Pathogens and Mouth Health. *Molecules.* 2023. 28:4803.

Castelli MV, Lopez SN. Chapter 9 - Homoisoflavonoids: Occurrence, Biosynthesis, and Biological Activity. *Stud Nat Prod Chem.* 2017. 54:315-354.

Cerri R, Dessi G, Manconi PM, Serra D, Pau A. Glycosides of the *Magydaris pastinacea* L. *Pharm Res Commun.* 1988. 20:109-112.

Cerri R, Pintore G, Dessi G, Asproni B, Piseddu G, Sini S. Isolation, characterization and pharmacological activity of *Magydaris pastinacea* glucosides. *Farmaco.* 1995. 50:841–848.

Chase MW, Reveal JL, Fay MF. A subfamilial classification for the expanded Asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Bot J Linn Soc.* 2009. 161:132-136.

Chemotherapy Side Effects. American Cancer Soc. Available online: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/chemotherapy-side-effects.html> (accessed on 1 August 2024).

Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. The Family of Terpene Synthases in Plants: A Mid-Size Family of Genes for Specialized Metabolism That Is Highly Diversified throughout the Kingdom. *Plant J Cell Mol Biol.* 2011. 66(1):212–229.

Chen J, Xu XJ, Fang YH, Li S, Zhang YL. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from the aerial parts of *Torilis japonica*. J Essent Oil-Bear Plants. 2013. 16:499-505.

Chen P, Yang J. Flavonol Galactoside Caffeiate Ester and Homoisoflavones from *Caesalpinia millettii* HOOK. et ARN. Chem Pharm Bull. 2007. 55:655-657.

Chen SL, Yu H, Luo HM, Wu Q, Li CF, Steinmetz A. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. Chin Med. 2016. 11:37.

Chen W, Wang G, Mei K, Zhu J. Coumarins from *Angelica dahurica* and their antitumor activities in human MG-63 osteosarcoma cells. Rec Nat Prod. 2021. 15:356-362.

Chen YL, Lee CY, Huang KH, Kuan YH, Chen M. Prescription patterns of Chinese herbal products for patients with sleep disorder and major depressive disorder in Taiwan. J Ethnopharmacol. 2015. 171:307-16.

Cheng MJ, Lo WL, Huang JC, Yeh YT, Hong ZL, Lu YC, Chang MS, Chen CY. Isolation of a new monoterpenic ester from the leaves of *Michelia compressa* (Maxim.) Sargent var. *formosana* Kanehira (Magnoliaceae). Nat Prod Res. 2010. 24(7):682-686.

Chibani S, Al-Dabbas M, Abuhamdah S, Aburjai T, Bencheraiet R, Kabouche A, Jay M, Kabouche Z. Flavonoids and antioxidant activity of *Thapsia garganica* from Algeria. Chem Nat Comp. 2014. 50:357-359.

Chizzola R, Novak J, Franz C. Fruit of *Laserpitium siler* grown in France. J Essen Oil Res. 1999. 11:197-198.

Chizzola R. Composition of the essential oil from *Laserpitium gallicum* grown in the wild in Southern France. Pharm Biol. 2007. 45:182-184.

Chizzola R. Essential oil composition of wild growing Apiaceae from Europe and the Mediterranean. Nat Prod Commun. 2010. 5:1477-1492.

Compton, J. *Eucomis* L'Heritier. The Plantsman. 1990. 12(3):128-139.

Corsaro MM, Lanzetta R, Mancino A, Parrilli M. Homoisoflavanones from *Chionodoxa luciliae*. *Phytochem.* 1992. 31:1395-1397.

Coruh N, Celep AS, Ozgokce F. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* L., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food Chem.* 2007. 100(3):1237–1242.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. Determining the antimicrobial actions of Tea Tree oil. *Molecules.* 2001. 6(12):87–91.

Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2013.1830(6):3670-95.

Croteau RB, Davis EM, Ringer KL, Wildung MR. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften.* 2005. 92(12):562-77.

D'Agostino G, Giambra B, Palla F, Bruno M, Badalamenti N. The application of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. and *Crithmum maritimum* L. as biocidal on two Tholu Bommalu Indian leather puppets. *Plants.* 2021.10:1508.

da Silva RPF, Rocha-Santos TAP, Duarte AC. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC.* 2016. 76:40-51.

Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour Heterogeneity and Resistance to Cancer Therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017. 15:81-94.

Das V, Kaishap PP, Duarah G, Chikkaputtaiah C, Deka Boruah HP, Pal M. Cytotoxic and apoptosis-inducing effects of novel 8-amido isocoumarin derivatives against breast cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2021. 394(7):1437–1449.

Dashtianeh M, Vatanara A, Fatemi S, Sefidkon F. Optimization of supercritical extraction of *Pimpinella affinis* Ledeb. using response surface methodology. *J CO2 Util.* 2013. 3-4:1-6.

- Dastan D, Salehi P, Maroofi H. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities on *Laserpitium carduchorum* Hedge & Lamond essential oil and extracts during various growing stages. *Chem Biodivers*. 2016. 13:1397-1403.
- De Oliveira AC, Simões RC, Lima CA, da Silva F, Nunomura SM, Roque RA, Tadei WP, Nunomura R. Essential oil of *Piper purusatum* C. DC (Piperaceae) and its main sesquiterpenes: Biodefensives against malaria and dengue vectors, without lethal effect on non-target aquatic fauna. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022. 29:47242-47253.
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. 2009. 70(15-16):1621-37.
- Delazar A, Nazemiyeh H, Afshar J, Syiyedi G. Identification of a new homoisoflavanone from *Bellevalia longistyla*. *Ulum-i Daroei (Tabriz, Islamic Republic of Iran)*. 33-38. 2002.
- Dewick PM. Biosynthesis of the 3-benzylchroman-4-one eucomin. *J Chem Soc Chem Commun*. 1973. 13(13):438-439.
- Dewick PM. Biosynthesis of the 3-benzylchroman-4-one eucomin in *Eucomis bicolor*. *Phytochemistry*. 1975. 14(4):983-988.
- Di Napoli M, Badalamenti N, Castagliuolo G, Merra R, Varcamonti M, Zanfardino A, Bruno M, Sottile F. Chemical Composition, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of *Opuntia Stricta* (Haw.) Haw. Mucilage Collected in Sicily, Italy. *Nat Prod Res*. 2023. 1:1-9.
- Dixon RA. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol*. 2004. 55:225-61.
- Dokovic DD, Bulatovic VM, Bozic BD, Kataranovski MV, Zrakic TM, Kovacevic NN. 3,5-Nonadiyne isolated from the rhizome of *Cachrys ferulacea* inhibits endogenous nitric oxide release by rat peritoneal macrophages. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2004. 52(7):853-854.
- Drew DP, Krichau N, Reichwald K, Simonsen HT. Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem Rev*. 2009. 8:581-599.

Drew DP, Rasmussen SK, Avato P, Simonsen HT. A Comparison of headspace solid-phase microextraction and Classic hydrodistillation for the identification of volatile constituents from *Thapsia* spp. provides insights into guaianolide biosynthesis in Apiaceae. *Phytochem Anal.* 2012. 23:44-51.

Du Toit K, Elgorashi E, Malan SF, Drewes SE, van Staden J, Crouch NR, Mulholland DA. Anti-inflammatory activity and QSAR studies of compounds isolated from Hyacinthaceae species and *Tachiadenus longiflorus* Griseb. (Gentianaceae). *J Bioorg Med Chem.* 2005. 13, 2561–2568.

Du Toit K, Elgorashi EE, Malan SF, Mulholland DA, Drewes SE, Van Staden J. Antibacterial activity and QSAR of homoisoflavanones isolated from six Hyacinthaceae species. *Afr J Bot.* 2007. 73:236–241.

Du Toit K, Drewes SE, Bodenstein J. The chemical structures, plant origins, ethnobotany and biological activities of homoisoflavanones. *Nat Prod Res.* 2010. 24(5):457-490.

Durbin RD. *Toxins in Plant Disease*, Academic Press, New York. 1981

Ebadollahi A. Plant essential oils from Apiaceae family as alternatives to conventional insecticides. *Ecologia Balkanica.* 2013. 5:149-172.

Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. 2014. *Front Pharmacol.* 4:177.

El-Elimat T, Rivera-Chavez J, Burdette JE, Czarnecki A, Alhawarri MB, Al-Gharaibeh M, Alali F, Oberlies NH. Cytotoxic homoisoflavonoids from the bulbs of *Bellevalia flexuosa*. *Fitoterapia.* 2018. 127:201-206.

El-Osta H, Circu ML. Mitochondrial ROS and Apoptosis. In: Buhlman LM, editor. *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease*. Cham: Springer International Publishing. p. 1-23. 2016.

El-Seedi HR, Burman R, Mansour A, Turki Z, Boulos L, Gullbo J, Göransson U. The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of

an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*. J Ethnopharmacol. 2013. 145(3):746-57.

ElNaker NA, Daou M, Ochsenkühn MA, Amin SA, Yousef AF, Yousef LF. A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the chemical composition of plant extracts. Sci Rep. 2021. 11(1):22679.

Ertan Anli R, Bayram M. Traditional aniseed-flavoured spirit drinks. Food Rev Int. 2010. 26:246–269.

Euro+Med Plantbase. <https://www.emplantbase.org/home.html>. Accessed on: 27 March 2024.

Evergetis E, Michaelakis A, Kioulos E, Koliopoulos G, Haroutounian SA. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from six Apiaceae family taxa against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. Parasitol Res. 2009. 105:117–124.

Evergetis E, Michaelakis A, Haroutounian SA. Essential oils of Umbelliferae (Apiaceae) family taxa as emerging potent agents for mosquito control, in: Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics. Publisher: InTech Publisher Editors: Marcelo L. Larramendy, Sonia Soloneski, Rijeka, Croatia. 2012.

Evergetis E, Haroutounian SA. Exploitation of Apiaceae family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals. Ind Crop Prod. 2014. 54:70-77.

Evergetis E, Koulocheri SD, Haroutounian SA. Exploitation of Apiaceae Family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals: Part II. Ind. Crops Prod. 2015. 64:59-67.

Evidente A, Kornienko A, Lefranc F, Cimmino A, Dasari R, Evidente M, Mathieu V, Kiss R. Sesterterpenoids with Anticancer Activity. Curr Med Chem. 2015. 22(30):3502-22.

Ezzat SM, Abdallah HM, Fawzy GA, El-Maraghy SA. Hepatoprotective constituents of *Torilis radiata* Moench (Apiaceae). Nat Prod Res. 2012. 26:282-285.

Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci.* 2012. 3:222.

