



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari – XXXV CICLO
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
SSD CHIM/06

Profilo fitochimico di prodotti naturali e loro derivati emisintetici ad attività
antitumorale e acaricida

IL DOTTORE

Dott. NATALE BADALAMENTI

LA COORDINATRICE

Prof.ssa GIOVANNA PITARRESI

IL TUTOR

Prof. FRANCESCO GIACALONE

LA CO-TUTOR

Prof.ssa ANTONELLA MAGGIO

CICLO XXXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2022

Premessa

La chimica delle sostanze organiche naturali è il principale attore di questo lavoro di tesi. Quel settore delle scienze chimiche che ha come oggetto lo studio della struttura, delle proprietà chimiche, delle trasformazioni delle sostanze organiche presenti negli organismi viventi (piante, animali, etc.), nonché del loro ruolo biologico, è stato il motore cardine di questo mio percorso. L'attività di ricerca svolta durante il triennio di Dottorato si è divisa in due differenti capitoli: il primo, dedicato interamente alla reattività, alla sintesi e alle proprietà biologiche di nuovi derivati ottenuti dall'*ent*-kaurene naturale atractyligenina. In particolare, dopo una fase totalmente estrattiva, sono stati progettati percorsi sintetici (reazioni di bromurazione, ammidazione, ossidazione, eliminazione e riduzione) su questo aglicone diterpenico al fine di ottenere molecole con nuovi gruppi funzionali potenzialmente bioattivi. Le molecole sintetizzate sono state successivamente testate come agenti antitumorali contro diverse linee cellulari: melanoma maligno umano (A375), cancro epiteliale del colon umano (CaCo2) e carcinoma del colon (HCT116). Per valutare la natura della morte cellulare indotta dai diversi composti, cercando di confermare gli effetti citotossici osservati mediante saggio MTT, sono state inoltre eseguite analisi morfologiche al microscopio ottico e di marcatura del DNA; il secondo capitolo, invece, è incentrato sullo studio spettroscopico di molecole estratte da fonti vegetali e sull'applicazione delle stesse in ambito fitosanitario. Nello specifico, sono stati valutati gli effetti anti-insetticidi dell'olio essenziale di *Ridolfia segetum* contro *Culex quinquefasciatus*, *Musca domestica* e *Spodoptera littoralis* e sono stati stimati gli effetti acaricidi di diversi metaboliti secondari (bufadienolidi e diterpeni), singolarmente isolati, contro lo scarabeo *Stegobium paniceum* e contro l'acaro polifago *Tetranychus urticae*.

Sommario

CAPITOLO I.....	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1. Prodotti naturali nel trattamento clinico del cancro: la gloria nella storia.....	3
1.1.1. Camptotecina e Taxol.....	4
1.1.2. Triossido di arsenico	5
1.1.3. Sviluppo recente dei prodotti naturali nella scoperta di nuovi farmaci antitumorali	6
1.1.4. Farmaci anticorpali: vecchi farmaci in un nuovo uso.....	7
1.1.5. Ricerca di farmaci a bersaglio molecolare nei prodotti naturali	9
1.1.6. Sfruttare tecnologie all'avanguardia per facilitare l'indagine meccanicistica	11
1.1.7. Sviluppi futuri che potrebbero aprire nuovi panorami per i prodotti naturali.....	12
1.1.8. Lo schermo integrato mirato e fenotipico accelera la scoperta di composti bioattivi	13
1.1.9. L'intelligenza artificiale aiuta la scoperta e la comprensione meccanicistica dei prodotti naturali bioattivi.....	14
1.1.10. L'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota apre una nuova finestra per i prodotti naturali.....	15
1.1.11. La terapia combinata amplia l'ambito terapeutico dei prodotti naturali	16
1.2. Diterpeni e derivati come potenziali agenti antitumorali	17
1.3. Caratteristiche dei diterpeni antitumorali	18
1.3.1. Effetti citotossici	18
1.3.2. Specie reattive dell'ossigeno e specie pro-ossidative	21
1.3.3. Apoptosi, arresto del ciclo cellulare e autofagia	22
1.3.4. Effetti sulla proliferazione e differenziazione cellulare.....	26
1.3.5. Effetti sull'angiogenesi	27
1.3.6. Effetti su migrazione cellulare e metastasi	28
1.3.7. Effetti immunosoppressivi e chemiopreventivi	30
1.3.8. Effetti sulle cellule tumorali resistenti ai farmaci	31
1.3.9. Altri effetti biologici.....	32
1.4. Sfide future	34
1.5. Una panoramica sul cancro coloretale	36
1.6 Bibliografia.....	41
2. SCOPO DI QUESTO CAPITOLO DI TESI.....	79
3. RISULTATI E DISCUSSIONI	81
3.1. Cytotoxic activity of several <i>ent</i> -kaurane derivatives of atractyligenin. Synthesis of unreported diterpenic skeleton by chemical rearrangement.....	81
3.1.1. Abstract	81

3.1.2. Introduzione	81
3.1.3. Materiale e metodi.....	84
3.1.3.1. Materiale vegetale	84
3.1.3.2. Procedure generali	84
3.1.3.3. Isolamento dell'atractyloside (1) e della carbossitractyloside (2).....	85
3.1.3.4. Saggio di citotossicità MTT	89
3.1.4. Risultati e discussioni	90
3.1.5. Conclusioni	97
3.1.6. Bibliografia	97
3.2. Effetti antitumorali di derivati ammidici e relativi diossidati dell' <i>ent</i> -kaurene atractyligenina	102
3.2.1. Introduzione	102
3.2.2. Risultati e discussione	104
3.2.3. Materiali e metodi	114
3.2.3.1. Procedure generali	114
3.2.3.2. Esperimenti per la sintesi di (2).....	114
3.2.3.2.1. Sintesi BOP/TEA.....	114
3.2.3.2.2. Sintesi con TBTU/TEA.....	115
3.2.3.2.3. Sintesi con TBTU/DIPEA	115
3.2.3.2.4. Sintesi con EDC/HOBt/DIMAP (25 °C).....	115
3.2.3.2.5. Sintesi con EDC/HOBt/DIMAP (50 °C).....	116
3.2.3.2.6. Procedura generale per la sintesi delle ammidi dell'atractyligenina (3-15).....	116
3.2.3.2.7. Procedura generale per la sintesi degli ossidati dell'atractyligenina.....	116
3.2.3.3. Dati spettroscopici	118
3.2.3.4. Saggi per la determinazione dell'attività biologica	150
3.2.3.4.1. Condizioni di coltura e di trattamento delle cellule	150
3.2.3.4.2. Saggi di vitalità cellulare per MTT	151
3.2.3.4.3. Valutazione del meccanismo di morte mediante microscopia ottica e a fluorescenza	152
3.2.4. Conclusioni	153
3.2.5. Bibliografia	154
CAPITOLO II	158
4. INTRODUZIONE	159
4.1. Classificazione tossicologica dei pesticidi	159
4.1.1. Classificazione in base al <i>Mode of Entry</i>	160
4.1.1.1. Pesticidi sistemici	160
4.1.1.2. Pesticidi non sistemici (di contatto).....	161
4.1.1.3. Avvelenamento attraverso lo stomaco	161
4.1.1.4. Fumiganti	162
4.1.1.5. Repellenti	162
4.2. Classificazione dei pesticidi basata sulla funzione e sull'organismo colpito	163
4.3. Classificazione basata sulla composizione chimica	164
4.3.1. Pesticidi organoclorurati.....	165
4.3.2. Organofosfati	166
4.3.3. Carbammati.....	167

4.3.4. Piretroidi sintetici	168
4.4. Altre classi minori.....	169
4.4.1. Classificazione in base alla modalità di azione	169
4.4.1.1. Veleni fisici.....	169
4.4.1.2. Veleni protoplasmatici.....	169
4.4.1.3. Veleni ad azione respiratoria.....	169
4.4.1.4. Agenti nervini.....	170
4.4.1.5. Inibitori della chitina	170
4.4.2. Classificazione in base alle fonti di origine	170
4.4.2.1. Pesticidi microbici	171
4.4.2.2. Potenziatori della difesa delle piante	171
4.4.2.3. Pesticidi biochimici	171
4.4.3. Classificazione basata sullo spettro d'azione.....	172
4.4.4. Classificazione basata sulla formulazione	172
4.4.4.1. Liquidi	173
4.4.4.2. Polveri.....	173
4.4.4.3. Granulati	173
4.4.4.4. Esche.....	174
4.4.4.5. Nebulizzatori ULV (Ultra basso volume).....	174
4.4.5. Classificazione basata sulla tossicità dei pesticidi	175
4.5. Effetti dei pesticidi.....	175
4.5.1. Impatto sulla salute umana	176
4.5.2. Effetto acuti	177
4.5.3. Effetto cronico	177
4.5.4. Impatti sull'ambiente	179
4.5.5. Impatti sugli organismi non bersaglio	180
4.5.6. Perdita della biodiversità	180
4.5.7. Impatti sulla microflora del suolo	181
4.5.8. Impatti sull'ecosistema dell'acqua e dell'aria	182
4.5.9. Sostenibilità ambientale: pesticidi e protezione fitosanitaria.....	182
4.6. Prodotti naturali vegetali come fonte di sviluppo di insetticidi <i>eco-friendly</i>	185
4.6.1. Dal piretro ai piretroidi sintetici.....	186
4.6.2. Azadirachtin e Limonoidi correlati dalle Meliaceae	187
4.6.3. Acetogenine dalle Annonaceae	189
4.6.4. Naftochinoni da Scrophulariaceae	190
4.6.5. Rocaglammidi di <i>Aglaia</i> (Meliaceae).....	192
4.6.6. Monoterpeni da oli essenziali	193
4.7. Bibliografia.....	195
5. SCOPO DI QUESTO CAPITOLO DI TESI.....	208
6. RISULTATI E DISCUSSIONI	210
6.1. Phytochemical profile and insecticidal activity of <i>Drimia pancration</i> (Asparagaceae) against adults of <i>Stegobium paniceum</i> (Anobiidae)	210

6.1.1. Abstract	210
6.1.2. Introduzione.....	210
6.1.3. Materiali e metodi	212
6.1.3.1. Procedure sperimentali generali	212
6.1.3.2. Materiale vegetale	213
6.1.3.3. Insetti	213
6.1.3.4. Estrazione e isolamento	213
6.1.3.5. Tossicità per contatto.....	222
6.1.3.6. Tossicità per repellenza	222
6.1.3.7. Tossicità per ingestione	223
6.1.3.8. Analisi statistica	224
6.1.4. Risultati e discussioni.....	224
6.1.4.1. Caratterizzazione chimica dei singoli metaboliti.....	224
6.1.4.2. Tossicità per contatto.....	229
6.1.4.3. Repellenza.....	229
6.1.4.4. Tossicità per ingestione	230
6.1.5. Conclusioni.....	232
6.1.6. Bibliografia.....	233
6.2. Acaricidal Activity of Bufadienolides Isolated from <i>Drimia pancrations</i> against <i>Tetranychus urticae</i> , and Structural Elucidation of Arenobufagin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	237
6.2.1. Abstract	237
6.2.2. Introduzione.....	238
6.2.3. Materiale e metodi.....	239
6.2.3.1. Materiale vegetale	239
6.2.3.2. Estrazione, isolamento e procedure sperimentali generali	239
6.2.3.3. Insetti	241
6.2.3.4. Attività acaricida	241
6.2.3.5. Citotossicità sulle cellule dei vertebrati	242
6.2.3.6. Analisi statistica	242
6.2.4. Risultati e discussioni.....	243
6.2.4.1. Composti chimici	243
6.2.4.2. Effetto acaricida	245
6.2.5. Conclusioni.....	247
6.2.6. Bibliografia.....	247
6.3. Chemical Composition and Broad-Spectrum Insecticidal Activity of the Flower Essential Oil from an Ancient Sicilian Food Plant, <i>Ridolfia segetum</i>	253
6.3.1. Abstract	253
6.3.2. Introduzione.....	254
6.3.3. Materiali e metodi	256
6.3.3.1. Materiale vegetale	256
6.3.3.2. Estrazione dell'olio essenziale	256
6.3.3.3. Analisi GC-FID dell'olio essenziale	256
6.3.3.4. Analisi GC-MS dell'olio essenziale.....	257
6.3.3.5. Insetti	257
6.3.3.6. Attività insetticida su <i>Culex quinquefasciatus</i>	258
6.3.3.7. Attività insetticida su <i>Musca domestica</i>	258
6.3.3.8. Attività insetticida su <i>Spodoptera littoralis</i>	259

6.3.3.9. Analisi statistica	259
6.3.4. Risultati e discussioni	259
6.3.4.1. Resa dell'olio essenziale e sua composizione chimica	259
6.3.4.2. Attività insetticida	261
6.3.5. Conclusioni	265
6.3.6. Bibliografia	266
6.4. Structural characterization of carboxyatractyloside and acaricidal activity of natural <i>ent</i> -kaurene diterpenoids isolated from <i>Chamaeleon gummifer</i> against <i>Tetranychus urticae</i>	277
6.4.1. Abstract	277
6.4.2. Introduzione	277
6.4.3. Materiale e metodi	280
6.4.3.1. Materiale vegetale	280
6.4.3.2. Procedure generali	280
6.4.3.3. Estrazione e isolamento di atractyloside (1), carbossitractyloside (2) e atractyligenin (3)	281
6.4.3.4. Allevamento di <i>Tetranychus urticae</i>	283
6.4.3.5. Attività acaricida	283
6.4.3.6. Analisi statistica	284
6.4.4. Risultati e discussioni	284
6.4.4.1. Attività acaricida contro gli acari di <i>T. urticae</i>	286
6.4.5. Conclusioni	289
6.4.6. Bibliografia	290

Capitolo I

Atractyligenina: estrazione, semi-sintesi, reattività e attività biologica

In questo primo capitolo, oltre a essere stata riportata una panoramica sull'utilizzo dei prodotti naturali come agenti antitumorali, focalizzando l'attenzione sui diterpeni, sul loro modo d'azione a livello citotossico e sulle caratteristiche del cancro coloretale, è stata riportata l'attività citotossica di svariati derivati dell'atractyligenina ottenuti mediante reazioni di bromurazione, riduzione, eliminazione, ammidazione e ossidazione. L'attività antiproliferativa è stata valutata contro diverse linee tumorali: melanoma maligno umano (A375), cancro epiteliale del colon umano (CaCo2) e carcinoma del colon (HCT116). Per valutare la morte cellulare indotta dai diversi composti, cercando di confermare gli effetti citotossici osservati mediante saggio MTT, sono state inoltre eseguite analisi morfologiche al microscopio ottico e di marcatura del DNA.

1. Introduzione

Attualmente, i tumori contribuiscono come seconda causa di morte nel mondo, coinvolgendo una serie di complessi meccanismi (Ritchie 2018). Nonostante i notevoli progressi nella terapia antitumorale, persistono seri e svariati problemi. La chemioterapia e la radioterapia, ad esempio, rimangono le principali strategie per la gestione del cancro. Tuttavia, l'efficacia degli agenti antitumorali sintetici per la chemioterapia è spesso limitata a causa dei loro gravi effetti tossici, che influenzano il metabolismo e la proliferazione dei tessuti normali e riducono la qualità della vita dei pazienti. Pertanto, sono urgentemente necessari approcci terapeutici alternativi per il trattamento del cancro.

I composti naturali, con una notevole diversità chimica, sono stati ampiamente studiati per il loro potenziale antitumorale per più di mezzo secolo. Gli sforzi collettivi della comunità hanno raggiunto enormi progressi, includendo prodotti naturali a un utilizzo clinico, scoprendo nuove opportunità terapeutiche, ma le sfide rimangono ancora molte. Con notevoli cambiamenti nel panorama della terapia del cancro e il ruolo crescente delle tecnologie all'avanguardia, potremmo essere giunti a un bivio per rivisitare le strategie per comprendere i prodotti offerti dalla natura ed esplorare la loro utilità terapeutica. Questo capitolo della mia tesi di dottorato riassume i principali progressi nella ricerca sul cancro incentrata sull'impiego dei metaboliti secondari con un approccio sistematico, nuovi modelli farmacologici, ricercando nuove rotte emergenti per rivitalizzare la ricerca sui prodotti naturali ad azione antitumorale.

Data la notevole diversità chimica in natura, i prodotti naturali sono considerati un ricco serbatoio di metaboliti bioattivi con potenziale azione terapeutica. Negli ultimi decenni sono stati compiuti enormi sforzi per isolare nuovi prodotti naturali, da microbi, piante e da altri organismi viventi, per valutarne le proprietà antitumorali ed esplorare il meccanismo d'azione. Questi sforzi hanno portato alla scoperta di numerosi farmaci antitumorali. Si stima che tra il 1981 e il 2020, circa il 25% di tutti i farmaci antitumorali di nuova approvazione fosse correlato e derivato a/dai prodotti naturali (Newman and Cragg, 2020; Huang et al. 2018). Nel

frattempo, sono stati evidenziati innumerevoli composti con potenziali antitumorali o vantaggi strutturali unici con importanti attività farmacologiche.

Nonostante questi risultati, lo sviluppo di prodotti naturali bioattivi tali come farmaci è rimasto impegnativo, in parte a causa della difficoltà nell'isolamento su larga scala, ma anche per la difficoltà nella comprensione meccanicistica e nello sviluppo farmaceutico. Di conseguenza, le principali aziende farmaceutiche di tutto il mondo hanno ridotto o addirittura eliminato gli immensi sforzi sui prodotti naturali per la scoperta di nuovi farmaci e si sono affidati principalmente a grandi librerie di composti bioattivi sintetizzati chimicamente. Recentemente, con la crescita esplosiva delle nostre conoscenze nella terapia del cancro e nelle tecnologie innovative, è diventato possibile superare gli ostacoli nel migliorare l'efficienza nella scoperta di farmaci nuovi, rivelando i bersagli diretti dei prodotti naturali e risolvendo la complessità degli effetti farmacologici conosciuti.

1.1. Prodotti naturali nel trattamento clinico del cancro: la gloria nella storia

I prodotti naturali hanno segnato la storia della scoperta di farmaci antitumorali. Numerose terapie antitumorali ampiamente utilizzate provengono da fonti naturali, come irinotecan, vincristina, etoposide e paclitaxel estratti da piante, actinomicina D e mitomicina C estratti da batteri, nonché bleomicina di origine marina. Alcuni di questi composti sono ancora cardine della terapia del cancro e continueranno a svolgere un ruolo fondamentale nel prossimo futuro. Tra questi, camptotecina e taxolo sono senza dubbio i due esempi di maggior successo, entrambi identificati tra gli anni '50 e '60 in una campagna avviata dal National Cancer Institute (NCI) per scoprire le potenzialità terapeutiche dei prodotti naturali (Wall and Wani, 1995; Wall 1998). Nel frattempo, scienziati cinesi hanno dato un contributo significativo per portare il triossido di arsenico, un vecchio rimedio nella medicina tradizionale cinese (MTC), alla cura standard della leucemia promielocitica acuta (APL) (Sanz et al. 2019).

1.1.1. Camptotecina e Taxol

L'attività antitumorale della camptotecina, isolata dal legno e dalla corteccia di *Camptotheca acuminata* Decne., è stata inizialmente notata all'inizio degli anni '60, ma la sua applicazione come agente antitumorale è stata latente per quasi 20 anni fino a quando non è stata scoperta la sua modalità d'azione (Martino et al. 2017; Oberlies and Kroll, 2004). La camptotecina è in grado di intrappolare specificamente la topoisomerasi I, un enzima coinvolto in modo critico sia nella replicazione del DNA che nei processi di trascrizione, e formare complessi topoisomerasi-DNA. Questi complessi possono causare un grave stress genomico quando entrano in collisione con la replicazione del DNA in corso o con il macchinario di trascrizione, portando alla morte cellulare (Pommier 2006). Questa modalità d'azione unica ha riacceso l'interesse per lo sviluppo di analoghi della camptotecina, con l'obiettivo di migliorare la solubilità, ridurre la tossicità e mantenere l'attività antitumorale. A metà degli anni '90, due analoghi della camptotecina, topotecan e irinotecan, hanno ricevuto l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento di vari tipi di cancro, inclusi i tumori dell'ovaio, del polmone, della mammella e del colon, e la 10-idrossicamptotecina, con tossicità ridotta rispetto alla camptotecina, è stato usato contro l'epatoma, il cancro del colon e il cancro della vescica in Cina dagli anni '70.

La storia del taxolo (paclitaxel) non è molto diversa, ma con più ostacoli, rappresentato da una vera e propria avventura tra i vari prodotti naturali per arrivare alla fine al composto più importante. Il taxolo è stato originariamente isolato dalla corteccia di *Taxus brevifolia*, che è una risorsa limitata e produce solo una quantità minima del composto in questione. La quantità adeguata all'uso terapeutico è stata risolta da una procedura semisintetica commercialmente fattibile, a partire da 10-DAB (10-Deacetylbaccatin) che proviene sempre da una risorsa vegetale rinnovabile. La complessa struttura chimica (un ostacolo successivo) non è stata risolta fino al 1971, con l'assistenza necessaria della spettrometria di massa, della cristallografia a raggi X e della spettroscopia NMR, un approccio abbastanza comune oggi ma ancora complicato in quel periodo. Il meccanismo d'azione del taxolo è stato riportato, per la prima volta, nel 1979. È stato scoperto che il taxolo lega i microtubuli e causa disfunzioni nella dinamica dei microtubuli stesi, con

conseguente catastrofe mitotica delle cellule tumorali. L'ultimo ostacolo, dato da questo composto, riguarda la scarsa solubilità, che è stata risolta da una particolare formulazione a base di olio di ricino, commercializzata come Cremophor® EL, aprendo finalmente la strada al taxolo per procedere successivamente alle sperimentazioni cliniche successive. Nel dicembre 1992, più di vent'anni dopo il rapporto iniziale del suo isolamento e della sua struttura, la FDA (Food and Drug Administration) ha concesso la sua approvazione per il trattamento del cancro ovarico refrattario (Wall and Wani, 1995; Wall 1998; Oberlies and Kroll, 2004; Wall and Wani, 1996).

Ancora oggi, l'eredità della camptotecina e del taxolo non sta svanendo. Il lavoro di miglioramento negli anni ha prodotto una serie di nuovi derivati della camptotecina con proprietà farmacologiche migliori e alcuni di essi sono passati a studi clinici. Il chimmitecan, un derivato della camptotecina sviluppato dagli scienziati dell'Istituto di Materia Medica di Shanghai, Accademia Cinese delle Scienze, è in fase II di sperimentazione in Cina (Pommier 2006). Utilizzando l'albumina legata a strutture nanoparticellari (nab), il paclitaxel è stato in grado di aggirare le gravi tossicità causate dalla formulazione e di concentrarsi sistematicamente ai tumori da annientare (Gradishar 2006; Gradishar et al. 2005). Infine, il nab-paclitaxel è stato approvato nel 2005 per il trattamento del carcinoma mammario metastatico, seguito da ottimi studi condotti nel carcinoma pancreatico e nel carcinoma polmonare.

1.1.2. Triossido di arsenico

L'arsenico è da secoli un antico rimedio nelle medicine tradizionali occidentali e cinesi. A partire dagli anni '70, i farmaci contenenti arsenico sono stati utilizzati per il trattamento della leucemia promielocitica acuta recidivante (APL) in Cina, sotto forma di un preparato contenente arsenico e una traccia di cloruro di mercurio (noto come Ailing-1), che ha aperto un prologo sul trattamento dell'APL con farmaci a base di arsenico (Sun et al. 1992; Chen et al. 2011; Lallemand-Breitenbach et al. 2021). I dati clinici che utilizzano la forma pura di triossido di arsenico sono stati riportati a metà degli anni '90. Ad oggi, studi clinici sia fatti in Cina che dai paesi occidentali, hanno consolidato il notevole beneficio del triossido di arsenico nei

pazienti con leucemia promielocitica (Powell et al. 2010; Niu et al. 1999). Da allora, l'APL è diventata una malattia altamente curabile. L'esito dei pazienti con APL è stato rivoluzionato da preparati che combinano acido retinoico e triossido di arsenico, raggiungendo uno straordinario tasso di guarigione del 90% (Shen et al. 2004). Studi meccanicistici approfonditi in seguito rivelano che il triossido di arsenico mostra un meccanismo d'azione degradando la proteina di fusione PML-RAR α , il *driver* oncogenico dell'APL. Il triossido di arsenico prende di mira la porzione PML di PML-RAR α e induce specificamente una degradazione dipendente da SUMO attraverso il sistema di ubiquitinazione-proteasoma (de The and Chen, 2010; Jeanne et al. 2010; Zhang et al. 2010; Lallemand-Breitenbach et al. 2008; Tatham et al. 2008).

Un avanzamento di quasi un trentennio sull'impiego del triossido di arsenico illustra come gli sforzi congiunti di medici e ricercatori di base hanno trasformato questo primitivo e misterioso "veleno" in una terapia mirata modernizzata con un meccanismo d'azione ben compreso. Inoltre, come spesso accade nei prodotti naturali, la proprietà chimica unica del triossido di arsenico consente di sondare le basi molecolari dell'APL, producendo una strategia di degradazione PML-RAR α per il trattamento dell'APL che altrimenti non sarebbe stata in grado di rivelare.

1.1.3. Sviluppo recente dei prodotti naturali nella scoperta di nuovi farmaci antitumorali

La maggior parte dei farmaci di origine naturale sono stati identificati intorno agli anni '70 e '80. Insieme all'arrivo di una nuova era di terapia del cancro a bersaglio molecolare all'inizio degli anni '90, il focus della ricerca sulla scoperta di farmaci a piccolo peso molecolare, sia nell'industria che nel mondo accademico, si è spostato sulle *library* di composti sintetizzati. Questo cambio di capitolo è in gran parte attribuito alle enormi difficoltà riscontrate nella scoperta di composti efficaci, nell'acquisizione di una quantità sufficiente di bioattivi e nella comprensione dei meccanismi molecolari dei prodotti naturali. Nonostante il calo di interesse, concetti terapeutici emergenti e nuove tecnologie, in simbiosi, hanno comportato la continua crescita del campo in questione.

1.1.4. Farmaci anticorpali: vecchi farmaci in un nuovo uso

Insieme all'arrivo di una nuova era basata sulla terapia mirata a livello molecolare all'inizio degli anni '90, anche il *focus* della ricerca sui prodotti naturali si è spostato sulle terapie selettive. Molteplici classi di prodotti naturali, o di farmaci da essi derivati, sono in fase di sperimentazione in studi clinici. Tra questi vi sono gli coniugati anticorpo farmaco (ADC), che incorporano anticorpi monoclonali (mAb) e potenti citotossine in una singola entità molecolare tramite *linker* chimici. Questa strategia sfrutta le capacità di *targeting* dei mAb per migliorare la somministrazione di farmaci tumore-specifici attraverso l'interazione anticorpo-antigene, risparmiando così i tessuti normali dagli effetti citotossici delle chemioterapie tradizionali (Beck et al. 2017; Abdollahpour-Alitappeh et al. 2019). Risultati clinici convincenti con gli ADC, sia nelle neoplasie ematologiche che nei tumori solidi, hanno suscitato un rinnovato interesse nel campo, che ha fornito anche una piattaforma utile per nuovi prodotti naturali.

Un *target* adatto per lo sviluppo di ADC richiede determinate proprietà tra cui: (1) una potenza tossica sostanzialmente più elevata, con valori di IC_{50} inferiori a 0.1 nM, rispetto alla maggior parte degli agenti chemioterapici approvati; (2) il sito modificato appropriato per la coniugazione con mAb per ottenere un adeguato carico farmacologico; (3) una ragionevole solubilità in soluzioni acquose per consentire la reazione con gli anticorpi; e (4) stabilità prolungata nelle formulazioni acquose comunemente usate per gli anticorpi (Abdollahpour-Alitappeh et al. 2019). Finora, le testate citotossiche utilizzate negli ADC sono per lo più derivate da prodotti naturali (Newman and Cragg, 2020) che può essere suddiviso in due categorie principali: agenti antimitotici e agenti dannosi per il DNA. I farmaci antimitotici causano effetti citotossici interrompendo la capacità dei fusi mitotici di segregare i cromosomi o alterando il citoscheletro delle cellule. I due agenti antimitotici più utilizzati per lo sviluppo di ADC sono basati su auristatine o maytansinoidi, i cui derivati, come MMAE e DM1, sono stati utilizzati con successo in ADC clinicamente approvati (**Fig. 1**). Gli agenti citotossici dannosi per il DNA sono un'altra classe di tossine frequentemente esplorate negli ADC. La N-acetil- γ -calicheamicina è comune negli ADC, essendo usata nel gemtuzumab ozogamicin e nell'ilotuzumab ozogamicin. Altre molecole di importanza citotossica, oggetto di

studio, includono derivati di camptotecine, pirrolbenzodiazepine, doxorubicina e gentamicina, duocarmicina, ecc.

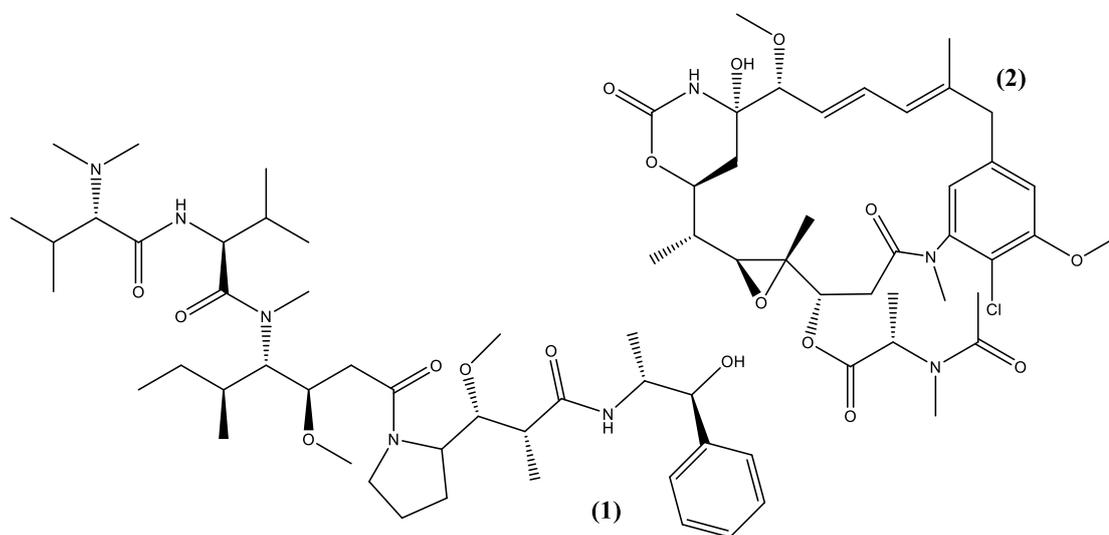


Fig. 1. Strutture chimiche dei prodotti naturali utilizzati come coniugati anticorpo farmaco. Auristatina E (1), molecola testata per MMAE; (2) Maytansine, molecola testata per DM1.

Gemtuzumab ozogamicin, un coniugato dell'anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD33, legato in modo covalente all'antibiotico citotossico antitumorale calicheamicina, è stato approvato per la prima volta nel 2000 con approvazione per il trattamento della leucemia mieloide acuta (LMA) CD33-positiva. Il farmaco è stato ritirato dal mercato nel 2010 per non aver dimostrato benefici clinici in uno studio di conferma post-approvazione. Dal 2011, nove ADC sono stati approvati per la terapia del cancro, con più di 60 ADC giunti nella fase degli studi clinici (Mullard 2013). Brentuximab vedotin è stato approvato nel 2011 per il trattamento di pazienti con linfoma di Hodgkin e linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL). È un coniugato di anti-CD30 e MMAE, un agente antimicrotubulo di derivazione naturale. Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) è stato il primo ADC approvato per il trattamento dei tumori solidi. È stato approvato dalla FDA nel 2013 per il trattamento del carcinoma mammario metastatico HER2 positivo (sovr'espressione della proteina HER2 o amplificazione del gene HER2) che aveva precedentemente ricevuto un trattamento a base di taxano neoadiuvante e trastuzumab. Combina l'anticorpo monoclonale anti-HER2 trastuzumab e l'agente antimicrotubulo di derivazione naturale DM1 tramite un *linker* tioetere stabile,

consentendo così il rilascio selettivo nelle cellule HER2 positive. Molto recentemente, la FDA ha approvato il sacituzumab govitecan-hziy (IMMU-132), un coniugato di un anticorpo selettivo a Trop-2 e il derivato della camptotecina SN-38, metabolita attivo dell'irinotecano (un farmaco antineoplastico facente parte della classe della camptotecine). È circa 200 volte più attivo rispetto all'irinotecano stesso.

1.1.5. Ricerca di farmaci a bersaglio molecolare nei prodotti naturali

L'emergere di terapie a bersaglio molecolare ha rimodellato il panorama del trattamento del cancro. Con lo sviluppo di questo campo, l'interesse della ricerca sui prodotti naturali ha mirato a rintracciare farmaci a bersaglio molecolare. Questi sforzi hanno comportato un'ampia varietà di prodotti naturali con potenziali attività contro vari bersagli antitumorali, che, sebbene siano per lo più prematuri come farmaci candidati, forniscono diversi scaffold chimici per le derivazioni dei farmaci. Tra i progressi realizzati dalla comunità scientifica sui prodotti naturali, gli scienziati cinesi hanno dato il loro contributo, in particolare nella ricerca di metaboliti secondari vegetali e marini. Un'ampia classe di agenti bioattivi botanici è stata identificata per la loro attività verso i *target* del cancro (**Fig. 2**).

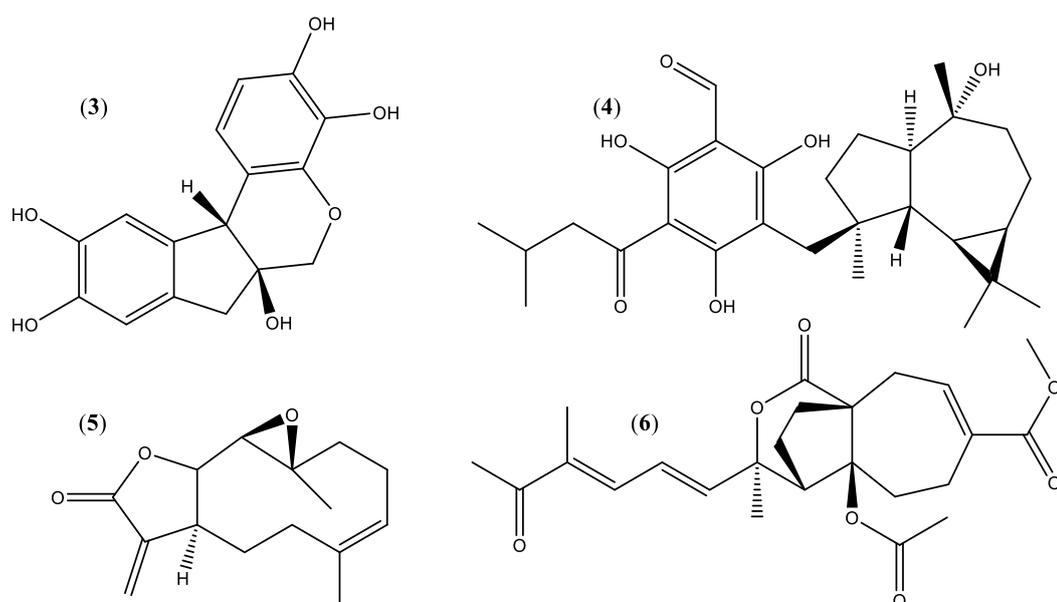


Fig. 2. Rappresentazione delle strutture chimiche dei prodotti naturali a bersaglio molecolare: (3) ematosilina; (4) eucaliptina A; (5) partenolide; (6) acido pseudolarico B.

Ad esempio, l'ematosilina e i suoi analoghi, estratti dal durame di *Haematoxylon campechianum* L., sono risultati inibitori competitivi dell'ATP delle tirosin-chinasi proteiche ad ampio spettro, con la più alta capacità di IC₅₀ che si è dimostrata a intervalli nanomolari (Lin et al. 2008). È stato scoperto anche che l'eucalptina A, che deriva dai frutti dell'*Eucalyptus globulus* Labill., una pianta che cresce ampiamente nel sud-ovest della Cina e nelle regioni australiane, mostra un potente effetto inibitorio sull'asse HGF/c-Met (Yang et al. 2012). L'acido pseudolarico B, un diterpenoide isolato dalla corteccia della radice dell'albero di *Pseudolarix kaempferi* Gordon (Pinaceae), mostra attività anti-angiogenesi attraverso un meccanismo che coinvolge il *crossstalk* tra il fattore 1- α inducibile dall'ipossia (HIF-1 α) e il fattore di trascrizione c-Jun (Yu et al. 2012). Il partenolide, un lattone sesquiterpenico, dapprima purificato dai germogli della pianta medicinale Partenio [*Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip.], ha mostrato un effetto inibitorio sulla segnalazione di Wnt/ β -catenina che è attribuito alla sua azione diretta sulla proteina ribosomiale RPL10 (Zhu et al. 2018). Inoltre, sono stati scoperti composti derivati da *Euphorbia peplus* Linn. con attività modulatoria sulla biogenesi del lisosoma (Li et al. 2016). Oltre ai farmaci ad origine vegetale, i prodotti naturali marini sono un'altra importante fonte di farmaci antitumorali, in particolare quelli degli invertebrati marini. La trabectedina, chimicamente una tetraidro isochinolina, è il primo farmaco antitumorale di origine marina scoperto dal tunicato caraibico di mangrovia *Ecteinascidia turbinata* Herdman, ma la sua modalità d'azione rimane poco chiara (Germano et al. 2010). Guo et al. hanno scoperto diversi nuovi alcaloidi isochinolinici dimerici simili alla trabectedina e i loro monomeri da nudibranchi marini e dalle loro prede di spugne, esibendo allo stesso modo attività antitumorali notevolmente significative. Ulteriori studi su questi composti hanno permesso la scoperta del meccanismo di inibizione di NF- κ B, che fornisce un indizio per una migliore comprensione dell'attività della trabectedina (Huang et al. 2016). Alcaloidi a parte, i polichetidi marini potrebbero anche essere promettenti farmaci. Ad esempio, una sintesi orientata alla funzione del polichetide ulocladolo, isolato dai funghi associati alle spugne marine *Ulocladium botrytis* Preuss, ha portato alla scoperta di una classe di inibitori dell'isoforma M2 della piruvato chinasi (PKM2) (Gao et al. 2020), un enzima metabolico coinvolto in modo critico nel cancro.

Quella qui menzionata, senza dubbio, è solo la punta dell'iceberg, ma ci permette di dare un'occhiata a come il campo si sia evoluto gradualmente dai farmaci citotossici alle terapie mirate. Con continui sforzi, possiamo aspettarci che composti naturali raggiungano la fase avanzata dello sviluppo di farmaci, terapie mirate e, infine, l'uso clinico.

1.1.6. Sfruttare tecnologie all'avanguardia per facilitare l'indagine meccanicistica

Al giorno d'oggi, i farmaci di precisione prevalenti nella terapia del cancro sottolineano la necessità di comprendere appieno le basi molecolari dei farmaci antitumorali. Tuttavia, ancora oggi, rivelare gli obiettivi diretti o chiarire il meccanismo dei prodotti naturali rimane molto impegnativo. Le nuove tecnologie all'avanguardia emergenti, come la chemioproteomica e la multi-omica, aiutano ad affrontare gli ostacoli nell'indagine meccanicistica dei prodotti naturali.

Per sondare gli obiettivi diretti dei prodotti naturali, sono stati sviluppati molteplici approcci. Gli approcci classici includono l'immobilizzazione di prodotti naturali su supporti solidi per l'isolamento basato sull'affinità di bersagli proteici (Whitby et al. 2017) e quelli non richiedono modifiche chimiche, come il test di spostamento termico cellulare SHP2 (PTPN11) o il profilo del proteoma termico (Chang et al. 2016). Tra i vari approcci, la strategia chemioproteomica è stata quella dominante per l'identificazione del target del prodotto naturale (Nomura and Maimone, 2019; Pan et al. 2016; Wright and Sieber, 2016). In questo test, i prodotti naturali sono derivatizzati per incorporare reticolanti di fotoaffinità, maniglie biortogonali e/o maniglie di arricchimento della biotina per consentire la cattura e/o l'arricchimento covalente. Il profilo chemioproteomico competitivo basato sul profilo proteico e sull'attività (ABPP) viene applicato per mappare gli obiettivi a livello di proteoma. Ad esempio, il nimbolide, un terpenoide antitumorale naturale derivato dall'albero di Neem (maggior limonoide della pianta *Azadirachta indica* A. Juss.), reagisce con una cisteina funzionale cruciale per il riconoscimento del substrato nell'ubiquitina ligasi E3 RNF114 e, a sua volta, interrompe il riconoscimento del substrato RNF114, portando all'inibizione dell'ubiquitinazione e della degradazione di

soppressori tumorali come p21 (Spradlin et al. 2019). Allo stesso modo, Grossman et al. hanno utilizzato piattaforme chemioproteomiche per scoprire che il prodotto naturale antitumorale withaferina A prende di mira la cistina 377 sulla subunità regolatoria PPP2R1A del complesso della proteina fosfatasi 2A oncosoppressore causando una ridotta proliferazione delle cellule del cancro al seno (Grossman et al. 2017).

Oltre all'identificazione del bersaglio, la crescente capacità di acquisire una comprensione completa delle alterazioni molecolari associate al cancro ha fornito un'opportunità senza precedenti per inquadrare gli impatti multibiologici dei prodotti naturali (Yan et al. 2015). In questo approccio, le tecnologie multiomiche, tra cui genomica, trascrittomica e metabolomica, sono caratterizzate e integrate sistematicamente utilizzando approcci bioinformatici. Questo approccio consentirà di rivelare percorsi molecolari e molecole differenzialmente quantificate con o senza trattamento, fornendo così un profilo sistematico degli impatti farmacologici. Gli approcci integrativi nella ricerca sui prodotti naturali promuovono anche il progresso verso il paradigma della medicina di precisione. Sebbene la maggior parte di questo tipo di studio rimanga nella fase iniziale, limitata dall'osservazione del fenomeno e dalla mancanza di un'indagine meccanicistica approfondita, rappresenta una direzione importante per conquistare la complessità meccanicistica dei prodotti naturali e facilitare il riposizionamento bioattivo dei farmaci (**Fig. 3**).

1.1.7. Sviluppi futuri che potrebbero aprire nuovi panorami per i prodotti naturali

Con notevoli cambiamenti nel panorama della terapia del cancro e con il ruolo crescente delle tecnologie all'avanguardia, ci troviamo di fronte a un'opportunità senza precedenti per comprendere meglio i prodotti della natura ed esplorare la loro utilità terapeutica.

1.1.8. Lo schermo integrato mirato e fenotipico accelera la scoperta di composti bioattivi

Fino agli anni '70, la scoperta di farmaci si basava fortemente sullo schermo fenotipico, un approccio che mirava a identificare le molecole attive per gli effetti terapeutici desiderati indipendentemente dai meccanismi esatti che vi stavano dietro. In effetti, la maggior parte dei prodotti naturali antitumorali sono stati scoperti attraverso lo screening fenotipico (Swinney 2013).

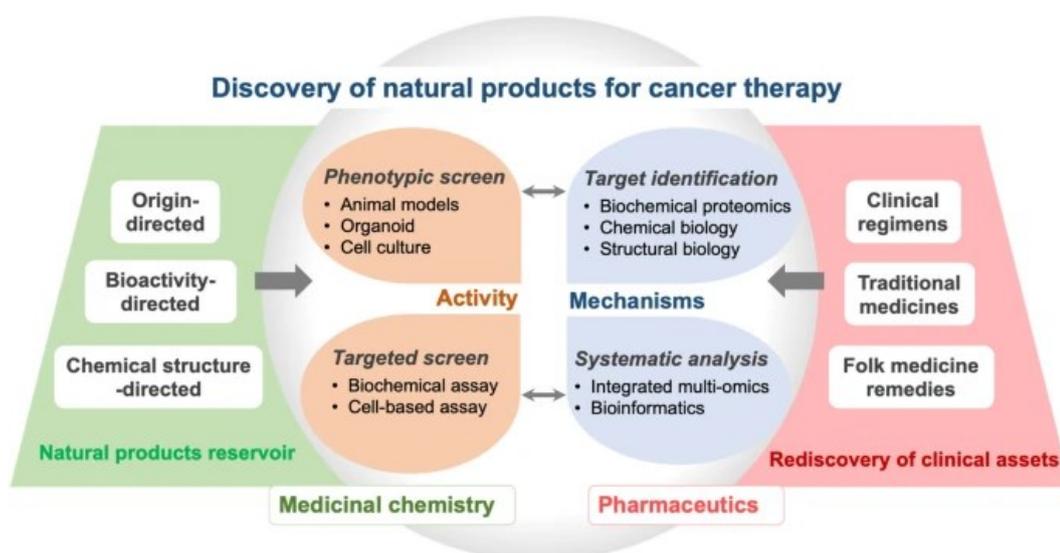


Fig. 3. Processi proposti per la scoperta di metaboliti secondari per la terapia del cancro (Huang et al. 2021).

Fino agli anni '70, la scoperta di farmaci si basava fortemente sullo schermo fenotipico, un approccio che mirava a identificare le molecole attive per gli effetti terapeutici desiderati indipendentemente dai meccanismi esatti che vi stavano dietro. In effetti, la maggior parte dei prodotti naturali antitumorali sono stati scoperti attraverso lo screening fenotipico (Swinney 2013). Con le crescenti conoscenze sulle alterazioni molecolari nel cancro, la scoperta di farmaci antitumorali devia gradualmente dallo screening fenotipico allo screening basato sul bersaglio, che si ritiene sia più efficiente ed economico per identificare i farmaci con un meccanismo d'azione chiaro. Quando sia l'industria che il mondo accademico adottano un approccio *target-first* per rintracciare il farmaco bioattivo, questo approccio potrebbe non essere il migliore per inquadrare il vantaggio dei prodotti naturali nell'affrontare malattie complesse come il cancro. Il cancro è una

malattia eterogenea che coinvolge la complessa interazione di vari fattori interni e ambientali, con alterazioni che si verificano a tutti i livelli di DNA, RNA, proteine, metaboliti e le loro interazioni (Hanahan and Weinberg, 2011; Du and Elemento, 2015). Nella maggior parte dei casi, l'inibizione di un singolo bersaglio non produce risultati terapeutici ottimali o tende a sviluppare resistenza anche con una risposta iniziale. I prodotti naturali mostrano un evidente vantaggio nella gestione di questa complessità a causa dei loro meccanismi sfaccettati. In questo scenario, ci si aspetta che l'integrazione di saggi mirati e fenotipici utilizzando multistrati di modelli di linee tumorali (linee cellulari, organoidi e xenotrapianti derivati dai pazienti) riveli meglio i potenziali terapeutici dei prodotti naturali nella terapia del cancro. Una sofisticata piattaforma di *screening* dotata di librerie di composti naturali classificate in modo differenziato in base all'origine dei composti, alle strutture chimiche o alle bioattività, migliorerà l'efficienza della caccia ai nuovi farmaci (**Fig. 3**).

1.1.9. L'intelligenza artificiale aiuta la scoperta e la comprensione meccanicistica dei prodotti naturali bioattivi

Il ruolo dell'intelligenza artificiale (IA) nella ricerca farmaceutica sta ricevendo sempre maggiore attenzione. Sono stati riportati numerosi sforzi per lo sviluppo di metodi e applicazioni pratiche, fornendo un'idea di come la tecnologia IA sta entrando nell'arena della scoperta di nuovi farmaci (Bajorath et al. 2020). Esiste una tendenza emergente ad applicare gli approcci dell'IA nella ricerca sui prodotti naturali, nella speranza di affrontare le sfide sia nella scoperta di prodotti naturali bioattivi che nella comprensione dei loro meccanismi (Zhang et al. 2020). Nell'ambito della ricerca sui prodotti naturali, gli algoritmi di apprendimento automatico per il riconoscimento della struttura, la classificazione, la simulazione della conformazione, la progettazione di librerie e la previsione delle attività sono tutti attivamente testati, sebbene per lo più in una fase iniziale. Inoltre, la bioattività basata sull'apprendimento automatico e la previsione meccanicistica possono fornire una soluzione per risolvere la complessità delle combinazioni di medicinali a base di erbe tradizionali ed estratti vegetali.

1.1.10. L'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota apre una nuova finestra per i prodotti naturali

L'intestino umano è una nicchia biologica, sede di una varietà di microbi che influenzano quasi tutti gli aspetti della biologia umana attraverso le loro interazioni con l'ospite. Prove accumulate supportano che il microbioma intestinale svolge un ruolo fondamentale nella malignità del cancro, attraverso un meccanismo primario che influenza l'immunosorveglianza antitumorale (Zitvogel et al. 2016; Gopalakrishnan et al. 2018). Nel frattempo, le prove emergenti supportano anche ampi effetti farmacologici dei prodotti naturali sul microbiota intestinale, inclusa la composizione del microbiota, i metaboliti microbici, la struttura della giunzione stretta intestinale e l'immunologia della mucosa (Pan et al. 2019). Una comprensione approfondita a questo proposito può risolvere un lungo enigma del motivo per cui la maggior parte dei prodotti naturali mostra effetti farmacologici concreti nonostante l'esposizione molto limitata al plasma e al tumore.

Certamente, i prodotti naturali potrebbero anche regolare il microambiente tumorale (TME) in modo indipendente dal microbiota. I dati emergenti suggeriscono l'impatto di prodotti naturali, come l'iniezione di composti del kushen (*Sophora flavescens* Ait.) (Yang et al. 2020) e l'icaritina (Hao et al. 2019), sul rimodellamento del TME attraverso l'alleviamento dei macrofagi associati al tumore o la riduzione dell'infiltrazione delle cellule di soppressione di derivazione mieloide. Con il convincente successo dell'immunoterapia del cancro nel trattamento clinico, descrivendo attentamente gli effetti dei prodotti naturali sulle cellule immunitarie nella TME o l'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota, si aprirà una nuova finestra per esplorare il valore terapeutico dei prodotti naturali e per comprendere i meccanismi che vi stanno alla base (**Fig. 4**).

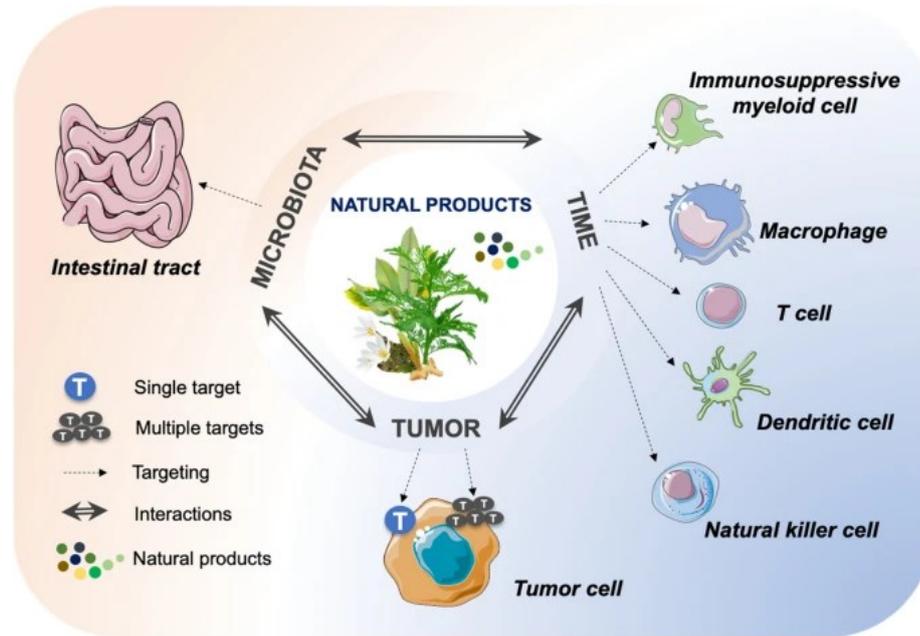


Fig. 4. Modalità d'azione antitumorali dei prodotti naturali (Huang et al. 2021).

1.1.11. La terapia combinata amplia l'ambito terapeutico dei prodotti naturali

La strategia di combinazione serve come direzione importante per lo sviluppo di prodotti naturali nella terapia del cancro. Il trattamento adiuvante dei prodotti naturali con i regimi attuali potrebbe essere utile in molteplici aspetti, tra cui la riduzione dell'effetto avverso, il superamento della resistenza ai farmaci e il miglioramento della risposta terapeutica. Ad esempio, si dice che PHY906, una formula di medicina cinese combinante quattro erbe, con una storia dietro secolare, allevia la tossicità gastrointestinale mediata dalla chemioterapia attraverso molteplici azioni, stimolando la rigenerazione delle cellule intestinali, bloccando la migrazione delle cellule infiammatorie e influenzando i fattori di trascrizione proinfiammatori (Lam et al. 2010). Questo lavoro fornisce un modello rappresentativo che mostra come ampliare l'ambito terapeutico dei prodotti naturali per ottimizzare l'effetto terapeutico della terapia del cancro.

Nel loro insieme, i paradigmi del passato si sono evoluti per svolgere un nuovo ruolo per i prodotti naturali nell'industria farmaceutica. Ci sono problemi multidimensionali da affrontare per aumentare la velocità e il tasso di successo della scoperta di farmaci da prodotti naturali: (1) Come selezionare un modello adatto

per rivelare pienamente il potenziale antitumorale dei prodotti della natura? Data l'eterogeneità del cancro, è stato ben accettato che un composto che non mostra attività verso un modello specifico non è necessariamente inattivo per altri modelli tumorali. Inoltre, l'effetto antitumorale dei composti naturali potrebbe derivare dai suoi impatti sul microambiente tumorale o addirittura sull'intero corpo umano; (2) Come identificare efficacemente gli obiettivi diretti e i meccanismi di azione? Il trattamento preciso del cancro richiederà la piena comprensione del meccanismo d'azione dei composti naturali. Gli approcci attualmente disponibili sono ancora tecnicamente piuttosto impegnativi e per lo più a bassa efficienza. Inoltre, poiché è abbastanza comune che i prodotti naturali mostrino meccanismi sfaccettati, è necessario affrontare anche come ottenere il quadro completo del meccanismo dei composti naturali; (3) Come accelerare il processo per sviluppare un promettente composto candidato a un farmaco commercializzato? La maggior parte dei prodotti naturali bioattivi deve affrontare i problemi della produzione su larga scala per soddisfare le esigenze del settore, il che costituisce un grosso ostacolo per quei candidati promettenti che alla fine raggiungono l'obiettivo.

1.2. Diterpeni e derivati come potenziali agenti antitumorali

I tumori sono malattie complesse e sono considerati una delle cause di morte più letali in tutto il mondo (Siegel et al. 2016). Il GLOBOCAN (l'Osservatorio Mondiale sul Cancro) stima circa 14.1 milioni di nuovi casi di cancro ogni anno e 8.2 milioni di decessi si sono verificati, per esempio, nel 2012 in tutto il mondo. Il peso maggiore riguarda i paesi meno sviluppati, dove attualmente rappresenta circa il 57% totale dei casi di malattia e il 65% dei decessi per cancro in tutto il mondo (Torre et al. 2015). Negli Stati Uniti, nel 2016, sono stati rilevati 1.685.210 nuovi casi di cancro e, tra questi, sono stati previsti 595.690 decessi (Siegel et al. 2016). Circa 4.5 milioni di nuovi americani cancerosi aumenteranno dal 1° gennaio 2014 al 1° gennaio 2024 (DeSantis et al. 2014).

L'impiego di preparati medici con prodotti di origine vegetale è conosciuto fin dall'antichità e, recentemente, questi sistemi sono entrati a far parte di studi clinici o a fornire cavi per composti che sono entrati in studi clinici, in particolare come

agenti antitumorali (Harvey et al. 2015). Chen et al. (2016a) suggeriscono che la fitoterapia può essere utilizzata come opzione terapeutica di iniziativa per la gestione del cancro. Più del 50% dei moderni farmaci antitumorali proviene dai prodotti naturali. Tra i prodotti naturali, le piante sono state a lungo una fonte produttiva di metaboliti bioattivi, compresi i farmaci antitumorali (Kim et al. 2010; Arumuggam et al. 2015; Islam et al. 2016a; Sicuro and Kasiappan, 2016).

I terpenoidi e i composti aromatici contenuti negli oli essenziali sono stati introdotti come agenti antitumorali significativi in molti studi (Lesgards et al. 2014). Tra i terpeni, i diterpeni sono oggi sotto i riflettori per le loro promettenti attività biologiche (Islam et al. 2016a; 2016b). Sono già stati introdotti numerosi potenziali diterpeni antitumorali e loro derivati, come i taxani (ad es. taxolo/paclitaxel/paclitaxel legato all'albumina) (Hoy 2014; Weaver 2014), triptolide (Li et al. 2014a), oridonina (Xu et al. 2016c), andrographolide (Aromdee 2014; Islam 2016) e diterpeni del caffè (es. acido caffeico e kahweol) (Lee et al. 2012). È stato dimostrato che questi diterpeni e i loro derivati agiscono contro una varietà di tumori, compresi quelli animali, umani e/o di altro tipo, e le loro linee cellulari, nonché su svariati microrganismi.

Questa sezione introduttiva esamina i diterpeni e i loro derivati di origine naturale o di sintesi che agiscono contro varie linee tumorali.

1.3. Caratteristiche dei diterpeni antitumorali

1.3.1. Effetti citotossici

L'effetto citotossico sulle cellule tumorali è la preoccupazione principale di qualsiasi terapia antitumorale, che può essere raggiunta attraverso uno o più percorsi (Principi di chemioterapia, 2014). È stato scoperto che gli edicoronali A e B isolati dall'*Hedychium coronarium* J.Koenig esercitano effetti citotossici da moderati a potenti sulle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) (Zhan et al. 2012). D'altra parte, i diterpeni con scheletro deidroabietico hanno mostrato citotossicità entro valori di concentrazione inibitoria semiminima (IC₅₀) da 0.75 a 10.65 µM in HCC (SMMC-7721), cancro ai polmoni (A-549), glioma (C-6) e cellule del carcinoma mammario (MCF-7) (Rao et al. 2012). Quattro

diterpenoidi isolati da *Anopterus macleayanus* F.Muell. hanno mostrato potenti effetti citotossici con valori di $IC_{50} < 400$ nM su cellule del cancro alla prostata umana (LNCaP, C4-2B e DuCaP) e sulle linee cellulari non maligne (BPH-1 e WPMY-1) (Levrier et al. 2015). Inoltre, il diterpene caseariagraveolina ha fortemente inibito le cellule del cancro orale e mammario con valori di IC_{50} rispettivamente di 2.48 e 6.63 μ M (Meesakul et al. 2016). È stato riscontrato che sette radosine (*ent-6,7-secokaurane*), isolate da *Rabdosia serra* (Maxim) Hara, producono effetti citotossici da deboli a moderati su due linee cellulari tumorali umane (Wang and Xuan, 2016). D'altra parte, i vibsanolici C–H e la vibsanina X, che sono stati isolati da *Viburnum odoratissimum* Ker Gawl., hanno esercitato un effetto citotossico significativo (IC_{50} : tra 3.35 e 11.30 μ M) nelle linee cellulari HL-60, SMMC-7721, A-594, MCF-7 e SW-480 (He et al. 2016a).

I diterpeni di *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr. (Liu et al. 2012), *Clerodendrum splendens* G. Don (Faiella et al. 2013), *Fagonia mollis* Del. (Sallam et al. 2014), *Isacina trichantha* Oliv. (Zhao et al. 2015b), *Hedychium longipetalum* X. Hu & N. Liu (Zhao et al. 2015a), *Micromonospora* sp. (Mullowney et al. 2015), *Cespitularia taeniata* May (Wang et al. 2015b), *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (He et al. 2015), *Nephtea columnaris* Studer (Hsiao et al. 2015), *Bursera microphylla* Gray (Messina et al. 2015), *Teucrium viscidum* Blume, Bijdr. (Gao et al. 2015a), *Euphorbia ebracteolata* Hayata (Yuan et al. 2016), *Euphorbia aellenii* Rech.f. (Yazdiniapour et al. 2016), *Perenniporia subacida* (Peck) Donk (Wen et al. 2016), *Abies fargesii* Franch. (Wu et al. 2016) e *Premna tomentosa* Willd. (Rekha et al. 2016), soggetti a diversi studi biologici, hanno esercitato notevoli effetti citotossici su un certo numero di linee cellulari tumorali umane. L'attività e il meccanismo di azione di alcuni diterpeni naturali e semi-sintetici è riportata in **Tabella 1**.

Tabella 1. Diterpeni e/o derivati con attività antitumorale.

Diterpeni/ derivati sintetici	Sistemi testati	Potenza/ meccanismo d'azione	Riferimenti
Alcyonolide e altri cinque diterpeni isolati da ssp. di <i>Cespitularia</i>	Cellule HCT-116	IC ₅₀ tra 5.85 e 91.4 μ M	Roy et al. 2012
Dieci diterpeni isolati da <i>Simularia</i> ssp.	Linee cellulari tumorali umane (SF-268, MCF-7 e H460)	IC ₅₀ tra 6.8 e 175 μ M	Chen et al. 2012
Neocaesalpine AA, AB, AD, AE e 12 α -methoxy,5 α ,14 β -dihydroxy-1 α ,6 α ,7 β -triacetoxycass-13(15)-en-16,12-olide da <i>Caesalpina minax</i>	Cellule tumorali HeLa, HCT-8, HepG-2, MCF-7 e A549	Attività moderata con IC ₅₀ compreso tra 18.4 e 83.9 μ M	Ma et al. 2012b
Eryngiolide A da <i>Pleurotus eryngii</i>	Linee cellulari tumorali HeLa e HepG2	Attività moderata (IC ₅₀ : 20.6 μ M)	Wang et al. 2012
Cavernenes A-D e kalihinenes E e F estratti da <i>Acanthella cavernosa</i>	Linee cellulari tumorali umane (HCT-116, A549, HeLa, QGY-7701 e MDA-MB-231)	Valori di IC ₅₀ nel ranfe 6-18 μ M	Xu et al. 2012
Simplexins A e P-S estratte da <i>Klyxum simplex</i>	Linee cellulare tumorali K-562, CCRF-CEM, T47D e MOLT4	ED ₅₀ compreso tra 2.7 e 30.3 μ M	Wu et al. 2012
Jaridonin da <i>Isodon rubescens</i>	Linea cellulare MGC-803	ATM, Chk1, Chk2, Cdc2 e CDK2 risultavano sovregolati, mentre decrescevano le espressioni in Cdc2 e CDK2. Il ciclo cellulare era arrestato alla fase G2/M Potente attività citotossica mostrata da alcuni diterpeni.	Ma et al. 2016b
Caryopincaolide A-L da <i>Caryopteris incana</i>	Cellule tumorali umane	Caryopincaolide A induce apoptosi nelle cellule Hey e A-549	Zhao et al. 2016
Quattro diterpeni isolati da <i>Euphorbia piscatoria</i>	Linfoma L5178Y	Attività antiproliferativa (IC ₅₀ compreso tra 39.51 e 66.02 μ M) Inibisce la proliferazione cellulare, induce apoptosi e incrementa la sensibilità agli agenti chemioterapici	Reis et al. 2014b
Pseudolaric acid B da pseudolarix	Linea cellulare MDR del tumore gastrico	in vitro	Yu et al. 2015

Oridonin da <i>Rabdosia rubescens</i>	Cellule del carcinoma colorettale umano HCT-116 e LoVo	Inibisce la proliferazione cellulare e induce apoptosi in maniera concentrazione- dipendente Effetti antiproliferativi	Yang et al. 2015a
Carnosic acid e carnosol	Adenocarcinoma gastrico epiteliale	Valori di IC ₅₀ compresi tra 39.2 e 48.9 µM	Pertino et al. 2015

1.3.2. Specie reattive dell'ossigeno e specie pro-ossidativi

Un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS/RNS) può portare a stress ossidativo, che può innescare infiammazioni, numerose malattie croniche, cancro e così via (Islam et al. 2016c). Tuttavia, è evidente che la maggior parte delle terapie antitumorali, in particolare la chemioterapia e la radioterapia, agiscono inducendo un effetto ROS cronico sulle cellule tumorali (Islam 2017). In uno studio, è stato scoperto che la longikaurin A aumenta la morte cellulare mediata da ROS nelle cellule tumorali H929 (Zhao et al. 2012). L'attività mostrata è risultata notevolmente più interessante rispetto a quella mostrata dall'altra promettente oridonina diterpenica, dove è stata segnalata anche una morte cellulare apoptotica. D'altra parte, longikaurin A, isolata da *Isodon ternifolius* (D.Don) Kudô, insieme all'induzione di ROS, ha causato una morte cellulare apoptotica e arrestato il ciclo cellulare in fase G2/M nelle cellule HCC e SMMC-7721, nonché nel modello di xenotrapianto SMMC-7721 (Liao et al. 2014). Il diterpene fenolico carnosolo ha aumentato i livelli di ROS e indotto la regolazione della fosforilazione delle chinasi 1 e 2 mediante segnale extracellulare (pERK1/2) con un arresto del ciclo cellulare in fase G2 nelle cellule MDA-MB-231 (Al Dhaheri et al. 2014). Il triptolide, un epossido diterpenoide, ha mostrato una morte cellulare apoptotica regolando la produzione di ROS nelle vie mitocondriali nelle cellule del cancro rinofaringeo umano HNE1/DDP resistenti al DDP (Wang et al. 2015c). Huang et al. (2015) suggeriscono che cinque diterpeni isolati da *Cladiella hirsuta* Tixier-Durivault hanno ridotto la generazione di ROS, per mostrare effetti antinfiammatori e antiproliferativi sui neutrofili umani normali. In un altro studio, il lattone ginkgolide B (da *Ginkgo biloba* L.) ha ridotto la formazione di ROS indotta da cisplatino attraverso la riduzione dell'espressione di NADP ossidasi 2 (NOX2) e ha migliorato

l'attività antitumorale attraverso la proteina chinasi B (Akt)-fattore nucleare (NF)-fattore 2 correlata a E2 (Nrf2)-eme ossigenasi-1 (HO-1) e un'inibizione delle vie di apoptosi mitocondriale nelle cellule uditive HEI-OC1 (Ma et al. 2015a).

Inoltre, in tre linee cellulari tumorali umane, sette diterpeni isolati da *Teucrium fruticans* L., hanno mostrato un significativo effetto inibitorio inducibile all'ossido nitrico sintasi nei macrofagi RAW 264.7 (Lv et al. 2015), mentre il derivato del tanshinone I, il diidrotanshinone I, ha indotto caspasi e ROS-apoptosi in topi con immunodeficienza combinata, non obesi, portatori di cancro al colon (tumori xenotrapianti) (Wang et al. 2015g). Il lattone diterpenoide, andrographolide trovato da *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees, ha ridotto ROS e aumentato i livelli di superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT) con un aumento dell'espressione di Nrf2, tioredossina-1 (Trx-1) e proteine HO-1 in cellule β pancreatiche di topo (Yan et al. 2016). Insieme all'induzione di ROS, è evidente che l'andrografolide arresta il ciclo cellulare nelle fasi S e G2/M e diminuisce il potenziale di membrana mitocondriale (MMP), nonché causa un'esternalizzazione della fosfatidil serina nella linea cellulare MDA-MB-231 (Banerjee et al. 2016). In quest'ultimo caso, è stata anche segnalata una morte cellulare apoptotica tramite le vie modulatorie della caspasi-3, -9, Bax, Apaf-1, Bcl-2 e Bcl-xL. L'effetto antitumorale mediato da ROS di alcuni altri diterpeni è riportato anche da Lin et al. (2015), Kang et al. (2015), Gao et al. (2015b), Yang et al. (2016), Chang et al. (2016), Erharuyi et al. (2016), Ma et al. (2016a), He et al. (2016b) e Zhang et al. (2016a).

1.3.3. Apoptosi, arresto del ciclo cellulare e autofagia

L'apoptosi, il processo di morte cellulare programmata, è un evento cruciale per eliminare le cellule cancerose (Vanden Berghe et al. 2013), mentre il ciclo cellulare svolge un ruolo importante per dividere e rigenerare le cellule dopo un certo tempo (Dong et al. 2014). Tuttavia, a differenza dall'apoptosi, l'autofagia è considerata un evento di morte cellulare sicura, poiché manifesta un evento suicida per le cellule danneggiate o cancerose (Mizushima and Komatsu, 2011). Tutti questi eventi mantengono un'omeostasi all'interno di un ospite. La jolkinolide B da *Euphorbia*

fischeriana Steud. è stata individuata causare causa morte cellulare apoptotica tramite vie di segnalazione mitocondriale e fosfatidilinositolo-3 chinasi/Akt (PI3K/Akt) nelle cellule MDA-MB-231 (Lin et al. 2012), mentre i caffè derivati diterpenoici cafestol e kahweol, agiscono tramite scissioni di Bid, caspase-3 e poli-ADP ribosio polimerasi (PARP), e dalla sovraregolazione del rapporto Bax/Bcl-xL nelle cellule MSTO-211H e H28 (Lee et al. 2012). D'altra parte, i diterpenoidi *neo-clerodanici* isolati da diverse *Salvia* ssp. sono risultati pro-apoptotici mirando al lisato cellulare U937 e causando una morte cellulare apoptotica (Faiella et al. 2012). L'acido kaur-16-en-19-oico (Dose: 30, 50 o 70 μ M) aumenta l'espressione dei geni apoptotici (caspasi-8 e caspasi-3) e diminuisce l'espressione dei geni antiapoptotici (miR-21 e c-FLIP) in cellule U87 (Lizarte Neto et al. 2013). Xu et al. (2013) hanno suggerito che il jolkinolide B, ritrovato in *E. fischeriana* Steud, nelle cellule di cancro al seno umano MCF-7, esercitasse un'azione apoptotica attraverso la via di segnalazione PI3K/Akt. Un'apoptosi mediata da *ent-18-acetossi-7 β -idrossi kaur-15-oxo-16-ene*, insieme all'effetto antitumorale indotto dall'attivazione della protein chinasi attivata dal mitogeno (MAPK), è stata riportata per la prima volta anche nelle cellule HCC e SK-HEP1 da Sul et al. (2013).

Il 7 α -acetossiroileanone, l'orminone, il royleanone, il 7-ketoroileanone e il sugiolo, da *Peltodon longipes* A.St.Hil. ex Benth. erano conosciuti per causare apoptosi e arresto del ciclo cellulare nelle fasi G1/G0 e S nella linea cellulare di cancro del pancreas umano MIA PaCa-2 (Fronza et al. 2012), mentre il 7-etossirosmanolo ha indotto l'arrestato in fase G2/M e ha esercitato morte cellulare apoptotica attraverso la via dipendente dalla caspasi-3 e dalla caspasi-9 nelle cellule del neuroblastoma umano (Tabata et al. 2012). È stato scoperto che il diterpenoide derivato dalla clorofilla, il fitolo, esegue un'attività antitumorale attraverso l'induzione dell'apoptosi mediata da caspasi-9/3 e l'inibizione della segnalazione di transizione mesenchimale epiteliale nelle cellule HCC (Huh7 e HepG2) (Kim et al. 2015a). L'apoptosi e gli eventi di arresto del ciclo cellulare sono evidenti anche con strutture quali longikaurin A (Zou et al. 2013), xerophilusin B (Yao et al. 2015a), indolo[3,2- β]andrographolide (Song et al. 2015), tanshinone IIA (Munagala et al. 2015), sclareol (Wang et al. 2015h), ponigidin (Du et al. 2015) e (5R,8R,9S,13R)-halim-1,10-ene-15,16-diolo (Silva et al. 2015).

Continuando la panoramica sulle proprietà antitumorali di diversi diterpeni naturali, l'asperolide A ha inibito la proliferazione delle cellule del carcinoma polmonare NCI-H460 mediante arresto della fase G2/M insieme a un'attivazione della segnalazione Ras/Raf/MEK/ERK e della via p21 p53-dipendente (Lv et al. 2013), mentre l'henryin ha ridotto l'espressione della ciclina D1 e c-myc, e l'arresto di fase G1/S indotto attraverso l'associazione alterata del complesso trascrizionale β -catenina/fattore di trascrizione 4 (TCF4), bloccando direttamente il legame della β -catenina al TCF4 nelle cellule HCT116 (Li et al. 2013b). In un altro studio, Burmistrova et al. (2013) hanno evidenziato come 30 diterpenoidi hanno causato la morte cellulare associata al rilascio di proteine mitocondriali, incluso il citocromo c, secondo attivatore derivato dai mitocondri delle caspasi (Smac)/DIABLO e AIF (fattore che induce l'apoptosi), accompagnato da dissipazione dell'MMP ($\Delta\Psi$) e modulazione dell'inibizione della segnalazione della chinasi regolata dal segnale extracellulare e della via p38 MAPK, in un numero diversificato di linee cellulari tumorali umane (HL-60, U937, Molt-3, SK-MEL-1 e MCF-7). Inoltre, è stato evidenziato che la lasiodina isolata da *R. serra* attiva le vie apoptotiche dipendenti da Apaf-1/caspasi causando la soppressione delle vie di segnalazione di AKT/MAPK e cicloossigenasi (COX)-2/NF- κ B nelle cellule tumorali nasofaringee (Lin et al. 2014b).

L'acido diterpenico carnosico, presente nella salvia e nel rosmarino, ha mostrato un'apoptosi mediata dal ligando che induce l'apoptosi (TRAIL) correlata al TNF attraverso la *downregulation* dell'espressione di c-FLIP e Bcl-2 e la sovraregolazione dell'espressione di DR5, Bim e PUMA mediata dallo stress ER in cellule di carcinoma renale umano (Caki, ACHN e A498), HCC (SK-HEP-1) e carcinoma mammario (MDA-MB-231) (Jung et al. 2015). Gli altri diterpeni responsabili dell'apoptosi mediati da TRAIL sono lo scopadulciol (Fuentes et al. 2015), il tanshinone IIA (Chang et al. 2015; Lin et al. 2015) e il triptolide (Brincks et al. 2015). È stato anche evidenziato che il tanshinone IIA (a 2, 4 o 8 μ g/mL) induce l'apoptosi e inibisce la proliferazione cellulare tramite la caspasi-4 e le vie dipendenti da CHOP nelle cellule Ec-109 (Zhu et al. 2016). In un recente studio, Karmakar et al. (2016), hanno scoperto che un pimarano diterpene estratto da *Boesenbergia pandurata* Roxb. esercita una morte cellulare apoptotica

sovraregolando DR4, DR5, p53, Fas, CHOP, Bak e caspasi-3, -8 e -9 scisse e sottoregolazione di Bcl-2, c-FLIP e glicogeno sintasi chinasi 3 beta (GSK3 β) in AGS resistenti a TRAIL e cellule non cancerose (HEK293).

Il fosfato di oridonina, nelle cellule MDA-MB-436 e MDA-MB-231, ha indotto apoptosi e autofagia (Li et al. 2015b), mentre i tanshinoni hanno causato lo stesso processo nelle cellule di cancro del polmone 95D (Gao et al. 2015b). Inoltre, l'oridonina, co-trattata con acido valproico, ha mostrato sinergicamente effetti antiproliferativi, e inducenti l'apoptosi, tramite la via di segnalazione MAPK nonché *downregulation* del rapporto Bcl-2/Bax, rilascio del citocromo c e attivazione della caspasi-9, e infine attivazione della caspasi-8 nelle cellule HL-60 (Shi et al. 2016). D'altra parte, con il cisplatino, ha anche indotto sinergicamente l'apoptosi attraverso la *downregulation* della traslocazione nucleare dell'espressione di p50, p65 e NF kappa B (NF- κ B) nelle cellule HepG2 (Dong et al. 2016).



Fig. 5. Principali vie antitumorali dei diterpeni.

In uno studio, un analogo dell'andrografolide, nella cellula U937 leucemica umana, ha causato apoptosi e autofagia indotta tramite il percorso dipendente da

PI3K/Akt/mTOR (Kumar et al. 2015). La morte cellulare apoptotica e autofagica indotta da andrografolide è stata segnalata anche in xenotrapianti SKOV3 ovarici umani da Zhang e Qiu (2015). In **Fig. 5** sono state presentate vie antitumorali comuni diterpeniche con relativi meccanismi.

1.3.4. Effetti sulla proliferazione e differenziazione cellulare

In generale, la proliferazione e la differenziazione cellulare mostrano una notevole relazione inversa, ma nelle cellule tumorali questa relazione è incontrollata poiché le cellule immature subiscono una divisione rapida e anormale (Ruijtenberg and van den Heuvel, 2016). Pertanto, un effetto su questa situazione non armonizzata può essere un buon obiettivo del trattamento del cancro. In uno studio, è stato scoperto, infatti, che sette *neocaesalpine* isolate da *C. minax* esercitavano una lieve attività antiproliferativa nelle cellule tumorali umane HepG-2 e MCF-7 (Ma et al. 2012c). Inoltre, 11 diterpeni macrociclici di *Euphorbia piscatoria* Aiton. hanno mostrato attività antiproliferativa (IC_{50} compresi tra 39.51 e 66.02 μ M) nelle cellule tumorali gastriche (EPG85-257), pancreatiche (EPP85-181) e del colon (HT-29) umane (Reis et al. 2014a). Il diterpene triptolide ha inibito in modo dose-dipendente la proliferazione cellulare (IC_{50} di 12.7 nM/mL), possibilmente tramite l'inibizione dell'mRNA di HERV-K Np9 e delle sue molecole di segnalazione a valle c-myc, β -catenina, ERK, Akt e proteina Notch1 nella proteina T acuta della leucemia linfocitica cellule Jurkat (Chen et al. 2015). Un certo numero di altri diterpeni antiproliferativi sono stati riportati anche da Reis et al. (2014b), Pertino et al. (2015), Win et al. (2015), Ma et al. (2015b) e Ghanadian et al. (2015) su un certo numero di linee cellulari di cancro umano.

In uno studio recente, le jatrophanes, vale a dire le euphowelwitschines A e B, welwitschene, epoxywelwitschene ed esulatin M, isolati da *Euphorbia welwitschii* (Boiss. & Reut.) Vicens, Molero & C.Blanché, hanno esercitato un'interazione sinergica con il farmaco antitumorale doxorubicina. L'esulatina M, in particolare, ha mostrato una forte attività antiproliferativa selettiva multiresistente (MDR) contro le cellule EPG85-257RDB ed EPP85-181RDB (IC_{50} rispettivamente di 1.8 e 4.8 μ M), mentre l'epossiwelwitschene, e sempre l'esulatina M, hanno indotto

l'apoptosi tramite l'attivazione della caspasi-3 nelle cellule tumorali gastriche (EPG85-257) e pancreatiche (EPP85-181) (Reiset et al. 2016). D'altra parte, il diterpenoide C da *Radix curcumae* (Yujin), nelle cellule SW620 dell'adenocarcinoma del colon umano, ha inibito significativamente la proliferazione cellulare e ha indotto l'apoptosi mediante la segnalazione MAPK e le vie dipendenti dalla caspasi-3 (Shen et al. 2014). Gli altri diterpeni antiproliferativi, che inducono l'apoptosi, sono stati l'acido pseudolarico B (Yu et al. 2015), l'oridonina (Yang et al. 2015a), l'acido pseudolarico B (Li and Hong, 2015), il cripotanshinone (Yao et al. 2015b), il tanshinone IIA (Zhang et al. 2016b), il tonantzitlolone A e il suo enantiomero sintetico (Pfeffer et al. 2016). Penitrem A, nelle cellule di cancro mammario MDA-MB-231, ha esercitato effetti antiproliferativi, antimigratori e di soppressione della β -catenina totale (Sallam et al. 2013).

1.3.5. Effetti sull'angiogenesi

A differenza della vasculogenesi, nell'angiogenesi si verifica la formazione di nuovi vasi sanguigni (Birbrair et al. 2014). Tuttavia, il tasso di angiogenesi nelle cellule cancerose è notevolmente più alto rispetto alle cellule normali, poiché le cellule tumorali subiscono rapidamente la divisione cellulare, richiedendo così più ossigeno e apporto di nutrienti. A questo proposito, si ritiene che gli agenti antiangiogenesi siano un buon bersaglio nella terapia del cancro (Lu et al. 2016). In alcuni studi recenti, numerosi prodotti naturali, in particolare composti di origine vegetale come polifenoli e oli essenziali, sono stati introdotti come agenti antiangiogenici (Khalid et al. 2016; Lu et al. 2016).

In uno studio di rilevanza internazionale, è stato scoperto che il tanshinone IIA inibisce l'angiogenesi e la crescita del cancro attraverso la soppressione del fattore 1 alfa ipossico inducibile (HIF-1 α) e del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) negli xenotrapianti di cancro al seno umano in topi adulti (Li et al. 2015c). Inoltre, il palmitato di cafestol e il palmitato di kahweol a 75 e 100 μ M, sulle cellule endoteliali dermiche microvascolari umane, hanno esercitato un effetto antiangiogenesi mediato da VEGFR-2 (Moeenfard et al. 2016). È anche evidente

che taxen e andrographolide, e loro derivati, mostrano un effetto antiangiogenesi in un certo numero di linee cellulari di cancro umano (Weaver 2014; Islam 2016), mentre il tanshinone I isolato da *Salvia miltiorrhiza* Bunge, ha mostrato inibizione nelle cellule endoteliali vascolari (Wang et al. 2015f). In quest'ultimo caso è stata segnalata anche un'inibizione della formazione di tubi vascolari. Va menzionato che un certo numero di taxen, inclusi docetaxel e paclitaxel, sono farmaci antitumorali ampiamente studiati e che sono in fase di sperimentazione clinica (fasi da I a III) (Khalid et al. 2016). Gli effetti antiangiogenesi di alcuni diterpeni sono riportati in Fig. 6.

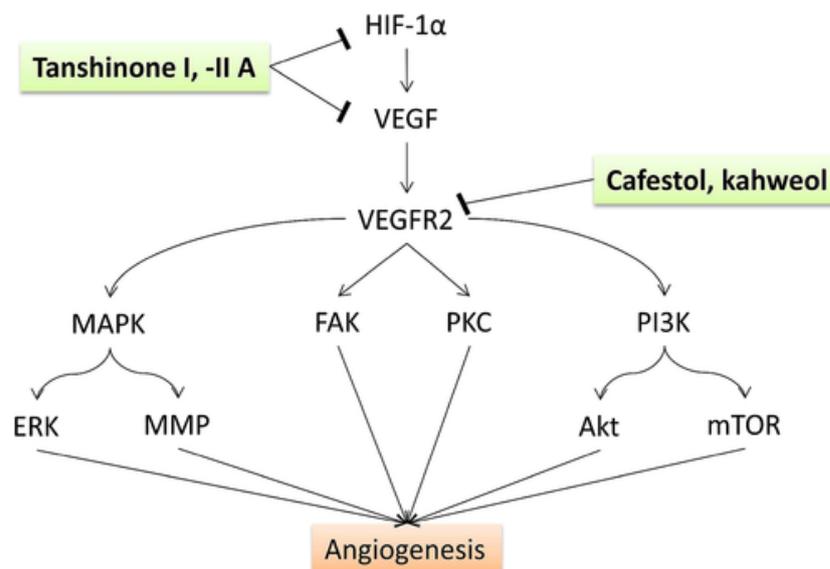


Fig. 6. Principali vie dell'angiogenesi prese di mira dai diterpeni.