Farkas L, Gottsegen A, Nogradi M, Strelisky J. Synthesis of homoisoflavanones—II: Constituents of *Eucomis autumnalis* and *E. punctata*. *Tetrahedron.* 1971. 27:5049-5054.

Figueiredo A, Hugueney P, Durazzo A. Recent Advances in Plant Metabolomics: From Metabolic Pathways to Health Impact. *Biology (Basel).* 2022. 11(2):238.

Finckh RE, Tamm C. The homo-isoflavones III. isolation and structure of punctatin, 3,9-dihydro-punctatin, 4'-O-methyl-3,9-dihydro-punctatin, 4'-demethyl-eucomin and 4'-demethyl-5-O-methyl-3,9-dihydro-eucomin. *Experientia.* 1970. 26:472–473.

Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer Heterogeneity: Implications for Targeted Therapeutics. *Br J Cancer.* 2013. 108:479.

Flindt ML. Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. *Lancet.* 1969. 1:1177-1181.

Forbes WM, Gallimore WA, Mansingh A, Reese PB, Robinson RD. Eryngial (*trans*-2-dodecenal), a bioactive compound from *Eryngium foetidum*: its identification, chemical isolation, characterization and comparison with ivermectin in vitro. *Parasitology.* 2013. 141:269-278.

Fujita SI. Miscellaneous contributions to the essential oils of plants from various territories. LI. On the component of essential oils of *Torilis japonica* (Houtt. DC). *Yakugaku Zasshi.* 1990. 110:771-775.

Gao L, Gou N, Amakye WK, Wu J, Ren J. Bioactivity guided isolation and identification of phenolic compounds from *Citrus aurantium* L. with anti-colorectal cancer cells activity by UHPLC-Q-TOF/MS. *Curr Res Food Sci.* 2022. 5:2251-2260.

Generalić Mekinić I, Blažević I, Mudnić I, Burčul F, Grga M, Skroza D, Jerčić I, Ljubenković I, Boban M, Miloš M, Katalinić, V. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical

profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *J Food Sci Technol.* 2016. 53:3104-3112.

Gerstner J. A preliminary check list of Zulu names of plants. *Bantu Studies.* pp. 131–149. 1939.

Giao MS, Pereira CI, Fonseca SC, Pintado ME, Malcata FX. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chem.* 2009. 117(3):412-416.

Glass A. Untersuchungen iiber die atherischen ale in Kraut und Friichten verschiedmer Apiinae (Apiaceae) Thesis Hamburg. 1975.

Gokce A, Stelinski LL, Isaacs R, Whalon ME. Behavioural and electrophysiological responses of grape berry moth (Lep., Tortricidae) to selected plant extracts. *J Appl Entomol.* 2006. 130:509–514.

Goldblatt P, Manning JC. A review of chromosome cytology in Hyacinthaceae subfamily Ornithogaloideae (*Albuca*, *Dipcadi*, *Ornithogalum* and *Pseudogaltonia*) in sub-Saharan Africa. *South Afr J Botany.* 2011. 77(3): 581-591.

Gollahon LS, Jeong Y, Finckbone V, Lee K, Park JS. The Natural Product NI-07 Is Effective Against Breast Cancer Cells While Showing No Cytotoxicity to Normal Cells. *Open Breast Cancer J.* 2011. 3:31-44.

Gonçalves MJ, Cruz MT, Tavares AC, Cavaleiro C, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro L. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Ind Crop Prod.* 2012. 35:166-171.

Greive M. A Modern Herbal. <http://botanical.com/botanical/mgmh/mgmh.html>. 1996.

Gruenberg-Fertig I, Heyn CC, Herrnstadt I. Typification of *Cachrys libanotis* L. (Umbellif). *Taxon.* 1973. 22(4):425-434.

Grzywacz D, Stevenson PC, Mushobozi WL, Belmain S, Wilson K. The use of indigenous ecological resources for pest control in Africa. *Food Sec.* 2014. 6:71-86.

Guella G, Öztunç A, Mancini I, Pietra F. Stereochemical features of sesquiterpene metabolites as a distinctive trait of red seaweeds in the genus *Laurencia*. *Tetrahedron Lett.* 1997. 38:8261-4.

Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, Abdel-Salam EM, Qahtan AA, Alatar AA, Cantini C, Cai G, Hausman JF, Siddiqui KS, Hernández-Sotomayor SMT, Faisal M. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes (Basel)*. 2018. 9(6):309.

Gülçin I, Oktay M, Kireççi E, Kufrevioglu OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.* 2003. 83:371-382.

Güvenalp Z, Özbek H, Yerdelen KÖ, Yılmaz G, Kazaz C, Demirezer LÖ. Cholinesterase inhibition and molecular docking studies of sesquiterpene coumarin ethers from *Heptaptera cilicica*. *Rec Nat Prod.* 2017. 11:462-467.

Güzel Y, Aktoklu E, Roumy V, Alkhatib R, Hennebelle T, Bailleul F, Åžahpaz S. Chemotaxonomy and flavonoid profiling of *Torilis* species by HPLC/ESI/MS². *Biochem System Ecol.* 2011. 39:781-786.

Habibi Z, Masoudi S, Rustaiyan A. Chemical composition of the essential oil of *Seseli tortuosum* L. ssp. *kiabii* Akhani. from Iran. *J Ess Oil Res.* 2003. 15(6):412–413.

Hachem K, Mébarki M, Hartani A, Benabdesslem Y, Kaid-Harche M. Essential oil composition of the root bark of *Thapsia garganica* (L.) growing in Northwestern Algeria. *J Essent Oil-Bear Plants.* 2017. 20:860-863.

Hadj-Said D, Bouazza B. Medicinal plants used for the treatment of respiratory diseases in Kabylia, north of Algeria: an ethnomedicinal survey. *J Herb Med.* 2023. 40:100685.

Hadjichambis ACH, Paraskeva-Hadjichambi D, Della A, Giusti ME, De Pasquale C, Lenzarini C, Censorii E, Gonzales-Tejero MR, Sanchez-Rojas CP, Ramiro-Gutierrez JM,

Skoula M, Johnson C, Sarpaki A, Hmamouchi M, Jorhi S, El-Demerdash M, El-Zayat M, Pieroni A. Wild and semi-domesticated food plant consumption in seven circum-Mediterranean areas. *Int J Food Sci Nutr*. 2008. 59:383-414.

Halim AF, Saad HEA, Mashaly MM, Lahloub MF, Ahmed AF. Phytochemical study of the fruits of *Torilis arvensis* (Huds.) Link growing in Egypt. *Mans J Pharm Sci*. 1990. 6:26-37.

Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition <https://www.routledge.com/Handbook-of-Essential-Oils-Science-Technology-and-Applications-Second/Baser-Buchbauer/p/book/9781466590465> (accessed Jan 24, 2023).

Harborne JB. Comparative biochemistry of flavonoids-V.: Luteolin 5-glucoside and its occurrence in the Umbelliferae. *Phytochem*. 1967. 6:1569-1573.

Harborne JB, Turner BL. *Plant Chemosystematics*, Academic Press, London. 1984.

Harmatha J, Buděšínský M, Vokáč K, Kostecká P, Kmoníčková E, Zídek Z. Trilobolide and related sesquiterpene lactones from *Laser trilobum* possessing immunobiological properties. *Fitoterapia*. 2013. 89:157-166.

Hartvig P. *Laserpitium* L., In: *Mountain Flora of Greece 1*, ed. A. Strid, Cambridge University Press, Cambridge, England, pp.726-733. 1986.

Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*. 2015. 14(2):111-29.

Hashim S, Jan A, Marwat KB, Khan MA. Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi visnaga* (Apiaceae). *Pak J Bot*. 2014. 46(3):861-867.

Hassen I, M'Rabet Y, Belgacem C, Kesraoui O, Casabianca H, Hosni K. Chemodiversity of volatile oils in *Thapsia garganica* L. (Apiaceae). *Chem Biodiv*. 2015. 12:637-651.

Hayakawa S, Ohishi T, Miyoshi N, Oishi Y, Nakamura Y, Isemura M. Anti-Cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3- Gallate and Coffee Chlorogenic Acid. *Molecules*. 2020. 25:4553.

Hayet EK, Hocine L, Meriem EK. Chemical composition and biological activities of the essential oils and the methanolic extracts of *Bunium incrassatum* and *Bunium alpinum* from Algeria. *J Chilean Chem Soc.* 2017. 62:3335-3341.

Hazrati S, Mousavi Z, Nicola S. Harvest time optimization for medicinal and aromatic plant secondary metabolites. *Plant Physiol Biochem.* 2024. 212:108735.

He D, Ma R, Li Y, Yang X, Wang L. Chemical Constituents of the Twigs of *Caesalpinia mimosoides*. *Chem NatCompd.* 2017. 53:545-547.

Hegi G. *Laserpitium* L. In: *Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Band V (2)*, Beger H. (Ed). A. Pichler's Witwe & Sohn, Wien, Austria, 1472-1501. 1906.

Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol.* 2001. 53(4):425-32.

Heinrich M, Bremner P. Ethnobotany and ethnopharmacy--their role for anti-cancer drug development. *Curr Drug Targets.* 2006. 7(3):239-45.

Heinrich M, Edwards S, Moerman DE, Leonti M. Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J Ethnopharmacol.* 2009. 124(1):1-17.

Helander IM, Alakomi H, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J Agric Food Chem.* 1998. 6:3590-3595.

Heller W, Andermatt P, Schaad WA, Tamm C. Homoisoflavanone. IV. Neue Inhaltsstoffe der Eucomin-Reihe von *Eucomis bicolor*. *Helv Chim Acta.* 1976. 59(6):2048-2058.

Heller W, Tamm C. 5,7-Dihydroxy-8-methoxy-chroman-4-on aus dem Zwiebelwachs von *Eucomis comosa*. *Helv Chim Acta.* 1978. 61:1257-1261.

Heller W, Tamm C. Homoisoflavanones and biogenetically related compounds. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 1981. 4:105–152.

Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O, Tritsch D, Kagan IA, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M, Bach TJ. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem.* 2003. 278(29):26666-76.

Heywood VH. *The Biology and Chemistry of the Apiaceae*, Linnean Society of London, London. p. 232. 1971.

Horgan R. Modern methods for plant hormone analysis. *Prog Phytochem.* 1981. 7:137-70.

Hostettmann K, Marston A. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochem Rev.* 2002. 1:275-285.

Hu CQ, Chang JJ, Lee KH. Antitumor agents, 115. Seselidiol, a new cytotoxic polyacetylene from *Seseli mairei*. *J Nat Prod.* 1990. 53(4):932–935.

Hussain SS, Kumar AP, Ghosh R. Food-Based Natural Products for Cancer Management: Is the Whole Greater than the Sum of the Parts? *Semin Cancer Biol.* 2016. 40:233-246.

Hutchings A, Scott AH, Lewis G, Cunningham A. *Zulu Medicinal Plants. An Inventory.* University of Natal Press, Pietermaritzburg. 1996.

Ikram A, Zahra NB, Shinwari ZK, Qaiser M. Ethnomedicinal review of folklore medicinal plants belonging to family Apiaceae of Pakistan. *Pak J Bot.* 2015. 47:1007-1014.

Ilardi V, Badalamenti N, Vaglica A, Maggio A, Bruno M. The chemical composition of the aerial parts essential oil of *Ferulago nodosa* (L.) Boiss. (Apiaceae) growing wild in Crete (Greece). *Nat Prod Res.* 2023. 10.

Ilic MD, Jovanovic VPS, Mitic VD, Jovanovic OP, Mihajilov-Krstev TM, Markovic MS, Chun J, Tosun A, Kim YS. Anti-inflammatory effect of corymbocoumarin from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* through suppression of NF- κ B signaling pathway and

induction of HO-1 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol.* 2016. 31:207–215.

Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblast within the Tumor Microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016. 99:186-196.

Itokawa H, Matsumoto H, Mihashi S, Iitaka Y, Kasuya A, Ita A. Constituents of *Torilis scabra* D.C. II. *Chem Pharm Bull.* 1985. 33:2204-2212.

Jahansooz F, Sefidkon F, Najafi, A., Ebrahimzadeh H, Najafi MS. Comparison of essential oils of *Bunium persicum* (Boiss.) populations grown in Iran, Pakistan and India. *J Essent Oil-Bear Plants.* 2012. 15:761-765.

Janačković P, Sokovic M, Vujisic L, Vajs V, Vuckovic I, Krivosej Z, Marin P. Composition and antimicrobial activity of *Seseli globiferum* essential oil. *Nat Prod Commun.* 2011. 6(8):1163–1166.

Janačković P, Gavrilović M, Savić J, Marin PD, Dajić Stevanović Z. Traditional knowledge on plant use from Negotin Krajina (Eastern Serbia): an ethnobotanical study. *Indian J Tradit Knowl.* 2019. 18:25-33.

Jassbi AR, Mehrdad M, Soleimani M, Mirzaeian M, Sonboli A. Chemical composition of the essential oils of *Bunium elegans* and *Bunium caroides*. *Chem Nat Compd.* 2005. 41:415–417.

Jerkovic I, Gaso-Sokac D, Pavlovic H, Marijanovic Z, Gugic M, Petrovic I, Kovac S. Volatile organic compounds from *Centaureum erythraea* Rafn (Croatia) and the antimicrobial potential of its essential oil. *Molecules.* 2012. 17(2):2058–2072.

Joppa LN, Roberts DL, Myers N, Pimm SL. Biodiversity hotspots house most undiscovered plant species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. 108(32):13171-6.

Jury SL. *Gen. Prangos Lindl. Flora Iberica.* Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC. 10:153–155. 2003.

Kamal FZ, Stanciu GD, Lefter R, Cotea VV, Niculaua M, Ababei DC, Ciobica A, Ech-Chahad A. Chemical composition and antioxidant activity of *Ammi visnaga* L. essential oil. *Antioxidants*. 2022. 11(2):347.

Kapetanios C, Karioti A, Bojović S, Marin P, Veljić M, Skaltsa H. Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioideae taxa (Apiaceae) from central Balkan. *Chem Biodivers*. 2008. 5:101-119.

Karakaya S, Göger G, Bostanlik FD, Demirci B, Duman H, Kiliç CS. Comparison of the essential oils of *Ferula orientalis* L., *Ferulago sandrasica* Peşmen and Quézel, and *Hippomarathrum microcarpum* Petrov and their antimicrobial activity. *Turk J Pharm Sci*. 2019. 16(1):69-75.

Karakoc OC, Gokce A. Bitki ekstraktlarının *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)'e olan kontak toksisiteleri. *Türk entomol derg*. 2012. 36:423-431.

Kaya A, Demirci B, Baser KHC. The essential oil of *Seseli tortuosum* L. growing in Turkey. *Flavour Fragr J*. 2003. 18(2):159–161.

Kaya A, Demirci B, Baser KHC. Composition of the essential oil of *Seseli campestre* Besser. Growing in the Northwest Anatolia. *Turk J Pharm Sci*. 2010. 7:161–166.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011. 48:412–422.

Keddad A, Baaliouamer A, Hazzit M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from umbels of Algerian *Ammi visnaga* (L.). *J Essent Oil-Bear Plants*. 2016. 19(5):1243–1250.

Khadhri A, El Mokni R, Mguis K, Ouerfelli I, Araujo M. Variability of two essential oils of *Ammi visnaga* (L.) Lam. a traditional Tunisian medicinal plant. *J Med Plants Res*. 2011. 5:5079–5082.

Khalfallah A, Labeled A, Semra Z, Al Kaki B, Kabouche R. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria. *Int J Med Arom Plants*. 2011. 193:302–305.

Khalil N, Bishr M, Desouky S, Salama O. *Ammi Visnaga* L., a Potential Medicinal Plant: A Review. *Molecules*. 2020. 25(2):301.

Khalilzadeh MA, Tajbakhsh M, Gholami FA, Hosaseinzadeh M, Dastoorani P, Norouzi M, Dabiri HA. Composition of the essential oils of *Hippomarathrum microcarpum* (M. Bieb.) B. Fedtsch. and *Physospermum cornubiense* (L.) DC. from Iran. *J Essent Oil Res*. 2007. 19(6):567-568.

Khanavi M, Laghaei P, Isman MB. Essential oil composition of three native Persian plants and their inhibitory effects in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J Asia-Pac Entomol*. 2017. 20:1234-1240.

Khaoukha G, Ben Jemia M, Amira S, Laouer H, Bruno M, Scandolera E, Senatore F. Characterisation and antimicrobial activity of the volatile components of the flowers of *Magydaris tomentosa* (Desf.) DC. collected in Sicily and Algeria. *Nat Prod Res*. 2014. 28(15):1152-1158.

Kharkwal GC, Pande C, Tewari G, Panwar A, Pande V. Terpenoid composition and antimicrobial activity of essential oil from *Torilis japonica* (Houtt.) DC. *J Ind Chem Soc*. 2017. 94:191-194.

Khemis E, Mustapha MB, Chaieb I, Ascrizzi R, Flamini G, Harrath AH, Jannet HB, Zardi-Bergaoui A. Chemical composition and insecticidal activity against *Tribolium castaneum* of *Thapsia garganica* L. seed essential oil. *Chem Biodiv*. 2023. 20:e202200646.

Khest MA, Jafari H, Alizadeh K. The Impact of Cultivation of Medicinal Plants on the Economic Income of Rural Settlements Case study of Kalat city villages. *Propósitos y Representaciones*. 2021. 10:20511.

Khoury M, El Beyrouthy M, Eparvier V, Ouaini N, Stien D. Chemical diversity and antimicrobial activity of the essential oils of four Apiaceae species growing wild in Lebanon. *J Essent Oil Res.* 2018. 30(1):25–31.

Kim DC, Kim JA, Min BS, Jang TS, Na M, Lee SH. Guaiane sesquiterpenoids isolated from the fruits of *Torilis japonica* and their cytotoxic activity. *Helv Chim Acta.* 2010. 93:692-697.

Kinghorn AD, Seo EK. Plants as Sources of Drugs. ACS Symposium Series, Vol. 647. Agricultural Materials as Renewable Resources, Chapter 12, pp. 179–193. 1996.

Kinghorn AD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Pezzuto JM, Udeani GO, Wani MC, Wall ME, Navarro HA, Kramer RA, Menendez AT, Fairchild Craig R, Lane KE, Forenza S, Vyas DM, Lam KS, Shu YZ. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. *Pure Appl Chem.* 1999. 71(9):1611-1618.

Kızıldaş H, Gören AC, Bingöl Z, Alwasel SH, Gülçin İ. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of *Ferula orientalis* L. Determination of its polyphenol contents by LC-HRMS. *Rec Nat Prod.* 2021. 15:513-528.

Kleiman R, Plattner RD, Weisleder D. Antigermination activity of phenylpropenoids from the genus *Pimpinella*. *J Nat Prod.* 1988. 51(2):249-256.

Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005. 4(3):206-20.

Kofinas C, Chinou L, Harvala A, Gally A. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tordylium apulum* L. *J Essent Oil Res.* 1993. 5:33-36.

Kofinas C, Chinou I, Loukis A, Harvala C, Roussakis C, Maillard M, Hostettmann K. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Med.* 1998a. 64:174-176.

Kofinas C, Chinou I, Loukis A, Harvala C, Maillard M, Hostettmann K. Flavonoids and bioactive coumarins from *Tordylium apulum*. *Phytochemistry.* 1998b. 48:637-641.

Kogure K, Yamauchi I, Tokumura A, Kondou K, Tanaka N, Takaishi Y, Fukuzawa K. Novel antioxidants isolated from plants of the genera *Ferula*, *Inula*, *Prangos* and *Rheum* collected in Uzbekistan. *Phytomedicine*. 2004. 11(7-8):645–651.

Koorbanally C. Extractives from the Hyacinthaceae. Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science. Department of Chemistry, University of Natal. 2000.

Koorbanally C, Crouch NR, Mulholland DA. The Phytochemistry and Ethnobotany of the southern African genus *Eucomis* (Hyacinthaceae: Hyacinthoideae) *Phytochemistry: Advances in Research*. pp 69-85. 2006.

Koorbanally NA, Crouch NR, Harilal A, Pillay B, Mulholland DA. Coincident isolation of a novel homoisoflavonoid from *Resnova humifusa* and *Eucomis montana* (Hyacinthoideae: Hyacinthaceae). *Biochem System Ecol*. 2006b. 34:114-118.

Kopka J, Fernie A, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biol*. 2004. 5(6):109.

Köroğlu A, Hürkul MM, Özbay O. Antioxidant Capacity and Total Phenol Contents of *Bifora radians* Bieb. *J Pharm Sci*. 2012. 37(3):123-127.

Kotan R, Kordali S, Cakir A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2007. 62:507-513.

Koutsaviti A, Georgiou C, Milenković M, Tzakou O. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from different parts of *Cachrys cristata* DC. from Greece. *Rec Nat Prod*. 2015. 9(3):436-440.

Kovacevic NN, Marcetic MD, Lakusic DV, Lakusic BS. Composition of the essential oils of different parts of *Seseli annuum* L. (Apiaceae). *J Essent Oil-Bear Plants*. 2016. 19(3):671–677.