1.3.6. Effetti su migrazione cellulare e metastasi

La migrazione cellulare è un processo centrale ed è essenziale nello sviluppo e nel mantenimento degli organismi multicellulari. Gli errori che si verificano durante questo processo possono portare ad alcune gravi conseguenze, inclusa la formazione di tumori e metastasi. Tuttavia, le cellule possono migrare in risposta a specifici segnali esterni, inclusi segnali chimici e meccanici (Ganguly et al. 2012). In questo senso, gli agenti chimici possono essere incorporati come bersagli terapeutici. È stato studiato che il tanshinone IIA inibisce la migrazione delle cellule

del cancro gastrico (**Fig. 7**) diminuendo l'espressione proteica di NF- κ B-p65, COX-2 e metalloproteinasi della matrice (MMP)-2, -7 e -9 (Su 2016). In caso contrario, è stato anche riportato che i 2,11-cembranoidi producono un'attività antimigratoria in diverse cellule tumorali umane (Welford et al. 2016).

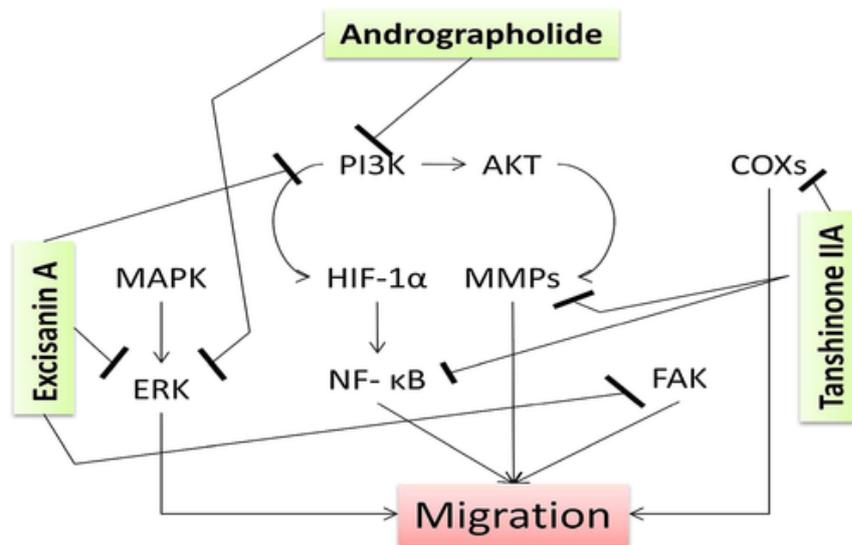


Fig. 7. Vie di migrazione cellulare in cui agiscono i diterpeni.

D'altra parte, la proliferazione cellulare è correlata alla migrazione cellulare, che definisce la capacità delle cellule di diventare mobili e di muoversi attraverso la matrice extracellulare all'interno di un tessuto o di infiltrarsi nei tessuti vicini. Le cellule tumorali che diventano invasive sono spesso disseminate in un sito secondario e formano facilmente metastasi. L'eccisanina A, isolata da *Isodon macrocalyx* Kudo ha inibito la proliferazione sopprimendo le espressioni di MMP-2 e MMP-9, la via di segnalazione dell'integrina β 1/FAK/PI3K/Akt/ β -catenina nelle cellule MDA-MB-231 e SKBR3 (Qin et al. 2013). Inoltre, è stato riscontrato che il triptolide (1 mg/kg, 3 volte la settimana per 9 settimane), nei topi portatori di cellule H358, inibisce la migrazione cellulare, l'invasione e la metastasi (Reno et al. 2015). L'inibizione diterpenica dell'invasione e della metastasi delle cellule tumorali è mostrata in **Fig. 8**.

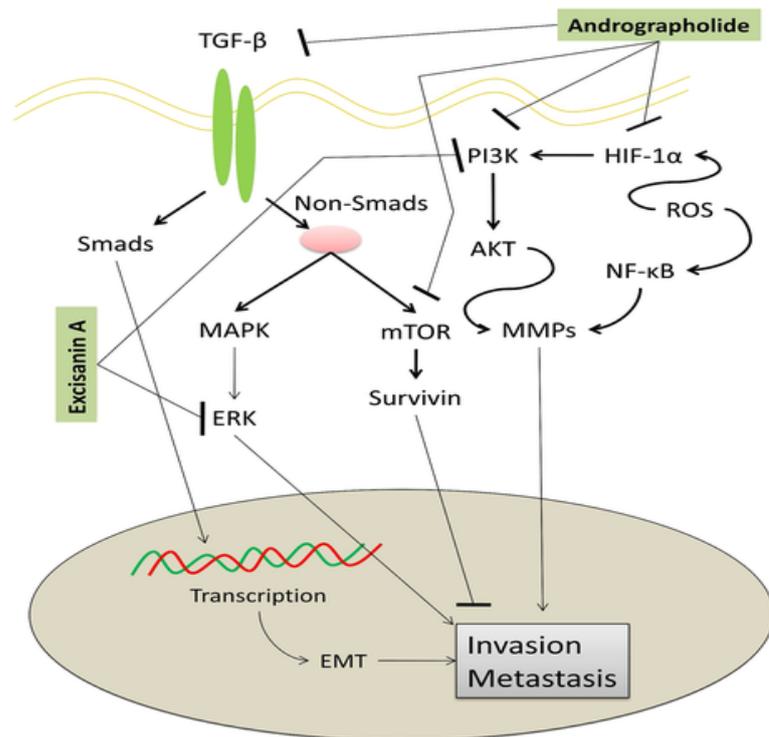


Fig. 8. Principali vie di invasione cellulare cooperativa e metastasi su cui agiscono i diterpeni.

1.3.7. Effetti immunosoppressivi e chemiopreventivi

L'immunosoppressione è un processo in cui si verifica una riduzione dell'attivazione o dell'efficacia del sistema immunitario (Shelton et al. 2016). Tuttavia, una soppressione immunitaria parziale, specialmente nella sede del cancro, può essere un buon obiettivo nella terapia del tumore. Il subglutinolo A da *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. & Reinking) P. E. Nelson, T. A. Toussoun, & Marasas ha mostrato un effetto immunosoppressivo nella cellula intera MCF-7 (Lim et al. 2015).

Tuttavia, un cancro secondario mediato dal trattamento antitumorale è una conseguenza comune, specialmente con la radioterapia e la chemioterapia. I chemiopreventivi sono gli agenti farmacologici che inibiscono lo sviluppo del cancro invasivo o bloccando il danno al DNA o arrestando o invertendo la progressione delle cellule premaligne (Tsao et al. 2004). Kim et al. (2012) hanno suggerito che l'acido acantoico isolato da *Acanthopanax koreanum* Nakai ha

mostrato un potenziale chemiopreventivo e terapeutico del cancro attraverso vie di segnalazione mediate da p38 MAPK nelle cellule HL-60.

1.3.8. Effetti sulle cellule tumorali resistenti ai farmaci

La resistenza ai farmaci è un fenomeno comune, soprattutto in caso di farmaci antimicrobici, psicoterapeutici e antitumorali. La glicoproteina P1 (chiamata anche glicoproteina della permeabilità, P-gp o Pgp) è una pompa di efflusso ATP-dipendente con ampio substrato ed evoluta come meccanismo di difesa contro le sostanze nocive durante l'evoluzione della vita. La P-gp è codificata dal gene di resistenza multifarmaco 1 (MDR1), noto anche come ABCB1 o cluster di differenziazione 243 (CD243), e funziona come un'importante proteina della membrana cellulare per pompare molte sostanze estranee fuori dalle cellule (Shenet al. 2011).

Sedici diterpeni macrociclici isolati da *Euphorbia* sp. hanno mostrato un'attività di inversione dell'MDR tramite la via di inibizione dell'efflusso dipendente dalla P-gp nelle cellule di adenocarcinoma del colon umano MDR (COLO 320 MDR) (Reis et al. 2012). In un altro studio, l'euphomelliferina e l'euphomelliferene A, isolati da *Euphorbia mellifera* W.T.Aiton., hanno mostrato attività di inversione dell'MDR in modo dose-dipendente nelle cellule di topo trasfettato dal gene MDR1 (L5178Y MDR) e nelle cellule di adenocarcinoma del colon umano (COLO 320) (Valente et al. 2012). Altri esempi di diterpeni che hanno causato inversione MDR sono i jatrophanes (Lu et al. 2014; Rédei et al. 2015), il latirolo (Jiao et al. 2015) e diterpeni da *Euphorbia* sp. (Wiśniewski et al. 2016).

In alcuni studi, il diterpene lattone andrografolide ha inibito le cellule tumorali della prostata umane stimulate dagli androgeni e resistenti alla castrazione, dove ha ridotto significativamente le espressioni del recettore degli androgeni e dell'interleuchina (IL)-6 (Chun et al. 2010; Liu et al. 2011). Karmakar et al. (2016) hanno dimostrato che un pimarane diterpene isolato da *B. pandurata* Roxb. ha esercitato morte cellulare apoptotica sovregolando DR4, DR5, p53, Fas, CHOP, Bak e causato scissione delle caspasi-3, -8 e -9, insieme a una sottoregolazione di Bcl-2, c-FLIP e GSK-3 β in TRAIL- cellule AGS resistenti. Inoltre, è stato scoperto

che il triptolide inverte l'attività resistente al tassolo nella linea cellulare dell'adenocarcinoma polmonare, inibendo la via di segnalazione NF- κ B (Jiang et al. 2016).

1.3.9. Altri effetti biologici

I diterpeni sono coltelli con più lame a livello bioattivo. La disossidensina B, C ed E isolate da *Dysoxylum densiflorum* (Blume) Miq. hanno mostrato un moderato effetto citotossico su un certo numero di linee cellulari tumorali umane (Gu et al. 2014), mentre è evidente che l'oridonina inibisce la crescita cellulare, probabilmente regolando l'espressione dei miRNA in cellule di cancro al pancreas umano BxPC-3 (Gui et al. 2015).

L'acido carnosico nelle cellule del neuroblastoma umano SH-SY5Y ha soppresso l'attivazione delle cascate di caspasi riducendo l'oligomerizzazione intracellulare del monomero esogeno A β 42/43, che può essere una buona indicazione dell'uso di questo farmaco nei pazienti di Alzheimer (Meng et al. 2015). D'altra parte, l'andrografolide (40 e 80 mg/kg), nel ratto, ha conferito un effetto ipoglicemizzante e migliorato la resistenza all'insulina nei ratti diabetici di tipo 2 (Li et al. 2015e). Il diterpene triptolide ha mostrato un effetto antitumorale sottoregolando la via di segnalazione mediata dal recettore degli estrogeni alfa (ER α) nelle cellule MCF-7 ER α -positive e nelle cellule MDA-MB-231 ER α -negative (Li et al. 2015a). Inoltre, il triptolide in un modello di xenotrapianto di cancro al pancreas ha esibito un effetto antitumorale *downregulation* di 11 geni, tra cui c-myc, HMG-box 9 (SOX9) correlato a SRY e proto-oncogene 2 ETS (Ets2) e un *over*-espressione di c-myc nelle cellule del cancro del colon, promuovendo una maggiore espressione di HIF-1 α e VEGF (Ding et al. 2015). È stato anche riscontrato che il triptolide (0.25 mg/kg; 2 volte/settimana per 1, 2 e 3 mesi) nei topi C57BL/6 riduce una fibrosi polmonare attenuata indotta da radiazioni (Yang et al. 2015b). Questo diterpene ha anche esercitato un effetto antitumorale tramite il componente della trascrittasi inversa della trascrizione della telomerasi (hTERT), possibilmente inibendo la proteina 1 di specificità del fattore di trascrizione (Sp1) nelle cellule di linfoma a versamento primario (Long et al. 2016).

È stato scoperto che l'andrografolide inibisce una perdita ossea indotta da carenza di estrogeni attraverso la soppressione dell'attivatore del recettore dell'osteoclastogenesi stimolata dal ligando NF kappa-B (RANKL) e NF-κB e NF delle cellule T attivate e delle attività citoplasmatica 1 (NFATc1) nell'osso del topo (Wang et al. 2015e). Questo diterpene ha anche inibito le cellule di mieloma multiplo attraverso la via di segnalazione TLR4/NF-κB (Gao e Wang, 2016) ed è evidente che sopprime il contenuto di melanina e l'attività TYR diminuendo Akt GSK3β-dipendente; fattore di trascrizione associato alla microftalmia (MITF) e famiglia TYR e promuove la degradazione della β-catenina nelle cellule B16F10, nelle cellule HEM e nella pelle (Zhu et al. 2015). In uno studio, è stato scoperto che il diterpene carnosolo sopprime l'espressione del gene MITF nelle cellule di melanoma di topo B16F10 (Yamahara et al. 2016).

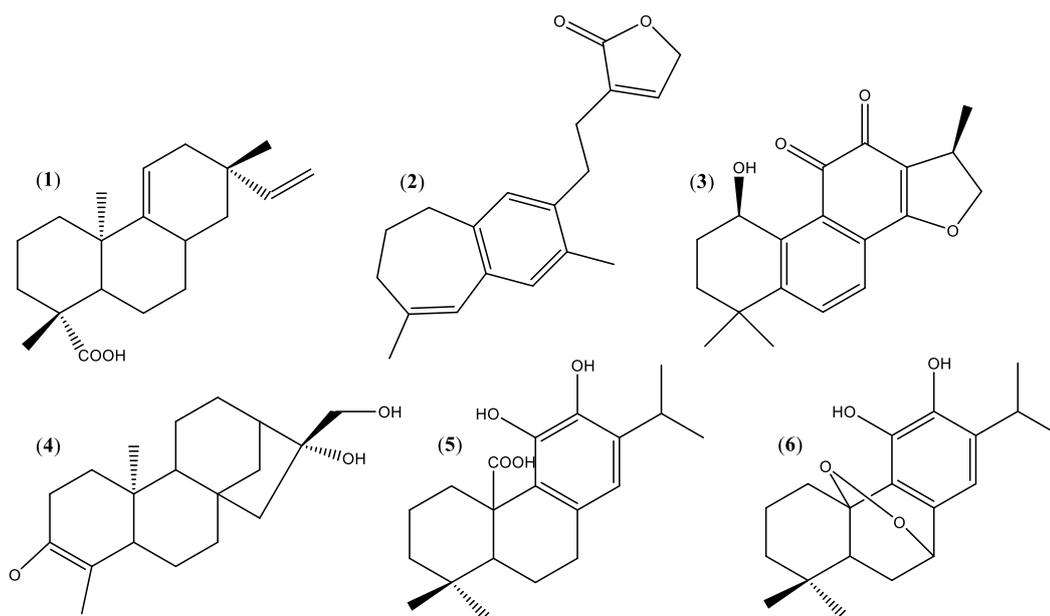


Fig. 9. Strutture chimiche di alcuni importanti diterpeni con abilità antitumorale: (1) acido acantoico; (2) andrographolactone; (3) 1-β-idrossicriptotanshione; (4) cafestol; (5) acido carnosico; (6) carnosolo.

Il tanshinone I e IIA e il criptotanshinone sono stati impiegati per sopprimere l'aurora chinasi A (AURKA) attraverso la sovraregolazione delle espressioni di miR-32 e altri miRNA correlati, nelle cellule di cancro del polmone (Ma et al. 2015c). Inoltre, i diterpeni cembranoidi (Cheng et al. 2014), andrographolide e suoi

analoghi (Mishra et al. 2015), 11 α , 12 α -epossileukamenina E (Ye et al. 2015; Valdés et al. 2017), jesridonina (Wang et al. 2015a), acido carnosico, carnosolo, rosmanolo (Petiwala and Johnson, 2015), clerodano diterpenoidi (Nguyen et al. 2015), rizovarine AF (Gao et al. 2016) e così via, hanno esercitato un effetto antitumorale su un certo numero di linee cellulari tumorali e su altri sistemi biologici. Alcuni importanti diterpeni antitumorali sono stati mostrati in **Fig. 9**.

1.4. Sfide future

Generalmente, gli effetti biologici di un particolare composto dipendono dalla sua concentrazione, dalla via di somministrazione e dal tipo di sistema biologico (Islam et al. 2016c). Islam et al. (2016d; 2016e) hanno riportato che il fitolo è ad azione antiossidante/citoprotettivo a basse concentrazioni (2–160 μ M), mentre è citotossico ad alte concentrazioni (2–8 mM). In questi studi, *in vitro*, è stato riscontrato che il fitolo mostra una capacità antiossidante dipendente dalla concentrazione fino a 16 μ M, mentre una citoprotettività fino a 160 μ M. Tuttavia, a 8 e 16 μ M, il fitolo ha mostrato un effetto ossidativo in un certo numero di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* mutati e non mutati. Inoltre, a 2-8 mM, ha esercitato un effetto citotossico negli eritrociti di ratto. Questo fa sorgere la domanda: quanto sono sicuri i diterpeni? Ad esempio, è evidente che gli esteri del forbolo esercitano un effetto di tumorigenesi in un certo numero di cellule tumorali e test biologici (Schmitt et al. 2014), mentre è evidente che il taxolo sviluppa resistenza in un certo numero di linee cellulari umane (Jiang et al. 2016). Secondo Zhang et al. (2016c), un'elevata espressione del dominio della tioredossina può essere collegata alla resistenza al tassolo nelle cellule tumorali del colon-retto.

Tuttavia, un certo numero di diterpeni e loro derivati, come andrografolide (Chen et al. 2016b; Mittal et al. 2016), fitolo (Costa et al. 2016), carnosolo, acido carnosico (Carvalho et al. 2015), rosmadiale, acido rosmarinico (Petiwala and Johnson, 2015) e jatrophone (Chen et al. 2014b), sono palesi antiossidanti o citoprotettivi. Inoltre, i diterpeni possono agire in una serie di percorsi diversi, ad esempio i diterpeni isolati da *Crossopetalum gaumeri* (Loes.) Lundell. *Wrightia* hanno ridotto la vitalità cellulare delle cellule tumorali umane HeLa (carcinoma della cervice) e Hep-2

(carcinoma del polmone), piuttosto che delle normali cellule Vero (rene della scimmia verde africana) (Miron-Lopez et al. 2014). Alcuni diterpeni hanno dimostrato di essere antinfiammatori in numerosi sistemi biologici (Islam et al. 2015; de Oliveira 2016), mentre altri possono conferire funzioni immunologiche benefiche (Takei et al. 2007, 2008; Pei et al. 2012; Tanabe et al. 2014).

In quanto citoprotettivo, l'uso di antiossidanti con agenti chemioterapici è limitato o può anche essere limitato durante, prima o dopo le strategie di trattamento per la normale protezione cellulare. Questo perché gli antiossidanti possono (i) ridurre l'efficacia dell'agente chemioterapico e (ii) aumentare la possibilità di fuga delle cellule tumorali, (iii) la resistenza ai farmaci e/o la stimolazione dei sistemi di riparazione delle cellule tumorali e (iv) la possibilità di pro- effetti ossidativi sulle cellule normali. Inoltre, la conoscenza del livello di stress ossidativo è fondamentale prima di una particolare terapia antiossidante (Islam et al. 2016c). Si ricorda che, ad oggi, numerosi diterpeni quali fruticolina C, 7 α -metossi-19-acetossi-roileanone, 7 α ,19-diacetossi-roileanone, 7-deidrossi-conacitone (Giacomelli et al. 2013), l'isocoronarina D, la metossicoronarina D, l'etossicoronarina D e il benzoil eugenolo (Endringer et al. 2014) hanno capacità chemiopreventiva in un certo numero di cellule umane.

In uno lavoro internazionale, il palmitato di cafestol e il palmitato di kahweol a 75 e 100 μ M non hanno disturbato l'angiogenesi e la proliferazione nelle normali cellule endoteliali dermiche microvascolari umane (Moeenfarid et al. 2016). In un altro studio, le micelle caricate con triptolide nelle cellule SKOV3 sono aumentate significativamente nell'inibizione della tumorigenicità attraverso l'inibizione della proliferazione, dell'apoptosi, dell'invasione e della migrazione rispetto al gruppo di controllo (Wang et al. 2016a). Mir et al. (2016) hanno anche suggerito che l'andrografolide mostrava un effetto differenziale sulle fasi del ciclo cellulare nelle cellule LNCaP, C4-2b e PC3, dove non influiva sulle cellule epiteliali primarie della prostata.

Anche gli effetti tossici, genotossici o mutageni indotti da farmaci antitumorali dovrebbero essere presi in considerazione nelle cellule normali. È evidente che l'estere diterpenico 12-0-tetradecanoil forbol-13-acetato esercita effetti non

cancerogeni sulle colture C3H/10T1/2 (Parfett and Healy, 2006). Si è scoperto che due nuovi diterpeni denominati marrulibacetal A e desertina, isolati da estratti di diclorometano e metanolo di *Marrubium deserti* de Noé inibiscono l'induzione della β -galattosidasi causata dall'agente mutageno nitrofurantoina (Zaabat et al. 2011), mentre il diterpene pimaradienoico di tipo pimarano acido (a 20, 40 e 80 mg/kg), nei fibroblasti polmonari di criceto cinese (cellule V79), non hanno mostrato effetti genotossici (Kato et al. 2012). La casearina X, un clerodano diterpene di *C. sylvestris*, nel test del micronucleo nelle cellule del midollo osseo del topo, ha protetto il DNA dai danni indotti dagli inquinanti atmosferici causati dalla combustione della canna da zucchero (Prieto et al. 2012). D'altra parte, è stato scoperto che l'acido caftarico, isolato da *Vitis coignetiae* Pulliat ex Planch., mostrava un effetto antimutageno nei confronti della dimetilbutilamina e preveniva l'infiammazione indotta dal 12-0-tetradecanoil forbol-13-acetato nei topi (Arimoto-Kobayashi et al. 2013). Il diterpene manolo a 0.5–8.0 $\mu\text{g/mL}$ è noto per il potenziale antigenotossico (test del micronucleo) nei fibroblasti polmonari di criceto cinese (V79) e nelle cellule dell'epatoma umano (HepG2) (Nicolella et al. 2014).

1.5. Una panoramica sul cancro coloretale

Il cancro coloretale (CRC) è tra i tumori più comuni al mondo e presenta una maggiore incidenza negli uomini piuttosto che nelle donne. Esso cresce lentamente e spesso non comporta sintomi evidenti se non quando non raggiunge dimensioni consistenti. Il suo sviluppo inizia tra la mucosa intestinale e il lume intestinale, tramite la formazione di polipi inizialmente precancerosi che sono accumuli di cellule anormali. Se questi polipi non vengono rimossi, le cellule in continua divisione iniziano ad accumulare mutazioni che promuovono il passaggio a cellule cancerose che acquisiscono un carattere invasivo, favoriscono la formazione di nuovi vasi e si diffondono anche negli organi lontani (Simon 2016). Il carcinoma coloretale può essere di natura sporadica, ereditaria o familiare. Nella maggior parte dei casi il cancro è di tipo sporadico e deriva da mutazioni puntiformi su differenti geni. Nel 70% dei casi di CRC si osservano delle mutazioni sequenziali su specifici geni che poi si concludono con lo sviluppo tumorale. La prima

mutazione avviene in APC (Adenomatous Polyposis Coli), un gene soppressore del tumore che quando mutato favorisce la formazione di polipi. Nel 15% dei casi questi polipi possono progredire in tumore in circa 10 anni. I successivi geni sono KRAS (oncogene che viene attivato), TP53 e DCC, noti oncosoppressori che vengono inattivati e privano le cellule di sistemi di controllo favorendo la proliferazione incontrollata. Nel 25% dei casi l'origine è di tipo familiare, causato da successive mutazioni ereditate che tuttavia non sono classificate tra i casi ereditari. Circa il 5-10%, invece, dei pazienti, hanno sindrome ereditaria. La sindrome più comune è quella di Lynch associata a mutazioni nei geni di riparo di mismatch del DNA. La seconda più comune è quella associata a mutazioni nel gene APC in cui soggetti in giovane età sviluppano precocemente adenomi coloretali che degenerano in cancro (Kuipers et al. 2015). Tra i fattori di rischio che promuovono l'insorgenza tumorale si annoverano fattori che sono modificabili e altri che non lo sono. I fattori di rischio modificabili sono connessi con uno stile di vita scorretto del soggetto e tra questi ritroviamo il fumo, un alto consumo di alcool e l'aumento di peso. Viceversa, un'alimentazione sana con alto consumo di frutta, fibre e vegetali, è inversamente correlata con l'insorgenza tumorale. Ciò può essere ricondotto a differenze socio-economiche e quindi geografiche. Infatti, nei paesi più sviluppati come Europa e Stati Uniti è presente una maggior incidenza tumorale rispetto che a quelli sottosviluppati come Africa e Asia (escluso il Giappone) (Kuiper et al. 2015). Per quanto riguarda i fattori di rischio non modificabili questi sono connessi con la storia personale del paziente. L'età è uno tra i maggiori fattori di rischio: si ha infatti un alto tasso di insorgenza tumorale dopo i 50 anni. Inoltre, precedenti malattie infiammatorie incrementano il rischio o predispongono l'insorgenza di cancro coloretale (Màrmol et al. 2017).

I trattamenti a cui sono sottoposti i pazienti malati di CRC sono differenti in base alla fase di stadiazione di quest'ultimo. Sono suddivisibili in 5 stadi (**Fig. 10**) che vanno dal meno invasivo a quello più invasivo che prevede la formazione di metastasi e l'invasione di organi adiacenti. Più vi è avanzamento tumorale più la prognosi del paziente è severa (Pandurangan et al. 2018). Non è da sottovalutare la prevenzione, soprattutto con l'avanzamento dell'età. La prevenzione, infatti, potrebbe escludere l'insorgenza tumorale tra il 66-75% dei casi.

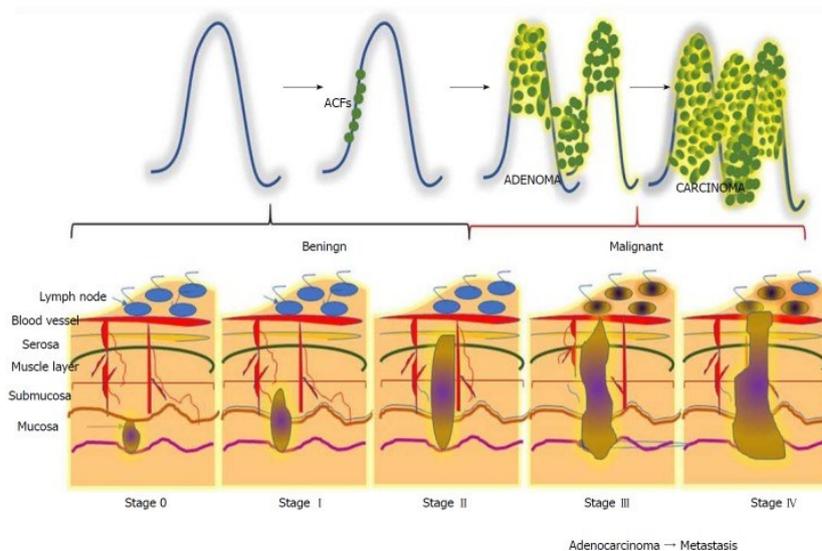


Fig. 10. Stadi della progressione tumorale del cancro coloretale (Pandurangan, et al. 2018).

Una buona prevenzione richiede una alimentazione sana, lo scarso abuso di alcool e fumo, un'attività fisica regolare ma anche screening periodici, soprattutto quando sussiste una predisposizione genica e uno stile di vita errato. La diagnosi in stadi precoci della malattia incrementa la possibilità di intervento e la sopravvivenza stessa del paziente. Ad oggi esistono vari approcci di screening che sono divisi in analisi di campione biologico e di visualizzazione per esplorare l'intestino. I soggetti ai quali viene diagnosticato il CRC sono sottoposti a più terapie in base al grado di avanzamento tumorale. Oltre che all'ablazione chirurgica, i pazienti possono anche essere sottoposti a chemioterapie preoperatorie (neoadjuvanti) o postoperatorie (adjuvanti) (Binefa 2014). Gli agenti chemioterapici di maggior impiego per il trattamento del CRC sono: 5- fluorouracile (5-FU), irinotecano e l'oxaliplatino, chemioterapici che hanno il fine di bloccare la proliferazione delle cellule tumorali, sebbene non tutti i pazienti rispondano bene a questi trattamenti. Il 5-FU è un chemioterapico che viene utilizzato per più tipi di tumore maligno come il tumore alla pelle, al seno, allo stomaco, all'esofago e per il CRC. Blocca la sintesi della timidina necessaria per la replicazione del DNA. Viene somministrato sia per via endovenosa che orale e, nonostante sia un chemioterapico molto efficiente, ha molti effetti collaterali sul paziente. Infatti, per modulare questi effetti, viene usato in associazione con il Leucovorin (acido folinico), un farmaco utilizzato

per ridurre gli effetti tossici del 5-FU. Circa la metà dei pazienti con cancro coloretale in fase metastatica sono resistenti al 5-FU. Tale chemioresistenza è da attribuire ad alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del farmaco. Per esempio, la timidilato sintasi è uno tra i principali target che viene inibito dal 5-FU; la riduzione della timidilato sintasi non permette la replicazione del DNA nella cellula tumorale che va incontro a morte. L'incrementata espressione della timidilato sintasi rende i pazienti chemioresistenti al trattamento con il 5-FU (Vodenkova et al. 2020).

Un altro farmaco utilizzato nel trattamento di routine del CRC è l'irinotecano, un antitumorale che all'interno delle cellule viene metabolizzato tramite la carbossilesterasi in SN-28. L'SN-28 sembra essere il metabolita responsabile dell'attività antitumorale dell'irinotecano ma anche della sua tossicità. Più precisamente, l'irinotecano è un inibitore della topoisomerasi1; di conseguenza la cellula esposta a tale trattamento è arrestata nella fase S-G2 del ciclo cellulare, non può avvenire la sintesi del DNA e va incontro a morte (Fujita et al. 2015).

Per aumentare l'efficacia dei trattamenti farmacologici cui viene esposto il paziente, può essere usato un mix di chemioterapici. Il FOLFOX, ad esempio, è la combinazione usata tra il 5-FU, leucovorin e oxaliplatin. Un'altra combinazione, il FOLFIRI, è, invece, realizzata con una mix di 5-FU, leucovorin e irinotecano. Occorre tuttavia precisare che sebbene il potenziale antitumorale di questi trattamenti farmacologici combinati sia superiore, esso talvolta mostra una marcata tossicità (Boige et al. 2010).

Un'altra tipologia di chemioterapia è la *targeted chemotherapy* (terapia mirata), una chemioterapia che prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro un determinato target genico che generalmente promuove la crescita tumorale (**Fig. 11**).

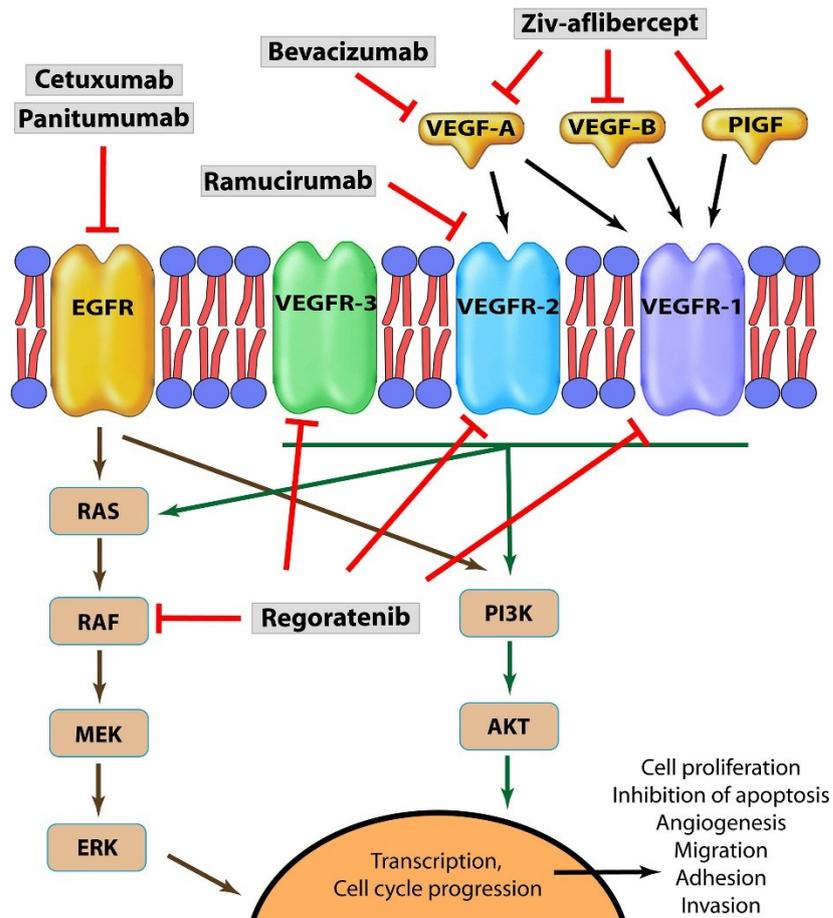


Fig. 11. Farmaci approvati per la targeted chemotherapy contro il carcinoma coloretale (Yau, 2019).

Un esempio di questo tipo di trattamento è rappresentato dal cetuximab e dal panitumumab che hanno come target molecolare l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*), il recettore per il fattore di crescita epidermico. L'EGFR è un recettore a tirosina chinasi transmembrana che regola differenti *pathway* di segnalazione coinvolti nella proliferazione cellulare, l'apoptosi, la sintesi del DNA come AKT, JNK, MAPK/ERK. Un altro target terapeutico è VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), il recettore per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare che è richiesto per l'angiogenesi, un processo associato con sviluppo di metastasi e progressione tumorale. In genere alti livelli di VEGFR sono evidenziabili in soggetti che hanno una prognosi bassa. Sono tre gli agenti biologici approvati che hanno come target i diversi membri della famiglia recettoriale VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3). Così come vengono usati più chemioterapici per

aumentarne l'effetto, sono usate combinazioni anche con gli anticorpi monoclonali e i cocktail chemioterapeutici sopracitati (FOLFOX e FOLFIRI). Sono molte le molecole attualmente in fase di sperimentazione clinica (trials clinico) per un loro putativo impiego nel trattamento del CRC. Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato che l'impiego di combinazioni di farmaci quali il cetuximab e il regorafenib che usano come target molecolari rispettivamente l'EGFR e il VEGF è risultato efficace superando la I fase del trial, in particolare su pazienti affetti da CRC con instabilità cromosomica (Yao 2019).

1.6 Bibliografia

Abdollahpour-Alitappeh M, Lotfinia M, Gharibi T, Mardaneh J, Farhadhosseinabadi B, Larki P, Faghfourian B, Sepehr KS, Abbaszadeh-Goudarzi K, Abbaszadeh-Goudarzi G, Johari B, Zali MR, Bagheri N (2019) Correction to: Antibody-drug conjugates in clinical trials for lymphoid malignancies and multiple myeloma. *J Cell Physiol* 234:5628–5642.

Abou-El-Wafa GS, Shaaban M, Shaaban KA, El-Naggar M, Maier A, Fiebig H, Laatsch H (2013) Pachydictyols B and C: new diterpenes from *Dictyota dichotoma* Hudson. *Mar Drugs* 11:3109–3123.

Al Dhaheri Y, Attoub S, Ramadan G, Arafat K, Bajbouj K, Karuvantevida N, AbuQamar S, Eid A, Iratni R (2014) Carnosol induces ROS-mediated beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. *PLoS One* 9.

Alcaraz M, Achel DG, Olivares A, Olmos E, Alcaraz-Saura M, Castillo J (2013) Carnosol, radiation and melanoma: a translational possibility. *Clin Transl Oncol* 15:712–719.

Al-Lihaibi SS, Alarif WM, Abdel-Lateff A, Ayyad SEN, Abdel-Naim AB, El-Senduny FE, Badriag FA (2014) Three new cembranoid-type diterpenes from Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*: isolation and antiproliferative activity against HepG2 cells. *Eur J Med Chem* 81:314–322.

Anh Hle T, Hien NT, Hang DT, Ha TH, Nhiem NX, Hien TTT, Thu VK, Thao DT, Minh CV, Kiem PV (2014) *ent*-Kaurane diterpenes from *Annona glabra* and their cytotoxic activities. *Nat Prod Commun* 9:1681–1682.

Arimoto-Kobayashi S, Zhang X, Yuhara Y, Kamiya T, Negishi T, Okamoto G (2013) Chemopreventive effects of the juice of *Vitis coignetiae* Pulliat on two-stage mouse skin carcinogenesis. *Nutr Cancer* 65:440–450.

Aromdee C (2014) Andrographolide: progression in its modifications and applications—a patent review (2012–2014). *Expert Opin Ther Patents* 24:1129–1138.

Arumuggam N, Bhowmick NA, Rupasinghe HP (2015) A review: phytochemicals targeting JAK/STAT signaling and IDO expression in cancer. *Phytother Res* 29:805–817.

Banerjee M, Chattopadhyay S, Choudhuri T, Bera R, Kumar S, Chakraborty S, Mukherjee SK (2016) Cytotoxicity and cell cycle arrest induced by andrographolide lead to programmed cell death of MDA-MB-231 breast cancer cell line. *J Biomed Sci* 23:40.

Bajorath J, Kearnes S, Walters WP, Meanwell NA, Georg GI, Wang S (2020) Artificial intelligence in drug discovery: into the great wide open. *J Med Chem* 63:8651–8652.

Bautista E, Fragoso-Serrano M, Ortiz-Pastrana N, Toscano RA, Ortega A (2016) Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia* 114:1–6.

Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N (2017) Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* 16:315–337.

Binefa G (2014) Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroent* 20:6786–6808.

Birbrair A, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Olson JD, Mintz A, Delbono O (2014) Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 307:C25–C38.

Boige V, Mendibou J, Pignon JP, Loriot MA, Castaing M, Barrois M, Laurent-Puig P (2010) Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J Clin Oncol* 28:2556–2564.

Brincks EL, Kucaba TA, James BR, Murphy KA, Schwertfeger KL, Sangwan V, Banerjee S, Saluja AK, Griffith TS (2015) Triptolide enhances the tumoricidal activity of TRAIL against renal cell carcinoma. *FEBS J* 282:4747–4765.

Burmistrova O, Simões MF, Rijo P, Quintana J, Bermejo J, Estévez F (2013) Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. *J Nat Prod* 76:1413–1423.

Carvalho AC, Gomes AC, Pereira-Wilson C, Lima CF (2015) Redox-dependent induction of antioxidant defenses by phenolic diterpenes confers stress tolerance in normal human skin fibroblasts: insights on replicative senescence. *Free Radic Biol Med* 83:262–272.

Chang FY, Hsu FJ, Tai CJ, Wei WC, Yang NS, Sheu JH (2014) Klymollins T-X, bioactive eunicellin-based diterpenoids from the soft coral *Klyxum molle*. *Mar Drugs* 12:3060–3071.

Chang CC, Kuan CP, Lin JY, Lai JS, Ho TF (2015) Tanshinone IIA facilitates TRAIL sensitization by up-regulating DR5 through the ROS-JNK-CHOP signaling axis in human ovarian carcinoma cell lines. *Chem Res Toxicol* 28:1574-1583.

Chang FR, Huang ST, Liaw CC, Yen MH, Hwang TL, Chen CY, Hou MF, Yuan SS, Cheng YB, Wu YC (2016a) Diterpenes from *Grangea maderaspatana*. *Phytochemistry* 131:124–129.

Chang J, Kim Y, Kwon HJ (2016b) Advances in identification and validation of protein targets of natural products without chemical modification. *Nat Prod Rep* 33:719–730.

Chemotherapy Principles (2014) American Cancer Society. Retrieved 20 August 2014.

Chen SJ, Zhou GB, Zhang XW, Mao JH, de The H, Chen Z (2011) From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia. *Blood* 117:6425–6437.

Chen W, Li Y, Guo Y (2012a) Terpenoids of *Simularia* soft corals: chemistry and bioactivity. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2:227–237.

Chen L, Liu Q, Huang Z, Wu F, Li Z, Chen X, Lin T (2012b) Tripchlorolide induces cell death in lung cancer cells by autophagy. *Int J Oncol* 40:1066–1070.

Chen Y, Wang C, Hu M, Pan J, Chen J, Duan P, Zhai T, Ding J, Xu C (2012c) Effects of ginkgolide A on okadaic acid-induced tau hyperphosphorylation and the PI3K-Akt signaling pathway in N2a cells. *Planta Med* 78:1337–1341.

Chen TH, Chen WF, Wen ZH, Kao CY, Li JJ, Hwang TL, Fang LS, Wang WH, Sheu JH, Sung PJ (2014a) Cladieunicellins M-Q, new eunicellins from *Cladiella* sp. *Mar Drugs* 12:2144–2155.

Chen H, Wang H, Yang B, Jin DQ, Yang S, Wang M, Xu J, Ohizumi Y, Guo Y (2014b) Diterpenes inhibiting NO production from *Euphorbia helioscopia*. *Fitoterapia* 95:133–138.

Chen J, Zheng W, Jiang X, Lu X, Xu R (2015) Triptolide induces apoptosis of human acute T lymphocytic leukemia Jurkat cells via inhibiting transcription of human endogenous retrovirus HERV-K Np9 gene. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 35:702–706.

Chen SR, Qiu HC, Hu Y, Wang Y, Wang YT (2016a) Herbal medicine offered as an initiative therapeutic option for the management of hepatocellular carcinoma. *Phytother Res* 30:863–877.

Chen W, Su H, Feng L, Zheng X (2016b) Andrographolide suppresses preadipocytes proliferation through glutathione antioxidant systems abrogation. *Life Sci* 156:21–29.

- Cheng ZB, Liao Q, Chen Y, Fan CQ, Huang ZY, Xu XJ, Yin S (2014) Four new cembranoids from the soft coral *Sarcophyton* sp. Magn Reson Chem 52:515-520.
- Chun JY, Tummala R, Nadiminty N, Lou W, Liu C, Yang J, Evans CP, Zhou Q, Gao AC (2010) Andrographolide, an herbal medicine, inhibits interleukin-6 expression and suppresses prostate cancer cell growth. Genes Cancer 1:868–876.
- Cimmino A, Mathieu V, Masi M, Baroncelli R, Boari A, Pescitelli G, Ferderin M, Lisy R, Evidente M, Tuzi A, Zonno MC, Kornienko A, Kiss R, Evidente A (2016) Higginsianins A and B, two diterpenoid α -pyrones produced by *Colletotrichum higginsianum*, with *in vitro* cytostatic activity. J Nat Prod 79:116–125.
- Costa JP, Islam MT, Santos PS, Ferreira PB, Oliveira GLS, Alencar MVOB, Paz MFCJ, Ferreira ELF, Feitosa CM, Citó AMGL, Sousa DP, Melo-Cavalcante AAC (2016) Evaluation of antioxidant activity of phytol using non- and pre-clinical models. Curr Pharm Biotechnol 17:1278–1284.
- Dai LP, Li C, Yang HZ, Lu YQ, Yu HW, Gao HM, Wang ZM (2015) Three new cytotoxic *ent*-kaurane diterpenes from *Isodon excisoides*. Molecules 20:17544–17556.
- Dai SJ, Zhang L, Xiao K, Han QT (2016) New cytotoxic neoclerodane diterpenoids from *Scutellaria strigillosa*. Bioorg Med Chem Lett 26:1750–1753.
- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB (2014) Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. CA Cancer J Clin. [https:// doi.org/10.3322/caac.21235](https://doi.org/10.3322/caac.21235).
- Ding X, Zhou X, Jiang B, Zhao Q, Zhou G (2015) Triptolide suppresses proliferation, hypoxia-inducible factor-1 α and c-Myc expression in pancreatic cancer cells. Mol Med Rep 12:4508–4513.
- Dong P, Maddali MV, Srimani JK, Th  lot F, Nevins JR, Mathey-Prevot B, You L (2014) Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. Nat Commun 5:47–50.
- Dong X, Liu F, Li M (2016) Inhibition of nuclear factor κ B transcription activity drives a synergistic effect of cisplatin and oridonin on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. Anticancer Drugs 27:286–299.

Du W, Elemento O (2015a) Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. *Oncogene* 34:3215–3225.

Du J, Chen C, Sun Y, Zheng L, Wang W (2015b) Ponicidin suppresses HT29 cell growth via the induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Med Rep* 12:5816–5820.

Eaton AL, Harinantenaina L, Brodie PJ, Cassera MB, Bowman JD, Callmander MW, Randrianaivo R, Rakotondrajaona R, Rakotobe E, Rasamison VE, Kingston DGI (2013) A new bioactive diterpene glycoside from *Molinaea retusa* from the Madagascar dry forest. *Nat Prod Commun* 8:1201–1203.

Endringer DC, Taveira FSN, Kondratyuk TT, Pezzuto JM, Braga FC (2014) Cancer chemoprevention activity of labdane diterpenes from rhizomes of *Hedychium coronarium*. *Rev Bras* 24:408-412.

Erharuyi O, Adhikari A, Falodun A, Jabeen A, Imad R, Ammad M, Choudhary MI, Gören N (2016) Cytotoxic, anti-inflammatory, and leishmanicidal activities of diterpenes isolated from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Planta Med* 83:104–110.

Faiella L, Piazz FD, Bisio A, Tosco A, De Tommasi N (2012) A chemical proteomics approach reveals Hsp27 as a target for proapoptotic clerodane diterpenes. *Mol Biosyst* 8:2637–2644.

Faiella L, Temraz A, Cotugno R, De Tommasi N, Braca A (2013) Diterpenes and phenylpropanoids from *Clerodendrum splendens*. *Planta Med* 79:1341–1347.

Falodun A, Kragl U, Touem SM, Villinger A, Fahrenwaldt T, Langer P (2012) A novel anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Nat Prod Commun* 7:151–152.

Ferreira PM, Bezerra DP, Silva Jdo N, da Costa MP, de Oliveira Ferreira JR, Alencar NMR, de Figueiredo IST, Cavalheiro AJ, Machado CML, Chammas R, Alves APNN, de Moraes MO, Pessoa C (2016) Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. *J Ethnopharmacol* 186:270–279.

Fronza M, Lamy E, Günther S, Heinzmann B, Laufer S, Merfort I (2012) Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action. *Phytochemistry* 78:107–119.

Fuentes RG, Toume K, Arai MA, Sadhu SK, Ahmed F, Ishibashi M (2015) Scopadulciol, isolated from *Scoparia dulcis*, induces β -catenin degradation and overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis ligand resistance in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Nat Prod* 78:864–872.

Fujita K, Kubota Y, Ishida H, Sasaki Y (2015) Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 21:12234-12248.

Ganguly A, Yang H, Sharma R, Patel K, Cabral F (2012) The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *J Biol Chem* 287:43359–43369.

Gao C, Han L, Zheng D, Jin H, Gai C, Wang J, Zhang H, Zhang L, Fu L (2015a) Dimeric abietane diterpenoids and sesquiterpenoid lactones from *Teucrium viscidum*. *J Nat Prod* 78:630–638.

Gao H, Sun W, Zhao W, Hao W, Leung CH, Lu J, Chen X (2015b) Total tanshinones-induced apoptosis and autophagy via reactive oxygen species in lung cancer 95D cells. *Am J Chin Med* 43:1265–1279.

Gao Q, Liu H, Yao Y, Geng L, Zhang X, Jiang L, Shi B, Yang F (2015c) Carnosic acid induces autophagic cell death through inhibition of the Akt/mTOR pathway in human hepatoma cells. *J Appl Toxicol* 35:485–492.

Gao H, Wang J (2016a) Andrographolide inhibits multiple myeloma cells by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep* 13:1827–1832.

Gao SS, Li XM, Williams K, Proksch P, Ji NY, Wang BG (2016b) Rhizovarins A–F, indole-diterpenes from the mangrove-derived endophytic fungus *Mucor irregularis* QEN-189. *J Nat Prod* 79:2066–2074.

Gao CL, Hou GG, Liu J, Ru T, Xu YZ, Zhao SY, Ye H, Zhang LY, Chen KX, Guo YW, Pang T, Li XW (2020) Synthesis and target identification of benzoxepane derivatives as potential anti-neuroinflammatory agents for ischemic stroke. *Angew Chem Int Ed Engl* 59:2429–2439.

Germano G, Frapolli R, Simone M, Tavecchio M, Erba E, Pesce S, Pasqualini F, Grosso F, Sanfilippo S, Casali PG, Gronchi A, Viridis E, Tarantino E, Pilotti S, Greco A, Nebuloni M, Galmarini CM, Tercero JC, Mantovani A, D'Incalci M, Allavena P (2010) Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res* 70:2235–2244.

Ghanadian M, Saeidi H, Aghaei M, Rahiminejad MR, Ahmadi E, Ayatollahi SM, Choudhary MI, Bahmani B (2015) New jatrophane diterpenes from *Euphorbia osyridea* with proapoptotic effects on ovarian cancer cells. *Phytochem Lett* 12:302–307.

Giacomelli E, Bertrand S, Nievergelt A, Zwick V, Simoes-Pires C, Marcourt L, Rivara-Minten E, Cuendet M, Bisio A, Wolfender JL (2013) Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugate*. *Phytochemistry* 96:257–264.

Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA (2018) The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell* 33:570–580.

Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, Hawkins M, O'Shaughnessy J (2005) Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 23:7794–7803.

Gradishar WJ (2006) Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* 7:1041–1053.

Grossman EA, Ward CC, Spradlin JN, Bateman LA, Huffman TR, Miyamoto DK, Kleinman JI, Nomura DK (2017) Covalent ligand discovery against druggable hotspots targeted by anti-cancer natural products. *Cell Chem Biol* 24:1368–1376.

Gu J, Cheng GG, Qian SY, Li Y, Liu YP, Luo XD (2014) Dysoxydensins A–G, seven new clerodane diterpenoids from *Dysoxylum densiflorum*. *Planta Med* 80:1017–1022.

Gu Z, Wang X, Qi R, Wei L, Huo Y, Ma Y, Shi L, Chang Y, Li G, Zhou L (2015) Oridonin induces apoptosis in uveal melanoma cells by upregulation of Bim and

downregulation of fatty acid synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 457:187–193.

Gui Z, Li S, Liu X, Xu B, Xu J (2015) Oridonin alters the expression profiles of microRNAs in BxPC-3 human pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 15:117.

Han Y, Di XX, Li HZ, Shen T, Ren DM, Lou HX, Wang XN (2014) Podoimbricatin A, a cytotoxic diterpenoid with an unprecedented 6/6/5/6-fused tetracyclic ring system from the twigs and leaves of *Podocarpus imbricatus*. *Bioorg Med Chem Lett* 24:3326–3328.

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674.

Hao H, Zhang Q, Zhu H, Wen Y, Qiu D, Xiong J, Fu X, Wu Y, Meng K, Li J (2019) Icaritin promotes tumor T-cell infiltration and induces antitumor immunity in mice. *Eur J Immunol* 49:2235–2244.

Harvey AL, Edrada-Ebel RA, Quinn RJ (2015) The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.

He D, Li Y, Tang H, Ma R, Li X, Wang L (2015) Six new cassane diterpenes from the twigs and leaves of Tara (*Caesalpinia spinosa* Kuntze). *Fitoterapia* 105:273–277.

He J, Peng L-Y, Tu L, Wu XD, Dong LB, Pan ZH, Chen XQ, Su J, Zhao Y, Xu G, Cheng X, Li Y, Zhao QS (2016a) Vibsan-type diterpenes from leaves and twigs of *Viburnum odoratissimum*. *Fitoterapia* 109:224–229.

He L, Han J, Li B, Huang L, Ma K, Chen Q, Liu X, Bao L, Liu H (2016b) Identification of a new cyathane diterpene that induces mitochondrial and autophagy-dependent apoptosis and shows a potent *in vivo* anticancer activity. *Eur J Med Chem* 111:183–192.

Hou P, Zeng Y, Ma B, Bi K, Chen X (2013) A new cytotoxic cembrane diterpene from the roots of *Euphorbia pekinensis* Rupr. *Fitoterapia* 90:10–13.

Hoy SM (2014) Albumin-bound paclitaxel: a review of its use for the first-line combination treatment of metastatic pancreatic cancer. *Drugs* 74:1757–1768.

Hsiao TH, Cheng CH, Wu TY, Wu TY, Lu MC, Chen WF, Wen ZH, Dai CF, Wu YC, Sung PJ (2015) New cembranoid diterpenes from the cultured octocoral *Nephthea columnaris*. *Molecules* 20:13205–13215.

Hu T, Wang L, Zhang L, Lu L, Shen J, Chan RLY, Li M, Wu WKK, To KKW, Cho CH (2015) Sensitivity of apoptosis-resistant colon cancer cells to tanshinones is mediated by autophagic cell death and p53-independent cytotoxicity. *Phytomedicine* 22:536–544.

Huang TZ, Chen BW, Huang CY, Hwang TL, Uvarani C, Dai CF, Sung PJ, Su JH, Sheu JH (2015) Eunicellin-based diterpenoids, hirsutalins S–V, from the formosan soft coral *Cladiella hirsuta*. *Mar Drugs* 13:2757–2769.

Huang RY, Chen WT, Kurtan T, Mandi A, Ding J, Li J, Li XW, Guo YW (2016) Bioactive isoquinolinequinone alkaloids from the South China Sea nudibranch *Jorunna funebris* and its sponge-prey *Xestospongia* sp. *Future Med Chem* 8:17–27.

Huang MY, Zhang LL, Ding J, Lu JJ (2018) Anticancer drug discovery from Chinese medicinal herbs. *Chin Med* 13:35.

Huang M, Lu JJ, Ding J (2021) Natural products in cancer therapy: past, present and future. *Nat Prod Biospect* 11:5–13.

Islam MT, de Alencar MV, da Conceição MK, da Conceição Machado K, de Carvalho AA, de Sousa DP, de Freitas RM (2015) Phytol in a pharma-medico-stance. *Chem Biol Interact* 240:60–73.

Islam MT (2016) Andrographolide, an up-coming multi-edged plant-derived sword in cancers! *Asian J Ethnopharmacol Med Foods* 02:01–03.

Islam MT, Mata AMOF, Aguiar RPS, Paz MFCJ, Alencar MVOB, Melo-Cavalcante AAC (2016a) Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpens. *Phytother Res* 30:1420–1444.

Islam MT, Silva CB, Alencar MVOB, Paz MFCJ, Almeida FRC, Melo-Cavalcante AAC. (2016b) Diterpenes: advances in neurobiological drug research. *Phytother Res* 30:915–928.

Islam MT, Ali ES, Sousa JMC, Santos JVO, Paz MFCJ, Lima RMT, Sousa LR, Alencar MVOB, Ana Melo-Cavalcante AAC (2016c) Physiological contributions of reactive oxygen species. *Photon eBooks*. Ed. I, pp. 1–13. UBN: 015-A94510112030.

Islam MT, Streck L, Paz MFCJ (2016d) Preparation of phytol loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. *Int Arch Med* 9:1–15.

Islam MT, Santos JVO, Ferreira JRO (2016e) A possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. *Int Arch Med* 9:1–11.

Islam MT (2017) Radiation interactions with biological system. *Int J Radiat Biol*. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1286050>.

Islam MT (2016b) Concentration-dependent-activities of diterpenes: achieving anti-/pro-oxidant links. *Asian J Ethnopharmacol Med Foods* 2:12–15.

Jadranin M, Pešić M, Aljančić IS, Milosavljević SM, Todorović NM, Podolski-Renić A, Banković A, Tanić N, Marković I, Vajs VE, Tešević VV (2013) Jatrophone diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. *Phytochemistry* 86:208–217.

Janar J, Nugroho AE, Wong CP, Hirasawa Y, Kaneda T, Shiota O, Morita H (2012) Sabiperones A–F, new diterpenoids from *Juniperus sabina*. *Chem Pharm Bull* 60:154–159.

Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, Koken M, Le Bras M, Duffort S, Peres L, Berthier C, Soilihi H, Raught B, de Thé H (2010) PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. *Cancer Cell* 18:88–98.

Ji L, Zheng Z, Shi L, Huang Y, Lu B, Wang Z. (2015) Andrographolide decreased VEGFD expression in hepatoma cancer cells by inducing ubiquitin/proteasome-mediated cFos protein degradation. *Biochim Biophys Acta* 1850:750–758.

Jiang H, Zhao L, Dong X, He A, Zheng C, Johansson M, Karlsson A, Zheng X(2015) Tanshinone IIA enhances bystander cell killing of cancer cells expressing *Drosophila melanogaster* deoxyribonucleoside kinase in nuclei and mitochondria. *Oncol Rep* 34:1487–1493.

Jiang N, Dong XP, Zhang SL, You QY, Jiang XT, Zhao XG (2016) Triptolide reverses the taxol resistance of lung adenocarcinoma by inhibiting the NF- κ B signaling pathway and the expression of NF- κ B-regulated drug-resistant genes. *Mol Med Rep* 13:153–159.

Jiao W, Wan Z, Chen S, Lu R, Chen X, Fang D, Wang J, Pu S, Huang X, Gao H, Shao H (2015) Lathyrol diterpenes as modulators of P-glycoprotein dependent multidrug resistance: structure-activity relationship studies on *Euphorbia* factor L3 derivatives. *J Med Chem* 58:3720–3738.

Jung KJ, Min KJ, Bae JH, Kwon TK (2015) Carnosic acid sensitized TRAIL-mediated apoptosis through downregulation of c-FLIP and Bcl-2 expression at the post translational levels and CHOP-dependent up-regulation of DR5, Bim, and PUMA expression in human carcinoma caki cells. *Oncotarget* 6:1556–1568.

Kang N, Cao SJ, Zhou Y, He H, Tashiro SI, Onodera S, Qiu F, Ikejima T (2015) Inhibition of caspase-9 by oridonin, a diterpenoid isolated from *Rabdosia rubescens*, augments apoptosis in human laryngeal cancer cells. *Int J Oncol* 47:2045–2056.

Karmakar UK, Ishikawa N, Arai MA, Ahmed F, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M (2016) Boesenberols, pimarane diterpenes with TRAIL-resistance-overcoming activity from *Boesenbergia pandurata*. *J Nat Prod* 79:2075–2082.

Kato FH, Viana NI, Santini CB, et al. (2012) Assessment of the *in vitro* and *in vivo* genotoxic and antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells. *Mutat Res* 749:87–92.

Khalid EB, Ayman E-ME-K, Rahman H, Abdelkarim G, Najda A (2016) Natural products against cancer angiogenesis. *Tumor Biol.* <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5364-8>.

Kim HK, Wilson EG, Choi YH, Verpoorte R (2010) Metabolomics: a tool for anticancer lead-finding from natural products. *Planta Med* 76:1094–1102.

Kim KN, Ham YM, Moon JY, Kim MJ, Jung YH, Jeon YJ, Lee NH, Kang N, Yang HM, Kim D, Hyun CG (2012) Acanthoic acid induces cell apoptosis through activation of the p38 MAPK pathway in HL-60 human promyelocytic leukaemia. *Food Chem* 135:2112–2117.

Kim CW, Lee HJ, Jung JH, Kim YH, Jung DB, Sohn EJ, Lee JH, Woo HJ, Baek NI, Kim YC, Kim SH (2015a.) Activation of caspase-9/3 and inhibition of epithelial mesenchymal transition are critically involved in antitumor effect of phytol in hepatocellular carcinoma cells. *Phytother Res* 29:1026–1031.

Kim MK, Park GH, Eo HJ, Song HM, Lee JW, Kwon MJ, Koo JS, Jeong JB. (2015b) Tanshinone I induces cyclin D1 proteasomal degradation in an ERK1/2 dependent way in human colorectal cancer cells. *Fitoterapia* 101:162–168.

Kuang X, Li W, Kanno Y, Yamashita N, Nemoto K, Asada Y, Koike K (2016) *ent*-Atisane diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* inhibit mammosphere formation in MCF-7 cells. *J Nat Med* 70:120–126.

Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJH, Watanabe T (2015) Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* 15065:62.

Kumar D, Das B, Sen R, Kundu P, Manna A, Sarkar A, Chowdhury C, Chatterjee M, Das P (2015) Andrographolide analogue induces apoptosis and autophagy mediated cell death in U937 cells by inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *PLoS One* 10:e0139657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139657>.

Kurimoto S, Pu JX, Sun HD, Shibata H, Takaishi Y, Kashiwada Y (2016) Acylated neo-clerodane type diterpenoids from the aerial parts of *Scutellaria coleifolia* Levl. (Lamiaceae). *J Nat Med* 70:241–252.

Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, de The H (2008) Arsenic degrades PML or PML-RAR α through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10:547–555.

Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, de The H (2012) Curing APL through PML/RARA degradation by As₂O₃. *Trends Mol Med* 18:36–42.

Lam W, Bussom S, Guan F, Jiang Z, Zhang W, Gullen EA, Liu SH, Cheng YC (2010) The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity. *Sci Transl Med* 2:45ra59.

Lanzotti V, Barile E, Scambia G, Ferlini C (2015) Cyparissins A and B, jatrophone diterpenes from *Euphorbia cyparissias* as Pgp inhibitors and cytotoxic agents against ovarian cancer cell lines. *Fitoterapia* 104:75–79.

Lee KA, Chae JI, Shim JH (2012) Natural diterpenes from coffee, cafestol and kahweol induce apoptosis through regulation of specificity protein 1 expression in human malignant pleural mesothelioma. *J Biomed Sci* 19:60.

Lesgards J-F, Baldovini N, Vidal N, Pietry (2014) Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother Res* 28:1423–1446.

Levrier C, Sadowski MC, Nelson CC, Davis RA (2015) Cytotoxic C20 diterpenoid alkaloids from the Australian endemic rainforest plant *Anopterus macleayanus*. *J Nat Prod* 78:2908–2916.

Li LM, Weng ZY, Huang SX, Pu JX, Li SH, Huang H, Yang BB, Han Y, Xiao WL, Li ML (2007) Cytotoxic *ent*-Kauranoids from the medicinal plant *Isodon xerophilus*. *J Nat Prod* 70:1295–1301.

Li L, Yue GG, Lau CB, Sun H, Fung KP, Leung PC, Han Q, Leung PS (2012) Eriocalyxin B induces apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic adenocarcinoma cells through caspase- and p53-dependent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 262:80–90.

- Li F, Sun Q, Hong L, Li L, Wu Y, Xia M, Ikejima T, Peng Y, Song S (2013) Daphnane-type diterpenes with inhibitory activities against human cancer cell lines from *Daphne genkwa*. *Bioorg Med Chem Lett* 23:2500–2504.
- Li X, Pu J, Jiang S, Su J, Kong L, Mao B, Sun H, Li Y (2013b) Henryin, an ent-kaurane diterpenoid, inhibits Wnt signaling through interference with β -catenin/TCF4 interaction in colorectal cancer cells. *PLoS One* 8:e68525.
- Li X-J, Jiang Z-Z, L-y Z (2014) Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology. *J Ethnopharmacol* 155:67–79.
- Li L, Wu L, Wang M, Sun J, Liang J (2014b) Abietane diterpenoids from *Clerodendrum trichotomum* and correction of NMR data of villosin C and B. *Nat Prod Commun* 19:907–910.
- Li M, Hong L (2015) Pseudolaric acid B exerts antitumor activity via suppression of the Akt signaling pathway in HeLa cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 12:2021–2026.
- Li G, Shan C, Liu L, Zhou T, Zhou J, Hu X, Chen Y, Cui H, Gao N (2015) Tanshinone IIA inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/ RPS6/4E-BP1 signaling pathway. *PLoS One* 10:e0117440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117440>.
- Li Y, Wang Y, Wang S, Gao Y, Zhang X, Lu C (2015b) Oridonin phosphate-induced autophagy effectively enhances cell apoptosis of human breast cancer cells. *Med Oncol* 32:365.
- Li H, Pan GF, Jiang ZZ, Yang J, Sun LX, Zhang LY (2015c) Triptolide inhibits human breast cancer MCF-7 cell growth via downregulation of the ER α -mediated signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 36:606–613.
- Li WF, Wang J, Zhang JJ, Song X, Ku CF, Zou J, Li JX, Rong LJ, Pan LT, Zhang HJ (2015d) Henrin A: a new anti-HIV ent-kaurane diterpene from *Pteris henryi*. *Int J Mol Sci* 16:27978–27987.

Li Y, Yan H, Zhang Z, Zhang G, Sun Y, Yu P, Wang Y, Xu L (2015e) Andrographolide derivative AL-1 improves insulin resistance through down-regulation of NF- κ B signalling pathway. *Br J Pharmacol* 172:3151–3158.

Li ZY, Li QZ, Ma GX, Chen L, Zhang C, Chen BD, Yang JS, Li WP (2016) Cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax* induce apoptosis in pituitary adenoma: structure-activity relationship, ER stress and Wnt/ β -catenin pathways. *J Asian Nat Prod Res* 2:1–13.

Li Q, He Y-N, Niu B, Wang X-G, Niu L-Y, Feng W (2016b). Caesalmins N–Q, new cassane diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax*. *Phytochem Lett* 17:23–27.

Li Y, Xu M, Ding X, Yan C, Song Z, Chen L, Huang X, Wang X, Jian Y, Tang G, Tang C, Di Y, Mu S, Liu X, Liu K, Li T, Wang Y, Miao L, Guo W, Hao X, Yang C (2016c) Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nat Cell Biol* 18:1065–1077.

Li MY, Song LH, Yue GGL, Lee JKM, Zhao LM, Li L, Zhou XN, Tsui SKW, Ng SSM, Fung KP (2017) Bigelovin triggered apoptosis in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* via upregulating death receptor 5 and reactive oxidative species. *Sci Rep* 7:42176.

Liao YJ, Bai HY, Li ZH, Zou J, Chen JW, Zheng F, Zhang JX, Mai SJ, Zeng MS, Sun HD, Pu JX, Xie D (2014) Longikaurin A, a natural entkaurane, induces G2/M phase arrest via downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 5:e1137.

Lim W, Park J, Lee YH, Hong J, Lee Y (2015) Subglutinol A, an immunosuppressive α -pyrone diterpenoid from *Fusarium subglutinans*, acts as an estrogen receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 461:507–512.

Lin LG, Xie H, Li HL, Tong LJ, Tang CP, Ke CQ, Liu QF, Lin LP, Geng MY, Jiang H, Zhao WM, Ding J, Ye Y (2008) Naturally occurring homoisoflavonoids function as potent protein tyrosine kinase inhibitors by c-Src-based high-throughput screening. *J Med Chem* 51:4419–4429.

Lin Y, Cui H, Xu H, Yue L, Xu H, Jiang L, Liu J (2012) Jolkinolide B induces apoptosis in MDA-MB-231 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep* 27:1976–1980.

Lin CZ, Zhao ZX, Xie SM, Mao JH, Zhu CC, Li XH, Zeren-dawa B, Suolang-qimei K, Zhu D, Xiong TQ, Wu AZ (2014a) Diterpenoid alkaloids and flavonoids from *Delphinium trichophorum*. *Phytochem* 97:88–95.

Lin L, Deng W, Tian Y, Chen W, Wang J, Fu L, Shi D, Zhao M, Luo W (2014b) Lasiodin inhibits proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by simultaneous modulation of the Apaf-1/caspase, AKT/MAPK and COX-2/ NF- κ B signaling pathways. *PLoS One* 19:e97799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097799>.

Lin Z, Guo Y, Gao Y, Wang S, Wang X, Xie Z, Niu H, Chang W, Liu L, Yuan H, Lou H (2015a) *ent*-Kaurane diterpenoids from Chinese liverworts and their antitumor activities through Michael addition as detected in situ by a fluorescence probe. *J Med Chem* 58:3944–3956.

Lin JY, Ke YM, Lai JS, Ho TF (2015) Tanshinone IIA enhances the effects of TRAIL by downregulating survivin in human ovarian carcinoma cells. *Phytomed* 22:929–938.

Lin CZ, Zhao W, Feng XL, Liu FL, Zhu CC (2016) Cytotoxic diterpenoids from *Rabdosia lophanthoides* var. *gerardianus*. *Fitoterapia* 109:14–19.

Liu C, Nadiminty N, Tummala R, Chun JY, Lou W, Zhu Y, Sun M, Evans CP, Zhou Q, Gao AC (2011) Andrographolide targets androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer. *Genes Cancer* 2:151–159.

Liu YW, Cheng YB, Liaw CC, Chen CH, Guh JH, Hwang TL, Tsai JS, Wang WB, Shen YC (2012) Bioactive diterpenes from *Callicarpa longissima*. *J Nat Prod* 75:689–693.

Liu J, Mu C, Yue W, Li J, Ma B, Zhao L, Liu L, Chen Q, Yan C, Liu H, Hao X, Zhu Y (2013) A diterpenoid derivate compound targets selenocysteine of

thioredoxin reductases and induces Bax/Bak-independent apoptosis. *Free Radic Biol Med* 63:485–494.

Liu Y, Wiedle CH Jr, Brodie PJ, Callmander MW, Rakotondrajaona R, Rakotobe E, Rasamison VE, Kingston DG (2015a) Antiproliferative diterpenes from a *Malleastrum* sp. from the Madagascar dry forest. *Nat Prod Commun* 10:1509–1512.

Liu YN, Gu JL, Ma MS, Guo H, Liu L, Guo LR, Wang Y, Li Y (2015b) Diterpenoid B derived from *Plectranthus excisus* inhibits the melanoma cell cycle in the B16 melanoma cell line. *Mol Med Rep* 12:4578–4583.

Lizarte Neto FS, Tirapelli DP, Ambrosio SR, Tirapelli CR, Oliveira FM, Novais PC, Peria FM, Oliveira HF, Carlotti Junior CG, Tirapelli LF (2013) Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. *Braz J Med Biol Res* 46:71–78.

Long C, Wang J, Guo W, Wang H, Wang C, Liu Y, Sun X (2016) Triptolide inhibits transcription of hTERT through down-regulation of transcription factor specificity protein 1 in primary effusion lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 469:87–93.

Lu D, Liu Y, Aisa HA (2014) Jatrophone diterpenoid esters from *Euphorbia sororia* serving as multidrug resistance reversal agents. *Fitoterapia* 92:244–251.

Lu K, Bhat M, Sujit BS (2016) Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis*. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9512-y>.

Lv C, Sun W, Sun H, Wei S, Chen R, Wang B, Huang C (2013) Asperolide A, a marine-derived tetranorditerpenoid, induces G2/M arrest in human NCI-H460 lung carcinoma cells, is mediated by p53-p21 stabilization and modulated by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Mar Drugs* 11:316–331.

Lv HW, Luo JG, Zhu MD, Zhao HJ, Kong LY (2015) neo-Clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Teucrium fruticans* cultivated in China. *Phytochemistry* 119:26–31.

Ma GX, Xu N, Yuan JQ, Wei H, Zheng QX, Sun ZC, Yang JS, Xu XD (2012a.) Two new diterpenes, neocaesalpin MR and minaxin C, from *Caesalpinia minax*. J Asian Nat Prod Res 14:1156–1161.

Ma GX, Xu XD, Cao L, Yuan JQ, Yang JS, Ma LY (2012b) Cassanetype diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax* with their antineoplastic activity. Planta Med 78:1363–1369.

Ma GX, Yuan JQ, Cao L, Yang JS, Xu XD (2012c) The new cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax*. Chem Pharm Bull 60:759–763.

Ma GX, Yuan JQ, Cao L, Yang JS, Xu XD (2013) Two new diterpenes from *Caesalpinia minax* Hance. Nat Prod Res 27:818–823.

Ma W, Hu J, Cheng Y, Wang J, Zhang X, Xu M (2015a) Ginkgolide B protects against cisplatin-induced ototoxicity: enhancement of Akt-Nrf2-HO-1 signaling and reduction of NADPH oxidase. Cancer Chemother Pharmacol 75:949–959.

Ma G, Wu H, Chen D, Zhu N, Zhu Y, Sun Z, Li P, Yang J, Yuan J, Xu X (2015b) Antimalarial and antiproliferative cassane diterpenes of *Caesalpinia sappan*. J Nat Prod 78:2364–2371.

Ma ZL, Zhang BJ, Wang DT, Li X, Wei JL, Zhao BT, Jin Y, Li YL, Jin YX (2015c) Tanshinones suppress AURKA through up-regulation of miR-32 expression in nonsmall cell lung cancer. Oncotarget 6:20111–20120.

Ma YC, Ke Y, Zi X, Zhao F, Yuan L, Zhu YL, Fan XX, Zhao NM, Li QY, Qin YH, Liu HM (2016a) Induction of the mitochondriamediated apoptosis in human esophageal cancer cells by DS2, a newly synthetic diterpenoid analog, is regulated by Bax and caused by generation of reactive oxygen species. Oncotarget. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13367>.

Ma YC, Su N, Zhao NM, Li QY, Zhang M, Zhao HW, Liu HM, Qin YH (2016b) Jaridonin, a new diterpenoid from *Isodon rubescens*, induces cell cycle arrest in gastric cancer cells through activating ataxia telangiectasia mutated kinase. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 38:258–262.

Mantaj J, Rahman SM, Bokshi B, Hasan CM, Jackson PJ, Parsons RB, Rahman KM (2015) Crispene E, a cisclerodane diterpene inhibits STAT3 dimerization in breast cancer cells. *Org Biomol Chem* 13:3882–3886.

Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ (2017) Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer, *Mol Sci* 18:e197.

Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S (2017) The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorg Med Chem Lett* 27:701–707.

Matos AM, Reis M, Duarte N, Spengler G, Molnár J, Ferreira MJ (2015) Epoxyalthanol derivatives: modulation of ABCB1-mediated multidrug resistance in human colon adenocarcinoma and mouse T-lymphoma cells. *J Nat Prod* 78:2215–2228.

Meesakul P, Ritthiwigrom T, Cheenpracha S, Sripisut T, Maneerat W, Machan T, Laphookhieo S (2016) A new cytotoxic clerodane diterpene from *Casearia graveolens* twigs. *Nat Prod Commun* 11:13–15.

Meng P, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Xing F, Hayakari R, Wang L, Tsuruga K, Tanaka H, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Takahashi I, Kawaguchi S, Imaizumi T (2015) Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid- β 1-42 or 1-43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 94:1–9.

Messina F, Curini M, Di Sano C, Zadra C, Gigliarelli G, Rascón-Valenzuela LA, Robles Zepeda RE, Marcotullio MC (2015) Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *J Nat Prod* 78:1184–1188.

Mir H, Kapur N, Singh R, Sonpavde G, Lillard JW Jr, Singh S (2016) Andrographolide inhibits prostate cancer by targeting cell cycle regulators, CXCR3 and CXCR7 chemokine receptors. *Cell Cycle* 15:819–826.

Miron-Lopez G, Bazzocchi IL, Jimenez-Diaz IA, Moujir LM, Quijano-Quiñones R, Quijano L, Mena-Rejon GJ. (2014) Cytotoxic diterpenes from roots of

Crossopetalum gaumeri, a Celastraceae species from Yucatan Peninsula. *Bioorg Med Chem Lett* 24:2105–2109.

Mishra SK, Tripathi S, Shukla A, Oh SH, Kim HM. (2015) Andrographolide and analogues in cancer prevention. *Front Biosci (Elite Ed)* 7:255–266.

Mittal SP, Khole S, Jagadish N, Ghosh D, Gadgil V, Sinkar V, Ghaskadbi SS (2016) Andrographolide protects liver cells from H₂O₂-induced cell death by upregulation of Nrf-2/HO-1 mediated via adenosine A_{2a} receptor signalling. *Biochim Biophys Acta* 1860:2377–2390.

Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–734.

Moeenfarid M, Cortez A, Machado V, Costa R, Luís C, Coelho P, Soares R, Alves A, Borges N, Santos A (2016) Anti-angiogenic properties of Cafestol and Kahweol palmitate diterpene esters. *J Cell Biochem* 117:2748–2756.

Mullard A (2013) Maturing antibody-drug conjugate pipeline hits 30. *Nat Rev Drug Discov* 12:329–332.

Mullowney MW, Ó Ainmhire E, Tanouye U, Burdette JE, Pham VC, Murphy BT (2015) A pimarane diterpene and cytotoxic angucyclines from a marine-derived *Micromonospora* sp. in Vietnam's East Sea. *Mar Drugs* 13:5815–5827.

Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC (2015) Tanshinone IIA inhibits viral oncogene expression leading to apoptosis and inhibition of cervical cancer. *Cancer Lett* 356:536–546.

Newman DJ, Cragg GM (2020) Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 83:770–803.

Nguyen HX, Nguyen MT, Nguyen TA, Nguyen NYT, Phan DAT, Thi PH, Nguyen THP, Dang PH, Nguyen NT, Ueda JY, Awale S (2013) Cleistanthane diterpenes from the seed of *Caesalpinia sappan* and their antiausterity activity against PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Fitoterapia* 91:148–153.

Nguyen HT, Truong NB, Doan HT, Litaudon M, Retailleau P, Do TT, Nguyen HV, Chau MV, Pham CV (2015) Cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves of *Casearia grewiifolia*. *J Nat Prod* 78:2726–2730.

Nguyen HX, Nguyen NT, Dang PH, Ho PT, Nguyen MTT, Can MV, Dibwe DF, Ueda JY, Awale S (2016) Cassane diterpenes from the seed kernels of *Caesalpinia sappan*. *Phytochemistry* 122:286–293.

Nicolella HD, Oliveira PF, Munari CC, Dias Costa GF, Moreira MR, Veneziani RCS, Tavares DC (2014) Differential effect of manool-a diterpene from *Salvia officinalis*, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 72:8–12.

Niu C, Yan H, Yu T, Sun HP, Liu JH, Li XS, Wu W, Zhang FQ, Chen Y, Zhou L, Li JM, Zeng XM, Yang RR, Yuan MM, Ren MY, Gu FY, Cao Q, Gu BW, Su XY, Chen GQ, Xiong SM, Zhang TD, Waxman S, Wang ZY, Chen Z, Hu J, Shen ZX, Chen SJ (1999) Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 94:3315–3324.

Nomura DK, Maimone TJ (2019) Target identification of bioactive covalently acting natural products. *Curr Top Microbiol Immunol* 420:351–374.

Oberlies NH, Kroll DJ (2004) Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod* 67:129–135.

Ohsaki A, Ozawa M, Komiyama K, Kishida A, Isobe T (2012) The cytotoxic activity of diterpenoids from *Isodon* species. *Nat Prod Commun* 17:977–978.

Oliveira AR, Beyer G, Chugh R, Skube SJ, Majumder K, Banerjee S, Sangwan V, Li L, Dawra R, Subramanian S, Saluja A, Dudeja V (2015) Triptolide abrogates growth of colon cancer and induces cell cycle arrest by inhibiting transcriptional activation of E2F. *Lab Invest* 95:648–659.

de Oliveira MR (2016) The dietary components carnosic acid and carnosol as neuroprotective agents: a mechanistic view. *Mol Neurobiol* 53:6155–6168.

- Pan S, Zhang H, Wang C, Yao SC, Yao SQ (2016) Target identification of natural products and bioactive compounds using affinity-based probes. *Nat Prod Rep* 33:612–620.
- Pan C, Guo Q, Lu N (2019) Role of gut microbiota in the pharmacological effects of natural products. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019:2682748.
- Pandurangan AK, Divya T, Kumar K, Dineshbabu V, Velavan B, Sudhandiran G (2018) Colorectal carcinogenesis: insights into the cell death and signal transduction pathways: a review. *World J Gastrointest Oncol* 10:244-259.
- Parfett CL, Healy C (2006) Tandemly repeated DNA sequence instabilities induced by two promoters of morphological transformation in vitro: a short-term response to nonmutagenic agents in C3H/10T1/2 cells. *Mutat Res* 604:42–52.
- Pei Y-H, Kim JW, Kang H-B, Lee HK, Kim CS, Song HH, Chin YW, Oh SR (2012) Tiglane diterpene esters with IFN γ -inducing activity from the leaves of *Aleurites fordii*. *Bioorg Med Chem Lett* 22:2318–2320.
- Peng T, Hu M, Wu TT, Zhang C, Chen Z, Huang S, Zhou XH (2015) Andrographolide suppresses proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells via attenuating NF- κ B pathway. *Biomed Res Int* 2015:735056.
- Pertino MW, Theoduloz C, Butassi E, Zacchino S, SchmedaHirschmann G (2015) Synthesis, antiproliferative and antifungal activities of 1,2,3-triazole-substituted carnosic acid and carnosol derivatives. *Molecules* 20:8666–8686.
- Petiwala SM, Johnson JJ (2015) Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): defining their potential for anticancer activity. *Cancer Lett* 367:93–102.
- Pfeffer TJ, Sasse F, Schmidt CF, Lakämper S, Kirschning A, Scholz T (2016) The natural diterpene tonantzitlolone A and its synthetic enantiomer inhibit cell proliferation and kinesin-5 function. *Eur J Med Chem* 112:164–170.
- Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6:789–802.

Powell BL, Moser B, Stock W, Gallagher RE, Willman CL, Stone RM, Rowe JM, Coutre S, Feusner JH, Gregory J, Couban S, Appelbaum FR, Tallman MS, Larson RA (2010) Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood* 116:3751–3757.

Prieto AM, Santos AG, Csipak AR, Caliri CM, Silva IC, Arbex MA, Silva FS, Marchi MRR, Cavaleiro AJ, Silva DHS, Bolzani VS, Soares CP (2012) Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil. *Toxicol Appl Pharmacol* 265:368–372.

Qin J, Tang J, Jiao L, Ji J, Chen WD, Feng GK, Gao YH, Zhu XF, Deng R (2013) A diterpenoid compound, excisanin A, inhibits the invasive behavior of breast cancer cells by modulating the integrin β 1/FAK/PI3K/AKT/ β -catenin signaling. *Life Sci* 93:655–663.

Rao X, Huang X, He L, Song J, Song Z, Shang S (2012) Antitumor activity and structure-activity relationship of diterpenoids with a dehydroabietyl skeleton. *Comb Chem High Throughput Screen* 15:840–844.

Rédei D, Boros K, Forgo P, Molnár J, Kele Z, Pálkó I, Pinke G, Hohmann J (2015) Diterpene constituents of *Euphorbia exigua* L. and multidrug resistance reversing activity of the isolated diterpenes. *Chem Biodivers* 12:1214–1221.

Reis M, Ferreira RJ, Serly J, Duarte N, Madureira AM, Santos DJVA, Molnár J, Ferreira MJU (2012) Colon adenocarcinoma multidrug resistance reverted by euphorbia diterpenes: structure-activity relationships and pharmacophore modeling. *Anticancer Agents Med Chem* 12:1015–1024.

Reis MA, Paterna A, Ferreira RJ, Lage H, Ferreira MJ (2014a) Macrocyclic diterpenes resensitizing multidrug resistant phenotypes. *Bioorg Med Chem* 22:3696–3702.

Reis MA, Paterna A, Mónico A, Molnar J, Lage H, Ferreira MJ (2014b). Diterpenes from *Euphorbia piscatoria*: synergistic interaction of Lathyranes with doxorubicin on resistant cancer cells. *Planta Med* 80:1739–1745.

- Reis MA, Ahmed OB, Spengler G, Molnár J, Lage H, Ferreira MJ (2016) Jatrophone diterpenes and cancer multidrug resistance - ABCB1 efflux modulation and selective cell death induction. *Phytomed* 23:968–978.
- Rekha K, Richa P, Hymavathy A, Babu KS, Rao JM, Amitava D (2016) New cytotoxic clerodane diterpenes from the leaves of *Premna tomentosa*. *J Asian Nat Prod Res* 18:215–221.
- Reno TA, Kim JY, Raz DJ (2015) Triptolide inhibits lung cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Ann Thorac Surg* 100:1817–1824.
- Roy PK, Maarisit W, Roy MC, Taira J, Ueda K (2012) Five new diterpenoids from an Okinawan soft coral, *Cespitularia* sp. *Mar Drugs* 10:2741–2748.
- Ruijtenberg S, van den Heuvel S (2016) Coordinating cell proliferation and differentiation: antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* 15:196–212.
- Safe S, Kasiappan R (2016) Natural products as mechanism-based anticancer agents: Sp transcription factors as targets. *Phytother Res* 30:1723–1732.
- Sallam AA, Ayoub NM, Foudah AI, Gissendanner CR, Meyer SA, El Sayed KA (2013) Indole diterpene alkaloids as novel inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells. *Eur J Med Chem* 70:594–606.
- Sallam A, Nugroho AE, Hirasawa Y, Chin-Piow W, Kaneda T, Shirota O, Gedara SR, Morita H (2014) Diterpenoids from *Fagonia mollis*. *Nat Prod Commun* 9:1243–1244.
- Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Lowenberg B, Naoe T, Lengfelder E, Dohner E, Burnett AK, Chen SJ, Mathews V, Iland H, Rego E, Kantarjian H, Ades L, Avvisati G, Montesinos P, Platzbecker U, Ravandi F, Russell NH, Lo-Coco F (2019) Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood* 133:1630–1643.
- Schmitt J, Noble A, Otsuka M, Berry P, Maitland NJ, Rumsby MG (2014) Phorbol ester stimulates ethanolamine release from the metastatic basal prostate cancer cell

line PC3 but not from prostate epithelial cell lines LNCaP and P4E6. Br J Cancer 111:1646–1656.

Shadi S, Saeidi H, Ghanadian M, Rahimnejad MR, Aghaei M, Ayatollahi SM, Choudhary MI (2015) New macrocyclic diterpenes from *Euphorbia connata* Boiss. with cytotoxic activities on human breast cancer cell lines. Nat Prod Res 29:607–614.

Shelton E, Laharie D, Scott FI, Mamtani R, Lewis JD, Colombel JF, Ananthakrishnan AN (2016) Cancer recurrence following immune-suppressive therapies in patients with immune-mediated diseases: a systematic review and metaanalysis. Gastroenterol 151:97–109.e4.

Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, Gu BW, Li JM, Zhu YM, Shi JY, Zheng PZ, Yan H, Liu YF, Chen Y, Shen Y, Wu W, Tang W, Waxman S, De The H, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z (2004) All-trans retinoic acid/As₂O₃ combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 101:5328–5335.

Shen B, Li D, Dong P, Gao S (2011) Expression of ABC transporters is an unfavorable prognostic factor in laryngeal squamous cell carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol 120:820–827.

Shen Y, Lu B, Zhang S, Ma ZJ (2014) Diterpenoid C of *Radix curcumae*: an inhibitor of proliferation and inducer of apoptosis in human colon adenocarcinoma cells acting via inhibiting MAPK signaling pathway. Pharm Biol 52:1158–1165.

Shi M, Ren X, Wang X, Wang H, Liu G, Yuan X, Zheng S, Yu L, Pan S, Song G, Guo Q, Li L, Zhang X, Zhang Z, Ding H, Jiang G (2016) A novel combination of oridonin and valproic acid in enhancement of apoptosis induction of HL-60 leukemia cells. Int J Oncol 48:734–746.

Shih FY, Chen TH, Lu MC, Chen WF, Wen ZH, Kuo YH, Sung PJ (2013) Cladieunicellins K and L, new eunicellin-based diterpenoids from an octocoral *Cladiella* sp. Int J Mol Sci 14:21781–22179.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66:7–30.

Silva CG, Santos Júnior HM, Costa GL, Costa GL, Rodrigues FAR, Oliveira DF, Costa-Lotufo LV, Alves RJV, Eleutherio ECA, Rezende CM (2015) Structure Elucidation, Antimicrobial and cytotoxic activities of a halimane isolated from *Vellozia kolbekii* Alves (Velloziaceae). *Chem Biodiversity* 12:1891–1901.

Simon K (2016) Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging* 11:967-76

Song Y, Xin Z, Wan Y, Li J, Ye B, Xue X (2015) Synthesis and anticancer activity of some novel indolo[3,2-b] andrographolide derivatives as apoptosis-inducing agents. *Eur J Med Chem* 90:695–706.

Spradlin JN, Hu X, Ward CC, Brittain SM, Jones MD, Ou L, To M, Proudfoot A, Ornelas E, Woldegiorgis M, Olzmann JA, Bussiere DE, Thomas JR, Tallarico JA, McKenna JM, Schirle M, Maimone TJ, Nomura DK (2019) Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation. *Nat Chem Biol* 15:747–755.

Su CC (2016) Tanshinone IIA decreases the migratory ability of AGS cells by decreasing the protein expression of matrix metalloproteinases, nuclear factor κ B-p65 and cyclooxygenase-2. *Mol Med Rep* 13:1263–1268.

Sul YH, Lee MS, Cha EY, Thuong PT, Khoi NM, Song IS (2013) An *ent*-kaurane diterpenoid from *Croton tonkinensis* induces apoptosis by regulating AMP-activated protein kinase in SK-HEP1 human hepatocellular carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 36:158–164.

Sun HD, Ma L, Hu HX, Zhang TD (1992) Ai-lin 1 treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Integr Med* 12:170–171.

Swinney DC (2013) Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther* 93:299–301.

Szak'acs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:219–234.

- Tabata K, Kim M, Makino M, Satoh M, Satoh Y, Suzuki T (2012) Phenolic diterpenes derived from *Hyptis incana* induce apoptosis and G(2)/M arrest of neuroblastoma cells. *Anticancer Res* 32:4781–4789.
- Takei M, Umeyama A, Arihara S (2007) Diterpenes inhibit IL-12 production by DC and enhance Th2 cells polarization. *Biochem Biophys Res Commun* 355:603–610.
- Takei M, Umeyama A, Shoji N, Hashimoto T (2008) Diterpenes drive Th1 polarization depending on IL-12. *Int Immunopharmacol* 8:1602–1608.
- Tanabe H, Yasui T, Kotani H, Nagatsu A, Makishima M, Amagaya S, Inoue M (2014) Retinoic acid receptor agonist activity of naturally occurring diterpenes. *Bioorg Med Chem* 22:3204–3212.
- Tao WW, Duan JA, Tang YP, Yang NY, Li JP, Qian YF (2013) Casbane diterpenoids from the roots of *Euphorbia pekinensis*. *Phytochemistry* 94:249–253.
- Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, Hay RT (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10:538–546.
- Thao do T, Phuong do T, Hanh TT, Thao NP, Cuong NX, Nam NH, Minh CV (2014) Two new neoclerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* D. Don growing in Vietnam. *J Asian Nat Prod Res* 16:364–369.
- de The H, Chen Z (2010) Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer* 10:775–783.
- Tiwari RV, Parajuli P, Sylvester PW (2015) Synergistic anticancer effects of combined γ -tocotrienol and oridonin treatment is associated with the induction of autophagy. *Mol Cell Biochem* 408:123–137.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Tsai TC, Wu YJ, Su JH, Lin WT, Lin YS (2013) A new spatane diterpenoid from the cultured soft coral *Simularia leptoclados*. *Mar Drugs* 11:114–123.

Tsao AS, Kim ES, Hong WK (2004) Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin* 54:150–180.

Tseng YJ, Yang YC, Wang SK, Duh CY (2014) Numerosol A–D, new cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia numerosa*. *Mar Drugs* 12:3371–3380.

Valdés A, García-Cañas V, Artemenko KA, Simó C, Bergquist J, Cifuentes A (2017) Nano-liquid chromatography-orbitrap MSbased quantitative proteomics reveals differences between the mechanisms of action of carnosic acid and carnosol in colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 16:8–22.

Valente I, Reis M, Duarte N, Serly J, Molnár J, Ferreira MJ (2012) Jatrophone diterpenes from *Euphorbia mellifera* and their activity as P-glycoprotein modulators on multidrug-resistant mouse lymphoma and human colon adenocarcinoma cells. *J Nat Prod* 75:1915–1921.

Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Yves D, Dmitri VK, Nozomi T, Vandenabeele P (2013) Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. *Methods* 61:117129.

Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V (2020) 5- fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: past, present and future, *Pharmacol Ther* 206:107447.

Wall ME, Wani MC (1995) Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Cancer Res* 55:753–760.

Wall ME, Wani MC (1996) Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol* 51:239–253.

Wall ME (1998) Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Med Res Rev* 18:299–314.

Wang SJ, Li YX, Bao L, Han JJ, Yang XL, Li HR, Wang YQ, Li SJ, Liu HW (2012) Eryngiolide A, a cytotoxic macrocyclic diterpenoid with an unusual cyclododecane core skeleton produced by the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Org Lett* 14:3672–3675.

- Wang C, Jiang L, Wang S, Shi H, Wang J, Wang R, Li Y, Dou Y, Liu Y, Hou G, Ke Y, Liu H (2015a) The antitumor activity of the novel compound Jesridonin on human esophageal carcinoma cells. *PLoS One* 10:e0130284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130284>.
- Wang SS, Cheng YB, Lin YC, Liaw CC, Chang JY, Kuo YH, Shen YC (2015b) Nitrogen-containing diterpenoids, sesquiterpenoids, and nor-diterpenoids from *Cespitularia taeniata*. *Mar Drugs* 13:5796–5814.
- Wang X, Zhang JJ, Sun YM, Zhang J, Wang LR, Li JC, Liu H (2015c) Triptolide induces apoptosis and synergizes with cisplatin in cisplatin-resistant HNE1/DDP nasopharyngeal cancer cells. *Folia Biol (Praha)* 61:195–202.
- Wang K, Yu H, Wu H, Wang X, Pan Y, Chen Y, Liu L, Jin Y, Zhang C (2015d) A new casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis*. *Nat Prod Res* 29:1456–1460.
- Wang T, Liu Q, Zhou L, Yuan JB, Lin X, Zeng R, Liang X, Zhao J, Xu J (2015e) Andrographolide inhibits ovariectomy-induced bone loss via the suppression of RANKL signaling pathways. *Int J Mol Sci* 16:27470–27481.
- Wang Y, Li JX, Wang YQ, Miao ZH (2015f) Tanshinone I inhibits tumor angiogenesis by reducing Stat3 phosphorylation at Tyr705 and hypoxia-induced HIF-1 α accumulation in both endothelial and tumor cells. *Oncotarget* 6:16031–16042.
- Wang L, Hu T, Shen J, Zhang L, Chan LRY, Lu L, Li M, Cho CH, Wu WKK (2015g) Dihydrotanshinone I induced apoptosis and autophagy through caspase dependent pathway in colon cancer. *Phytomed* 22:1079–1087.
- Wang L, He HS, Yu HL, Zeng Y, Han H, He N, Liu ZG, Wang ZY, Xu SJ, Xiong M (2015h) Sclareol, a plant diterpene, exhibits potent antiproliferative effects via the induction of apoptosis and mitochondrial membrane potential loss in osteosarcoma cancer cells. *Mol Med Rep* 11:4273–4278.
- Wang WQ, Xuan LJ (2016) *ent*-6,7-Secokaurane diterpenoids from *Rabdosia serra* and their cytotoxic activities. *Phytochem* 122:119–125.

Wang Y, Liu T, Li H (2016a) Enhancement of triptolide-loaded micelles on tumorigenicity inhibition of human ovarian cancer. *J Biomater Sci Polym Ed* 27:545–556.

Wang ZM, Kang YH, Yang X, Wang JF, Zhang Q, Yang BX, Zhao KL, Xu LP, Yang LP, Ma JX, Huang GH, Cai J, Sun XC (2016b) Andrographolide radiosensitizes human esophageal cancer cell line ECA109 to radiation *in vitro*. *Dis Esophagus* 29:54–61.

Weaver BA (2014) How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 25:2677–2681.

Welford AJ, Caldwell JJ, Liu M, Richards M, Brown N, Lomas C, Tizzard GJ, Pitak MB, Coles SJ, Eccles SA, Raynaud FI, Collins I (2016) Synthesis and evaluation of a 2,11-cembranoid-inspired library. *Chem* 22:5657–5664.

Wen CN, Hu DB, Bai X, Wang F, Li ZH, Feng T, Liu JK (2016) Chemical constituents from fruiting bodies of Basidiomycete *Perenniporia subacida*. *Fitoterapia* 109:179–184.

Whitby LR, Obach RS, Simon GM, Hayward MM, Cravatt BF (2017) Quantitative chemical proteomic profiling of the *in vivo* targets of reactive drug metabolites. *ACS Chem Biol* 12:2040–2050.

Win NN, Ito T, Aimaiti S, Imagawa H, Ngwe H, Abe I, Morita H (2015) Kaempulchraols A–H, diterpenoids from the rhizomes of *Kaempferia pulchra* collected in Myanmar. *J Nat Prod* 78:1113–1118.

Wiśniewski J, Wesołowska O, Środa-Pomianek K, Paprocka M, Bielawska-Pohl A, Krawczenko A, Duarte N, Ferreira MJU, Duś D, Michalak K (2016) *Euphorbia* species-derived diterpenes and coumarins as multidrug resistance modulators in human colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 36:2259–2264.

Woo SM, Min KJ, Seo BR, Nam JO, Choi KS, Yoo YH, Kwon TK (2014) Cafestol overcomes ABT737 resistance in Mcl-1-overexpressed renal carcinoma Caki cells through downregulation of Mcl-1 expression and upregulation of Bim expression. *Cell Death Dis* 5:e1514.

Wright MH, Sieber SA (2016) Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Nat Prod Rep* 33:681–708.

Wu SL, Su JH, Huang CY, Tai CJ, Sung PJ, Liaw CC, Sheu JH (2012) Simplexins P–S, eunicellinbased diterpenes from the soft coral *Klyxum simplex*. *Mar Drugs* 10:1203–1211.

Wu HF, Zhang XP, Wang Y, Zhang JY, Ma GX, Tian Y, Wu LZ, Chen SL, Yang JS, Xu XD (2013a) Four new diterpenes from *Aphanamixis polystachya*. *Fitoterapia* 90:126–131.

Wu XD, Zhang LC, He J, Li GT, Ding LF, Gao X, Dong LB, Song LD, Li Y, Zhao QS (2013b) Two new diterpenoids from *Excoecaria acerifolia*. *J Asian Nat Prod Res* 15:151–157.

Wu WM, Liu Y, Chen X, Jin A, Zhou M, Han T, Li R (2016) Diterpenoids from the branch and leaf of *Abies fargesii*. *Fitoterapia* 110:123–128.

Xu Y, Lang JH, Jiao WH, Wang RP, Peng Y, Song SJ, Zhang BH, Lin HW (2012) Formamido-diterpenes from the South China Sea sponge *Acanthella cavernosa*. *Mar Drugs* 10:1445–1458.

Xu HY, Chen ZW, Hou JC, Du FX, Liu JC (2013) Jolkinolide B induces apoptosis in MCF-7 cells through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Oncol Rep* 29:212–218.

Xu B, Shen W, Liu X, Zhang T, Ren J, Fan Y, Xu J (2015) Oridonin inhibits BxPC-3 cell growth through cell apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin Shanghai* 47:164–173.

Xu K, Cheng WT, Hu ZW, Shan W (2016a) Effect of tanshinone IIA in preventing and treating oxaliplatin induced peripheral neuropathy. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 36:559–563.

Xu M, Wang S, Jia O, Zhu Q, Shi L (2016b) Bioactive diterpenoids from *Clerodendrum kiangsiense*. *Molecules* 21:86.

Xu S, Luo S, Yao H, Cai H, Miao X, Wu F, Yang DH, Wu X, Xie W, Yao H, Chen ZS, Xu J (2016c) Probing the anticancer action of oridonin with fluorescent analogues: visualizing subcellular localization to mitochondria. *J Med Chem* 59:5022–5034.

Xu X, Yuan J, Zhou X, Li W, Zhu N, Wu H, Li P, Sun Z, Yang J, Ma G (2016d) Cassane diterpenes with oxygen bridge from the seeds of *Caesalpinia sappan*. *Fitoterapia* 112:205–210.

Yamahara M, Sugimura K, Kumagai A, Fuchino H, Kuroi A, Kagawa M, Itoh Y, Kawahara H, Nagaoka Y, Iida O, Kawahara N, Takemori H, Watanabe H (2016) *Callicarpa longissima* extract, carnosol-rich, potently inhibits melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *J Nat Med* 70:28–35.

Yan SK, Liu RH, Jin HZ, Liu XR, Ye J, Shan L, Zhang WD (2015) "Omics" in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. *Chin J Nat Med* 13:3–21.

Yan H, Li Y, Yang Y, Zhang Z, Zhang G, Sun Y, Yu P, Wang Y, Xu L (2016) Protective effects of andrographolide derivative AL-1 on high glucose-induced oxidative stress in RIN-m cells. *Curr Pharm Des* 22:499–505.

Yang SP, Zhang XW, Ai J, Gan LS, Xu JB, Wang Y, Su ZS, Wang L, Ding J, Geng MY, Yue JM (2012) Potent HGF/c-Met axis inhibitors from *Eucalyptus globulus*: the coupling of phloroglucinol and sesquiterpenoid is essential for the activity. *J Med Chem* 55:8183–8187.

Yang B, Chen GY, Song XP, Yang LQ, Wu XY, Han CR, Chen WH, Zou BY, Li XM (2013) Five new degraded diterpenoids from *Trigonostemon xyphophylloides*. *Bioorg Med Chem Lett* 23:5748–5751.

Yang J, Jiang H, Wang C, Yang B, Zhao L, Hu D, Qiu G, Dong X, Xiao B (2015a) Oridonin triggers apoptosis in colorectal carcinoma cells and suppression of microRNA-32 expression augments oridonin-mediated apoptotic effects. *Biomed Pharmacother* 72:125–134.

Yang S, Zhang M, Chen C, Zhang Z, Hong J, Han D, Ma J, Zhang SB, Okunieff P, Zhang L (2015b) Triptolide mitigates radiation-induced pulmonary fibrosis. *Radiat Res* 184:509–517.

Yang Y, Cong H, Han C, Yue L, Dong H, Liu J (2015c) 12- Deoxyphorbol 13-palmitate inhibits the expression of VEGF and HIF-1 α in MCF-7 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Oncol Rep* 34:1755–1760.

Yang J, Wang WG, Wu HY, Du X, Li XN, Li Y, Pu JX, Sun HD (2016) Bioactive enmein-type entkaurane diterpenoids from *Isodon phyllostachys*. *J Nat Prod* 79:132–140.

Yang Y, Sun M, Yao W, Wang F, Li X, Wang W, Li J, Gao Z, Qiu L, You R, Yang C, Ba Q, Wang H (2020) Serum anti-SPP1 autoantibody as a potential novel biomarker in detection of esophageal squamous cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 8:e000317.

Yao R, Chen Z, Zhou C, Luo M, Shi X, Li J, Gao Y, Zhou F, Pu J, Sun H, He J (2015a) Xerophilusin B induces cell cycle arrest and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells and does not cause toxicity in nude mice. *J Nat Prod* 78:10–16.

Yao Y, Li HZ, Qian BJ, Liu CM, Zhang JB, Lin MC (2015b) Cryptotanshione reduces the expression of metadherin in DU145 prostate cancer cells. *Zhonghua Nan Ke Xue* 21:782–787.

Yau TO (2019) Precision treatment in colorectal cancer: Now and the future. *J gastroenterol hepatol* 3:361-369.

Yassine F, Gali-Muhtasib H, Salibi E (2016) Overview of the formulations and analogs in the taxanes' story. *Curr Med Chem* 23:4540–4558.

Yazdiniapour Z, Ghanadian M, Zolfaghari B, Lanzotti V (2016) 6(17)-Epoxyalthyrane diterpenes from *Euphorbia sogdiana* Popov with cytotoxic activity. *Fitoterapia* 108:87–92.

- Ye Q, Yao G, Zhang M, Guo G, Hu Y, Jiang J, Cheng L, Shi J, Li H, Zhang Y, Liu H (2015) A novel *ent*-kaurane diterpenoid executes antitumor function in colorectal cancer cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *Carcinogenesis* 36:318–326.
- Yoon WJ, Ham YM, Yoon HS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG (2013) Acanthoic acid inhibits melanogenesis through tyrosinase downregulation and melanogenic gene expression in B16 melanoma cells. *Nat Prod Commun* 18:1359–1362.
- Yu B, Li MH, Wang W, Wang YQ, Jiang Y, Yang SP, Yue JM, Ding J, Miao ZH (2012) Pseudolaric acid B-driven phosphorylation of c-Jun impairs its role in stabilizing HIF-1 α : a novel function-converter model. *J Mol Med* 90:971–981.
- Yu F, Li K, Chen S, Liu Y, Li Y (2015) Pseudolaric acid B circumvents multidrug resistance phenotype in human gastric cancer SGC7901/ADR cells by downregulating Cox-2 and Pgp expression. *Cell Biochem Biophys* 71:119–126. [https:// doi.org/10.1007/s12013-014-0170-7](https://doi.org/10.1007/s12013-014-0170-7).
- Yuan W-J, Yang G-P, Zhang J-H, Zhang Y, Chen DZ, Li SL, Di YT, Hao XJ (2016) Three new diterpenes with cytotoxic activity from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. *Phytochem Lett* 18:176–179.
- Zaabat N, Hay AE, Michalet S, Darbour N, Bayet C, Skandrani I, Chekir-Ghedira L, Akkal S, Dijoux-Franca MG (2011) Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. *Food Chem Toxicol* 49:3328–3335.
- Zhan ZJ, Wen YT, Ren FY, Rao GW, Shan WG, Li CP (2012) Diterpenoids and a diarylheptanoid from *Hedychium coronarium* with significant anti-angiogenic and cytotoxic activities. *Chem Biodivers* 9:2754–2760.
- Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, Liang WX, Song AX, Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Zhang QY, Yang HY, Huang QH, Zhou GB, Tong JH, Zhang Y, Wu JH, Hu HY, de The H, Chen SJ, Chen Z (2010) Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science* 328:240–243.

Zhang X, Tan Y, Li Y, Jin L, Wei N, Wu H, Ma G, Zheng Q, Tian Y, Yang J, Zhang J, Xu X (2014) Aphanamixins A–F, acyclic diterpenoids from the stem bark of *Aphanamixis polystachya*. *Chem Pharm Bull* 62:494–498.

Zhang C, Qiu X (2015) Andrographolide radiosensitizes human ovarian cancer SKOV3 xenografts due to an enhanced apoptosis and autophagy. *Tumour Biol* 36:8359–8365.

Zhang J, Li Y, Zhu R, Li L, Li L, Wang Y, Zhou J, Qiao Y, Zhang Z, Lou H (2015a) Scapairrins A–Q, labdanetype diterpenoids from the Chinese liverwort *Scapania irrigua* and their cytotoxic activity. *J Nat Prod* 78:2087–2094.

Zhang XS, Ha S, Wang XL, Shi YL, Duan SS, Li ZA (2015b) Tanshinone IIA protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity through miR-153/ NF-E2-related factor 2/antioxidant response element signaling pathway. *Neurosci* 303:489–502.

Zhang G, Ma H, Hu S, Xu H, Yang B, Yang Q, Xue Y, Cheng L, Jiang J, Zhang J, Wang F, Zhang Y (2016a) Clerodane-type diterpenoids from tuberous roots of *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep. *Fitoterap* 110:59–65.

Zhang K, Li J, Meng W, Xing H, Yang Y (2016b) Tanshinone IIA inhibits acute promyelocytic leukemia cell proliferation and induces their apoptosis *in vivo*. *Blood Cells Mol Dis* 56:46–52.

Zhang Z, Wang A, Li H, Zhi H, Lu F (2016c) STAT3-dependent TXNDC17 expression mediates taxol resistance through inducing autophagy in human colorectal cancer cells. *Gene* 584:75–82.

Zhang R, Li X, Zhang X, Qin H, Xiao W (2020) Machine learning approaches for elucidating the biological effects of natural products. *Nat Prod Rep*. Articolo in stampa.

Zhao S, Pu JX, Sun HD, Wu YL (2012) Longikaurin A induces apoptosis of multiple myeloma H929 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 20:611–615.

- Zhao H, Zeng G, Zhao S, Xu J, Kong L, Li Y, Tan N, Yang S (2015a) Cytotoxic labdane-type diterpenes from *Hedychium longipetalum* inhibiting production of nitric oxide. *Bioorg Med Chem Lett* 25:4572–4575.
- Zhao M, Onakpa MM, Santarsiero BD, Chen WL, Szymulanska-Ramamurthy KM, Swanson SM, Burdette JE, Che CT (2015b) (9 β H)-Pimaranes and derivatives from the tuber of *Icacina trichantha*. *J Nat Prod* 78:2731–2737.
- Zhao SM, Chou GX, Yang QS, Wang W, Zhou JL (2016) Abietane diterpenoids from *Caryopteris incana* (Thunb.) Miq. *Org Biomol Chem* 14:3510–3520.
- Zhao M, Guo D-L, Yuan L-Y, Gu YC, Chena L, Ding LS, Zhou Y (2017) Three new labdane diterpenes from *Loxocalyx urticifolius*. *Phytochem Lett* 19:55–59.
- Zheng CJ, Zhu JY, Yu W, Ma XQ, Rahman K, Qin LP (2013a) Labdane-type diterpenoids from the fruits of *Vitex trifolia*. *J Nat Prod* 76:287–291.
- Zheng Y, Zhang SW, Cong HJ, Huang YJ, Xuan LJ (2013b) Caesalminaxins A–L, cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia minax*. *J Nat Prod* 76:2210–2218.
- Zhong M, Wu H, Zhang X, Sun G, Sun G, Yu S, Xu X (2014) A new diterpene from *Clinopodium chinense*. *Nat Prod Res* 28:467–472.
- Zhu PY, Yin WH, Wang MR, Dang YY, Ye XY (2015) Andrographolide suppresses melanin synthesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway. *J Dermatol Sci* 79:74–83.
- Zhu YQ, Wang BY, Wu F, An YK, Zhou XQ (2016) Influence of tanshinone IIA on the apoptosis of human esophageal Ec-109 cells. *Nat Prod Commun* 11:17–19.
- Zhu X, Yuan C, Tian C, Li C, Nie F, Song X, Zeng R, Wu D, Hao X, Li L (2018) The plant sesquiterpene lactone parthenolide inhibits Wnt/ β -catenin signaling by blocking synthesis of the transcriptional regulators TCF4/LEF1. *J Biol Chem* 293:5335–5344.
- Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, Kroemer G (2016) Microbiome and anticancer immunosurveillance. *Cell* 165:276–287.

Zou QF, Du JK, Zhang H, Wang HB, Hu ZD, Chen SP, Du Y, Li MZ, Xie D, Zou J, Sun HD, Pu JX, Zeng MS (2013) Anti-tumour activity of longikaurin A (LK-A), a novel natural diterpenoid, in nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med* 11:200.

Zou QY, Wu HF, Tang YL, Chen DZ (2016) A new labdane diterpene from the rhizomes of *Alpinia officinarum*. *Nat Prod Res* 30:1–6.

2. Scopo di questo capitolo di tesi

Ogni giorno in Italia vengono diagnosticati poco più di 1.000 nuovi casi di tumore, per un totale di 377.000 in un anno, con 181.330 morti tra i pazienti oncologici. Un bilancio sempre inquietante, quello delle neoplasie, che però va letto insieme al dato forse più importante: i 3.6 milioni di italiani guariti da un tumore, in aumento del 36% rispetto solo a 10 anni fa. Un risultato clamoroso, che pone il nostro Paese ai vertici della sopravvivenza da malattie oncologiche nel mondo. A cosa dobbiamo questo confortante primato? Alla ricerca che nei laboratori di tutta Italia non dà tregua alle infinite versioni del cancro, con un vero e proprio esercito di medici e scienziati al lavoro quotidianamente per spostare sempre più in là il perimetro della vita.

L'impiego di farmaci provenienti principalmente dal mondo vegetale è conosciuto fin dall'antichità e, recentemente, questi sistemi sono entrati a far parte di studi clinici, fornendo informazioni fondamentali relativamente alla relazione struttura chimica-attività tumorale. Molti autori scientifici suggeriscono che la fitoterapia può essere utilizzata come opzione terapeutica di iniziativa per la gestione del cancro. Più del 50% dei farmaci antitumorali, infatti, proviene dai prodotti naturali. Tra i prodotti naturali, le piante sono state a lungo una fonte produttiva di metaboliti bioattivi, compresi i farmaci antitumorali.

Tra i metaboliti secondari, i terpenoidi e/o i composti aromatici, contenuti negli oli essenziali o negli estratti, sono stati introdotti come agenti antitumorali significativi in molti studi. Tra i terpeni, i diterpeni sono oggi sotto i riflettori per le loro promettenti attività biologiche. Sono già stati introdotti numerosi potenziali diterpeni antitumorali e loro derivati, come i taxani (ad es. taxolo/paclitaxel/paclitaxel legato all'albumina), triptolide, oridonina, andrographolide, e diterpenoidi del caffè (es. acido caffeico e kahweol). È stato dimostrato che questi diterpeni e i loro derivati agiscono contro una varietà di tumori, compresi quelli animali, umani e/o di altro tipo, e le loro linee cellulari, nonché su svariati microrganismi.

Considerato quanto detto sopra, lo scopo di questo capitolo della tesi di dottorato è quello di ampliare l'arsenale di composti antitumorali cercando di migliorare

l'attività di composti che hanno già dimostrato importante attività a tal merito. In particolare, ho indagato composti semi-sintetici a partire da un prodotto naturale, altamente tossico, quale l'*ent*-kaurene atractyligenina. Questa prima parte della tesi di dottorato è interamente dedicata alla ricerca di composti con potenziale attività antitumorale. Lo scopo che questa parte di tesi si propone è quello di indagare circa la possibile attività biologica di derivati bromurati, ridotti, in forma ammidata e ossidati dell'atractyligenina, su cellule (HCT116) del carcinoma del colon, su cellule del melanoma maligno umano (A375), su cellule di cancro epiteliale del colon umano (CaCo2) e su cellule di epidermide umana immortalizzate (HaCaT). I diversi derivati sintetici sono stati caratterizzati chimicamente attraverso studi spettroscopici (¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HMBC, HSQC e NOESY), polarimetrici e spettrometrici (HPLC-MS). Infine, è stata valutata l'attività citotossica di questi derivati mediante saggio di vitalità MTT ed è stato caratterizzato il meccanismo di morte mediante indagine morfologica, analisi mediante microscopia a fluorescenza con colorazione di Hoescht e analisi in *western blotting*.

3. Risultati e discussioni

3.1. Cytotoxic activity of several *ent*-kaurane derivatives of atractyligenin. Synthesis of unreported diterpenic skeleton by chemical rearrangement

I risultati di questa sezione sono stati pubblicati in Badalamenti et al. (Badalamenti et al. 2022).

3.1.1. Abstract

Atractyloside, carbossitractyloside, il loro aglicone atractyligenin e diversi derivati sintetici sono stati testati e sono risultati attivi contro differenti linee cellulari tumorali umane. L'atrattiligenina è stata sottoposta a reazioni di ossidazione, bromurazione ed eliminazione, ottenendo diversi composti sintetici. Uno scheletro chimicamente interessante è stato sintetizzato mediante riarrangiamento chimico a partire dal 3 β -bromo-2,15-dichetoatractyligenin metil estere. I composti sintetizzati sono risultati attivi contro tutte le linee cellulari testate. In particolare, l'estere metilico della 15-chetoatrattiligenina e l'estere metilico del 3 β -bromo-2,15-dichetoatrattiligenina sono risultati i più attivi con valori IC₅₀ di 0.427 e 0.723 μ M contro la linea cellulare di melanoma A375. Ottimi risultati sono stati ottenuti anche contro la linea cellulare del cancro del colon CaCo2, con attività antiproliferativa leggermente inferiore. Un'interessante estensione dello studio dovrebbe essere quella di analizzare i derivati dell'atrattiligenina anche come bersaglio per il melanoma umano e le cellule di cancro del colon umano.

3.1.2. Introduzione

Chamaeleon gummifer Cass. [sin. *Acarna gummifera* W., *Atractylis gummifera* Salzm. ex L., *Carlina gummifera* (L.) Less.] (The World Flora, 2022) è un cardo, appartenente alle Asteraceae, che cresce principalmente nelle regioni mediterranee: in Nord Africa (Algeria, Marocco e Tunisia) e nell'Europa meridionale (Italia, Grecia, Spagna e Portogallo). La pianta ha un lungo rizoma che può raggiungere una lunghezza di 30-40 cm con un diametro di 7-8 cm. Le foglie

sono profondamente divise in lobi spinosi e raggruppate in rosette. I fiori sono rosa e raggruppati in *capitulum* circondati da brattee ricoperte da spine. Dopo che il frutto è maturo, dalla base delle brattee, fuoriesce un lattice bianco-giallastro (Bruneton, 1999).

Questa pianta, conosciuta con diversi nomi volgari come '*masticogna*' (siciliano), '*musciurida*' (sardo), '*chardon 'a glu*' (francese) e '*el-heddah*' (arabo), ha mostrato diverse proprietà tossiche sin dal III secolo a.C. Teofrasto, infatti, notando le sue proprietà biologiche, ne suggeriva l'uso contro vermi e lebbra, e mescolata con olio e 'cavolo di montagna', diventava un ottimo veleno per cani e maiali (Daniele et al. 2005).

Nella medicina popolare, *C. gummifer* è stato raccomandato per il trattamento di diversi problemi di salute come parassiti intestinali, ulcere, avvelenamento da morso di serpente, idrope e sonnolenza. Nella medicina tradizionale araba veniva usato per cauterizzare gli ascessi. La pianta era anche nota per le sue proprietà antipiretiche, diuretiche, purgative ed emetiche (Larrey and Pageaux, 1995), e in Nord Africa, il suo uso per il trattamento dell'ulcera sifilitica o come abortivo, è ancora segnalato (Capdevielle and Darraq, 1980; Georgiou et al. 1988).

Diversi casi di avvelenamento da *C. gummifer* sono stati descritti in letteratura a partire dal XIX secolo (Hamouda et al. 2004) e la sua tossicità risiede nella presenza dell'atractyloside (**1**) e della carbossitractyloside (**2**) (**Fig. 1**), due diterpenoidi glucosidici capaci di inibire la fosforilazione ossidativa nei mitocondri degli epatociti e delle cellule epiteliali tubulari prossimali (Vignais et al. 1978). L'atractyloside (**1**) fu isolato per la prima volta da Lefranc dalle radici di *C. gummifer* (Lefranc 1868), ma la sua struttura fu chiarita solo un secolo dopo (Ajello et al. 1963; Piozzi et al. 1966; Piozzi 1978). Diversi altri analoghi dell'atractyloside, che contengono tutti il derivato kaurano aglicone atractyligenin (**3**) (**Fig. 1**), sono stati successivamente scoperti in *Callilepis laureola* (Popat et al. 2001), *Widelia glauca* (Schteingart and Pomilio 1984) e *Antennaria rosea* subsp. *confinis* (Xiao et al. 2019) e nelle diverse specie di piante di caffè (Pegel 1981; Ames 1983; Gao et al. 2021; Hu et al. 2021; Nemzer et al. 2021).

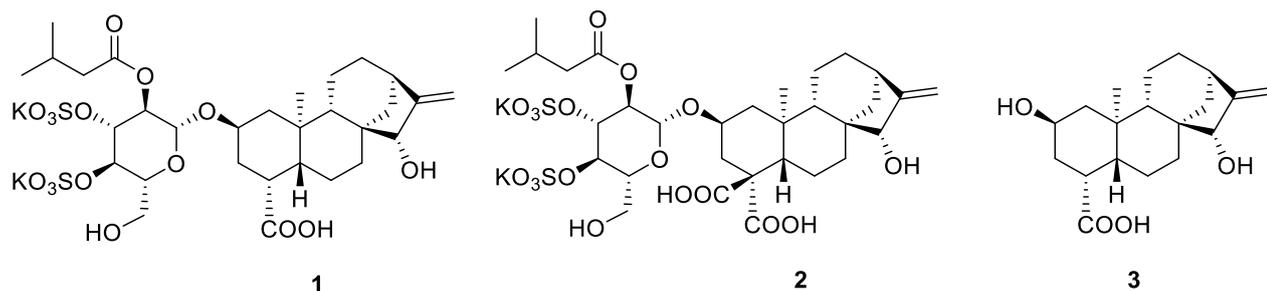


Fig. 1. Strutture dell'atractyloside (1), della carboxyatractyloside (2) e dell'atractyligenina (3).

L'idrolisi basica sia dell'atractyloside (1) che della carboxyatractyloside (2) fornisce l'atractyligenina (3), che è stata oggetto di numerose modificazioni chimiche anche al fine di esplorare le proprietà biologiche dei suoi derivati. Queste indagini hanno riguardato la funzionalizzazione fotoindotta del gruppo metilico C-20 dell'atractyligenina (3) (Buscemi et al. 2001; 2003), le trasformazioni catalizzate da enzimi dei suoi gruppi alcolici (Monsalve et al. 2005) e la sintesi di numerosi derivati ossidativi con attività citotossica promettente (Rosselli et al. 2007; Cotugno et al. 2014). Uno di questi, l'estere metilico della 15-chetoatractyligenina, ha mostrato una potente attività di inibizione della crescita delle cellule tumorali il cui meccanismo d'azione è stato ampiamente chiarito (Cotugno et al. 2014; Vasaturo et al. 2017). Inoltre, la valutazione delle proprietà antibiotiche dell'atractyloside, dell'atractyligenina e del 15-dideidroatractyligenin metil estere contro *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Brucoli et al. 2020), la loro attività anti-leishmania (Deiva et al. 2020) e l'inibizione del fotoinvecchiamento cutaneo dell'atractyligenina (3) (Xuan et al. 2019) sono stati recentemente segnalati.

A causa della grande disponibilità di atractyligenin (3), facilmente ottenibile dalla popolazione siciliana di *C. gummifer*, particolarmente ricca dei suoi precursori atractyloside (1) e carboxyatractyloside (2) (**Fig. 1**) (Fassina et al. 1962), nell'ambito della nostra ricerca in corso sulle specie siciliane (Rosselli et al. 2020; Sut et al. 2020; Badalamenti et al. 2021; Basile et al. 2022; Ilardi et al. 2022), abbiamo deciso di indagare ulteriormente la reattività chimica di questo interessante *ent*-kaurane, effettuando su di esso reazioni di bromurazione, riduzione ed eliminazione al fine di ottenere un nuovo sistema α,β -insaturo (estere α,β -insaturo), composto 11, e verificando se questo porta ad un miglioramento dell'attività citotossica.

3.1.3. Materiale e metodi

3.1.3.1. Materiale vegetale

I rizomi di *Chamaeleon gummifer* Cass. sono stati raccolti a Piana degli Albanesi, Sicilia (Italia) (37°59'11" N, 13°16'06" E, 835 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 MB-2020/84) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

3.1.3.2. Procedure generali

I poteri rotatori sono stati misurati con CHCl₃ con un polarimetro digitale JASCO P-1010; Gli spettri ¹H e ¹³C NMR sono stati registrati a 400/100 MHz in CDCl₃, se non diversamente indicato, su spettrometri Bruker, utilizzando il segnale del solvente residuo ($\delta = 7.27$ in ¹H e $\delta = 77.00$ in ¹³C per CDCl₃) 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 × 50 mm, 1.8 μm) con una colonna di guardia di sicurezza Phenomenex C₁₈ (4 mm × 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-anisalaldeide in EtOH acido. Celite[®] 545, piridinio clorocromato (PCC), piridinio tribromuro (PyHBr₃), NaCl, Na₂SO₄, CuBr₂, e tutti i solventi organici utilizzati, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (San Louis, MO, USA).

3.1.3.3. Isolamento dell'atractyloside (1) e della carbossitractyloside (2)

Atractyloside (1) e carbossitractyloside (2) sono stati estratti come precedentemente riportato (Danieli et al. 1972).

Attrattiligenina (3)

L'attrattiligenina (3) è stata ottenuta come precedentemente riportato (Ajello et al. 1963).

Sintesi del composto (4)

Il composto 4 è stato preparato dal composto (3) (4 g, 12 mmol) e CH_2N_2 (≈ 40 mL) come precedentemente riportato (Piozzi et al. 1966). Atractyligenin (3) (4.00 g, 12 mmol) è stata per prima dissolta in THF a 0 °C. Dopo, CH_2N_2 (≈ 40 mL) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per due 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 (3:1, v/v) dando 4 (3.92 g, 97.8%). ESIMS (+) m/z 334.4661 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Le proprietà fisiche e spettroscopiche del composto in esame sono in accordo con i dati riportati in letteratura (Piozzi et al. 1966).

Ossidazione del metil estere dell'atractyligenin (4) per ottenere gli esteri regioisomerici 5 e 6

Una soluzione di 4 (1 g, 3 mmol) in 40 mL di diclorometano anidro (DCM) è stata aggiunta a 0.52 g (2.4 mmol) PCC e lasciata agitare, per 24 h, a temperatura ambiente. Dopo filtrazione su Celite® 545 (≤ 125.30 μm) e purificazione con colonna cromatografica [Si gel, 98:2 (v/v) DCM-MeOH come miscela eluente], i composti (5) (229.6 mg, 23% resa) e (6) (677.96 Mg, 68% resa) sono stati ottenuti. Le loro caratteristiche fisiche e spettroscopiche sono in accordo con i dati riportati in letteratura (Rosselli et al. 2007).

Sintesi del metil estere diketo-atractyligenina (7)

Una soluzione di 4 (2 g, 6 mmol) in 80 mL di diclorometano anidro (DCM) è stata aggiunta a 3.88 g (18 mmol) (ratio 1:3) di PCC e lasciata agitare, per 2 h, a

temperatura ambiente. Dopo filtrazione su Celite® 545 ($\leq 125.30 \mu\text{m}$) e purificazione con colonna cromatografica [Si gel, 98:2 (v/v) DCM-MeOH come miscela eluente], il composto (7) (1.73 g, 88%) è stato ottenuto. Le proprietà fisiche e spettroscopiche del composto in esame sono in accordo con i dati riportati in letteratura (Rosselli et al. 2007).

Bromurazione del composto (7) per la sintesi dei composti (8) e (9)

Il metil estere diketo-atractyligenina (7) (200.00 mg, 0.6 mmol) è stato dissolto in 1.5 mL di THF anidro sotto atmosfera di azoto. 198.36 mg (2 eq.) di PyHBr₃ sono stati aggiunti alla soluzione e la miscela risultante è stata agitata a 0 °C per 1 h e poi a temperatura ambiente per l'intera notte. Quindi, acqua è stata aggiunta (4 mL), e la miscela è stata estratta in DCM (3 × 5 mL). La fase organica è stata quindi lavata con 5 mL di NaCl, ed essiccata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente è stato rimosso a basse pressioni e il residuo purificato con colonna cromatografica [Si gel, 80:20 (v/v) etere di petrolio-EtOAc come eluente] dando 138.7 mg (53.3% resa) del composto maggioritario (8) e 64.5 mg del composto minoritario (9) (18.3% di resa).

Per verificare la possibilità di ulteriori regio e stereoisomeri, è stata effettuata un'altra bromurazione utilizzando un reagente inorganico: CuBr₂. Il metil estere diketo-atractyligenina (7) (200.00 mg, 0.6 mmol) è stato disciolto in 10 mL della miscela CHCl₃/EtOAc (1:1). 256.74 mg (3.5 eq.) di CuBr₂ sono stati aggiunti alla soluzione e questa è stata agitata per 24 h sotto riflusso. Quindi, acqua è stata aggiunta (4 mL), e la miscela è stata estratta in DCM (3 × 5 mL). La fase organica è stata quindi lavata con 5 mL di NaCl, ed essiccata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente è stato rimosso a basse pressioni e il residuo purificato con colonna cromatografica [Si gel, 80:20 (v/v) etere di petrolio-EtOAc come eluente]. La stessa miscela (8 e 9) è stata ottenuta ma, in questo caso, il principale composto è stato il 9 (154.7 mg, 45%) e solo una piccola quantità di 8 (25.8 mg, 10 %) è stata ottenuta.

Composto 8: solido amorfo; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -149.51$ (c 0.05, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.987 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1$ Hz, H-17a), 5.304 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1$ Hz, H-17b), 4.721 (1H, dd, $J = 1.5, 1.2$ Hz, H-3 α), 3.701 (3H, s, -OCH₃), 3.124 (1H, dd, $J = 5.4, 1.5$ Hz, H-4 β), 3.077 (1H, brs, H-13), 2.690 (1H, dd, $J = 14.3, 0.8$ Hz,

H-1 α), 2.624 (1H, ddd, $J = 12.1, 5.4, 3.0$ Hz, H-5 β), 2.465 (1H, dd, $J = 14.3, 1.2$ Hz, H-1 β), 2.272 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-14 α), 2.086 (1H, ddd, $J = 14.0, 14.0, 4.4$ Hz, H-7 β), 1.888 (1H, dddd, $J = 14.0, 14.0, 12.1, 3.2$ Hz, H-6 α), 1.815 (1H, ov, H-6 β), 1.808 (1H, ov, H-12 α), 1.719 (1H, ov, H-12 β), 1.579 (1H, m, H-9 β), 1.564 (1H, ov, H-11 β), 1.540 (1H, ov, H-11 α), 1.452 (1H, m, H-14 β), 1.418 (1H, ddd, $J = 14.0, 3.2, 3.2$ Hz, H-7 α), 0.937 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR vedere **Tabella 1**; ESIMS (+) m/z 431.0824 [M+Na]⁺ (calcd. per C₂₀H₂₅BrO₄, m/z 431.0828).

Composto **9**: solido amorfo; $[\alpha]_D^{25} = -127.72$ (c 0.06, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.715 (1H, dd, $J = 1.5, 1.2$ Hz, H-3 α), 3.944 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-17a), 3.700 (3H, s, -OCH₃), 3.678 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-17b), 3.122 (1H, dd, $J = 5.4, 1.5$ Hz, H-4 β), 2.790 (1H, m, H-13), 2.665 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-1 α), 2.618 (1H, ddd, $J = 12.1, 5.4, 3.0$ Hz, H-5 β), 2.405 (1H, dd, $J = 14.0, 1.2$ Hz, H-1 β), 2.240 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-14 α), 2.106 (1H, dd, $J = 12.6, 4.0$ Hz, H-14 β), 2.073 (1H, ddd, $J = 14.0, 14.0, 4.4$ Hz, H-7 β), 1.969 (1H, m, H-12 β), 1.878 (1H, dddd, $J = 14.0, 14.0, 12.1, 3.2$ Hz, H-6 α), 1.828 (1H, brs, H-6 β), 1.752 (1H, m, H-12 α), 1.681 (1H, ddd, $J = 14.0, 3.2, 3.2$ Hz, H-7 α), 1.584 (1H, ov, H-11 α), 1.570 (1H, ov, H-9 β), 1.297 (1H, m, H-11 β), 0.901 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR vedere **Tabella 1**; ESIMS (+) m/z 588.9138 [M+Na]⁺ (calcd. per C₂₀H₂₅Br₃O₄, m/z 588.9195).

Composto (10): riarrangiamento di Favorskii del 3 β -Bromo-2,15-diketoatractyligenin metil estere (8)

3 β -Bromo-2,15-diketoatractyligenina metil estere (**8**) (80 mg, 0.2 mmol) è stato disciolto in una miscela di MeOH:DCM (7:3 mL, v/v) e lasciato agitare a 0 °C. Dopo, NaBH₄ (19.56 mg, 0.52 mmol) è stato aggiunto, e la miscela è stata lasciare agitare a temperatura ambiente per 24 h. Quindi, acqua è stata aggiunta (4 mL), e la miscela è stata estratta in DCM (3 \times 5 mL). La fase organica è stata quindi lavata con 5 mL di NaCl, ed essiccata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente rimosso sotto pressione ridotta e il residuo purificato tramite colonna cromatografica [Si gel, 70:30 (v/v) cicloesano-EtOAc come eluente]. Dopo purificazione, è stato ottenuto il composto (**10**) (6 mg, 8.33% di resa).

Composto **10**: solido amorfo; $[\alpha]_D^{25} = -76.16$ (c 0.08, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.970 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1$ Hz, H-17a), 5.283 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1$ Hz,

H-17b), 3.681 [3H, s, -OCH₃ (2)], 3.580 [3H, s, -OCH₃ (1)], 3.139 (1H, ddd, $J = 10.1, 10.1, 5.0$ Hz, H-4 α), 3.041 (1H, m, H-13), 2.818 (1H, dd, $J = 8.2, 0.8$ Hz, H-1 α), 2.500 (1H, ddd, $J = 14.5, 8.2, 5.0$ Hz, H-3 α), 2.359 (1H, d, $J = 12$ Hz, H-14 α), 2.221 (1H, ddd, $J = 13.1, 10.1, 2.8$ Hz, H-5 β), 2.088 (1H, ddd, $J = 14.5, 10.1, 0.8$ Hz, H-3 β), 1.960 (1H, ov, H-7 β), 1.938 (1H, ov, H-6 α), 1.900 (1H, ov, H-12 α), 1.753 (1H, ov, H-11 α), 1.727 (1H, ov, H-12 β), 1.621 (1H, ov, H-11 β), 1.406 (1H, ov, H-6 β), 1.373 (1H, ov, H-14 β), 1.304 (1H, ov, H-7 α), 1.230 (1H, ov, H-9 β), 1.083 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR vedere **Tabella 1**; ESIMS (+) m/z 361.2008 [M+H]⁺ (calcd. per C₂₁H₂₈O₅, m/z 361.2009).

Sintesi del 3-*en*-15-ketoatractyligenin metil estere (**11**)

3 β -Bromo-2,15-diketoatractyligenin metil estere (**8**) (80 mg, 0.2 mmol) è stato disciolto in una miscela di MeOH:DCM (7:3 mL, v/v) è lasciato agitare a 0 °C. Quindi, NaBH₄ (19.56 mg, 0.52 mmol) è stato aggiunto, è la miscela di reazione è stata lasciata agitare per 24 h a temperatura ambiente. Quindi, acqua è stata aggiunta (4 mL), e la miscela è stata estratta in DCM (3 × 5 mL). La fase organica è stata quindi lavata con 5 mL di NaCl, ed essiccata con Na₂SO₄ e filtrata. L'estratto grezzo, parzialmente purificato come riportato nella sezione **3.1.3.9.**, è stato disciolto in 5 mL di CHCl₃, e quindi 300 mg Zn⁰ sono stati aggiunti. La miscela è stata agitata sotto riflusso per 18 h. Quindi, acqua è stata aggiunta (4 mL), e la miscela è stata estratta in DCM (3 × 5 mL). La fase organica è stata quindi lavata con 5 mL di NaCl, ed essiccata con Na₂SO₄ e filtrata. Dopo filtrazione e purificazione con colonna cromatografica [Si gel, 70:30 (v/v) cicloesano-EtOAc come eluente], il composto (**11**) (54 mg, 81.8% di resa) è stato ottenuto.

Composto **11**: solido amorfo; $[\alpha]_D^{25} = -133.15$ (c 0.05, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.405 (1H, dd, $J = 3.0, 1.2$ Hz, H-3 β), 5.996 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1$ Hz, H-17a), 5.303 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1$ Hz, H-17b), 4.413 (1H, ddd, $J = 10.1, 6.0, 3.0$ Hz, H-2 β), 3.749 (3H, s, -OCH₃), 3.074 (1H, m, H-13), 2.485 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-14a), 2.355 (1H, dd, $J = 10.1, 6.0$ Hz, H-1 α), 2.316 (1H, ov, H-5 β), 2.163 (1H, ov, H-6 α), 2.028 (1H, ov, H-7 β), 2.008 (1H, ov, H-9 β), 1.836 (1H, ov, H-12 β), 1.763 (1H, ov, H-11 β), 1.750 (1H, ov, H-12 α), 1.599 (1H, ov, H-11 α), 1.453 (1H, ov, H-14b), 1.365 (1H, brs, H-7 α), 1.306 (1H, ov, H-6 β), 1.061 (3H, s, CH₃), 0.960

(1H, dd, $J = 10.1, 10.1$ Hz, H-1 β). ^{13}C -NMR vedere **Tabella 1**; ESIMS (+) m/z 353.1776 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. per $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$, m/z 353.1759).

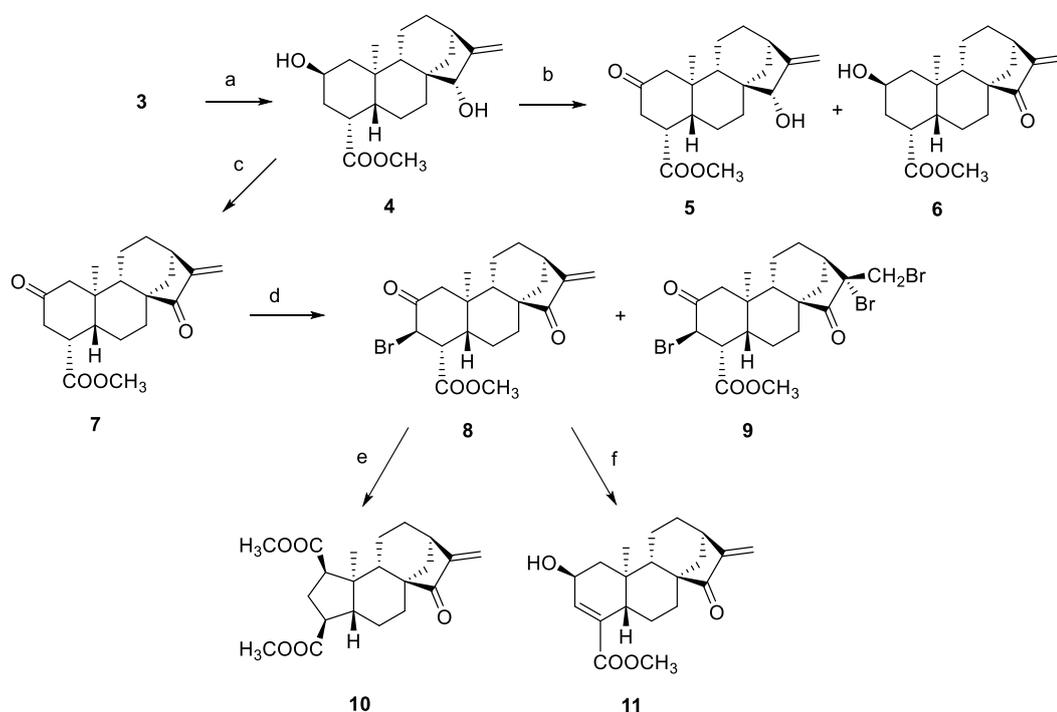
3.1.3.4. Saggio di citotossicità MTT

Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule di melanoma maligno umano (A375), cellule di cancro epiteliale del colon umano (CaCo2) e cheratinociti umani (HaCaT). Le cellule A375 e HaCaT sono state mantenute in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 2 mM di L-glutammina, 100 IU/mL di penicillina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di streptomina e integrate con il 10% di siero bovino fetale inattivato al calore (HI-FBS). Le cellule CaCo2 sono state coltivate in DMEM con 2 mM di L-glutammina, 100 IU/mL di penicillina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di streptomina, 1% di aminoacidi non essenziali (NEAA) e integrate con 10% di HI-FBS. Le cellule sono state coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2 . Le cellule sono state sottocoltivate ogni 3-4 giorni.

La vitalità cellulare è stata esaminata mediante saggio 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT) come descritto in letteratura (Quassinti et al. 2013). Per il test, le cellule sono state seminate alla densità di 2×10^4 cellule/mL. Dopo 24 ore, i campioni sono stati esposti a diverse concentrazioni di atractiligenina e derivati sintetici (0.097–50 μM). Le cellule sono state incubate per 72 ore. Alla fine dell'incubazione, ogni pozzetto ha ricevuto 10 μL di soluzione MTT (5 mg/mL in soluzione salina tamponata con fosfato, PBS). Dopo l'incubazione per 4 ore a 37 °C, il mezzo MTT è stato rimosso ed è stato aggiunto DMSO (100 μL) per sciogliere i cristalli di formazano. L'entità della riduzione dell'MTT è stata misurata spettrofotometricamente a 540 nm utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre FLUOstar Omega (BMG Labtech). Le curve di sopravvivenza cellulare sono state calcolate dopo il confronto con il controllo. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. La citotossicità è espressa come la concentrazione del composto che inibisce la crescita cellulare del 50% (IC_{50}). I valori di IC_{50} sono stati determinati con il programma per computer GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, S. Diego, CA, USA).

3.1.4. Risultati e discussioni

L'estere metilico dell'atractiligenina (**4**) (**Schema 1**), preparato trattando **3** con CH_2N_2 , è stato fatto reagire con cloromato di piridinio (PCC) (rapporto 1:0.8) per 20 minuti fino a quando il reagente di partenza è scomparso completamente su TLC. Si è ottenuta una miscela dei due regioisomeri **5** e **6**. Al composto **5** con δ_{C} 208.85 (C-2) e δ_{C} 82.11 (C-15) è stata assegnata la struttura dell'estere metilico della 2-chetoatractiligenina, mentre il composto **6** era l'estere metilico della 15-chetoatractiligenina [δ_{C} : 64.02 (C-2), 210.32 (C-15)] (**Tabella 1**; **Schema 1**). L'ossidazione del composto **4** con cloromato di piridinio (PCC), con rapporto stechiometrico 1:3, ha fornito invece un unico prodotto (**7**). I suoi segnali ^1H e ^{13}C -NMR (**Tabella 1**) hanno mostrato uno spostamento a campi più bassi dei protoni esociclici (δ_{H} 5.960, H-17a; δ_{H} 5.283, H-17b), la presenza di due chetoni a δ_{C} 207.82 (C-2) e δ_{C} 209.64 (C-15) e l'assenza di gruppi idrossilici. Di conseguenza, il composto **7** è coerente con la struttura dell'estere metilico della 2,15-dichetoatractiligenina.



Schema 1. Sintesi di differenti derivati *ent*-kaurenici (**4-11**) partendo dall'atractyligenina (**3**). ^a CH_2N_2 , THF dry, 0 °C → r.t., 2 h; ^b PCC, DCM dry, r.t., 24 h; ^c PCC, DCM dry, r.t., 2 h; ^d PyHBr_3 , THF dry, N_2 , 0 °C, 1 h → r.t., o.n.; ^e NaBH_4 , MeOH:DCM, 0 °C → r.t., 24 h; ^f NaBH_4 , MeOH:DCM, 0 °C → r.t., 24 h; Zn^0 , CHCl_3 , riflusso, 18 h.

Tabella 1. Dati ^{13}C -NMR dei composti **5-11**.

Composti	5	6	7	8	9	10	11
Posizione	δ_{C}						
1	56.0	48.3	55.3	49.2	48.8	54.2	44.3
2	208.8	64.0	207.8	201.6	200.9	175.8	66.0
3	42.9	37.4	43.0	48.0	47.9	28.2	136.2
4	45.3	43.7	46.3	53.5	53.3	44.0	135.7
5	47.8	48.3	47.6	41.7	41.3	48.5	46.0
6	25.4	24.4	24.1	23.5	23.4	21.0	19.5
7	37.9	33.2	32.8	32.7	34.3	32.7	32.7
8	45.2	52.2	51.7	51.6	53.4	51.9	51.7
9	44.5	50.8	50.2	49.8	50.5	46.1	51.6
10	42.5	40.8	43.0	43.5	43.0	52.3	41.1
11	18.0	18.2	18.1	18.1	18.2	20.9	18.3
12	32.6	32.0	31.7	31.7	25.8	31.8	31.3
13	39.8	38.0	37.9	37.8	43.2	37.6	37.7
14	3 5.6	36.5	36.9	36.0	34.2	37.3	37.8
15	82.1	210.3	209.6	209.4	212.0	209.5	209.3
16	157.7	149.1	148.9	148.7	69.7	148.9	148.9
17	105.3	114.9	115.1	115.3	36.0	115.1	115.2
19	173.9	175.3	175.4	171.3	171.1	175.3	168.5
20	16.7	16.2	16.7	16.5	16.3	18.3	14.6
-OCH₃ (2)	-	-	-	-	-	51.4	-
-OCH₃ (19)	51.7	51.4	51.4	52.1	52.3	51.4	51.6

Altre procedure ossidative, come il permanganato di potassio e il reagente di Jones, sono state scartate a causa della bassa resa e conversione debole del substrato.

La fase sintetica successiva è stata la bromurazione in α al chetone in posizione 2 del composto **7**. A causa della possibilità di formazione di isomeri regio/stereo in

C-1 e C-3, è stato scelto un reattivo con grande impedimento sterico: il piridinio tribromuro (PyHBr₃). L'uso di questo metodo è stato riportato in letteratura sull'ent-*kaurene* oridonina, dove un α -bromo-chetone è stato utilizzato come intermedio per la successiva sintesi di anelli tiazolici bi-sostituiti (Ding et al. 2013). La reazione del dichetone **7** con PyHBr₃ a 0 °C per 18 h ha mostrato la formazione di due composti. Il principale aveva una formula molecolare C₂₀H₂₅BrO₄, come indicato dallo spettro di massa a m/z 431.0824 [M+Na]⁺. Gli spettri NMR hanno mostrato la presenza di metino bromurato ($\delta_H = 4.721$ dd, $J = 1.5, 1.2$ Hz; $\delta_C = 48.03$), che è stato assegnato al carbonio C-3 per la correlazione nello spettro HMBC con C-19. La stereochimica del nuovo legame è stata determinata essere β a causa dell'assenza di correlazione tra H-1 β e H-3 nello spettro NOESY e confermata dai valori delle costanti di accoppiamento di H-3. Di conseguenza, a questo composto è stata assegnata la struttura dell'estere metilico della 3 β -bromo-2,15-dichetoatrattiligenina (**8**). Il secondo composto minoritario aveva una formula molecolare di C₂₀H₂₅Br₃O₄ come indicato dallo spettro di massa a m/z 588.9138 [M+Na]⁺. Il suo spettro ¹H-NMR era estremamente simile allo spettro del composto **8**, ma caratterizzato dall'assenza dei segnali del doppio legame esociclico C-16/C-17 e dalla presenza di un sistema AB ($\delta_H = 3.944$, $\delta_H = 3.700$, $J = 12.4$ Hz). Lo spettro ¹³C-NMR, inoltre, ha mostrato l'assenza dei segnali relativi al doppio legame C-16/C-17 che sono stati sostituiti da due segnali a $\delta_C = 69.69$ (C-16) e $\delta_C = 35.95$ (C-17). Questi dati hanno permesso di determinare la presenza di due gruppi bromuro vicinali su C-16 e C-17 come confermato dalla correlazione, nello spettro HMBC, tra H-13 e C-17. Infine, la stereochimica del gruppo bromurato C-16 è stata assegnata α per la presenza, nello spettro NOESY, di correlazioni tra H-17 e H-12 β e H-11 β e per l'assenza di correlazione tra H-17 e H-14. Pertanto, è stato possibile assegnare a questo composto la struttura dell'estere metilico di 3 β , 16 α , 17-tribromo-2,15-dichetoatrattiligenina (**9**).

Per verificare la possibilità di accedere ad ulteriori prodotti bromurati regioisomerici e stereoisomerici, è stato testato un altro agente bromurante, di natura inorganica: il bromuro di rame (II) (CuBr₂).

Si è ottenuta la stessa miscela (**8** e **9**) ma, in questo caso, il composto principale era di gran lunga **9** e si rilevava solo una piccola quantità di prodotto monobromurato **8**.

La fase sintetica successiva alla bromurazione del composto **7** è stata la riduzione con $\text{NaBH}_4/\text{CH}_3\text{OH}$ dei due gruppi carbonilici in posizione 2 e 15 del composto **8**. Abbastanza sorprendentemente il prodotto della reazione era privo di qualsiasi gruppo ossidrilico. Aveva una formula molecolare $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ come mostrato dal picco a m/z 361.2008 $[\text{M}+\text{H}]^+$ nel suo spettro di massa. Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR hanno mostrato segnali relativi agli anelli B, C e D molto simili a quelli del composto **8**, essendo la differenza profonda nei sostituenti e nella struttura dell'anello A. In effetti, il segnale per un cheto gruppo su C-2 cheto era assente, mentre apparivano segnali per un ulteriore gruppo carbometossi ($\delta_{\text{H}}= 3.681$ s, $\delta_{\text{C}}= 51.44$; $\delta_{\text{C}}= 175.83$). Le correlazioni nello spettro HMBC tra il protone a $\delta_{\text{H}}= 2.818$ (H-1) e il carbonio a $\delta_{\text{C}}= 44.04$ (C-4), non possibili per una struttura a sei termini, e l'accoppiamento di entrambi i protoni con C-3 [$\delta_{\text{H}}= 2.500$, ddd (H-3 α), $\delta_{\text{H}}= 2.088$, ddd (H-3 β)] con H-1 ($\delta_{\text{H}}= 2.818$, dd) e H-4 ($\delta_{\text{H}}= 3.139$, ddd), indicavano chiaramente il riarrangiamento dell'anello A da sei membri in un anello a cinque membri. Di conseguenza, il nuovo gruppo carbossilico ($\delta_{\text{C}}= 175.83$) è stato assegnato a C-2, come confermato dalla sua correlazione con H-3. Ulteriori correlazioni sono state osservate tra C-1 ($\delta_{\text{C}}= 54.21$) e i protoni metilici 20 ($\delta_{\text{H}}= 1.083$) e C-4 ($\delta_{\text{C}}= 44.04$) e H-6 ($\delta_{\text{H}}= 1.406$). Per confermare solo la stereochimica del nuovo anello A, è stato registrato lo spettro NOESY. Le correlazioni, nello spettro NOESY, di H-1 con H-4 e Me 20 hanno dimostrato il loro orientamento α e, di conseguenza, entrambi i gruppi carbossimetilici su C-4 e C-1, rispettivamente, erano orientati β .

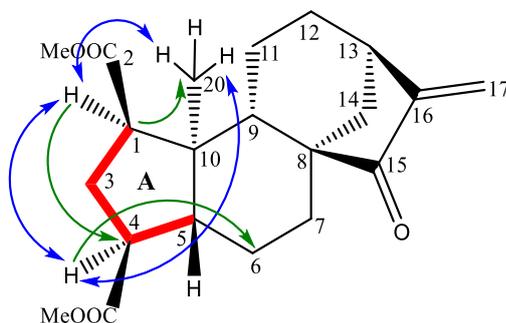
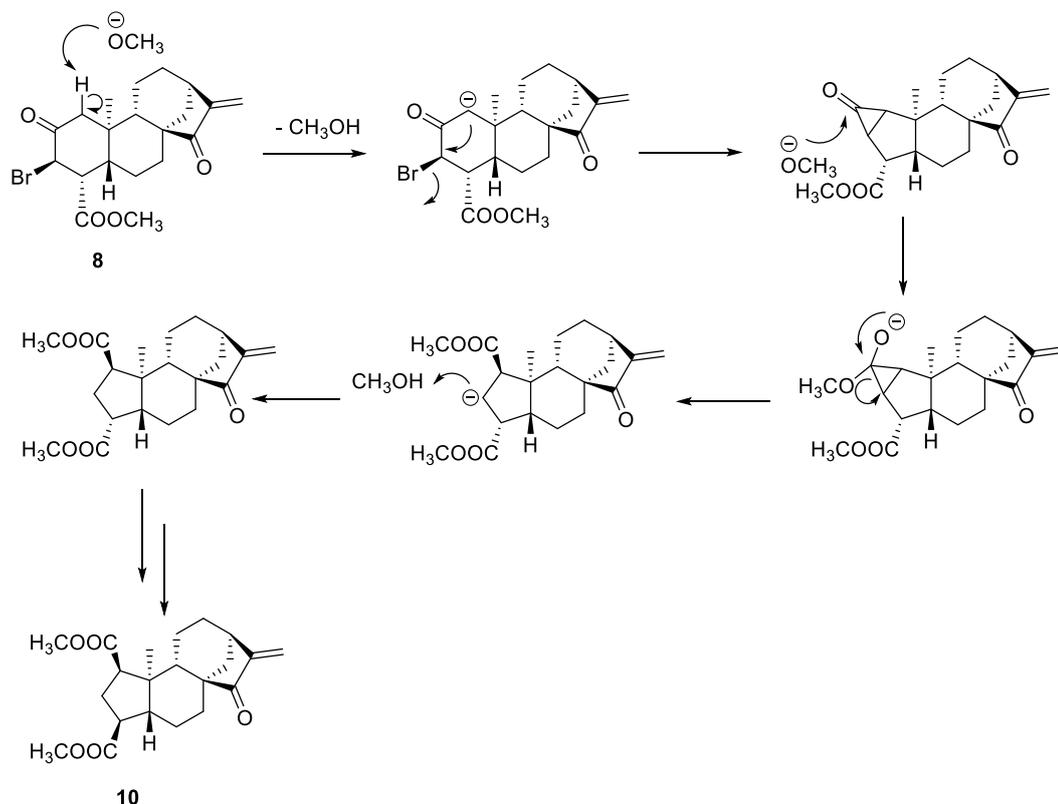


Fig. 2. Correlazioni COSY (in rosso), HMBC (in verde), e NOESY (frecce blu) dell'anello A del composto **10**.

Infine, da tutti i dati sopra riportati potremmo assegnare a questo composto la struttura **10**, appartenente ad uno scheletro non precedentemente descritto (**Fig. 2**).

Per la sintesi di questo composto è stato previsto un meccanismo di riarrangiamento simil Favorskii, in cui il metilato, presente nel mezzo di reazione, formava l'enolato sul lato opposto all'atomo di bromo, con ciclizzazione e formazione di un ciclopropanone. Successivamente l'attacco nucleofilo del gruppo metossilico, con riformazione carbonilica e scissione dell'anello ciclopropanico, portava alla formazione di un anello a 5 atomi (Wohllebe and Garbisch, 1977) (**Schema 2**). L'ultimo passaggio della reazione è un'epimerizzazione in cui la stereochimica del carbonio in posizione 4 è invertita (Piozzi et al. 1966).



Schema 2. Meccanismo di riarrangiamento simil-Favorskii del composto **8**.

Per tentare l'introduzione di un legame CC α - β insaturo in posizione 3 e 4, è stata ripetuta la riduzione del composto **8** con NaBH_4 , ma è stato utilizzato anche zinco granulare attivo. Il prodotto di reazione principale ha mostrato una formula molecolare di $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$ come mostrato dal picco dello spettro di massa a m/z 353.1776 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gli spettri NMR hanno mostrato l'assenza del gruppo chetonico, sostituito da una funzione alcolica secondaria su C-2 ($\delta_{\text{H}} = 4.413$, ddd, $J = 10.1, 6.0, 3.0$ Hz; $\delta_{\text{C}} = 66.00$) e il presentarsi di un doppio legame C-3/C-4

insaturo aggiuntivo ($\delta_{\text{H}}= 6.405$ dd, $J= 3.0, 1.2$ Hz; $\delta_{\text{C}}= 136.22$; $\delta_{\text{C}}= 135.69$). Infine, l'orientamento β del gruppo ossidrilico in posizione 2 è stato confermato dallo spettro NOESY, che ha mostrato la correlazione tra H-2 e i protoni del metil-20, entrambi orientati α . Di conseguenza, questo composto è coerente con la struttura dell'estere metilico della 3-*en*-15-chetoatrattiligenina (**11**).

In vista del potenziale utilizzo di questi *ent*-kaurani, classe di diterpeni come farmaci antiproliferativi, i derivati sintetici dell'atractyligenina sono stati selezionati contro un pannello di linee cellulari tumorali umane (Rosselli et al. 2007). Tra questi, l'estere metilico della 15-chetoatractiligenina, ha mostrato un'elevata attività antiproliferativa in diverse linee cellulari di tumori solidi. Al fine di estendere gli spettri antitumorali dei derivati dell'atractiligenina, abbiamo valutato l'attività antiproliferativa *in vitro* contro altre due linee cellulari tumorali (A375, una linea cellulare di melanoma maligno umano, e CaCo2, una linea cellulare di cancro epiteliale del colon umano) e una linea cellulare normale (HaCaT, cheratinociti umani), utilizzando il metodo MTT. I loro valori IC_{50} sono stati riportati nella **Tabella 2**.

I composti da **5** a **11** sono risultati attivi contro tutte le linee cellulari testate. In particolare, i composti **6** e **8** sono risultati i più attivi con valori di IC_{50} di 0.427 e 0.723 μM rispettivamente contro la linea cellulare di melanoma A375. Rispetto ai valori IC_{50} del *cisplatin*o, la loro attività citotossica è risultata molto simile. Gli stessi risultati sono stati ottenuti contro la linea cellulare di cancro del colon CaCo2 con attività antiproliferativa leggermente inferiore. I dati riportati in **Tabella 2** non mostrano un'attività specifica nei confronti delle cellule tumorali, in quanto i composti erano attivi anche sulla linea cellulare HaCaT, i cheratinociti normali. Facendo una correlazione tra struttura e funzione, la presenza del sistema α,β -insaturo sembra importante per l'attività antiproliferativa, in accordo con quanto riportato in letteratura (Dal Piaz et al. 2007; Rosselli et al. 2007).

Tabella 2. Attività citotossica *in vitro* dei derivati dell'atractyligenina.

Composti	Linee cellulari (IC ₅₀ μM) ^a		
	A375 ^b	CaCo2 ^c	HaCaT ^d
1	> 50	> 50	> 50
95% C.I. ^e			
2	> 50	> 50	> 50
95% C.I.			
3	> 50	> 50	> 50
95% C.I.			
4	> 50	> 50	> 50
95% C.I.			
5	9.242	10.35	6.986
95% C.I.	8.15 - 10.48	9.834 - 10.90	5.911 - 8.256
6	0.427	0.662	0.810
95% C.I.	0.374 - 0.489	0.543 - 0.807	0.693 - 0.947
7	1.542	1.969	1.292
95% C.I.	1.458 - 1.632	1.857 - 2.088	1.197 - 1.394
8	0.723	0.906	1.408
95% C.I.	0.622 - 0.839	0.779 - 1.059	1.205 - 1.644
9	1.661	2.168	1.158
95% C.I.	1.583 - 1.742	2.032 - 2.312	1.074 - 1.248
10	2.429	2.666	2.362
95% C.I.	2.289 - 2.577	2.508 - 2.833	2.190 - 2.547
11	5.008	5.842	5.177
95% C.I.	4.763 - 5.265	5.237 - 6.517	4.971 - 5.391
Cisplatin	0.467	10.53	n.d.
95% C.I.	0.332 - 0.548	7.49 - 13.57	

^a IC₅₀ = ^a concentrazione del composto che consente una riduzione del 50% della crescita cellulare (dopo 72 h di incubazione). ^b Linea cellulare di melanoma maligno umano. ^c Linea cellulare di cancro epiteliale del colon umano. ^d Linea cellulare di cheratinociti umani. ^e Intervallo di confidenza. n.d. = non determinato.

Precedenti studi sul sistema della tioredossina hanno mostrato che i tioli catalitici TrxR e/o la selenocisteina esposta (Mustacich and Powis, 2000; Sandalova et al. 2001) sono buoni accettori di Michael per il gruppo carbonile α,β -insaturo presente nell'estere metilico della 15-chetoatractiligenina. La reattività del gruppo elettrofilo nei confronti di TrxR Cys/Sec è supportata dai recenti risultati sull'attività inibitoria di Trx di oridonina (Zhen et al. 2012). Un altro bersaglio molecolare del chetone α,β -insaturo è risultato il recettore γ attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR γ) (Vasaturo et al. 2017). L'estere metilico della 15-chetoatractiligenina forma un legame covalente con il gruppo tiolo di C285 di PPAR γ inducendo l'apoptosi e inibendo la via PI3K/AKT. Un'interessante estensione dello studio dovrebbe essere quella di analizzare i composti dell'atractiligenina anche come bersaglio del sistema tioredossina o PPAR γ sul melanoma umano e sulle cellule di cancro del colon umano.

3.1.5. Conclusioni

In conclusione, in questo lavoro, partendo da una pianta tossica come il *Chamaeleon gummifer* Cass., e dai suoi principali metaboliti atractyloside (**1**), carboxyatractyloside (**2**), e dalla loro rapida conversione nell'aglicone atractyligenina (**3**), sono stati sintetizzati vari prodotti con potenziale attività antiproliferativa. Il composto **3** è stato sottoposto a reazioni di ossidazione, bromurazione ed eliminazione, ottenendo i composti **4–11**. Uno scheletro singolare (**10**), mai descritto e riportato in letteratura, è stato sintetizzato mediante riarrangiamento chimico simil Favorskii a partire dal composto **8**. Sulla base dei risultati ottenuti, questi composti potrebbero essere promettenti per lo sviluppo di nuovi strumenti terapeutici e/o biochimici dotati sia di proprietà anti-proliferative che pro-apoptotiche.

3.1.6. Bibliografia

Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221:1256-1264.

Ajello T, Piozzi A, Quilico F, Sprio V (1963) Attrattilina e attrattiligenina. *Gazz Chim Ital* 93:867–915.

Badalamenti N, Russi S, Bruno M, Maresca V, Vaglica A, Ilardi V, Zanfardino A, Di Napoli M, Varcamonti M, Cianciullo P, Calice G, Laurino S, Falco G, Basile A (2021) Dihydrophenanthrenes from a Sicilian accession of *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge showed antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities. *Plants* 10:2776.

Basile S, Badalamenti N, Riccobono O, Guarino S, Ilardi V, Bruno M, Peri E (2022) Chemical composition and evaluation of insecticidal activity of *Calendula incana* subsp. *maritima* and *Laserpitium siler* subsp. *siculum* essential oils against stored products pests. *Molecules* 27:588.

Brucoli F, Borrello MT, Stapleton P, Parkinson GN, Gibbons S (2020) Structural characterization and antimicrobial evaluation of atractyloside, atractyligenin, and 15-didehydroatractyligenin methyl ester. *J Nat Prod* 75:1070-1075.

Bruneton J (1999) Toxic Plants. Dangerous to Humans and Animals. Ed Tec & Doc, Paris.

Bruno M, Rosselli S, Maggio A, Bellone G, Lee KH (2006) New oxidative derivatives of atractyligenin and their cytotoxic activity. *Planta Med* 72:996.

Buscemi S, Rosselli S, Bruno M, Vivona N, Piozzi F (2001) Photoinduced functionalization of C-20 methyl group in nor-diterpene atractyligenin. *Tetrahedron Lett* 42:8289-8291.

Buscemi S, Rosselli S, Bruno M, Vivona N, Piozzi (2003) Photoinduced functionalization of diterpenes. Transformation of the C-20 methyl of atractyligenin into a methylene-carbomethoxy or methylene-carboxamide group. *J Photochem Photobiol A: Chemistry*. 155:145-149.

Capdevielle P, Darraq R (1980). Poisoning by bird-lime thistle. *Trop Med* 40:137-142.

Cotugno R, Gallotta D, Dal Piaz F, Apicella I, De Falco S, Rosselli S, Bruno M, Belisario MA (2014) Powerful tumor cell growth-inhibiting activity of a synthetic derivative of atractyligenin: Involvement of PI3K/Akt pathway and thioredoxin system. *Biochim Biophys Acta* 1840:1135-1144.

Dal Piaz F, Nigro P, Braca A, De Tommasi N, Belisario MA (2007) 13-Hydroxy-15-oxo-zoapatlin, an *ent*-kaurane diterpene, induces apoptosis in human leukemia cells, affecting thiol-mediated redox regulation, *Free Radic Biol Med* 43:1409-1422.

Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, Sekfali N, Saso L, Mazzanti G (2005) *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 97:175-181.

Danieli B, Bombardelli E, Bonati A, Gabetta B (1972) Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. *Phytochemistry* 11:3501-3504.

Ding C, Zhang Y, Chen H, Yang Z, Wild C, Chu L, Liu H, Shen Q, Zhou J (2013) Novel nitrogen-enriched oridonin analogues with thiazole-fused a-ring: protecting

group-free synthesis, enhanced anticancer profile, and improved aqueous solubility. *J Med Chem* 56:5048-5058.

Deiva S, Ferguson L, Rateb ME, Williams R, Brucoli F (2020) 2-Furyl(phenyl)methanol isolated from *Atractylis gummifera* rhizome exhibits anti-leishmanial activity. *Fitoterapia* 140:104420.

Fassina G, Contessa AR, Toth CE (1962) Analisi degli estratti di *Atractylis gummifera* L. VI contenuto di attrattiloside in rapporto alla stagione e alla provenienza. *Boll Soc Ital Biol Sper* 133:346-348.

Gao C, Tello E, Peterson DG (2021) Identification of coffee compounds that suppress bitterness of brew. *Food Chem* 350:129225.

Georgiou M, Siandon L, Hatziz T, Papadatos J, Kouselini SA (1988) Hepatotoxicity due to *Atractylis gummifera* L. *Clinical Toxicol* 26:487-493.

Hamouda C, Hedhili A, Zhioua M, Amamou M (2004) A review of acute poisoning from *Atractylis gummifera* L. *Veter Human Toxicol* 46:144-146.

Hu G, Peng X, Dong D, Nian Y, Gao Y, Wang X, Hong D, Qiu M (2021) New *ent*-kaurane diterpenes from the roasted arabica coffee beans and molecular docking to α -glucosidase. *Food Chem* 345:128823.

Ilardi V, Badalamenti N, Bruno M (2022) Chemical composition of the essential oil from different vegetative parts of *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho (Umbelliferae) growing wild in Sicily. *Nat Prod Res* 36:3587-3597.

Larrey D, Pageaux GP (1995) Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Semin. Liver Dis.* 15:183-188.

Lefranc E (1868) Sur l'acide atractylique et les atractylates, produits immédiats de la racine de l'*Atractylis gummifera*. *Comptes Rendus.* 69:954-961.

Monsalve LN, Rosselli S, Bruno M, Baldessari A (2005) Enzyme-catalyzed transformations of *ent*-kaurane diterpenoids. *Eur J Org Chem* 10:2106-2115.

Mustacich D, Powis G (2000) Thioredoxin reductase, *Biochem J* 346:1-8.

Nemzer B, Abshiru N, Al-Taher F (2021) Identification of phytochemical compounds in *Coffea arabica* whole coffee cherries and their extracts by LC-MS/MS. J Agric Food Chem 69:3430-3438.

Pegel KH (1981) Coffe's link to cancer. Chem Eng News 59:4.

Piozzi F, Quilico A, Ajello T, Sprio V, Melera A (1966) The structure and stereochemistry of atractyloside. Tetrahedron 22:515-529.

Piozzi F (1978) The chemistry of atractyloside. In: Santi, R., Luciani, S. (Eds.), Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology. Piccin, Padova. pp. 13-32.

Popat A, Shear NH, Malkiewicz I, Stewart MJ, Steenkamp V, Thomson S, Neuman MG (2001) The toxicity of *Callilepis laureola*, a south African traditional herbal medicine. Clin Biochem 34:229-236.

Quassinti L, Lupidi G, Maggi F, Papa F, Vittori S, Bianco A, Bramucci M (2013) Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson essential oil. Nat Prod Res 27:862-868.

Rosselli S, Bruno M, Maggio A, Bellone G, Chen TH, Bastow KF, Lee KH (2007) Cytotoxic activity of some natural and synthetic *ent*-kauranes. J Nat Prod 70:347-352.

Rosselli S, Tundis R, Bruno M, Leporini M, Falco T, Gagliano Candela R, Badalamenti N, Loizzo MR (2020) *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) seeds oil: fatty acids profiling by GC-MS and NMR and bioactivity. Molecules 25:1037.

Sandalova T, Zhong L, Lindqvist Y, Holmgren A, Schneider G (2001) Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98:9533–9538.

Schteingart CD, Pomilio ABJ (1984) Atractyloside, toxic compound from *Wedelia glauca*. J Nat Prod 47:1046-1047.

Sut S, Maggi F, Bruno S, Badalamenti N, Quassinti L, Bramucci M, Beghelli D, Lupidi G, Dall'Acqua S (2020) Hairy garlic (*Allium subhirsutum*) from Sicily (Italy): LC-DAD-MSn analysis of secondary metabolites and *in vitro* biological properties. *Molecules* 25:2837.

The World Flora online. <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000129147>. Accessed 30th Aug 2022.

Vasaturo M, Fiengo L, De Tommasi N, Sabatino L, Ziccardi P, Colantuoni V, Bruno M, Cerchia C, Novellino E, Lupo A, Lavecchia A, Dal Piaz F (2017) A compound-based proteomic approach discloses 15-ketoatractyligenin methyl ester as a new PPAR γ partial agonist with anti-proliferative ability. *Sci Rep* 7:41273.

Vignais PV, Vignais PM, Defay G (1978) Structure-activity of atractiloside and diterpenoid derivatives on oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocator. In: Santi, R., Luciani, S., (Eds.), *Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Piccin, Padova, pp 39-68.