Ksouda G, Sellimi S, Merlier F, Falcimaigne-Cordin A, Thomasset B, Nasri M, Hajji M. Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. *Food Chem.* 2019. 288:47-56.

Kubeczka KH. in: Baser KHC, Kirimer N. (Eds.), Proceedings of the 28th International Symposium on Essential Oils, Eskisehir, Turkey, 1-3 September. p. 35. 1997.

Kulišić-Bilušić T, Blažević I, Dejanović B, Miloš M, Pifat G. Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from caper (*Capparis spinosa*) and sea fennel (*Crithmum maritimum*) by different methods. *J Food Biochem.* 2010. 34:286-302.

Kumar K, Kumar SR, Dwivedi V, Rai A, Shukla AK, Shanker K, Nagegowda DA. Precursor feeding studies and molecular characterization of geraniol synthase establish the limiting role of geraniol in monoterpene indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaves. *Plant Sci.* 2015. 239:56-66.

Kupeli E, Tosun A, Yesilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Seseli* L. species (Apiaceae) growing in Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2006. 104(3):310–314.

Kürkçüoğlu M, Başer KHC, Tosun A, Duman T, Duran A. Essential oil composition of *Tordylium syriacum* L. (Umbelliferae) collected from different localities in Turkey. *J Essent Oil Res.* 2002. 14:353-354.

Kürkçüoğlu M, Tosun A, Duran A, Duman T, Başer KHC. Essential oil composition of *Tordylium elegans*. *Chem Nat Comp.* 2015. 51:980-981.

Kürkçüoğlu M, Tabanca N, Ali A, Khan I, Duran A, Baser KHC. Chemical composition of a new taxon, *Seseli gummiferum* subsp. *ilgazense*, and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Rec Nat Prod.* 2018. 12(2):184–189.

Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. Chimeric triterpene synthase. A possible model for multifunctional triterpene synthase. *J Am Chem Soc.* 1999. 121:1208-16.

Ladjel S, Zellagui A, Gherraf N. Reinvestigation of essential oil content of *Thapsia Garganica* grown in the east of Algeria. *J Fundam Appl Sci.* 2011- 3(2):165-168.

Lajis N, Maulidiani M, Abas F, Ismail IS. Metabolomics Approach in Pharmacognosy. *Pharmacognosy*. 2017. Chapter 30:597-616.

Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crop Res*. 2001. 71(1):9–15.

Larsen PK, Sandberg F. Constituents of Umbelliferous plants. XV. Coumarins from *Thapsia garganica* L. The structure of a new coumarin. *Acta Chem Scandinav*. 1970. 24:1113-14.

Latrasse A, Semon E, Le Quere J. Composition and Major Odorous Compounds of the Essential Oil of *Bifora radians*, an Aldehyde-Producing Weed. *HRC*. 1991. 14:549-553.

Lauricella M, D'Anneo A, Giuliano M, Calvaruso G, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. Induction of apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by the proteasome inhibitor MG132 and the protective effect of pRb. *Cell Death Diff*. 2003. 10:930.

Lauricella M, Carlisi D, Giuliano M, Calvaruso G, Cernigliaro C, Vento R, D'Anneo A. The analysis of estrogen receptor- α positive breast cancer stem-like cells unveils a high expression of the serpin proteinase inhibitor PI-9: Possible regulatory mechanisms. *Int J Oncol*. 2016. 49(1):352-60.

Lauricella M, Lo Galbo V, Cernigliaro C, Maggio A, Palumbo Piccionello A, Calvaruso G, Carlisi D, Emanuele S, Giuliano M, D'Anneo A. The Anti-Cancer Effect of *Mangifera indica* L. Peel Extract is Associated to γ H2AX-mediated Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Antioxidants*. 2019. 8:422.

Lauricella M, Maggio A, Badalamenti N, Bruno M, D'Angelo GD, D'Anneo A. Essential oil of *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* fruits exerts an anti-tumor effect in triple-negative breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2022. 26:243.

Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Antimycobacterial activity of *Laserpitium siler* L. roots. *Sci Pharm*. 2006. 74:94.

- Lee IK, Lee JH, Hwang EI, Yun BS. New guaiane sesquiterpenes from the fruits of *Torilis japonica*. Chem Pharm Bull. 2008. 56:1483-1485.
- Lee J, Gollahon L. Nek2-Targeted ASO or SiRNA Pretreatment Enhances Anticancer Drug Sensitivity in Triple-Negative Breast Cancer Cells. Int J Oncol. 2013. 42:839-847.
- Leurquin J. Étude du genre *Oenanthe* (Apiaceae) de la Belgique et des régions voisines: clés de détermination, données morphologiques, stationnelles et socio-écologiques. Lotissement Co-putienne. 2007. 10:26.
- Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. Cell Mol Neurobiol. 2015. 35:615-621.
- Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiol Biochem. 2020. 148:80-89.
- Liao Z, Zhou Z, Li Y, Zhang Y. Plant metabolism and synthetic biology. Synth Syst Biotechnol. 2023. 8(3):563-564.
- Lin L, Xie H, Wang Y, Ding J, Ye Y. Chemical Constituents from the Heartwood of *Haematoxylon campechianum* as Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. Chem. Biodiv. 2008. 11:776-783.
- Liu H, Olsen CE, Christensen SB. Tethered lipids from *Thapsia garganica*. J Nat Prod. 2004. 67:1439-1440.
- Liu H, Jensen KG, Tran LM, Chen M, Zhai L, Olsen CE, Sohoel H, Denmeade SR, Isaacs JT, Christensen SB. Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. Phytochemistry. 2006. 67:2651-2658.
- Liu ZL, Liu QR, Chu SS, Jiang GH. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oils of *Artemisia lavandulaefolia* and *Artemisia sieversiana* from China. Chem Biodivers. 2010. 7(8):2040-5.

Lo Galbo V, Lauricella M, Giuliano M, Emanuele S, Carlisi D, Calvaruso G, De Blasio A, Di Liberto D, D'Anneo A. Redox imbalance and mitochondrial release of apoptogenic factors at the forefront of the antitumor action of mango peel extract. *Molecules*. 2021. 26(14):4328.

Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Piccolo V, Statti GA, de Cindio B, Houghton PJ, Menichini F. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2008. 119(1):109–116.

Lojacono Pojero M. Flora Sicula, o descrizione delle piante vascolari spontanee o indigenate in Sicilia. 1907. II(2-3); 1-428, (3):464.

López SN, Sierra MG, Gattuso SJ, Furlán RL, Zacchino SA. An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (Polygonaceae). *Phytochemistry*. 2006. 67(19):2152-2158.

Łuczaj Ł, Fressel N, Perković S. Wild food plants used in the villages of the lake Vrana Nature Park (Northern Dalmatia, Croatia). *Acta Soc Bot Pol*. 2013. 82:275-281.

Lyskov DF, Degtjareva GV, Samigullin TH, Pimenov MG. The revision of *Prangos* subsections *Koelzella* and *Fedtschenkoana* (Apiaceae) with some notes to phylogeny and biogeography of the genus: molecular and morphological evidences. *Plant Syst Evol*. 2017. 303(7):815–826.

Ma B, Ma J, Li B, Tao Q, Gan J, Yan Z. Effects of different harvesting times and processing methods on the quality of cultivated *Fritillaria cirrhosa* D. Don. *Food Sci Nutr*. 2021. 9(6):2853-2861.

Maeda HA. Evolutionary Diversification of Primary Metabolism and Its Contribution to Plant Chemical Diversity. *Front Plant Sci*. 2019. 10:881.

Maggi F, Bartolucci F, Conti F. Chemical variability in volatile composition between several Italian accessions of *Siler montanum* (*S. montanum* subsp. *montanum* and *S. montanum* subsp. *siculum*). *Biochem Syst Ecol*. 2017. 70:14-21.

Maggio A, Bruno M, Spadaro V, Scialaba A, Senatore F, Oliviero F. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils from *Pimpinella tragiium* Vill. subsp. *glauca* (C. Presl.) C. Brullo & Brullo (Apiaceae) growing wild in Sicily. *Nat Prod Res.* 2013. 27:2338-2346.

Mander M. Marketing of Indigenous Medicinal Plants in South Africa: a Case Study in KwaZulu-Natal. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 1998.

Marcetic M, Bozic D, Milenkovic M, Lakusic B, Kovacevic N. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of different parts of *Seseli rigidum*. *Nat Prod Commun.* 2012. 7(8):1091–1094.

Maresca V, Badalamenti N, Ilardi V, Bruno M, Basile A. The antioxidant properties and protective capacity of *Prangos trifida* and *Cachrys cristata* essential oils against Cd stress in *Lunularia cruciata* and *Brassica napus*. *Antioxidants.* 2023. 12:793.

Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Maxia A. Isolation of *Seseli bocconi* Guss., subsp. *praecox* Gamisans (Apiaceae) volatile oil by supercritical carbon dioxide extraction. *Nat Prod Res.* 2006. 20(9):820–826.

Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Anal.* 2002. 13(1):51-4.

Masoudi S, Monfared A, Rustaiyan A, Chalabian F. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Semenovia dichotoma* (Boiss.) Manden., *Johreniopsis seseloides* (C. A.Mey) M.Pimen and *Bunium cylindricum* (Boiss. et Hohen.) Drude., three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *J Essent Oil Res.* 2005. 17:691-694.

Masoudi S, Esmaeili A, Ali khalilzadeh M, Rustaiyan A, Moazami N, Akhgar MR, Varavipoor M. Volatile constituents of *Dorema aucheri* Boiss., *Seseli libanotis* (L.) W. D. Koch var. *armeniacum* Bordz. and *Conium maculatum* L. three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Flavour Fragr J.* 2006. 21(5):801–804.

Masoudi S, Rustaiyan A, Mazloomifar H. Composition of the essential oils of *pimpinella anisactis* rech.f. and *pimpinella saxifraga* L. from Iran. J Essent Oil Res. 2009. 21:146-148.

Masoudi S, Fathollahi R, Taherkhani M, Valadkhani Z, Baradari T, Cheraghi M, Rustaiyan A. Volatile constituents of the aerial parts of *Torilis leptophylla* (L.) Reichenb., *Thecocarpus meifoliosus* Boiss., leaves of *Xanthogalum purpurascens* Ave. Lall. and flowers of *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude. four Umbelliferae herbs from Iran. J Essent Oil-Bear-Plants. 2012. 15:934-942.

Matejić JS, Džamić AM, Ristić MS, Randelović VN, Marin PD. Essential oil composition of *Cachrys cristata* - A rare and endangered species in the Flora of Serbia. Nat Prod Commun. 2012. 7(2):235-236.

Mathew VA. *Pimpinella* L., in: P.H. Davis (Ed.), Flora of Turkey and East Aegean Islands, vol. 4, Edinburgh University Press, Edinburgh. p. 352. 1972.

Maurya A, Dubey B. A Comprehensive Evaluation of Coumarin Derivatives and Associated Biological Activities. Int J Pharm Res Appl. 2024. 9(2):1552-1560.

Mazzoli A, Donadio G, Lanzilli M, Saggese A, Guarino AM, Rivetti M, Crescenzo R, Ricca E, Ferrandino I, Iossa S, Pollice A, Istickato R. *Bacillus megaterium* SF185 spores exert protective effects against oxidative stress in vivo and in vitro. Sci Rep. 2019. 9:12082.

McCartan SA. In vitro propagation of *Scilla natalensis* Planch. Submitted in fulfilment of the requirements for the degree in Doctor of Philosophy. Department of Botany, University of Natal. 1999.

Merfort I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. Curr Drug Targets. 2011. 12:1560-1573.

Miara MD, Bendif H, Rebbas K, Rabah B, Hammou MA, Maggi F. Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). J Herb Med. 2019. 16:100262.

Micevski K. *Laserpitium* L., In: Flora of Republic of Macedonia 1, ed, V. Matevski, Macedonian Academy of Arts and Sciences, Skopje, North Macedonia, pp.1647. 2005.

Mileski KS, Ćirić AD, Petrović JD, Ristić MS, Matevski VS, Marin PD, Džamić AM. *Laserpitium ochridanum*: antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities against *Pseudomonas aeruginosa*. J Appl Bot Food Qual. 2017. 90:330-338.

Milosavljević S, Bulatović V, Stefanović M. Sesquiterpene lactones from the Yugoslavian wild growing plant families Asteraceae and Apiaceae. J Serb Chem Soc. 1999. 64:397-442.

Milosavljevic S, Tesevic V, Vuckovic I, Jadranin M, Vajs V, Sokovic M, Janackovic P, Jovanovic A. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia. Fitoterapia. 2007. 78(4):319–322.

Mimaki Y, Nishino H, Ori K, Kuroda M, Matsui T, Sashida Y. Lanosterol oligosaccharides from the plants of the subfamily Scilloideae and their antitumor-promoter activity. Chem. Pharm. Bull. 1994. 42:327–332.

Mitić V, Stankov-Jovanović V, Đorđević A, Ilić M, Simonović S, Stojanović G. Chemical composition of the essential oil of *Laserpitium latifolium* from Serbia. Nat Prod Commun. 2015. 10:649-651.

Mneimne M, Baydoun S, Nemer N, Arnold A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from aerial parts of *Prangos asperula* Boiss. (Apiaceae) growing wild in Lebanon. Med Plant Res. 2016. 5:5–9.

Moghaddam M, Mehdizadeh L, Mirzaei Najafgholi H, Ghasemi Pirbalouti A. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. Int J Food Prop. 2018. 21(1):158–170.

Mohammadhosseini M, Frezza C, Venditti A, Sarker SD. A systematic review on phytochemistry, ethnobotany and biological activities of the genus *Bunium* L. Chem Biodiv. 2021. 18:e2100317.

Moodley N, Crouch NR, Mulholland DA, Slade D, Ferreira D. 3-Benzyl-4-chromanones (homoisoflavanones) from bulbs of the ethnomedicinal geophyte *Ledebouria revoluta* (Hyacinthaceae). *S Afr J Bot.* 2006. 72:517-520.

Mottaghipisheh J, Kiss T, Toth B, Csupor D. The *Prangos* genus: a comprehensive review on traditional use, phytochemistry, and pharmacological activities. *Phytochem Rev.* 2020. 19(6):1449–1470.

Moulder S, Hortobagyi GN. Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2008. 83:26-36.

Mubtasim N, Moustaid-Moussa N, Gollahon L. The Complex Biology of the Obesity-Induced, Metastasis-Promoting Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022. 23:2480.

Mulholland DA, Sianne LS, Crouch NR. The chemistry and biological activity of the Hyacinthaceae. *Nat Prod Rep.* 2013. 30:1165-1210.

Musolino V, Perri MR, Conforti F, Gliozzi M, Marrelli M, Mollace V. *Cachrys L.* genus: a comprehensive review on botany, phytochemistry and biological properties. *Plants.* 2023. 12:565.

Nagai M, Nagumo S, Lee SM, Eguchi I, Kawai KI. Protosappanin a a novel biphenyl compound from *sappan lignum*. *Chem Pharm Bull.* 1986. 34:1–6.

Najmi A, Javed SA, Al Bratty M, Alhazmi HA. Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. *Molecules.* 2022. 27(2):349.

Napolitano A, Di Napoli M, Castagliuolo G, Badalamenti N, Cicio A, Bruno M, Piacente S, Maresca V, Cianciullo P, Capasso L, Bontempo P, Varcamonti M, Zanfardino A. The chemical composition of the aerial parts of *Stachys spreitzenhoferi* (Lamiaceae) growing in Kythira Island (Greece), and their antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative properties. *Phytochem.* 2002. 203:113373.

Nasir A, Yabalak E. Investigation of antioxidant, antibacterial, antiviral, chemical composition, and traditional medicinal properties of the extracts and essential oils of the *Pimpinella* species from a broad perspective: a review. *J Essent Oil Res.* 2021. 33:411-426.

Nasreen N, Semmar N, Muhammad Farman M, Lacaille-Dubois MA, Saud Ahmed N. Phytochemical, geographical, and pharmacological retrospect of Genus *Torilis*. *Curr Topics Med Chem.* 2023. 23:2300-2331

Neelam, Khatkar A, Sharma KK. Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020. 60(16):2655-2675.

Nekkaa A, Benaissa A, Lalaouna AED, Mutelet F, Canabady-Rochelle L. Optimization of the extraction process of bioactive compounds from *Rhamnus alaternus* leaves using Box-Behnken experimental design. *J Appl Res Med Aromati Plants.* 2021. 25:100345.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016. 79(3):629-661.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. 2020. *J Nat Prod.* 83(3):770-803.

Nicolau KC, Vourloumis D, Winssinger N, Baran PS. The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century. *Angew Chem.* 2000. 39:44-122.

Nikolić V. *Laserpitium* L., In: Flora of Republic of Serbia 5, ed, M. Josifivić, Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia, pp.308-313. 1973.

Noel JP, Austin MB, Bomati EK. Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 2005. 8(3):249-53.

Notaro A, Lauricella M, Di Liberto D, Emanuele S, Giuliano M, Attanzio A, Tesoriere L, Carlisi D, Allegra M, De Blasio A, Calvaruso G, D'Anneo A. A Deadly Liaison between Oxidative Injury and p53 Drives Methyl-Gallate-Induced Autophagy and Apoptosis in HCT116 Colon Cancer Cells. *Antioxidants.* 2023. 12:1292.

Nurshalina CR, Bacho SA, Mustapa AN. Review on drying methods for herbal plants. *Mater Today*. 2022. 63:S122-S139.

Osanloo M, Sedaghat MM, Sanei-Dehkordi A, Amani A. Plant-derived essential oils; their larvicidal properties and potential application for control of mosquito-borne diseases. *Galen Med J*. 2019. 8:e1532.

Ozcelik B, Kusmenoglu S, Turkoz S, Abbasoglu U. Antimicrobial Activities of Plants from the Apicaceae. *Pharm Biol*. 2004. 42:526-528.

Ozdemir E, Alpınar K. The wild edible plants of western nigde aladaglar mountains (central turkey). *J Fac Pharm Istanbul*. 2010. 41:66-75.

Özer H, Sökmen M, Güllüce M, Adigüzel A, Çahin F, Sökmen A, Kiliç H, Bariş Ö. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) from Turkey. *J Agric Food Chem*. 2007. 55(3):937-942.

Ozkirim A, Keskin N, Kurkcuoglu M, Başer KHC. Evaluation of some essential oils as alternative antibiotics against American foulbrood agent *Paenibacillus larvae* on honey bees *Apis mellifera* L. *J Essent Oil Res*. 2012. 24:465-470.

Ozturk G, Demirci B, Celik M, Başer KHC. Chemical composition of *Bunium elegans* (Fenzl) Freyn var. *elegans* essential oil. *Nat Vol Essent Oils*. 2020. 7:26-29.

Ozturk S, Ercisli S. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Seseli libanotis*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006. 22(3):261–265.

Page M, Bejaoui N, Cinq-Mars B, Lemieux P. “Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity”. *Int J Immunopharmacol*. 1998. 10(7):785-93.

Palá-Paúl J, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Sanz J. Essential oil composition of the aerial parts of *Cachrys sicula* L. *Flav Fragr J*. 2002. 17(1):64-68.

Palá-Paül J, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Maqueda J, Sanz J. Volatile oil constituents from different parts of *Cachrys trifida* L. J Essent Oil Res. 2004;16(4):347-349.

Pan SY, Litscher G, Gao SH, Zhou SF, Yu ZL, Chen HQ, Zhang SF, Tang MK, Sun JN, Ko KM. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: The current renaissance and conservation of herbal resources. Evid Based Complement Alternat Med. 2014. 2014:525340.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016. 5:e47.

Parada M, Carriò E, Valles J. Ethnobotany of food plants in the Alt Emporadà region (Catalonia, Iberian Peninsula). J Appl Bot Food Quality. 2011. 84:11-25.

Park HW, Choi SU, Baek NL, Kim SH, Eun JS, Yang JH, Kim DK. Guaiane sesquiterpenoids from *Torilis japonica* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. Arch Pharm Res. 2006. 29:131-134.

Pasias IN, Ntakoulas DD, Raptopoulou K, Gardeli C, Proestos C. Chemical Composition of Essential Oils of Aromatic and Medicinal Herbs Cultivated in Greece—Benefits and Drawbacks. Foods. 2021. 10:2354.

Pattiram PD, Lasekan O, Tan CP, Zaidul ISM. Identification of the aroma-active constituents of the essential oils of water dropwort (*Oenanthe javanica*) and 'Kacip Fatimah' (*Labisia pumila*). Int Food Res J. 2011. 18(3):1021-1026.

Patwardhan B, Warude D, Pushpangadan P, Bhatt N. Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. Evid Based Complement Alternat Med. 2005. 2(4):465-73.

Pereira KC, Quintela ED, do Nascimento VA, da Silva DJ, Rocha DVM, Silva JFA, Arthurs SP, Forim MR, Silva FG, Casal CM. Characterization of *Zanthoxylum rhoifolium* (Sapindales: Rutaceae) Essential Oil Nanospheres and Insecticidal Effects to *Bemisia tabaci* (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). Plants (Basel). 2022. 11(9):1135.