Wohllebe J, Garbisch EW (1977) Ring contraction *via* a Favorskii-type rearrangement: cycloundecanone. *Org Synth* 56:107-109.

Xiao Y, Lv L, Gou P, Xie H (2019) Acyl atractyligenin and carboxyatractyligenin glycosides from *Antennaria rosea* subsp. *confinis*. *Phytochemistry*. 157:151-157.

Xuan SH, Lee NH, Park SN (2019) Atractyligenin, a terpenoid isolated from coffee silverskin, inhibits cutaneous photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 194:166-173.

Zhen T, Wu CF, Liu P, Wu HY, Zhou GB, Lu Y, Liu JX, Liang Y, Li KK, Wang YY, Xie YY, He MM, Cao HM, Zhang WN, Chen LM, Petrie K, Chen SJ, Chen Z (2012) Targeting of AML1-ETO in t(8;21) leukemia by oridonin generates a tumor suppressor-like protein, *Sci. Transl. Med.* 4:127ra38.

3.2. Effetti antitumorali di derivati ammidici e relativi diossidati dell'*ent*-kaurene atractyligenina

I risultati di questa sezione, non ancora pubblicati, sono in fase di stesura per *Journal of Medicinal Chemistry*.

3.2.1. Introduzione

I tumori altamente aggressivi sono una delle principali cause di morte in tutto il mondo, con circa 8.8 milioni di morti ogni anno. A livello globale, circa 1 decesso su 6 è dovuto al cancro. Circa il 70% dei decessi per cancro si verifica, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>), nei paesi a basso e medio reddito. Tra tutti, il cancro coloretale (CRC) è il terzo cancro più comune al mondo e presenta una maggiore incidenza negli uomini piuttosto che nelle donne. Il cancro coloretale cresce lentamente e spesso non porta a sintomi evidenti fin quando non raggiunge dimensioni consistenti. I soggetti ai quali viene diagnosticato il CRC sono sottoposti a più terapie in base al grado di avanzamento tumorale. Oltre che all'ablazione chirurgica, i pazienti possono anche essere sottoposti a chemioterapie preoperatorie (neoadiuvanti) o postoperatorie (adiuvanti) (Binefa 2014).

Le piante, tuttavia, sono una fonte importante di nuovi farmaci (Armin and Mark 2014). Negli ultimi anni, metaboliti del genere *Isodon*, piante della famiglia delle Lamiaceae, sono stati indagati biologicamente e sono risultati promettenti fitofarmaci grazie alla loro vasta gamma di effetti fisiologici, come l'inibizione della replicazione virale dell'epatite (Liu et al. 2017) e le infezioni batteriche del polmone o dell'intestino (Lin et al. 2013), così come le proprietà antimalariche (Casteel 1992), antinfiammatorie (Hanson 2015) e antitumorali (Zhou et al. 2007) dimostrate. Finora, oltre 1200 diterpenoidi di tipo *ent*-kauranico, con sistemi ad anello policiclico altamente compatti, sono stati isolati dal genere *Isodon*, in particolare il composto oridonina (Xu et al. 2017). Altri diterpenoidi naturali quali isoferritina A (Li et al. 2017), longikaurin (Liao et al. 2014), xerophilusins (Li et al. 2007), sono stati studiati per l'attività antitumorale. Un'unità strutturale comune presente in questi composti diterpenici è la funzionalità chetonica α,β -insatura a ponte. Sfortunatamente, però, l'uso di questi diterpeni naturali come agenti

antitumorali è stato ostacolato dalla potenza moderata e dalla complessa struttura chimica ossigenata. Pertanto, è stato ed è necessario trovare composti con struttura semplice e con attività più robusta. Tra i diterpeni a struttura *ent*-kaurenica, l'atractiligenina (**1**) (**Fig. 1**), l'aglicone delle molecole altamente tossiche atractyloside e carboxyatractyloside estraibili da *Chamaeleon gummifer*, è stata oggetto di numerose modifiche chimiche al fine di esplorare le proprietà biologiche dei suoi derivati.

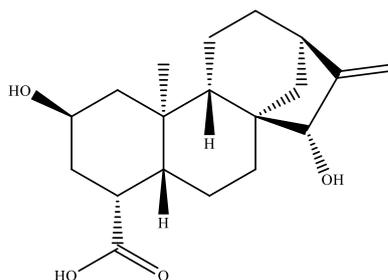


Fig. 1. Struttura chimica dell'atractiligenina.

Queste indagini hanno riguardato la funzionalizzazione fotoindotta del suo gruppo metilico C-20 (Buscemi et al. 2001; 2003), trasformazioni catalizzate da enzimi dei suoi gruppi alcolici (Monsalve et al. 2005) e la sintesi di numerosi derivati ossidativi con attività citotossica promettente contro diverse linee cellulari tumorali umane, tra cui A549 (polmone), PC-3 (prostata), 1A9 (ovaio), MCF-7 (seno), KB (rinofaringe), e KB-VIN (sottolinea KB multiresistente) (Rosselli et al. 2007; Cotugno et al. 2014). Uno di questi, l'estere metilico della 15-chetoatractiligenina, ha mostrato una potente attività di inibizione della crescita delle cellule tumorali, il cui meccanismo d'azione è stato ampiamente chiarito (Cotugno et al. 2014; Vasaturo et al. 2017). Facendo una correlazione tra struttura e funzione, la presenza del sistema α,β -insaturo sembra importante per l'attività antiproliferativa, in accordo con quanto riportato in letteratura (Dal Piaz et al. 2007; Rosselli et al. 2007). Precedenti studi sul sistema della tioredossina hanno inoltre dimostrato che i tioli catalitici TrxR e/o la selenocisteina esposta (Mustacich and Powis, 2000; Sandalova et al. 2001) sono buoni accettori di Michael per il gruppo carbonilico α,β -insaturo presente nell'estere metilico della 15-chetoatractiligenina. La reattività del gruppo elettrofilo nei confronti di TrxR Cys/Sec è supportata, anche, dai recenti risultati sull'attività inibitoria di Trx di

oridonina (Zhen et al. 2012). Inoltre, la valutazione delle proprietà antibiotiche dell'atractyloside, dell'atractyligenina e del 15-dideidroatractyligenin metil estere contro *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Brucoli et al. 2020), la loro attività anti-leishmania (Deiva et al. 2020) e l'inibizione del fotoinvecchiamento cutaneo dell'atractyligenina (**1**) (Xuan et al. 2019), sono stati recentemente segnalati.

In questo lavoro viene presentato uno studio sulla sintesi e sull'attività antitumorale delle ammidi e dei corrispondenti diossidati ottenuti dal noto diterpene naturale atractyligenina. A livello scientifico differenti composti ammidici semisintetici hanno mostrato importanti attività biologiche. È stata, per esempio, osservata una promettente attività inibitoria con le ammidi fenoliche *N-p-cumaroiltiramina* (Zhang et al. 2011) e *N-caffeoiltiramina* (Morandi-Afrapoli et al. 2012); le analoghe ammidi di serotonina hanno portato a una maggiore attività rispetto agli acidi carbossilici di partenza (Takahashi and Miyazawa 2012). Anche le bisammidi fenoliche derivate dal mais sono state segnalate come agenti ipoglicemizzanti (Niwa 2003). Inoltre, uno studio recente ha riportato che alcuni derivati dell'acido rosmarico, comprese diverse ammidi, sono risultati inibitori dell'aldoso-reduttasi, un enzima implicato nelle complicanze diabetiche (Kang et al. 2016). Sulla base di questi dati è stata pianificata la sintesi di ammidi e dei corrispondenti ossidati dell'atractyligenina come potenziali agenti antitumorali e la loro efficacia è stata esplorata, in questo capitolo di tesi, valutandone l'azione su una linea cellulare di carcinoma del colon (HCT116).

3.2.2. Risultati e discussione

In questo lavoro è stata prodotta una piccola libreria di ammidi derivate atractyligenina. È stato condotto uno studio preliminare al fine di trovare le migliori condizioni di sintesi per la reazione di ammidazione. L'ammina propilammina è stata utilizzata come modello per questa ottimizzazione e l'agente di *coupling*, la base e/o la temperatura sono stati variati per ottenere l'ammide **2** (**Fig. 2**).

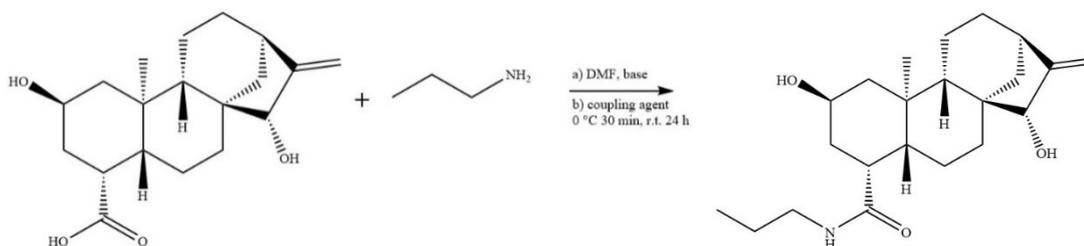


Fig. 2. Reazione di amidazione dell'atractyligenina utilizzando la propilammina.

Le reazioni sono state controllate mediante TLC e la resa percentuale a 24 ore è stata determinata mediante purificazione su colonna gravimetrica di gel di silice. I dettagli sulle condizioni di reazione sono riportati nella sezione **Materiali e metodi** e sono riassunti nella **Tabella 1**.

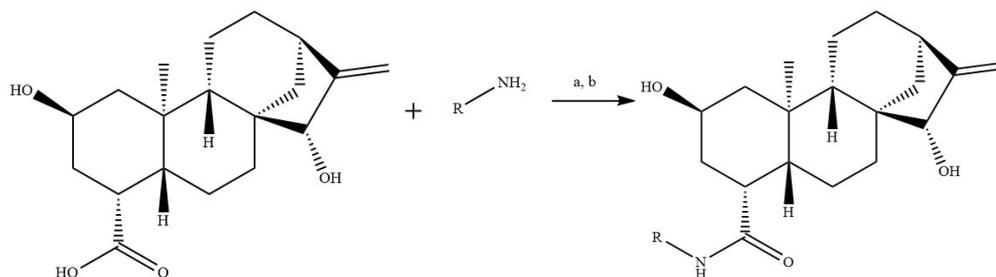
Tabella 1. Ottimizzazione delle condizioni di reazione per ottenere l'ammide **2**.

Prova	Base	Agente di <i>coupling</i>	T (°C)	Resa (%)
1	DIMAP	EDC/HOBt	25	96
2	DIPEA	TBTU	25	24
3	TEA	BOP	25	54
4	TEA	TBTU	25	28
5	DIMAP	EDC/HOBt	50	57

(a) Atractyligenina (0.31 mmol), base (0.35 mmol), DMF anidro (3 mL), N₂, 0 °C 10 min; (b) propilammina (1.2 equiv.), agente di *coupling* (1.2 equiv.), 0 °C 30 min, r.t. 24 h; (b) La resa è stata determinata dopo purificazione cromatografica.

Quando l'atractyligenina è stata fatta reagire con la propilammina impiegando trietilammina (TEA) come base, con benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) come agente di accoppiamento, l'ammide **2** è stata recuperata, dopo cromatografia su colonna, con 54 % di rendimento (**Tabella 1**). Il prodotto atteso è stato ottenuto con scarsa resa in presenza di 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate (TBTU) come agente di *coupling*. Al contrario, quando sono stati utilizzati come base 4-dimethylaminophenol (DIMAP) e come agenti di coupling sia 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) sia hydroxybenzotriazole (HOBt), l'ammide **2** è stata ottenuta con una resa del 96%. Un ulteriore tentativo di migliorare la resa, aumentando la temperatura di reazione, pur mantenendo le altre condizioni nella voce 1, non ha avuto successo, fornendo **2** con una resa del 57% (voce 5); quindi, le migliori condizioni di reazione

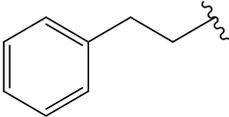
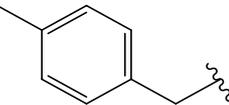
sono state quelle riportate nella voce 1. Sulla base di questi dati, le ammidi **3–15** sono state sintetizzate secondo le condizioni sopra citate, come riassunte nello **Schema 1**. Complessivamente sono state preparate quattordici ammidi, sette aventi una catena alchilica (**2–8**), quattro recanti una catena laterale alchilica ramificata (**9–12**), una impiegando un'ammina ciclica alifatica (**13**) e due recanti un anello aromatico terminale (**14–15**) (**Tabella 2**).



Schema 1. Sintesi delle ammidi dell'atractyligenina (**2-15**).

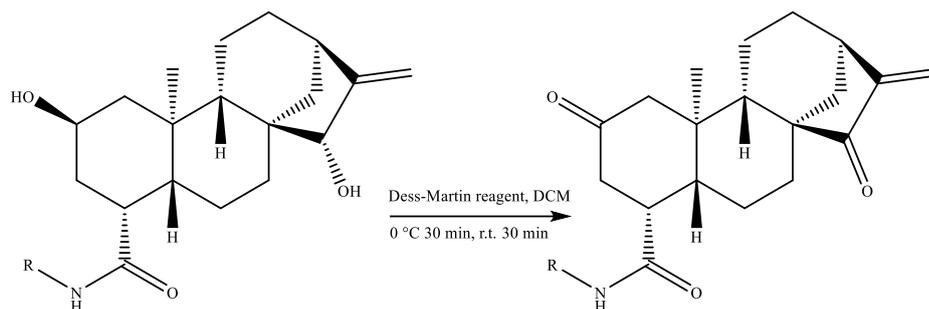
Tabella 2. Resa (%) delle ammidi e natura chimica delle diverse ammine impiegate.

Ammina	R	Resa (%)
2		96
3		95
4		94
5		95
6		93
7		94
8		92
9		96
10		95
11		91
12		90
13		91

14		82
15		88

Dopo purificazione cromatografica, tutti i composti sono stati sottoposti ad analisi spettroscopica e spettrometrica. Tutte queste strutture sintetizzate non sono mai state riportate in letteratura e quindi sono state sottoposte a una caratterizzazione completa mediante HRESIMS e analisi ^1H e ^{13}C -NMR, inclusi metodi bidimensionali (COSY, HSQC, HMBC e NOESY). Nello spettro ^{13}C -NMR di **2**, il segnale diagnostico attribuibile a un carbonio sp^2 ammidico quaternario è stato trovato a 174.3 ppm (C-19), oscillando tra valori di 173.3 e 174.4 ppm per tutti gli altri composti sintetizzati. Per analogia, nello spettro ^1H -NMR di **2**, la presenza di un segnale tra 3.11 e 2.93 ppm (ddt, $J = 13.4, 7.0, 7.0$ Hz, CH_2), che mostrava una correlazione HSQC con il carbonio a 174.3 ppm, era diagnostico dell'avvenuta formazione dell'ammide. Questi segnali, insieme a quelli attesi per la frazione diterpenica dell'atractyligenina e delle diverse porzioni (alifatiche lineari, ramificate, cicliche e aromatiche) del pendente amminico, hanno confermato la formazione delle ammidi pensate e sintetizzate. Questi risultati sono stati confermati anche dalle correlazioni COSY, HSQC e soprattutto HMBC, in particolare da H-4 e C-2, da H-4 e C-10, e da H-15 e C-14. Le altre ammidi **3-15** hanno mostrato dati NMR, comprese le correlazioni bidimensionali, molto simili a quelle osservate per **2**, consentendo così di determinare in modo univoco le loro strutture e quindi di assegnare completamente tutti i segnali protonici e carbonici, come riportato nelle **Tabelle 3-16**.

Al fine di valutare se fossero necessarie le funzioni ossigenate (-OH), sul C-2 e sul C-15, per l'attività biologica investigata, abbiamo pianificato di trasformare i due gruppi ossidrici in due gruppi chetonici (**Schema 2**), il primo alifatico e il secondo α,β -coniugato con un doppio legame terminale.



Schema 2. Ossidazioni delle ammidi (**2-15**) con il reagente di Dess-Martin.

L'ammide propilammina dell'atractylenina (**2**), è stata fatta reagire con il reagente di Dess-Martin per 1 h fino alla scomparsa del reattivo di partenza su TLC. Un singolo prodotto (**16**) è stato ottenuto. I suoi spettri protonici e carbonici hanno mostrato uno spostamento verso campi più bassi dei protoni esociclici (δ_{H} 5.95, H-17a; δ_{H} 5.28, H-17b), la presenza di due chetoni a δ_{C} 209.82 (C-2) e δ_{C} 209.86 (C-15), e l'assenza di gruppi idrossilici. Di conseguenza, il composto **16** è coerente con la struttura dell'ammide propilammina della 2,15-dichetoatractylenina. Le altre ammidi **3-15**, sottoposte allo stesso trattamento ossidativo, hanno mostrato dati NMR molto simili a quelle osservate per **16**, consentendo così di determinare in modo univoco le loro strutture e quindi di assegnare completamente tutti i segnali protonici e carbonici, come riportato nelle **Tabelle 17-30**.

Lo studio condotto in questo lavoro ha indagato, oltre gli aspetti puramente chimici, anche l'attività biologica esplicitata dalle ammidi (**2-15**), e dai corrispettivi ossidati (**16-29**), sintetizzati a partire dall'atractylenina (**1**). In particolare, è stata valutata l'attività antiproliferativa di questi composti su una linea cellulare di carcinoma del colon (HCT116). Per stimare gli effetti delle singole molecole sono stati inizialmente eseguiti saggi di vitalità cellulare tramite il test colorimetrico dell'MTT, un composto che, nelle cellule vitali, viene ridotto a formaz dalle deidrogenasi mitocondriali. Per tale studio, la linea cellulare HCT116 di carcinoma del colon è stata incubata in presenza di differenti concentrazioni (2.5 μM ; 5 μM ; 7.5 μM ; 10 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 200 μM ; 300 μM) delle singole molecole sintetizzate. Le **Fig. 3 e 4** riportano, dopo 48 h di trattamento, la vitalità delle cellule (espressa in %) di carcinoma del colon HCT116 esposte all'azione delle ammidi **2-15**, rispetto alle cellule incubate in presenza del solo veicolo. Come è possibile osservare dai dati riportati nelle **Fig. 3 e 4**, l'atractylenina (**1**), anche a elevate

concentrazioni, non causa variazioni significative della vitalità delle cellule in questione. Relativamente ai composti ammidati, è possibile invece visualizzare, solamente a elevate concentrazioni (200 e 300 μM), un effetto citotossico marcato. Infatti, le ammidi **5** e **6**, hanno determinato una riduzione della vitalità di circa il 70% alla dose 300 μM ; mentre, l'ammido **7**, la più promettente tra quelle testate, ha mostrato importanti effetti citotossici anche alla dose 200 μM . Occorre comunque precisare che gli effetti di tutte le ammidi saggiate si osservano solo con alte dosi. Infatti, come riportato in figura, riducendo la concentrazione delle ammidi i assiste a un modesto effetto citotossico con riduzione della vitalità di appena il 20% con la dose 50 μM .

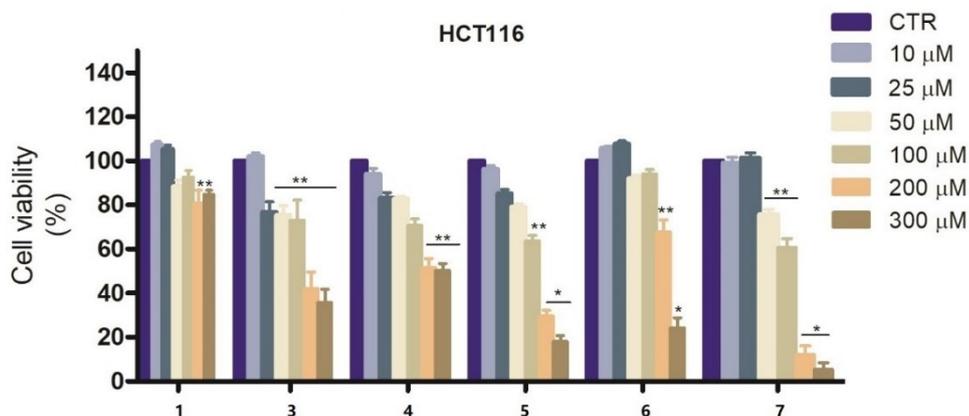


Fig. 3. Valutazione della vitalità cellulare di carcinoma del colon HCT116 trattate con l'atractyligenina **1** e le ammidi **3, 4, 5, 6, 7** dell'atractyligenina. Le cellule HCT116 sono state trattate per 48 h con alte concentrazioni di 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM . Sull'asse delle ascisse sono riportate le singole ammidi testate e sull'asse delle ordinate la vitalità cellulare (%). I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test *t* di Student: ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.

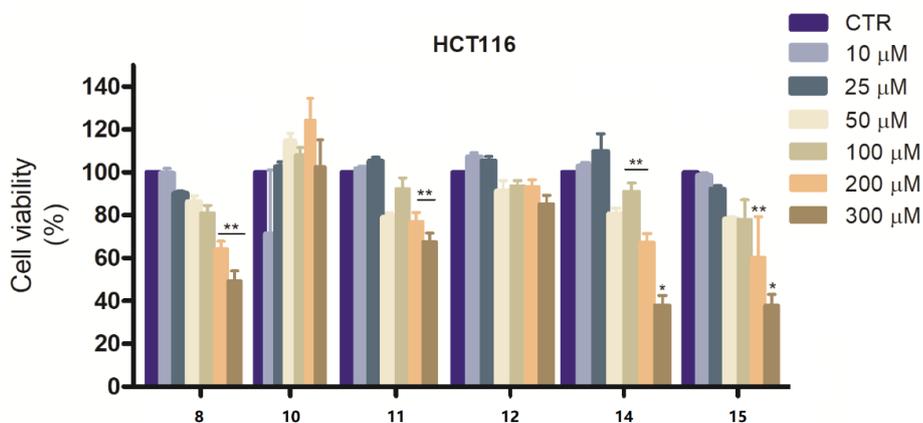


Fig. 4. Valutazione della vitalità cellulare di carcinoma del colon HCT116 trattate con le ammidi **8, 10, 11, 12, 14** e **15** dell'atractyligenina. Le cellule HCT116 sono state trattate per 48 h con alle

concentrazioni di 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM . Sull'asse delle ascisse sono riportate le singole ammidi testate e sull'asse delle ordinate la vitalità cellulare (%). I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test *t* di Student: ***p* < 0.01; **p* < 0.001.

Le **Fig. 5** e **6** riportano, invece, la vitalità cellulare di carcinoma del colon HCT116 quando trattate, per 48 h, con i rispettivi diossidati (**16-29**) delle ammidi (**2-15**). Per tale studio, la linea cellulare è stata incubata in presenza di differenti concentrazioni (10, 25, 50, 100, 200, 300 μM) delle molecole ossidate (**16-29**). Analizzando gli istogrammi delle due figure (**Fig. 5** e **6**), l'introduzione dei due gruppi funzionali chetonici, uno in posizione C-2 e l'altro in C-15, sulle ammidi precedentemente progettate e sintetizzate, ha bruscamente migliorato gli effetti citotossici. Quasi tutte le molecole, tranne **17**, **21** e **24**, hanno indotto ottimi effetti citotossici già alla dose 25 μM , causando una riduzione della vitalità cellulare in un range tra l'80 e il 90%. Riducendo ulteriormente la concentrazione (dose 10 $\mu\text{g/mL}$), i composti **18**, **19**, **20**, **23**, **27** e **28** hanno mostrato un effetto citotossico marcato, determinando una netta riduzione della vitalità nelle cellule HCT116 anche del 90-95%, a 48 h dall'inizio del trattamento.

Avendo dimostrato l'azione antitumorale di questi metaboliti diossidati e la loro efficacia nel ridurre la vitalità cellulare, i successivi esperimenti sono stati condotti incubando le cellule del carcinoma del colon con concentrazioni più basse dei composti (2.5-15 μM) e gli effetti sono stati esaminati dopo un tempo di trattamento più breve (24 h).

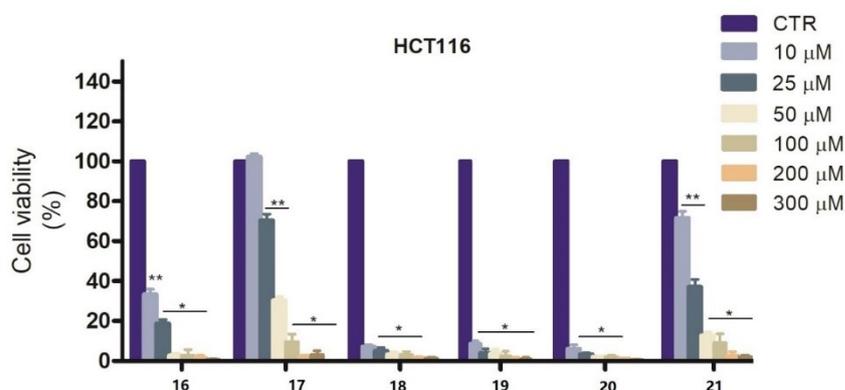


Fig. 5. Valutazione della vitalità cellulare di carcinoma del colon HCT116 trattate con i diossidati **16**, **17**, **18**, **19**, **20** e **21**. Le cellule HCT116 sono state trattate per 48 h con alle concentrazioni di 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM . Sull'asse delle ascisse sono riportate le singole ammidi testate e sull'asse

delle ordinate la vitalità cellulare (%). I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test *t* di Student: ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.

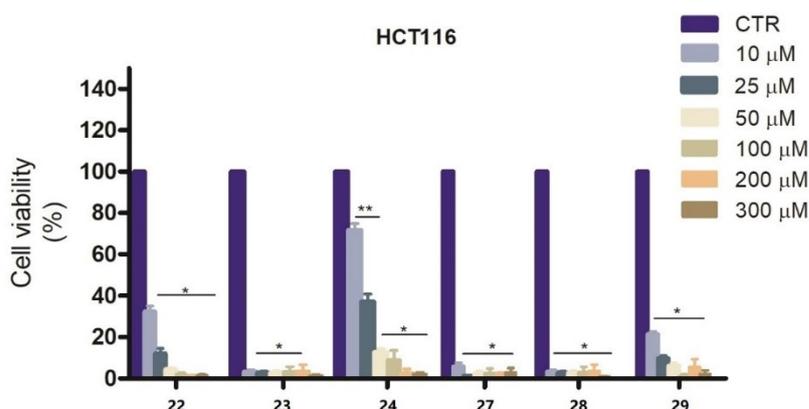


Fig. 6. Valutazione della vitalità cellulare di carcinoma del colon HCT116 trattate con i diossidati **22**, **23**, **24**, **27**, **28** e **29**. Le cellule HCT116 sono state trattate per 48 h con alle concentrazioni di 10, 25, 50, 100, 200, 300 μ M. Sull'asse delle ascisse sono riportate le singole ammidi testate e sull'asse delle ordinate la vitalità cellulare (%). I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test *t* di Student: ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.

Come è possibile osservare dall'istogramma riportato in figura, il trattamento con i composti diossidati, a concentrazione minime (**Fig. 7**), induce modesti effetti citotossici già alla dose 2.5 μ M (tranne per il composto **22**), determinando una riduzione della vitalità di circa il 20-35% nella linea cellulare HCT116. L'effetto aumenta in maniera dose-dipendente, determinando, per esempio, con la dose 7.5 μ M, una riduzione della vitalità cellulare di circa il 50%, che progressivamente incrementa a dosi maggiori, risultando già più consistente con la dose 10 μ M (riduzione \approx del 60-70%) dopo appena 24 h di trattamento.

Per valutare la natura della morte cellulare indotta dai composti **16-29**, e cercando di confermare gli effetti citotossici osservati mediante saggio MTT, sono state eseguite analisi morfologiche al microscopio ottico e di marcatura del DNA.

Le caratteristiche morfologiche delle cellule trattate per 24 h con i diossidati ammidati dell'atractyligenina (**16-29**), sono state osservate mediante microscopia ottica adoperando ingrandimenti 200x. A titolo esemplificativo, la **Fig. 8** mostra le caratteristiche morfologiche delle cellule trattate con i composti **23**, **27** e **28** alla dose 10 μ M.

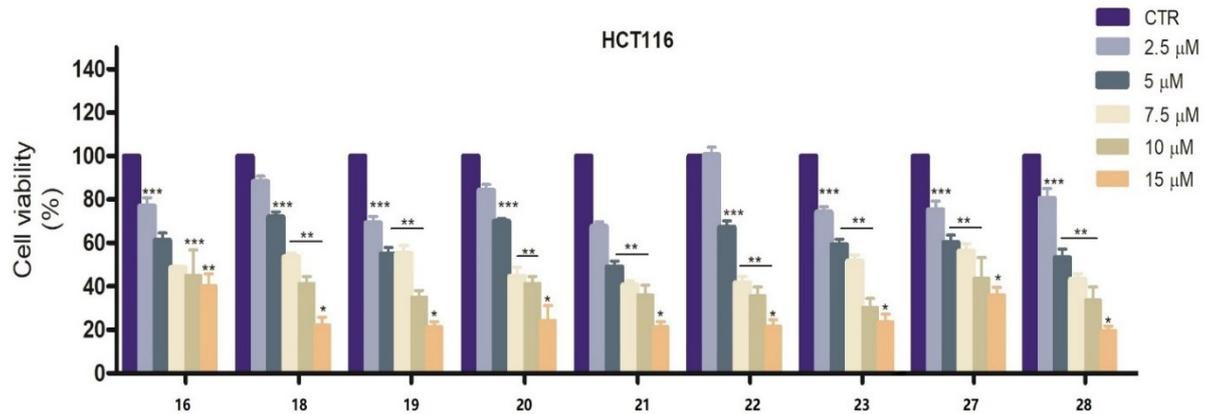


Fig. 7. Valutazione della vitalità cellulare di carcinoma del colon HCT116 trattate con i diossidati **16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 27 e 28**. Le cellule HCT116 sono state trattate per 48 h con alle concentrazioni di 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM . Sull'asse delle ascisse sono riportate le singole ammidi testate e sull'asse delle ordinate la vitalità cellulare (%). I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test *t* di Student: ** $p < 0.05$; * $p < 0.01$.

Come si può evincere dall'immagine acquisita in microscopia in campo chiaro (ingrandimento 200X), e riportata nel pannello superiore della Fig. 8, il trattamento con i diossidati **23, 27 e 28**, determina nelle cellule HCT116 chiari effetti citotossici. Rispetto alle cellule controllo incubate in presenza del solo veicolo, l'analisi della morfologia mette in evidenza che il trattamento con i diossidati causa un chiaro restringimento del volume cellulare. Queste cellule, infatti, acquisiscono morfologia tondeggiate, tendono a distaccarsi dal substrato e presentano una drastica diminuzione del numero cellulare manifestando evidenti segni distintivi di processi di morte per apoptosi.

Alla luce delle osservazioni fatte sulle analisi morfologiche, è stato indagato lo stato di condensazione e l'integrità della cromatina, poiché un altro dei fenomeni cellulari caratteristici dell'apoptosi è la frammentazione del DNA a opera di specifiche endonucleasi che, attivate dalle caspasi, causano la rottura di entrambi i filamenti delle catene polinucleotidiche, all'altezza del DNA *linker* (Nagata et al. 1998).

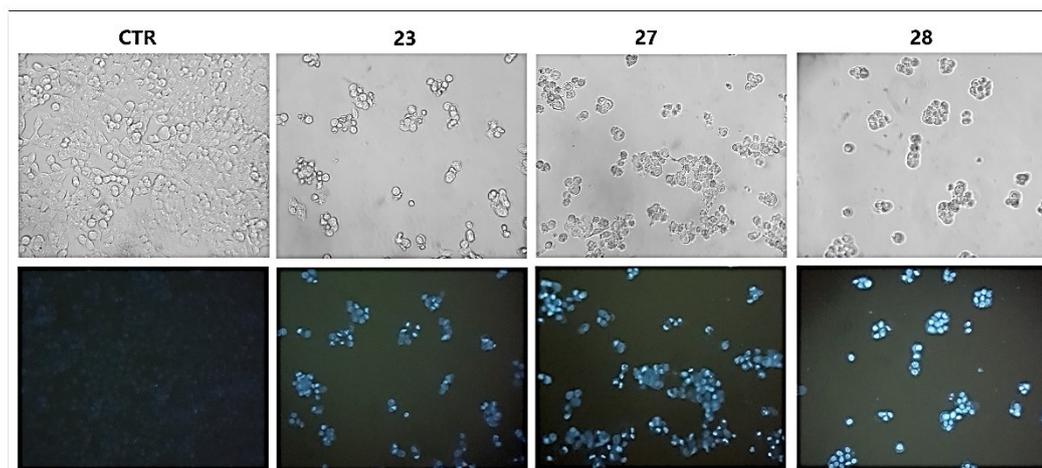


Fig. 8. In alto: Immagini acquisite mediante microscopia ottica utilizzando un ingrandimento 200x su cellule di carcinoma del colon HCT116 non trattate e dopo 24 h d'esposizione ai composti **23**, **27** e **28** alla dose 10 μ M. **In basso:** Stato della condensazione della cromatina osservato per mezzo di microscopia a fluorescenza previa colorazione con Hoechst33342 (ingrandimento 200x).

Sono diversi i metodi utilizzati per apprezzare lo stato di condensazione ed eventuale frammentazione del DNA, ma nel nostro caso è stata utilizzata l'analisi mediante microscopia a fluorescenza mediante colorazione con Hoechst33342. Le cellule sono state osservate tramite microscopio a fluorescenza dopo 24 h di trattamento. Le immagini riportate nel pannello inferiore della **Fig. 8**, ottenute adoperando l'ingrandimento 200x, riguardano, a titolo di esempio, il trattamento cellulare con i composti **23**, **28** e **29**, utilizzando la dose minima 10 μ M. Come si può evincere dalle immagini, rispetto alle cellule controllo, dove è presente una colorazione blu diffusa e quasi uniforme, indice dell'integrità della cromatina, nelle cellule esposte a trattamento si osserva un'intensa colorazione blu brillante indice di condensazione della cromatina e che si accompagna a eventi di frammentazione del DNA. Tali effetti, particolarmente visibili nelle cellule soggette all'attività dei composti **23** e **27**, sono maggiormente evidenti in quelle soggette all'azione del composto **28** (**Fig. 8**).

3.2.3. Materiali e metodi

3.2.3.1. Procedure generali

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 , CD_3OD e DMSO se non diversamente indicato, su spettrometri Bruker, utilizzando il segnale del solvente residuo 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 × 50 mm, 1.8 μm) con una colonna di guardia di sicurezza Phenomenex C₁₈ (4 mm × 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 tutti i solventi organici utilizzati, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (San Louis, MO, USA).

3.2.3.2. Esperimenti per la sintesi di (2)

3.2.3.2.1. Sintesi BOP/TEA

L'atractyligenina (100.4 mg) è stata solubilizzata in dimetilformammide anidra (DMF) (≈ 3 mL) in un pallone a due colli e la miscela è stata trattata con TEA (0.040 mL, 0.278 mmol) in atmosfera di Ar, a 0 °C per 10 min. Quindi, è stato aggiunto un eccesso di propilammia (0.4 mmol) e una soluzione di BOP (122.9 mg, 0.278 mmol) in CH_2Cl_2 anidro (3 mL) è stata iniettata goccia a goccia per 30 minuti, in atmosfera di Ar. La miscela è stata agitata a 0 °C per 30 minuti e a temperatura ambiente per una notte. La miscela è stata evaporata sottovuoto per

rimuovere CH₂Cl₂, e il prodotto grezzo è stato ripartito tra EtOAc (25 mL) e 1 N HCl (25 mL); quindi lo strato organico è stato ripartito con una soluzione satura di NaHCO₃ (25 mL). La fase organica è stata lavata con acqua, essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e portata a secco. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su gel di silice eluendo con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) per ottenere **2** con una resa del 54%.

3.2.3.2.2. Sintesi con TBTU/TEA

L'atractyligenina (100 mg) è stato solubilizzato in un pallone a due colli, precedentemente condizionato con Ar, con DMF secco (3 mL). La miscela è stata agitata con TEA (0.32 mmol) sotto un'atmosfera di Ar, a 0 °C per 10 minuti. Quindi, una soluzione contenente TBTU (0.32 mmoli, 3 mL di CH₂Cl₂) e un eccesso di propilammia (0.4 mmol) è stato aggiunto in atmosfera di Ar. La miscela di reazione è stata agitata a 0 °C per 30 minuti e poi a temperatura ambiente, controllando l'andamento della reazione mediante TLC per un massimo di 24 ore. Il grezzo è stato evaporato per rimuovere CH₂Cl₂ e ripartito tra EtOAc (5 mL) e 1 N HCl (5 mL). Quindi l'estratto organico è stato ripartito con NaHCO₃, lavato con acqua, essiccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e portato a secco.

3.2.3.2.3. Sintesi con TBTU/DIPEA

Questa reazione è stata effettuata sostituendo TEA con DIPEA appena distillato e seguendo la procedura sopra riportata **3.2.3.2.2**.

3.2.3.2.4. Sintesi con EDC/HOBt/DIMAP (25 °C)

L'atractyligenina (100 mg) è stato solubilizzato in un pallone a due colli, precedentemente riempito con N₂, con DMF anidro (2 mL). La miscela è stata agitata con DIMAP (0.4 mmol) in atmosfera di N₂, a 0 °C per 10 min. Quindi EDC (0.4 mmol) e HOBt (0.4 mmol) sono stati aggiunti alternativamente in atmosfera di N₂ e la miscela è stata agitata a 0 °C per 30 minuti. Infine, è stato aggiunto un eccesso di propilammia (0.4 mmol). La miscela di reazione è stata mantenuta a temperatura ambiente e monitorata mediante TLC per un massimo di 24 ore. La

miscela grezza è stata evaporata per rimuovere CH_2Cl_2 e ripartita come descritto nelle procedure precedenti.

3.2.3.2.5. Sintesi con EDC/HOBt/DIMAP (50 °C)

In questa reazione sono stati impiegati gli stessi reagenti impiegati nella procedura **3.2.3.2.4.**, ma dopo l'aggiunta di tutti i reagenti, la reazione è stata agitata a 50 °C per 24 ore e l'andamento della reazione è stato controllato mediante TLC.

3.2.3.2.6. Procedura generale per la sintesi delle ammidi dell'atractyligenina (3-15)

L'atractyligenina (100 mg) è stato solubilizzato in un pallone a due colli, precedentemente riempito con N_2 , con DMF anidro (2 mL). La miscela è stata agitata con DIMAP (0.4 mmol) in atmosfera di N_2 , a 0 °C per 10 minuti. Quindi EDC (0.4 mmol) e HOBt (0.4 mmol) sono stati aggiunti alternativamente in atmosfera di N_2 e la miscela è stata agitata a 0 °C per 30 minuti. Infine, l'ammina adatta (1.2 equiv) è stata aggiunta alla miscela, agitando per 24 h a temperatura ambiente. La reazione grezza è stata evaporata sottovuoto per rimuovere CH_2Cl_2 , e il residuo è stato ripartito tra EtOAc (10 mL) e 1 N HCl (10 mL); quindi lo strato organico è stato ripartito con una soluzione di NaHCO_3 (2×10 mL). La fase organica è stata lavata con acqua, essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e portata a secco. Ciascun residuo è stato purificato mediante cromatografia liquida stazionaria.

3.2.3.2.7. Procedura generale per la sintesi degli ossidati dell'atractyligenina

Le ammidi, singolarmente, (20 mg, 1 mmol) sono state solubilizzate in un pallone a due colli, precedentemente riempito con Ar, con DCM (2 mL). Alla miscela è stato aggiunto un eccesso di reattivo di Dess-Martin (2.1 mmol) in atmosfera di N_2 , a 0 °C per 30 minuti. Quindi è stata lasciata agitare per altri 30 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'agitazione, il solvente è stato rimosso e il residuo è stato ripartito tra EtOAc (10 mL) e H_2O (10 mL); quindi lo strato organico è stato ripartito con una soluzione di NaHCO_3 (2×10 mL). La fase organica è stata lavata con acqua, filtrata e essiccata su Na_2SO_4 anidro, rifiltrata e portata a secco. Ciascun

residuo è stato purificato mediante cromatografia liquida stazionaria. Questa procedura è stata utilizzata per la sintesi dei composti **16-29**.

3.2.3.3. Dati spettroscopici

4-Propylcarboxamide-atractyligenin (2)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (2) (96%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25} -112.76$ (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 3**; HRESIMS *m/z* 384.2518 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₂H₃₅NO₃, 384.2509).

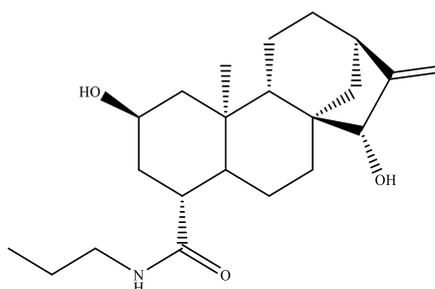


Tabella 3. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 2.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.68 (dd, <i>J</i> = 11.7, 11.7 Hz)	49.0
1α	2.20 (ddd, <i>J</i> = 11.7, 3.7, 1.7 Hz)	
2α	4.40 (dddd, <i>J</i> = 11.7, 11.7, 3.7, 3.7 Hz)	64.1
3β	1.26 (ov)	37.7
3α	2.29 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 3.7, 1.7 Hz)	
4β	2.49 (ov)	45.2
5β	1.40 (ov)	48.7
6β	1.57 (ov)	25.9
6α	1.75 (ov)	
7β	1.46 (ov)	34.7
7α	1.72 (ov)	
8	-	47.4
9β	1.01 (brd, <i>J</i> = 7.5 Hz)	52.7
10	-	40.3
11α	1.54 (ov)	18.0
11β	1.39 (ov)	
12β	1.55 (ov)	
12α	1.43 (ov)	32.1
13	2.70 (brs)	42.1
14a	1.83 (dd, <i>J</i> = 11.2, 2.1 Hz)	36.0
14b	1.35 (ov)	
15β	3.79 (brs)	82.4
16	-	159.6
17a	5.17 (brs)	108.5
17b	5.04 (brs)	
19	-	174.3
20	0.96 (s)	16.4
1'	3.23 (ddt, <i>J</i> = 13.4, 7.0, 7.0 Hz)	41.3
2'	1.53 (m)	22.7
3'	0.89 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz)	11.5

4-Butylcarboxamide-atractyligenin (3)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (3) (95%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -110.71 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 4**; HRESIMS *m/z* 398.2669 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₃H₃₇NO₇, 398.2666).

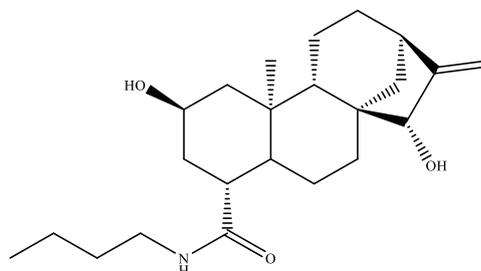


Tabella 4. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **3**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.71 (dd, <i>J</i> = 11.0, 11.0 Hz)	
1α	2.22 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 4.6, 1.7 Hz)	49.1
2α	4.40 (dddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 4.6, 4.6 Hz)	64.4
3β	1.25 (ov)	37.9
3α	2.35 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.6, 2.1 Hz)	
4β	2.50 (brt)	45.4
5β	1.46 (ov)	48.7
6β	1.61 (ov)	26.1
6α	1.78 (ov)	
7β	1.42 (ov)	34.8
7α	1.73 (ov)	
8	-	47.4
9β	1.05 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.4
11α	1.50 (ov)	18.0
11β	1.36 (ov)	
12β	1.58 (ov)	32.2
12α	1.452 (ov)	
13	2.75 (brs)	42.1
14a	1.87 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	36.1
14b	1.36 (ov)	
15β	3.82 (brs)	82.5
16	-	159.9
17a	5.22 (brs)	108.5
17b	5.08 (brs)	
19	-	174.1
20	0.99 (s)	16.4
1'a	3.28 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.3
1'b	3.17 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	
2'	1.58 (ov)	31.6
3'	1.34 (ov)	20.2
4'	0.93 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	13.7

4-Pentylcarboxamide-atractyligenin (4)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (4) (94%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25} -111.54$ (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 5**; HRESIMS *m/z* 412.2837 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₄H₃₉NO₃, 412.2822).

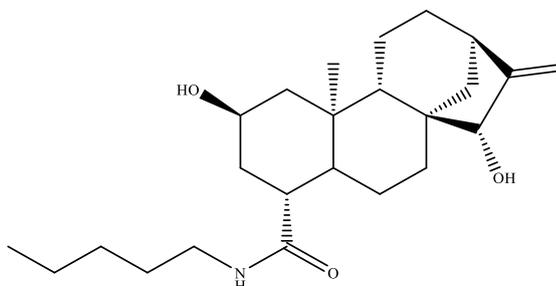


Tabella 5. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 4.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.66 (dd, <i>J</i> = 12.0, 12.0 Hz)	48.9
1α	2.24 (brdd)	
2α	4.38 (brt)	64.0
3β	1.27 (ov)	
3α	2.24 (brdd)	37.6
4β	2.46 (brs)	45.2
5β	1.43 (ov)	48.7
6β	1.56 (ov)	
6α	1.73 (ov)	25.8
7β	1.46 (ov)	
7α	1.74 (ov)	34.7
8	-	47.3
9β	0.99 (brd, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.2
11α	1.50 (ov)	
11β	1.43 (ov)	17.9
12β	1.58 (ov)	
12α	1.44 (ov)	32.1
13	2.68 (brs)	42.0
14a	1.79 (d, <i>J</i> = 11.3 Hz)	
14b	1.35 (ov)	35.9
15β	3.77 (brs)	82.3
16	-	159.5
17a	5.16 (brs)	
17b	5.02 (brs)	108.4
19	-	174.2
20	0.94 (s)	16.4
1'	3.22 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.5
2'	1.50 (ov)	29.1
3'	1.25 (ov)	29.0
4'	1.23 (ov)	22.2
5'	0.84 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	13.9

4-Hexylcarboxamide-atractyligenin (5)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (5) (95%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -111.23 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 6**; HRESIMS *m/z* 426.2959 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₄₁NO₃, 426.2979).

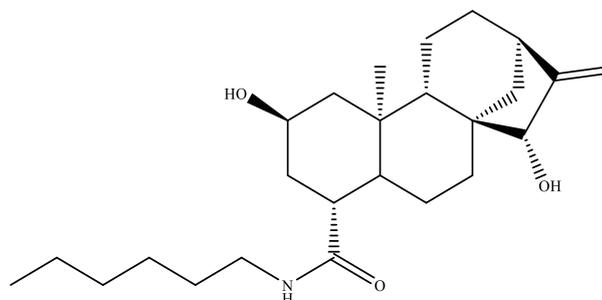


Tabella 6. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **5**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.67 (dd, <i>J</i> = 12.0, 12.0 Hz)	
1α	2.17 (ddd, <i>J</i> = 12.0, 4.3, 1.8 Hz)	49.0
2α	4.40 (dddd, <i>J</i> = 12.0, 10.9, 4.3, 3.6 Hz)	64.1
3β	1.32 (ov)	
3α	2.30 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 3.6, 1.8 Hz)	37.7
4β	2.47 (brt)	45.2
5β	1.42 (ov)	48.7
6β	1.57 (ov)	
6α	1.72 (ov)	25.9
7β	1.44 (ov)	
7α	1.75 (ov)	34.7
8	-	47.3
9β	1.00 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.3
11α	1.51 (ov)	
11β	1.44 (ov)	18.0
12β	1.57 (ov)	
12α	1.48 (ov)	32.2
13	2.70 (brs)	42.0
14a	1.81 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz)	36.0
14b	1.35 (ov)	
15β	3.78 (brs)	82.3
16	-	159.6
17a	5.18 (brs)	
17b	5.04 (brs)	108.4
19	-	174.2
20	0.95 (s)	16.4
1'	3.24 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.6
2'	1.52 (ov)	26.7
3'	1.25 (ov)	25.9
4'	1.23 (ov)	29.4
5'	1.21 (ov)	22.5
6'	0.84 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	13.9

4-Heptylcarboxamide-atractyligenin (6)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (6) (93%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -109.63 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 7**; HRESIMS *m/z* 440.3132 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₆H₄₃NO₃, 440.3135).

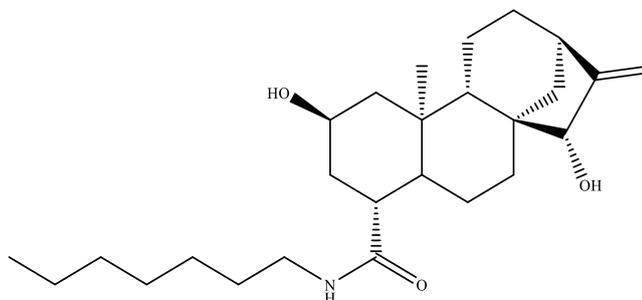


Tabella 7. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 6.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1 β	0.65 (dd, <i>J</i> = 12.0, 12.0 Hz)	48.9
1 α	2.14 (ddd, <i>J</i> = 12.0, 4.3, 1.8 Hz)	
2 α	4.36 (dddd, <i>J</i> = 12.0, 10.9, 4.3, 4.3 Hz)	64.0
3 β	1.33 (ov)	37.6
3 α	2.27 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 3.6, 1.8 Hz)	
4 β	2.45 (brt)	45.1
5 β	1.43 (ov)	48.7
6 β	1.60 (ov)	25.8
6 α	1.71 (ov)	
7 β	1.44 (ov)	34.7
7 α	1.73 (ov)	
8	-	47.3
9 β	0.98 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.2
11 α	1.49 (ov)	17.9
11 β	1.39 (ov)	
12 β	1.54 (ov)	32.1
12 α	1.49 (ov)	
13	2.67 (brs)	42.0
14a	1.78 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz)	36.0
14b	1.36 (ov)	
15 β	3.76 (brs)	82.3
16	-	159.5
17a	5.15 (brs)	108.3
17b	5.01 (brs)	
19	-	174.2
20	0.93 (s)	16.4
1'	3.22 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.5
2'	1.38 (ov)	29.4
3'	1.23 (ov)	26.9
4'	1.23 (ov)	28.8
5'	1.23 (ov)	31.6
6'	1.23 (ov)	22.4
7'	0.82 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	13.8

4-Octylcarboxamide-atractyligenin (7)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (7) (94%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -106.34 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 8**; HRESIMS *m/z* 454.3278 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₇H₄₅NO₃, 454.3292).

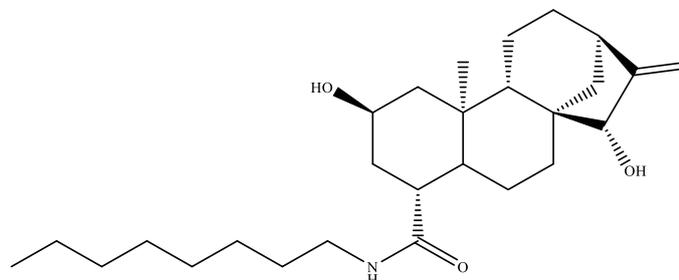


Tabella 8. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 7.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)
1β	0.67 (dd, <i>J</i> = 11.0, 11.0 Hz)	49.0
1α	2.16 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 4.6, 1.7 Hz)	
2α	4.38 (dddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 4.6, 4.6 Hz)	64.0
3β	1.24 (ov)	
3α	2.28 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.6, 2.1 Hz)	37.7
4β	2.49 (brs)	45.2
5β	1.47 (ov)	48.7
6β	1.65 (ov)	
6α	1.74 (ov)	25.9
7β	1.44 (ov)	
7α	1.73 (ov)	34.7
8	-	47.4
9β	1.01 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.3
11α	1.49 (ov)	
11β	1.36 (ov)	18.0
12β	1.52 (ov)	
12α	1.45 (ov)	32.2
13	2.69 (brs)	42.1
14a	1.80 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	
14b	1.36 (ov)	36.0
15β	3.77 (brs)	82.4
16	-	159.7
17a	5.17 (brs)	
17b	5.03 (brs)	108.4
19	-	174.2
20	0.94 (s)	16.4
1'a	3.24 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	
1'b	3.07 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.5
2'	1.44 (ov)	29.4
3'	1.24 (ov)	27.0
4'	1.24 (ov)	29.1
5'	1.24 (ov)	29.1
6'	1.24 (ov)	31.6
7'	1.24 (ov)	22.5
8'	0.83 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	14.0

4-Decylcarboxamide-atractyligenin (8)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (8) (92%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -102.55 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 9**; HRESIMS *m/z* 482.3611 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₉H₄₉NO₃, 482.3605).

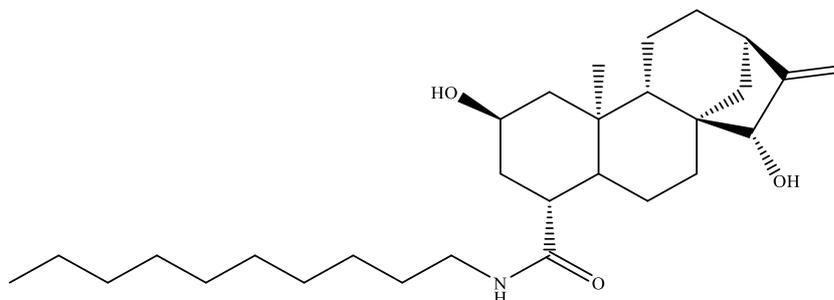


Tabella 9. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **8**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1 β	0.66 (dd, <i>J</i> = 11.0, 11.0 Hz)	
1 α	2.14 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 4.6, 1.7 Hz)	49.0
2 α	4.36 (dddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 4.6, 4.6 Hz)	63.9
3 β	1.26 (ov)	37.7
3 α	2.25 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.6, 2.1 Hz)	
4 β	2.45 (brs)	45.2
5 β	1.52 (ov)	48.7
6 β	1.69 (ov)	25.9
6 α	1.70 (ov)	
7 β	1.48 (ov)	34.7
7 α	1.73 (ov)	
8	-	47.3
9 β	0.97 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.2
11 α	1.47 (ov)	
11 β	1.38 (ov)	18.0
12 β	1.52 (ov)	
12 α	1.45 (ov)	32.2
13	2.68 (brt)	42.0
14a	1.79 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	36.0
14b	1.36 (ov)	
15 β	3.76 (brs)	82.3
16	-	159.6
17a	5.16 (brs)	
17b	5.02 (brs)	108.3
19	-	174.2
20	0.93 (s)	16.4
1'a	3.22 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.5
1'b	3.06 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	
2'	1.42 (ov)	31.7
3'	1.20 (ov)	27.0
4'	1.20 (ov)	29.1
5'	1.20 (ov)	29.4
6'	1.20 (ov)	29.4
7'	1.20 (ov)	29.2
8'	1.20 (ov)	29.5

9'	1.20 (ov)	22.5
10'	0.83 (t, $J = 6.7$ Hz)	13.9

4-Isopropylcarboxamide-atractyligenin (9)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (9) (96%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -108.59 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 10**; HRESIMS *m/z* 384.2515 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₂H₃₅NO₃, 384.2509).

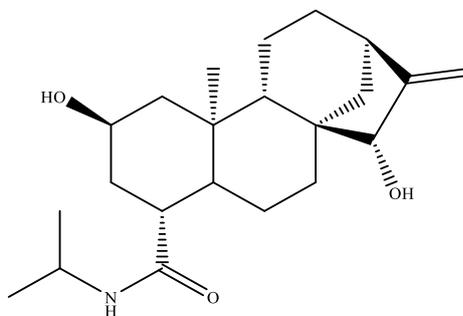


Tabella 10. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 9.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.66 (dd, <i>J</i> = 11.2, 11.2 Hz)	49.0
1α	2.17 (ddd, <i>J</i> = 11.2, 4.6, 1.6 Hz)	
2α	4.39 (dddd, <i>J</i> = 11.2, 11.2, 4.6, 4.6 Hz)	64.0
3β	1.22 (ov)	37.7
3α	2.27 (ddd, <i>J</i> = 11.2, 4.6, 1.6 Hz)	
4β	2.43 (ov)	45.2
5β	1.38 (ov)	48.7
6β	1.59 (ov)	25.9
6α	1.78 (ov)	
7β	1.43 (ov)	34.7
7α	1.71 (ov)	
8	-	47.3
9β	1.00 (brd, <i>J</i> = 7.5 Hz)	52.7
10	-	40.3
11α	1.50 (ov)	18.0
11β	1.42 (ov)	
12β	1.58 (ov)	32.2
12α	1.44 (ov)	
13	2.65 (brs)	42.0
14a	1.87 (dd, <i>J</i> = 11.2, 2.1 Hz)	36.0
14b	1.38 (ov)	
15β	3.77 (brs)	82.3
16	-	159.6
17a	5.17 (brs)	108.4
17b	5.03 (brs)	
19	-	173.3
20	0.95 (s)	16.4
1'	4.00 (m)	41.3
2'	1.10 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.7
3'	1.09 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.5

4-Isobutylcarboxamide-atractyligenin (10)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (10) (95%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -107.98 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 11**; HRESIMS *m/z* 398.2642 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₃H₃₇NO₃, 398.2666).

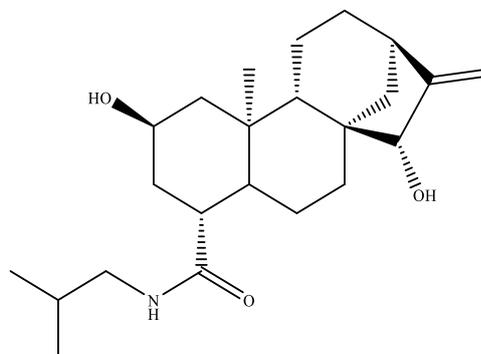


Tabella 11. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **10**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.69 (dd, <i>J</i> = 11.7, 11.7 Hz)	
1α	2.19 (ddd, <i>J</i> = 11.7, 3.7, 1.7 Hz)	49.1
2α	4.41 (dddd, <i>J</i> = 11.7, 11.7, 3.7, 3.7 Hz)	64.1
3β	1.25 (ov)	37.9
3α	2.30 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 3.7, 1.7 Hz)	
4β	2.50 (ov)	45.4
5β	1.40 (ov)	48.7
6β	1.57 (ov)	26.0
6α	1.77 (ov)	
7β	1.45 (ov)	34.8
7α	1.74 (ov)	
8	-	47.4
9β	1.03 (brd, <i>J</i> = 7.5 Hz)	52.7
10	-	40.3
11α	1.53 (ov)	18.0
11β	1.37 (ov)	
12β	1.53 (ov)	32.2
12α	1.43 (ov)	
13	2.70 (brs)	42.1
14a	1.85 (dd, <i>J</i> = 11.2, 2.1 Hz)	36.0
14b	1.35 (ov)	
15β	3.79 (brs)	82.4
16	-	159.7
17a	5.18 (brs)	108.4
17b	5.04 (brs)	
19	-	174.3
20	0.97 (s)	16.5
1'a	3.11 (dt, <i>J</i> = 13.3, 6.6 Hz)	47.1
1'b	2.93 (dt, <i>J</i> = 13.3, 6.6 Hz)	
2'	2.50 (ov)	28.3
3'	0.90 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz)	20.3
4'	0.88 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz)	20.2

4-((*R*)-1,3-Dimethylbutyl)carboxamide-atractyligenin (**11**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (**11**) (91%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -98.25 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 12**; HRESIMS *m/z* 426.2999 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₄₁NO₃, 426.2979).

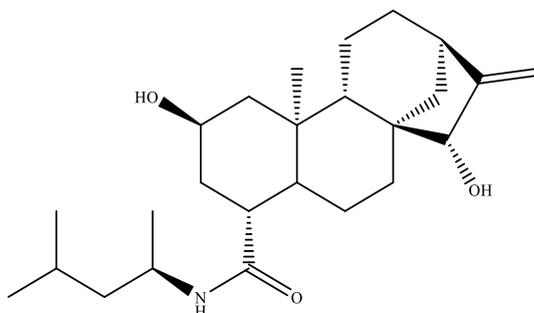


Tabella 12. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **11**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.71 (dd, <i>J</i> = 12.7, 11.0 Hz)	
1α	2.33 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.3, 1.7 Hz)	49.0
2α	4.47 (dddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 4.6, 4.6 Hz)	64.3
3β	1.23 (ov)	37.9
3α	2.21 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.3, 2.1 Hz)	
4β	2.73 (brs)	45.3
5β	1.77 (ov)	48.7
6β	1.58 (ov)	
6α	1.60 (ov)	26.1
7β	1.45 (ov)	
7α	1.57 (ov)	34.7
8	-	47.4
9β	1.05 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.7
10	-	40.4
11α	1.45 (ov)	
11β	1.28 (ov)	18.0
12β	1.41 (ov)	
12α	1.34 (ov)	32.2
13	2.47 (brt)	42.1
14a	1.86 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	
14b	1.34 (ov)	36.1
15β	3.81 (brs)	82.5
16	-	159.8
17a	5.21 (brs)	
17b	5.07 (brs)	108.5
19	-	173.3
20	1.01 (s)	16.5
1'	4.07 (ept, <i>J</i> = 7.2 Hz)	43.4
2'	1.42 (ov)	46.2
3'	1.60 (ov)	25.0
4'	0.89 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.6
5'	0.89 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.5
6'	1.10 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	21.3

4-((*S*)-1,3-Dimethylbutyl)carboxamide-atractyligenin (**12**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (**12**) (90%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -112.63 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 13**; HRESIMS *m/z* 426.2999 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₄₁NO₃, 426.2979).

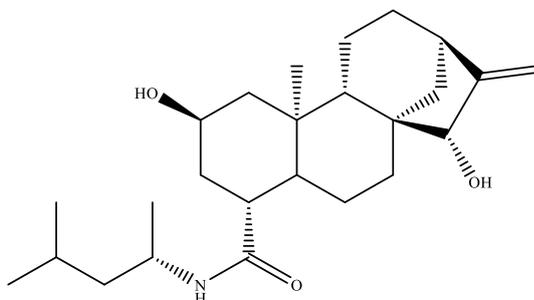


Tabella 13. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **12**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.71 (dd, <i>J</i> = 12.7, 11.0 Hz)	49.1
1α	2.33 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.3, 1.7 Hz)	
2α	4.45 (dddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 4.6, 4.6 Hz)	64.3
3β	1.23 (ov)	37.9
3α	2.22 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.3, 2.1 Hz)	
4β	2.74 (brs)	45.6
5β	1.78 (ov)	48.8
6β	1.58 (ov)	26.0
6α	1.60 (ov)	
7β	1.45 (ov)	34.8
7α	1.57 (ov)	
8	-	47.4
9β	1.04 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.4
11α	1.47 (ov)	18.0
11β	1.28 (ov)	
12β	1.41 (ov)	32.2
12α	1.34 (ov)	
13	2.47 (brt)	42.1
14a	1.85 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	36.0
14b	1.34 (ov)	
15β	3.82 (brs)	82.5
16	-	159.9
17a	5.21 (brs)	108.5
17b	5.08 (brs)	
19	-	173.3
20	1.01 (s)	16.5
1'	4.02 (ept, <i>J</i> = 7.2 Hz)	43.6
2'	1.44 (ov)	46.2
3'	1.61 (ov)	25.2
4'	0.90 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.6
5'	0.90 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.3
6'	1.10 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	21.3

4-Cyclohexylcarboxamide-atractyligenin (13)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (13) (91%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -143.34 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 14**; HRESIMS *m/z* 424.2857 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₃₉NO₃, 424.2822).

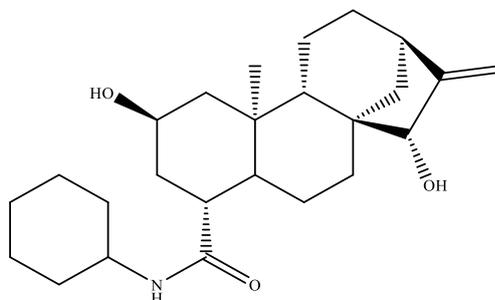


Tabella 14. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 13.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.64 (dd, <i>J</i> = 10.7, 10.7 Hz)	48.6
1α	2.15 (ddd, <i>J</i> = 10.7, 4.1, 1.7 Hz)	
2α	4.36 (dddd, <i>J</i> = 10.7, 10.7, 4.1, 4.1 Hz)	63.9
3β	1.23 (ov)	
3α	2.25 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.1, 1.7 Hz)	37.6
4β	2.42 (ov)	45.1
5β	1.43 (ov)	49.0
6β	1.56 (ov)	
6α	1.68 (ov)	25.3
7β	1.39 (ov)	
7α	1.61 (ov)	34.7
8	-	47.3
9β	1.03 (brd, <i>J</i> = 7.5 Hz)	52.6
10	-	40.3
11α	1.54 (ov)	17.9
11β	1.38 (ov)	
12β	1.63 (ov)	
12α	1.53 (ov)	32.1
13	2.66 (brs)	42.0
14a	1.80 (dd, <i>J</i> = 12.2, 2.1 Hz)	36.3
14b	1.43 (ov)	
15β	3.75 (brs)	82.3
16	-	159.5
17a	5.15 (brs)	
17b	5.00 (brs)	108.3
19	-	173.1
20	0.93 (s)	16.3
1'	3.67 (m)	48.1
2'	1.20-1.80 (m)	33.0
3'	1.20-1.80 (m)	24.8
4'	1.20-1.80 (m)	25.8
5'	1.20-1.80 (m)	24.7
6'	1.20-1.80 (m)	32.8

4-Phenethylcarboxamide-atractyligenin (14)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 95:5) ha dato l'ammide (14) (82%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25}$ -178.29 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 15**; HRESIMS *m/z* 446.2681 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₇H₃₇NO₃, 446.2666).

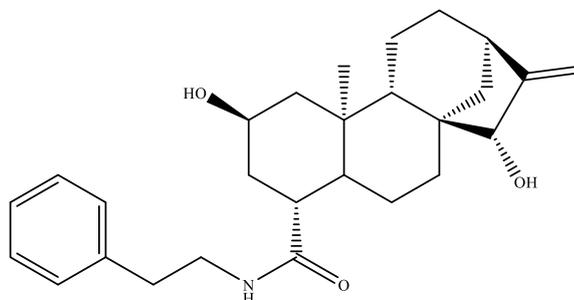


Tabella 15. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 14.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	0.65 (dd, <i>J</i> = 11.0, 11.0 Hz)	48.9
1α	2.14 (ddd, <i>J</i> = 11.0, 4.6, 1.7 Hz)	
2α	4.37 (dddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 4.6, 4.6 Hz)	64.0
3β	1.23 (ov)	
3α	2.31 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.6, 2.1 Hz)	37.6
4β	2.41 (brs)	45.1
5β	1.48 (ov)	48.5
6β	1.58 (ov)	
6α	1.60 (ov)	25.6
7β	1.48 (ov)	
7α	1.56 (ov)	34.6
8	-	47.3
9β	0.98 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	52.6
10	-	40.2
11α	1.47 (ov)	
11β	1.38 (ov)	17.9
12β	1.44 (ov)	
12α	1.45 (ov)	32.2
13	2.71 (brt)	42.0
14a	1.74 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	
14b	1.36 (ov)	36.1
15β	3.76 (brs)	82.3
16	-	159.7
17a	5.18 (brs)	
17b	5.05 (brs)	108.4
19	-	174.3
20	0.87 (s)	16.3
1'a	3.58 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	
1'b	3.43 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	40.4
2'	2.80 (dd, <i>J</i> = 6.5, 2.8)	
3'	-	138.7
4'	7.20-7.27 (m)	128.5
5'	7.20-7.27 (m)	128.6
6'	7.20-7.27 (m)	126.5
7'	7.20-7.27 (m)	128.6

4-Methylbenzylcarboxamide-atractyligenin (15)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**15**) (88%) come polvere amorfa bianca: $[\alpha]_D^{25} -184.20$ (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 16**; HRESIMS *m/z* 446.2653 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₇H₃₇NO₃, 446.2666).

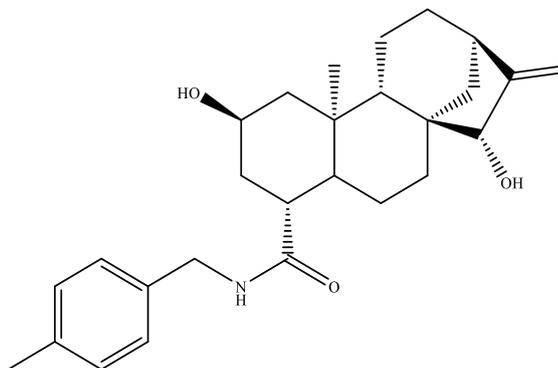


Tabella 16. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **15**.

Posizione	¹ H-NMR (CD ₃ OD- <i>d</i> ₄)	¹³ C-NMR (CD ₃ OD- <i>d</i> ₄)
1β	0.66 (dd, <i>J</i> = 12.7, 11.0 Hz)	50.5
1α	2.17 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.3, 1.7 Hz)	
2α	4.41 (m)	65.3
3β	1.23 (ov)	
3α	2.17 (ddd, <i>J</i> = 12.7, 4.3, 2.1 Hz)	38.5
4β	2.69 (brs)	46.7
5β	1.65 (ov)	50.3
6β	1.59 (ov)	
6α	1.62 (ov)	26.2
7β	1.48 (ov)	
7α	1.56 (ov)	36.2
8	-	48.8
9β	1.02 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	54.7
10	-	43.7
11α	1.47 (ov)	
11β	1.32 (ov)	19.3
12β	1.43 (ov)	
12α	1.34 (ov)	33.6
13	2.62 (brt)	44.1
14a	1.80 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz)	
14b	1.36 (ov)	37.2
15β	3.74 (brs)	83.7
16	-	160.3
17a	5.18 (brs)	
17b	5.07 (brs)	109.2
19	-	176.8
20	0.96 (s)	17.5
1'a	4.41 (m)	
1'b	4.17 (d, <i>J</i> = 14.2 Hz)	41.6
2'	-	137.4
3'	7.10-7.17 (m)	129.0
4'	7.10-7.17 (m)	130.1

5'	-	137.9
6'	7.10-7.17 (m)	130.1
7'	7.10-7.17 (m)	129.0
8'	2.30 (s)	21.3

4-Propylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (16)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**16**) (81%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25} -124.10$ (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 17**; HRESIMS *m/z* 380.2187 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₂H₃₁NO₃, 380.2196).

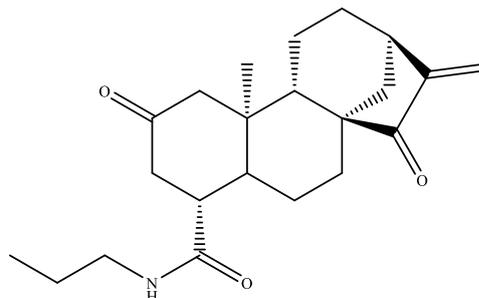


Tabella 17. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **16**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.85 (ov)	
1α	2.55 (ov)	55.2
2	-	209.7
3β	2.64 (ov)	43.9
3α	2.93 (m)	
4β	3.04 (dd, <i>J</i> = 7.2, 4.3 Hz)	47.0
5β	2.02 (ov)	47.8
6β	1.85 (ov)	24.4
6α	1.88 (ov)	
7β	1.97 (ov)	32.8
7α	1.40 (ov)	
8	-	51.6
9β	1.61 (ov)	50.5
10	-	43.8
11α	1.49 (ov)	18.0
11β	1.43 (ov)	
12β	1.62 (ov)	31.6
12α	1.45 (ov)	
13	2.69 (brt)	35.8
14a	2.25 (brd, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.7
14b	1.39 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.8
17a	5.91 (brs)	115.1
17b	5.25 (brs)	
19	-	172.3
20	1.04 (s)	16.9
1'	3.16 (brdd)	39.7
2'	1.23 (ov)	31.6
3'	1.23 (ov)	22.4
4'	0.83 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	14.0

4-Butylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (17)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (17) (83%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -122.98 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 18**; HRESIMS m/z 394.2386 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₃H₃₃NO₃, 394.2352).

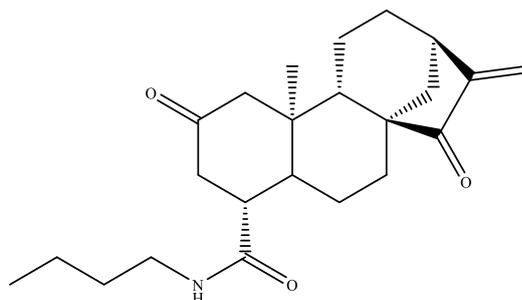


Tabella 18. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 17.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.84 (ov)	55.4
1α	2.57 (ov)	
2	-	209.8
3β	2.62 (ov)	44.2
3α	2.95 (m)	
4β	3.07 (dd, <i>J</i> = 7.2, 4.3 Hz)	47.2
5β	2.02 (ov)	48.2
6β	1.83 (ov)	24.6
6α	1.87 (ov)	
7β	1.99 (ov)	
7α	1.42 (ov)	33.0
8	-	51.7
9β	1.53 (ov)	50.6
10	-	44.0
11α	1.50 (ov)	18.1
11β	1.42 (ov)	
12β	1.58 (ov)	31.7
12α	1.44 (ov)	
13	2.67 (brt)	35.9
14a	2.32 (brd, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.8
14b	1.38 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.8
17a	5.98 (brs)	115.2
17b	5.28 (brs)	
19	-	172.2
20	1.06 (s)	16.9
1'	3.20 (brdd)	39.5
2'	1.25 (ov)	31.2
3'	1.25 (ov)	20.1
4'	0.92 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	13.7

4-Pentylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**18**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**18**) (84%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -124.11 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 19**; HRESIMS m/z 408.2537 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₄H₃₅NO₃, 408.2509).

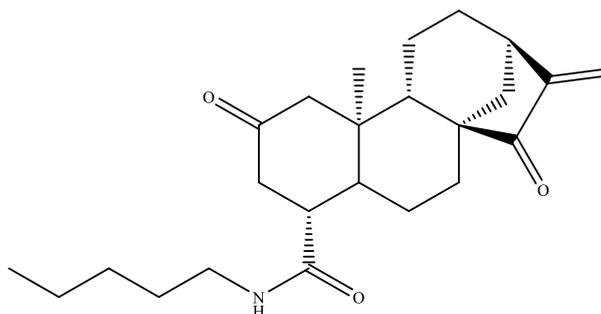


Tabella 19. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **18**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1 β	1.83 (ov)	55.2
1 α	2.57 (ov)	
2	-	209.8
3 β	2.65 (ov)	43.9
3 α	2.93 (brt)	
4 β	3.03 (ov)	47.0
5 β	1.98 (ov)	47.8
6 β	1.82 (ov)	24.4
6 α	1.86 (ov)	
7 β	1.96 (ov)	32.8
7 α	1.40 (ov)	
8	-	51.6
9 β	1.54 (ov)	50.5
10	-	43.7
11 α	1.52 (ov)	18.0
11 β	1.40 (ov)	
12 β	1.58 (ov)	31.5
12 α	1.44 (ov)	
13	2.53 (brt)	35.8
14a	2.29 (brd, $J = 12.1$ Hz)	37.7
14b	1.38 (ov)	
15	-	209.7
16	-	148.8
17a	5.92 (brs)	115.1
17b	5.26 (brs)	
19	-	171.3
20	1.03 (s)	16.9
1'	3.13 (ddt, $J = 13.0, 6.5, 6.5$ Hz)	39.6
2'	1.50 (ov)	29.0
3'	1.24 (ov)	28.7
4'	1.24 (ov)	22.2
5'	0.85 (t, $J = 6.7$ Hz)	13.9

4-Hexylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (19)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (19) (83%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -117.73 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 20**; HRESIMS m/z 422.2676 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₃₇NO₃, 422.2666).

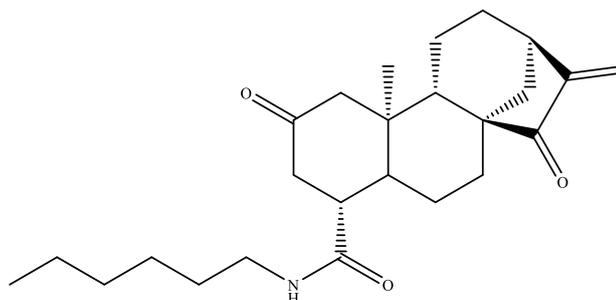


Tabella 20. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **19**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.83 (ov)	55.4
1α	2.61 (m)	
2	-	209.8
3β	2.67 (brt)	44.2
3α	2.94 (m)	
4β	3.07 (m)	47.2
5β	2.03 (ov)	48.2
6β	1.88 (ov)	24.6
6α	1.86 (ov)	
7β	1.96 (ov)	
7α	1.42 (ov)	33.0
8	-	51.7
9β	1.54 (ov)	50.6
10	-	44.0
11α	1.52 (ov)	
11β	1.46 (ov)	18.1
12β	1.56 (ov)	
12α	1.45 (ov)	31.7
13	2.54 (brt)	35.9
14a	2.32 (brd, <i>J</i> = 12.1 Hz)	
14b	1.40 (ov)	37.8
15	-	209.8
16	-	148.9
17a	5.96 (brs)	
17b	5.29 (brs)	115.2
19	-	172.2
20	1.06 (s)	16.9
1'	3.19 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	39.8
2'	1.44 (ov)	30.1
3'	1.28 (ov)	26.6
4'	1.28 (ov)	31.4
5'	1.28 (ov)	22.5
6'	0.88 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz)	14.0

4-Heptylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**20**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**20**) (85%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -123.50 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 21**; HRESIMS m/z 436.2821 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₆H₃₉NO₃, 436.2822).

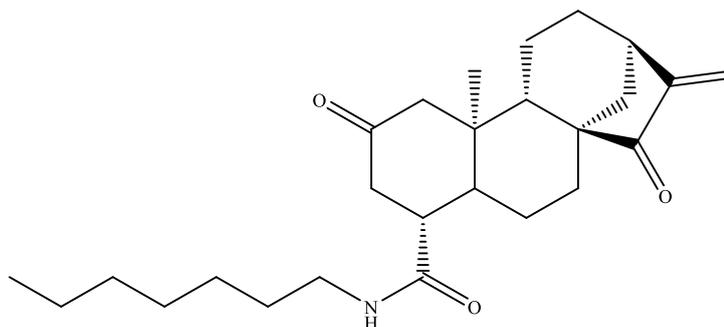


Tabella 21. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **20**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.83 (ov)	55.3
1α	2.61 (m)	
2	-	209.8
3β	2.67 (brt)	44.1
3α	2.94 (m)	
4β	3.07 (m)	47.4
5β	2.03 (ov)	48.7
6β	1.88 (ov)	
6α	1.86 (ov)	24.5
7β	1.96 (ov)	
7α	1.42 (ov)	32.9
8	-	51.7
9β	1.54 (ov)	50.6
10	-	44.0
11α	1.52 (ov)	18.1
11β	1.46 (ov)	
12β	1.56 (ov)	31.6
12α	1.45 (ov)	
13	2.54 (brt)	35.9
14a	2.32 (brd, J = 12.1 Hz)	37.7
14b	1.40 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.8
17a	5.96 (brs)	115.2
17b	5.28 (brs)	
19	-	172.2
20	1.05 (s)	16.9
1'	3.17 (ddt, J = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	41.5
2'	1.44 (ov)	29.6
3'	1.43 (ov)	26.0
4'	1.28 (ov)	31.8
5'	1.28 (ov)	22.5

6'	1.28 (ov)	22.5
7'	0.91 (t, $J = 6.7$ Hz)	14.1

4-Octylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (21)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (21) (83%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25} -131.49$ (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 22**; HRESIMS m/z 450.22964 $[M+Na]^+$ (calcolato per C₂₇H₄₁NO₃, 450.2979).

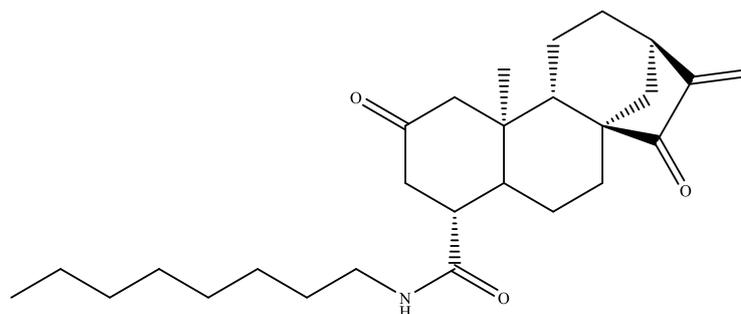


Tabella 22. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 21.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.83 (ov)	55.1
1α	2.57 (m)	
2	-	209.7
3β	2.63 (brt)	43.7
3α	2.92 (m)	
4β	3.01 (m)	46.8
5β	2.03 (ov)	47.6
6β	1.88 (ov)	24.2
6α	1.86 (ov)	
7β	1.96 (ov)	32.7
7α	1.39 (ov)	
8	-	51.6
9β	1.56 (ov)	50.4
10	-	43.6
11α	1.50 (ov)	17.9
11β	1.44 (ov)	
12β	1.65 (ov)	31.5
12α	1.42 (ov)	
13	2.50 (brt)	35.7
14a	2.29 (brd, $J = 12.1$ Hz)	37.6
14b	1.38 (ov)	
15	-	209.7
16	-	148.7
17a	5.95 (brs)	115.0
17b	5.23 (brs)	
19	-	172.4
20	1.02 (s)	16.9
1'	3.13 (ddt, $J = 13.0, 6.5, 6.5$ Hz)	39.6
2'	1.37 (ov)	30.0
3'	1.20 (ov)	26.8
4'	1.20 (ov)	29.0
5'	1.20 (ov)	29.0
6'	1.20 (ov)	31.5

7'	1.20 (ov)	22.4
8'	0.80 (t, $J = 6.7$ Hz)	13.9

4-Decylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**22**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**22**) (83%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25} -121.68$ (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 23**; HRESIMS m/z 478.3301 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₉H₄₅NO₃, 478.3292).

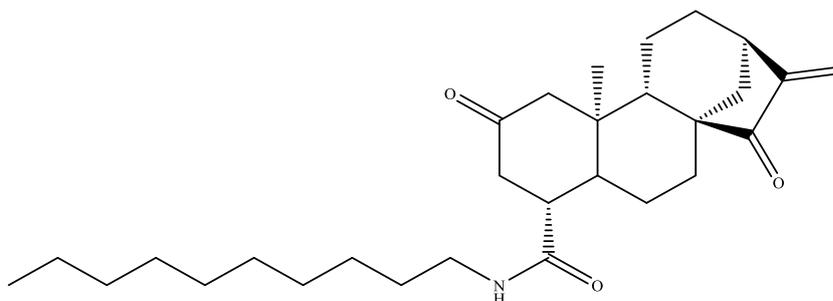


Tabella 23. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **22**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1 β	1.85 (ov)	55.2
1 α	2.57 (m)	
2	-	209.8
3 β	2.64 (brt)	43.9
3 α	2.93 (m)	
4 β	3.03 (m)	47.0
5 β	2.00 (ov)	47.9
6 β	1.90 (ov)	24.4
6 α	1.86 (ov)	
7 β	1.97 (ov)	32.8
7 α	1.36 (ov)	
8	-	51.6
9 β	1.52 (ov)	50.5
10	-	43.8
11 α	1.51 (ov)	18.0
11 β	1.44 (ov)	
12 β	1.68 (ov)	31.6
12 α	1.42 (ov)	
13	2.53 (brt)	35.8
14a	2.29 (brd, $J = 12.1$ Hz)	37.7
14b	1.36 (ov)	
15	-	209.7
16	-	148.7
17a	5.92 (brs)	115.1
17b	5.26 (brs)	
19	-	172.3
20	1.03 (s)	16.9
1'	3.15 (ddt, $J = 13.0, 6.5, 6.5$ Hz)	39.7
2'	1.42 (ov)	31.7
3'	1.22 (ov)	26.9
4'	1.22 (ov)	29.1
5'	1.22 (ov)	29.4
6'	1.22 (ov)	29.1

7'	1.22 (ov)	29.1
8'	1.22 (ov)	31.7
9'	1.22 (ov)	22.5
10'	0.84 (t, $J = 6.7$ Hz)	14.0

4-Isopropylcarboxamide-2,15-keto-atractyigenin (**23**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**23**) (85%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -164.57 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 24**; HRESIMS *m/z* 380.2177 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₂H₃₁NO₃, 380.2196).