Pericin C. Piante selvatiche commestibili dell'Istria. Sintesi, Pola, pp. 488-528. 2020.

Petrović S, Pavlović M, Popović V, Couladis M, Tzakou O, Milenković M, Vučićević D, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of essential oils from flower and leaf of *Laserpitium zernyi* Hayek. J Essent Oil Res. 2009. 21:467-470.

Petrovic GM, Stamenkovic JG, Jovanovic OP, Stojanovic GS. Chemical compositions of the essential oils and headspace volatiles of *Seseli peucedanoides* plant parts. Nat Prod Commun. 2019. 14(5):1-6.

Petruk G, Donadio G, Lanzilli M, Isticato R, Monti DM. Alternative use of *Bacillus subtilis* spores: protection against environmental oxidative stress in human normal keratinocytes. Sci Rep. 2018. 8:1745.

Pfossen M, Speta F. Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. Annals of Missouri Botanical Garden. pp 852-875. 1999.

Piatti D, Angeloni S, Maggi F, Caprioli G, Ricciutelli M, Arnoldi L, Bosisio S, Mombelli G, Drenaggi E, Sagratini G. Comprehensive characterization of phytochemicals in edible sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) grown in central Italy. J Food Compos Anal. 2023. 115:104884.

Pieroni A, Janiak V, Dürr CM, Lüdeke S, Trachsel E, Heinrich M. In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. Phytotherapy Res. 2002. 16:467-473.

Pietra F. Structurally similar natural products in phylogenetically distant marine organisms, and a comparison with terrestrial species. Chem Soc Rev. 1995. 24:65-71.

Pignatti S. Flora d'Italia. Vol. II. Bologna: Edagricole; p. 221. 1982.

Pignatti S, Guarino R, La Rosa M. Flora d'Italia, 2nd Edition. Edagricole di New Business Media,. Bologna pp. 547-548. 2018.

Pignatti S, Guarino R, La Rosa M. Flora d'Italia. Second ed. Edagricole Bologna, Italy New Business Media. 2019.

Pimenov MG, Tikhomirov VN. The taxonomic problems in the genera *Prangos* Lindl., *Cachrys* L., *Cryptodiscus* Schrenk and *Hippomarathrum* Hoffmanns. et Link (Umbelliferae – Apioideae). Feddes Repertorium. 1983. 94:145–164.

Pimm SL, Jenkins CN, Abell R, Brooks TM, Gittleman JL, Joppa LN, Raven PH, Roberts CM, Sexton JO. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. Science. 2014. 344(6187):1246752.

Pino JA, Fernandes P, Marbot R, Rosado A, Fontinha SS. Leaf oils of *Helichrysum melaleucum* Rchb. ex Holl., *Oenanthe divaricata* (R. Br.) Mabb., and *Persea indica* (L.) Spreng. from Madeira. Nat Prod Commun. 2004. 16(5):487-489.

Plants of World Online (POWO). <https://powo.science.kew.org/>. Accessed on: 5 Nov 2024.

Pohl T, Koorbanally C, Crouch NR, Mulholland DA. Secondary metabolites of *Scilla plumbea*, *Ledebouria cooperi* and *Ledebouria ovatifolia* (Hyacinthaceae). Biochem System Ecol. 2001. 29:857-860.

Polatoğlu K, Karakoç ÖC, Yücel Yücel Y, Gücel S, Demirci B, Başer KHC, Demirci F. Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against Coleopteran and Lepidopteran insects. Ind Crops Prod. 2016. 89:383-389.

Pooley E. A Field Guide to Wild Flowers of KwaZulu-Natal and the Eastern Region. Natal Flora Publications Trust, Durban. 2005.

Popović V, Heyerick A, Petrović S, Van Calenbergh S, Karalić I, Niketić M, Deforce D. Sesquiterpene lactones from the extracts of two Balkan endemic *Laserpitium* species and their cytotoxic activity. Phytochemistry. 2013. 87:102-11.

Popović V, Petrović S, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Micov A, Pavlović-Drobac M, Couladis M, Niketić M. Nat Prod Commun. 2014. 9:125.

Popović V, Stojković D, Nikolić M, Heyerick A, Petrović S, Soković M, Niketić M. Extracts of three *Laserpitium* L. species and their principal components laserpitine and sesquiterpene lactones inhibit microbial growth and biofilm formation by oral *Candida* isolates. *Food Funct.* 2015a. 6:1205-1211.

Popović V, Petrović S, Milenković MT, Drobac MM, Couladis M, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Laserpitium latifolium* L. and *L. ochridanum* Micevski (Apiaceae). *Chem Biodivers.* 2015b. 12:170-177.

Pratelli G, Carlisi D, D'Anneo A, Maggio A, Emanuele S, Palumbo Piccionello A, Giuliano M, De Blasio A, Calvaruso G, Lauricella M. Bio-waste products of *Mangifera indica* L. reduce adipogenesis and exert antioxidant effects on 3t3-11 cells. *Antioxidants (Basel).* 2022. 11(2):363.

Pretorius JC, Craven P, Van Der Watt E. In vivo control of *Mycosphaerella pinodes* on pea leaves by a crude bulb extract of *Eucomis autumnalis*. *Ann. Appl. Biol.* 2002. 141:125–131.
Dold AP, Cocks ML. The trade in medicinal plants in the Eastern Cape Province. *S Afr J Sci.* 2002. 98: 589–597.

Prusty JS, Kumar A. Coumarins: antifungal effectiveness and future therapeutic scope. *Mol Divers.* 2020. 24(4):1367-1383.

Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative Approaches for Cancer Treatment: Current Perspectives and New Challenges. *Ecancermedicalsecience.* 2019. 13:961.

Pujol J. *Nature Africa: the herbalist handbook.* Jean Pujol Natural Healers Foundation, Durban. 1990.

Putnam AR, Tang CS. *The Science of Allelopathy.* John Wiley & Sons. 1986.

Rahimpour Y, Doorandishan M, Dehsheikh AB, Sourestani MM, Mottaghipisheh J. A review on *Torilis japonica*: ethnomedicinal, phytochemical, and biological features. *Chem Biodiv.* 2023. 20:e202201071.

Rahmani B, Shiraz NJ, Masnabadi N, Masoudi S, Monfared A, Larijani K, Rustaiyan A. Volatile constituents of *alococarpum erianthum* (DC) H. Riedl & Kuber. *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. and *Pimpinella affinis* Ledeb. Three umbelliferae herbs growing wild in Iran. J Essent Oil Res. 2008. 20:232-235.

Rajasekar M, Bhuvanesh P, Varada P, Selvam M. Review on anticancer activity of flavonoid derivatives: Recent developments and future perspectives. Results Chem. 2023. 6:101059.

Ramadan M, Goeters S, B Watzer B, Krause E, Lohmann K, Bauer R, Hempel B, Imming P. Chamazulene carboxylic acid and matricin: a natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. J Nat Prod. 2006. 69:1041-1045.

Ranđelović V, Zlatković B, Jušković M, Živojinović L. Endangered species of flora of Mt. Suva planina, Proceeding of 6th Symposium on flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, Serbia, pp.303-322. 2000.

Ranfa A, Orlandi F, Maurizi A, Bodesmo M. Ethnobotanical knowledge and nutritional properties of two edible wild plants from Central Italy: *Tordylium apulum* L. and *Urospermum dalechampii* (L.) F.W. Schmid. J Appl Bot Food Qual. 2015. 88:249-254.

Rani R, Sharma S. Recent advances in medicinal applications of essential oil. Mater Today. 2022. 68:891-898.

Razavi SM, Nazemiyeh H, Zarrini G, Asna-Asharii S, Dehghan G. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl from Iran. Nat Prod Res. 2010. 24(6):530–533.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999. 26:1231–1237.

Renna, M. Reviewing the Prospects of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as Emerging Vegetable Crop. Plants. 2018. 7:92.

Rimpelová S, Jurášek M, Peterkov L, Bejček J, Spiwok V, Majdl M, Jirásko M, Buděšínský M, Harmatha J, Kmoníčková E, Drašar P, Ruml T. Archangelolide: a sesquiterpene lactone with immunobiological potential from *Laserpitium archangelica*. *Beilstein J Org Chem*. 2019. 15:1933-1944.

Rodriguez JP, Ashenfelter G, Rojas-Suárez F, García Fernández JJ, Suárez L, Dobson AP. Local data are vital to worldwide conservation. *Nature*. 2000. 403:241.

Rosselli S, Maggio AM, Bellone G, Formisano C, Basile A, Cicala C, Alfieri A, Mascolo N, Bruno M. Antibacterial and anticoagulant activities of coumarins isolated from the flowers of *Magydaris tomentosa*. *Planta Med*. 2006. 72:116–120.

Rossi PG, Berti L, Panighi J, Luciani A, Maury J, Muselli A, de Rocca Serra D, Gonny M, Bolla JM. Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *J Essent Oil Res*. 2007. 19:176-182.

Roy SK, Srivastava A, Jachak SM. Analysis of Homoisoflavonoids in *Caesalpinia digyna* by HPLC-ESI-MS, HPLC and Method Validation. *Nat Prod Comm*. 2012. 7:1189-1192.

Ruan JX, Li JX, Fang X, Wang LJ, Hu WL, Chen XY, Yang CQ. Isolation and Characterization of Three New Monoterpene Synthases from *Artemisia annua*. *Front Plant Sci*. 2016. 7:638.

Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*. 2000. 69:167-174.

Rufino AT, Ferreira I, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cavaleiro C, Mendes AF. Differential effects of the essential oils of *Lavandula luisieri* and *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* in cell models of two chronic inflammatory diseases. *Pharm Biol*. 2015. 53:1220-1230.

Saad HEA, Ahmed AF, Lahloub MF, Halim AF. Crocatone and coumarins from the roots of *Torilis arvensis*. *Mans J Pharm Sci*. 1995a. 11:35-42.

Saad HEA, El-Sharkawy SH, Halim AF. Composition of the essential oils of the leaves and stems of *Torilis arvensis*. *Pharm Acta Helv.* 1995b. 70:85-87.

Şahin S, Kurtulbaş E. Green Extraction and Valorization of By-Products from Food Processing. *Foods.* 2024.13(10):1589.

Samigullin TH, Logacheva MD, Degtjareva GV, Terentieva EI, Vallejo-Roman CM. Complete plastid genome of critically endangered plant *Prangos trifida* (Apiaceae: Apioideae). *Conserv Genet Resour.* 2018. 10(4):847–849.