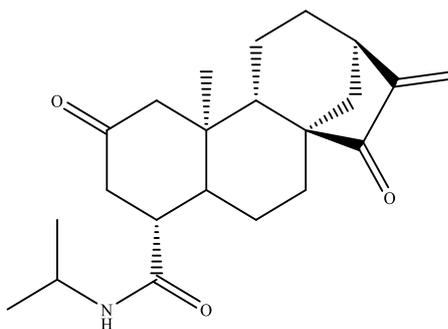


Tabella 24. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **23**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)
1 β	1.85 (ov)	55.3
1 α	2.58 (ov)	
2	-	209.8
3 β	2.56 (ov)	
3 α	2.90 (brt)	43.9
4 β	3.06 (brs)	47.1
5 β	2.01 (ov)	48.0
6 β	1.82 (ov)	
6 α	1.85 (ov)	24.5
7 β	2.08 (ov)	
7 α	1.42 (ov)	32.9
8	-	51.7
9 β	1.53 (ov)	50.6
10	-	44.1
11 α	1.50 (ov)	
11 β	1.42 (ov)	18.0
12 β	1.58 (ov)	
12 α	1.44 (ov)	31.6
13	2.68 (ov)	35.9
14a	2.30 (d, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.7
14b	1.38 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.8
17a	5.95 (brs)	
17b	5.28 (brs)	115.2
19	-	171.4
20	1.06 (s)	17.0
1'	4.01 (dq, <i>J</i> = 13.0, 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	41.5
2'	1.12 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.7
3'	1.09 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.0

4-Isobutylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**24**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**24**) (86%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -176.21 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 25**; HRESIMS m/z 394.2320 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₃H₃₃NO₃, 394.2353).

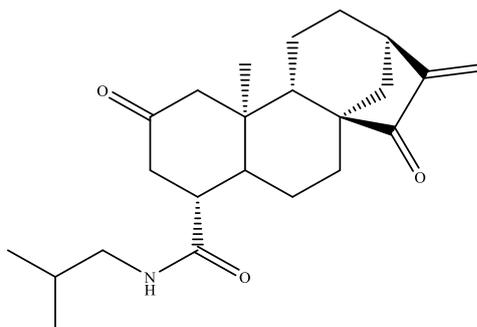


Tabella 25. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **24**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.83 (ov)	55.2
1α	2.56 (ov)	
2	-	209.8
3β	2.65 (ov)	44.0
3α	2.95 (m)	
4β	2.95 (m)	47.2
5β	2.00 (ov)	48.0
6β	1.81 (ov)	24.4
6α	1.85 (ov)	
7β	1.97 (ov)	32.9
7α	1.41 (ov)	
8	-	51.7
9β	1.54 (ov)	50.5
10	-	43.9
11α	1.52 (ov)	18.0
11β	1.40 (ov)	
12β	1.58 (ov)	31.6
12α	1.44 (ov)	
13	2.68 (brt)	35.8
14a	2.30 (brd, J = 12.1 Hz)	37.7
14b	1.38 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.8
17a	5.92 (brs)	115.1
17b	5.26 (brs)	
19	-	172.4
20	1.03 (s)	16.9
1'	3.00 (m)	48.0
2'	2.51 (ov)	28.0
3'	0.89 (d, J = 6.8 Hz)	20.2
4'	0.86 (d, J = 6.8 Hz)	20.2

4-((*R*)-1,3-Dimethylbutyl)carboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**25**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**25**) (88%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -108.73 (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 26**; HRESIMS *m/z* 422.26 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₃₇NO₃, 422.2666).

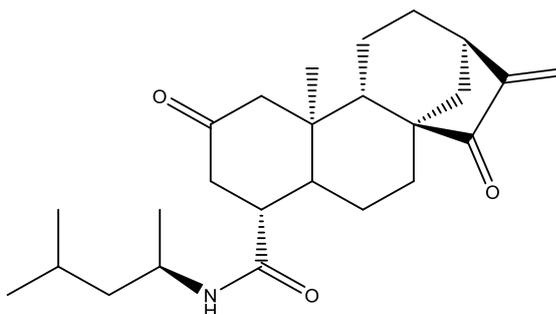


Tabella 26. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **25**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)
1β	1.93 (ov)	
1α	2.56 (m)	55.3
2	-	209.7
3β	2.68 (brt)	44.1
3α	2.91 (m)	
4β	3.08 (m)	47.2
5β	2.04 (ov)	48.1
6β	1.98 (ov)	24.7
6α	1.94 (ov)	
7β	2.02 (ov)	33.0
7α	1.40 (ov)	
8	-	51.7
9β	1.56 (ov)	50.7
10	-	44.0
11α	1.71 (ov)	18.1
11β	1.44 (ov)	
12β	1.84 (ov)	31.7
12α	1.43 (ov)	
13	2.53 (brd)	36.0
14a	2.31 (brd, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.8
14b	1.38 (ov)	
15	-	209.5
16	-	148.9
17a	5.97 (brs)	115.2
17b	5.29 (brs)	
19	-	171.4
20	1.09 (s)	17.1
1'	3.98 (ept, <i>J</i> = 7.2 Hz)	43.8
2'	1.28 (ov)	45.7
3'	1.44 (ov)	24.9
4'	0.90 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.5
5'	0.87 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.5
6'	1.11 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	21.2

4-((*S*)-1,3-Dimethylbutyl)carboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**26**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**26**) (84%) come polvere amorfa gialla: [α]_D²⁵ -98.58 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 27**; HRESIMS *m/z* 422.2690 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₃₇NO₃, 422.2666).

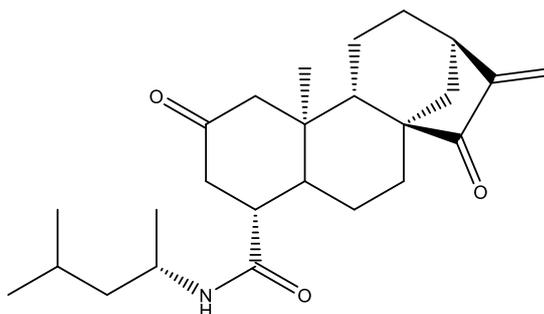


Tabella 27. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **26**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ - <i>d</i> ₁)
1β	1.91 (ov)	
1α	2.61 (m)	55.4
2	-	210.0
3β	2.64 (brt)	44.5
3α	2.94 (m)	
4β	3.08 (m)	47.4
5β	2.05 (ov)	48.5
6β	1.99 (ov)	24.6
6α	1.95 (ov)	
7β	2.02 (ov)	33.0
7α	1.39 (ov)	
8	-	51.8
9β	1.56 (ov)	50.6
10	-	44.3
11α	1.63 (ov)	18.1
11β	1.44 (ov)	
12β	1.84 (ov)	
12α	1.43 (ov)	31.7
13	2.57 (brd)	35.9
14a	2.32 (brd, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.8
14b	1.36 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.9
17a	5.97 (brs)	115.2
17b	5.29 (brs)	
19	-	171.3
20	1.06 (s)	17.1
1'	4.02 (ept, <i>J</i> = 7.2 Hz)	43.6
2'	1.26 (ov)	46.2
3'	1.44 (ov)	25.1
4'	0.91 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.6
5'	0.91 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	22.5
6'	1.08 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	20.5

4-Cyclohexylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (27)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (27) (87%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -144.85 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 28**; HRESIMS m/z 420.2543 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₅H₃₅NO₃, 420.2509).

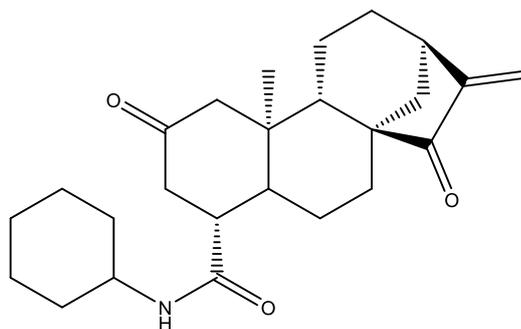


Tabella 28. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto 27.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.93 (ov)	55.3
1α	2.59 (m)	
2	-	209.7
3β	2.66 (brt)	44.1
3α	2.91 (m)	
4β	3.05 (m)	47.1
5β	2.02 (ov)	48.2
6β	1.97 (ov)	
6α	1.93 (ov)	24.5
7β	2.00 (ov)	32.3
7α	1.45 (ov)	
8	-	51.7
9β	1.58 (ov)	50.6
10	-	43.9
11α	1.77(ov)	18.0
11β	1.44 (ov)	
12β	1.84 (ov)	31.6
12α	1.43 (ov)	
13	2.55 (brd)	35.8
14a	2.33 (brd, J = 12.1 Hz)	37.7
14b	1.36 (ov)	
15	-	209.8
16	-	148.8
17a	5.95 (brs)	115.2
17b	5.28 (brs)	
19	-	171.2
20	1.06 (s)	17.0
1'	3.71 (dddd, J = 10.4, 7.8, 6.9, 3.9 Hz)	48.0
2'	1.20-1.65 (m)	32.9
3'	1.20-1.65 (m)	24.6
4'	1.20-1.65 (m)	25.4
5'	1.20-1.65 (m)	24.6

4-Phenethylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (28)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 90:10) ha dato l'ammide (28) (72%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25}$ -67.12 (c 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 29**; HRESIMS m/z 442.2321 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₇H₃₃NO₃, 442.2353).

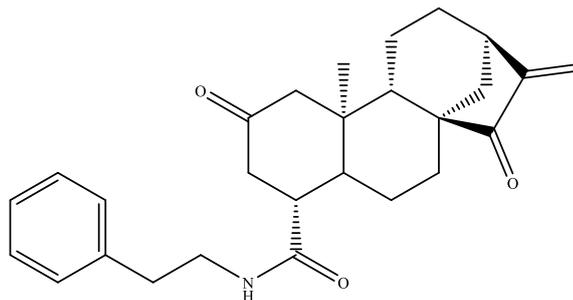


Tabella 29. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **28**.

Posizione	¹ H-NMR (CDCl ₃ -d ₁)	¹³ C-NMR (CDCl ₃ -d ₁)
1β	1.83 (d, <i>J</i> = 14.1 Hz)	55.1
1α	2.54 (dd, <i>J</i> = 13.8, 1.9 Hz)	
2	-	209.1
3β	2.64 (brt)	43.5
3α	2.88 (m)	
4β	3.06 (m)	46.8
5β	2.00 (ov)	47.4
6β	1.88 (ov)	24.2
6α	1.68 (ov)	
7β	1.96 (ov)	32.7
7α	1.39 (ov)	
8	-	51.6
9β	1.56 (ov)	50.4
10	-	43.4
11α	1.50 (ov)	17.9
11β	1.44 (ov)	
12β	1.64 (ov)	31.5
12α	1.42 (ov)	
13	2.45 (brdd)	35.8
14a	2.24 (brd, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.6
14b	1.37 (ov)	
15	-	209.7
16	-	148.7
17a	5.94 (brs)	115.0
17b	5.28 (brs)	
19	-	172.6
20	0.98 (s)	16.9
1'a	3.56 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	40.7
1'b	3.44 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 6.5, 6.5 Hz)	
2'	2.82 (dd, <i>J</i> = 6.5, 2.8)	35.0
3'	-	138.6
4'	7.18-7.32 (m)	128.5

5'	7.18-7.32 (m)	128.5
6'	7.18-7.32 (m)	126.4
7'	7.18-7.32 (m)	128.5
8'	7.18-7.32 (m)	128.5

4-Methylbenzylcarboxamide-2,15-keto-atractyligenin (**29**)

La cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con CH₂Cl₂:MeOH (97:3 → 92:8) ha dato l'ammide (**29**) (77%) come polvere amorfa gialla: $[\alpha]_D^{25} -66.44$ (*c* 0.10, CHCl₃); per i valori NMR dei singoli protoni e carboni vedere **Tabella 30**; HRESIMS *m/z* 442.2378 [M+Na]⁺ (calcolato per C₂₇H₃₃NO₃, 442.2353).

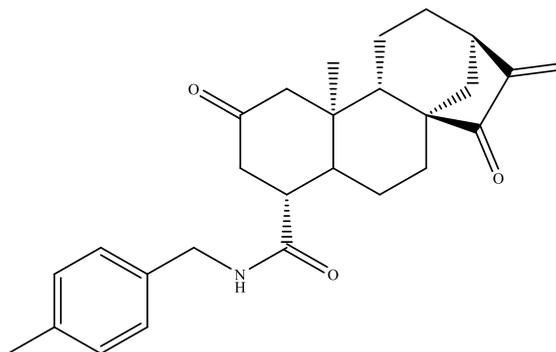


Tabella 30. Dati spettroscopici (¹H e ¹³C-NMR), espressi in ppm (in ppm), del composto **29**.

Posizione	¹ H-NMR (CD ₃ OD- <i>d</i> ₄)	¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆)
1 β	1.82 (ov)	
1 α	2.23 (brdd)	51.5
2	-	209.1
3 β	2.66 (brt)	44.6
3 α	2.23 (brdd)	
4 β	3.05 (m)	47.8
5 β	1.94 (ov)	48.6
6 β	1.88 (ov)	23.3
6 α	1.68 (ov)	
7 β	1.92 (ov)	32.8
7 α	1.39 (ov)	
8	-	51.5
9 β	1.56 (ov)	50.8
10	-	42.1
11 α	1.50 (ov)	
11 β	1.44 (ov)	17.8
12 β	1.64 (ov)	
12 α	1.42 (ov)	31.5
13	1.68 (ov)	35.9
14a	2.32 (d, <i>J</i> = 12.1 Hz)	37.2
14b	1.37 (ov)	
15	-	209.1
16	-	149.2
17a	5.88 (brs)	115.0
17b	5.32 (brs)	
19	-	173.7
20	1.02 (s)	16.3
1'a	4.42 (m)	40.2
1'b	4.37 (m)	
2'	-	136.9

3'	7.09-7.19 (m)	127.4
4'	7.09-7.19 (m)	128.7
5'	-	136.9
6'	7.09-7.19 (m)	128.7
7'	7.09-7.19 (m)	127.4
8'	2.29 (s)	20.7

3.2.3.4. Saggi per la determinazione dell'attività biologica

3.2.3.4.1. Condizioni di coltura e di trattamento delle cellule

Allo scopo di verificare la possibile attività biologica dei derivati dell'atractyligenina su cellule del cancro al colon è stata utilizzata la linea cellulare HCT116. Le cellule sono state coltivate seguendo il protocollo attualmente in uso per le cellule di mammifero. Le cellule sono state coltivate in fiasche T-75 di polistirene, materiale biologicamente inerte che permette l'ancoraggio delle cellule, utilizzando come terreno l'RPMI-1640 addizionato con FBS (Fetal Bovin Serum) al 10%, precedentemente inattivato tramite calore (56 °C per 30 minuti), 1% di L-glutammina (2 mM), antibioticoantimicotico (100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomicina and 250 ng/mL amfotericina B) per ridurre il rischio di contaminazione e rosso fenolo come indicatore per il controllo del pH. Le cellule sono state incubate in ambiente sterile a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂, queste condizioni favoriscono la crescita e la proliferazione delle cellule che mostrano la crescita in monostrato tipica della linea cellulare.

Il terreno di coltura è stato sostituito ogni due/tre giorni in modo tale da assicurare il corretto apporto di nutrienti e l'eliminazione di prodotti di scarto del metabolismo, la coltura è stata monitorata giornalmente per mezzo di microscopia ottica per verificare lo stato di salute delle cellule ed evitare fenomeni di confluenza.

Al fine di studiare gli effetti delle diverse molecole, le cellule sono state distaccate dalla fiasca mediante trattamento con soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/mL di tripsina e 1 mg/mL di EDTA) diluita in tampone fosfato salino (Phosphate buffered saline: NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4) alla concentrazione 0.25X. Le cellule, dopo distacco della superficie della piastra, sono state piastrate in piastre Petri (10⁶/5 mL di terreno) o piastre da 96 pozzetti (1x10⁴ cellule/200 µL di terreno di coltura in ogni pozzetto) a seconda del saggio da condurre. Le cellule sono state incubate per 24 h e ne è stato verificato lo stato di salute prima di effettuare i trattamenti, di modo da consentirne l'adesione alla piastra, la proliferazione ed evitare l'erronea attribuzione di effetti citotologici al composto.

Per ogni saggio è stata condotta una prova controllo costituita esclusivamente dalle cellule coltivate in presenza del solo veicolo. Per i trattamenti le cellule sono state incubate con soluzioni dei diversi derivati, utilizzando soluzioni madri preparate in DMSO. Le concentrazioni finali comprese in un intervallo da 2.5 μM a 300 μM sono state invece realizzate in terreno di coltura. Nei saggi condotti la concentrazione finale di DMSO non supera mai lo 0.01%. Il controllo è rappresentato dalle cellule incubate in presenza del solo veicolo.

3.2.3.4.2. Saggi di vitalità cellulare per MTT

Gli effetti dei derivati sintetici sulla vitalità cellulare sono stati valutati mediante saggio colorimetrico MTT. Questo tipo di saggio sfrutta il livello dell'attività metabolica delle cellule come indicazione della vitalità cellulare, poiché danni cellulari causerebbero una perdita da parte di queste di provvedere efficientemente alla crescita al fabbisogno energetico. L'MTT [2-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] è un sale di tetrazolio che viene ridotto in formazan da parte del complesso II della catena di trasporto degli elettroni detto anche succinato deidrogenasi (unico enzima del ciclo acido citrico ad essere legato alla membrana mitocondriale). Questo sistema enzimatico è attivo soltanto in cellule metabolicamente attive e quindi vitali.

L'MTT possiede una colorazione gialla, mentre il suo derivato formazan possiede una colorazione viola. Per eseguire tale saggio le cellule sono state seminate su piastre da 96 pozzetti e lasciate incubare per 24 h (ogni pozzetto contenente 1×10^4 cellule in 200 μL di terreno di coltura) per permettere la corretta proliferazione e adesione ai pozzetti della piastra. Dopo 24 h le cellule sono state trattate mediante soluzione dei derivati diterpenici in DMSO a concentrazioni comprese tra 2.5 μM a 300 μM . Il saggio MTT è stato eseguito sia a 24 h dall'inizio del trattamento sia a 48 h in maniera tale da mettere in evidenza possibili effetti tempo-dipendenti. Al termine dei trattamenti, sia a 24 h che a 48 h, 20 μL di una soluzione MTT, preparata solubilizzando il sale in PBS caldo (11 mg/mL di PBS, privo di Ca^{2+} Mg^{2+}), sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, la piastra è stata lasciata a incubare al buio per 2 h a 37 °C in atmosfera al 5% di CO_2 . Trascorso il tempo di incubazione il mezzo di coltura viene completamente eliminato e vengono aggiunti 100 μL di tampone di

lisi (*N,N*-dimetilformamide al 40%, SDS al 20%, pH 7.4), quindi la piastra viene lasciata in agitatore al fine di favorire la lisi delle cellule.

Una volta osservata la formazione di una soluzione omogenea in ogni pozzetto, la piastra viene inserita all'interno di uno spettrofotometro per piastre (ELISA) e viene misurata l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 570 nm (massimo dell'assorbanza in lysis buffer), direttamente proporzionale alle cellule vitali, e vengono utilizzati tre pozzetti come bianco del metodo. La vitalità delle cellule è stata riportata come percentuale di vitalità rispetto alle cellule controllo assumendo che l'assorbanza prodotta da quest'ultime corrisponda al 100% di vitalità. I saggi sono stati condotti in triplicato.

3.2.3.4.3. Valutazione del meccanismo di morte mediante microscopia ottica e a fluorescenza

Al fine di valutare il meccanismo di morte che si verifica nelle cellule di HCT116 a seguito del trattamento con i derivati diossidati diterpenici (**16-29**), sono state effettuate osservazioni mediante microscopia ottica e a fluorescenza. Tramite microscopia ottica sono state eseguite osservazioni nel tempo e sono state scattate delle immagini delle cellule utilizzate come controllo e delle cellule esposte al trattamento dopo 24 h dall'inizio del trattamento. Le immagini sono state acquisite con ingrandimenti 200x, in modo da poter osservare le caratteristiche morfologiche tipiche di processi di morte per apoptosi o per necrosi.

Tramite microscopia a fluorescenza è stato effettuato il saggio per l'apoptosi tramite colorazione con Hoechst33342 (2.5 $\mu\text{g/mL}$), un colorante fluorescente utilizzato per marcare il DNA. Il colorante di tipo Hoechst assorbe a lunghezze d'onda intorno a 350 nm e possiede picchi di emissione a 365 nm e a 495 nm.

Attraverso i coloranti di tipo Hoechst è possibile osservare lo stato della cromatina, grazie alla capacità di questo fluorocromo di intercalarsi nel solco minore e all'affinità per sequenze di DNA costituite da poly(d(A-T)).

Questo colorante consente di evidenziare eventuali fenomeni di condensazioni e frammentazione della cromatina dovuti a processi di pyknosis e karyorrhexis, segni distintivi del fenomeno apoptotico. Le cellule vitali mostrano invece una

colorazione ben diffusa. Al fine di effettuare il saggio con Hoechst 33342 le cellule di HCT116 sono state piastrate su piastra da 96 pozzetti, ogni pozzetto contenente 1×10^4 cellule in 200 μL di terreno di coltura è stato lasciato in incubazione per 24 h a 37 °C in una atmosfera di CO_2 al 5%. Al termine delle 24 h di trattamento le cellule vengono incubate per 30 min con il colorante Hoechst 33342.

Verificata l'avvenuta colorazione mediante microscopio a fluorescenza, il terreno viene rimosso, e si esegue un lavaggio in PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.76 mM, pH 7.4), e dopo aggiunte del terreno si procede con il trattamento delle cellule con soluzioni dei derivati in DMSO a concentrazione pari a: 2.5, 5, 7.5, 10, 15 μM per 24 h. L'acquisizione delle immagini è stata condotta tramite l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza Leica DC 300F (Leica microsystem, Wetzlar, Germany), utilizzando un ingrandimento 200x.

3.2.4. Conclusioni

In questo studio sono state riportate, per la prima volta, differenti e nuove strutture semi-sintetiche a partire dall'atractyligenina. In particolare, sono state progettate e sintetizzate diverse strutture ammidate e diossidate dell'*ent*-kaurene (**1**). Tutte le molecole sono state caratterizzate mediante tecniche mono- e bi-dimensionali NMR, mediante tecniche spettrometriche (HPLC-MS) e analisi polarimetriche. Inoltre, sono stati indagati gli effetti antitumorali delle strutture ammidate, e di quelle ossidate, su una linea cellulare di carcinoma del colon: HCT116. Si è voluto, quindi, esaminare il potenziale citotossico al fine di individuare le strutture con il maggior potenziale antitumorale e definirne la modalità d'azione. Le analisi condotte hanno dimostrato che i soli composti diossidati **16-29** determinano maggiori effetti citotossici, importanti già alla dose 10 μM , sulle cellule tumorali di colon in maniera dose-dipendente, rispetto agli starter di partenza ammidati **2-15**. I dati ottenuti, oltre a supportare la valenza biologica delle funzionalità chetoniche introdotte nelle strutture **16-29**, hanno evidenziato che alla base dell'effetto antiproliferativo mostrato vi è una riduzione della vitalità cellulare che si accompagna a morte per apoptosi.

3.2.5. Bibliografia

Armin B, Mark B (2014) Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat Prod Rep* 31:35–60.

Binefa G (2014) Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol* 20:6786-6808.

Buscemi S, Rosselli S, Bruno M, Vivona N, Piozzi F (2001) Photoinduced functionalization of C-20 methyl group in *nor*-diterpene atractyligenin. *Tetrahedron Lett* 42:8289-8291.

Buscemi S, Rosselli S, Bruno M, Vivona N, Piozzi (2003) Photoinduced functionalization of diterpenes. Transformation of the C-20 methyl of atractyligenin into a methylene-carbomethoxy or methylene-carboxamide group. *J Photochem Photobiol A: Chemistry*. 155:145-149.

Casteel DA (1992) Peroxy Natural Products. *Nat Prod Rep* 9:289–312.

Cotugno R, Gallotta D, Dal Piaz F, Apicella I, De Falco S, Rosselli S, Bruno M, Belisario MA (2014) Powerful tumor cell growth-inhibiting activity of a synthetic derivative of atractyligenin: Involvement of PI3K/Akt pathway and thioredoxin system. *Biochim Biophys Acta* 1840:1135-1144.

Dal Piaz F, Nigro P, Braca A, De Tommasi N, Belisario MA (2007) 13-Hydroxy-15-oxo-zoapatlin, an *ent*-kaurane diterpene, induces apoptosis in human leukemia cells, affecting thiol-mediated redox regulation. *Free Radic Biol Med* 43:1409–1422.

Hanson JR (2015) Diterpenoids of terrestrial origin. *Nat Prod Rep* 32:76–87.

Kang J, Tang YB, Liu Q, Guo N, Zhang J, Xiao ZY, Chen RY, Shen ZF (2016) Isolation, modification, and aldose reductase inhibitory activity of rosmarinic acid derivatives from the roots of *Salvia grandifolia*. *Fitoterapia* 112:197-204.

Li LM, Weng ZY, Huang SX, Pu JX, Li SH, Huang H, Yang BB, Han Y, Xiao WL, Li ML (2007) Cytotoxic *ent*-Kauranoids from the medicinal plant *Isodon xerophilus*. *J Nat Prod* 70:1295–1301.

Li MY, Song LH, Yue GGL, Lee JKM, Zhao LM, Li L, Zhou XN, Tsui SKW, Ng SSM, Fung KP (2017) Bigelovin triggered apoptosis in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* via upregulating death receptor 5 and reactive oxidative species. *Sci Rep* 7:42176.

Liao YJ, Bai HY, Li ZH, Zou J, Chen JW, Zheng F, Zhang JX, Mai SJ, Zeng MS, Sun HD, Pu JX, Xie D (2014) Longikaurin A, a natural *ent*-kaurane, induces G2/M phase arrest via downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 5:e1137.

Lin LZ, Zhu DS, Zou LW, Yang B, Zhao MM (2013) Antibacterial activity-guided purification and identification of a novel C-20 oxygenated *ent*-kaurane from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA. *Food Chem* 139:902–909.

Liu HC, Xiang ZB, Wang Q, Li BY, Jin YS, Chen HS (2017) Monomeric and dimeric *ent*-kauranoid-type diterpenoids from *rabdosia japonica* and their cytotoxicity and anti-HBV activities. *Fitoterapia* 118:94–100.

Monsalve LN, Rosselli S, Bruno M, Baldessari A (2005) Enzyme-catalyzed transformations of *ent*-kaurane diterpenoids. *Eur J Org Chem* 10:2106–2115.

Moradi-Afrapoli F, Asghari B, Saeidnia S, Ajani Y, Mirjani M, Malmir M, Bazaz RD, Hadjiakhoondi A, Salehi P, Hamburger M, Yassa N (2012) *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *J Pharm Sci* 20:37.

Mustacich D, Powis G (2000) Thioredoxin reductase, *Biochem J* 346:1–8.

Nagata S, Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A 1998 A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50.

Niwa T, Doi U, Osawa TJ (2003) Inhibitory activity of corn-derived bisamide compounds against α -glucosidase *Agric Food Chem* 51:90–94.

Rosselli S, Bruno M, Maggio A, Bellone G, Chen TH, Bastow KF, Lee KH (2007) Cytotoxic activity of some natural and synthetic *ent*-kauranes. *J Nat Prod* 70:347-352.

Sandalova T, Zhong L, Lindqvist Y, Holmgren A, Schneider G (2001) Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:9533–9538.

Takahashi T, Miyazawa M (2012) Synthesis and structure–activity relationships of serotonin derivatives effect on α -glucosidase inhibition. *Med Chem Res* 21:1762-1770.

Vasaturo M, Fiengo L, De Tommasi N, Sabatino L, Ziccardi P, Colantuoni V, Bruno M, Cerchia C, Novellino E, Lupo A, Lavecchia A, Dal Piaz F (2017) A compound-based proteomic approach discloses 15-ketoatractyligenin methyl ester as a new PPAR γ partial agonist with anti-proliferative ability. *Sci Rep* 7:41273.

World Health Organization (WHO). Available online: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 1 August 2022).

Xu ST, Yao H, Luo SS, Zhang YK, Yang DH, Li DH, Wang GY, Hu M, Qiu YY, Wu XM (2017) a novel potent anticancer compound optimized from a natural oridonin scaffold induces apoptosis and cell cycle arrest through the mitochondrial pathway. *J Med Chem* 60:1449–1468.

Xuan SH, Lee NH, Park SN (2019) Atractyligenin, a terpenoid isolated from coffee silverskin, inhibits cutaneous photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 194:166-173.

Zhang L, Bai B, Liu X, Wang Y, Li M, Zhao D (2011) α -Glucosidase inhibitors from Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). *Chimica alimentare* 126:203-206.

Zhen T, Wu CF, Liu P, Wu HY, Zhou GB, Lu Y, Liu JX, Liang Y, Li KK, Wang YY, Xie YY, He MM, Cao HM, Zhang WN, Chen LM, Petrie K, Chen SJ, Chen Z (2012) Targeting of AML1-ETO in t(8;21) leukemia by oridonin generates a tumor suppressor-like protein, *Sci. Transl. Med.* 4:127ra38.

Zhou GB, Kang H, Wang L, Gao L, Liu P, Xie J, Zhang FX, Weng XQ, Shen ZX, Chen J (2007) Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8;21) leukemia *in vitro* and *in vivo*. Blood 109:3441–3450.

Capitolo II

Utilizzo di estratti vegetali, metaboliti secondari e oli essenziali come biopesticidi

I prodotti vegetali rappresentano alternative efficaci ai derivati chimici sintetici e forniscono risultati molto promettenti. È ormai ampiamente riconosciuto che alcuni metaboliti secondari impiegati per il controllo di funghi, batteri, nematodi, erbe infestanti e insetti possono essere pensati e progettati in prodotti commerciali adatti per la gestione integrata dei parassiti. Gli estratti vegetali e i fitofarmaci a base di oli essenziali possono, infatti, essere altamente selettivi nel loro organismo bersaglio, e non arrecare danni agli organismi non-*target* e all'ambiente circostante. In questo secondo capitolo di tesi di Dottorato è riportato l'impiego dell'olio essenziale di una pianta ampiamente utilizzata in Sicilia, *Ridolfia segetum*, nel controllo di tre diversi parassiti: *Culex quinquefasciatus*, *Musca domestica* e *Spodoptera littoralis*. Inoltre, i bufadienolidi estratti da *Drimys panchratium* e i tre diterpeni, atractyloside, carboxyatractyloside e atractyligenina, isolati da *Chamaeleon gummifer*, sono stati testati nel controllo insetticida di *Stegobium paniceum* e acaricida del ragno rosso *Tetranychus urticae*.

4. Introduzione

Con il termine pesticida si indica una sostanza o una miscela di sostanze destinate a prevenire, distruggere, respingere o ridurre i danni causati da qualsiasi parassita (Eldridge 2008). I parassiti, in questo caso, possono essere insetti, patogeni vegetali, erbacce, molluschi, uccelli, mammiferi, pesci, nematodi (vermi del terreno che attaccano le radici delle piante e ne compromettono la produzione e la riproduzione) e microbi, che competono con l'uomo per il cibo, distruggendone e modificandone le proprietà, o che diffondono o aiutano a trasportare malattie.

I pesticidi più comunemente impiegati includono insetticidi, erbicidi, fungicidi e rodenticidi. Altri pesticidi meno noti comprendono regolatori della crescita, defoglianti per piante, disinfettanti per superfici e prodotti chimici, liquidi o solidi, per piscine. Da un'indagine effettuata nel 2015, i pesticidi sono usati maggiormente nel settore sanitario e nella prevenzione e cura delle colture agricole (Yadav et al. 2015). Infatti, trovano destinazione nella salute pubblica per uccidere i vettori di malattie trasmissibili, come le zanzare, o nella protezione delle colture agricole. Naturalmente, fatto piuttosto grave, i pesticidi risultano potenzialmente tossici per gli altri organismi non bersaglio, compreso l'essere umano. Quindi, è necessario usarli in modo sicuro e mirato.

4.1. Classificazione tossicologica dei pesticidi

Pesticida è un termine generico che caratterizza diverse classi di insetticidi, erbicidi, fungicidi, rodenticidi, conservanti per legno, prodotti chimici per giardini e disinfettanti domestici usati per uccidere o proteggere dai parassiti (Eldridge 2008). Questi pesticidi differiscono, tra loro, per le loro caratteristiche fisiche e chimiche, e per le proprietà che mostrano. Pertanto, a seconda dell'impiego, delle proprietà e del meccanismo di azione, sono classificati in differenti gruppi.

I pesticidi sintetici sono prodotti chimici artificiali e non si trovano comunemente in natura. Sono suddivisi in varie classi a seconda dell'utilizzo. Attualmente, esistono tre metodi di classificazione dei pesticidi suggeriti da Drum (Drum 1980). Questi tre metodi di ripartizione dei pesticidi comprendono:

- classificazione dipendente dal *Mode of Entry* del pesticida;
- classificazione basata sulla funzione dei pesticidi e sull'organismo nocivo che annientano;
- classificazione in base alla composizione chimica del pesticida.

4.1.1. Classificazione in base al *Mode of Entry*

Sono chiamati tutti quei prodotti con particolare o specifica modalità di ingresso nel sito bersaglio (parassita) entrandone direttamente o indirettamente in contatto. Questi includono veleni sistemici, da contatto, per lo stomaco, fumiganti, e repellenti.

4.1.1.1. Pesticidi sistemici

I pesticidi sistemici sono pesticidi che vengono assorbiti da piante o animali e trasferiti ai tessuti non trattati. L'erbicida sistemico si muove attraverso la pianta e può raggiungere aree non trattate quali foglie, steli o radici. Sono in grado di causare lo sterminio di erbe infestanti con parziale copertura via spray. Possono efficacemente penetrare nei tessuti vegetali e spostarsi attraverso il sistema vascolare della pianta uccidendo specifici patogeni. Questo tipo di prodotti vengono impiegati anche attraverso gli animali, per controllare parassiti quali larve di *Pediculus humanus capitis* (pidocchi) o *Ctenocephalides felis e canis* (pulce del gatto e del cane).

Il movimento dei pesticidi nei tessuti vegetali può essere unidirezionale o multidirezionale. Alcuni pesticidi possono muoversi solo in una direzione o verso l'alto o verso il basso all'interno della pianta, mentre altri pesticidi possono spostarsi solo verso l'alto. Se applicato alla zona della radice, viaggerà attraverso tutta la pianta, ma se applicato sulle foglie non si muoverà in tutta la pianta. Inoltre, pochi pesticidi sono considerati localmente sistemici e si spostano solo per breve distanza nella pianta trattata nel punto di contatto. Esempi di pesticidi sistemici includono l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) (1) e il glifosato (2) (**Fig. 1**) (Buchel 1983).

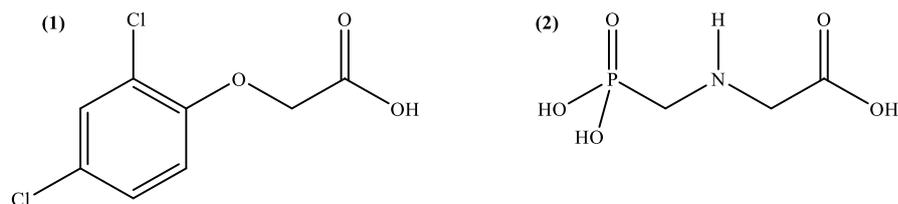


Fig. 1. Strutture chimiche dell'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) (1) e il glifosato (2).

4.1.1.2. Pesticidi non sistemici (di contatto)

I pesticidi non sistemici sono anche chiamati pesticidi di contatto in quanto agiscono prendendo di mira i parassiti quando entrano in contatto con essi. I pesticidi devono entrare fisicamente a contatto con il parassita per essere efficaci e mortali. Il pesticida entra nel corpo dei parassiti attraverso la loro epidermide e ne provoca la morte per avvelenamento. Non è comunemente detto che questi pesticidi penetrino nei tessuti vegetali e di conseguenza non sono trasportati attraverso il sistema vascolare della pianta. Esempi di pesticidi da contatto sono il paraquat (*N,N*-dimetil-4,4'-bipiridinio dicloruro) (3) e il diquat (4) (Fig. 2).

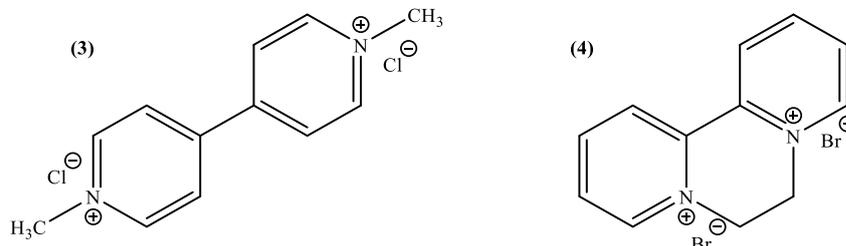


Fig. 2. Strutture chimiche del paraquat (3) e del diquat (4).

4.1.1.3. Avvelenamento attraverso lo stomaco

Il pesticida che avvelena lo stomaco entra nel corpo del parassita attraverso la bocca e dall'apparato digerente e provoca la morte per avvelenamento del patogeno. Il parassita ingerisce i suddetti veleni applicati sulle piante e sulle foglie e quindi mediante l'alimentazione avviene l'assimilazione a livello dello stomaco. Questi prodotti sono più appropriati soprattutto attraverso i batteri e trovano altresì applicazione in ambito acquatico, per esempio per l'abbattimento di zanzare (*Culex pipiens*) o per il controllo di larve di mosca soldato nera (*Hermetia illucens*). Questi

insetticidi uccidono il vettore comportando la distruzione l'intestino medio (o lo stomaco) delle larve. Un esempio è il malathion (5) (Fig. 3).

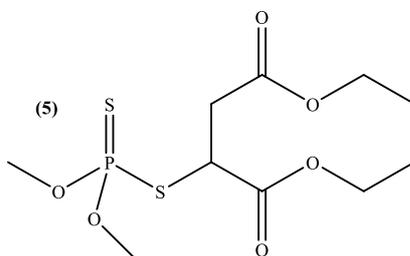


Fig. 3. Struttura chimica del malathion (5).

4.1.1.4. Fumiganti

Per fumiganti si intendono i pesticidi che agiscono o potrebbero uccidere i parassiti bersaglio mediante la fase vapore. Questi pesticidi formano dei gas velenosi quando sono applicati. I vapori entrano nel corpo del parassita attraverso il loro sistema tracheale (respiratorio), attraverso gli orifizi respiratori, e provocano la morte per avvelenamento. La maggior parte dei loro principi attivi sono liquidi quando confezionati ad alta pressione ma mutano a fase gassosa quando vengono rilasciati. Altri principi attivi, invece, sono sotto forma di liquidi volatili quando confezionati in un normale contenitore e non sono mantenuti sotto elevate pressioni. I fumiganti vengono utilizzati per rimuovere e uccidere i parassiti dei prodotti immagazzinati quali frutta, verdura e cereali. Sono anche molto utili nel controllo dei parassiti nel suolo.

4.1.1.5. Repellenti

I repellenti non uccidono, ma sono abbastanza sgradevoli da tener lontani i parassiti dalle aeree merci-immagazzinamento trattate. Interferiscono anche con la capacità dei parassiti di localizzare il raccolto.

4.2. Classificazione dei pesticidi basata sulla funzione e sull'organismo colpito

Con questo metodo, i pesticidi sono classificati in base all'organismo del parassita utilizzato come bersaglio specifico, e quindi, i vari pesticidi sono denominati con nomi specifici per riflettere l'attività svolta. La desinenza dei vari gruppi di questi pesticidi deriva dalla parola latina *caedo* (che significa uccidere), posta come suffisso dopo il nome corrispondente del parassita che si intende uccidere (**Tabella 1**). Non necessariamente, però, tutti i pesticidi terminano con il termine *-cidi*.

Alcuni pesticidi sono classificati anche in base alla loro funzione. Ad esempio: vi sono i regolatori della crescita, che stimolano o ritardano la crescita dei parassiti; i defoglianti, che vengono impiegati per far cadere le foglie alle piante; gli essiccanti, che velocizzano l'essiccazione delle erbe per la successiva raccolta meccanica o provocano l'essiccazione e la ulteriore morte degli insetti; i repellenti, che respingono i parassiti; gli attrattivi, che attirano i parassiti, di solito all'interno di una trappola; e i chemiosterilizzanti, aventi come scopo la sterilizzazione di un sesso (maschile o femminile) al fine di ottenere, con l'accoppiamento, uova non feconde.

Inoltre, esistono pesticidi che controllano più di una classe di parassiti: per esempio il carbammato *Aldicarb*, che è ampiamente utilizzato nella produzione e gestione degli agrumi in Florida, può essere considerato un acaricida, insetticida, o nematocida, perché controlla rispettivamente acari, insetti e nematodi. Un altro esempio comune è il 2,4-D, che viene adoperato come erbicida per il controllo delle infestanti a foglia larga, ma è un regolatore della crescita delle piante perenni a bassa crescita.

Tabella 1: classificazione dei pesticidi per parassiti bersaglio (modello modificato dopo Fishel and Ferrell, 2013).

Modelli di pesticidi	Target/Funzione	Esempio
Insetticida	Uccide insetti e altri artropodi	Aldicarb
Fungicida	Uccide i funghi (comprese le muffe)	Azoxystrobin
Battericida	Uccide batteri o agisce contro lo sviluppo dei batteri	Complessi rameici
Erbicida	Uccide le erbacce e le altre piante che crescono dove non desiderate	Atrazine
Acaricida	Uccide gli acari che si nutrono di piante e animali	Bifenazate
Rodenticida	Attenua la presenza di topi e/o altri roditori	Warfarin
Alghicida	Controlla o inibisce la crescita delle alghe	Solfato di rame
Larvicida	Limita la crescita delle alghe	Metoprene
Agente repellente	Respinge i parassiti per il suo sapore o a causa dell'odore	Methiocarb
Agente essiccante	Agisce sulle piante asciugandone i tessuti vegetali	Acido borico
Ovicida	Inibisce la crescita di uova di insetti e degli acari	Benzossazina
Virucida	Agisce contro i virus	Scytovirin
Molluschicida	Inibisce o uccide i molluschi causando anche gravi danni alla crescita delle piante	Metaldeide
Nematocida	Uccide i nematodi che fungono come parassiti delle piante	Aldicarb
Avicida	Uccide gli uccelli	Avitrol
Antitarmici	Ferma eventuali danni ai tessuti da parte delle larve delle terme	Diclorobenzene
Larvicida	Bersaglio sistematico per il controllo di diverse larve	Trifluorometil nitro fenol
Pescicida	Agisce contro i pesci dannosi	Rotenone
Silvicida	Agisce contro la vegetazione legnosa	Tebuthiuron
Termiticida	Sopprime la proliferazione delle termiti	Fipronil

4.3. Classificazione basata sulla composizione chimica

È una classificazione basata sul metodo più comune e utile per catalogare i pesticidi mediante la loro composizione chimica e attraverso la natura dei principi attivi. È il tipo di classificazione che fornisce le indicazioni sull'efficacia, sulle proprietà fisiche e chimiche dei pesticidi impiegati. Le informazioni sulla chimica e sulle caratteristiche fisiche di questi prodotti sono molto utile per determinare la modalità

d'applicazione, le precauzioni che devono essere prese durante l'applicazione e le quantità da impiegare. In base alla composizione chimica, i pesticidi sono classificati in quattro gruppi principali vale a dire: organoclorurati, organofosfati, carbammati, e piretrina e piretroidi (Fishel and Ferrell, 2013). In generale, i pesticidi moderni sono sostanze chimiche organiche. Includono pesticidi ottenuti sia per sintetici che di origine vegetale. Tuttavia, alcuni composti inorganici sono utilizzati ancora come pesticidi. Gli insetticidi sono tra i pesticidi più importanti e possono essere ulteriormente classificati in diverse sottoclassi. La sotto-classificazione degli insetticidi è riportata in **Fig. 4**.

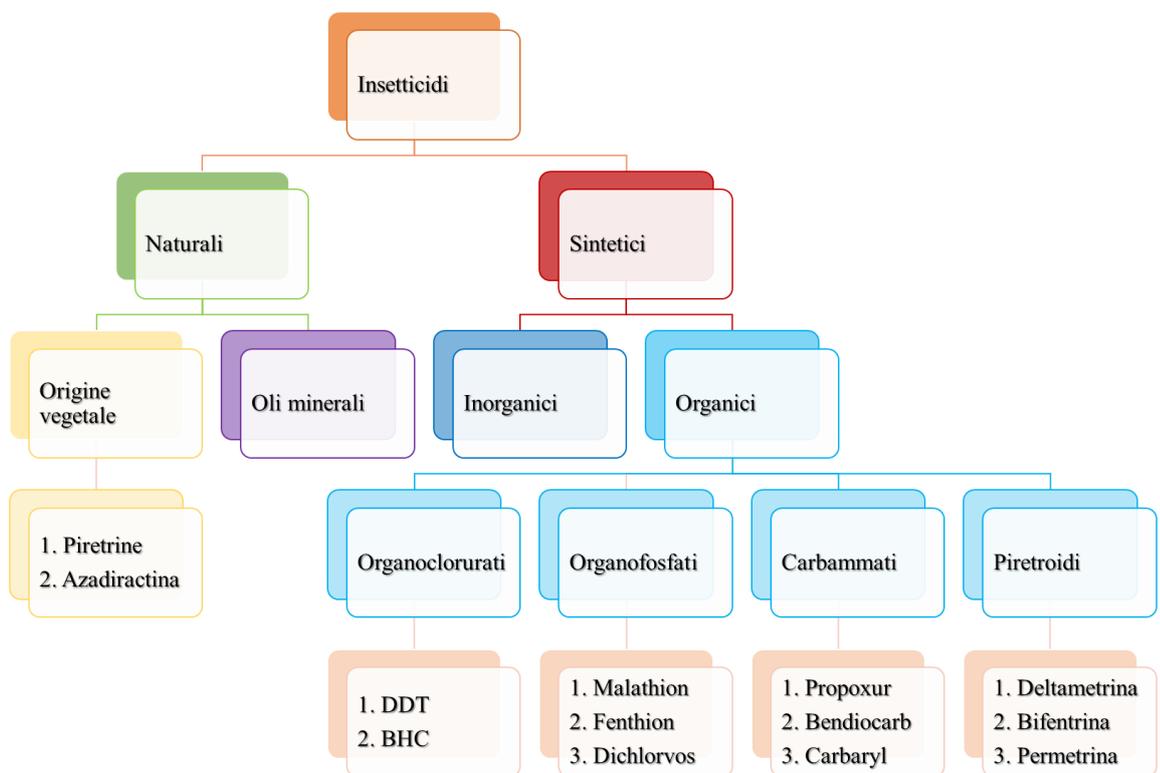


Fig. 4. Classificazione degli insetticidi.

4.3.1. Pesticidi organoclorurati

Gli organoclorurati sono un gruppo di composti organici a struttura chimica notevolmente diversificata che hanno in comune uno o più atomi di cloro nella molecola. Essi rappresentano uno dei primi gruppi di pesticidi sintetizzati e utilizzati in agricoltura e nella sanità pubblica. La maggior parte di questi sono stati ampiamente impiegati come insetticidi per il controllo di una vasta gamma di

insetti, anche se hanno un'emivita nel terreno molto lunga (anche 10 anni). Questi insetticidi possono alterare il sistema nervoso degli insetti, comportando convulsioni e paralisi, seguite da eventuale morte. Esempi più comuni di questi pesticidi includono: il DDT (6), lindano, l'endosulfano, l'aldrina, la dieldrina (7) e il clordano (Fig. 5). Anche se la produzione e l'uso del DDT è stata vietata nei paesi più sviluppati, inclusi gli Stati Uniti, è ancora adoperato nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo per il controllo di parassiti protozoi del genere *Plasmodium*.

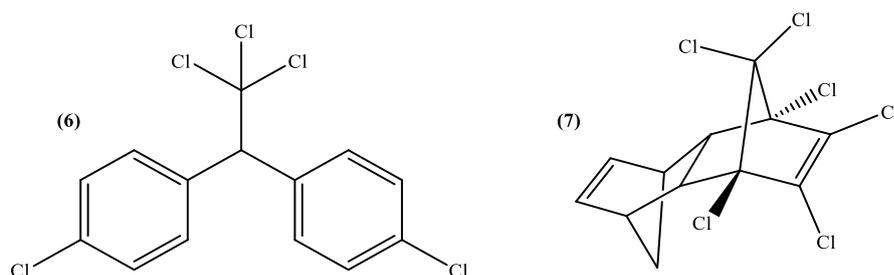


Fig. 5. Strutture chimiche del DDT (6) e della dieldrina (7).

4.3.2. Organofosfati

I pesticidi organofosfati sono considerati un gruppo di prodotti ad ampio spettro che controllano una larga gamma di parassiti grazie alle loro molteplici funzioni. Sono stati e sono tuttora ampiamente utilizzati sia come insetticidi in agricoltura che come antiparassitari sugli animali. La degradazione di queste molecole nell'ambiente ad opera di luce, batteri, umidità, è abbastanza veloce. Infatti, la maggior parte di queste molecole si degrada in un paio di settimane; tuttavia, per certe sostanze possono essere necessari diversi mesi (Martin 1968). La tossicità degli organofosfati varia molto da sostanza a sostanza: per alcuni bastano pochi milligrammi di tossico a causare la morte di un animale, mentre per altri sono necessari centinaia di milligrammi per produrre un'intossicazione. Il meccanismo di tossicità degli organofosfati è lo stesso per insetti e mammiferi: tali sostanze si legano alla colinesterasi, un enzima post-sinaptico che ha la funzione di idrolizzare l'acetilcolina (un neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale e periferico), nelle giunzioni neuronali. Questo induce un accumulo a livello sinaptico di acetilcolina che, non venendo più metabolizzata, continua a stimolare la fibra nervosa. Di conseguenza, gli impulsi nervosi non riescono a viaggiare attraverso la sinapsi

causando una rapida contrazione dei muscoli volontari, e quindi, arriva la paralisi e la morte. Alcuni pesticidi organofosforici ampiamente utilizzati sono: il parathion (8), il malatione, il diazinone (9) e glifosato (Fig. 6).

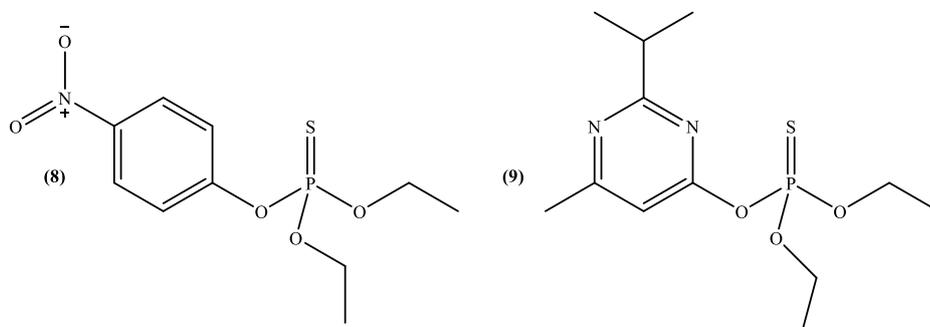


Fig. 6. Strutture chimiche del parathion (8) e del diazinone (9).

4.3.3. Carbammati

Strutturalmente, i carbammati sono simili agli organofosfati. Tuttavia, differiscono nella loro origine. Gli organofosfati sono derivati dell'acido fosforico, mentre i carbammati derivano dall'acido carbammico. I carbammati hanno più o meno lo stesso effetto degli organofosforici. In seguito al loro ingresso nell'organismo, infatti, l'enzima acetilcolinesterasi (AChE) viene carbamitato, di conseguenza reso inattivo. Il legame tra enzima e carbammato, però, non è così resistente come quello tra AChE ed organofosforici. L'enzima, infatti, viene reso di nuovo disponibile dopo qualche ora, quindi il legame che si è formato è di tipo reversibile (Drum 1980). A volte questi insetticidi sono applicati come veleni per lo stomaco e per contatto oltre che come fumiganti. Hanno un'emivita breve e possono essere facilmente degradati nell'ambiente naturale con il minimo inquinamento ambientale. Alcuni dei carbammati ampiamente utilizzati come insetticidi includono il carbaryl (10), il carbofuran, il propoxur e l'aminocarb (11) (Fig.7).

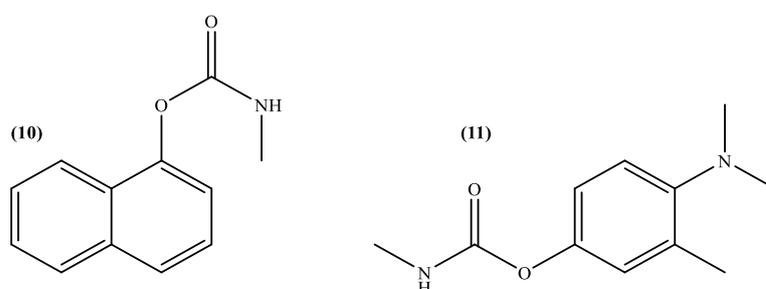


Fig. 7. Strutture chimiche del carbaryl (10) e dell'aminocarb (11).

4.3.4. Piretroidi sintetici

Gli insetticidi e acaricidi piretroidi sintetici sono un gruppo di pesticidi organici che sono stati sintetizzati duplicando la struttura delle piretrine naturali. Sono abbastanza più stabili delle piretrine naturali e hanno degli effetti residui più dilatati nel tempo. Le piretrine vengono frantumate e macinate per ottenere i componenti attivi. Le sostanze attive ad azione insetticida sono le piretrine denominate la piretrina I (12) e II, la cinerina I (13) e II e la jasmolina I (14) e II di cui la piretrina I è la più attiva (Fig. 8). Il meccanismo di azione è per contatto con un'azione neurotossica molto rapida e un'immediata paralisi. Le piretrine sono però facilmente degradabili nell'ambiente ad opera della temperatura e della luce per cui i formulati commerciali vengono miscelati a prodotti a base di oli vegetali o una sostanza specifica detta piperonilbutossido con funzione sinergizzante.

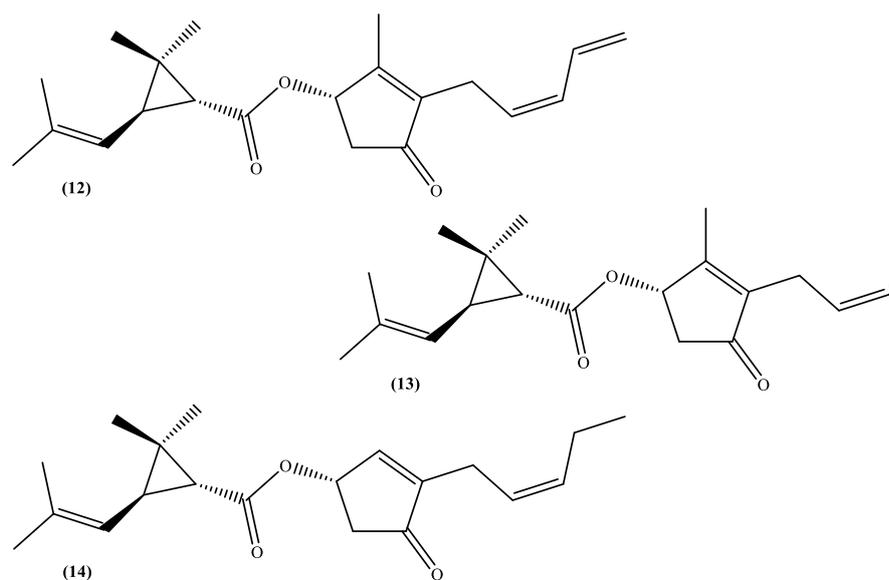


Fig. 8. Strutture chimiche della piretrina I (12), cinerina I (13) e jasmolina I (14).

I pesticidi piretroidi sintetici, invece, sono altamente tossici per insetti e pesci ma leggermente tossici per mammiferi e uccelli. Sono considerati tra gli insetticidi più sicuri per l'uomo e per l'utilizzo su frutta e verdura nel cibo. La cipermetrina (15) e la deltametrina (16) (Fig. 9) sono i piretroidi sintetici più utilizzati come pesticidi.

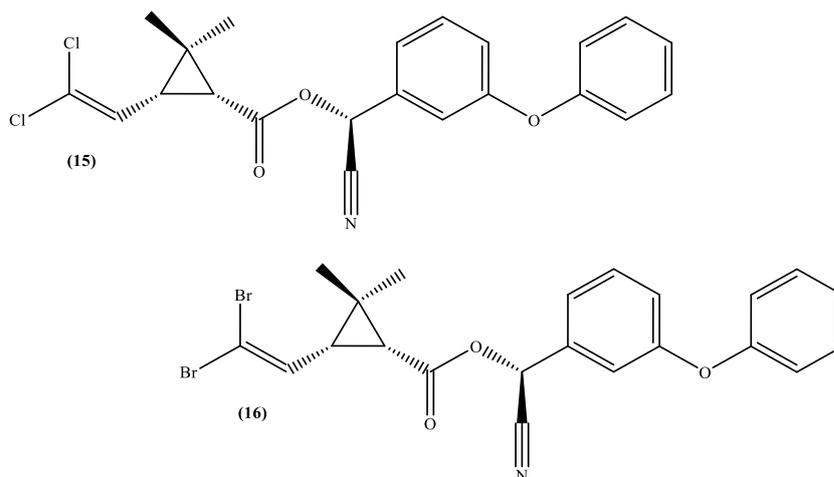


Fig. 9. Strutture chimiche della cipermetrina (15) e della deltametrina (16).

4.4. Altre classi minori

4.4.1. Classificazione in base alla modalità di azione

In base alla modalità di azione, i pesticidi sono classificati come:

4.4.1.1. Veleni fisici

Queste classi di pesticidi provocano l'uccisione di un insetto esercitando un effetto fisico. Ad esempio: argilla attivata.

4.4.1.2. Veleni protoplasmatici

Questi pesticidi sono in grado di intaccare il protoplasma e sono responsabili della precipitazione delle proteine. Esempio di questi veleni sono i cosiddetti arsenicali.

4.4.1.3. Veleni ad azione respiratoria

I veleni respiratori sono sostanze chimiche che inattivano gli enzimi respiratori. Esempio: acido cianidrico.

4.4.1.4. Agenti nervini

Questi prodotti chimici inibiscono la conduzione degli impulsi nervosi. Esempio: malathion.

4.4.1.5. Inibitori della chitina

Gli inibitori di crescita degli insetti che intervengono sull'enzima (chitina sintetasi) che presiede la sintesi della chitina (tessuto costituente l'esoscheletro), che viene rinnovata ad ogni muta larvale. Esempio: diflubenzuron.

4.4.2. Classificazione in base alle fonti di origine

Il pesticida è una sostanza chimica o biologica che mira a distruggere i parassiti o/e prevenire i danni causati dai parassiti. Sulla base della fonte d'origine, i pesticidi possono essere classificati in pesticidi chimici e biopesticidi. Il principale vantaggio dell'utilizzo dei pesticidi biologici riguarda l'*host specificity*. Questi prodotti agiscono solamente su parassiti bersaglio o su organismi fortemente collegati; mentre i pesticidi chimici sono generalmente ad ampio spettro capaci di colpire un ampio gruppo non-*target* di organismi.

I bio-pesticidi sono generalmente verdi, ecologici e rispettosi dell'ambiente così come risultano meno tossici, si decompongono più rapidamente e più facilmente e richiedono piccole quantità di impiego. I pesticidi chimici comportano normalmente gravi inquinamenti ambientali in quanto sono piuttosto tossici e non sempre biodegradabili. Un altro importante vantaggio dell'utilizzo dei bio-pesticidi è il fatto che sono meno suscettibili ai cambiamenti genetici nelle piante in cui vengono impiegati. Ciò conferma la scarsa sopravvivenza, se non nulla, dei parassiti all'azione di questi pesticidi, cosa che difficilmente si vede in caso dei pesticidi chimici. I pesticidi chimici sono già stati ampiamente discussi nella sezione 4.3. I bio-pesticidi, quindi quel gruppo di pesticidi derivanti da sorgenti naturali come animali, piante e microrganismi (batteri, virus, funghi e nematodi), sono classificati in tre importanti gruppi.

4.4.2.1. Pesticidi microbici

Il principio attivo dei pesticidi microbici è il microrganismo come batteri, funghi o protozoi. Questi pesticidi mostrano l'enorme vantaggio di replicarsi dentro l'ospite e di persistere in esso e nell'ambiente circostante per via della trasmissione verticale ed orizzontale, favorendo così la soppressione nel lungo periodo senza il bisogno di intervenire nuovamente per combattere l'organismo nocivo. Due pesticidi comuni che rientrano in questo gruppo includono il batterico sporigeno *Bacillus thuringiensis* (Bti) agente a livello intestinale nel parassita, e il *Bacillus sphaericus* (Bs). La modalità d'azione solitamente è quella di produrre una proteina che si lega al recettore intestinale larvale che causa la morte delle larve per inedia. Le tossine rilasciate da questi due batteri sono adoperate per la lotta alle larve di zanzara e alle larve di mosca nera.

4.4.2.2. Potenzianti della difesa delle piante

Questo gruppo di pesticidi sono prodotti in maniera del tutto naturale dalle piante. Tuttavia, può anche intervenire la genetica: il gene necessario per la produzione di questi corroboranti viene introdotto nella pianta attraverso l'ingegneria genetica. Quindi, il fitofarmaco prodotto dalla pianta geneticamente modificata e il materiale genetico introdotto sono definiti, insieme, come *Plant-Incorporated-Protectants* (PIPs).

4.4.2.3. Pesticidi biochimici

La terza classe è costituita dai pesticidi biochimici che comprendono sostanze naturali, i quali controllano e gestiscono un'azione antiparassitaria mediante un meccanismo non-tossico. Esempi di pesticidi biochimici sono i feromoni sessuali: sono composti chimici che riproducono i feromoni emessi dalle femmine degli insetti durante il periodo di accoppiamento, come mezzo di comunicazione tra individui della stessa specie, e vengono utilizzati nelle trappole, sotto forma di erogatori, per monitorare la presenza di insetti e nei diffusori per impedirne l'accoppiamento.

4.4.3. Classificazione basata sullo spettro d'azione

Secondo questo metodo di classificazione, i pesticidi sono classificati in due grandi gruppi, ossia come pesticidi ad ampio spettro e fitofarmaci selettivi. Quelli ad ampio spettro sono pesticidi che hanno lo scopo di uccidere una vasta gamma di parassiti, ma anche altri organismi non bersaglio. Non sono selettivi e sono spesso letali per rettili, pesci, animali domestici e uccelli. Alcuni esempi di pesticidi ad ampio spettro sono il clorpirifos, un pesticida organofosfato usato per uccidere dei parassiti tra cui insetti e vermi, e il clordano, utilizzato per il trattamento delle termiti di circa 30 milioni di case fino a quando non è stato vietato nel 1988.

I pesticidi selettivi, d'altra parte, sono quei prodotti che uccidono solo uno specifico organismo o gruppo di parassiti, lasciando inalterati altri gruppi di insetti. Un buon esempio di pesticida selettivo è 2,4-D utilizzato contro le erbe infestanti di latifoglie lasciando le colture agricole completamente inalterate.

4.4.4. Classificazione basata sulla formulazione

Per formulazione si intende la miscela del principio attivo (PA) e gli ingredienti inerti. I principi attivi sono sostanze chimiche che mirano a controllare l'obiettivo parassitario, mentre gli ingredienti inerti (come acqua, solventi, agenti bagnanti, spargitori in polvere, adesivi, estensori) sono i materiali aggiunti al PA in modo da rendere il pesticida più sicuro, più efficace e più facile da miscelare e applicare. Sono anche più indicati nella gestione e nell'uso.

Un gruppo di pesticidi può essere miscelato con altri ingredienti non di tipo fitosanitario o utilizzato in combinazione con altri principi attivi per produrre pesticidi mirati o ad ampio spettro d'azione. In genere, un gruppo di pesticidi è combinato con altri biocidi in modo tale da aumentarne l'efficacia e l'azione, riuscendo anche a controllare più parassiti in una singola dose d'applicazione.

Le formulazioni dei pesticidi possono essere suddivise in tre tipi principali: solidi, liquidi e gassosi. Alcune formulazioni sono vendute pronte per l'uso, mentre altre necessitano di una diluizione con acqua o con un solvente organico, o aria (come aria compressa o attrezzature nebulizzanti ULV) prima della loro applicazione.

Le formulazioni più comunemente impiegate sono elencate nelle seguenti paragrafi:

4.4.4.1. Liquidi

Queste formulazioni consistono in soluzioni oleose concentrate di pesticidi combinati con un emulsionante per consentire un'ulteriore miscelazione con acqua. Gli emulsionanti sono prodotti tensioattivi che consentono la sospensione di gocce d'olio molto piccole in acqua per formare un'emulsione. L'utilizzo dell'emulsione permette il controllo sistematico del vettore principio attivo impiegato per la gestione parassitaria.

4.4.4.2. Polveri

In genere i sistemi in polvere sono formulazioni finemente macinate. Le polveri secche sono composte da PA mescolati con altri elementi per aiutarne la miscelazione e la dispersione. Sono di due tipi: polvere bagnabile e solubile.

Le polveri bagnabili sono progettate per essere miscelate con un liquido, solitamente acqua, per un'applicazione che richiede attrezzatura a spruzzo. Sono generalmente miscelati e combinati con acqua al fine di ottenere un impasto liquido ottimo da spargere mediante l'ausilio di un atomizzatore, richiedendo quindi una continua agitazione. Queste polveri possono essere utilizzate per fronteggiare la maggior parte dei problemi causati dai parassiti, ma soprattutto con la maggior parte delle apparecchiature mobili di spruzzatura di antiparassitari presenti in commercio.

Le polveri solubili sono simili alle polveri bagnabili, tranne per il fatto che il principio attivo, così come il solvente diluente e tutti gli ingredienti necessari per ottenere il formulato sono completamente solubili in acqua. Gli impieghi delle polveri solubili sono praticamente simili a quelli delle polveri bagnabili.

4.4.4.3. Granulati

In questa formulazione, il principio attivo viene miscelato con varie argille inerti al fine di ottenere sistemi particellari di varie dimensioni. La dimensione dei granuli

impiegati, di solito, varia da 20 a 80 mesh. Le formulazioni granulari sono preparate per l'applicazione diretta e richiedono attrezzature di spargimento specializzate. Possono essere applicati dall'aria o dal terreno. Possono essere dispersi con piccole unità elettromeccaniche, o semplicemente sparse a mano (con apposite protezioni personali). Queste formulazioni sono particolarmente utili nel trattamento delle larve di zanzara in luoghi dove sarebbe fitta la vegetazione evitando inoltre che l'insetticida raggiunga e si depositi in ambiente acquoso.

4.4.4.4. Esche

Le esche contengono principi attivi che vengono mescolati con un alimento per parassiti o che funge da attrattivo. I principali usi delle esche includono il controllo dei parassiti domestici come formiche, topi, ratti, scarafaggi e mosche. Sono anche usati all'aperto per controllare gli uccelli, le formiche, le lumache, e vari tipi di parassiti agricoli come grilli e cavallette.

4.4.4.5. Nebulizzatori ULV (Ultra basso volume).

L'attrezzatura nebulizzante viene utilizzata principalmente per l'applicazione di disinfettanti, biocidi, fungicidi e pesticidi. I nebulizzatori generano uno spray formato da goccioline di volume ultra-basso (ULV) di 5-50 micron (μm) di diametro. Gli studi dimostrano che le goccioline di queste dimensioni sono ideali per il controllo di agenti patogeni, vettori di vettori e parassiti.

Inoltre, le formulazioni possono essere applicate a concentrazioni del 10-90% e portate fino a 1 litro al minuto (60 litri all'ora), rendendole più efficienti nello spettro del diametro mediano del volume (VMD). L'atomizzazione ULV funziona comprimendo i disinfettanti attraverso un ugello appositamente progettato, creando una sottile nebbia fredda o aerosol. Le versioni portatili elettriche sono particolarmente ideali per applicazioni indoor in quanto non producono fumi di scarico e sono meno rumorose. Queste macchine per nebulizzazione ULV possono applicare soluzioni a base di olio e acqua.

4.4.5. Classificazione basata sulla tossicità dei pesticidi

È una classificazione basata sul rischio per la salute associato all'impiego dei pesticidi e all'azione tossica degli stessi. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raggruppa i pesticidi in quattro categorie (Eddleston et al. 2002). L'OMS, conducendo esperimenti *in vivo*, somministrando quindi diverse dosi di pesticida, per via orale e cutanea, su ratti e altri animali da laboratorio, ha stimato la dose LD₅₀ o "Dose Letale 50", che si riferisce alla dose di una sostanza, somministrata in una volta sola, in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione di cavie. Le diverse classi, dalla tossicità minima alla più letale, sono indicate con i numeri romani da I a IV, e indicano, separatamente, estremamente tossico, altamente tossico, moderatamente tossico, e leggermente tossico (**Tabella 2**).

Tabella 2. Classificazione dei pesticidi in base alla tossicità.

Classificazione WHO	Tossicità	LD ₅₀ su ratto		Esempio
		(mg/kg per peso corporeo)		
		Via orale	Via cutanea	
Classe Ia	Estremamente tossico	<5	<50	Parathion, Dieldrin
Classe Ib	Altamente tossico	5-50	50-200	Eldrin, Dichlorvos
Classe II	Moderatamente tossico	50-2000	200-2000	DDT, Chlordane
Classe III	Leggermente tossico	>2000	>2000	Malathion
Classe IV	Non presenta pericolo alle dosi consigliate	>5000		Cyprothrin

4.5. Effetti dei pesticidi

Nonostante i risultati benefici e i progressi sull'impiego dei pesticidi in agricoltura e ambito del settore della salute pubblica, il loro utilizzo risulta purtroppo dannoso per l'uomo e per l'ambiente circostante (fauna e flora). I pesticidi occupano una posizione particolare tra i contaminanti ambientali a causa della loro attività biologica e per la loro tossicità. La maggior parte dei fitofarmaci di questo tipo, non distingue i vari parassiti e altre forme di vita, non risulta selettivo e quindi ha un'azione tossica ad ampio spettro. Risultano, perciò, potenzialmente dannosi per l'uomo, gli animali, per gli altri organismi viventi e per ambiente confinante se utilizzati in modo errato. Si stima che circa 5000 - 20.000 persone sono morte a

causa dei loro effetti e un range compreso tra le 500.000 unità fino ad 1 milione di persone, sono avvelenate ogni anno dai pesticidi (FAO/WHO 2000; Yadav et al. 2015). Almeno la metà delle persone intossicate e circa il 75% di quelli che muoiono a causa di pesticidi fa parte del comparto dei lavoratori agricoli. Il resto delle persone ammalate, ha subito intossicazione a causa del nutrimento attraverso cibo contaminato.

4.5.1. Impatto sulla salute umana

I pesticidi possono entrare nel corpo umano attraverso l'inalazione di aria inquinata, o attraverso la polvere e l'aerosol che contengono residui fitosanitari, attraverso l'esposizione orale diretta o consumando cibo e acqua contaminati o attraverso l'esposizione cutanea per contatto diretto (Sacramento 2008). I pesticidi vengono applicati sul cibo, in particolare sulla frutta e sulla verdura, si disperdono nei terreni e nelle falde acquifere andando a contaminare le acque potabili e in fase vapore i prodotti antiparassitari possono inquinare l'aria e propagarsi anche per lunghe tratte. La tossicità di queste sostanze chimiche e la durata nell'esposizione determinano il grado di impatto nocivo sulla salute umana (Lorenz 2009). La tossicità delle sostanze chimiche dipende dalla natura chimica della sostanza tossica, delle parti del corpo umano esposte (orale, dermica e per inalazione), dalla dose e dall'organismo interessato.

La tossicità può essere acuta o cronica. La tossicità acuta è la capacità di una sostanza di provocare effetti nocivi che si sviluppano rapidamente in seguito all'assorbimento, cioè poche ore o un singolo giorno. La tossicità cronica è la capacità di una sostanza di causare effetti nocivi per la salute derivanti da un'esposizione a lungo termine. La tossicità degli insetticidi è comunemente espressa in termini di dose letale 50 (LD₅₀) o concentrazione letale 50 (LC₅₀).

LD₅₀ è la quantità di sostanza tossica che effettivamente entra nell'organismo (si distingue per tipologia, cioè per via orale, per iniezione, ecc.) in grado di provocare la morte del 50% degli organismi utilizzati in prova. In altre parole, se l'effetto del tossico considerato è la morte dei soggetti esposti, si ha la cosiddetta Dose Letale

(LD in inglese), rapportata a zero, 50 o 100. Si ha una LD₅₀ quando la metà degli esposti muore. È espresso in milligrammi per chilogrammo di peso corporeo.

LC₅₀ è la concentrazione che provoca la morte del 50% degli organismi utilizzati in prova dopo periodi di tempo specifici, dove la popolazione è geneticamente omogenea. È espressa in parti per milione (ppm).

4.5.2. Effetto acuti

Gli effetti nocivi che si verificano da una singola esposizione, per via orale o anche per via cutanea, sono definiti "effetti acuti". Le quattro vie di esposizione sono: cutanea (pelle), inalazione (polmoni), orale (bocca) e occhi. La tossicità acuta è fissata esaminando la tossicità cutanea, la tossicità per inalazione e la tossicità orale a cui sono soggetti animali di prova. Inoltre, vengono esaminate anche l'irritazione degli occhi e della pelle. Questo tipo di tossicità compare generalmente poco tempo dopo il contatto o l'esposizione al pesticida. Deriva dalla presenza di pesticidi nei campi agricoli, o dall'esposizione ai pesticidi durante l'applicazione o per avvelenamento intenzionale (Dawson et al. 2010; Lee et al. 2011). Svariati sintomi come mal di testa, dolori muscolari, eruzioni cutanee, scarsa concentrazione, nausea, vertigini, alterazione visiva, crampi, attacchi di panico, e nei casi più gravi la morte, si verificano a causa dell'avvelenamento da pesticidi (**Tabella 3**).

Circa 3 milioni di casi di tossicità acuta, dovuta ai pesticidi, sono segnalati ogni anno in tutto il mondo. Di questi 3 milioni di casi di avvelenamento da pesticidi, 2 milioni sono tentativi di suicidio e il resto di questi sono casi di avvelenamento professionale o accidentale (Singh et al. 2013).

4.5.3. Effetto cronico

Gli effetti cronici sono eventuali effetti nocivi che si verificano a causa di piccole dosi ripetute per un periodo di tempo. Sospetti effetti cronici da esposizione a determinati pesticidi includono difetti alla nascita, tossicità per il feto e formazioni di tumori benigni o maligni, alterazioni genetiche, malattie del sangue, disturbi nervosi, disturbi endocrini ed effetti sulla riproduzione.

Tabella 3. Sintomi generici dovuti all'avvelenamento da pesticidi.

Avvelenamento lieve	Avvelenamento moderato	Avvelenamento severo
Sintomi	Uno qualsiasi dei sintomi lievi, seguito da:	Uno qualsiasi dei sintomi moderati, seguito da:
<ul style="list-style-type: none"> • Irritazione al naso, gola, occhi e alla pelle • Mal di testa • Vertigini • Perdita di appetito • Sete • Nausea • Diarrea • Eccessiva sudorazione • Debolezza o affaticamento • Irrequietezza • Nervosismo • Insonnia • Cambiamento di umore 	<ul style="list-style-type: none"> • Vomito • Eccessiva salivazione • Tosse • Sensazione di costrizione alla gola • Crampi addominali • Offuscamento della vista • Eccessiva sudorazione • Debolezza • Tremito • Incoordinazione muscolare • Confusione mentale 	<ul style="list-style-type: none"> • Incapacità di respirare • Eccessivo catarro e muco • Rimpicciolimento delle pupille • Ustioni chimiche sulla pelle • Aumento della frequenza respiratoria • Perdita di riflessi • Contrazioni muscolari incontrollate • Incoscienza • Morte

La tossicità cronica dovuta a un pesticida è più difficile da determinare della tossicità acuta, attraverso semplici analisi di laboratorio. Si è visto che l'esposizione continua e ripetuta a quantità di pesticidi letali, per un lungo periodo di tempo (possono essere diversi anni fino a decenni), provoca malattie croniche nell'uomo (PAN 2012). I sintomi non si notano immediatamente ma possono comparire in una fase successiva. Più comunemente, gli studi hanno dimostrato come gli operatori del settore agricolo sono coloro che risultano maggiormente a un rischio. Tuttavia, c'è pari possibilità che la gente comune sia colpita soprattutto a causa di cibo e acqua contaminati o a causa della diffusione dei pesticidi dai campi alle città (PAN 2012). Recentemente diversi studi hanno stabilito un legame tra l'esposizione ai pesticidi e l'incidenza di malattie croniche umane che colpiscono il sistema nervoso, riproduttivo, renale, cardiovascolare e respiratorio (Mostafalou and

Abdollahi, 2012). Alcune delle malattie croniche più comuni, dovute alla lunga esposizione ai pesticidi, sono riportate nella Tabella 4.

Tabella 4. Malattie croniche comuni da pesticidi.

Malattie	Riferimenti
Cancro (al cervello, ai reni, alla prostata, leucemia)	Lee et al. 2005; Shim et al. 2009; Heck et al. 2010; Xu et al. 2010; Band et al. 2011; Cocco et al. 2013
Malattie neurodegenerative inclusi Parkinson e Alzheimer	Elbaz et al. 2009; Hayden et al. 2010; Tanner et al. 2011
Malattie cardio-vascolari	Abdullah et al. 2011; Andersen et al. 2012
Diabete di tipo II	Son et al. 2010
Disturbi riproduttivi e infertilità	Petrelli and Mantovani 2002; Greenlee et al. 2003
Difetti congeniti	Winchester et al. 2009; Mesnage et al. 2010
Squilibri ormonali compresa l'infertilità e dolore al seno	Xavier et al. 2004
Malattie respiratorie (asma, malattia polmonare ostruttiva cronica)	Chakraborty et al. 2009; Hoppin et al. 2009

4.5.4. Impatti sull'ambiente

L'estensiva applicazione e il successivo smaltimento dei pesticidi da parte degli agricoltori, delle istituzioni e del pubblico in generale, possono creare numerose possibili fonti di inquinamento da pesticidi nell'ambiente. È quasi impossibile limitare l'area in cui agiscono o hanno effetto i pesticidi. Anche se applicato su un'area molto piccola, il biocida si diffonde nell'aria, viene assorbito nel terreno o si dissolve nell'acqua ed eventualmente può propagarsi su un'area molto più ampia. I pesticidi una volta rilasciati nell'ambiente possono subire molteplici destini diversi. Quando i pesticidi sono spruzzati sui raccolti, potrebbero farsi strada nell'aria e finire in altre parti, come nel suolo o nell'acqua. Pesticidi che sono applicati direttamente sul terreno possono essere lavati via e raggiungere la superficie vicina attraverso enti idrici o attraverso il deflusso superficiale o possono filtrare nel suolo e giungere negli strati inferiori o nelle falde acquifere (Vickerman 1988). Gli effetti dei pesticidi sull'ambientale possono variare, quindi, da una minore alterazione rispetto al normale funzionamento dell'ecosistema fino alla perdita della

diversità delle specie animali e vegetali. A volte, l'uso di pesticidi può causare effetti residuali a lungo termine provocando anche effetti letali. Ad esempio, la maggior parte dei pesticidi organoclorurati, che risultano persistenti nell'ambiente per lungo tempo, comportano generalmente conseguente contaminazione delle falde acquifere, delle acque superficiali, dei prodotti alimentari, dell'aria e del suolo.

4.5.5. Impatti sugli organismi non bersaglio

La maggior parte degli insetticidi, una volta applicati, uccidono i parassiti; possono però anche essere colpiti organismi non *target* come lombrichi, altri predatori naturali e impollinatori (Ware 1980). Le applicazioni degli antiparassitari possono causare il declino delle popolazioni di lombrichi. Per esempio, gli insetticidi a base di carbammato sono molto tossici per i lombrichi ed è stato dimostrato che gli organofosfati riducono le popolazioni di lombrichi (Edwards 1987). Purtroppo, i predatori naturali (essenziali per controllare il livello di popolazione di parassiti) sono i più suscettibili agli insetticidi e sono gravemente colpiti (Vickerman 1988). La riduzione numerica di questi predatori naturali può esacerbare i problemi legati agli agenti parassitari. I pesticidi, quindi, possono anche influenzare il comportamento dei predatori e i diversi parametri inclusi il tasso di crescita, il tempo di sviluppo e altre funzioni riproduttive. Ultimamente sono stati impiegati impollinatori come api, moscerini della frutta, alcuni coleotteri e diversi uccelli, come bioindicatori dei processi ecosistemici per capire come le loro attività sono influenzate dallo stress ambientale causato dall'applicazione di pesticidi e dalle modifiche dell'habitat naturale (Kevan 1999). L'utilizzo di pesticidi può anche causare la perdita diretta di insetti impollinatori e perdite indirette degli stessi per lo sviluppo delle colture (Fishel and Ferrell, 2013).

4.5.6. Perdita della biodiversità

La biodiversità è spesso considerata come una misura di un sistema biologicamente sano. Più è elevato il numero di organismi che vivono in equilibrio in un dato ambiente, e più sano è l'ambiente. Un ambiente variegato sostiene molti tipi di forme di vita, tutte interdipendenti tra loro. Questi possono variare da microbi a

insetti come formiche, scarafaggi e vespe, uccelli, fino a grandi animali come l'elefante e predatori come volpi, lupi, cani selvatici, leoni, tigri e orsi. Un tale sistema ha la capacità di mantenere il suo equilibrio in modo che nessuna specie diventi dominante. A volte, il parassita può anche essere benefico per il sistema biologico consumando e controllando altri simili. Pertanto, l'eliminazione anche di singole specie mediante l'uso di pesticidi, può causare cambiamenti significativi e può comportare anche molti altri cambiamenti, come l'estinzione dell'equilibrio raggiunto in quell'ambiente. In alcuni casi, un pesticida può eliminare una specie essenziale per il funzionamento dell'intera comunità, oppure può promuovere il predominio di specie indesiderate o può semplicemente diminuire il numero e la varietà delle specie presenti nella comunità. Questo potrebbe interrompere le dinamiche alimentari nel sistema ambiente e interrompendo le relazioni che intercorrevano tra le varie specie.