Sampson BJ, Tabanca N, Kirimer N, Demirci B, Başer KHC, Khan IA, Spiers JM, Wedge DE. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Manag Sci.* 2005. 61:1122–1128.

Sari F, Velioglu YS. Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea. *J Food Compos Anal.* 2011. 24(8):1130-1135.

Sarker SD. Pharmacognosy in modern pharmacy curricula. *Pharmacogn Mag.* 2012. 8(30):91-2.

Sarker SD, Nahar L. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017. 106:241-304.

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011. 8(1):1-10.

Satrani B, Farah A, Fechtal M, Talbi M, Bouamrani ML. Chemical composition and antibacterial and antimycotic activities of the essential oil of *Ammi visnaga* (L.) Lam. from Morocco. *Acta Bot Gall.* 2004. 151(1):65–71.

Savikin-Fodulovic KP, Zdunic GM, Tasic SR. Essential Oil of *Seseli rigidum* Waldst. et Kit. var. *rigidum*. *J Essent Oil Res.* 2006. 18(2):156–157.

Savo V, Salomone F, Mattoni E, Tofani D, Caneva G. Traditional salads and soups with wild plants as a source of anti-oxidants: a comparative chemical analysis of five species growing in Central Italy. *Evid-based Compl Altern Med*. 2019. 2019:6782472.

Saxena RC, Dixit OP, Harshan V. Insecticidal action of *Lantana camara* against *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*. 1992. 28:279-281.

Sayed-Ahmad B, Talou T, Saad Z, Hijazi A, Merah O. The Apiaceae: ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Ind Crop Prod*. 2017. 109:661-671.

Schippmann U, Leaman DJ, Cunningham ABA. A Comparison of Cultivation and Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants Under Sustainability Aspects. *Med Arom Plants*. 2006. 17.

Schwikkard S, Whitmore H, Sishtla K, Sulaiman RS, Shetty T, Basavarajappa HD, Waller C, Alqahtani A, Frankemoelle L, Chapman A, Crouch N, Wetschnig W, Knirsch W, Andriantiana J, Mas-Claret E, Langat MK, Mulholland D, Corson TW. The Antiangiogenic Activity of Naturally Occurring and Synthetic Homoisoflavonoids from the Hyacinthaceae (*sensu* APGII). *J Nat Prod*. 2019. 82:1227-1239.

Sefidkon F, Shaabani A. Analysis of the oil of *Hippomarathrum microcarpum* (M. B.) B. Fedtsch. from Iran. *J Essent Oil Res*. 2003. 15(4):261-262.

Sefidkon F, Gooshegir SA, Bahmanzadegan A, Golipour M, Meshkizadeh S. Chemical composition of the essential oils of five Iranian *Bunium* species (*B. lurestanicum*, *B. microcarpum*, *B. badghayzi*, *B. wolffi* and *B. carioides*). *J Essent Oil-Bear Plants*. 2014. 17:13-17.

Seyyednejad SM, Motamedi H. A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties. *Int J Pharmacol*. 2010. 6:551-560.

Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, López-Jornet P, Lopez EP, Harun N, Yeskaliyeva B, Beyatli A, Sytar O, Shaheen S, Sharopov F, Taheri Y, Docea AO, Calina D, Cho WC. Natural

Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2021. 2021:6492346.

Shonte TT, Duodu KG, de Kock HL. Effect of drying methods on chemical composition and antioxidant activity of underutilized stinging nettle leaves. *Heliyon*. 2020. 6(5):e03938.

Shu S, Deng A, Li Z, Qin H. Two novel biphenyl dimers from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Fitoterapia*. 2011. 82:762–766.

Simon C, Lamla M. Merging pharmacopoeia: understanding the historical origins of incorporative pharmacopoeial processes among Xhosa healers in southern Africa. *J Ethnopharmacol*. 1991. 33:237–242.

Simonsen HT, Weitzel C, Christensen SB. Guaianolide sesquiterpenoids: pharmacology and biosynthesis. In: Ramawat KG, Merillon JM, editors. *Natural Products*. Springer-Verlag; p. 3069-3098. 2013.

Skalicka-Wozniak K, Los R, Glowniak K, Malm A. Comparison of hydrodistillation and headspace solid phase microextraction techniques for antibacterial volatile compounds from the fruits of *Seseli libanotis*. *Nat Prod Commun*. 2010. 5(9):1427–1430.

Slavkovska V, Zlatkovic B, Marcetic M, Kovacevic N, Drobac M. The anatomy and essential oil composition of the different organs of *Pimpinella tragioides* and *P. saxifraga* (Apiaceae). *Bot Serb*. 2022. 46:269-284.

Smítalová Z, Buděšínský M, Šaman D, Vašíčková S, Holub M. Components of the extract from the underground parts of *Laserpitium siler* L. of Slovenian origin, mainly sesquiterpenic lactones. *Collect Czech Chem Commun*. 1984. 49:852-870.

Smitt UW, Moldt P, Christensen SB. Structure of a pro-1,4-dimethylazulene guaianolide from *Thapsia garganica* L. *Acta Chem Scand B*. 1986. 40:711-714.

Smolarz B, Zadroz A, Nowak A, Romanowicz H. Breast Cancer Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*. 2022. 14:2569.

Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ. *Molecular Systematics of Plants*, Chapman and Hall, New York. 1992.

Song DH, Jo YH, Ahn JH, Kim SB, Yun CY, Kim Y, Hwang BY, Lee MK. Sesquiterpenes from fruits of *Torilis japonica* with inhibitory activity on melanin synthesis in B16 cells. *J Nat Med*. 2018. 72:155-160.

Soro KN, Sabri L, Amalich S, Khabbal Y, Zair T. Chemical composition of Moroccan *Ammi visnaga* L. (Lam.) and antibacterial activity of its essential oil against extended-spectrum beta- lactamase-producing and not producing bacteria. *Phytotherapie*. 2015. 13(3):168–175.

Stafford GI, Jäger AK, Van Staden J. Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular South African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. 2005. 97:107–115.

Stanković N, Mihajilov-Krstev T, Zlatković B, Stankov-Jovanović V, Mitić V, Jović J, Čomić L, Kocić B, Bernstein N. Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula. *NJAS-Wagen J Life Sci*. 2016. 78:21-28.

Staub P. Doctoral Thesis in Neurosciences. Herbal drugs in European tradition - A phylogenetic, chemosensory and neuropharmacological approach. University of Cagliari, Italy. 2017.

Stirbet A, Lazár D, Guo Y, Govindjee G. Photosynthesis: basics, history and modelling. *Ann Bot*. 2020. 126(4):511-537.

Stojanovic GS. Comparison of chemical composition and biological activities of *Seseli rigidum* fruit essential oils from Serbia. *Open Chem*. 2015. 13(1):42–51.

Stojkovic D, Glamoclija J, Sokovic M, Grubisic D, Petrovic S, Kukic J, Ristic M. Chemical composition, antimicrobial and antiradical properties of the essential oils of *Seseli globiferum* fruits. *Nat Prod Commun*. 2008. 3(11):1935–1938.

Sun P, Schuurink RC, Caissard JC, Huguency P, Baudino S. My Way: Noncanonical Biosynthesis Pathways for Plant Volatiles. *Trends Plant Sci*. 2016. 21(10):884-894.

Sundufu AJ, Shoushan H. Chemical composition of the essential oils of *Lantana camara* L. occurring in south China. *Flavour Fragr J.* 2004. 19:229-232.

Szymański P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int J Mol Sci.* 2012. 13(1):427-52.

Tabanca N, Bedir E, Kirimer N, Baser KH, Khan SI, Jacob MR, Khan IA. Antimicrobial compounds from *Pimpinella* species growing in Turkey. *Planta Med.* 2003. 69(10):933-8.

Tabanca N, Khan SI, Bedir E, Annavarapu S, Willett K, Khan IA, Kirimer N, Baser KH. Estrogenic activity of isolated compounds and essential oils of *Pimpinella* species from Turkey, evaluated using a recombinant yeast screen. *Planta Med.* 2004. 70(8):728-35.

Tabanca N, Bedir E, Ferreira D, Slade D, Wedge DE, Jacob MR, Khan SI, Kirimer N, Baser KH, Khan IA. Bioactive constituents from Turkish *Pimpinella* species. *Chem Biodivers.* 2005a. 2(2):221-32.

Tabanca N, Demirci B, Kirimer N, Baser KHC, Bedir E, Khan IA, Wedge DE. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella aurea*, *Pimpinella corymbosa*, *Pimpinella peregrina*, and *Pimpinella puberula* gathered from Eastern and Southern Turkey. *J Chromatogr A.* 2005b. 1097:192-198.

Tabanca N, Demirci B, Ozek T, Kirimer N, Baser KHC, Bedir E, Khan IA, Wedge DE. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *J Chromatogr A.* 2006. 1117:194-205.

Tabanca N, Tsikolia M, Ozek G, Ozek T, Ali A, Bernier UR, Duran A, Baser KHC, Khan IA. The identification of suberosin from *Prangos pabularia* essential oil and its mosquito activity against *Aedes aegypti*. *Rec Nat Prod.* 2016. 10:311–325.

Tabanca N, Wedge DE, Li X-C, Gao Z, Ozek T, Bernier UR, Epsky ND, Baser KHC, Ozek G. Biological evaluation, overpressured layer chromatography separation, and isolation of a new acetylenic derivative compound from *Prangos platychlaena* ssp. *platychlaena* fruit essential oils. *JPC J Planar Chromatogr TLC.* 2018. 31(1):61–71.

Tahar S, Hamdi B, Flamini G, Mehmet Ö, Duru ME, Bruno M, Maggi F. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of the essential oil of Algerian *Cachrys sicula* L. Nat Prod Res. 2022. 36(16):4094–4102.

Taïbi K, Abderrahim LA, Ferhat K, Betta S, Taïbi F, Bouraada F, Boussaid M. Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. Saudi Phar J. 2020. 28:1451-1465.

Taïbi K, Aït Abderrahim L, Boussaid M, Taïbi F, Achir M, Souana K, Benaïssa T, Farhi KH, Naamani FZ, Nait Said K. Unraveling the ethnopharmacological potential of medicinal plants used in Algerian traditional medicine for urinary diseases. Eur J Integr Med. 2021. 44:101339.

Tandan SK, Chandra S, Tripathi HC, Lal J. Pharmacological actions of seselin, a coumarin from *Seseli indicum* seeds. Fitoterapia. 1990. 61:360–363

Tang C, Zhu L, Chen Y, Qin R, Mei ZN, Xu J, Yang G. Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivative–chalcone conjugates as α -glucosidase inhibitors. RSC Adv. 2014. 4:10862-10874.