4.5.7. Impatti sulla microflora del suolo

Una parte importante dei pesticidi non bersaglio per applicazioni agricole possono accumularsi nel suolo. Inoltre, l'indiscriminato e il ripetuto uso dei pesticidi aggrava questo accumulo nel suolo. Le proprietà e la microflora del suolo, colpiti dall'azione pesticida, possono subire processi degradativi, di trasporto e di adsorbimento/desorbimento (Hussain et al. 2009). I pesticidi degradati interagiscono con il suolo e con i microrganismi in esso presenti, alterandone così la diversità microbica, le reazioni biochimiche e le attività enzimatiche (Hussain et al. 2009; Munoz-Leoz et al. 2011). Qualsiasi alterazione della diversità microbica e della biomassa del suolo alla fine porta al disturbo dell'intero ecosistema e, come conseguenza, la perdita di fertilità del suolo. L'applicazione dei biocidi può anche inibire o uccidere alcuni gruppi di microrganismi (Hussain et al. 2009). Può anche influenzare negativamente i processi vitali, reazioni biochimiche, inclusa la fissazione dell'azoto, la nitrificazione e l'ammonificazione, attivando/disattivando specifici microrganismi del suolo e/o enzimi (Hussain et al. 2009; Munoz-Leoz et al. 2011). È stato anche segnalato che i pesticidi influenzano la mineralizzazione della materia organica del suolo, che è una proprietà chiave del suolo, determinandone qualità e produttività.

4.5.8. Impatti sull'ecosistema dell'acqua e dell'aria

I residui di pesticidi nell'acqua sono una delle principali preoccupazioni in quanto rappresentano un problema serio per minaccia che creano alle comunità biologiche, compresi gli esseri umani. Ci sono diversi modi in cui i pesticidi possono entrare nell'acqua come fuoriuscite accidentali, effluenti industriali, deflusso superficiale e trasporto da suoli trattati con pesticidi, lavaggio delle apparecchiature di spruzzatura dopo l'applicazione, deviazione sugli stagni, laghi, corsi d'acqua e acqua di fiume, etc., (Singh and Mandal, 2013).

I pesticidi generalmente si diffondono dai campi ai vari serbatoi d'acqua per deflusso o per drenaggio indotto dalla pioggia o dall'irrigazione (Larson et al. 2010). Allo stesso modo, la presenza di pesticidi nell'aria può essere causata da una serie di fattori, tra cui lo spargimento mediante spruzzo, la volatilizzazione dalle superfici trattate e l'applicazione aerea dei fitofarmaci. L'entità dello spargimento dipende da: dimensione delle goccioline e velocità del vento. Il tasso di volatilizzazione dipende dal tempo dopo il trattamento, la superficie trattata e in cui si deposita la miscela, la temperatura ambiente, l'umidità, la velocità del vento e la pressione di vapore dei composti impiegati. La volatilità o la natura volate dei composti antiparassitari costituisce allo stesso modo un importante rischio di inquinamento atmosferico delle grandi città (Trajkovska et al. 2009).

4.5.9. Sostenibilità ambientale: pesticidi e protezione fitosanitaria

Uno dei concetti chiave dell'epoca contemporanea è quello della sostenibilità ambientale. Il concetto di sostenibilità è legato intrinsecamente a quello di tutela dell'ambiente, ma negli ultimi anni ha vissuto una profonda evoluzione: si è partiti da una visione centrata quasi esclusivamente sugli aspetti ecologici, per approdare a un significato più ampio che considera, oltre alla dimensione ambientale, anche quella economica e sociale.

Il termine "sostenibilità" è stato introdotto nel corso della prima Conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente del 1972, per poi essere codificato nel 1987, con la pubblicazione del cosiddetto rapporto Brundtland (<https://sustainabledevelopment.un.org/milestones/wced>). Il documento definisce

come sostenibile un modello di sviluppo in grado di soddisfare i bisogni del presente senza compromettere la capacità delle generazioni future di soddisfare i propri. Una definizione nata dalla presa di coscienza che le risorse del pianeta non sono infinite, vanno preservate con cura, senza sprechi, rispettando ecosistemi e biodiversità.

Il significato di sostenibilità ambientale indica quindi uno degli aspetti chiave del concetto più ampio di sviluppo sostenibile, dal quale nascono tutte le azioni che possono essere introdotte da istituzioni, aziende, singole persone.

Nel settembre del 2015, l'Onu ha delineato un piano d'intervento definendo con l'Agenda 2030 i 17 Obiettivi di sviluppo sostenibile (Sustainable Development Goals, SDG) (<https://sdgs.un.org/topics/biodiversity-and-ecosystems>): un quadro di azioni e di target per migliorare la vita delle popolazioni di tutto il mondo e salvaguardare gli ecosistemi della Terra.

A partire dagli anni '90, quindi, non solo i governi hanno iniziato ad adottare normative di salvaguardia e strumenti per valutare l'impatto delle attività industriali e di produzione di beni e servizi, ma anche le aziende e i singoli cittadini hanno iniziato a fare la propria parte. In particolare, le filiere produttive hanno consolidato l'adozione di politiche ambientali che si traducono in esempi di sostenibilità ambientale sempre più diffusi, come:

- adozione delle migliori tecnologie e pratiche sulla base dei principi dell'economia circolare;
- conservazione e tutela del territorio e della biodiversità;
- promozione delle fonti di energia rinnovabile e impiego efficiente delle risorse;
- riciclo e gestione ottimale dei rifiuti (un esempio pratico in quest'ambito è il progetto "ZERO. Verso un mondo senza plastica", promosso nella nostra azienda per azzerare l'uso della plastica monouso in tutte le sedi in Italia);
- promozione della mobilità sostenibile;
- sviluppo di tecnologie innovative per l'ambiente.

I prodotti fitosanitari, quali i pesticidi, hanno un ruolo importante nell'aiutare le istituzioni e le aziende a raggiungere gli obiettivi in materia di prevenzione, sostenibilità e sicurezza alimentare. I prodotti fitosanitari sono estremamente essenziali in agricoltura e nella silvicoltura per la protezione delle colture e delle altre piante da parassiti e malattie. Tuttavia, come già sottolineato nei paragrafi precedenti, l'uso eccessivo e l'utilizzo improprio dei pesticidi, possono avere un impatto negativo sul suolo, sulle risorse idriche e sulla biodiversità agricola. Questi possono anche comportare effetti negativi sulla salute delle piante, degli animali e dell'uomo. L'uso dei prodotti fitosanitari è pertanto fortemente regolamentato dalle norme dell'UE in materia di pesticidi (https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_en).

Nel quadro della strategia “Dal produttore al consumatore” (https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en), uno dei pilastri centrali del “*Green Deal* europeo” (https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en), la Commissione europea fissa obiettivi più ambiziosi per l'uso sostenibile dei pesticidi. Una di queste ambizioni è che entro il 2030 l'uso e il rischio di sostanze chimiche e dei pesticidi più pericolosi nell'UE siano ridotti del 50%. La politica agricola comune (PAC) è una pietra angolare dell'uso sostenibile dei pesticidi in agricoltura e aiuta gli agricoltori a proteggere la salute delle loro colture e a mantenere le rese, tutelando allo stesso tempo gli ecosistemi agricoli.

Da un punto di vista statistico, molti autori (Alavanja 2009; Morshed 2013; Allsop et al. 2015) hanno dimostrato come il consumo di pesticidi sintetici sia aumentato negli anni. Circa 1.8 miliardi di persone sono coinvolte nel mondo agricolo e la maggior parte di questi utilizza pesticidi principalmente per proteggere i raccolti e i prodotti agricoli. Gli Stati Uniti consumano più di 1 miliardo di libbre di pesticidi all'anno e 5.6 miliardi di libbre sono consumate in tutto il mondo. La conseguenza diretta di questo sistema comporta avvelenamento accidentale di circa 25 milioni di persone che lavorano nel settore agricolo. Per evitare queste conseguenze orribili, i pesticidi organici naturali potrebbero essere un'alternativa ai pesticidi sintetici. I pesticidi naturali sono definiti come prodotti naturali che funzionano come killer o

repellenti per ridurre, distruggere e uccidere parassiti come insetti, funghi, erbacce e altri organismi indesiderati che colpiscono la salute umana, le colture agricole e anche l'ambiente (<http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/pi-ip/ir-di-eng.php>; <http://www.cata-farmworkers.org/Harmful>). Questo argomento è estremamente importante al fine di valutare l'efficacia dei pesticidi organici naturali sugli insetti, la loro sostenibilità e il loro impiego in materia di salvaguardia della vita e dell'ambiente circostante.

4.6. Prodotti naturali vegetali come fonte di sviluppo di insetticidi *eco-friendly*

Le piante terrestri producono un'impressionante mola di prodotti naturali: terpenoidi, composti fenolici, alcaloidi, probabilmente un numero superiore alle 100.000 sostanze chimiche. Differenti studi internazionali (Ishaaya et al. 2007) hanno dimostrato che molti di questi svolgano una funzione ecologica per le piante che li producono, contribuendo alla difesa dagli erbivori e dagli agenti patogeni. Si ritiene che tale chimica difensiva sia estremamente diffusa tra il regno vegetale. Su questa base molti scienziati ritengono le piante superiori come una risorsa preziosa che potrebbe essere sfruttata per la scoperta di nuovi insetticidi o di nuove strutture che potrebbero fungere da composti essenziali nello sviluppo di bio-pesticidi.

Questa logica si basa in parte sul presupposto che nuove strutture isolabili possono avere nuove modalità d'azione, e alcune o molte di queste possono mostrare selettività specifica nei confronti degli insetti, pensati per essere i principali agenti bersaglio per le piante, con una chimica difensiva probabilmente più mirata agli insetti che ai vertebrati erbivori. Diverse ricerche sono state pubblicate sul concetto di insetticidi naturali dalle piante (Arnason et al. 1989; Hedin et al. 1997; Koul e Dhaliwal 2001; Regnault-Roger et al. 2005). In realtà, gli insetticidi naturali estraibili dalle piante si sono rivelati negli anni un'eccezione che non conferma la regola. Sebbene, infatti, centinaia di composti isolati dalle piante hanno dimostrato bioattività verso uno o più insetti, basata su saggi biologici effettuati in laboratorio, l'azione fagodeterrente o l'inibizione della crescita larvale è molto più comune della morte degli insetti testati. Questo potrebbe in parte spiegare perché solo una quantità limitata di insetticidi botanici sono stati commercializzati nei paesi industriali, ricercando quelli con una bioattività comparabile agli insetticidi sintetici (ossia con tossicità acuta per gli insetti), e limitati metaboliti secondari, identificati

e isolati da migliaia di estratti vegetali selezionati, hanno mostrato attività insetticida soddisfacente.

In questo capitolo seguente verranno considerati diversi prodotti vegetali naturali con attività insetticida, rivedendo la loro relazioni struttura-attività e discutendo gli sforzi messi in piedi per migliorarne la bioattività (efficacia e/o spettro d'azione).

4.6.1. Dal piretro ai piretroidi sintetici

Lo sviluppo dei piretroidi sintetici, probabilmente la classe di insetticidi convenzionali con maggior successo commerciale, è spesso citato come un esempio di come un prodotto naturale di origine vegetale può fungere da guida nello sviluppo di nuovi fitofarmaci.

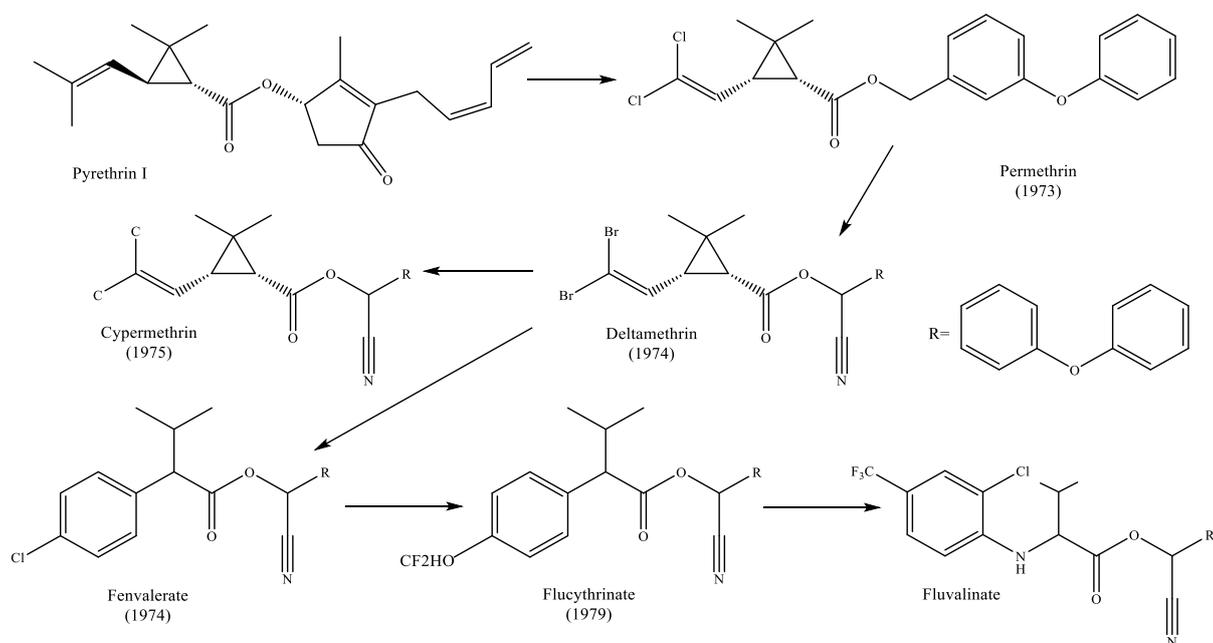


Fig. 10. Evoluzione sintetica dei piretroidi a partire dalla piretrina I.

Tuttavia, va ricordato che i primi piretroidi commercialmente significativi, quelli utilizzati per la protezione delle colture in campo (ad es. permetrina e fenvalerato) furono ottenuti solo dopo gli anni '70 del secolo scorso. Sono quindi trascorsi quasi 25 anni dopo la sintesi del primo piretroide sintetico, allethrin (nel 1948), e quasi 60 anni dopo la delucidazione strutturale delle piretrine naturali. Ciò che ha reso i piretroidi sintetici utili per l'agricoltura era la loro ridotta fotolabilità in presenza di

luce solare attraverso sostituzione dell'anello a tre termini con un sistema ad anello 3-fenossifenile più stabile (**Fig. 10**). Come tali, i moderni piretroidi somigliano poco al loro prodotto naturale capostipite (piretrina I) e persino la modalità d'azione dei successivi piretroidi insetticidi differisce dal prodotto naturale originale (Perry et al. 1998).

4.6.2. Azadirachtin e Limonoidi correlati dalle Meliaceae

Nessun insetticida di origine vegetale è stato soggetto a così tanti studi minuziosi negli ultimi 20 anni come quello del neem, un derivato dai semi dell'albero del neem indiano *Azadirachta indica* (Schmutterer 2002; Koul e Wahab 2004). I semi di *A. indica* producono una varietà di limonoidi strettamente correlati tra loro e il più importante è l'azadiractina (**Fig. 11**). In totale purezza, questo composto rimane il più potente *antifeedant* per insetti scoperto fino ad oggi, almeno nei saggi biologici che utilizzano la locusta del deserto, *Schistocerca gregaria*, e alcune specie di bruchi notturni.

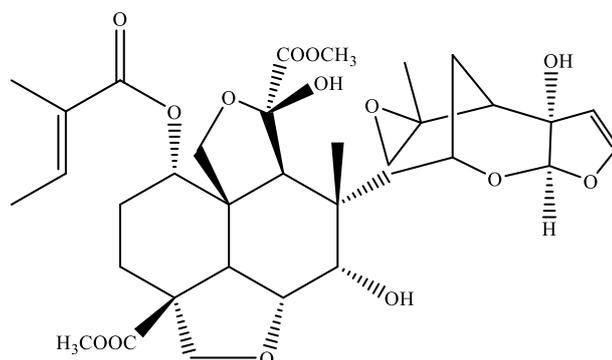


Fig. 11. Struttura chimica dell'azadiractina.

Gli effetti *antifeedant* dell'azadiractina (e altri *antifeedants* di origine vegetale) variano ampiamente in azione a seconda della specie di insetti testati. Il maggior valore di questo composto riguarda l'eccezionale controllo sulla crescita degli insetti. Attraverso l'interferenza con il sistema neuroendocrino dell'insetto, l'azadiractina interrompe la muta e la metamorfosi, blocca la riproduzione e può causare anche anoressia in alcune specie. Azadirachtin è stato isolato per la prima volta nel 1968 (Butterworth e Morgan 1968), ma la sua struttura non fu chimicamente determinata fino al 1987 (Kraus et al. 1987). Rembold (1989) fu il

primo a condurre uno dei primi studi attività-struttura sugli analoghi naturali dell'azadiractina estratti dai semi di neem. L'azadiractina, relativamente il più abbondante tra circa una dozzina di analoghi imparentati, è biologicamente anche il più attivo nella maggior parte dei saggi insetticidi.

Due costituenti minoritari (azadirachtine H e I) sono stati scoperti altresì due volte più attivi dell'azadiractina sulla base di saggi biologici sulla muta di *Epilachna*. Rembold (1989) ha anche delineato i requisiti minimi strutturali della molecola di azadiractina come regolatrice della crescita degli insetti. Queste osservazioni sono state estese da Blaney e Simmonds, in collaborazione con Ley (Blaney et al. 1990; Simmonds et al. 1995; Ley 1994). Quasi 60 studi analoghi sono stati eseguiti, verificando l'azione *antifeedant* e insetticida di derivati sia naturali sia sintetici su locuste e larve nottuide. Una conclusione importante da questo corpus di lavori è che quasi tutti gli analoghi sono meno potenti del composto progenitore azadiractina, confermando maggiormente le indagini di Rembold. Un altro aspetto è che il legame specifico di questi analoghi dell'azadiractina alle proteine di membrana, basato su studi, *in vitro*, impiegando colture cellulari di insetti, si correla bene con le osservazioni sul comportamento degli insetti e sulla fisiologia degli insetti intatti (Mordue et al. 1998). Particolarmente interessanti sono stati gli sforzi di Ley e colleghi per sintetizzare l'azadiractina *ex novo*, un'impresa formidabile visto il gran numero di centri chirali e vista la complessità strutturale della molecola. La loro strategia è stata quella di sintetizzare la porzione decalina e sintetizzare il frammento diidrofuranacetale, con l'intento di collegare i due attraverso il legame cruciale C₈-C₁₄.

Il saggio *antifeedant* dei frammenti non legati, effettuato sulla nottua del cotone *Spodoptera littoralis*, ha indicato che il frammento della decalina possedeva importanti attività a concentrazione 10⁻⁶ M e che, alcune combinazioni con dei frammenti furanacetali, erano sinergici (C:10⁻⁶ M). Tuttavia, nello stesso insetto, azadiractina è attivo come agente *antifeedant* a 10⁻¹⁵ M; si potrebbe obiettare che i composti sono risultati attivi solo a concentrazioni di nove ordini di grandezza maggiore.

Ad oggi, la sintesi totale dell'azadiractina non è stata realizzata su scala significativa. Le alternative alla sintesi includono la produzione di questa molecola

complessa attraverso la coltura di tessuti vegetali, ma fino a questo punto, l'estrazione dai semi di neem è l'unica via commercialmente praticabile per la produzione di insetticidi da neem. Inoltre, l'uso di neem o azadiractina da fonti naturali deve ancora ampiamente esplodere a livello commerciale, addirittura 15 anni dopo la sua commercializzazione negli Stati Uniti (Isman 2004). Quindi, mentre l'azadiractina si è rivelata una molecola affascinante per lo studio sul comportamento alimentare degli insetti e sulla fisiologia endocrina, non è stata vantaggiosa la produzione di insetticidi sintetici derivanti da questo composto fino a oggi.

4.6.3. Acetogenine dalle Annonaceae

I derivati ottenibili dalle specie della famiglia delle *custard apple* sono stati impiegati ai fini tradizionali per il controllo dei parassiti e come vermifughi (McLaughlin et al. 1997). Queste attività sono state erroneamente attribuite a una serie di alcaloidi benzilisoquinolinici isolati da estratti di piante delle Annonaceae. Ispirati dai test biologici, la separazione dei prodotti estratti da *Artemia salina*, ha portato all'isolamento e alla delucidazione di acidi grassi a lunga catena C-32 o C-34 combinati con un'unità di 2-propanolo sul C-2 per formare un α -lattone, come principi attivi principali della pianta (Mikolajczak et al. 1988, 1989). Ad oggi, più di 400 strutture di questo tipo sono stati isolati da circa 40 specie di Annonaceae, in particolare dalla corteccia, dal frutto e dai semi. Specie che sono state ampiamente esaminati includono *Asimina triloba*, *Annona muricata* e *Annona squamosa*. Ognuna di queste specie contiene miscele complesse di acetogenine comprendendo almeno 30 composti (ad es. squamocina-I, **Fig. 12**).

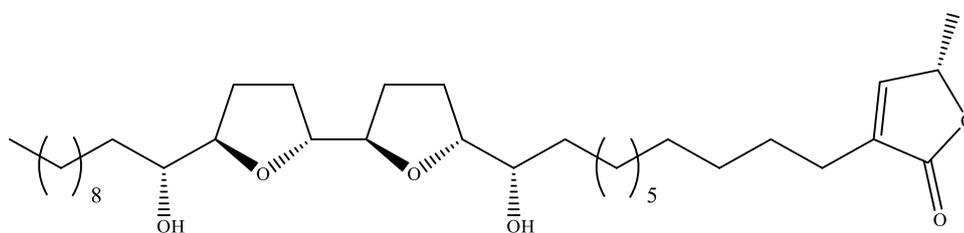


Fig. 12. Struttura chimica della squamocina-I.

McLaughlin e colleghi hanno studiato le relazioni struttura-attività di 44 acetogenine isolate da *Asimina triloba*, *A. longifolia*, *Annona muricata*, *A. bullata*, *Goniothalamus giganteus* e *Rollinia mucosa* (He et al. 1997), utilizzando larve di zanzara della febbre gialla (*Aedes aegypti*). Il rotenone, uno insetticida e acaricida naturale isolato e estraibile da *Derris elliptica* e da simili legumi tropicali, era utilizzato come controllo positivo. Le acetogenine, come inibitori della NADH deidrogenasi, avevano lo stesso meccanismo d'azione del rotenone, rendendo il confronto particolarmente appropriato (Londershausen et al. 1991). Tra le 44 acetogenine, due erano significativamente più tossiche per larve di zanzara rispetto al rotenone, mentre altre 28 erano statisticamente equitossiche al rotenone ($LC_{50} = 1.2$ ppm) (He et al. 1997). I composti con adiacenti anelli bis-tetraidrofuranici e tre gruppi ossidrilici erano i più attivi; quelli con un solo anello mono-tetraidrofuranico e con un singolo gruppo ossidrilico risultarono i meno attivi.

Anche se tre brevetti basati sull'uso di queste sostanze per il controllo degli insetti sono stati emessi più di 15 anni fa, non è seguita nessuna commercializzazione sostanziale. Come veleni mitocondriali tossici per una vasta gamma di organismi, tra cui i mammiferi, le acetogenine non sono considerate molecole starter attraenti per i reali sforzi sintetici. Come per le azadiractine (limonoidi), l'uso principale delle acetogenine, per il controllo degli insetti, continuerà probabilmente a basarsi su prodotti grezzi o parzialmente raffinati dagli estratti vegetali (Leatemia and Isman 2004).

4.6.4. Naftochinoni da Scrophulariaceae

Un progetto di cinque anni coadiuvato dai ricercatori dell'IACR-Rothamsted (Regno Unito), ha portato all'isolamento di due principi attivi dalla pianta cilena *Calceolaria andina* (Scrophulariaceae). Questi composti (BTG 504 e BTG 505), identificati come naftochinoni, sono risultati efficaci contro una serie di parassiti commercialmente importanti tra cui la mosca bianca del tabacco, la *Bemisia tabaci*, gli afidi e il ragno rosso bimaculato, *Tetranychus urticae* (Khambay et al. 1995; 1999). Questi composti offrono due opportunità: o come strutture guida per la sintesi analogica di nuovi derivati (Khambay et al. 1997a) o come nuovi pesticidi botanici (Khambay et al. 1997b), avendo mostrato una bassa tossicità sui

mammiferi a differenza di altri naftochinoni. L'uso di questi composti come pesticidi è stato brevettato (Khambay et al. 1999) dalla BTG Internazionale Ltd. Khambay et al. (2003) hanno confrontato le proprietà insetticide e fungicide del dunnione (un noto naftofurano) con BTG 505 (**Fig. 13**). Sebbene il dunnione non abbia mostrato praticamente alcuna attività contro mosca domestica *Musca domestica*, mosca bianca *B. tabaci*, coleottero *Phaedon cochleariae* e ragno rosso *T. urticae* a differenza di BTG 504 e BTG 505, ha esibito un insolito ampio spettro di attività antimicotica. La modalità d'azione del dunnione è principalmente effettuata all'inizio del ciclo redox, mentre il BTG 505 agisce inibendo i mitocondri del Complesso III (Khambay et al. 2003).

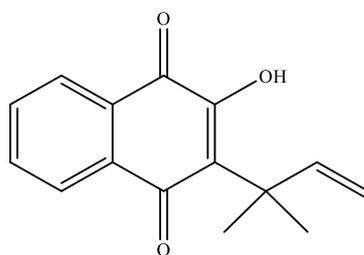


Fig. 13. Struttura chimica del BTG 505.

L'attività biologica dei 2-idrossi-3-sostituiti-1,4-naftochinoni è stata segnalata per la prima volta da Fieser et al. (1948), dimostrando che il lapachol e l'idrolapachol erano attivi contro *Plasmodium lophurae*, un parassita di vertebrati e insetti. Il farmaco antimalarico di recente sviluppo, l'atovaquone, è un sintetico analogo del lapachol (Olliao e Trigg 1995). L'attività antimicotica del lapachol, ottenuto dall'estratto legnoso di *Tabebuia serratifolia* (Bignoniaceae) è stata riportata da Velasquez et al. (2004). Il lapachol ottenuto dall'estratto etanolic della corteccia di *T. serratifolia* era più attivo ($LC_{50} = 20.8$ ppm), rispetto ai derivati amminici (LC_{50} compresi tra 242.6–899.4 ppm) contro le larve di *Aedes aegypti*, mostrando così l'importanza del gruppo ossidrilico in posizione C-2 per la bioattività rilevata (Oliviera et al. 2002). Una proprietà eccezionale di questi composti è che sono efficaci contro una gamma di ceppi di insetti resistenti, tra cui il famigerato biotipo B della mosca bianca del tabacco, *Bemisia tabaci*, che sta devastando i raccolti in tutto il mondo.

4.6.5. Rocaglammidi di *Aglaia* (Meliaceae)

Il genere *Aglaia* comprende circa 130 specie ampiamente distribuite nell'arcipelago malese (Nugroho et al. 1999) e ha attirato una notevole attenzione nell'ultimo decennio come possibile fonte di prodotti naturali unici. Le indagini fitochimiche di *Aglaia* hanno rivelato la presenza di una varietà di composti, comprese le rocaglammidi (Ishibashi et al. 1993; Proksch et al. 2001), aglaine (Bacher et al. 1999), bisammidi (Brader et al. 1998), triterpeni (Weber et al. 2000) e lignani (Wang et al. 2002), con interessanti attività biologiche. Esistono più di 50 derivati naturali delle rocaglammidine isolati fino ad oggi (es. rocaglammidine, **Fig. 14**) (Proksch et al. 2001).

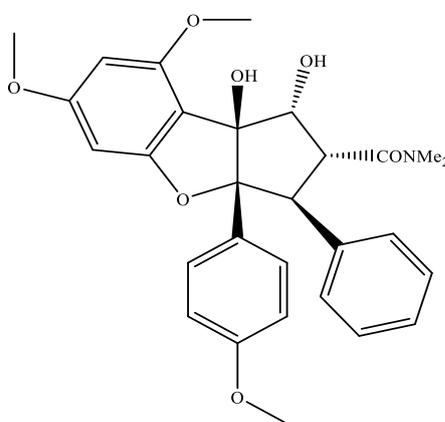


Fig. 14. Struttura chimica della rocaglammidine.

I derivati della rocaglammidine sono composti aromatici insoliti caratterizzati da un scheletro ciclico pentatetraidrobenzofurano e sono strettamente correlati alle sole specie del genere *Aglaia*. Recentemente, diversi nuovi derivati della rocaglammidine, isolati da diverse specie di *Aglaia*, hanno dimostrato di possedere una forte attività insetticida (in alcuni casi addirittura comparabile ad azadiractina), principalmente contro larve neonatali di *Spodoptera littoralis*, specie *Ostrinia* e la piralide *Helicoverpa armigera* (Brader et al. 1998; Nugroho et al. 1997a, 1997b, 1999; Gussregan et al. 1999; Koul et al. 2004). La modalità d'azione insetticida e la potenziale attività antitumorale delle rocaglammidine derivano dall'inibizione della sintesi proteica, spiegando così la lungaggine temporale che intercorre tra il trattamento e la morte degli insetti studiati (Satasook et al. 1993). L'attività insetticida delle rocaglammidine può essere attribuita alla presenza del sistema ad

anello furanico poiché gli aglain, strettamente imparentati, che possiedono un anello piranico, sono privi di attività insetticida (Nugroho et al. 1999). È stato anche suggerito che la natura dei sostituenti ai C-1, C-2, C-3 e C-8b sia responsabile della bioattività dei rispettivi derivati (Nugroho et al. 1997a, 1999; Schneider et al. 2000). L'acilazione del gruppo -OH (con acido formico o acido acetico) sul C-1 ha causato una riduzione dell'attività insetticida nelle larve neonatali di *S. littoralis* rispetto ad altri derivati della rocaglamide caratterizzati dalla presenza del gruppo idrossile (Nugroho et al. 1997a). La riduzione dell'attività insetticida nel derivato acetilato indica la prima relazione struttura-attività in questo gruppo di insetticidi naturali. Una tendenza simile è stata notata in altri derivati della rocaglamide isolati da *A. odorata* (Nugroho et al. 1999; Gussregan et al. 1997) e *A. elliptica* (Nugroho et al. 1997b). La sostituzione di un gruppo -OH con il gruppo metossi (-OCH₃) su C-8b ha provocato una perdita completa di attività nei composti che sono stati isolati dalle radici di *A. duperreana* (Chaidir et al. 1999), mostrando l'importanza del gruppo OH in C-8b. La forte bioattività dei derivati della rocaglamide contro numerosi insetti nocivi suggerisce che questi metaboliti possono fungere da *starter* nello sviluppo di insetticidi sintetici per la protezione delle piante.

4.6.6. Monoterpeni da oli essenziali

Circa 20 anni fa, gli studi su neem e azadiractina dominavano la letteratura scientifica sugli insetticidi di natura botanica. Nell'ultimo decennio, gli oli essenziali hanno sfidato e persino eclissato neem come soggetto principale in questo campo. Ora esistono migliaia di pubblicazioni che evidenziano del rapporto tossicità degli oli essenziali e insetti testati, e questi sono stati oggetto di numerose revisioni scientifiche (Isman and Tak 2017, Pavela and Benelli 2016, Regnault-Roger et al. 2012). Questo tsunami di sforzi di ricerca ha avuto come conseguenza la produzione di un'ondata di insetticidi a base di oli essenziali vegetali? La risposta è un sì deciso.

Gli oli essenziali, vale a dire, idro-distillati di erbe e piante aromatiche e/o medicinali, sono noti da tempo per possedere proprietà repellenti e/o insetticide, ma solo di recente alcuni oli naturali sono stati commercializzati per quegli usi. In termini generali, i monoterpenoidi esibiscono neurotossicità per insetti e acari al

contatto, ma solo a dosi sostanziali maggiori di quelli ottenuti con piretrine naturali o insetticidi convenzionali.

Coats e Rice hanno esplorato le relazioni struttura-attività dei monoterpenoidi naturali attraverso attività topiche, fumiganti e ovicide utilizzando la mosca domestica (*Musca domestica*), lo scarabeo rosso della farina (*Tribolium castaneum*) e la diabrotica del mais (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (Coats and Rice 1994a). Hanno notato che, in generale, i chetoni tendevano a essere più attivi di analoghe aldeidi che erano a loro volta più efficaci dei rispettivi alcoli. I fenoli erano più attivi degli alcoli saturi per via topica e come larvicidi, mentre gli alcoli saturi erano più efficaci come fumiganti. Questo studio è stato ampliato per includere un gran numero di derivati sintetici ottenuti per acilazione di sostituenti alcolici (Rise and Coats 1994b; Tsao et al. 1995). Nella maggior parte dei saggi biologici, i pivalati erano più attivi degli acetati, sebbene questi ultimi fossero generalmente più efficaci come ovicidi. I fluoroacetati erano particolarmente efficaci come fumiganti per le mosche domestiche. La derivitizzazione ha comportato, inoltre, un aumento di 2-3 volte della tossicità in alcuni saggi biologici, sebbene tra 55 composti testati per la tossicità topica sulla mosca domestica, il prodotto naturale, il timolo (**Fig. 15**), era ancora il più attivo; tutti e sette i derivati del timolo sono risultati significativamente meno tossici. Probabilmente l'aumentata volatilità e lipofilia dei derivati acilati, ha comportato una migliore attività fumigante e ovicida. Ulteriori studi per svestire la modalità d'azione per un certo numero di monoterpenoidi (Enan 2001; Bischof and Enan 2004; Kostyukovsky et al. 2002), combinando la loro relativa semplicità chimica, possono comportare la scoperta di prodotti naturali a base di oli essenziali utili come strutture base di nuovi insetticidi neurotossici con buona selettività nei mammiferi.

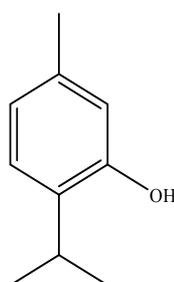


Fig. 15. Struttura chimica del monoterpene ossigenato timolo.

4.7. Bibliografia

Abdullah NZ, Ishaka A, Samsuddin N, Mohd RR, Mohamed AH (2011) Chronic organophosphate pesticide exposure and coronary artery disease: Finding a bridge. IIUM Research, Invention and Innovation Exhibition (IRIIE), p. 223.

Alavanja MC (2009) Pesticides use and exposure extensive worldwide, retrieved from the national center for biotechnology information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946087/#R4>.

Allsop M, Huxdorff C, Johnston P, Santillo D, Thompson H (2015) pesticides and our health: a growing concern, retrieved from <http://www.greenpeace.org/international/Global/international/publications/agriculture/2015/Pesticides-and-ourHealth.pdf> 2015 May).

Andersen HR, WohlfahrtVeje C, Dalgård C, Christiansen L, Main KM, Nellemann C, Murata K, Jensen TK, Skakkebaek NE, Grandjean P (2012) Paraoxonase 1 polymorphism and prenatal pesticide exposure associated with adverse cardiovascular risk profiles at school age. *PLoS One* 7:e36830.

Arnason JT, Philogene BJR, Morand P, Imrie K, Iyengar S, Duval F, Soucy-Brou C, Scaino JC, Werstiuk NH, Hasspieler B, Downe AER (1989) Naturally occurring and synthetic thiopenes as photoactivated insecticides. In: Arnason JT, Philogene BJR, Morand P (eds) *Insecticides of plant origin*. Am Chem Soc Symp Ser 387, Washington, DC, pp 164–172.

Bacher M, Hofer O, Brader G, Vajrodaya SH (1999) Thapsakins: possible biogenetic intermediates towards insecticidal cyclopenta[b] benzofurans from *Aglaia edulis*. *Phytochemistry* 52:253–263.

Band PR, Abanto Z, Bert J, Lang B, Fang R, Gallagher RP, Le ND (2011) Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *Prostate* 71:168–183.

Bischof LJ, Enan EE (2004) Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta americana*. *Insect Biochem Molec Biol* 34:511–521.

Blaney WM, Simmonds MSJ, Ley SV, Anderson JC, Toogood PL (1990) Antifeedant effect of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopteran larvae. *Entomologia Exp Appl* 55:149–160.

Brader G, Vajrodays S, Greger H, Bacher M, Kalchhauser H, Hofer O (1998) Bisamides, lignans, triterpenes, and insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species. *J Nat Prod* 61:1482–1490.

Brem B, Seger C, Pacher T, Hofer O, Vajrodaya S, Gregger H (2002) Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids—a source of potent natural insecticides. *J Agric Food Chem* 50:6383–6388.

Brem B, Seger C, Pacher T, Hartl M, Hadacek F, Hofer O, Vajrodaya SH (2004) Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species. *Phytochemistry* 65:2719–2729.

Buchel KH (1983) *Chemistry of Pesticides*, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Butterworth JH, Morgan ED (1968) Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J Chem Soc Chem Commun* 4:23–24.

Chaidir JH, Nugroho BW, Bohnenstengel FI, Wray V, Witte L, Hung PD, Kiet LC, Proksch P (1999) New insecticidal rocaglamide derivatives from flowers of *Aglaia duperreana* (Meliaceae). *Phytochemistry* 52:837–842.

Chakraborty S, Mukherjee S, Roychoudhury S, Siddique S, Lahiri T, Ray MR (2009) Chronic exposures to cholinesterase inhibiting pesticides adversely affect respiratory health of agricultural workers in India. *J Occup Health* 51:488–497.

Cocco P, Satta G, Dubois S, Pili C, Pilleri M, Zucca M, Mannetje AM, Becker N, Benavente Y, Sanjose SD, Foretova L, Staines A, Maynadie M, Nieters A, Brennan P, Miligi L, Ennas MG, Boffetta P (2013) Lymphoma risk and occupational

exposure to pesticides: Results of the Epilymph study. *Occup Environ Med* 70:91–98.

Dawson AH, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe SJ, Manuweera G, Buckley NA (2010) Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: A prospective cohort study. *PLoS Medicine* 7:1–10.

Drum C (1980) *Soil Chemistry of Pesticides*, PPG Industries, Inc. USA.

Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R, Hutchin SG, Isbister G, Konradsen F, Murray D, Piola JC, Senanayake N, Sheriff R, Singh S, Siwach SB, Smit L (2002) Pesticide poisoning in the developing world-A minimum pesticide list. *Lancet* 360:1163–1167.

Edwards CA (1987) The environmental impact of insecticides. In: Delucchi, V. (Ed.) *Integrated pest management, Protection Integàee Quo vadis? An International Perspective*. Parasitis 86, Geneva, Switzerland, pp. 309–329.

Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alperovitch A, Tzourio C (2009) Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neur* 66:494–504.

Eldridge BF (2008) *Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides*. California Department of Public Health, Vector-Borne Disease Section, 1616 Capitol Avenue, MS7307, P.O. Box 997377, Sacramento, CA.

Enan E (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol C* 130:325–337.

FAO/WHO (2000) *Pesticide residues in food - 1999 evaluations. Part II - toxicological*. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. World Health Organization, Geneva.

Fieser LF, Berliner E, Bondhus FJ, Chang FC, Dauben WG, Ettliger MG, Fawaz G, Fields M, Fieser M, Heidelberger C, Heymann H, Seligman AM, Vaughan WR, Wilson E, Wu M, Leffler MT, Hamlin KE, Hathaway RJ, Matson EJ, Moore EE, Moore MB, Rapala RT, Zaugg HE (1948) Naphthoquinone antimalarials. *J Am Chem Soc* 70:3151–3244.

Fishel FM, Ferrell JA (2013) Managing pesticide drift. Agronomy department. PI232. University of Florida, Gainesville, FL, USA (<http://edis.ifas.ufl.edu/pi232>) (accesso 11 Settembre 2022).

Godfrey C, Benner J, Clough M, Dunbar S, Earley F, Russel A, Urch C, Ware A (2002) 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection, vol. 1. p 236.

Greenlee AR, Arbuckle TE, Chyou PH (2003) Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology*, 14:429–436.

Gussregan B, Pühr M, Nugroho BW, Wray V, Witte I, Proksch P (1999) New insecticidal rocaglamide derivative from flower of *Aglaia odorata*. *Zeitschrift für Naturforschung* 52:339–334.

Harrison SA (1990) The fate of pesticides in the environment, Agrochemical Fact Sheet # 8, Penn, USA.

Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP, Breitner JCS, WelshBohmer KA (2010) Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD the cache county study. *Neurology* 74:1524–1530.

He K, Zeng L, Ye Q, Shi G, Oberlies NH, Zha, GX, Njoku C J, McLaughlin JL (1997) Comparative SAR evaluations of Annonaceous acetogenins for pesticidal activity. *Pestic Sci* 49:372–378.

Heck JE, Charbotel B, Moore LE, Karami S, Zaridze DG, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Foretova L, Bencko V, SzeszeniaDabrowska N, Lissowska J, Mates D, Ferro G, Chow WH, Rothman N, Stewart P, Brennan P, Boffetta P (2010)

Occupation and renal cell cancer in Central and Eastern Europe. *Occup Environ Med* 67:47–53.

Hedin PA, Hollingworth RM, Masler EP, Miyamoto J, Thompson GD (eds) (1997) *Phytochemicals for pest control*. Am Chem Soc Washington, DC, 372.

Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Henneberger PK, Kullman GJ, Coble J, Alavanja MCR, Freeman LEB, Sandler DP (2009) Pesticide use and adult-onset asthma among male farmers in the agricultural health study. *Eur Respir J* 34:1296–1303.

Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A (2009) Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Adv Agr* 102:159–200.

Ishaaya I, Horowitz AR, Nauen R (2007) Insecticides design using advanced technologies. Plant natural products as a source for developing environmentally acceptable insecticides. (Chapter 10), pp:235–248.

Ishibashi F, Satasook C, Isman MB, Towers GHN (1993) Insecticidal 1H-cyclopentatetrahydro[b]benzofurans from *Aglaia odorata* (Lour.) (Meliaceae). *Phytochemistry* 32:307–310.

Isman MB (2002) Lepidoptera, butterflies, and moths. In: Schmutterer H (ed) *The neem tree*, 2nd edn. The Neem Foundation. Mumbai, India, pp 378–401.

Isman MB (2004) Factors limiting commercial success of neem insecticides in North America and Western Europe. In: Koul O, Wahab S (eds) *Neem: today and in the new millennium*. Kluwer, Dordrecht, pp 33–41.

Isman MB, Tak J-H (2017) Commercialization of insecticides based on plant essential oils: past, present, and future. In *Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control*, ed. LML Nollet, HS Rathore, pp. 27–39. Boca Raton, FL: CRC Press.

Kaltenegger E, Brem B, Mereiter K, Kalchhauser H, Kahlig H, Hofer O, Vajrodaya SH (2003) Insecticidal pyrido[1,2-a]azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry* 63:803–816.

Kevan PG (1999) Pollinators as bio-indicators of the state of the environments: Species, activity and diversity. *Agric Ecosyst Environ* 74:373–393.

Khambay BPS, Batty D, Niemeyer MAH (1995) Naphthoquinone derivatives. UK Patent Application 2289463A, PCT Application WO 95/32176.

Khambay BPS, Batty D, Beddie DG, Denholm I, Cahill M (1997a) A new group of plant-derived naphthoquinone pesticides. *Pestic Sci* 50:291–296.

Khambay BPS, Beddie DG, Simmonds MSJ (1997b) In pursuit of insecticidal compounds from plants. In: Wrigley S, Hayes M, Thomas R, Chrystal E (eds) *Phytochemical diversity: a source of new industrial products*. R Soc Chem, Cambridge UK, pp 158–169.

Khambay BPS, Batty D, Cahill M, Denholm I (1999) Isolation characterization and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *J Agric Food Chem* 47:770–775.

Khambay BPS, Batty D, Jewess PJ, Bateman GL, Hollomon DW (2003) Mode of action and pesticidal activity of the natural product dunnione and of some analogues. *Pest Manage Sci* 59:174–182.

Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manage Sci* 58:1101–1106.

Koul O, and Dhaliwal GS (2001) *Phytochemical biopesticides*. Hardwood Acad, Amsterdam, 223 pp.

Koul O, Wahab S (2004) *Neem: today and in the new millennium*. Kluwer, Dordrecht, 276 pp.

Koul O, Multani JS, Singh G, Wahab S (2004) Bioefficacy and mode of action of rocaglamide from *Aglaia elaeagnoidea* against gram pod borer, *Helicoverpa armigera*. *J Appl Entomol* 128:177–181.

Kraus W, Bokel M, Bruhn A, Cramer R, Klaiber I, Klenk A, Nagl G, Pohnl H, Sadlo H, Vogler B (1987) Structure determination by NMR of azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Tetrahedron* 43:2813–2830.

Larson SJ, Capel PD, Majewski M (2010) *Pesticides in surface waters: Distribution, trends, and governing factors* (No. 3). CRC Press.

Leatemia JA, Isman MB (2004) Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp, *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetiape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasitica* 32:30–37.

Lee WJ, Colt JS, Heineman EF, McComb R, Weisenburger DD, Lijinsky W, Ward MH (2005) Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occup Environ Med* 62:786–792.

Lee SJ, Mehler L, Beckman J, DieboltBrown B, Prado J, Lackovic M, Waltz J, Mulay P, Schwartz A, Mitchell Y, Moraga McHaley S, Gergely R, Calvert GM (2011) Acute pesticide illnesses associated with off target pesticide drift from agricultural applications: 11 States, 1998–2006. *Environ Health Perspect*, 119:11–62.

Ley SV (1994) Synthesis and chemistry of the insect antifeedant azadirachtin. *Pure and Appl Chem* 66:2099–2102.

Londershausen M, Leight W, Lieb F, Moeschler S (1991) Molecular mode of action of annonins. *Pestic Sci* 33:427–438.

Lorenz ES (2009) Potential health effects of pesticides. *Agricultural Communications and Marketing*. pp. 1–8.

Martin H (1968) *Pesticides manual*, British Crop Protection Council, London, UK.

McLaughlin JL, Zeng L, Oberlies NH, Alfonso D, Johnson HA, Cummings BA (1997) Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: recent progress. In: Hedin P, Hollingworth R, Mujamoto J, Masler E, Thompson D (eds) *Phytochemical pest control agents*. Am Chem Soc, Washington, DC, pp 117–133.

Mesnage R, Clair E, de Vendômois JS, Seralini GE (2010) Two cases of birth defects overlapping StrattonParker syndrome after multiple pesticide exposure. *Occup Environ Med* 67:359–359.

Mikolajczak KL, McLaughlin JL, Rupprecht JK (1988) Control of pests with Annonaceous acetogenins. US Patent 4,721,727.

Mikolajczak KL, McLaughlin JL, Rupprecht JK (1989) Control of pests with Annonaceous acetogenins. US Patent 4,855,319.

Mordue AJ, Simmonds MSJ, Ley SV, Blaney WM, Mordue W, Nasiruddin M, Nisbet AJ (1998) Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. *Pestic Sci* 54:277–284.

Morshed MS (2013) Homemade bio-pesticides and organic pest. *Int J Eng Sci* 2:18–25.

Mostafalou S, Abdollahi M (2012) Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clin Exp Pharmacol* S5:e002.

MunozLeoz B, RuizRomera E, Antigüedad I, Garbisu C (2011) Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biol Biochem* 43:2176–2183.

Nugroho BW, Edrada RA, Gussregen B, Wray V, Witte L, Bringmann G, Proksch P (1997a) Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia Duppereana*. *Phytochemistry* 44: 1455–1461.

Nugroho BW, Gussregen B, Wray V, Witte L, Bringmann G, Gehling M, Proksch P (1997b) Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia elliptica* and *A. harmsiana*. *Phytochemistry* 45:1579–1585.

Nugroho BW, Edrada RA, Wray V, Witte L, Bringmann G, Proksch P (1999) An insecticidal rocaglamide derivative and related compounds from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 51:367–376.

Oliviera MF, Lemos TG, de Mattos MC, Segundo TA, Santiago GM, Braz-Filho R (2002) New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *An Acad Bras Cienc* 74:211–221.

Olliao PL, Trigg PI (1995) Status of antimalarial drugs under development. *Bull World Health Org* 73:565–571.

PAN (2012) Pesticides and health hazards Facts and figures. Pesticide Action Network, Germany, GLS Gemeinschaftsbank.

Pavela R, Benelli G (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci* 21:1000–7.

Perry AS, Yammamoto I, Ishaaya I, Perry RY (1998) *Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 261 pp.

Pesticides Incident Reports. (n.d.). Retrieved from Health Canada: <http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/pi-ip/ir-di-eng.php>.

Petrelli G, Mantovani A (2002) Environmental risk factors and male fertility and reproduction. *Contraception* 65:297–300.

Pilli RA, Ferreira de Oliviera MC (2000) Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. *Nat Prod Rep* 17:117–127.

Proksch P, Edrada R, Ebel R, Bohnenstengel IF, Nugroho WB (2001) Chemistry and biological activity of rocaglamide derivatives and related compounds in *Aglaia* species (Meliaceae). *Curr Org Chem* 5:923–938.

Regnault-Roger C, Philogene BGR, Vincent D (eds) (2005) *Biopesticides of plant origin*. Lavoisier, Paris, 313 pp.

Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT (2012) Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu Rev Entomol* 57:405–25.

Rembold H (1989) Azadirachtins: their structure and mode of action. In: Arnason JT, Philogene BJR, Morand P (ed) *Insecticides of plant origin*. Am Chem Soc Symp Ser 387, Washington, DC, pp 150–163.

Rice PJ, Coats JR (1994a) Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol* 87:1172–1179.

Rice PJ, Coats JR (1994b) Insecticidal properties of monoterpenoids derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pestic Sci* 41:195–202.

Ritchie, H (2018) Causes of Death. Our World in Data. Available online: <https://ourworldindata.org/causes-of-death> (accesso 13 Ottobre 2022).

Sacramento CA (2008) Department of pesticide regulation “What are the Potential Health Effects of Pesticides?” Community Guide to Recognizing and Reporting Pesticide Problems, pp. 27–29.

Sakata K, Aoki K, Chang CF, Sakurai A, Tamura S, Murakoshi S (1978) Stemospiroline, a new insecticidal alkaloid of *Stemona japonica* Miq. Isolation, structural determination and activity. *Agric Biol Chem* 42:457–463.

Salerno M (2018) The Harmful Effects of Pesticides on Human Health. Retrieved from cata-farmworkers organization: <http://www.cata-farmworkers.org/Harmful>

Satasook G, Isman MB, Wiriyaichita P (1993) Activity of rocaglamide, an insecticidal natural product, against the variegated cut worm, *Peridroma saucia*, (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Sci* 36:53–58.

Schneider C, Bohnenstengel FI, Nugroho BW, Wray V, Witte L, Hung PD, Kiet LC, Proksch P (2000) Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae). *Phytochemistry* 54:731–736.

Schmutterer G (ed) (2002) The neem tree. Mumbai Neem Foundation, 892 pp.

Shim YK, Mlynarek SP, van Wijngaarden E (2009) Parental exposure to pesticides and childhood brain cancer: US Atlantic coast childhood brain cancer study. *Environ Health Persp* 117:1002–1006.

Simmonds MSJ, Blaney WM, Ley SV, Anderson JC, Bantelia R, Denholm AA, Green PCW, Grossman RB, Gutteridge C, Jennens L, Smith SC, Togwood PL, Wood A (1995) Behavioural and neurophysiological responses of *Spodoptera littoralis* to azadirachtin and a range of synthetic analogues. *Entomol Exp Appl* 77:69–80.

Singh B, Mandal K (2013) Environmental impact of pesticides belonging to newer chemistry. In: Dhawan, A.K., Singh, B., BrarBhullar, M. and Arora, R. (Eds.). *Integrated pest management*. Scientific Publishers, Jodhpur, India, pp. 152–190.

Son HK, Kim SA, Kang JH, Chang YS, Park SK, Lee SK, Jacobs JDR, Lee DH (2010) Strong associations between lowdose organochlorine pesticides and type 2 diabetes in Korea. *Environ Int* 36:410–414.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Persp* 119:866–872.

Trajkovska S, Mbaye M, Seye MG, Aaron JJ, Chevreuil M, Blanchoud H (2009) Toxicological study of pesticides in air and precipitations of Paris by means of a bioluminescence method. *Anal Bioanal Chem* 394:1099–1106.

Tsao R, Lee S, Rice PJ, Jensen C, Coats JR (1995) Monoterpenoids and their synthetic derivatives as leads for new insect-control agents. In: Baker DR, Fenyes JG, Basarab GS (eds) Synthesis and chemistry of agrochemicals IV. Am Chem Soc Symp Ser 584, Washington, DC, pp 312–324.

Velasquez J, Rojas LB, Usubillaga A (2004) Antifungal activity of naphthoquinone from *Tabebuia serratifolia* (Vahl, Nicholson). CIEN 12:64–69.

Vickerman GP (1988) Farm scale evaluation of the long-term effects of different pesticide regimes on the arthropod fauna of winter wheat. In: Greeves, M.P., Grieg Smith, P.W. and Smith, B.D. (Eds.) Field methods for the environmental study of the effects of pesticides. BCPC Monograph No. 40 British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp. 127–135.

Wang B, Peng H, Huang H, Li X, Eck G, Gong X, Proksch P (2002) Rocaglamide, aglain, and other related derivatives from *Aglaia testicularis* (Meliaceae). Biochem Syst Ecol 32:1223–1226.

Ware GW (1980) Effect of pesticides on non-target organisms. Residue Rev 76:173–201.

Weber S, Puripattanavong J, Brecht V, Frahm AW (2000) Phytochemical investigation of *Aglaia rubiginosa*. J Nat Prod 63:636–642.

WHO (2009) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland.

Winchester PD, Huskins J, Ying J (2009) Agrichemicals in surface water and birth defects in the United States. Acta Paediatr 98:664–669.

Xavier R, Rekha K, Bairy KL (2004) Health perspective of pesticide exposure and dietary management. Malays J Nutr 10:39–51.

Xu RS, Lu YJ, Chu JH, Iwashita T, Naoki H, Naya Y, Nakanishi K (1982) Studies on some new stemona alkaloids. *Tetrahedron* 38:2667–2670.

Xu RS (2000) Some bioactive natural products from Chinese medicinal plants. In: Atta-ur-Rahman (ed) *Studies in natural products chemistry*, vol. 21. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 729–772.

Xu X, Dailey AB, Talbott EO, Ilacqua VA, Kearney G, Asal NR (2010) Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in US adults. *Environ Health Persp* 118:60–66.

Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G, Jones KC (2015) Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Sci Total Environ* 511:123–137.

Ye Y, Qin GW, Xu RS (1994) Alkaloids of *Stemona japonica*. *Phytochemistry* 37:1205–1208.

5. Scopo di questo capitolo di tesi

L'uomo ha da sempre cercato di eliminare o ridurre i parassiti che minacciano costantemente la propria salute e fonti di cibo. A questo scopo lo sviluppo degli insetticidi è stato fondamentale. Due sono i principali vantaggi che derivano dal loro utilizzo. Da un lato una la possibilità di prevenire la trasmissione di malattie come la malaria, il tifo, la malattia del sonno, la febbre gialla e altre trasmesse dagli insetti, e dall'altro di assicurare la sopravvivenza di un ragguardevole numero di individui per merito di una sufficiente produzione agricola atta a fronteggiare l'aumento della popolazione mondiale.

Gli insetticidi sono composti naturali o di sintesi utilizzati per eliminare gli insetti dannosi per l'uomo. Sebbene la maggior parte degli insetticidi (organoclorurati, organofosforici, carbammati) siano stati sviluppati tra il 1935 e il 1950, la conoscenza e l'utilizzo di alcune sostanze, quali lo zolfo (il riscontro più antico è di Omero nel 1000 a.C.), il piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), il rotenone (*Derris elliptica*), le foglie di tabacco (*Nicotiana tabacum*) risale all'antichità.

Lo sviluppo e la diffusione degli insetticidi ha dato un grosso contributo, particolarmente in passato, al controllo di diverse malattie trasmesse dagli insetti. È facile ricordare le varie epidemie di tifo e di malaria durante la Seconda guerra mondiale controllate con il DDT. Sebbene risultano notevoli i benefici apportati dall'utilizzo dei differenti pesticidi in vari settori quali quello agrario, sanitario e zootecnico, importanti, ancora oggi, sono gli effetti tossici che ricadono sul massiccio utilizzo dei prodotti sopra menzionati.

La preoccupazione risiede nella potenziale tossicità degli insetticidi, anche organismi non bersaglio, quali insetti utili, animali domestici e l'uomo stesso, quando sono esposti a questi composti. Le molecole dei pesticidi sono estremamente nocive non solo per la salute umana ma anche per tanti organismi viventi a causa delle loro particolari caratteristiche biochimiche:

- persistenza nel suolo e nelle acque con danni diretti e permanenti agli ecosistemi acquatici (pesci, anfibi ecc.);
- bioaccumulo in tessuti animali (es. *Dreissena polymorpha*);

- insorgenza di resistenze e necessità quindi di prodotti sempre più potenti;
- tossicità a largo spettro in grado di distruggere indistintamente molte specie di insetti anche utili (bombi, farfalle, api) come avviene ad esempio nel caso della moria di api da neonicotinoidi (usati per la concia delle sementi del mais o per la flavescenza della vite).

Grazie allo sviluppo di nuove tecniche e tecnologie, investimenti in ricerca, disciplinari di produzione, e una revisione fin troppo severa dei composti usati in passato, la popolazione in generale è esposta a dosi sicure di insetticidi, ad eccezione di episodiche intossicazioni acute in seguito a ingestioni accidentali o intenzionali o all'esposizione occupazionale.

Considerato quanto detto sopra, lo scopo di questo capitolo della tesi di dottorato è quello di ampliare l'arsenale di insetticidi seguendo approcci *green*. In particolare, ho indagato composti naturali quali singole molecole o miscele complesse come gli oli essenziali con attività insetticida e repellente. Questa seconda parte della tesi di dottorato è interamente dedicata alla ricerca di estratti, di metaboliti secondari e di oli essenziali con potenziale attività anti-insetticida. In particolare, è stato valutato l'effetto insetticida degli estratti ottenuti dai bulbi di *Drimia pancrations*, e di alcuni metaboliti secondari isolati singolarmente, su adulti di *Stegobium paniceum* (Anobiidae) e *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). In aggiunta, come esempio di insetticida verde, in grado di sostituire gli insetticidi a natura sintetica, conservandone una maggiore efficacia ed evitando l'inquinamento ambientale o l'avvelenamento umano, ho esplorato il potenziale insetticida dell'olio essenziale di *Ridolfia segetum* (L.) Moris contro tre diversi parassiti: *Culex quinquefasciatus* Say, *Musca domestica* L. e *Spodoptera littoralis* (Boisduval).

6. Risultati e discussioni

6.1. Phytochemical profile and insecticidal activity of *Drimia pancrations* (Asparagaceae) against adults of *Stegobium paniceum* (Anobiidae)

I risultati di questa sezione sono stati pubblicati in Badalamenti et al. (Badalamenti et al. 2021).

6.1.1. Abstract

L'indagine chimica e spettroscopica dei bulbi di *Drimia pancrations* ha portato all'isolamento di un flavonolo noto (**1**), mai isolato da questa specie vegetale, e di tre saponine steroidee precedentemente descritte in letteratura (**2–4**), ma la cui configurazione dei centri stereogenici non era chiaramente determinata. Gli spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR, l'effetto nucleare Overhauser (NOE) e gli spettri NMR bidimensionali dei singoli composti **2–4** sono stati dettagliatamente studiati e tutti i segnali protonici e carbonici sono stati assegnati. Inoltre, gli estratti in metanolo e butanolo di *D. pancrations* sono stati testati contro i coleotteri adulti di *Stegobium paniceum*. Nonostante i risultati non significativi per quanto riguarda l'attività repellente e la tossicità da contatto, sono stati ottenuti risultati promettenti per l'effetto anti-*feeding*.

6.1.2. Introduzione

Lo stoccaggio delle merci e la loro protezione contro il deterioramento, dovuto principalmente agli insetti e i funghi, con conseguente perdita di qualità, sono un argomento molto importante e di interesse attuale. La maggior parte della merce conservata nei depositi è costituita da cereali, una componente importante dell'alimentazione mondiale e della dieta umana, che, dopo la raccolta, vengono generalmente conservati in ampi box dove possono essere soggetti a infestazione da parte di una molteplicità di insetti, come lo scarabeo della farmacia (*Stegobium paniceum*).

S. paniceum (L.) (Coleoptera: Anobiidae), noto anche come scarabeo del pane o del biscotto, è tra i principali parassiti di un'ampia varietà di prodotti agricoli

immagazzinati secchi e durevoli nel tempo (Edde et al. 2012). Oltre al danno diretto a causa dell'alimentazione dei prodotti, può provocare disgusto, fastidio e irritazione nei consumatori diretti (Cabrera 2001). Inoltre, si segnala anche come infestante del patrimonio culturale perché si nutre del legno di antiche pitture e di libri (Ignatowicz et al. 2011; Liu 2013). *S. paniceum* ha una distribuzione mondiale, ma è più abbondante nei paesi caldi o nelle strutture riscaldate nei paesi temperati (Cabrera 2001). I gestori di cereali tendono a utilizzare insetticidi sintetici e fumiganti per controllare gli insetti nei depositi di cereali, ma i loro usi possono determinarne un significativo aumento dei prezzi e resistenza ai pesticidi (Isman 2004). Questi problemi hanno incoraggiato nuovi studi e nuove tattiche di controllo dei parassiti come l'uso di insetticidi ecologici, facilmente producibili da agricoltori e piccole industrie, e l'utilizzato di polveri, estratti e oli (Guzzo et al. 2006; Nikkon et al. 2009). Di conseguenza, un grande interesse per i prodotti vegetali naturali, come quelli a base di oli essenziali (Pavela and Benelli 2016) o a base di estratti con proprietà insetticide, è continuato a crescere negli ultimi anni e in alcuni paesi extraeuropei esistono specifici requisiti normativi per l'uso di estratti vegetali e oli essenziali in campo fitosanitario (Isman 2019).

Drimia pancration (Steinh.) JC Manning & Goldblatt [sin. *Scilla pancration* (Steinh.) Nyman, *Urginea maritima* subsp. *pancration* (Steinh.) K. Richt., *Squilla pancration* Steinh., *Charybdis pancration* (Steinh.) Speta] è un genere di pianta da fiore appartenente alla famiglia delle Asparagaceae, presente in Nord Africa (Marocco, Algeria, Libia), Italia meridionale, Malta, Baleari e Corsica (Euro Med Plant Base: <https://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/query.asp>). Ha foglie dure, di colore verde brillante e lanceolate. Durante la stagione della fioritura (agosto-settembre) ha un lungo gambo, che può raggiungere un'altezza di 1.5 m ed è sormontata da un'infiorescenza che porta molti piccoli fiori di colore tra il rosa e il bianco. La specie strettamente imparentata, *Drimia maritima* (L.) Stearn [sin. *Urginea maritima* (L.) Baker], nota con diversi nomi comuni tra cui scilla, scilla di mare, cipolla di mare, è stata ampiamente studiata. Viene coltivato nell'area mediterranea ed è utilizzata come a cardiotonico, diuretico, per il trattamento del marasma cardiaco e degli edemi (Mitsushashi et al. 1994), e come rodenticida (O'connor et al. 1935). Precedenti studi fitochimici sui bulbi di *D. maritima* hanno

portato all'isolamento di glicosidi cardiaci (Kopp et al. 1996; Crenn et al. 2000), antociani (Fernandez et al. 1972), lignani (Iizuka et al. 2001), flavonoidi, acidi grassi e polisaccaridi (Fernandez et al. 1972). Alcuni altri studi scientifici hanno dimostrato che i metaboliti di questa pianta inibiscono la pompa sodio-potassio, detta anche pompa Na^+/K^+ ATP-dipendente (Na^+/K^+ ATPasi) (Schoenfeld et al. 1985). D'altro lato, sono stati pubblicati solo due articoli su *D. pancraticum* (Kopp et al. 1990; Krenn et al. 1992). Entrambi gli articoli riguardano l'isolamento di diversi bufadienolidi da piante di due stazioni del Sud Italia.

6.1.3. Materiali e metodi

6.1.3.1. Procedure sperimentali generali

La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice (70-230 mesh ASTM, Merck n. 7734) disattivato con acqua deionizzata al 15%. È stata condotta la cromatografia radiale utilizzando uno strumento Chromatotron (modello 7924T) e con gel di silice (60 PF254, Merck n. 7749). La liofilizzazione è stata condotta utilizzando lo strumento CoolSafe (15 L). I poteri ottici sono stati misurati con uno strumento JASCO P-1010. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno strumento Bruker Avance II (400 MHz per ^1H NMR e 100 MHz per ^{13}C -NMR). Per la cromatografia su strato sottile sono state impiegate lastre di alluminio 60 F254 neutro (Merck). Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando un apparato HPLC/ESI/Q-TOF HRMS. Le condizioni dell'HPLC erano le seguenti: acqua, acetonitrile e acido formico, di grado HPLC/MS; il sistema HPLC era un Agilent 1260 Infinity; per la cromatografia è stata impiegata una colonna C18 a fase inversa (ZORBAX Extended-C18 2.1 50 mm, 1.8 μm), dotata di una precolonna (4 mm 3 mm) di sicurezza Phenomenex C18; il flusso era di 0.4 mL/min e la temperatura della colonna è stata fissata a 30 °C. Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando uno Spettrometro Agilent Q-TOF di massa accurata 6540 UHD dotato di doppia sorgente AJS ESI, lavorando sia in modalità negativa che positiva. Tutti i solventi utilizzati erano di grado analitico (Honeywell).

6.1.3.2. Materiale vegetale

I bulbi di *D. pancraticum* (L.) Stearn sono stati raccolti a Cinisi, in provincia di Palermo, Sicilia, Italia, nel gennaio 2020 e identificati dal Prof. Vincenzo Ilardi (Università degli Studi di Palermo). Un *voucher* è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo, con il numero PAL 264/2020.

6.1.3.3. Insetti

Gli adulti di *S. paniceum* (L.) (di circa 5 ± 2 giorni) sono stati ispezionati in un ambiente controllato a 28 ± 1 °C e con 70% di umidità relativa, al buio. La selezione degli insetti da testare è avvenuta casualmente, inserendoli in stanze di allevamento e acclimatandoli nella stanza dei saggi biologici per più di un'ora prima dell'inizio degli esperimenti. Gli adulti non sono stati privati del cibo prima delle prove. L'identificazione del sesso non è stata eseguita. Per valutare la tossicità da contatto, la repellenza e tossicità per ingestione, 100 g degli estratti in metanolo e in butanolo sono stati impiegati per ricavarne due soluzioni concentrate e da cui ottenere cinque differenti soluzioni diluite in acqua per HPLC a varie concentrazioni (6.0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g/mL}$).

6.1.3.4. Estrazione e isolamento

I bulbi essiccati all'aria di *D. pancraticum* (1.5 kg) sono stati tagliati e triturati con un mortaio ed estratti con solventi a polarità crescente: etere di petrolio (3×2.5 L, 24 ciascuno), CHCl_3 (3×2,5 L, 24 h ciascuno) e CH_3OH (6×5 L, estrattore Soxhlet). Il risultante estratto metanolico (133 g) è stato concentrato sottovuoto (40 °C), disciolto in H_2O (0.25 L) e separato successivamente in H_2O -*n*-BuOH per dare due frazioni di cui una in H_2O (120.9 g) e una in *n*-BuOH (12.1 g). La porzione *n*-BuOH è stata separata con gel di silice con cromatografia su colonna mediante miscela EtOAc–MeOH– H_2O –HCOOH (90:8:1.8:0.2) per dare 16 frazioni (LA1–LA16). La frazione A6 (0.29 g) è stata sottoposta a colonna gravitazionale e cromatografia radiale utilizzando la miscela CHCl_3 –EtOAc–MeOH (15:82:3) per ottenere il composto **1** (40 mg). La frazione A7 (0.24 g) è stata sottoposta a cromatografia

radiale con CHCl_3 -MeOH (da 94:6 a 92:8) per ottenere il composto **2** (34 mg). Anche la frazione A10 (0.32 g) è stata separata con colonna cromatografia impiegando la miscela CHCl_3 -MeOH- H_2O -toluene (70:20:3:7) per ottenere i composti **3** (29 mg) e **4** (24 mg).

(2*R*,3*R*)-dihydrokaempferol 3-*O*- β -D-glucoside (1)

Solido amorfo giallo; $[\alpha]_D^{30} = -30.2$ ($c = 0.1$, MeOH); i valori ^1H e ^{13}C -NMR sono riportati nella **Tabella 1**; ESIMS m/z 449.1043 $[\text{M}-\text{H}]^-$, (calcolata per $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, m/z 449.1089).

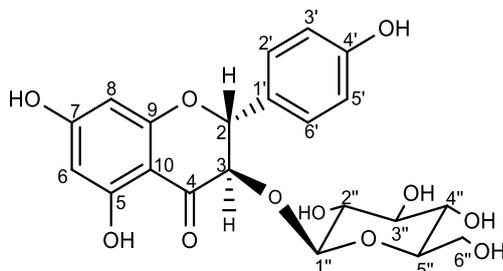


Fig. 1. Struttura chimica del (2*R*,3*R*)-dihydrokaempferol 3-*O*- β -D-glucoside.

Tabella 1. ^1H -NMR e ^{13}C -NMR per il composto **1** (δ in ppm).

Posizione	δ_C^a	δ_C^b	δ_H^a (J in Hz)
1	-	-	-
2	83.57	83.6	5.25 (d, 10.3)
3	77.73	77.2	4.94 (d, 10.3)
4	196.23	196.2	-
5	165.45	164.3	-
6	97.22	96.4	5.95 (m)
7	169.30	169.2	-
8	96.48	97.4	5.95 (m)
9	164.29	165.6	-
10	102.54	102.6	-
1'	128.42	128.6	-
2'	130.52	130.5	7.37 (d, 8.5)
3'	116.29	116.3	6.83 (d, 8.5)
4'	159.35	159.4	-
5'	116.29	116.3	6.83 (d, 8.5)
6'	130.52	130.5	7.37 (d, 8.5)
1''	103.06	102.6	3.83 (d, 7.7)
2''	74.50	74.6	3.23 (t, 9.0)
3''	77.42	77.6	3.12 (t, 9.0)
4''	70.87	71.3	3.30 (m)
5''	78.02	78.3	3.00 (m)
6''	61.39	62.7	3.67 (dd, 4.8, 12.0) 3.75 (dd, 2.4, 12.0)

^a Misurato in CD_3OD (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz); ^b Misurato in CD_3OD (^{13}C : 100 MHz)

(5 α)-4,5-Dihydro-16 β -hydroxyscillirosidin 3-*O*- α -L-thevetopyranoside (2)

Solido amorfo; $[\alpha]_D^{30} = -68.5$ ($c = 0.1$, MeOH); i valori ^1H e ^{13}C -NMR sono riportati nella **Tabella 2**; ESIMS m/z 643.3124 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calcolata per $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_{11}$, m/z 643.3089).

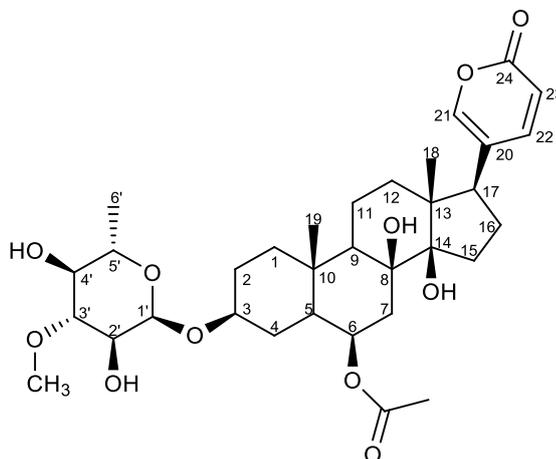


Fig. 2. Struttura chimica del (5 α)-4,5-dihydro-16 β -hydroxyscillirosidin 3-*O*- α -L-thevetopyranoside (2).

Tabella 2. ^1H -NMR e ^{13}C -NMR per il composto (2) (δ in ppm).

Posizione	δ_C^a	δ_C^b	δ_H^a (J in Hz)
1 β	40.58	37.8	1.07 (m)
1 α			1.81 (m)
2 α	30.08	29.2	1.29 (m)
2 β			1.71 (m)
3 α	78.06	76.3	3.63 (m)
4 β	31.85	31.3	1.64 (m)
4 α			1.72 (m)
5 α	46.84	46.6	1.41 (ddd, 2.6, 2.6, 2.8)
6 α	75.48	77.4	5.07 (dd, 2.6, 3.5)
7 α	38.27	41.6	1.71 (dd, 4.0, 12.0)
7 β			2.26 (dd, 2.6, 15.3)
8	77.67	77.2	-
9 α	51.61	52.5	1.32 (m)
10	37.01	36.5	-
11 α	19.36	18.9	1.50 (m)
11 β			1.83 (m)
12 β	42.10	40.2	1.45 (m)
12 α			1.56 (m)
13	50.43	49.9	-
14	86.52	85.8	-
15 β			1.70 (m)
15 α	35.16	34.6	2.12 (m)
16 β	29.82	29.6	1.82 (m)
16 α			2.18 (m)
17 α	52.94	51.2	2.53 (dd, 6.3, 9.6)
18	19.76	19.5	0.87 (s)

19	15.51	15.3	1.23 (s)
20	125.152	124.5	-
21	150.38	149.5	7.41 (dd, 2.5, 1.0)
22	149.28	148.6	8.01 (dd, 2.5, 9.8)
23	115.46	115.3	6.29 (dd, 9.8, 1.0)
24	164.77	164.3	-
1'	98.38	97.7	4.86 (d, 3.9)
2'	73.55	72.9	3.40 (dd, 9.6, 3.9)
3'	84.92	84.5	3.27 (dd, 9.6, 8.8)
4'	77.16	74.9	3.00 (dd, 9.6, 8.7)
5'	68.90	68.4	3.71 (m)
6'	17.99	17.8	1.19 (d, 6.2)
<u>C</u> O (Ac)	172.42	171.6	-
CH ₃ (Ac)	21.31	21.4	2.04 (s)
OCH ₃	61.18	-	3.62 (s)

^a Misurato in CD₃OD (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz); ^b Misurato in CDCl₃:CD₃OD 1:1 (¹³C: 62.5 MHz)

Scilliglaucoside (3)

Solido amorfo; $[\alpha]_D^{30} = +30.8$ ($c = 0.1$, MeOH); i valori ^1H e ^{13}C -NMR sono riportati nella **Tabella 3**; ESIMS m/z 583.2513 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calcolata per $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$, m/z 583.2513).

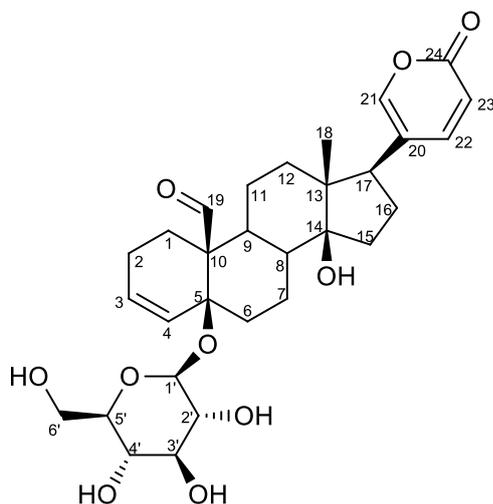


Fig. 3. Struttura chimica del scilliglaucoside (3).

Tabella 3. ^1H -NMR e ^{13}C -NMR del composto (3) (δ in ppm).

Posizione	δ_c^a	δ_c^b	δ_H^a (J in Hz)
1			2.16 (m)
1	20.27	19.9	2.03 (m)
2 α	24.80	24.4	1.14 (m)
2 β			2.18 (m)
3	130.27	130.1	5.52 (brdd 2.0, 10.0)
4	133.88	133.4	6.03 (d, 4.3, 9.8)
5	78.81	78.4	-
6 β			2.24 (m)
6 α	35.26	34.9	2.11 (m)
7 β			1.49 (m)
7 α	23.70	23.5	1.88 (m)
8 β	42.96	42.6	1.88 (m)
9 α	40.16	39.8	1.49 (m)
10	54.02	53.7	-
11 α			1.48 (m)
11 β	22.21	21.9	1.88 (m)
12 β			1.37 (m)
12 α	41.37	41.2	1.49 (m)
13	50.21	49.6	-
14	85.32	84.8	-
15 β			1.59 (m)
15 α	32.08	31.9	1.92 (m)
16 β			1.71 (m)
16 α	29.44	29.2	2.16 (m)
17 α	51.67	51.5	2.54 (dd, 6.9, 9.6)

18	16.91	16.8	0.68 (s)
19	209.45	209.0	10.03 (s)
20	124.67	124.1	-
21	150.31	149.5	7.43 (dd, 1.0, 2.5)
22	149.13	148.5	7.97 (dd, 2.5, 9.8)
23	115.22	115.2	6.27 (dd, 1.0, 9.8)
24	164.64	164.1	-
1'	96.6	97.6	4.52 (d, 7.80)
2'	74.92	74.3	3.04 (t, 8.4)
3'	77.12	76.4	3.16 (m)
4'	74.48	71.1	3.27 (m)
5'	78.01	77.4	3.30 (m)
6'	62.65	62.4	3.62 (m)
			3.76 (d, 2.5)

^a Misurato in CD₃OD (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz); ^b Misurato in CDCl₃:CD₃OD 1:1 (¹³C: 100 MHz).

(5 α)-4,5-Dihydrosicillirosidin
thevetopyranoside] (4)

3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-

Solido amorfo; $[\alpha]_D^{30} = -52.6$ ($c = 0.1$, MeOH); i valori ^1H e ^{13}C -NMR sono riportati nella **Tabella 4**; ESIMS m/z 805.3617 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calcolata per $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{O}_{16}$, m/z 805.3617).

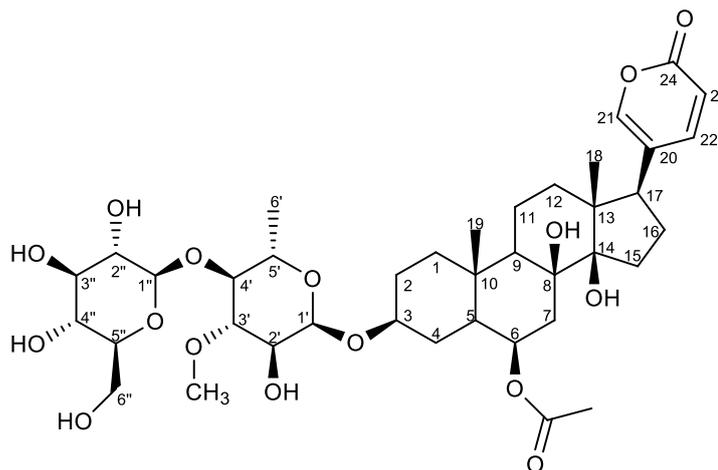


Fig. 4. Struttura chimica del (5 α)-4,5-dihydrosicillirosidin 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-thevetopyranoside] (4).

Tabella 4. ^1H -NMR e ^{13}C -NMR per il composto (4) (δ in ppm).

Posizione	δ_c^a	δ_c^b	δ_H^a (J in Hz)
1 α			1.80 (m)
1 β	40.56	37.7	1.07 (m)
2 β			1.80 (m)
2 α	29.80	29.1	1.72 (m)
3 α	78.03	75.0	3.62 (m)
4 α			1.73 (m)
4 β	31.84	31.2	1.65 (m)
5 α	46.83	46.5	1.41 (ddd, 12.7 2.6, 2.6)
6 α	75.50	77.1	5.07 (dd, 2.6, 3.0)
7 β			2.27 (dd, 15.2, 2.4)
7 α	38.27	41.5	1.73 (dd, 15.2, 4.0)
8	77.68	77.4	-
9 α	51.60	52.4	1.33 (m)
10	37.01	36.5	-
11 α			1.51 (m)
11 β	19.36	18.8	1.85 (m)
12 α			1.57 (m)
12 β	42.11	40.2	1.47 (m)
13	50.44	49.9	-
14	86.53	85.7	-
15 α			2.12 (m)
15 β	35.16	34.7	1.72 (m)

16 α	30.07	29.6	2.19 (m)
16 β			1.73 (m)
17 α	52.94	51.1	2.53 (dd, 9.7, 6.4)
18	19.75	19.5	0.87 (s)
19	15.50	15.3	1.23 (s)
20	125.17	124.4	-
21	150.38	149.4	7.41 (dd, 2.5, 1.0)
22	149.31	148.5	8.01 (dd, 9.8, 2.6)
23	115.45	115.2	6.29 (dd, 9.8, 1.0)
24	164.80	164.2	-
<u>C</u> O (Ac)	172.44	171.6	-
<u>CH</u> ₃ (Ac)	21.31	21.3	2.04 (s)
<u>OCH</u> ₃	61.35	61.1	3.64 (s)
1'	98.28	97.5	4.83 (d, 3.7)
2'	74.13	73.4	3.44 (dd, 9.6, 3.7)
3'	85.19	84.4	3.50 (dd, 9.6, 8.6)
4'	81.80	81.9	3.36 (dd, 9.5, 8.6)
5'	67.83	67.2	3.75 (m)
6'	18.21	17.8	1.25 (d, 6.3)
1''	104.56	104.2	4.61 (d, 7.8)
2''	75.62	74.9	3.16 (dd, 9.2, 7.8)
3''	77.91	76.8	3.37 (dd, 9.2, 8.7)
4''	71.91	71.2	3.28 (t, 8.3)
5''	77.91	77.3	3.25 (m)
6''	62.99	62.6	3.85 (dd, 11.9, 2.2)
			3.67 (m)

^a Misurato in CD₃OD (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz)

^b Misurato in CDCl₃:CD₃OD 1:1 (¹³C: 62.5 MHz)

6.1.3.5. Tossicità per contatto

La tossicità per contatto degli estratti di *D. pancration* verso gli adulti di *Stegobium paniceum* è stata determinata tramite applicazione topica (**Fig. 5**).

1 μL di ciascuna diluizione è stata applicata sulle elitre degli insetti usando una siringa Hamilton da 5 μL . Per ogni soluzione sono state condotte 10 repliche (10 insetti). Le concentrazioni sono state espresse come μg di soluzione per adulto. Gli insetti trattati con sola acqua per HPLC sono stati usati come controllo. Dopo l'applicazione, gli insetti, singolarmente, sono stati posti in microtubi Eppendorf (2 mL). Il numero d'insetti morti è stato verificato dopo 24 h. La percentuale di mortalità è stata statisticamente analizzata tramite ANOVA e i trattamenti sono stati comparati con il test di Tukey.

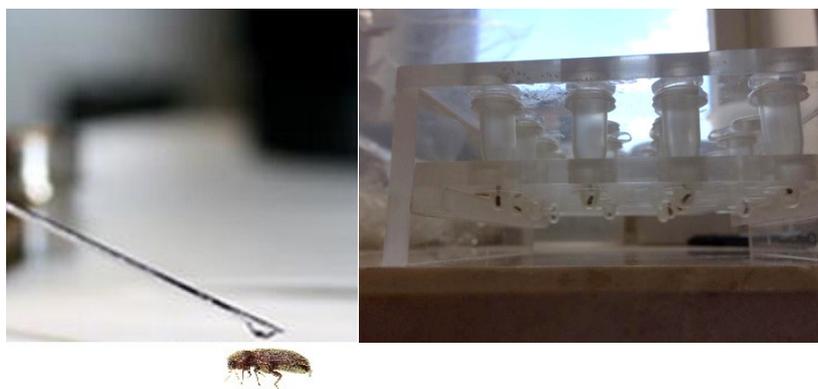


Fig. 5. Test biologico di tossicità da contatto. Applicazione topica a sinistra. A destra, microprovette Eppendorf contenenti adulti trattati di *S. paniceum*.

6.1.3.6. Tossicità per repellenza

L'attività di repellenza delle soluzioni degli estratti di *D. pancration* verso gli adulti di *S. paniceum* è stata valutata tramite dischi carta filtro (Whatman No. 1, \varnothing 8.0 cm) divisi a metà. Una metà è stata trattata uniformemente con 100 μL di ciascuna soluzione usando una micropipetta e l'altra metà è stata trattata con uguale volume di acqua come controllo. Entrambi i trattamenti sono stati fatti asciugare per dieci minuti per favorire la completa evaporazione del solvente. I dischi di carta filtro, in seguito, sono stati posti in capsule Petri (9 cm). 5 adulti di *S. paniceum* sono stati posti al centro dei dischi di carta filtro (**Fig. 6**). Le soluzioni degli estratti sono state testate e ogni biosaggio è stato replicato 6 volte. Il numero degli insetti presenti

nella porzione di trattamento e di controllo è stato valutato a intervalli di 15 minuti per un'ora. La percentuale di scelta totale è stata calcolata tramite χ^2 .



Fig. 6. Attività di repellenza su dischi di carta filtro.

6.1.3.7. Tossicità per ingestione

La tossicità per ingestione è stata valutata su biscotti di circa 0.4 g cui è stata aggiunta un'aliquota di 50 μ L di ciascuna soluzione. Come controllo sono stati usati biscotti impregnati con un'uguale aliquota di acqua. 5 insetti e ciascun biscotto intriso della relativa soluzione e del controllo sono stati posti in capsule Petri (9 cm). 6 repliche (30 insetti) per trattamento sono state usate per valutare la tossicità alle diverse dosi rispetto al controllo (**Fig. 7**). Gli insetti, prima dei biosaggi sulla tossicità, sono stati tenuti a digiuno per 24 h e il numero d'insetti morti è stato valutato dopo 24 h da ciascun trattamento. La percentuale di mortalità è stata statisticamente analizzata tramite ANOVA e i trattamenti sono stati comparati tramite test di Tukey.



Fig. 7. Saggio biologico sull'ingestione. In alto, capsule Petri contenenti biscotti intrisi delle soluzioni metanoliche e adulti di *S. paniceum*; in basso capsule Petri contenenti biscotti intrisi delle soluzioni butanoliche e adulti di *S. paniceum*; all'estrema destra capsula Petri contenente un biscotto intriso di acqua per controllo e adulti di *S. paniceum*.

6.1.3.8. Analisi statistica

Le risposte sulla prima scelta, utilizzate per valutare l'attività repellente, di *S. paniceum* sono state analizzate mediante χ^2 . Le tossicità per contatto e per ingestione sono state eseguite mediante analisi di varianza (ANOVA unidirezionale) seguite dal test di Tukey. Tutte le analisi statistiche sono state fatte utilizzando Statistica 7.0 per Windows (Statsoft 2001, Vigonza, PD, Italia).

6.1.4. Risultati e discussioni

6.1.4.1. Caratterizzazione chimica dei singoli metaboliti

L'estratto butanolico dei bulbi essiccati di *D. pancration* è stato sottoposto a diverse separazioni cromatografiche al fine di ottenere quattro composti **1-4** (Fig. 8). Il composto **1** è stato ottenuto come polvere amorfa gialla. Lo spettro di massa ha mostrato uno ione molecolare a m/z 449.1040 ($[M-H]^-$, calcolato per 449.1089), che concordava con la formula molecolare $C_{21}H_{22}O_{11}$. Lo spettro 1H -NMR di **1** (Tabella 1) ha mostrato caratteristici segnali per un flavonolo: 2 protoni aromatici H-6 e H-8 ($\delta = 5.95$, s, 2H), protoni per un anello aromatico *p*-di-sostituito a $\delta_H = 7.37$ (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6') e a $\delta_H = 6.83$ (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5') e

due protoni legati al C-2 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-2) e al C-3 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3).

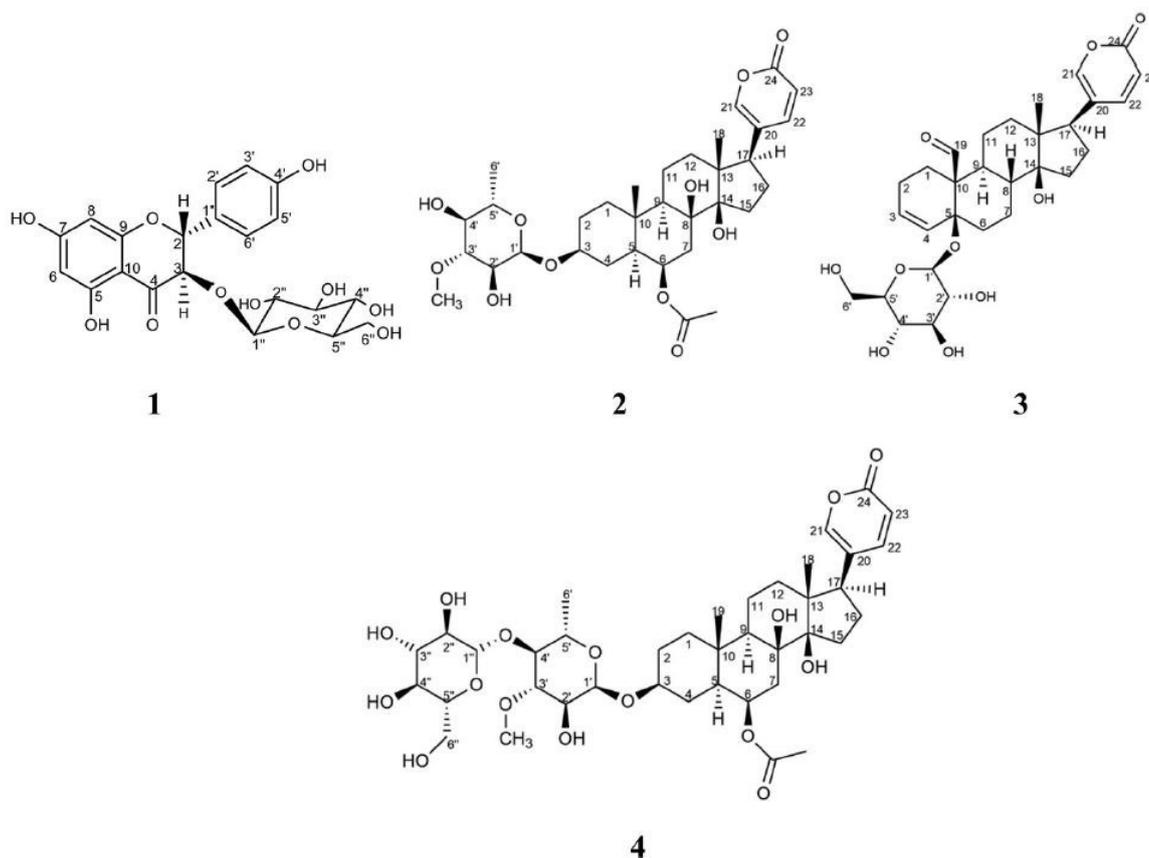


Fig. 8. Strutture chimiche dei composti 1-4.

Lo spettro ^{13}C -NMR di **1** mostravano 15 segnali di carbonio (**Tabella 1**) in accordo con una struttura flavanolica. Inoltre, lo spettro protonico e carbonico hanno mostrato segnali tipici di un'unità di glucosio (**Tabella 1**). Le correlazioni HMBC del protone H-2 con i carboni C-3, C-4, C-9, C-10 e C-2'/6', di H-3 con C-2, C-4, C-10 e C-1', di H-1'' con C-3 e di H-3 con il carbonio C-1'', hanno confermato la presenza di una porzione aglicolica di 3,5,7,4'-tetraidrossi-diidroflavone e il legame della frazione zuccherina sul C-3. La relativa stereochimica 2-3-*trans* è stata facilmente identificabile dalla costante di accoppiamento nello spettro ^1H -NMR ($J_{2-3} = 10.3$ Hz) e la presenza di un'unità β -D-glucopiranosio è stata evidenziata dalla caratteristica costante di accoppiamento del protone anomero ($J = 7.7$ Hz) e dai suoi *chemical shifts* nello spettro carbonico. Di conseguenza, il composto **1** è stato dedotto come (2R,3R)-dihydrokaempferol 3-O- β -D-glucoside, un metabolita

precedentemente isolato da altre specie, ma mai rilevato in *D. pancration*. Tutti i dati combaciavano con quelli riportati (Baderschneider and Winterhalter 2001; Gödecke et al. 2005).

Il composto **2** è stato separato come polvere amorfa. Ha mostrato nello spettro di massa uno ione molecolare a m/z 643.3124 $[M+Na]^+$ (calcd. per 643.3089), in accordo con la formula molecolare $C_{33}H_{48}O_{11}$. Gli spettri H-NMR e C-NMR (**Tabella 2**) mostravano segnali per un anello $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -lattonico insaturo a $\delta_H = 7.41$ (H-21), 8.01 (H-22), 6.29 (H-23) e a $\delta_C = 125.15$ (C-20), 150.38 (C-21), 149.28 (C-22), 115.46 (C-23) e 164.77 (C-24), due gruppi metilici angolari ($\delta_H = 0.87$, 3H, s, $\delta_C = 19.76$, Me-18 e $\delta_H = 1.23$, 3H, s, $\delta_C = 15.51$, Me-19), due metini ossigenati C-6 ($\delta_H = 5.07$, ddd, $\delta_C = 75.48$) e C-3 ($\delta_H = 3.63$, m, $\delta_C = 78.06$) e due carboni ossigenati di tipo quaternari ($\delta_C = 77.67$, C-8, e $\delta_C = 86.52$, C-14). Inoltre, sono stati osservati segnali per un gruppo acetile ($\delta_H = 2.04$, s, $\delta_C = 21.31$, $\delta_C = 172.42$) e una porzione glicosilata per la presenza di un α -L-tevetopiranoside (**Tabella 2**). Mediante l'analisi attraverso spettri DEPT, 1H - 1H COSY, HSQC e HMBC (**Fig. 9**), è stata determinata la struttura completa del composto **2**. Infatti, le correlazioni, nello spettro HMBC, tra il protone anomero H₁₀ ($\delta_H = 4.86$, d, $J = 3.9$ Hz) e C-3 ($\delta_C = 78.06$), e del protone H₆ ($\delta_H = 5.07$) e del gruppo carbonilico dell'acetile ($\delta_C = 172.42$), hanno chiaramente indicato il legame della parte zuccherina e dell'acetile al C-3 e C-6, rispettivamente.

Infine, le correlazioni NOESY tra Me-19/H_{2ax}, Me-19/H_{4ax}, H_{2ax}/H_{4ax}, Me-19/H_{11ax}, H_{11ax}/Me-18, H_{17ax}/H_{16eq}, H_{17ax}/H_{12ax}, H_{16eq}/H_{12ax}, H_{12ax}/H_{9ax}, H_{9ax}/H_{5ax}, H_{1ax}/H_{5ax}, H_{4eq}/H_{6eq}, H_{3ax}/H_{10ax}, non solo hanno confermato l'orientamento β del gruppo acetile e del legame glicosidico, ma anche della corretta giunzione tra gli anelli agliconi: *trans* tra gli anelli A/B e B/C e *cis* tra il C/D. Di conseguenza, la struttura del composto **2** è stato identificato con il nome (5 α)-4,5-dihydro-16 β -hydroxyscillirosidin 3-*O*- α -L-thevetopyranoside, precedentemente isolato in *D. maritima* (Kopp et al. 1996) ma non in *D. pancration*.

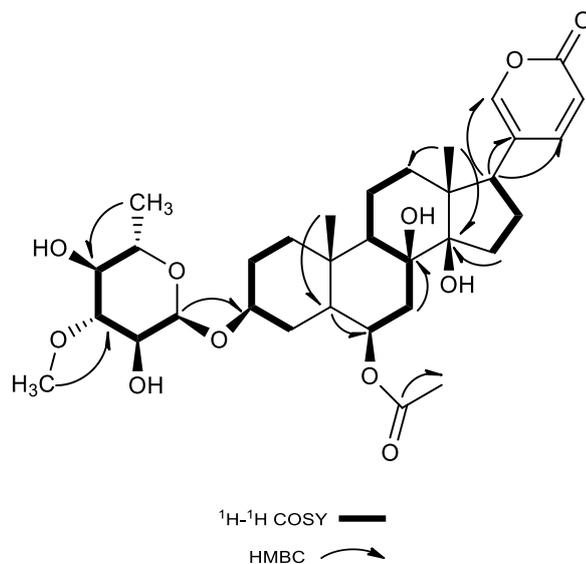


Fig. 9. Alcune correlazioni determinate attraverso gli spettri HMBC e $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY.

Il composto **3** è stato ottenuto come polvere amorfa e lo spettro di massa mostrava uno ione molecolare a m/z 583.2513 (calc. per 583.2513) per una formula molecolare quale $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gli spettri ^1H -NMR e ^{13}C -NMR (**Tabella 3**) hanno mostrato segnali per un anello $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -lattone insaturo a $\delta_{\text{H}} = 7.43$ (H-21), 7.97 (H-22), 6.27 (H-23), anche confermati da segnali $\delta_{\text{C}} = 124.67$ (C-20), 150.31 (C-21), 149.13 (C-22), 115.22 (C-23) e 164.64 (C-24), per un gruppo β -D-glucopiranosile, segnali per una funzione aldeidica ($\delta_{\text{H}} = 10.03$, H-19; $\delta_{\text{C}} = 209.45$, C-19), e per due carboni ossigenati quaternari ($\delta_{\text{C}} = 78.81$, C-5 e $\delta_{\text{C}} = 85.32$, C-14) e per un metile angolare ($\delta_{\text{C}} = 16.91$) assegnato al Me-18, in accordo anche con la correlazione HMBC con H-17 ($\delta_{\text{H}} = 2.53$). I protoni metilici ($\delta_{\text{H}} = 0.86$) hanno mostrato nello spettro HMBC una correlazione con un carbonio quaternario a $\delta_{\text{C}} = 50.21$, segnale che può essere assegnato al C-13. Il doppietto a δ_{H} 5.52 ($J = 10.00$ Hz) e il doppietto a 6.03 ppm dei due protoni olefinici indicavano un doppio legame tra C-3 e C-4. Il legame tra lo zucchero e lo scheletro agliconico è stato determinato mediante correlazione HMBC tra H-10 ($\delta_{\text{H}} = 4.52$, d, $J = 7.8$ Hz) e C-5 ($\delta_{\text{C}} = 78.81$). Le relative configurazioni di tutti i centri stereogenici del composto **3** sono stati determinati mediante l'esperimento NOESY. Le correlazioni (**Fig. 10**) di $\text{H}_{8\text{ax}}$ con $\text{H}_{6\text{ax}}$, Me-18, $\text{H}_{11\text{ax}}$ e il protone aldeidico hanno confermato la giunzione *trans* tra l'anello B e C, mentre, in questo caso, a differenza del composto **2**, le correlazioni NOESY di $\text{H}_{6\text{eq}}$ con $\text{H}_{4\text{ax}}$, $\text{H}_{9\text{ax}}$ con $\text{H}_{2\text{ax}}$ e $\text{H}_{16\text{eq}}$ con i protoni $\text{H}_{17\text{ax}}$ e $\text{H}_{12\text{ax}}$ hanno

delucidato le giunzioni tra gli anelli A/B e C/D di tipo *cis*. Infine, al gruppo ossidrilico nella posizione 14 è stata assegnata una configurazione β . Pertanto, la struttura del composto **3** è quella del bufadienolide scilliglaucoside (Kopp et al. 1990).

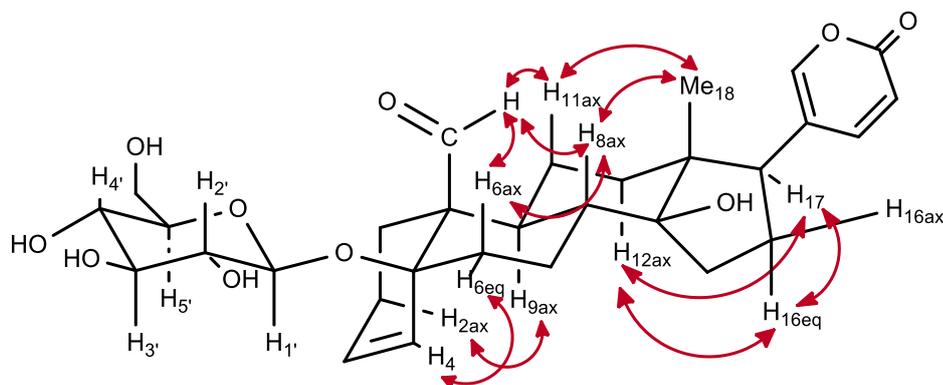


Fig. 10. Le correlazioni NOESY nel composto scilliglaucoside.

Il composto **4** è stato ottenuto come polvere amorfa e la sua formula molecolare è risultata essere $C_{39}H_{58}O_{16}$ secondo lo ione molecolare a m/z 805.3617 $[M+Na]^+$, (calc. per $C_{39}H_{58}O_{16}$, m/z 805.3617). Confrontando e analizzando i dati NMR di **4** (**Tabelle 4**) con quelli del composto **2**, è possibile notare una stretta somiglianza tra le strutture di entrambi i composti, con la presenza di uno zucchero aggiuntivo nel composto **4**, come indicato dal segnale addizionale di un protone anomero (δ_H 0 4.61, 1H, d, $J = 7.8$, H-1''; $\delta_c = 104.56$, C-1''). La giunzione dell'unità di glucosio al C-4 dell'L-tevetopiranoside è stata determinata dalle correlazioni HMBC osservate tra $\delta_H = 4.61$ (1H, d, H1'') e δ_c 81.80 (C-4').

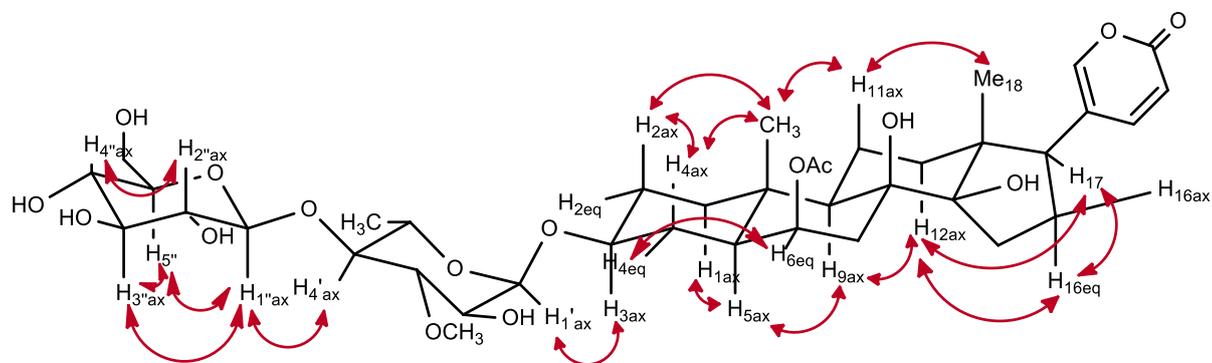


Fig. 11. Correlazioni NOESY nel composto (5 α)-4,5-dihydroscillirosidin 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-thevetopyranoside].

Le relative configurazioni di **4** sono state determinate essere uguali a quelle del composto **2** grazie allo spettro NOESY (**Fig. 11**). Di conseguenza, la struttura di **4** è stata inquadrata quale (5 α)-4,5-dihydrosicillirosidin 3-*O*-[β -D-glucopiranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-thevetopyranoside] (Kopp et al. 1990).

6.1.4.2. Tossicità per contatto

La tossicità per contatto delle diverse soluzioni degli estratti in metanolo e in butanolo non è risultata essere significativa. I risultati di tossicità, tra le dosi, entro gli errori sperimentali, non sono risultati essere differenti come evidenziato dal test statistico di Tukey (**Fig. 12**).

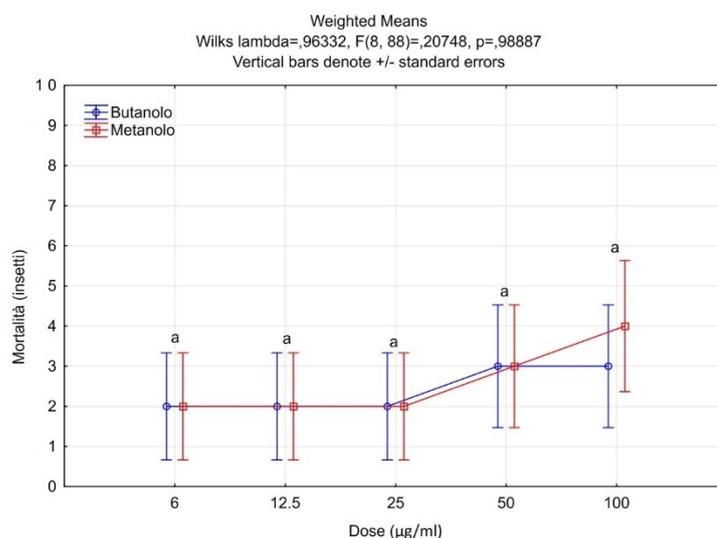


Fig. 12. Tossicità per contatto a diverse concentrazioni degli estratti in metanolo e butanolo di *D. pancration* contro *S. paniceum* adulti 24 ore dopo l'applicazione topica. I valori medi di mortalità, aventi la stessa lettera, non sono statisticamente differenti $P = 0.99$ (test Tukey HSD).

6.1.4.3. Repellenza

I test biologici di repellenza dell'estratto in metanolo e in butanolo, eseguiti su carta filtro, hanno mostrato dei risultati non significativi all'aumentare della concentrazione (**Fig. 13**).

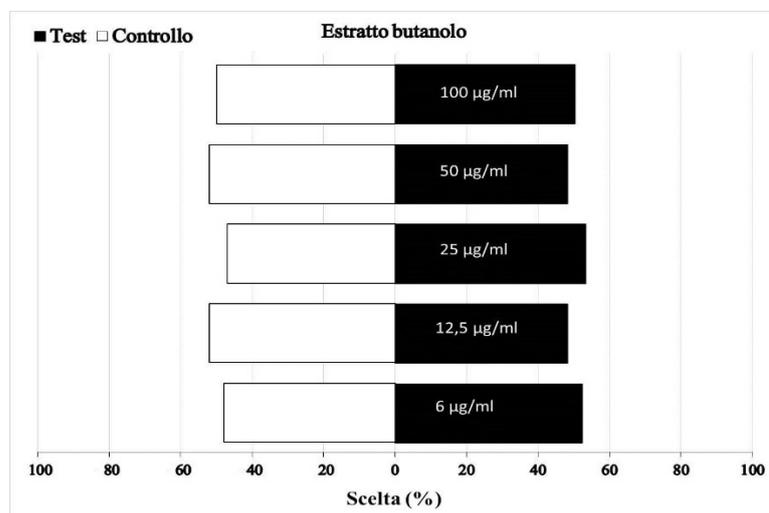
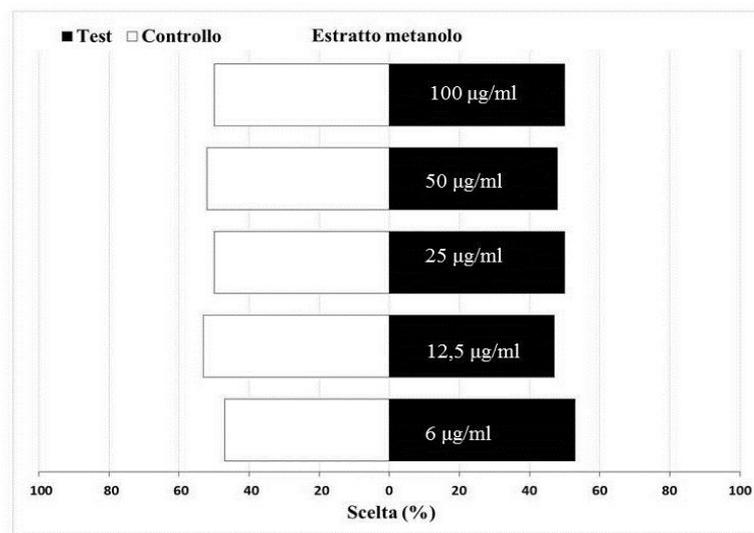


Fig. 13. Biosaggio di repellenza dell'estratto metanolico e butanolico. I biosaggi di repellenza dell'estratto metanolico e butanolico, a diverse dosi, su *S. paniceum*: gli adulti di *S. paniceum* non fanno distinzione tra "controllo" e "test" alle varie concentrazioni utilizzate.

6.1.4.4. Tossicità per ingestione

I saggi per tossicità eseguiti con biscotti per animali hanno mostrato un aumento significativo della mortalità degli adulti di *S. paniceum* all'aumentare della dose (Fig. 14).

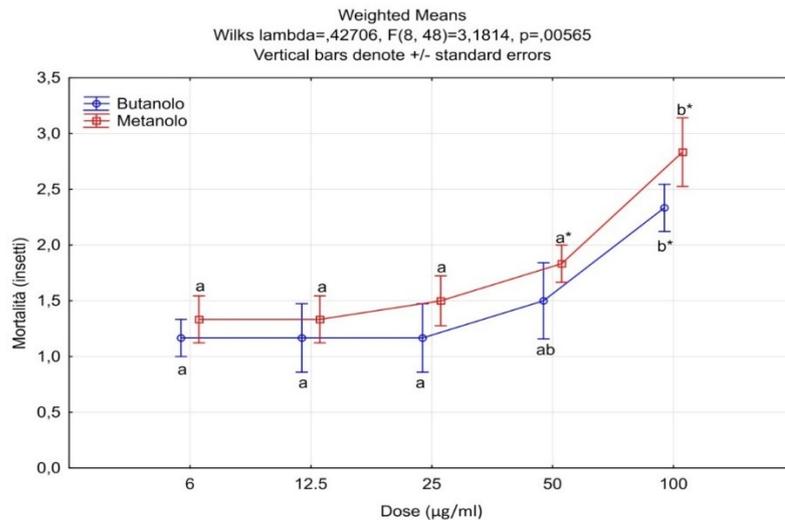


Fig. 14. Biosaggi per ingestione: mortalità di adulti di *S. paniceum* alimentati per 1 giorno con biscotti per animali trattati con concentrazioni crescenti dei due estratti di *D. pancration*. Differenti lettere indicano un effetto statisticamente significativo tra le dosi dello stesso estratto; l'asterisco (*) indica un effetto statisticamente significativo rispetto al controllo (acqua).

Le concentrazioni dell'estratto butanologico da 6 a 25 µg/mL avevano un effetto simile sulla mortalità; la dose 50 µg/mL mostrava un comportamento come le dosi precedenti e come la dose 100. La dose a 100 µg/mL è differita significativamente rispetto alle dosi da 6 a 25 µg/mL ma presentava un effetto simile alla dose 50 µg/mL.

Solo la dose 100 µg/mL ha mostrato un effetto significativo rispetto al controllo acqua. Le concentrazioni dell'estratto metanologico da 6 a 50 µg/mL hanno presentato effetti sulla mortalità simili tra di loro; solo la dose 100 mostrava un effetto differente.

Le dosi da 6 a 25 µg/mL causavano una mortalità non significativa rispetto al controllo acqua, mentre le dosi 50 e 100 µg/mL hanno mostrato un effetto significativo rispetto al controllo. Comparando i risultati ottenuti sui due estratti, l'estratto metanologico qualitativamente mostrava una mortalità maggiore rispetto all'estratto butanologico.

Poiché i bufadienolidi sono facilmente degradabili da acidi o basi, una nuova strategia per superare questi problemi è stata proposta e prende in considerazione l'utilizzo di microsfere lipidiche (Weng et al. 2010) o di microemulsioni (Pavela et

al. 2019; Pavoni et al. 2019) per incorporare i farmaci internamente modulandone il rilascio ed evitando il contatto diretto con l'acqua. I nostri risultati sono in accordo con precedenti ricerche sulle proprietà insetticide di piante appartenenti al genere *Drimia*. Infatti, Pascual-Villalobos e Fernandez (1999) hanno riportato, in un lavoro scientifico, l'inibizione della crescita di larve di *Tribolium castaneum* Herbst quando l'estratto etanologico dei bulbi di *Urginea maritima* (L.) Baker [syn. *Drimia maritima* (L.) Stearn; *Scilla maritima* L.] è stato miscelato al prodotto alimentare in quantità non superiori al 10%. Il potenziale tossico di questa specie è stato segnalato anche contro il punteruolo del riso [*Sitophilus oryzae* (L.)]. Utilizzando test biologici di contatto e di repellenza, è potenziale insetticida di *U. maritima* è stato evidenziato. Valori ottimali di LD₅₀, LC₅₀ e RC₅₀, (19.03 µg/insetto, 2.35 µg/cm² e 0.009 µg/cm²) sono stati ottenuti per i test biologici di contatto mediante applicazione topica, di contatto e di repellenza (Maazoun et al. 2017).

In studi precedenti, Hassid et al. (1976) ha studiato l'effetto delle foglie di *U. maritima* sulla crescita di *Spodoptera littoralis*, evidenziando il potere insetticida dell'acido azetidina-2-carbossilicoisolato come composto puro. Anche l'olio essenziale dei bulbi di *U. maritima* ha mostrato buone proprietà insetticide, inibendo a deposizione delle uova del punteruolo cinese (*Callosobruchus chinensis* L.) (Fatiha et al. 2014). Infine, l'estratto acquoso di *U. maritima* si è dimostrato attivo contro *Meloidogyne incognita* (Nematoda: eteroderidi). Infatti, l'estratto applicato al terreno ha ridotto il rischio vitale delle radici causato da *M. incognita* e la resa di pomodoro è migliorata rispetto al controllo non trattato (Kaşkavalci and Civelek 2009).

6.1.5. Conclusioni

La nostra indagine fitochimica sui bulbi di *D. pancraticum* ha portato all'isolamento e all'identificazione di quattro composti, tre noti bufadienolidi e un noto flavonolo, ma quest'ultimo mai isolato da questa specie vegetale. I diversi composti sono stati caratterizzati mediante HPLC-MS, $[\alpha]_D$, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, NOESY e analisi NMR bidimensionali (2D). Sono stati anche effettuati saggi biologici, utilizzando estratti in metanolo e in butanolo di *D. maritima*, su adulti, non distinti per sesso, della specie *S. paniceum*. Gli estratti non hanno mostrato risultati significativi né

per attività repellente né per la tossicità da contatto; mentre la tossicità per ingestione ha mostrato risultati interessanti già alla dose 100 µg/mL per entrambi gli estratti utilizzati. La presente indagine ha suggerito che *D. pancration* potrebbe diventare una potenziale fonte di prodotti naturali che possono contribuire alla riduzione efficace di popolazioni di insetti come *S. paniceum*. I risultati di questo studio possono essere utili per lo sviluppo di un sistema *trap and kill* efficace ed economicamente sostenibile per il monitoraggio di adulti di *S. paniceum*.

6.1.6. Bibliografia

Baderschneider B, Winterhalter P (2001) Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49(6):2788–2798.

Cabrera BJ (2001) Drugstore Beetle, *Stegobium paniceum* (L.) (Insecta: Coleoptera: Anobiidae). Gainesville, Florida, USA: Entomology and Nematology Department, University of Florida/Institute of Food and Agricultural Sciences Extension. [accessed 2020 October 10]. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN38500.pdf>.

Edde PA, Eaton M, Kells SA, Phillips TW (2012) Biology, behavior and ecology of pests in other durable commodities. In: Hagstrum DW, Phillips TW, Cuperus G, editors. *Stored product protection*. Manhattan (KS): Kansas State University Press; p. 45–61.

Fatiha RA, Kada R, Khelil MA, Pujade-Villar J (2014) Biological control against the cowpea weevil (*Callosobruchus chinensis* L., Coleoptera: Bruchidae) using essential oils of some medicinal plants. *J Plant Prot Res.* 54(3):211–217.

Fernandez M, Vega FA, Arrupe T, Renedo J (1972) Flavonoids of squill, *Urginea maritima*. *Phytochemistry* 11(4):1534.

Gödecke T, Kaloga M, Kolodziej H (2005) A phenol glucoside, uncommon coumarins and flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC. *J Chem Sci* 60:677–682.

Guzzo EC, Tavares M, Vendramim JD (2006) Evaluation of insecticidal activity of aqueous extracts of *Chenopodium* spp. in relation to *Rhyzopertha dominica* (Fabr.) (Coleoptera: Bostrichidae). Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored-Product Protection, p. 926–930, Campinas, Sao Paulo, Brazil. Passo Fundo, RS (Brazil): Brazilian Post-Harvest Association ABRAPOS.

Hassid E, Applebaum S. W, Birk Y (1976) Azetidine-2- carboxylic acid: a naturally occurring inhibitor of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Phytoparasitica* 4(3):173–183.

Ignatowicz S, Janczukowicz K, Olejarski P (2011) Integrated Pest Management (IPM) of the drug store beetle, *Stegobium paniceum* (L.), a serious pest of old books. *J Entomol Acarol Res* 43(2):177–183.

Iizuka M, Warashina T, Noro T (2001) Bufadienolides and a new lignan from the bulbs of *Urginea maritima*. *Chem Pharm Bull* 49(3):282–286.

Isman MB (2004) Plants essential oils ad green pesticides for pest and disease management. *ACS Symp Ser Am Chem Soc* 887:41–51.

Isman MB (2019) Botanical insecticides in the twenty-first century – fulfilling their promise? *Annu Rev Entomol* 12:47.

Kaşkavalci G, Civelek HS (2009) Effects of two plant extracts on the damage of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. *Ekoloji* 18:16–22.

Kopp B, Krenn L, Draxler M, Hoyer A, Terkola R, Vallaster P, Robien W (1996) Bufadienolides from *Urginea maritima* from Egypt. *Phytochemistry* 42(2):513–522.

Kopp B, Unterluggauer M, Robien W, Kubelka W (1990) Bufadienolides from *Urginea pancration*. *Planta Med* 56(02):193–197.

Krenn L, Bamberger M, Kopp B (1992) A new bufadienolide from *Urginea pancration*. *Planta Med* 58(03):284–285.

Krenn L, Jelovina M, Kopp B (2000) New bufadienolides from *Urginea maritima* sensu strictu. *Fitoterapia* 71(2):126–129.

Liu LY (2013) First case of *Stegobium paniceum* (L., 1758) (Coleoptera: Anobiidae) infesting paintings in a Taiwanese museum. *Coleopt Bull* 67(1):52–53.

Maazoun AM, Hlel TB, Hamdi SH, Belhadj F, Jemāa JMB, Marzouki MN (2017) Screening for insecticidal potential and acetylcholinesterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). *J Asia-Pac Entomol* 20(3):752–760.

Mitsuhashi H, Tanaka O, Nozoe S, Nagai M (1994) Chemistry of organic natural products. 4th ed. Tokyo: Nankoudou Press; p. 168–174.

Nikkon F, Habib MR, Karim MR, Ferdousi Z, Rahman MM, Haque ME (2009) Insecticidal activity of flower of *Tagetes erecta* L. against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Res J Agric Biol Sci* 5:748–753.

O’connor MG, Buck RE, Fellers CR (1935) Red squill investigations properties, toxicity, and palatability of red squill and powder baits to rats. *Ind Eng Chem* 27:1377–1380.

Pascual-Villalobos MJ (2002) Anti-insect activity of bufadienolides from *Urginea maritime*. In: Janick J, Whipkey A, editors. Trends in new crops and new uses. Alexandria (VA): ASHS Press.

Pascual-Villalobos MJ, Fernández M (1999) Insecticidal activity of ethanolic extracts of *Urginea maritima* (L.) Baker bulbs. *Ind Crop Prod* 10(2):115–120.

Pavela R, Benelli G (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci* 2:1000–1007.

Pavela R, Benelli G, Pavoni L, Bonacucina G, Cespi M, Cianfaglione K, Bajalan I, Morshedloo MR, Lupidi G, Romano D (2019) Microemulsions for delivery of

Apiaceae essential oils – towards highly effective and eco-friendly mosquito larvicides? *Ind Crops Prod* 129:631–640.

Benelli G (2019) Green micro- and nanoemulsions for managing parasites, vectors and pests. *Nanomaterials* 9(9):1285.

Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM, Spadaro V, Varol M, Koparal AT, Maggio A (2012) Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *siculum*. *Molecules* 17(7):8186–8195.

Schoenfeld W, Weiland J, Lindig C, Masnyk M, Kabat MM, Kurek A, Wicha J, Repke K (1985) The lead structure in cardiac glycosides is 5 β ,14 β -androstane-3 β ,14-diol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329:414–426.

Senatore F, Formisano C, Raio A, Bellone G, Bruno M (2008) Volatile components from flowerheads of *Centaurea nicaensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L, ssp. *schouwii* (D.C) Dostàl wild growing in Sicily and their biological activity. *Nat Prod Res* 22(10):825–832.

Weng Y, Li F, Chen W, Miao Y, Tang X (2010) Intravenous bufadienolides-loaded lipid microspheres for improving chemical stability. *Eur J Lipid Sci Technol* 112(11):1190–1199.

Zito P, Sajeve M, Bruno M, Rosselli S, Maggio A, Senatore F (2013) Essential oils composition of two Sicilian cultivars of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) fruits (prickly pear). *Nat Prod Res* 27(14):1305–1314.

6.2. Acaricidal Activity of Bufadienolides Isolated from *Drimia pancrations* against *Tetranychus urticae*, and Structural Elucidation of Arenobufagin-3-O- α -L-rhamnopyranoside

I risultati di questa sezione sono stati pubblicati in Badalamenti et al. (Badalamenti et al. 2022).

6.2.1. Abstract

La caratterizzazione chimica dei bulbi di *Drimia pancrations* ha comportato l'isolamento di quattro saponine steroidee (1–4). Nel manoscritto presentato precedentemente, ci siamo concentrati sulla delucidazione strutturale dei composti 1–3. Qui, per mezzo di studi spettroscopici $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Nuclear Overhauser Effects (NOE) e analisi 2D-NMR, viene riportata la struttura stereochimica completa del composto 4 e vengono assegnati tutti i segnali ^1H e ^{13}C . I composti 1–4 sono stati testati per le loro proprietà acaricide contro l'acaro polifago *Tetranychus urticae*, noto come ragnetto rosso. I nostri risultati hanno mostrato un'eccellente attività del composto 1, con un LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di 0.29 e un LD_{90} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di 0.96, mentre i composti 2, 3 e 4 hanno mostrato un'attività moderata. Inoltre, sono state studiate anche le proprietà acaricide e citotossiche dell'estratto grezzo. Da notare, dopo 96 h di esposizione, l'attività acaricida del composto 1 era superiore a quella del controllo positivo, esitiazox. Infatti, per il composto 1, LD_{50} e LD_{90} erano rispettivamente 0.29 e 0.96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mentre l'esitiazox mostrava valori di $\text{LD}_{50(90)}$ 18.7 (132.5) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Inoltre, l'estratto di *D. pancrations*, dopo 72 h, ha indotto un elevato effetto citotossico nelle linee cellulari HaCaT e THP-1, con un IC_{50} rispettivamente di 7.37 ± 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3.50 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nel complesso, *D. pancrations* può essere considerata una fonte verde di nuovi acaricidi efficaci contro gli acari di importanza agricola, come *T. urticae*, in attesa di un'adeguata convalida sul campo e della valutazione degli effetti non bersaglio su altre specie di invertebrati.

6.2.2. Introduzione

La gestione dei parassiti quali insetti e acari di importanza agricola è una sfida importante al giorno d'oggi, considerando il rapido e diffuso sviluppo della resistenza ai pesticidi nelle popolazioni di parassiti sovraesposte (Wang et al. 2021), nonché il grande impatto dell'uso dei pesticidi sulla salute umana e sull'ambiente (Leska et al. 2021; Ricupero et al. 2020; Passos et al. 2018). Tra gli acari, il ragnetto rosso, *Tetranychus urticae* Koch (Arachnida: Acari: Tetranychidae), è un eccellente esempio di specie di enorme importanza economica dovuto alla capacità di sviluppare rapidamente resistenza a diverse classi di acaricidi chimici (Van Leeuwen et al. 2010; Adesanya et al. 2021), favorita dall'elevata fecondità, dall'accoppiamento fra consanguinei, dalla riproduzione e dal breve ciclo di vita (Whalon et al. 2022; Van Leeuwen et al. 2015). Da notare, *T. urticae* può attaccare più di 1100 piante *host*, comprese colture sia in serra che in pieno campo (Migeone et al. 2010; Cazaux et al. 2014). In questo scenario, le piante rappresentano una promettente fonte di metaboliti secondari con attività insetticida (Pavela et al. 2020) e acaricida (Benelli et al. 2017; Pavela et al. 2017; Pavela et al. 2018; Sut et al. 2017), caratterizzati da una modalità d'azione multipla che riduce la probabilità di sviluppo della resistenza (Pavela and Benelli, 2016; Isman 2020).

Drimia pancracion (Steinh.) JC Manning & Goldblatt [syn. *Scilla pancracion* (Steinh.) Nyman, *Urginea maritima* subsp. *pancracion* (Steinh.) K. Richt., *Squilla pancracion* Steinh., *Charybdis pancracion* (Steinh.) Speta], appartenente alla famiglia delle Asparagaceae, è un bulbo distribuito in Africa (Marocco, Libia, Algeria), Italia (comprese Sicilia, Malta, Baleari) e Corsica (<https://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/query.asp>). È molto simile alla *Drimia maritima* (L.) Stearn, comunemente indicata come scilla o cipollotto, specie assente in Sicilia, ampiamente studiata per le sue importanti proprietà biologiche, come quelle cardiotoniche e diuretiche, per malattie cardiache ed edema (Mitsubishi et al. 1994), proprio come rodenticida (O'Connor et al. 1935), e per attività insetticida contro *Drosophila melanogaster* Meigen (Saadane et al. 2020). Il gran numero di studi pubblicati fitochimici di *D. maritima* ha mostrato la presenza di glicosidi cardiaci (Kopp et al. 1996; Crenn et al. 2000), antociani (Fernandez et al. 1972), lignani (Iizuka et al. 2001), flavonoidi, acidi grassi e polisaccaridi (Fernandez et al.

1972), che sono stati recensiti da alcuni autori (Mulholland et al. 2013). D'altra parte, pochi studi sono stati condotti su *D. pancration*. Due articoli hanno riportato l'identificazione di diversi bufadienolidi ottenuti dalle radici di due diverse popolazioni raccolte nell'Italia meridionale (Kopp et al. 1990; Crenn et al. 1992). In particolare, in una recente indagine su una popolazione siciliana (Badalamenti et al. 2021c), gli autori hanno isolato (2*R*,3*R*)-diidrokaempferolo 3-*O*- β -D-glucoside e tre saponine steroidee: (5 α)-4,5-diidro-16 β -idrossiscillirosidin-3-*O*- α -L-tevetopiranoside (**1**), scilliglaucoside (**2**) e (5 α)-4,5-diidrosicillirosidin-3-*O*-(β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-tevetopiranoside) (**3**). Inoltre, nello stesso articolo, le proprietà insetticide degli estratti di metanolo e butanolo di *D. pancration* si sono dimostrate efficaci contro i coleotteri adulti di *Stegobium paniceum* (Badalamenti et al. 2021^o). Di conseguenza, nell'ambito della nostra ricerca in corso sulle piante siciliane (Rosselli et al. 2020; Sut et al. 2020; Badalamenti et al. 2021b; Badalamenti et al. 2022), e sulle possibili applicazioni biocide (Badalamenti et al. 2021a; 2021b; D'Agostino et al. 2021; Basile et al. 2022) ispirate all'attività insetticida mostrata da entrambi gli estratti di *D. pancration* e dai glicosidi cardiaci (Badalamenti et al. 2021b; Pascual-Villalobos 2022), abbiamo deciso di investigare nuovamente la presenza di bufadienolidi in una popolazione di *D. pancration* raccolta vicino Palermo, in Sicilia, e di testare le proprietà acaricide dei composti isolati puri sull'acaro, *T. urticae*.

6.2.3. Materiale e metodi

6.2.3.1. Materiale vegetale

Il Prof. Vincenzo Ilardi, botanico dell'Università di Palermo, ha raccolto campioni a Cinisi, Palermo, Italia, e ha identificato, nel febbraio 2020, i bulbi di *D. pancration*. Il voucher depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università di Palermo, Italia, è identificato dal codice PAL266/2020.

6.2.3.2. Estrazione, isolamento e procedure sperimentali generali

La procedura di estrazione, l'isolamento dei singoli metaboliti e tutti i materiali utilizzati (reattivi chimici e strumenti di laboratorio), sono gli stessi descritti in Badalamenti et al. (Badalamenti et al. 2021b). Il composto **4** è stato isolato dalla

porzione butanolica dell'estratto metanolico delle radici di *D. pancracion*. La frazione A13 (200 mg) è stata ottenuta mediante cromatografia su colonna con CHCl₃-MeOH (7:3) per dare il composto **4** (22 mg). I composti **1–3** sono stati precedentemente descritti in (Badalamenti et al. 2021b).

Arenobufagin-3-*O*- α -L-ramnopyranoside (**4**)

Piatti bianchi; per i chemical shifts protonici e carbonici vedere la **Tabella 1**; ESIMS m/z 585.2513 [M+Na]⁺ (cald. per 585.2675).

Tabella 1. ¹H-NMR e ¹³C-NMR del composto **4** (δ in ppm).

Position	δ_C^a	δ_H^a (J in Hz)
1 β		1.23 (m)
1 α	32.17	1.62 (m)
2 α		1.18 (m)
2 β	26.70	1.79 (m)
3 α	71.03	3.43 (m)
4 β		1.30 (m)
4 α	30.22	1.62 (m)
5 β	40.05	2.48 (dddd, 1.8, 1.8, 1.8, 1.8)
6 α	27.92	1.37 (m)
6 β		1.79 (m)
7 α		1.18 (m)
7 β	21.61	1.82 (m)
8	39.92	1.68 (m)
9 α	39.56	1.71 (m)
10	36.80	-
11 α	73.61	4.24 (d, 11.2)
12	213.73	-
13	62.48	-
14	84.51	-
15 β		2.06 (m)
15 α	32.74	2.36 (m)
16 β		1.60 (m)
16 α	27.93	1.83 (m)
17 α	40.40	3.94 (dd, 9.4, 7.0)
18	17.60	0.77 (s)
19	23.79	1.04 (s)
20	121.29	-
21	150.47	7.55 (dd, 2.5, 1.0)
22	147.53	7.79 (dd, 9.8, 2.5)
23	114.89	6.30 (dd, 9.8, 1.0)
24	161.71	-
1'	98.44	4.59 (d, 1.5)
2'	71.48	3.54 (m)
3'	71.83	3.76 (m)
4'	72.35	3.18 (dd, 9.0, 9.0)
5'	68.89	3.41 (m)
6'	18.13	1.07 (d, 6.3)

^a(CD₃)₂SO (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz)

6.2.3.3. Insetti

Gli adulti di *T. urticae* sono stati ottenuti dal sito di allevamento di massa ubicato presso il Crop Research Institute (Repubblica Ceca). Gli acari sono stati allevati su piante di fagioli in una camera di crescita [22–25 °C; fotoperiodo di 16:8 h (L:D)].

6.2.3.4. Attività acaricida

L'efficacia acaricida dell'estratto metanolico di *D. pancracion* e dei bufadienolidi isolati è stata misurata come mortalità adulta di *T. urticae* dopo 24 e 96 ore di esposizione (Pavela 2015). Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando dischi di foglie di fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris* L.) di dimensioni 1 cm². L'estratto e i composti sono stati sciolti in metanolo (p.a. 99%, Sigma-Aldrich, Repubblica Ceca) alle dosi di 1 mg in 100 µL di MeOH utilizzando una pipetta automatica; aliquote (10 µL) delle soluzioni metanoliche, contenenti una quantità definita di estratto di *D. pancracion* o di composti puri, sono state applicate sui dischi fogliari. Ciò ha creato una dose di 100 µg/cm². Per la sola stima delle dosi letali, le prove sono state eseguite con le seguenti dosi: composto **1** - 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 e 1.0 µg/cm²; per il composto **2** - 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 80.0, 100.0 e 120.0 µg/cm² (sono state selezionate 5 dosi per il calcolo); per il composto **4** - 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 e 400.0 µg/cm²; per l'estratto - 6.2, 12.5, 25.0, 50.0 e 100.0 µg/cm². Successivamente, i dischi sono stati posti in piastre Petri (5 cm) con uno strato di agar di 0.3 cm di spessore sul fondo. Solo metanolo è stato applicato ai dischi come controllo negativo. Come controllo positivo è stato utilizzato un acaricida commerciale a base di esitiiazox (Nissorun 25 SC, ai 250 g/L, dichiarante Nisso Chemical Europe GmbH). Da notare, questo acaricida è usato classicamente per colpire le uova e le ninfe di *T. urticae* e che è necessaria una dose significativamente più alta per gli adulti. Tuttavia, è stato segnalato che mostra una certa efficacia sugli adulti. Ad esempio, Marris (Marris 1988) ha mostrato che la tossicità di hexythiazox sulle femmine di *T. urticae* era di 1.5 a.i. g/L, e Havasi et al. (Havasi et al. 2021) ha riportato un LC₅₀ di 2.35 g/L su *T. urticae* adulti. Dopo l'evaporazione del solvente, 10 femmine di *T. urticae* sono state spostate sui lati del disco fogliare trattati con i composti utilizzando un pennello fine. I dischi Petri sono stati inseriti in una camera di crescita (16:8 (L:D), 25 °C). Quindi, i dischi fogliari

sono stati controllati per il numero di acari morti 24 e 96 ore dopo l'applicazione. La mortalità degli acari è stata registrata quando le femmine non hanno reagito agli stimoli del forcipe. Ogni esperimento è stato ripetuto 5 volte. Per le sostanze che presentavano una mortalità superiore al 50% a 96 h dall'applicazione, è stata successivamente creata una serie di concentrazione di 5 diluizioni, che ha mostrato una mortalità compresa tra il 10 e il 90%. L'intervallo di concentrazioni è stato scelto per ciascuna sostanza sulla base di esperimenti preliminari.

6.2.3.5. Citotossicità sulle cellule dei vertebrati

La linea cellulare monocitica THP-1 e la linea cellulare di cheratinociti umani immortalati (HaCaT) sono state fornite dall'IFOM (Istituto di Oncologia Molecolare, Roma, Italia). Le cellule HaCaT sono state coltivate in Modified Eagle Medium (DMEM) di Dulbecco arricchito con il 10% di siero bovino fetale (FBS), 100 IU/mL di penicillina/streptomina e 2 mM di L-glutamina e mantenute a 37 °C con il 5% di CO₂ e 95% di umidità. La citotossicità è stata valutata aggiungendo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio bromuro (MTT). In breve, come descritto in precedenza (Pavela et al. 2021), 3×10^3 cellule per pozzetto sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti ad un volume finale di 100 µL/pozzetto e, dopo 24 h di incubazione, diverse diluizioni dell'estratto di *D. pancration* sono state aggiunte e sono state ripetute 6 replicati per ogni trattamento. L'effetto è stato confrontato con il dimetilsolfossido (DMSO) utilizzato per solubilizzare l'estratto. Dopo 72 ore, la vitalità cellulare è stata studiata aggiungendo 0.8 mg/mL di MTT (Sigma Aldrich, Milano, Italia) al terreno. Dopo 3 ore, i cristalli di sale sono stati sciolti in 100 µL/pozzetto di DMSO. Una piastra con lettore ELISA (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) è stata utilizzata per misurare l'assorbanza dei campioni a 570 nm rispetto al controllo.

6.2.3.6. Analisi statistica

I tassi di mortalità sperimentale degli sono stati corretti tramite la formula di Abbott (Abbott 1925), e quindi è stata eseguita l'analisi Probit (Finney 1952). La mortalità degli acari a 24 e 96 h è stata trasformata in radice quadrata di arcoseno e analizzata utilizzando ANOVA all'interno di un disegno a blocco completo randomizzato,

seguito dal test HSD di Tukey ($p < 0.05$). I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software BioStat v5.0. I dati per la citotossicità cellulare rappresentano la media e la deviazione standard (SD) di almeno 3 esperimenti indipendenti. La significatività statistica è stata determinata mediante ANOVA unidirezionale con test *post hoc* di Bonferroni; α è stato fissato a 0.05. IC_{50} è stato calcolato utilizzando il software GraphPad Prism (Nabissi et al. 2016).

6.2.4. Risultati e discussioni

6.2.4.1. Composti chimici

Le quattro saponine steroidee (1 – 4) (Fig. 1) sono state isolate, mediante diverse separazioni cromatografiche, dai bulbi di *D. pancrati*, dall'estratto in *n*-butanolo.

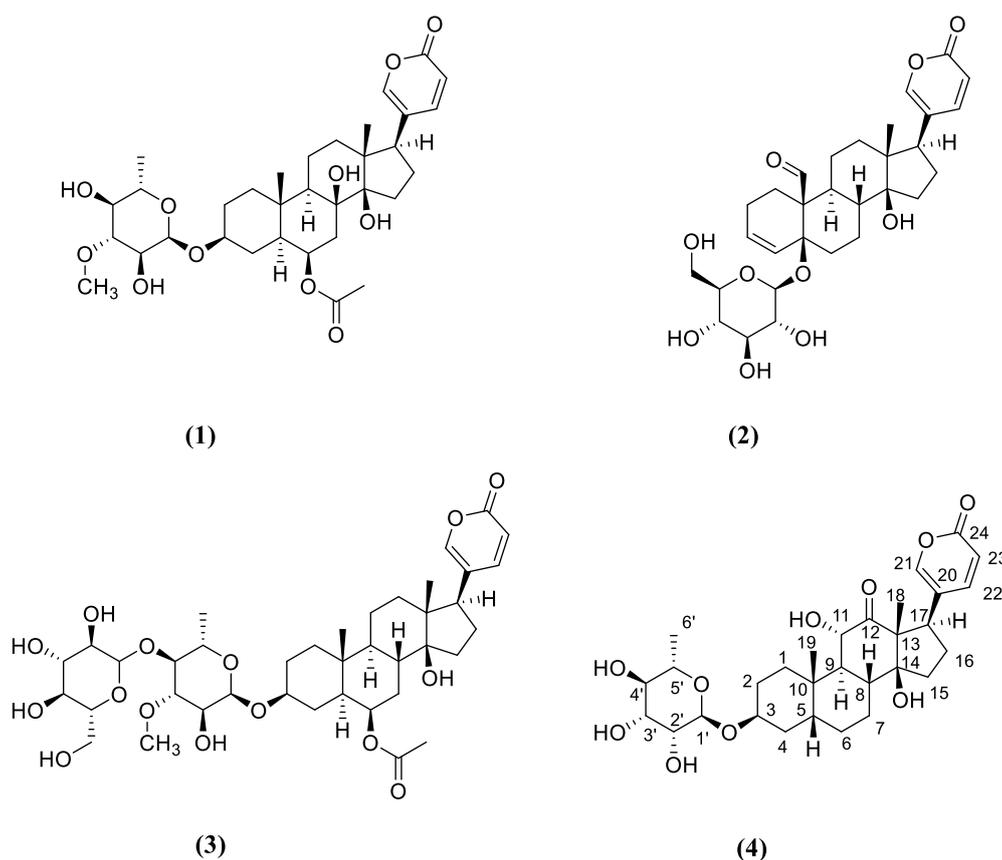


Fig. 1. Strutture chimiche (1-4) dei bufadienolidi isolati da *D. pancrati*.

Nell'articolo precedente, abbiamo riportato le strutture dei composti 1 – 3 (Badalamenti et al. 2021b); di conseguenza, nel presente lavoro, è

stata evidenziata solo la delucidazione strutturale del composto **4**, mediante analisi spettroscopica 1D- e 2D-NMR e spettrometria di massa ESIMS. Il composto **4** è stato separato sottoforma di cristalli bianchi. Lo spettro di massa ha mostrato un picco ione molecolare a m/z 585.2513 $[M+Na]^+$ (calcolato per 585.2675), in accordo con la formula molecolare di $C_{30}H_{42}O_{10}$. Gli spettri 1H -NMR e ^{13}C -NMR (**Tabella 1**) hanno mostrato segnali per un anello $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -lattone insaturo a $\delta_H = 7.55$ (H-21), 7.79 (H-22), 6.30 (H-23) ppm e a $\delta_C = 121.29$ (C-20), 150.47 (C-21), 147.53 (C-22), 114.89 (C-23) e 161.71 (C-24) ppm, due gruppi metilici angolari ($\delta_H = 0.77$ ppm, 3H, s; $\delta_C = 17.60$ ppm, Me-18) e ($\delta_H = 1.04$ ppm, 3H, s; $\delta_C = 23.79$ ppm, Me-19), due metini ossigenati a C-11 ($\delta_H = 4.24$ ppm, d; $\delta_C = 73.61$ ppm) e C-3 ($\delta_H = 3.43$ ppm, m; $\delta_C = 71.03$ ppm), un gruppo chetonico C-12 ($\delta_C = 213.73$ ppm) e un carbonio ossigenato quaternario ($\delta_C = 84.51$ ppm, C-14). Inoltre, sono stati osservati segnali per una porzione zuccherina di α -L-rhamnopyranoside. Utilizzando gli spettri DEPT, 1H - 1H -COSY, HSQC e HMBC, è stata identificata la struttura completa del composto **4**. Infatti, la correlazione nello spettro HMBC tra il protone anomeroico H_{1'} ($\delta_H = 4.59$ ppm, d, $J = 1.5$ Hz) e il carbonio C-3 dell'aglicone ($\delta_C = 71.03$ ppm) indicava chiaramente che la parte glicosidica era legata al carbonio C-3. Infine, le correlazioni NOESY (**Fig. 2**) di Me-19/H-5 β , Me-19/H-11_{ax}, H-11_{ax}/Me-18, H-17_{ax}/H-16_{eq} e l'assenza di correlazione H-3/H-5, non solo hanno confermato l'orientamento β del gruppo glicosilico O-C-3, ma anche la corretta giunzione tra gli anelli agliconici: *cis* tra gli anelli A/B e C/D, e *trans* tra gli anelli B/C. Di conseguenza, la struttura di **4** è stata stabilita come arenobufagin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, precedentemente isolata in *D. altissima* (Dagne et al. 1994), ma non in *D. pancraticum*.

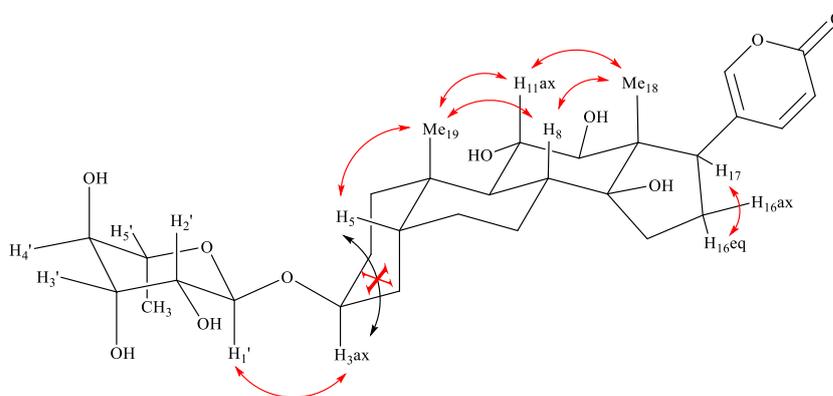


Fig. 2. Correlazioni NOESY nel composto **4**.

6.2.4.2. Effetto acaricida

Tutti i composti qui testati, così come l'estratto, hanno mostrato una promettente attività acaricida (**Tabella 2**). Tuttavia, sono state riscontrate differenze significative nell'efficacia acaricida tra le singole sostanze. La sostanza più efficace è stata il composto **1**, che, alla dose di 100 µg/cm², è stato l'unico a causare una mortalità del 100% entro 24 h dall'applicazione.

Tabella 2. Effetto acaricida dei composti isolate contro *Tetranychus urticae* dopo 96 h di trattamento.

Molecole	Mortalità**		Dose letale (96 h)			
	A 24 h (100 µg/cm ²)	A 96 h (100 µg/cm ²)	LD ₅₀ (µg/cm ²)	LD ₉₀ (µg/cm ²)	χ ²	p-value
1	100.0±0.0e	100.0±0.0d	0.28 (0.22-0.34)	1.08 (0.84-1.60)	1.485	0.685 ns
2	47.4±11.7c	83.3±4.7c	1.41 (0.62-2.48)	198.58 (86.01-786.52)	1.836	0.968 ns
3	16.4±5.6b	46.7±12.5b	>100	-	-	-
4	10.6±5.4ab	70.0±8.2c	29.61 (13.20-48.35)	1862.15 (648.5-2651.24)	0.407	0.981 ns
Estratto <i>D. pancration</i>	5.5±2.5a	78.9±6.3c	8.5 (5.9-10.6)	118.8 (103.3-129.5)	0.852	0.384 ns
Controllo positivo: hexythiazox	82.5±12.5d	100.0±0.0d	18.7 (12.7-21.5)	132.5 (111.7-142.8)	1.234	0.251 ns
Controllo negativo	0.0±0.0a	6.7±4.7a	-	-	-	-
ANOVA <i>F</i> _{6,28} , <i>p</i> - valori	381.72; <0.001	273.57; <0.001	-	-	-	-

*parametri ANOVA ** I valori seguiti nella stessa colonna dalla stessa lettera non sono significativamente diversi (ANOVA, Tukey's HSD test, *p* < 0.05).

Altre sostanze da noi testate, tra cui l'estratto grezzo di *D. pancration*, hanno mostrato una mortalità significativa fino a 96 h dopo l'applicazione, con tassi di mortalità esercitati dal composto **1** paragonabili a quelli innescati dal controllo positivo, hexythiazox.

Le dosi letali sono state stimate per tutte le sostanze tranne per il composto **3**, che ha mostrato una bassa efficacia acaricida. Significativamente, i valori più bassi di LD₅₀ e LD₉₀ sono stati stimati per il metabolita secondario **1** (rispettivamente 0.29 e 0.96 µg/cm²). Questo composto ha mostrato un'efficacia significativamente maggiore rispetto all'acaricida commerciale testato a base di esitiazox, per il quale la LD₅₀₍₉₀₎ è stata stimata 18.7 (132.5) µg/cm².

Dato che è già emersa la resistenza agli insetticidi di *T. urticae* (Adesanya et al. 2021; Ferreira et al. 2015), è urgente cercare nuove sostanze attive con attività acaricida. Gli estratti vegetali sono tra le fonti più promettenti di composti con svariato meccanismo d'azione (Rincon et al. 2019). In particolare, il composto **1** isolato dagli autori qui presenti sembra essere un candidato molto promettente per la sintesi di nuove sostanze acaricide per la sua elevata attività acaricida. Tuttavia, saranno necessari ulteriori test per rivelare il meccanismo d'azione e l'effetto di questa sostanza sugli organismi non bersaglio.

6.2.4.3. Saggio di citotossicità

La linea cellulare monocitica THP-1 e la linea cellulare di cheratinociti umani immortalati (HaCaT) sono state trattate con diverse diluizioni (da 0.49 fino a 500 µg/mL) di estratto di *D. pancration* per 72 ore e la vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio citotossico. Come riportato nella **Fig. 3**, l'estratto totale ha indotto un effetto citotossico in entrambe le linee cellulari, con un IC₅₀ di 7.37 ± 0.5 µg/mL e 3.50 ± 0.15 µg/mL, rispettivamente per le cellule THP-1 e HaCaT. Secondo le linee guida dell'*Organization for Standardization guidelines*, l'estratto totale ha mostrato un'elevata citotossicità, poiché ha causato un tasso di mortalità > 70%, quando è stato utilizzato alla dose 100 µg/mL (Schneider et al. 2017).

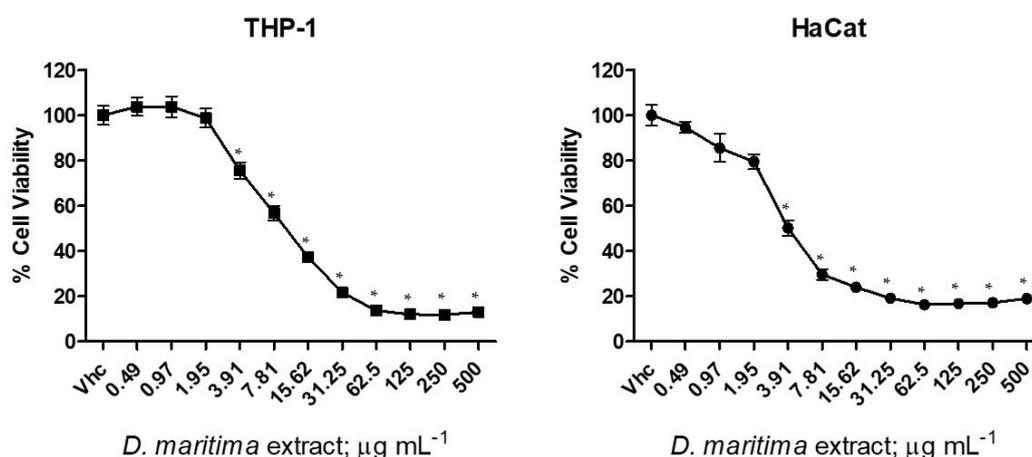


Fig. 3. Effetto citotossico dell'estratto di *Drimia pancration*: la vitalità cellulare è stata determinata nelle linee cellulari THP-1 e HaCaT mediante test MTT. Le cellule sono state trattate per 72 ore con diverse concentrazioni di estratto. I dati sono espressi come media \pm DS di tre esperimenti separati. * $p < 0.05$ rispetto al veicolo (Vhc).

6.2.5. Conclusioni

In questo studio fitochimico sui bulbi di *D. pancration*, per mezzo degli spettri 1D- e 2D-NMR, NOESY e HPLC-MS, l'intera struttura stereochimica dell'arenobufagin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**4**) è stata rivelata. Questo bufadienolide, insieme agli altri tre (**1** – **3**) composti precedentemente isolati, è stato esaminato per la sua potenziale attività come acaricida. Dal punto di vista dei pesticidi verdi, *D. pancration*, nonostante il fatto che l'estratto totale mostri un'elevata citotossicità, può essere utilizzato nella formulazione, per mitigarne la citotossicità, o considerato una fonte verde di nuovi acaricidi, con particolare riferimento al composto **1**, efficace contro acari di importanza agricola, come *T. urticae*, in attesa di un'adeguata convalida sul campo e della valutazione degli effetti non bersaglio su altre specie di invertebrati.

6.2.6. Bibliografia

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267.

Adesanya AW, Lavine MD, Moural TW, Lavine LC, Zhu F, Walsh DB (2021) Mechanisms and management of acaricide resistance for *Tetranychus urticae* in agroecosystems. *J Pest Sci* 94:639–663.

Badalamenti N, Ilardi V, Bruno M, Pavela R, Boukouvala MC, Kavallieratos NG, Maggi F, Canale A, Benelli G (2021a) Chemical composition and broad-spectrum insecticidal activity of the flower essential oil from an ancient Sicilian food plant, *Ridolfia segetum*. *Agriculture* 11:304.

Badalamenti N, Russi S, Bruno M, Maresca V, Vaglica A, Ilardi V, Zanfardino A, Di Napoli M, Varcamonti M, Cianciullo P (2021b) Dihydrophenanthrenes from a Sicilian accession of *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge showed antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities. *Plants* 10:2776.

Badalamenti N, Rosselli S, Zito P, Bruno M (2021c) Phytochemical profile and insecticidal activity of *Drimia pancracion* (Asparagaceae) against adults of *Stegobium paniceum* (Anobiidae). *Nat Prod Res* 35:4468–4478.

Badalamenti N, Bruno M, Schicchi R, Geraci A, Leporini M, Gervasi L, Tundis R, Loizzo MR (2022) Chemical compositions and antioxidant activities of essential oils, and their combinations, obtained from flavedo by-product of seven cultivars of Sicilian *Citrus aurantium* L. *Molecules* 27:1580.

Basile S, Badalamenti N, Riccobono O, Guarino S, Ilardi V, Bruno M, Peri E (2022) Chemical composition and evaluation of insecticidal activity of *Calendula incana* subsp. *maritima* and *Laserpitium siler* subsp. *siculum* essential oils against stored products pests. *Molecules* 27:588.

Benelli G, Pavela R, Canale A, Nicoletti M, Petrelli R, Cappellacci L, Galassi R, Maggi F (2017) Isofuranodiene and germacrene from *Smyrniolum olusatrum* essential oil as acaricides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae*: Impact of chemical stabilization of isofuranodiene by interaction with silver triflate. *J Pest Sci* 90:693–699.

Cazaux M, Navarro M, Bruinsma KA, Zhurov V, Negrave T, Van Leeuwen T, Grbic M (2014) Application of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* for plant-pest interaction studies. *J Vis Exp* 89:e51738.

D'Agostino G, Giambra B, Palla F, Bruno M, Badalamenti N (2021) The application of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. and *Crithmum maritimum* L. as biocidal on two *Tholu bommalu* indian leather puppets. *Plants* 10:1508.

Dagne E, Mammo W, Alemu M, Casser I (1994) Two bufadienolides from *Drimia altissima* (*Urginea altissima*). *Bull Chem Soc Ethiop* 8:85–89.

Euro Med Plant Base. Available online: <https://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/query.asp> (accessed on 30 April 2022).

Fernandez M, Vega FA, Arrupe T, Renedo J. Flavonoids of squill, *Urginea maritima*. *Phytochemistry* 11:1534.

Ferreira CBS, Andrade FHN, Rodrigues ARS, Siqueira HAA, Gondim MGC (2015) Resistance in field populations of *Tetranychus urticae* to acaricides and characterization of the inheritance of abamectin resistance. *Crop Prot* 67:77–83.

Finney DJ (1952) *Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*; Cambridge University Press: Cambridge, UK.

Havasi M, Sangak Sani Bozhgani N, Golmohmmadi G, Kheradmand K (2021) Impact of hexythiazox on life table parameters of the *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) and its prey *Tetranychus urticae*. *J Crop Prot* 10:295–308.

Iizuka M, Warashina T, Noro T (2001) Bufadienolides and a new lignan from the bulbs of *Urginea maritima*. *Chem Pharm Bull* 49:282–286.

Isman MB (2020) Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochem Rev* 19:235–241.

Kopp B, Unterluggauer M, Robien W, Kubelka W (1990) Bufadienolides from *Urginea pancration*. *Planta Med* 56, 193–197.

Kopp B, Krenn L, Draxler M, Hoyer A, Terkola R, Vallaster P, Robien W (1996) Bufadienolides from *Urginea maritima* from Egypt. *Phytochemistry* 42:513–522.

Krenn L, Bamberger M, Kopp B (1992) A new bufadienolide from *Urginea pancration*. *Plant Med* 58:284–285.

Krenn L, Jelovina M, Kopp B (2000) New bufadienolides from *Urginea maritima* sensu strictu. *Fitoterapia* 71:126–129.

Leska A, Nowak A, Nowak I, Górczynska A (2021) Effects of insecticides and microbiological contaminants on *Apis mellifera* health. *Molecules* 26:5080.

Marris JW (1988) *The Toxicity of Hexythiazox to Twospotted Spider Mite (Tetranychus urticae Koch) Adults and Eggs*. Ph.D. Thesis, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.

Migeon A, Nouguier E, Dorkeld F (2010) Spider Mites Web: A comprehensive database for the Tetranychidae. In *Trends in Acarology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 557–560.

Mitsubishi H, Tanaka O, Nozoe S, Nagai M (1994) Chemistry of Organic Natural Products, 4th ed.; Nankoudou Press: Tokyo, Japan, pp. 168–174.

Mulholland DA, Schwikkardab SL, Crouch NR (2013) The chemistry and biological activity of the Hyacinthaceae. *Nat Prod Rep* 30:1165–1210.

Nabissi M, Morelli MB, Offidani M, Amantini C, Gentili S, Soriani A, Cardinali C, Leoni P, Santoni G (2016) Cannabinoids synergize with carfilzomib, reducing multiple myeloma cells viability and migration. *Oncotarget* 7:77543–77557.

O’connor MG, Buck RE, Fellers CR (1935) Red squill investigations properties, toxicity, and palatability of red squill and powder baits to rats. *Ind Eng Chem* 27:1377–1380.

Pascual-Villalobos MJ (2002) Anti-insect activity of bufadienolides from *Urginea maritima*. In *Trends in New Crops and New Uses*; Janick, J., Whipkey, A., Eds.; ASHS Press: Alexandria, VA, USA, pp. 564–566.

Passos L, Soares MA, Collares LJ, Malagoli I, Desneux N, Carvalho GA (2018) Lethal, sublethal and transgenerational effects of insecticides on *Macrolophus basicornis*, predator of *Tuta absoluta*. *Entomol Gen* 38:127–143.

Pavela R (2015) Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch. *Ind Crop Prod* 67:108–113.

Pavela R, Benelli G (2016) Essential oils as eco-friendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci* 21:1000–1007.

Pavela R, Murugan K, Canale A, Benelli G (2017) *Saponaria officinalis*-synthesized silver nanocrystals as effective biopesticides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae* Koch. *Ind Crop Prod* 97:338–344.

Pavela R, Dall’Acqua S, Sut S, Baldan V, Kamte SLN, Nya PCB, Benelli G, (2018) Oviposition inhibitory activity of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) polar extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *Physiol Mol Plant Pathol* 101:85–92.

Pavela R, Morshedloo MR, Mumivand H, Khorsand GJ, Karami A, Maggi F, Benelli G (2020) Phenolic monoterpene-rich essential oils from Apiaceae and Lamiaceae species: Insecticidal activity and safety evaluation on non-target earthworms. *Entomol Gen* 40:421–435.

Pavela R, Pavoni L, Bonacucina G, Cespi M, Cappellacci L, Petrelli R, Spinozzi E, Aguzzi C, Zeppa L, Ubaldi M (2021) Encapsulation of *Carlina acaulis* essential oil and carlina oxide to develop long-lasting mosquito larvicides: Microemulsions versus nanoemulsions. *J Pest Sci* 94:899–915.

Ricupero M, Desneux N, Zappalà L, Biondi A (2020) Target and non-target impact of systemic insecticides on a polyphagous aphid pest and its parasitoid. *Chemosphere* 247:125728.

Rincón RA, Rodríguez D, Coy-Barrera E (2019) Botanicals against *Tetranychus urticae* Koch under laboratory conditions: A survey of alternatives for controlling pest mites. *Plants* 8:272.

Rosselli S, Tundis R, Bruno M, Leporini M, Falco T, Candela RG, Badalamenti N, Loizzo MR (2020) *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) seeds oil: Fatty acids profiling by GC-MS and NMR and bioactivity. *Molecules* 25:1037.

Saadane FZ, Habbachi W, Habbachi S, Boublata NEI, Slimani A, Tahraoui A (2020) Toxic effects of *Drimia maritima* (Asparagaceae) ethanolic extracts on the mortality, development, sexual behaviour and oviposition behaviour of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J Anim Behav Biometeorol* 9:2102.

Schneider F, Maurer C, Friedberg RC (2017) International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med* 37:365–370.

Sut S, Pavela R, Kolarčík V, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F, Benelli G (2017) Identification of *Onosma visianii* roots extract and purified shikonin derivatives as potential acaricidal agents against *Tetranychus urticae*. *Molecules* 22:1002.

Sut S, Maggi F, Bruno S, Badalamenti N, Quassinti L, Bramucci M, Beghelli D, Lupidi G, Dall'Acqua S (2020) Hairy garlic (*Allium subhirsutum*) from Sicily

(Italy): LC-DAD-MSn analysis of secondary metabolites and *in vitro* biological properties. *Molecules* 25:2837.

Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem Mol Biol* 40:563–572.

Van Leeuwen T, Tirry L, Yamamoto A, Nauen R, Dermauw W (2015) The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pestic Biochem Physiol* 121:12–21.

Wang X, Xu X, Ullah F, Ding Q, Gao X, Desneux N, Song D (2021) Comparison of full-length transcriptomes of different imidacloprid-resistant strains of *Rhopalosiphum padi* (L.). *Entomol Gen* 41:289–304.

Whalon ME, Mota-Sanchez RM, Hollingworth RM, Duynslager L (2022) Arthropods Resistant to Pesticides Database (ARPD). Available online: <http://www.pesticideresistance.org> (accessed on 2 May 2022).

6.3. Chemical Composition and Broad-Spectrum Insecticidal Activity of the Flower Essential Oil from an Ancient Sicilian Food Plant, *Ridolfia segetum*

I risultati di questa sezione sono stati pubblicati in Badalamenti et al. (Badalamenti et al. 2021).

6.3.1. Abstract

Diverse specie della famiglia delle Apiaceae sono erbe aromatiche che producono oli essenziali utilizzabili su scala industriale per scopi farmaceutici, cosmetici e alimentari. In particolare, alcuni oli essenziali, come ad esempio i *green*-insetticidi, possono sostituire gli insetticidi sintetici, mantenendo la maggior parte della loro efficacia ed evitando l'inquinamento ambientale o l'avvelenamento umano. Nel presente studio, abbiamo esplorato il potenziale insetticida dell'olio essenziale di *Ridolfia segetum* (L.) Moris (EO) contro tre diversi parassiti: *Culex quinquefasciatus* Say, *Musca domestica* L. e *Spodoptera littoralis* (Boisduval). A tale scopo, l'EO è stato ottenuto mediante idrodistillazione dei fiori e la sua composizione è stata rivelata mediante gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC/FID) e gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS). Questo EO era ricco di α -phellandrene (49.3%), β -phellandrene (9.2%), terpinolene (20.7%) e piperitone ossido (5.9%). Per quanto riguarda l'efficacia moschicida, l'EO ha mostrato una notevole tossicità contro larve di III stadio di *C. quinquefasciatus*, con un $LC_{50} = 27.1 \mu\text{L/L}$ e $LC_{90} = 42.5 \mu\text{L/L}$. Per quanto riguarda *M. domestica*, una diversa tossicità dell'olio essenziale di *R. segetum* è stata osservata su mosche maschili e femminili, calcolando valori LD_{50} rispettivamente di 10.5 e 50.8 $\mu\text{g} \times \text{adulto}^{-1}$. L'EO è risultato anche tossico per *S. littoralis* al terzo stadio larvale, raggiungendo valori LD_{50} e LD_{90} rispettivamente di 37.9 e 99.6 $\mu\text{g} \times \text{larva}^{-1}$. Nel complesso, questo EO, estratto da una pianta alimentare tradizionale siciliana, merita ulteriori indagini per lo sviluppo di formulazioni di insetticidi verdi da utilizzare in condizioni reali, in attesa di un'attenta valutazione della tossicità non bersaglio su organismi benefici.

6.3.2. Introduzione

Gli artropodi includono numerosi parassiti agricoli, nonché specie chiave che svolgono un ruolo importante come vettori di agenti patogeni, tra cui la malaria, la dengue, il virus Zika, la filariosi linfatica, la malattia di Lyme e molte altre (Mazzi and Dorn, 2012; Di Giovanni et al. 2021). Il loro controllo ha una lunga storia ed è ancora regolarmente sostenuto attraverso massicci utilizzi di insetticidi sintetici (Zhang et al. 2015; Deligeorgidis et al. 2019; Humann-Guillemot et al. 2019), con gravi effetti sulla salute umana e sull'ambiente, e con effetti sub-letali a lungo termine (Gul et al. 2019; Ullah et al. 2019a; Ullah et al. 2019b; Ullah et al. 2019c; Varikou et al. 2019) e il rapido sviluppo della resistenza nelle specie bersaglio (Desneux et al. 2007; Naqqash et al. 2016; Benelli et al. 2021). Nel tentativo di scoprire nuovi principi attivi per formulazioni insetticide, acaricide e repellenti, i prodotti botanici sono stati ampiamente studiati (Benelli et al. 2018a; Benelli et al. 2018b; Pavela et al. 2019), delineando la loro scarsa tossicità per i vertebrati (Pavela et al. 2016), nonché le loro molteplici modalità di azione su artropodi, che riducono fortemente il rischio di sviluppo di resistenza (Jankowska et al. 2017; Jankowska et al. 2019). Sebbene la commercializzazione degli insetticidi botanici sembri per il momento complessa e lenta (Pavela et al. 2016; Isman et al. 2014; Isman et al. 2020), è necessario intensificare la ricerca, soprattutto in termini di standardizzazione fitochimica dei principi attivi, di formulazione dei nuovi insetticidi per garantire un'efficacia a lungo termine e di ricerca di nuove specie vegetali come potenziali fonti di principi attivi (Pavela et al. 2019; Pavoni et al. 2019). In particolare, considerando il numero decrescente di principi attivi autorizzati come insetticidi di sintesi, gli insetticidi botanici assumono una rilevanza crescente tra i prodotti preferiti ai fini fitosanitari (Pavela et al. 2016; Isman et al. 2014; Isman et al. 2020). In questo scenario, riveste particolare interesse la ricerca incentrata sul potenziale insetticida, in gran parte inesplorato, delle specie di piante aromatiche alimentari che crescono in ambienti aridi (Pavela et al. 2020), con potenziali collegamenti con l'economia agricola locale dei paesi mediterranei.

Ridolfia segetum (L.) Moris (Apiaceae) è una pianta annuale, alta 3–8 dm, glabra e di odore sgradevole. È una specie mediterranea che si trova comunemente nei

campi di cereali e nei terreni temporaneamente incolti dell'Europa meridionale, della Turchia, del Medio Oriente e del Nord Africa (http://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=343528&size=medium). In Italia è presente in tutte le regioni centro-meridionali, dalla Liguria alla Toscana e le Marche, dalla Sardegna alla Sicilia (Pignatti et al. 1982; Pignatti et al. 2018).

In Marocco viene cucinata come verdura in diverse ricette, tra cui *tajines*, couscous e *beqoula* (Tbatou et al. 2018), mentre in Sicilia questa pianta, localmente conosciuta come *finuocchju anitu*, è consumata cruda in insalata e cotta (Lentini et al. 2007); le sue radici e gli steli vengono mangiati per curare l'acidità gastrica (Tuttolomondo et al. 2014).

Ricerche precedenti si sono concentrate sulla composizione degli oli essenziali di altre popolazioni, in crescita in Europa e Nord-Africa. Sono state riportate anche alcune proprietà biologiche dell'olio essenziale di *R. segetum* (EO). L'EO dei fiori raccolti in Portogallo ha mostrato attività antinfiammatoria e antiossidante (Cabral et al. 2015) e, recentemente, un forte potenziale antitumorale con elevata capacità di inibire la proliferazione e indurre l'apoptosi (Beeby et al. 2020). Jabrane et al. (Jabrane et al. 2009; Jabrane et al. 2010) e Ben Jannet e Mighri (Ben Jannet et al. 2007) hanno mostrato le attività antibatteriche degli EOs da piante raccolte in Tunisia, mentre l'EO della popolazione sarda ha dimostrato di inibire l'attività dell'HIV-1 RT RDDP in modo dose-dipendente (Bicchi et al. 2009).

Nell'ambito della nostra ricerca in corso su specie mediterranee appartenenti alla famiglia delle Apiaceae (Casiglia et al. 2016; Pavela et al. 2017; Di Napoli et al. 2019; Badalamenti et al. 2020a; Badalamenti et al. 2020b; Bruno et al. 2020), abbiamo analizzato la composizione chimica dell'olio essenziale dei fiori di una stazione siciliana di *R. segetum*, non indagata finora, e ne abbiamo valutato l'attività insetticida su una diversità di specie di insetti a elevata importanza economica, ovvero il vettore della filariosi linfatica *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) - per il quale è urgente lo sviluppo di strumenti di controllo nuovi e sostenibili (Pavela et al. 2017; Wilke et al. 2020) - la mosca comune, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), che è un insetto nocivo in grado di trasmettere un gran numero di agenti patogeni microbici (Khamesipour et al. 2018), e il verme

del cotone africano, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), attualmente considerato uno della specie di falena più polifaga che attacca colture altamente diverse delle regioni tropicali e subtropicali ed è elencata come un parassita da quarantena A2 (OEPP/EPPO 2015). Per zanzare e falene è stato preso di mira il terzo stadio larvale, mentre per le mosche domestiche abbiamo esaminato la tossicità dell'EO sugli adulti, valutando la potenziale differenza nell'efficacia dell'EO su mosche maschili e femminili.

6.3.3. Materiali e metodi

6.3.3.1. Materiale vegetale

I fiori di *R. segetum* sono stati raccolti a giugno 2019, a Borgo Eras, Collesano, Palermo (Sicilia) a 600 m di altitudine (37°53'34.84" N e 13°54'41.08" E). Esempari esattu (PAL 109714), raccolti e identificati dal Prof. Vincenzo Ilardi, sono stati depositati nell'Herbarium Mediterraneum Panormitanum dell'Orto Botanico, Palermo, Italia.