Tariq A, Mussarat S, Adnan M, Abd-Allah EF, Hashem A, Alqarawi AA, Ullah R. Ethnomedicinal evaluation of medicinal plants used against gastrointestinal complaints. BioMed Res Int. 2015. 2015:892947.

Taylor JLS, Van Staden J. The effect of cold storage during winter on the levels of COX-1 inhibitory activity of *Eucomis autumnalis autumnalis* extracts. S. Afr. J. Bot. 2002. 68:157–162.

Tepe B, Akpulat HA, Sokmen M, Daferera D, Yumrutas O, Aydin E, Polissiou M, Sokmen A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. Food Chem. 2006. 97(4):719–724.

Terentieva EI, Valiejo-Roman CM, Samigullin TH, Pimenov M, Tilney P. Molecular phylogenetic and morphological analyses of the traditional tribe Coriandreae (Umbelliferae-Apioideae). *Phytotaxa*. 2015. 195:251–271.

Tetsuhiro N, Takashi O, Masakatsu S. Enantioselective total syntheses of (+) decursin and related natural compounds using catalytic asymmetric epoxidation of an enone. *Tetrahedron*. 2003. 53:6889-6897.

Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015. 148:63-106.

Throne JE, Weaver DK, Chew V, Baker JE. Probit analysis of correlated data: Multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol*. 1995. 88:1510-1512.

Tirillini B, Pintore G, Chessa M, Menghini L. Essential oil composition of *Tordylium apulum* L. from Italy. *J Essent Oil Res*. 2006. 18:51-52.

Tirillini B, Pagiotti R, Angelini P, Pintore G, Chessa M, Menghini L. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Laserpitium garganicum* from Italy. *Chem Nat Compd*. 2009. 45:103-105.

Tlhapi D, Ramaite I, Anokwuru C, van Ree T, Madala N, Hoppe H. Effects of seasonal variation on phytochemicals contributing to the antimalarial and antitrypanosomal activities of *Breonadia salicina* using a metabolomic approach. *Heliyon*. 2024. 10(2):e24068.

Todorova M, Trendafilova A, Ivanova R, Stoitsova S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from Bulgarian wild growing *Seseli rhodopeum*. *Acta Horti*. 2012. 955(955):155–159.

Todorova M, Trendafilova A, Dimitrov D. Essential oil composition of *Seseli rigidum* Waldst. From Bulgaria *Compt Rend Acad Bulg Sci*. 2013. 66(7):991–996.

Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer *Front Oncol*. 2018. 8:227.

Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Hollman P, Chamalides Ch, Foufa E, Kaloudis Tr, Kromhout D, Miskaki Ph, Petrochilou I, Poulima E, Stafilakis K, Theophilou D. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chem.* 2000. 70:319-323.

Tunçtürk M, Tuncturk R, Sekeroglu N, Ertus M, Özgökçe F. Lead concentrations of herbs used in Van Herby Cheese. *Nat Prod Commun.* 2011. 6(10):1473-1474.

Tunçtürk M, Özgökçe F. Chemical composition of some Apiaceae plants commonly used in herby cheese in Eastern Anatolia. *Turk J Agric Fores.* 2015. 39(1):55-62.

Tusek AJ, Benkovic' M, Valinger D, Jurina T, Belščak-Cvitanović A, Kljusurić JG. Optimizing bioactive compounds extraction from different medicinal plants and prediction through nonlinear and linear models. *Ind Crops Prod.* 2018. 126(4):449-458.

Tutin TG. *Laserpitium* L., In: *Flora Europaea*, 2, eds, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters and D.A. Webb, Cambridge University Press, Cambridge, Englands, pp.368-370. 1968.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge (UK), Vol. 2, p. 330. 1981.

Usmani QI, Jahan N, Aleem M, Hasan SA. Aatriral (*Ammi majus* L.), an important drug of Unani system of medicine: A review. *J Ethnopharmacol.* 2021. 276:114144.

Uwineza PA, Waśkiewicz A. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules.* 2020. 25(17):3847.

Uzel A, Dirmenci T, Celik A, Arabaci T. Composition and antimicrobial activity of *Prangos platychlaena* and *P. uechtrizii*. *Chem Nat Compd.* 2006. 42(2):169–171.

Vaglica A, Peri E, Badalamenti N, Ilardi V, Bruno M, Guarino S. Chemical composition and evaluation of insecticidal activity of *Seseli bocconeii* essential oils against stored product pests. *Plants.* 2022. 11:3047.

Valente J, Zuzarte M, Gonçalves MJ, Lopes MC, Cavaleiro C, Salgueiro L, Cruz MT. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food Chem Toxic.* 2013. 62:349-354.

Veitch NC. Isoflavonoids of the leguminosae. *Nat Prod Rep.* 2013. 30:988–1027.

Vij I, Pathania AR. An Overview- Advances in Chromatographic Techniques in Phytochemistry. *E3S Web of Conferences.* 2023. 391.

Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant.* 2010. 3(1):2-20.

Von Ahlefeldt D, Crouch NR, Nichols G, Symonds R, McKean S, Sibiyi H, Cele MP. *Medicinal Plants Traded on South Africa's Eastern Seaboard.* Porcupine Press, Durban. 2003.

Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA-J Am Med Assoc.* 2019. 321:288-300.

Wang G, Sun S, Wu B, Liu J. Coumarins as potential anti-drug resistant cancer agents: a mini review. *Curr Top Med Chem.* 2021. 21(19):1725–1736.

Wang X, Shen Y, Thakur K, Han J, Zhang JG, Hu F, Wei ZJ. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 2020. 25(17):3955.

Wang X, Pan H, Sagurthi S, Paris V, Zhuo C, Dixon RA. The protein conformational basis of isoflavone biosynthesis. *Commun Biol.* 2022. 5(1):1249.

Wang Y, Fan M, Li J, Wang Z, Gao H. Homoisoflavanones and stilbenes from fresh bulb of *Scilla scilloides*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 2014. 39:3788-3793.

Wang Z, Sun JB, Qu W, Guan F-Q, Li LZ, Liang JY. Caesappin A and B, two novel protosappanins from *Caesalpinia sappan* L. *Fitoterapia.* 2014. 92:280-284.

Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. E & S. Livingstone Ltd, Edinburgh. 1962.

Weitzel C, Rønsted N, Spalik K, Simonsen HT. Resurrecting deadly carrots. Towards a revision of *Thapsia* L. (Apiaceae) based on phylogenetic analysis of nrITS sequences and chemical profiles. Bot J Linn Soc. 2014. 174:620-636.

Widelski J, Graikou K, Ganos C, Skalicka-Wozniak K, Chinou I. Volatiles from selected apiaceae species cultivated in Poland-antimicrobial activities. Processes. 2021. 9:695.

Winston JE. Describing Species: Practical Taxonomy Procedure for Biologists. Columbia University Press. 2000.

Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. Nat Biotechnol. 2006. 24(11):1441-7.

Wu S, Snajdrova R, Moore JC, Baldenius K, Bornscheuer UT. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. Angew Chem Int Ed Engl. 2021. 60(1):88-119.

Xie L, Takeuchi Y, Cosentino LM, Lee K-H. Anti-AIDS Agents. 37.1 Synthesis and structureactivity relationships of (3'R,4'R)-(p)-cis-khellactone derivatives as novel potent anti-HIV agents. J Med Chem. 1999. 42(14):2662–2672.

Xu Z, Cai Y, Ma Q, Zhao Z, Yang D, Xu X. Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from *Baphicacanthus cusia* Leaves by Hydrophobic Deep Eutectic Solvents. Molecules. 2021. 26(6):1729.

Xu Z, Ullah N, Duan Y, Hou Z, Liu A, Xu L. Editorial: Plant secondary metabolites and their effects on environmental adaptation based on functional genomics. Front Genet. 2023. 14:1211639.

Yeom SJ, Kim M, Kim SK, Lee DH, Kwon KK, Lee H, Kim H, Kim DM, Lee SG. Molecular and biochemical characterization of a novel isoprene synthase from *Metrosideros polymorpha*. BMC Plant Biol. 2018. 18(1):118.

Yeşil Y, Çelik M, Yılmaz B. Wild edible plants in Yeşilli (Mardin-Turkey), a multicultural area. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2019. 15:52.

Youssef D, El-Bakatoushi R, Elframawy A, El-Sadek L, Badan GE. Molecular phylogenetic study of flavonoids in medicinal plants: a case study family Apiaceae. *J Plant Res.* 2023. 136:305-322.

Yu L, Rios E, Castro L, Liu J, Yan Y, Dixon D. Genistein: Dual Role in Women's Health. *Nutrients.* 2021. 13(9):3048.

Zafeiropoulou V, Tomou EM, Douros A, Skaltsa H. The Effect of Successive Harvesting on The Volatile Constituents of Two Essential Oils of Cultivated Populations of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) in Greece. *J Essent Oil Bear Plants.* 2021. 24:1-11.

Zahrae Redouan F, Benítez G, Picone RM, Crisafulli A, Yebouk C, Bouhbal M, Ben Driss A, Kadiri M, Molero-Mesa J, Merzouki A. Traditional medicinal knowledge of Apiaceae at Talassemtane National Park (Northern Morocco). *S Afr J Bot.* 2020. 131:118-130.

Zarrinpashne S, Gorji Kandi S. A study on the extraction of essential oil of Persian black cumin using static supercritical CO₂ extraction, and comparison with hydrodistillation extraction method. *Sep Sci Technol.* 2018. 54:1778-1786.

Zengin G, Mahomoodally MF, Yıldıztuğay E, Jugreet S, Khan SU, Dall'Acqua S, Mollica A, Bouyahya A, Montesano D. Chemical composition, biological activities and in silico analysis of essential oils of three endemic *Prangos* species from Turkey. *Molecules.* 2022. 27(5):1676.

Zhang J, Feng M, Guan W. Naturally occurring aesculetin coumarin exerts antiproliferative effects in gastric cancer cells mediated via apoptotic cell death, cell cycle arrest and targeting PI3K/AKT/M-TOR signalling pathway. *Acta Biochim Pol.* 2021. 68(1):109–113.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.* 2018. 13:20.

Zhou Z, Chen B, Chen S, Lin M, Chen Y, Jin S, Chen W, Zhang Y. Applications of Network Pharmacology in Traditional Chinese Medicine Research. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020. 2020:1646905.

Zrira S, Elamrani A, Pellerin P, Bessiere JM, Menut C, Benjilali B. Isolation of Moroccan *Ammi visnaga* oil: comparison between hydrodistillation, steam distillation and supercritical fluid extraction. *J Essent Oil-Bear Plants.* 2008. 11(1):30–35.