6.3.3.2. Estrazione dell'olio essenziale

350 g di fiori di *R. segetum* sono stati sottoposti a idrodistillazione per 3 h utilizzando un apparato di tipo Clevenger (EDMQ 2008). L'EO [resa 0.9% (v/w)] è stato seccato con solfato di sodio anidro, filtrato e conservato in congelatore a -20 °C, fino al momento dell'analisi.

6.3.3.3. Analisi GC-FID dell'olio essenziale

È stato utilizzato un gascromatografo Agilent 4890D accoppiato a un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). La fase stazionaria della colonna era rappresentata da una colonna capillare HP-5 (5% fenilmetilpolisilossano, 25 m, 0.32 mm i.d.; 0.17 µm ft) (Agilent, Folsom, CA, USA). La fase mobile era elio (99.999%) con flusso a 1.0 mL/min. Il programma della temperatura del forno era il seguente: 60 °C isothermico per 5 minuti; quindi, rampa (4 °C/min) fino 220 °C e infine rampa (11 °C/min) fino a 280 °C. L'EO è stato diluito a 1:100 in esano e il volume iniettato

era di 1 μ L in modalità split (1:34). Le temperature dell'iniettore e del rivelatore sono state impostate a 280 °C. Una miscela commerciale di *n*-alcani (C₈–C₃₀) acquistata da Supelco (Bellefonte, CA, USA) è stata utilizzata per determinare l'indice di ritenzione lineare dei picchi (RI). I valori quantitativi, espressi in percentuale, sono stati ottenuti seguendo la procedura di Cecchini et al. (Cecchini et al. 2010); i risultati sono la media di tre analisi.

6.3.3.4. Analisi GC-MS dell'olio essenziale

È stato utilizzato un gascromatografo Agilent 6890N dotato di uno spettrometro di massa (MS) a singolo quadrupolo 5973N. La fase stazionaria era una colonna capillare HP-5MS (30 m, 0.25 mm i.d., 0.1 μ m ft) (Agilent). Le condizioni operative e la fase mobile erano le stesse di quelle sopra riportate. Le temperature dell'iniettore e della linea di trasferimento erano rispettivamente di 280 e 250°C. La stessa diluizione di quella sopra riportata è stata iniettata nel sistema GC-MS in modalità split (1:50). Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità a impatto elettronico (EI) nell'intervallo 29–400 *m/z*. L'identificazione è stata effettuata combinando la corrispondenza degli spettri di massa (MS) e la sovrapposizione degli RI in librerie quali Adams (Adams 2007), NIST 17 (NIST17 2017) e FFNSC 2 (FFNSC2 2012). Il confronto con gli standard autentici (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stato effettuato per α -pinene, canfene, sabinene, β -pinene, mircene, α -phellandrene, *p*-cimene, limonene, γ -terpinene, terpinolene, canfora, e terpinen-4-olo.

6.3.3.5. Insetti

Le popolazioni di *C. quinquefasciatus*, *M. domestica* e *S. littoralis* sono state allevate secondo i metodi descritti da Pavela (Pavela et al. 2014; Pavela et al. 2007; Pavela et al. 2014). Sono state fondate vere e proprie colonie sperimentali di zanzare al Crop Research Institute (Praga, Repubblica Ceca). Le zanzare adulte sono state mantenute in gabbie entomologiche (40 × 40 × 40 cm) e alimentate con una soluzione di saccarosio al 10%. La schiusa delle uova è stata ottenuta nell'acqua del rubinetto. Le larve sono state allevate in vassoi di plastica (30 × 35 × 25 cm,

circa 100 larve/L). Le larve sono state nutrite con biscotti per cani e lievito in polvere con un rapporto 3:1 (p:p) (Pavela et al. 2014). Tutte le fasi sono state mantenute a 25 ± 2 °C, 65–75% di umidità relativa e un fotoperiodo di 12:12 h (L:D).

6.3.3.6. Attività insetticida su *Culex quinquefasciatus*

L'EO di *R. segetum* è stato diluito in dimetilsolfossido (DMSO) e testato contro larve al 3° stadio iniziale di *C. quinquefasciatus* seguendo il metodo dell'OMS (WHO 1996), con lievi modifiche effettuate da Benelli et al. (Benelli et al. 2019). Le larve sono state selezionate e trasferite in 25 mL di acqua distillata. L'EO è stato diluito in DMSO ottenendo le seguenti concentrazioni di prova: 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$. Per i trattamenti sperimentali, 1 mL di ciascuna diluizione di EO è stato aggiunto a 224 mL di acqua distillata in una ciotola di vetro da 500 ml e agitato leggermente per garantire una soluzione di prova omogenea. Quindi, le larve selezionate sono state trasferite dall'acqua distillata in una ciotola della soluzione in esame con una superficie finale di 125 cm^2 (25 larve/becher). Ciascuna concentrazione è stata replicata 4 volte su gruppi di 25 larve ciascuno. L'acqua distillata, con la stessa quantità di DMSO usata per sciogliere l'EO, era il controllo negativo. La mortalità larvale è stata registrata dopo 24 h in una camera di crescita (fotoperiodo 16:8, 24 ± 1 °C). Nessun cibo è stato offerto alle larve durante le fasi di test e di riposo.

6.3.3.7. Attività insetticida su *Musca domestica*

L'EO è stato testato su femmine e maschi adulti (3-6 giorni di età) mediante applicazione topica, seguendo Benelli et al. (Benelli et al. 2019). Un μL di acetone (Sigma-Aldrich, Germania) più l'EO a 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 μg adulto⁻¹ (ogni concentrazione è stata testata su 4 gruppi di 20 maschi o/e femmine ciascuno), è stata applicata utilizzando una micropipetta elettrica (Hardy Step Electronic, Brand, Repubblica Ceca) al pronoto di mosche anestetizzate con anidride carbonica. Il numero e l'intervallo di dosi sono stati determinati da esperimenti preliminari. L'acetone era il controllo negativo. Le mosche sono state

spostate in una scatola di recupero (10 × 10 × 12 cm, posta in una camera di crescita, fotoperiodo 16:8, 24 ± 1 °C) per 24 ore; quindi, è stata registrata la mortalità per maschi e femmine.

6.3.3.8. Attività insetticida su *Spodoptera littoralis*

La'EO diluito in acetone è stato testato mediante applicazione topica su larve di *S. littoralis* all'inizio del 3° stadio (peso 20-25 mg larva⁻¹). Secondo Pavela et al. (Pavela et al. 2020), ogni larva è stata trattata sul dorso con 1 µL di acetone contenente 20, 30, 40, 50, 70, 90 e 100 µg di larva⁻¹ di EO. Ciascuna concentrazione è stata replicata 4 volte ($n = 20$ larve replicate). Il numero e l'intervallo delle singole dosi sono stati determinati da esperimenti preliminari. L'acetone era il controllo negativo. Tutte le larve trattate da ciascuna replicazione sono state trasferite in scatole di plastica (10 × 10 × 7 cm) per 24 ore e conservate in una camera di crescita (fotoperiodo 16:8, 24 ± 1 °C). Ogni scatola aveva un cappuccio perforato per evitare qualsiasi effetto di fumigazione dell'EO o dell'acetone.

6.3.3.9. Analisi statistica

Le dosi letali o le concentrazioni letali sono state stimate utilizzando l'analisi Probit (Finney 2017). Il calcolo includeva anche una possibile correzione della mortalità secondo Abbott (Abbott 1925). I calcoli sono stati eseguiti utilizzando il software statistico BioStat Pro (versione 5.8.9.).

6.3.4. Risultati e discussioni

6.3.4.1. Resa dell'olio essenziale e sua composizione chimica

L'idrodistillazione dei fiori di *R. segetum* ha dato un EO giallo pallido con una resa pari a 0.9% (v/p). Complessivamente sono stati identificati 27 composti, che rappresentano il 99.9% della composizione totale. I composti sono elencati nella **Tabella 1** in base ai loro indici di ritenzione su una colonna HP-5MS e sono classificati in base alla loro struttura chimica in quattro classi. Questo EO era estremamente ricco di idrocarburi monoterpenici (90.1%). L' α -phellandrene

(49.3%) era, di gran lunga, il componente principale di questa classe così come dell'EO, seguito da terpinolene (20.7%) e β -phellandrene (9.2%). Questi 3 componenti costituivano circa l'80% della composizione totale. I monoterpeni ossigenati erano presenti in quantità inferiori (6.1%), con piperitenone ossido (5.9%) come composto principale della classe, mentre i derivati sesquiterpenici erano praticamente assenti. Tra gli altri composti è da segnalare la presenza di una buona quantità di dillapiolo (3.7%).

Sulla base della composizione degli EO di diverse popolazioni di *R. segetum* studiate finora, è possibile identificare tre chemiotipi distinti: il primo è in gran parte dominato da idrocarburi monoterpenici, solitamente α -phellandrene, terpinolene e *p*-cimene (Bicchi et al. 2009; Marongiu et al. 2007; Palà-Paul et al. 2002; Palà-Paul et al. 2005); un secondo che contiene fenilpropanoidi, solitamente miristicina e/o dillapiolo come composti principali (Jabrane et al. 2010; Ben Jannet et al. 2007; Karkouri et al. 2017); e un terzo ricco di dillapiolo e *o*-cimene (Bozovic et al. 2020).

La composizione del nostro EO indica chiaramente che la stazione siciliana appartiene al primo chemiotipo. Infatti, il confronto con gli EO dei fiori delle altre popolazioni mostra un'elevata similitudine con quelli della Sardegna [(α -phellandrene (24.7%), terpinolene (19.9%)] (Marongiu et al. 2007), Andalusia (Spagna) [(α -phellandrene (54.7–44.5%), terpinolene (27.6–20.1%)] (Palà-Paul et al. 2002), Castillia la Mancha (Spagna) [(α -phellandrene (33.8–32.0%), terpinolene (21.4–18.0%)] (Palà-Paul et al. 2005) e Kroussia (Tunisia) [(α -phellandrene (34.7%), terpinolene (23.7%)] (Jabrane et al. 2009).

Tabella 1. Composizione (%) dell'olio essenziale dei fiori di *R. segetum* raccolti in Sicilia.

N.	Componenti	LRI ^a	LRI Lett.	Area (%)	Id. ^b
1	α -Thujene	921	924	0.4	RI, MS
2	α -Pinene	926	932	3.0	Co-I, RI, MS
3	Camphene	939	946	t	Co-I, RI, MS
4	Sabinene	965	969	0.5	Co-I, RI, MS
5	β -Pinene	968	974	2.5	Co-I, RI, MS
6	Myrcene	989	988	1.1	Co-I, RI, MS
7	α -Phellandrene	1004	1002	49.3	Co-I, RI, MS
8	3-Carene	1008	1008	t	Co-I, RI, MS
9	α -Terpinene	1014	1014	0.1	Co-I, RI, MS
10	<i>p</i> -Cymene	1022	1020	1.4	Co-I, RI, MS
11	Limonene	1024	1025	0.3	Co-I, RI, MS
12	β -Phellandrene	1025	1026	9.2	RI, MS
13	(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1037	1032	1.3	Co-I, RI, MS
14	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1047	1044	0.1	Co-I, RI, MS
15	γ -Terpinene	1055	1054	0.2	Co-I, RI, MS
16	Terpinolene	1086	1086	20.7	Co-I, RI, MS
17	Linalool	1101	1095	t	Co-I, RI, MS
18	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	1109	1108	t	RI, MS
19	allo-Ocimene	1129	1128	t	Co-I, RI, MS
20	Terpinen-4-ol	1173	1174	0.1	Co-I, RI, MS
21	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1183	1179	0.1	RI, MS
22	α -Terpineol	1186	1186	t	Co-I, RI, MS
23	Piperitone	1250	1249	t	RI, MS
24	Piperitenone	1336	1340	t	RI, MS
25	Piperitenone oxide	1362	1366	5.9	RI, MS
26	Germacrene D	1471	1484	t	RI, MS
27	Dill apiole	1621	1620	3.7	RI, MS
Monoterpeni idrocarburici				90.1	
Monoterpeni ossigenati				6.1	
Sesquiterpeni idrocarburici				t	
Altro				3.7	
Totale				99.9	

^a LRI: Indice ritenzione lineare su colonna HP-5MS; ^b Co-I, Co-eluzione con standard autentici (Sigma-Aldrich); RI, coerenza rispetto ai valori riportati sulla libreria ADAMS; MS, spettro di massa confacente con i dati ADAMS, NIST17 e FFNSC3.

D'altra parte, gli oli di M'saken (Tunisia) (Ben Jannet et al. 2007) e Marocco (Karkouri et al. 2017; Gattefosse and Igolen, 1946), ricchi di dillapiole e miristicina, hanno mostrato un profilo completamente diverso rispetto al nostro campione analizzato.

6.3.4.2. Attività insetticida

L'EO dei fiori di *R. segetum* ha mostrato un'attività insetticida rilevante contro le tre specie di insetti testate (**Tabella 2**). Per quanto riguarda le zanzare, l'EO ha mostrato una notevole efficacia contro le larve di 3° stadio della specie

studiata *C. quinquefasciatus*, con un $LC_{50} = 27.1 \mu L \times L^{-1}$ e $LC_{90} = 42.5 \mu L \times L^{-1}$ (Tabella 2).

Tabella 2. Concentrazioni letali (LC) e dosi letali (LD) dell'EO di *Ridolfia segetum* contro i tre insetti.

Insetti	Unità	LC/LD ₅₀	CI ₉₅	LC/LD ₉₀	CI ₉₅	χ^2 (df = 4)	p-Level
<i>C. quinquefasciatus</i>	$\mu g L^{-1}$	27.1	18.9-	42.5	38.9-	0.734	0.574
			32.3		54.2		ns
<i>M. domestica</i> female	μg adult ⁻¹	50.8	41.2-	147.5	129.5-	3.751	0.289
			62.3		168.7		ns
<i>M. domestica</i>	μg adult ⁻¹	10.5	5.8-15.6	75.2	61.8-	2.485	0.615
					93.6		ns
<i>S. littoralis</i>	μg adult ⁻¹	37.9	28.5-	99.6	87.2-	2.745	0.133
					42.6		152.7

CI₉₅ = 95% intervallo di confidenza, df = livello di libertà; ns = non significativo ($p > 0.05$).

Questi valori sono inferiori se confrontati con quelli ottenuti testando molti EO vegetali come larvicidi sulle stesse specie di zanzare (es. *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe EO, $LC_{50} = 37.29 \mu L \times L^{-1}$ (Sutthanont et al. 2019); *Blumea mollis* (D. Don) Merr. EO, $LC_{50} = 71.71 \mu L \times L^{-1}$ (Senthilkumar et al. 2008)); *Zingiber collinsii* Mood & Theilade EO, $LC_{50} = 50.11 mg \times L^{-1}$ (Huong et al. 2020). D'altra parte, va notato che, anche se diversi EO sono stati trovati più efficaci contro larve di *C. quinquefasciatus* (ad esempio oli di *Lippia berlandieri* Schauer e *Pimpinella anisum* L., entrambi LC_{50} erano $< 7 mg \times L^{-1}$ (Andrade-Ochoa et al. 2018)), il valore LC_{50} calcolato qui per *R. segetum* è di interesse per ulteriori studi. Infatti, secondo Pavela (Pavela 2015), i larvicidi per zanzare a base di EO che raggiungono valori di $LC_{50} < 50 \mu L \times L^{-1}$ possono essere considerati promettenti per l'ulteriore sviluppo di prodotti zanzaricidi. Sono ancora necessari ulteriori sforzi per aumentare la stabilità e l'efficacia dell'EO sul campo (Pavoni et al. 2019) per consentirne l'uso nel mondo reale, con particolare riferimento all'incapsulamento in nanoemulsioni per aumentare la bioattività e la stabilità nel tempo (Sundararajan et al. 2018; Mohafrash et al. 2020).

Per quanto riguarda *M. domestica*, una diversa tossicità dell'EO è stata riscontrata su mosche maschili e femminili, calcolando valori LD₅₀ di 10.5 e 50.8 μg adulto⁻¹, rispettivamente (LD₉₀ = 75.2 e 147.5 μg adulto⁻¹, rispettivamente), con intervalli di confidenza del 95% (Tabella 2). Anche se un certo numero di oli essenziali sono

stati testati contro larve di *M. domestica*, con risultati positivi (Xie et al. 2019; Chere et al. 2018; Xie et al. 2020), anche le mosche adulte dovrebbero essere oggetto di un'adeguata azione di controllo, poiché sono veicoli di riproduzione e causano anche fastidio all'uomo e al bestiame, come altre specie di muscoidi (Hazarika et al. 2020; Scalerandi et al. 2018).

L'EO testato ha mostrato un'efficacia relativamente promettente contro *M. domestica*. Sulla base dei valori di LC₉₀ stimati per le femmine meno sensibili, saremmo in grado di raggiungere almeno il 90% di mortalità adulta approssimativamente con una preparazione a base di olio essenziale del 15-20%. La diversa sensibilità tra i sessi di *M. domestica* è confermata anche da altri studi (Pavela et al. 2014). In generale, le femmine sono sempre meno sensibili alle sostanze chimiche rispetto ai maschi. Pertanto, nei test biologici, è importante monitorare ogni sesso separatamente, o solo le femmine, che sono più importanti in termini di fertilità (Benelli et al. 2018; Pavela et al. 2016). Tuttavia, anche le concentrazioni sub-letali di EO applicate ad adulti di *M. domestica* possono avere un impatto significativo sulla densità di popolazione di questo parassita, perché possono ridurre significativamente la fecondità, la longevità e la vitalità complessiva degli adulti, come è stato dimostrato per altri EO (Pavela et al. 2014; Benelli et al. 2018; Kumar et al. 2014). Lo studio di questo fenomeno per l'EO di *R. segetum* sarà oggetto di ulteriori ricerche.

L'EO è stato trovato significativamente tossico per *S. littoralis* al terzo stadio larvale, raggiungendo valori LD₅₀ e LD₉₀ di 37.9 e 99.6 $\mu\text{g} \times \text{larva}^{-1}$ (Tabella 2). La sua efficacia sembra buona contro questo importante parassita. Rispetto ad altri EO, quello di *R. segetum* sembra fornire un'efficacia superiore rispetto all'EO di *Echinophora spinosa* L. (Apiaceae) o ad alcuni EO ottenuti da piante del genere *Thymus* (Pavela et al. 2019; Pavela et al. 2019). Sarà inoltre necessario determinare se l'EO da *R. segetum* provoca fitotossicità nelle piante trattate. Alte concentrazioni di EO sono note per il loro potenziale erbicida (Verdeguer et al. 2020). Tuttavia, è anche noto che, sebbene basse dosi di EO vegetali possano non mostrare tossicità acuta nei confronti delle larve di *S. littoralis*, possono causare tossicità cronica, come dimostrato, ad esempio, per EO estratti da *Pimenta racemosa* (Mill.) JW Moore, *Origanum vulgare* L., *Salvia sclarea* L. e *Thymus*

vulgaris L. Infatti, quando questi EO sono stati applicati a dosi corrispondenti al valore LD₃₀ stimato, hanno portato a una mortalità complessiva di *S. littoralis* larve > 70%. Inoltre, questi EO hanno ridotto significativamente la longevità, la fecondità, la fertilità e la natalità degli adulti sopravvissuti (Pavela et al. 2012). Questo fenomeno merita quindi ulteriori studi, compresi gli sforzi per valutare l'EO di *R. segetum*. È anche importante concentrarsi su una formulazione appropriata dell'insetticida botanico, poiché quest'ultimo può aumentare significativamente l'efficacia biologica, riducendo così concentrazioni elevate. Ad esempio, una nanoformulazione dell'EO da *Mentha spicata* L. (Lamiales: Lamiaceae) ha aumentato la sua efficacia contro *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) e *M. domestica* rispettivamente di oltre il 71 e 52% (Mahafrash et al. 2020). Le prospettive delle micro e nano-emulsioni verdi, che aumentano l'efficacia e la sicurezza degli EO, sono state confermate anche da altri studi (Pavoni et al. 2019, Pavela et al. 2019).

Circa l'80% della composizione totale di questo olio era costituita da tre costituenti, vale a dire α -phellandrene (49.3%), terpinolene (20.7%) e β -phellandrene (9.2%). Pertanto, si presume che gli effetti insetticidi osservati sui tre bersagli dipendano strettamente da questi composti. L' α -phellandrene e il terpinolene si sono dimostrati efficaci come larvicidi contro *Aedes aegypti* L. e *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) con valori LC₅₀ di 16.6 e 39.9, e 28.4 e 35.6 mg L⁻¹ (Cheng et al. 2009). Il terpinolene è stato testato anche da Pavela et al. (Pavela et al. 2018) su *C. quinquefasciatus*, evidenziando una LC₅₀ di 25.7 μ L×L⁻¹. β -Phellandrene ha mostrato tossicità da contatto e fumigazione contro il coleottero *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae), con LD₅₀ e LC₅₀ di 2.2 μ g×adulto⁻¹ e 3.6 mg×L⁻¹, rispettivamente (Ma et al. 2020). Tuttavia, anche se va notato che la maggior parte dei componenti è generalmente considerata responsabile dell'attività biologica, è possibile che esistano relazioni sinergiche o antagonistiche tra di loro, anche con composti minori (Benelli et al. 2017; Tak et al. 2015; Tak et al. 2017; Liu et al. 2020; Benelli et al. 2017). Sono quindi necessarie ulteriori ricerche su questo fenomeno.

Per quanto riguarda la loro potenziale modalità d'azione, l'evidenza dalla letteratura suggerisce il loro coinvolgimento nella trasmissione colinergica, portando a una

compromissione della conduzione nervosa degli insetti e della coordinazione del sistema neuromuscolare. Ciò può causare un'alterazione del comportamento dell'insetto, mancanza di coordinazione motoria e persino la morte (Maggi et al. 2018). In effetti, è stato riscontrato che il β -phellandrene esercita un'inibizione sull'attività dell'acetilcolinesterasi nella blatta tedesca, *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Ectobiidae) (Yeom et al. 2015).

Gli EO sono stati spesso valutati scarsamente tossici per le specie non bersaglio (Govindarajan et al. 2016; Murfadunnisa et al. 2019). Tuttavia, in molti casi mostrano una tossicità rilevante per specie acquatiche non bersaglio (Conti et al. 2014; Benelli et al. 2019), impollinatori e agenti di controllo biologico (Ferreira et al. 2017; Melo et al. 2018). Pertanto, sono necessarie ulteriori ricerche per valutare la potenziale tossicità dell'EO di *R. segetum* sulle specie non bersaglio, nonché i suoi effetti a lungo termine sulla fisiologia e sul comportamento.

6.3.5. Conclusioni

In conclusione, il presente lavoro ha esplorato il potenziale insetticida dell'olio essenziale di *R. segetum*, una specie mediterranea che si trova comunemente nei campi di cereali e negli incolti. Le analisi GC-FID e GC-MS hanno mostrato la presenza significativa di idrocarburi monoterprenici (90.1%), consentendoci di classificare l'EO nel chemiotipo dominato da α -phellandrene, terpinolene e *p*-cimene. Sviluppare nuovi insetticidi dal fiore dell'EO di *R. segetum* richiede ulteriori ricerche. Il presente studio sottolinea chiaramente che questa pianta alimentare tradizionale fornisce un EO efficace, che può essere utilizzato per lo sviluppo e la successiva produzione di insetticidi botanici contro specie di insetti altamente diversificate e dannose. Tali prospettive sono inoltre accresciute dalla possibilità di coltivare la pianta anche in zone calde o piuttosto aride (Pavela et al. 2016), problema che può fornire rese simili a quelle dell'analogo habitat e crescita di *F. vulgare*. Questa coltura potenzialmente alternativa fornisce rese relativamente elevate di EO (circa l'1%) ed è sia una pianta alimentare che medicinale, pertanto le applicazioni di insetticidi botanici a base dell'EO di *R. segetum* non destano preoccupazioni.

6.3.6. Bibliografia

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267.

Adams, R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, IL, USA, 2007.

Andrade-Ochoa S, Sánchez-Aldana D, Chacón-Vargas KF, Rivera-Chavira BE, Sánchez-Torres LE, Camacho AD, Noguera-Torres B, Nevárez-Moorillón GV (2018) Oviposition deterrent and larvicidal and pupaecidal activity of seven essential oils and their major components against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): Synergism–antagonism effects. *Insects* 9:25.

Badalamenti N, Bruno M, Gagliano Candela R, Maggi F (2020) Chemical composition of the essential oil of *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol subsp. *meoides* (Desf.) Fiori (Umbelliferae) collected wild in Central Sicily and its antimicrobial activity. *Nat Prod Res*. In press.

Badalamenti N, Ilardi V, Rosselli S, Bruno M, Maggi F, Leporini M, Falco T, Loizzo MR, Tundis R (2020) *Ferulago nodosa* subsp. *geniculata* (Guss.) Troia & Raimondo: Isolation of essential oil and evaluation of its bioactivity. *Molecules* 25:3249.

Beeby E, Magalhães M, Lemos MFL, Pires IM, Cabral C (2020) Cytotoxic effects of *Ridolfia segetum* (L.) Moris phytoproducts in cancer cells. *J Ethnopharmacol* 267:113515.

Ben Jannet H, Mighri Z (2007) Hydrodistillation kinetic and antibacterial effect studies of the flower essential oil from the Tunisian *Ridolfia segetum* (L.). *J Essent Oil Res* 19:258–261.

Benelli G, Pavela R, Iannarelli R, Petrelli R, Cappellacci L, Cianfaglione K, Afsharf FH, Nicoletti M, Canale A, Maggi F (2017a) Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: Larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say. *Ind Crops Prod* 96:186–195.

- Benelli G, Pavela R, Canale A, Cianfaglione K, Ciaschetti G, Conti F, Nicoletti M, Senthil-Nathan S, Mehlhorn H, Maggi F (2017b) Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitol Int* 66:166–171.
- Benelli G, Pavela R (2018a) Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. *Acta Trop* 179:47–54.
- Benelli G, Pavela R (2018b) Beyond mosquitoes—Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. *Ind Crops Prod* 117:382–392.
- Benelli G, Pavela R, Giordani C, Casettari L, Curzi G, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F (2018c) Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Ind Crops Prod* 112:668–680.
- Benelli G, Pavela R, Petrelli R, Nzekoue FK, Cappellacci L, Lupidi G, Quassinti L, Bramucci M, Sut S, Dall'Acqua S (2019a) Carlina oxide from *Carlina acaulis* root essential oil acts as a potent mosquito larvicide. *Ind Crops Prod* 137:356–366.
- Benelli G, Maggi F, Canale A, Mehlhorn H (2019b) Lyme disease is on the rise—How about tick repellents? A global view. *Entomol Gen* 39:61–72.
- Benelli G, Pavela R, Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Santini G, Canale A, Maggi F (2019c) Insecticidal activity of the essential oil from *Schizogyne sericea* (Asteraceae) on four insect pests and two non-target species. *Entomol Gen* 39:9–18.
- Benelli G, Wilke AB, Bloomquist JR, Desneux N, Beier JC (2021) Overexposing mosquitoes to insecticides under global warming: A public health concern? *Sci Total Environ* 762:143069.
- Bicchi C, Rubiolo P, Ballero M, Sanna C, Matteodo M, Esposito F, Zinzula L, Tramontano E (2009) HIV-1-inhibiting activity of the essential oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. *Planta Med* 75:1331–1335.

Božović M, Garzoli S, Baldisserotto A, Andreotti E, Cesa S, Pepi F, Vertuani S, Manfredini S, Ragno R (2020) Variation in essential oil content and composition of *Ridolfia segetum* Moris based on 30-hour prolonged fractionated extraction procedure. *Nat Prod Res* 34:1923–1926.

Bruno M, Ilardi V, Lupidi G, Quassinti L, Bramucci M, Fiorini D, Venditti A, Maggi F (2020) Composition and biological activities of the essential oil from a Sicilian accession of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. *Nat Prod Res*. In press.

Cabral C, Poças J, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Salgueiro L (2015) *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. *Ind Crops Prod* 65:56–61.

Casiglia S, Riccobono L, Bruno M, Rosselli S, Senatore F, Senatore F (2016) Chemical composition of the essential oil from *Thapsia garganica* L. (Apiaceae) grown wild in Sicily and its antimicrobial activity. *Nat Prod Res* 30:1042–1052.

Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Tirillini B, Cristalli G, Papa F, Sagratini G, Vittori S, Maggi F (2010) Essential oil from fruits and roots of *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu (Apiaceae): Composition and antioxidant and anti-*Candida* activity. *Flavour Frag J* 25:493–502.

Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST (2009) Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresour Technol* 100:452–456.

Chere JMC, Dar MA, Pandit RS (2018) Evaluation of some essential oils against the larvae of house fly, *Musca domestica* by using residual film method. *Biotechnol Microb* 9:555752.

Conti B, Flamini G, Cioni PL, Ceccarini L, Macchia M, Benelli G (2014) Mosquitocidal essential oils: Are they safe against non-target aquatic organisms? *Parasitol Res* 113:251–259.

Deligeorgidis NP, Kavallieratos NG, Malesios C, Sidiropoulos G, Deligeorgidis PN, Benelli G, Papanikolaou NE (2019) Evaluation of combined treatment with mineral oil, fenoxycarb and chlorpyrifos against *Cydia pomonella*, *Phyllonorycter*

blancardella and *Synanthedon myopaeformis* in apple orchards. Entomol Gen 39:117–126.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu Rev Entomol 52:81–106.

Di Napoli M, Varcamonti M, Basile A, Bruno M, Maggi F, Zanfardino A (2019) Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of hemlock (*Conium maculatum*, Apiaceae) essential oil. Nat Prod Res 33:3436–3440.

EDQM (Council of Europe). European Pharmacopoeia, 6th ed.; EDQM: Strasbourg, France, 2008.

Euro + Med Plantbase. Available online: http://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=343528&size=medium (accessed on 22 March 2021).

Ferreira TP, Oliveira EE, Tschoeke PH, Pinheiro RG, Maia AMS, Aguiar RWS (2017) Potential use of Negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honeybees. Ind Crops Prod 109:151–157.

FFNSC 2. Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds. Mass Spectral Database; Shimadzu Corps: Kyoto, Japan, 2012.

Finney DJ (1971) Probit Analysis; Cambridge University: London, UK, 1971; pp. 68–78.

Gattefosse J, Igolen G (1946) Aromatic flora of Morocco. The essence of “harvest fennel” (*Ridolfia segetum*). Bull Soc Chim Fr 361–363.

Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G (2016) Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. Ecotoxicol Environ Saf 129:85–90.

- Gul H, Ullah F, Biondi A, Desneux N, Qian D, Gao X, Song D (201) Resistance against clothianidin and associated fitness costs in the chive maggot, *Bradysia odoriphaga*. *Entomol Gen* 39:81–92.
- Hazarika H, Tyagi V, Krishnatreyya H, Islam J, Boruah D, Kishor S, Chattopadhyaya P, Zaman K (2020) Essential oil based controlled-release non-toxic evaporating tablet provides effective repellency against *Musca domestica*. *Acta Trop* 210:105620.
- Humann-Guillemot S, Binkowski ŁJ, Jenni L, Hilke G, Glauser G, Helfenstein F (2019) A nation-wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri-environment schemes. *J Appl Ecol* 56:1502–1514.
- Huong LT, Huong TT, Huong NT, Hung NH, Dat PT, Luong NX, Ogunwande IA (2020) Mosquito larvicidal activity of the essential oil of *Zingiber collinsii* against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *J Oleo Sci* 69:153–160.
- Isman MB, Grieneisen ML (2014) Botanical insecticide research: Many publications, limited useful data. *Trends Plant Sci* 19:140–145.
- Isman MB (2020) Botanical insecticides in the twenty-first century—Fulfilling their promise? *Annu Rev Entomol* 65:233–249.
- Jabrane A, Ben Jannet H, Harzallah-Skhiri F, Casanova J, Mighri Z (2009) GC, GC-MS and ¹³C NMR spectroscopy integrated analyses and in vitro antibacterial activity of *Ridolfia segetum* essential oils from Tunisia. *J Essent Oil-Bear Plants* 12:521–530.
- Jabrane A, Ben Jannet H, Mastouri M, Mighri Z, Casanova J (2010) Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the root oil of *Ridolfia segetum* (L.) Moris from Tunisia. *Nat Prod Res* 24:491–499.
- Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M (2017) Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—A review. *Molecules* 23:34.

Jankowska M, Lapied B, Jankowski W, Stankiewicz M (2019) The unusual action of essential oil component, menthol, in potentiating the effect of the carbamate insecticide, bendiocarb. *Pestic Biochem Phys* 158:101–111.

Karkouri JEL, Amalich S, Drioiche A, Fadili K, Eto B, Khabal Y, Zair T (2017) Phytochemical valuation of the umbels of *Ridolfia segetum* (L.) Moris of Morocco. *Int J Adv Res* 5:1780–1788.

Khamesipour F, Lankarani KB, Honarvar B, Kwenti TE (2018) A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health* 18:1–15.

Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S (2014) Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 100:1–6.

Lentini F, Venza F (2007) Wild food plants of popular use in Sicily. *J Ethnobiol Ethnomed* 3:15.

Liu TT, Chao LKP, Hong KS, Huang YJ, Yang TS (2020) Composition and insecticidal activity of essential oil of *Bacopa caroliniana* and interactive effects of individual compounds on the activity. *Insects* 11:23.

Ma S, Jia R, Guo M, Qin K, Zhang L (2020) Insecticidal activity of essential oil from *Cephalotaxus sinensis* and its main components against various agricultural pests. *Ind Crops Prod* 150:112403.

Maggi F, Benelli G (2018) Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants as Effective Weapons against Mosquito Vectors of Public Health Importance. In *Mosquito-borne Diseases. Parasitology Research Monographs*; Benelli, G., Mehlhorn, H., Eds, Springer: Cham, Switzerland Volume 10.

Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Maxia A (2007) Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Ridolfia segetum* (L.) Moris. *Nat Prod Res* 21:412–417.

Mazzi D, Dorn S (2012) Movement of insect pests in agricultural landscapes. *Ann Appl Biol* 160:97–113.

Melo CR, Picanço MC, Santos AA, Santos IB, Pimentel MF, Santos ACC, Blank AF, Araujo APA, Cristaldo PF, Bacci L (2018) Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. *Crop Prot* 104:47–51.

Mohafrash SM, Fallatah SA, Farag SM, Mossa ATH (2020) *Mentha spicata* essential oil nanoformulation and its larvicidal application against *Culex pipiens* and *Musca domestica*. *Ind Crops Prod* 157:112944.

Murfadunnisa S, Vasantha-Srinivasan P, Ganesan R, Senthil-Nathan S, Kim TJ, Ponsankar A, Kumar SD, Chandramohan D, Krutmuang P (2019) Larvicidal and enzyme inhibition of essential oil from *Spheranthus amaranthoides* (Burm.) against lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.) and their impact on non-target earthworms. *Biocatal Agric Biotechnol* 21:101324.

Naqqash MN, Gökçe A, Bakhsh A, Salim M (2016) Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitol Res* 115:1363–1373.

NIST 17. Mass Spectral Library; (NIST/EPA/NIH); National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA, 2017.

OEPP/EPPO. EPPO Standards PM 7/124 (1) Diagnostic Protocol for *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*. *OEPP/EPPO Bull.* 2015, 34, 257–270.

Palá-Paúl J, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Ramos-Vázquez P (2002) Volatile constituents of *Ridolfia segetum* (L.) Moris gathered in southern Spain, Andalusia province. *J Essent Oil Res* 14:206–209.

Palá-Paúl J, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Vallejo MCG (2005) Volatile constituents of *Ridolfia segetum* (L.) Moris gathered in central Spain: Castilla la Mancha. *J Essent Oil Res* 17:119–121.

Pavela R (2007) Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on the house fly (*Musca domestica* Lin.). *J Essent Oil -Bear. Plants* 10:346–356.

Pavela R (2012) Sublethal effects of some essential oils on the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *J Essent. Oil-Bear. Plants* 15:144–156.

Pavela R (2014a) Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. J Asia Pac Entomol 17:287–293.

Pavela R (2014b) Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. Ind Crops Prod 60:247–258.

Pavela R (2015) Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. Ind Crops Prod 76:174–187.

Pavela R, Zabka M, Bednar J, Triska J, Vrchotova N (2016) New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Ind Crops Prod 83:275–282.

Pavela R, Maggi F, Lupidi G, Cianfaglione K, Dauvergne X, Bruno M, Benelli G (2017) Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Ind Crops Prod 109:603–610.

Pavela R, Maggi F, Cianfaglione K, Bruno M, Benelli G (2018) Larvicidal activity of essential oils of five Apiaceae taxa and some of their main constituents against *Culex quinquefasciatus*. Chem Biodivers 15:e1700382.

Pavela R, Bartolucci F, Desneux N, Lavoit AV, Canale A, Maggi F, Benelli G (2019a) Chemical profiles and insecticidal efficacy of the essential oils from four *Thymus* taxa growing in central-southern Italy. Ind Crops Prod 138:111460.

Pavela R, Benelli G, Pavoni L, Bonacucina G, Cespi M, Cianfaglione K, Bajalan I, Morshedloo MR, Lupidi G, Romano D (2019b) Microemulsions for delivery of Apiaceae essential oils—Towards highly effective and eco-friendly mosquito larvicides? Ind Crops Prod 129:631–640.

Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G (2019c) Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. Acta Trop 193:236–271.

Pavela R, Morshedloo MR, Mumivand H, Khorsand GJ, Karami A, Maggi F, Desneux N, Benelli G (2020a) Phenolic monoterpene-rich essential oils from Apiaceae and Lamiaceae species: Insecticidal activity and safety evaluation on non-target earthworms. *Entomol Gen* 40:421–435.

Pavela R, Maggi F, Cianfaglione K, Canale A, Benelli G (2020b) Promising insecticidal efficacy of the essential oils from the halophyte *Echinophora spinosa* (Apiaceae) growing in Corsica Island, France. *Environ Sci Pollut Res* 27:14454–14464.

Pavoni L, Pavela R, Cespi M, Bonacucina G, Maggi F, Zeni V, Canale A, Lucchi A, Bruschi F, Benelli G (2019) Green micro-and nanoemulsions for managing parasites, vectors and pests. *Nanomaterials* 9:1285.

Pignatti S (1982) *Flora d'Italia*; Edagricole: Milan, Italy, 1982; Volume 2, p. 220.

Pignatti S (2018) *Flora d'Italia*; Edagricole-New Business Media: Milan, Italy, 2018; Volume 3, p. 592.

Scalerandi E, Flores GA, Palacio M, Defagó MT, Carpinella MC, Valladares G, Bertoni A, Palacios SM (2018) Understanding synergistic toxicity of terpenes as insecticides: Contribution of metabolic detoxification in *Musca domestica*. *Front Plant Sci* 9:1579.

Senthilkumar A, Kannathasan K, Venkatesalu V (2008) Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol Res* 103:959–962.

Sundararajan B, Moola AK, Vivek K, Kumari BR (2018) Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). *Microb Pathog* 125:475–485.

Sutthanont N, Attrapadung S, Nuchprayoon S (2019) Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles from *Curcuma zedoaria* essential oil against *Culex quinquefasciatus*. *Insects* 10:27.

Tak JH, Isman MB (2015) Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. *Sci Rep* 5:1–10.

Tak JH, Isman MB (2017) Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Sci Rep* 7:srep42432.

Tbatou M, Kabil M, Belahyan A, Belahsen R (2018) Dietary potential of some forgotten wild leafy vegetables from Morocco. *Int Food Res J* 25:1829–1836.

Tuttolomondo T, Licata M, Leto C, Savo V, Bonsangue G, Gargano ML, Venturella G, La Bella S (2014) Ethnobotanical investigation on wild medicinal plants in the Monti Sicani regional park (Sicily, Italy). *J Ethnopharmacol* 153:568–586.

Ullah F, Gul H, Desneux N, Gao X, Song D (2019a) Imidacloprid-induced hormetic effects on demographic traits of the melon aphid, *Aphis gossypii*. *Entomol Gen* 39:325–337.

Ullah F, Gul H, Desneux N, Tariq K, Ali A, Gao X, Song D (2019b) Clothianidin-induced sublethal effects and expression changes of vitellogenin and ecdysone receptors genes in the melon aphid, *Aphis gossypii*. *Entomol Gen* 39:137–149.

Ullah F, Gul H, Desneux N, Qu Y, Xiao X, Khattak AM, Gao X, Song D (2019c) Acetamiprid-induced hormetic effects and vitellogenin gene (Vg) expression in the melon aphid, *Aphis gossypii*. *Entomol Gen* 39:259–270.

Varikou K, Garantonakis N, Birouraki A (2019) Exposure of *Bombus terrestris* L. to three different active ingredients and two application methods for olive pest control. *Entomol Gen* 39:53–60.

Verdeguer M, Sanchez-Moreiras AM, Araniti F (2020) Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. *Plants* 9:1571.

WHO. Report of the WHO Informal Consultation on the Evaluation and Testing of Insecticides; CTD/WHOPES /IC /96.1; WHO: Geneva, Switzerland, 1996; p. 69.

Wilke ABB, Beier JC, Benelli G (2020) Filariasis vector control down-played due to the belief the drugs will be enough—Not true! *Entomol Gen* 40:15–24.

Xie Y, Huang Q, Rao Y, Hong L, Zhang D (2019) Efficacy of *Origanum vulgare* essential oil and carvacrol against the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Environ Sci Pollut Res* 26:23824–23831.

Xie Y, Jin H, Yang X, Gu Q, Zhang D (2020) Toxicity of the essential oil from *Thymus serpyllum* and thymol to larvae and pupae of the housefly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Environ Sci Pollut Res* 27:35330–35340.

Yeom HJ, Jung CS, Kang J, Kim J, Lee JH, Kim DS, Kim HS, Park PS, Kang KS, Park IK (2015) Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Asteraceae plant essential oils and their constituents against adults of the German cockroach (*Blattella germanica*). *J Agric Food Chem* 63:2241–2248.

Zhang C, Hu R, Shi G, Jin Y, Robson MG, Huang X (2015) Overuse or underuse? An observation of pesticide use in China. *Sci Total Environ* 538:1–6.

6.4. Structural characterization of carboxyatractyloside and acaricidal activity of natural *ent*-kaurene diterpenoids isolated from *Chamaeleon gummifer* against *Tetranychus urticae*

I risultati di questa sezione sono in fase di revisione in *Crop Protection*.

6.4.1. Abstract

I metaboliti secondari di origine vegetale stanno suscitando grande interesse per il loro potenziale utilizzo in applicazioni agricole, con particolare riferimento al controllo dei parassiti artropodi. Nel presente lavoro viene riportata, per la prima volta, la delucidazione strutturale del diterpenoide glicosilato carbossiatractyloside (**2**) mediante tecniche spettroscopiche e spettrometriche. L'identificazione completa è avvenuta grazie a esperimenti NMR uni e bidimensionali, assegnando i singoli protoni e atomi di carbonio, e la stereochimica mediante lo spettro NOESY. Il carbossiatractyloside (**2**), insieme agli altri due *ent*-kaureni tossici atractyloside (**1**) e atractyligenin (**3**), estratti dalle radici di *Chamaeleon gummifer* Cass., sono stati testati per la loro attività acaricida contro il ragnetto rosso, *Tetranychus urticae*. In particolare, i composti **1-3** sono risultati tossici per *T. urticae*, portando a mortalità significativa, inibizione della deposizione delle uova, ridotta schiusa delle uova e inibizione della natalità. Analizzando i dati, alla dose più bassa, 12.5 µg·cm⁻², il composto **2** era il più efficace, portando a mortalità > 60% dopo 5 giorni di esposizione, inibendo la deposizione delle uova > 70% e riducendo la natalità dell'80%. Nel complesso, questi composti rappresentano validi candidati per lo sviluppo di nuovi acaricidi per la protezione delle colture. Sono in corso ulteriori ricerche su come sviluppare formulazioni stabili per l'utilizzo sul campo e sugli effetti non-*target* di questi metaboliti su impollinatori e su agenti di bio-controllo degli acari.

6.4.2. Introduzione

Al giorno d'oggi, il crescente aumento demografico è proporzionalmente legato alla crescita incessante dei bisogni alimentari, e all'incredibile richiesta di nuovi spazi agricoli (Ray et al. 2013). Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha puntato alla

messa a punto di nuove tecnologie volte ad aumentare la resa delle colture agricole, la qualità dei prodotti, senza dimenticare il progressivo netto calo dei campi coltivabili, la scarsità idrica e vari cambiamenti climatici. Lo sviluppo scientifico comporta progressi che riguardano il campo della fitogenetica, nella ricerca di semi più resistenti e con una resa maggiore, nella gestione del pascolo, nell'uso di prodotti naturali per il controllo di parassiti animali. Quest'ultimo campo comprende prodotti di origine naturale e derivati semisintetici, che hanno svolto un ruolo fondamentale nel controllo dei parassiti. In effetti, si stima che nel 2012 i prodotti naturali e i relativi derivati rappresentassero il 30% delle vendite globali di prodotti chimici per l'agricoltura (Gerwick and Sparks, 2014). Pertanto, lo studio sul meccanismo d'azione dei metaboliti secondari ha ampliato il loro utilizzo nelle applicazioni agricole verso il controllo degli insetti dannosi. Infatti, diversi studi hanno riportato l'uso delle piante in fitoterapia, e soprattutto nel campo della disinfestazione, tra cui diverse specie appartenenti alle Apiaceae (Basile et al. 2022; Badalamenti et al. 2021a), Asparagaceae (Badalamenti et al. 2021b; 2022) e la famiglia delle Asteraceae (Haris et al. 2022; Mssillou et al. 2022; Kavallieratos et al. 2022).

Chamaeleon gummifer Cass., nome scientificamente accettato rispetto al più comune *Atractylis gummifera* L. (<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000129147>. Accessed on: 12 Jul 2022'), appartenente alla famiglia delle Asteraceae, ha una distribuzione in quasi tutto il bacino del Mediterraneo (Spagna, Portogallo, Sud Italia, Grecia, Nord Marocco e Algeria). È un cardo spinoso e perenne con radici larghe che possono raggiungere i 40-50 cm, e un diametro di 8-10 cm. Il fusto, che si estende anche fino a 1 m, è ricoperto da foglie molto spinose e, durante le piene giornate estive, da fiori di colore rosa intenso (Vallejo et al. 2009; Bouabid et al. 2019a). Questa pianta è comunemente usata, ad esempio, in Marocco (Kharchoufa et al. 2018), ma è considerata molto tossica, la cui mortalità dipende dalla dose utilizzata, dall'età del soggetto che la utilizza e dalla parte vegetale utilizzata (radici, foglie o fiori) (Bouabid et al. 2019b, Bouabid et al. 2019a). È tradizionalmente usata contro raffreddori, nausea, mal di stomaco e vertigini, ma anche, sotto forma di infuso, contro vesciche o emorragie, come vermifugo o addirittura come purgante (Ahid et al. 2012; Hammich et al. 2013). I casi di

avvelenamento di questa pianta citano il suo impiego per scopi tradizionali e hanno tenuto in considerazione la fitochimica di estratti acquosi o organici, e soprattutto la presenza di diterpeni altamente tossici quali: atractyloside (**1**), carboxyatractyloside (**2**), e atractyligenin (**3**) (**Fig. 1**).

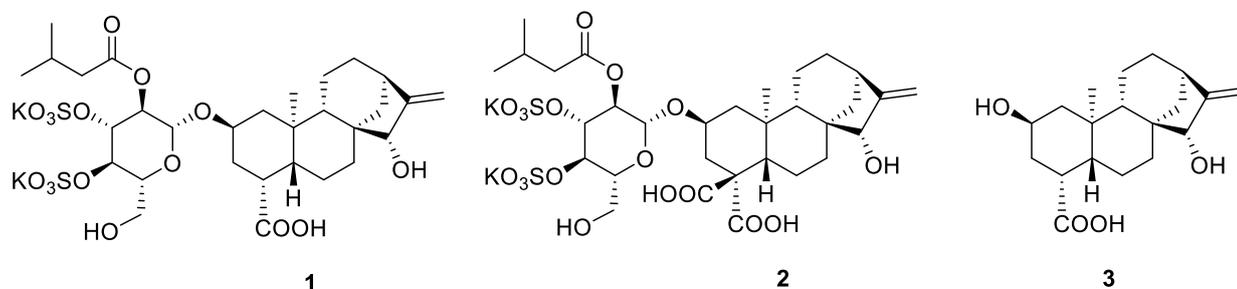


Fig. 1. Strutture di atractyloside (**1**), carboxyatractyloside (**2**), e atractyligenina (**3**).

Il primo composto isolato, e poi strutturalmente identificato, dalle radici di *Chamaeleon gummifer* Cass. è stato l'atractyloside (**1**) (Lefranc, 1868), ma oggi questi diterpeni (1-3) sono stati ritrovati anche in diverse piante come *Xanthium strumarium* (Machado et al. 2021), *Coffea arabica* e *robusta* (Gao et al. 2021; Hu et al. 2021) e *Antennaria rosea* subsp. *confinis* (Xiao et al. 2019). Atractyloside (**1**) e carboxyatractyloside (**2**), ampiamente studiati nel mondo biologico (Todisco et al. 2015; Cho et al. 2017), agiscono a livello cellulare inibendo la fosforilazione ossidativa nei mitocondri degli epatociti e dell'epitelio tubulare prossimale cellule (Vignais et al. 1978). Essenzialmente questi due metaboliti secondari influiscono negativamente sulla produzione di ATP nella cellula, poiché, bloccando il trasporto dell'adenosina difosfato (ADP) nei mitocondri, inibiscono il traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT) (Roux et al. 1996; Pebay- Peyroula et al. 2003). L'aglicone atractyligenin (**3**), a causa dell'assenza dell'unità isovalerica e della porzione zuccherina, è risultata significativamente meno letale di (**1**) e di (**2**) (Vignais et al. 1978). L'atractyligenina (**3**), tuttavia, negli ultimi due decenni, è stata oggetto di numerose modificazioni chimiche al fine di migliorare le proprietà biologiche dei suoi derivati. Queste ricerche hanno riguardato la funzionalizzazione fotoindotta del gruppo metilico C-20 dell'atractyligenina (**3**) (Buscemi et al. 2001; 2003), le trasformazioni catalizzate da enzimi dei suoi gruppi alcolici (Monsalve et al. 2005) e la sintesi di numerosi derivati ossidativi ad attività citotossica (Rosselli

et al. 2007; Cotugno et al. 2014). Uno di questi, l'estere metilico della 15-chetoatrattiligenina, ha mostrato una potente attività di inibizione della crescita delle cellule tumorali il cui meccanismo d'azione è stato ampiamente chiarito (Cotugno et al. 2014; Vasaturo et al. 2017). In questo lavoro, presentiamo la prima delucidazione strutturale completa di **2** mediante spettroscopia 1D e 2D-NMR (^1H - ^1H -COSY, NOESY, HSQC e HMBC) e mediante spettrometria di massa (HPLC/ESI/Q-TOF). Inoltre, i composti **1-3** sono stati valutati per la loro attività acaricida contro il ragnetto rosso, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), un parassita di acari polifagi di elevata importanza agricola (Attia et al. 2013), che è stato trovato resistente a un numero piuttosto ampio di acaricidi che esercitano la loro tossicità attraverso diversi meccanismi d'azione (Wu et al. 2019; Adesanya et al. 2021).

6.4.3. Materiale e metodi

6.4.3.1. Materiale vegetale

Le radici di *Chamaeleon gummifer* Cass. sono state raccolte a Piana degli Albanesi, Sicilia (Italia) all'inizio di maggio 2020. L'autenticazione è stata effettuata dal Prof. Vincenzo Ilardi, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo, Italia. L'esemplare del voucher (PAL MB-2020/84) è stato depositato presso il Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo.

6.4.3.2. Procedure generali

Il potere rotatorio è stato misurato in una soluzione CH_3OH su un polarimetro digitale JASCO P-1010; Gli spettri ^1H e ^{13}C -NMR, per i composti **1-2**, sono stati registrati a 400/100 MHz in $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (dimetilsolfossido, $\text{DMSO}-d_6$) salvo diversa indicazione, sugli spettrometri Bruker, utilizzando il segnale del solvente residuo ($\delta = 2.50$ ppm in ^1H e $\delta = 39.51$ ppm in ^{13}C per DMSO) come riferimento. Per il composto **3** gli spettri di protoni e carbonio sono stati registrati in CD_3OD utilizzando il segnale del solvente residuo ($\delta = 3.31$ ppm in ^1H e $\delta = 49.15$ ppm in ^{13}C per CD_3OD) 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 apparato 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 × 50 mm, 1.8 μm) con una colonna di guardia di sicurezza Phenomenex C₁₈ (4 mm × 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. Il gel Merck Si (70-230 mesh), disattivato con il 15% di H₂O, è stato utilizzato per la cromatografia su colonna. Le TLC sono state eseguite su lastre di gel di silice (Merck, Kieselgel 60 F254, 0,25 e 0,50 mm). Le macchie sono state visualizzate spruzzando una soluzione acida in etanolo di 4-anisaldeide. Tutti i solventi chimici sono stati acquistati da Sigma Aldrich (San Louis, MO, USA) e utilizzati senza ulteriore purificazione.

6.4.3.3. Estrazione e isolamento di atractyloside (1), carbossittractyloside (2) e atractyligenin (3)

Le radici essiccate di *C. gummifer* Cass. (≈ 4,5 kg) sono stati macinati ed estratti in CH₃OH, per tre volte, a temperatura ambiente (4 L × 3 volte). Dopo filtrazione ed evaporazione del solvente a pressione ridotta, è stato ottenuto un estratto metanolico grezzo (98.01 g). Questo estratto, sciolto in acqua distillata, è stato ripartito in *n*-butanolo (11.23 g). Quest'ultimo strato è stato cromatografato su una colonna di gel di silice, eluendo con diclorometano/metanolo (99:1 → 90:10 v/v), per dare 6 diverse frazioni Cg1-Cg6. Le frazioni Cg4-Cg5 (4.32 g) sono state ricromatografate, utilizzando una miscela di diclorometano/acetone/acqua (5.5/4/0.5, v/v/v) come solvente, su gel di silice, per dare i composti **1** (611 mg) e **2** (453 mg). Dalla frazione Cg1 (619 mg), dopo la separazione e la purificazione su colonna di silice, si ottiene il composto **3** (374 mg).

Atractyloside (1)

Solido incolore; $[\alpha]_D^{20}$ -51.7° (c 0.2, H₂O). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.17 (1H, m, H-1α), 0.62 (1H, t, *J* = 12.0 Hz, H-1β), 4.03 (1H, m, H-2α), 2.21 (1H, dd,

$J = 2.2, 1.7$ Hz, H-3 β), 1.04 (1H, ddd, 5.4, 5.2, 4.6 Hz, H-3 α), 2.60 (1H, bs, H-4), 1.33 (1H, m, H-5 β), 1.74 (1H, m, H-6 α), 1.50 (1H, m, H-6 β), 1.52 (1H, m, H-7 β), 1.37 (1H, m, H-7 α), 1.00 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9 β), 1.52 (1H, m, H-11a), 1.28 (1H, m, H-11b), 1.54 (1H, m, H-12 α), 1.39 (1H, m, H-12 β), 2.58 (1H, bs, H-13), 1.75 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-14 α), 1.30 (1H, m, H-14 β), 3.61 (1H, m, H-15 β), 5.07 (1H, bs, H-17a), 4.97 (1H, bs, H-17b), 0.90 (3H, d, $J = 2.6$ Hz, CH₃-20), 4.55 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.66 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-2'), 4.32 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 4.00 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 3.43 (1H, m, H-5'), 3.66 (1H, m, H-6'), 3.60 (1H, m, H-6'), 2.12 (1H, d, $J = 2.30$ Hz, H-2''), 2.14 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 1.96 (1H, sept, $J = 6.5$ Hz, H-3''), 0.87 (6H, d, $J = 2.3$ Hz, H-4'', H-5''). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 47.0 (C-1), 72.3 (C-2), 34.1 (C-3), 45.3 (C-4), 48.1 (C-5), 25.0 (C-6), 35.1 (C-7), 47.2 (C-8), 52.5 (C-9), 42.6 (C-10), 17.2 (C-11), 32.0 (C-12), 41.6 (C-13), 35.9 (C-14), 81.0 (C-15), 159.9 (C-16), 107.4 (C-17), 176.0 (C-19), 15.9 (C-20), 98.6 (C-1'), 72.1 (C-2'), 77.0 (C-3'), 73.4 (C-4'), 75.9 (C-5'), 61.8 (C-6'), 171.0 (C-1''), 42.6 (C-2''), 24.5 (C-3''), 22.13 and 22.15 (C-4''-C-5''). ESIMS (-) m/z 725.2134 [M-H]⁻ (calcd. per C₃₀H₄₅O₁₆S₂, m/z 725.2149). Le sue caratteristiche chimico-fisiche erano in accordo con la letteratura (Brucoli et al. 2012).

Carboxyatractyloside (2)

Solido amorfo giallastro; odore nauseante; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 46.5^\circ$ (c 0.1, MeOH). Per i dati ¹H- e ¹³C-NMR, vedere **Tabella 1**. ESI-MS (+) m/z 793.2033 [M+Na]⁺ (calcd. per 793.2023).

Atractyligenin (3)

Solido amorfo bianco; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -146.3^\circ$ (c 0.1, EtOH). ¹H-NMR (CD₃OD-*d*₄, 400 MHz) δ 2.18 (1H, m, H-1 α), 0.71 (1H, m, H-1 β), 4.17 (1H, m, H-2 α), 2.38 (1H, m, H-3 β), 1.24 (1H, m, H-3 α), 2.63 (1H, bs, H-4), 1.52 (1H, m, H-5 β), 1.83 (1H, m, H-6 α), 1.68 (1H, m, H-6 β), 1.61 (1H, m, H-7 β), 1.50 (1H, m, H-7 α), 1.03 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9 β), 1.70-1.62 (2H, m, H₂-11), 1.70-1.62 (2H, m, H₂-12), 2.69 (1H, bs, H-13), 1.88 (1H, m, H-14 α), 1.40 (1H, dd, $J = 4.9, 4.7$ Hz, H-14 β), 3.80 (1H, s, H-15 β), 5.19 (1H, bs, H-17a), 5.06 (1H, bs, H-17b), 1.00 (3H, s, CH₃-20). ¹³C-NMR (CD₃OD-*d*₄, 100 MHz) δ 50.3 (C-1), 64.9 (C-2), 38.2 (C-3), 45.0 (C-4), 50.0 (C-5), 26.4 (C-6), 36.1 (C-7), 48.0 (C-8), 54.5 (C-9), 41.6 (C-10), 18.8 (C-11), 33.5 (C-

12), 43.7 (C-13), 37.0 (C-14), 83.8 (C-15), 160.2 (C-16), 109.0 (C-17), 179.5 (C-19), 17.2 (C-20). ESIMS (+) m/z 321.2054 $[M+H]^+$ (calcd. per $C_{19}H_{28}O_4$, m/z 321.2060). Le sue caratteristiche chimico-fisiche erano in accordo con la letteratura (Brucoli et al. 2012).

6.4.3.4. Allevamento di *Tetranychus urticae*

Gli acari del ragno rosso, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), sono stati prelevati dalle colture mantenute presso il Crop Research Institute (Repubblica Ceca). Gli acari utilizzati negli esperimenti sono stati allevati su piante di fagioli (*Phaseolus vulgaris* L.) in una camera di crescita (25 ± 3 °C; un fotoperiodo di 12 h).

6.4.3.5. Attività acaricida

La tossicità dei composti **1-3**, misurata come mortalità al 2° e 5° giorno di esposizione, è stata determinata mediante applicazione tarsale ad adulti di *T. urticae* (Pavela, 2015). L'esperimento è stato condotto su dischi di foglie di mora (*Rubus fruticosus* L.) di dimensioni 1 cm². Carboxyatractiloside, atractyligenina e atractyloside sono stati sciolti in acetone e, utilizzando una pipetta automatica, aliquote (10 µL) delle soluzioni di acetone, contenenti una quantità definita dei composti, sono state applicate uniformemente sui dischi fogliari. Le dosi utilizzate erano 12.5, 25.0, 50.0 e 100.0 µg·cm⁻². Dopo l'applicazione, i dischi sono stati posti in piastre Petri (5 cm) con uno strato di agar spesso 0.3 cm sul fondo. Solo acetone è stato applicato ai dischi di controllo.

Dopo l'evaporazione del solvente, è stato utilizzato un pennello fine per trasferire 10 femmine di *T. urticae* (1-2 giorni) su ciascuno dei dischi fogliari. I dischi di Petri sono stati posti in una camera di crescita (L16:D8, 25°C). I dischi fogliari tagliati sono stati quindi controllati dopo il 2° e il 5° giorno dall'applicazione, determinando il numero di adulti morti. La morte è stata registrata quando gli adulti non hanno risposto al pungolo con il forcipe.

Il secondo esperimento è stato progettato per valutare il possibile effetto inibitorio sulla fertilità e sulla fecondità. Le sostanze alle dosi di 12.5, 25.0, 50.0 e 100.0

$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ sono state applicate sui dischi fogliari nello stesso modo descritto sopra. Le 10 femmine di *T. urticae* (di 1-2 giorni) sono state introdotte su ciascuno dei dischi fogliari. I dischi di Petri sono stati posti in una camera di crescita (L16:D8, 25 °C) per 24 ore. Sono stati rilevati il numero di uova e la percentuale di ninfe schiuse. Le uova sono state incubate per cinque giorni a 25 °C. Ogni esperimento è stato ripetuto 5 volte.

6.4.3.6. Analisi statistica

La mortalità degli acari dopo il trattamento con i diversi composti è stata corretta secondo Abbott (1925). Tutti i dati sono stati analizzati dalla varianza dell'analisi (ANOVA) per un disegno a blocchi completo randomizzato. Le medie sono state separate utilizzando il test di confronto multiplo delle differenze significative (HSD) di Tukey ($p < 0.05$). I dati percentuali sono stati sottoposti alla trasformazione della radice quadrata dell'arcoseno prima dell'analisi. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software BioStat v5.0.

6.4.4. Risultati e discussioni

I tre metaboliti *ent*-kaurene (**1–3**) (**Fig. 1**) sono stati isolati dall'estratto di metanolo delle radici di *C. gummifer* mediante diverse colonne cromatografiche. I composti **1** e **3**, ampiamente descritti chimicamente e biologicamente in letteratura, hanno presentato dati spettroscopici in accordo con Brucoli et al. (Brucoli et al. 2012). In questo lavoro è stata riportata l'indagine spettroscopica e stereochimica completa, mai riportata in letteratura, del composto **2**, mediante analisi 1D- e 2D-NMR, analisi polarimetrica e spettrometria di massa (HPLC-MS).

Il composto **2** è stato ottenuto, dopo diverse colonne cromatografiche, come polvere giallastra di odore sgradevole. Lo spettro HPLC-MS ha mostrato un picco ionico molecolare a m/z 793.2033 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. per 793.2023), in accordo con una formula molecolare di $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_{18}\text{S}_2\text{Na}$. Lo spettro del protone e del carbonio e i dati ^1H - e ^{13}C -NMR (**Tabella 1**), hanno mostrato segnali per uno scheletro *ent*-kaurenico, un diterpene tetraciclico, caratterizzato dalla presenza di un doppio

legame in posizione C16-C17 [$\delta_C = 159.44$ (C16) e $\delta_C = 107.54$ (C17)], due funzioni carboniliche (C18 e C19), con lo stesso valore carbonico di *chemical shift* ($\delta_C = 170.90$ ppm), legati in posizione 4, un gruppo ossidrilico assiale in posizione 15 [$\delta_H = 3.59$ (H-15)] e, infine, un metile angolare (C-20), legato al carbonio C-10, a $\delta_C = 16.38$ ppm ($\delta_H = 0.94$, s, 3H, H-20). Inoltre, sono stati osservati segnali per un derivato glucosidico. Infatti, utilizzando gli accoppiamenti COSY, HSQC e HMBC, l'intera struttura del carbossiatractiloside (**2**) è stata chiaramente determinata. Il punto di correlazione presentato nello spettro HMBC, tra il protone anomero H1' ($\delta_H = 4.54$ ppm, d) e l'aglicone C-2 ($\delta_C = 73.42$ ppm), indicava chiaramente il legame esatto tra la parte zuccherina e lo scheletro terpenoico (**Fig. 2**). Infine, segnali caratteristici dell'acido isovalerico, un acido grasso saturo a catena ramificata, legati a C-2' dell'unità glicosidica (punto di correlazione, nello spettro HMBC, tra il protone H-2' e C-1''), sono risultati abbastanza distinguibili nello spettro protonico: due metili terminali, doppietti, a δ_H 0.86-0.88 ppm e l'inconfondibile nonetto per H-3 ($\delta_H = 1.95$ ppm). Per l'esatta stereochimica, la correlazione NOESY tra l'H-2 α con i protoni metilici (3H-20 α) ha confermato il legame β -glicosidico tra la porzione di zucchero e l'aglicone (**Fig. 2**).

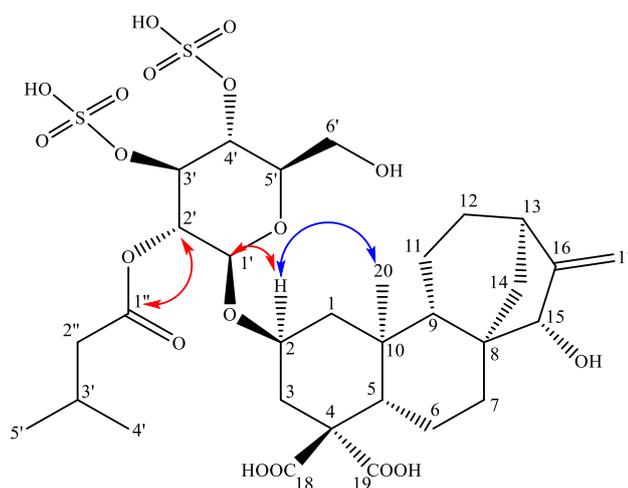


Fig. 2. Struttura chimica del composto **2** e fondamentali correlazioni NOESY (in blu) e HMBC (in rosso).

Tabella 1. Dati ^1H - e ^{13}C -NMR del composto **2**.

Carboxyatractiloside (2)		
Posizione	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
1β	47.03	0.62 (brt, $J = 11.7, 11.7$)
1α		2.14 (dd, $J = 11.7, 2.0$)
2α	73.42	4.35 (m)
3α		1.75 (ov)
3β	35.74	2.11 (d, $J = 10.0$)
4	57.24	-
5β	51.80	1.30 (ov)
6β		1.42 (ov)
6α	21.81	1.63 (ov)
7β		1.34 (ov)
7α	32.20	1.52 (ov)
8	46.81	-
9β	53.40	0.91 (ov)
10	40.50	-
11α		1.50 (ov)
11β	11.77	1.65 (ov)
12α		1.50 (ov)
12β	34.80	1.62 (ov)
13β	41.64	2.59 (m)
14α		1.58 (m)
14β	38.26	2.02 (d, $J = 11.0$)
15β	81.23	3.59 (brs)
16	159.44	-
17α		4.94 (s)
17β	107.54	5.05 (s)
18	170.90	-
19	170.90	-
20α	16.38	0.94 (s)
1'	99.03	4.54 (d, $J = 8.0$)
2'	71.99	4.31 (dd, $J = 9.3, 8.0$)
3'	77.24	4.65 (t, $J = 9.3$)
4'	73.42	4.04 (t, $J = 9.3$)
5'	75.28	3.39 (brs)
6'	61.09	3.57 (brs)
1''	170.90	-
2''	42.85	2.10 (d, $J = 6.5$)
3''	24.63	1.95 (nonet, $J = 6.5$)
4''	22.34	0.86 (d, $J = 6.5$)
5''	22.34	0.88 (d, $J = 6.5$)

^a *Chemical shifts* sono espressi in ppm da TMS, utilizzando il segnale residuo del solvente come riferimento ($\delta_{\text{H}} = 2.50$ in ^1H -NMR and $\delta_{\text{C}} = 39.51$ in ^{13}C for DMSO- d_6).

6.4.4.1. Attività acaricida contro gli acari di *T. urticae*

Considerando l'importanza agricola fondamentale delle popolazioni di acari polifagi di *T. urticae* (Wybouw et al. 2018), e la loro resistenza in rapida crescita a diversi acaricidi attualmente impiegati (Wu et al. 2019; Adesanya et al. 2021; Alsay and Ay 2022), lo sviluppo di prodotti nuovi e affidabili nello scenario di gestione

integrata dei parassiti (IPM) è un campo di ricerca in forte incremento, e infatti un numero crescente di formulazioni a base vegetale viene preso in considerazione per la gestione di *T. urticae* (Pavela et al. 2017a, 2018; Benelli et al. 2017). In questo lavoro, tutte e tre le sostanze testate (**1-3**), ovvero carboxyatractyloside, atractyligenin e atractyloside, hanno mostrato una tossicità significativa contro *T. urticae* (**Tabella 2-4**), in termini di mortalità, inibizione della deposizione delle uova, minore schiusa delle uova e inibizione complessiva della natalità. Tuttavia, sono state trovate differenze di efficacia tra le tre molecole impiegate. Confrontando la dose più bassa testata, ovvero 12.5 µg·cm⁻², la carboxyatractyloside (**2**) sembra essere la sostanza più efficace, portando a una mortalità superiore al 63% al 5° giorno dopo l'applicazione, inibendo l'ovideposizione di oltre il 70%, e inibendo l'emergere delle ninfe del 33.3%. Complessivamente, la natalità è stata ridotta dell'80.1% (**Tabella 2**). Un'efficienza simile è stata trovata per l'atractyligenina, dove il test a 12.5 µg·cm⁻² ha portato a una mortalità del 50.5% il 5° giorno dopo l'applicazione e una natalità totale del 73.2% (**Tabella 3**). La sostanza meno efficace è risultata l'atractyloside, che, quando testata a 12.5 µg·cm⁻² ha raggiunto solo il 34.6% di mortalità e una riduzione della natalità del 45.2% (**Tabella 4**).

Tabella 2. Tossicità della carboxyatractyloside sugli acari di *Tetranychus urticae*.

Dose (µg·cm ⁻²)	Mortalità adulta		Ovideposizione		Natalità		
	2° giorno	5° giorno	Uova/Femmine/ Giorno	Inibizione deposizione delle uova (% ± SD)	Nascita (% ± SD)	Inibizione della nascita (% ± SD)	Potenziale inibizione della natalità (% ± SD)
100	30.0±14.1c	83.3±4.7d	0.5±0.2a	89.1±5.8	61.5±3.8a	32.5±5.8	92.6±10.2
50	40.0±8.2c	70.0±8.2cd	1.1±0.6b	76.6±7.2	58.8±1.3a	35.4±10.3	84.9±6.5
25	26.7±9.4b	66.7±12.5bc	0.8±0.2ab	83.7±9.1	62.4±8.8a	31.5±6.9	88.8±5.5
12.5	13.3±9.4ab	63.3±9.4b	1.4±0.6b	70.1±8.5	60.7±11.9a	33.3±5.8	80.1±7.2
Controllo	0.0±0.0a	6.7±4.7a	4.6±0.3c		91.1±2.4b		
ANOVA F _{4,15} ; p-value	23.97; 0.000	89.23; 0.000	290.02; 0.000	NS	31.83; 0.000	NS	NS

All'interno di una colonna, i valori (±SD) seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo ($p>0.05$). La percentuale indica la rispettiva variazione inibitoria media rispetto al controllo.

Tabella 3. Tossicità della atractyligenina sugli acari di *Tetranychus urticae*.

Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Mortalità adulta		Ovideposizione		Natalità		
	2° giorno	5° giorno	Uova/Femmine/ Giorno	Inibizione deposizione delle uova (% \pm SD)	Nascita (% \pm SD)	Inibizione della nascita (% \pm SD)	Potenziale inibizione della natalità (% \pm SD)
100	16.7 \pm 17.0b	75.0 \pm 13.4d	1.2 \pm 0.2ab	73.3 \pm 6.9a	72.4 \pm 6.4c	20.5 \pm 3.5a	78.8 \pm 5.9a
50	43.3 \pm 12.5c	67.9 \pm 8.7cd	0.9 \pm 0.3a	80.4 \pm 3.4a	49.3 \pm 5.2a	45.8 \pm 5.3c	89.4 \pm 7.2b
25	40.0 \pm 28.3c	57.1 \pm 2.8bc	1.8 \pm 0.3b	60.3 \pm 6.2b	61.1 \pm 4.7bc	32.9 \pm 5.9b	73.3 \pm 6.1a
12.5	36.7 \pm 17.0c	50.5 \pm 10.2b	1.9 \pm 0.5b	57.6 \pm 8.7b	57.4 \pm 8.9ab	36.7 \pm 4.5b	73.2 \pm 5.5a
Controllo	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	4.6 \pm 0.3c	-	91.1 \pm 2.4d	-	-
ANOVA $F_{4,15}$; p -value	48.67; <0.001	82.45; <0.001	272.45; <0.001	(df 3,12) 23.34; <0.001	42.51; <0.001	(df 3,12) 24.23; <0.001	(df 3,12) 15.27; <0.001

All'interno di una colonna, i valori (\pm SD) seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo ($p>0.05$). La percentuale indica la rispettiva variazione inibitoria media rispetto al controllo.

Tabella 4. Tossicità della atractyloside sugli acari di *Tetranychus urticae*.

Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Mortalità adulta		Ovideposizione		Natalità		
	2° giorno	5° giorno	Uova/Femmine/ Giorno	Inibizione deposizione delle uova (% \pm SD)	Nascita (% \pm SD)	Inibizione della nascita (% \pm SD)	Potenziale inibizione della natalità (% \pm SD)
100	20.0 \pm 11.6c	53.8 \pm 16.3c	2.1 \pm 0.3ab	54.8 \pm 8.9bc	50.1 \pm 7.4ab	45.0 \pm 5.5c	75.1 \pm 5.5c
50	23.3 \pm 17.0bcd	50.0 \pm 23.7bc	1.9 \pm 0.5a	59.2 \pm 4.8c	46.6 \pm 5.5a	48.8 \pm 4.8c	79.1 \pm 5.1c
25	13.3 \pm 4.7b	38.5 \pm 5.4b	2.7 \pm 0.4b	41.8 \pm 5.4b	69.1 \pm 8.2bc	24.1 \pm 3.9b	55.8 \pm 7.2b
12.5	30.0 \pm 7.2d	34.6 \pm 14.4b	3.1 \pm 0.4b	34.2 \pm 3.9a	75.8 \pm 5.2c	16.7 \pm 5.1a	45.2 \pm 8.5a
Controllo	0.0 \pm 0.0a	6.7 \pm 4.7a	4.6 \pm 0.3c	-	91.1 \pm 2.4d	-	-
ANOVA $F_{4,15}$ p -value	14.61; <0.001	75.67; <0.001	198.78; <0.001	($F_{3,12}$) 28.71; <0.001	28.25; <0.001	($F_{3,12}$) 27.15; <0.001	($F_{3,12}$) 70,16; <0.001

All'interno di una colonna, i valori (\pm SD) seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo ($p>0.05$). La percentuale indica la rispettiva variazione inibitoria media rispetto al controllo.

Come accennato in precedenza, *T. urticae* è considerato uno dei parassiti più pericolosi, in grado di distruggere le piante per aspirazione, ed è noto anche per la resistenza verso diversi acaricidi. È quindi molto importante concentrarsi su nuove sostanze acaricide con un diverso meccanismo d'azione, che potrebbero diventare un'alternativa adeguata alle sostanze esistenti. Nel presente lavoro, abbiamo testato

diterpenoidi naturali *ent*-kaurenici isolati da *C. gummifer* contro *T. urticae*. Delle sostanze che abbiamo sottoposto nei diversi test acaricidi, le sostanze carbossiatractoryloside e atractyligenin hanno mostrato un'efficienza acaricida molto promettente, quando alla dose più bassa che abbiamo testato, $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, è stata rilevata più del 50% della mortalità degli adulti il 5° giorno dopo applicazione, e per la carbossiatractoryloside, allo stesso tempo, è stata rilevata un'inibizione della natalità superiore all'80%. La dose da noi utilizzata di $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ corrisponde approssimativamente a una concentrazione di applicazione dello 0.125%. Se consideriamo che circa lo 0.2% può essere considerato una concentrazione letale, le sostanze testate carbossiatractoryloside e atractyligenin sono più efficaci di alcuni oli essenziali. Ad esempio, Abd El-Moneim et al. (Abd El-Moneim et al. 2012) hanno testato oli essenziali da *Chamomilla recutita*, *Marjorana hortensis* ed *Eucalyptus* sp. contro *T. urticae*, e le LC_{50} sono risultate rispettivamente pari a 0.65, 1.84 e 2.18% e per le uova rispettivamente a 1.17, 6.26 e 7.33%. Inoltre, ad esempio, è inferiore a quello riscontrato per un estratto delle radici di *Saponaria officinalis*, per il quale è stata stimata una LC_{50} dell'1.18%, sulla base della quale sono stati sviluppati nuovi acaricidi botanici (Pavela 2017b).

D'altra parte, l'efficacia riportata nel nostro studio è stata peggiore dell'estratto di radice di *Onosma visianii*, per il quale la LD_{50} è stata stimata in $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ per il 5° giorno dopo l'applicazione (Sut et al. 2017) o dell'estratto di *Drimia pancracion*, per cui la LD_{50} è stata stimata in $8.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Badalamenti et al. 2022).

6.4.5. Conclusioni

In questo studio fitochimico effettuato su metaboliti isolati da *C. gummifer*, per mezzo degli spettri 1D- e 2D-NMR, NOESY e HPLC-MS, l'intera struttura stereochimica della carboxyatractoryloside (**2**) è stata caratterizzata. Questo diterpene, insieme agli altri due (**1** – **3**), è stato testato per la sua potenziale attività acaricida. Nel complesso, i composti **1-3**, con particolare riferimento alla carbossiatractoryloside, rappresentano validi candidati per lo sviluppo di nuovi acaricidi per la protezione delle colture. Tuttavia, sono ancora necessari ulteriori sforzi di ricerca per includerli in formulazioni altamente stabili, come le

nanoemulsioni, per uso sul campo e semi-campo. Sono in corso ulteriori ricerche sui possibili effetti non bersaglio di questi composti sugli impollinatori e sugli agenti di bio-controllo degli acari.

6.4.6. Bibliografia

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267.

Abd El-Moneim MRA, Fatma SA, Turkey AF (2012) Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and *Eucalyptus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2:0-30.

Adesanya AW, Lavine MD, Moural TW, Lavine LC, Zhu F, Walsh DB (2021) Mechanisms and management of acaricide resistance for *Tetranychus urticae* in agroecosystems. *J Pest Sci* 94:639-663.

Ahid S, Ait el cadi M, Meddah B, Cherah Y (2012) *Atractylis gummifera*: de l'intoxication aux méthodes analytiques. *Ann Biol Clin* 70:263-268.

Alsay S, Ay R (2022) Development of resistance to a mixture of spiromesifen and abamectin and cross resistance in *Tetranychus urticae*. *System Appl Acar* 27:1857-1866.

Attia S, Grissa KL, Lognay G, Bitume E, Hance T, Mailleux AC (2013) A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides. *J Pest Sci* 86:361-386.

Badalamenti N, Ilardi V, Bruno M, Pavela R, Boukouvala MC, Kavallieratos NG, Maggi F, Canale A, Benelli G (2021a) chemical composition and broad-spectrum insecticidal activity of the flower essential oil from an ancient sicilian food plant, *Ridolfia segetum*. *Agriculture* 11:304.

Badalamenti N, Rosselli S, Zito P, Bruno M (2021b) Phytochemical profile and insecticidal activity of *Drimia pancration* (Asparagaceae) against adults of *Stegobium paniceum* (Anobiidae). *Nat Prod Res* 35:4468–4478.

Badalamenti N, Bruno M, Pavela R, Maggi F, Marinelli O, Zeppa L, Benelli G, Canale A (2022) Acaricidal activity of bufadienolides isolated from *Drimys panchratium* against *Tetranychus urticae*, and structural elucidation of Arenobufagin-3-O- α -L-rhamnopyranoside. *Plants* 11:1629.

Basile S, Badalamenti N, Riccobono O, Guarino S, Ilardi V, Bruno M, Peri E (2022) Chemical composition and evaluation of insecticidal activity of *Calendula incana* subsp. *maritima* and *Laserpitium siler* subsp. *siculum* essential oils against stored products pests. *Molecules* 27:588.

Benelli G, Pavela R, Canale A, Nicoletti M, Petrelli R, Cappellacci L, Maggi F (2017) Isofuranodiene and germacrone from *Smyrniololus olusatrum* essential oil as acaricides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae*: impact of chemical stabilization of isofuranodiene by interaction with silver triflate. *J Pest Sci* 90:693-699.

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Faouzi MEA (2019a) Inventory of poisonings and toxicological studies carried out on *Atractylis gummifera* L.: a review. *Plant Sci Today* 6:457-464.

Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Boulfia M, Senhaji S, Faouzi MEA (2019b) *In vivo* anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts of *Atractylis gummifera*. *Bangladesh J Pharmacol* 1467-73.

Brucoli F, Borrello MT, Stapleton P, Parkinson GN, Gibbons S (2012) Structural characterization and antimicrobial evaluation of atractyloside, atractyligenin, and 15-didehydroattractyligenin methyl ester. *J Nat Prod* 75:1070–1075.

Buscemi S, Rosselli S, Bruno M, Vivona N, Piozzi F (2001) Photoinduced functionalization of C-20 methyl group in nor-diterpene atractyligenin. *Tetrahedron Lett* 42:8289-8291.

Buscemi S, Rosselli S, Bruno M, Vivona N, Piozzi F (2003) Photoinduced functionalization of diterpenes. Transformation of the C-20 methyl of atractyligenin into a methylene-carbomethoxy or methylene-carboxamide group. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 155:145-149.

Cho J, Zhang Y, Park SY, Joseph AM, Han C, Park HJ, Kalavalapalli S, Chun SK, Morgan D, Kim JS, Someya S, Mathews CE, Lee, Young J, Wohlgemuth SE, Sunny NE, Lee HY, Choi CS, Shiratsuchi T, Oh OP, Terada N (2017) Mitochondrial ATP transporter depletion protects mice against liver steatosis and insulin resistance. *Nat Comm* 8:14477.

Cotugno R, Gallotta D, Dal Piaz F, Apicella I, De Falco S, Rosselli S, Bruno M, Belisario MA (2014) Powerful tumor cell growth-inhibiting activity of a synthetic derivative of atractyligenin: Involvement of PI3K/Akt pathway and thioredoxin system. *Biochim Biophys Acta* 1840:1135-1144.

Gao C, Tello E, Peterson DG (2021) Identification of coffee compounds that suppress bitterness of brew. *Food Chem* 350:129225.

Gerwick BC, Sparks TC (2014) Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Manag Sci* 70:1169-1185.

<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000129147>. Accessed on: 12 Jul 2022'

Hammich V, Merad R, Azzouz M (2013) *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Springer-Verlag France, Paris, p. 63.

Haris A, Azeem M, Binyameen M (2022) Mosquito repellent potential of *Carpesium abrotanoides* essential oil and its main components against a dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 59:801-809.

Hu G, Peng X, Dong D, Nian Y, Gao Y, Wang X, Hong D, Qiu M (2021) New *ent*-kaurane diterpenes from the roasted arabica coffee beans and molecular docking to α -glucosidase. *Food Chem* 345:128823.

Kavallieratos NG, Nika EP, Skourti A, Boukouvala MC, Ntalaka CT, Maggi F, Spinozzi E, Petrelli R, Perinelli DR, Benelli G, Canale A, Bonacucina G (2022) *Carlina acaulis* essential oil nanoemulsion as a new grain protectant against different developmental stages of three stored-product beetles. *Pest Management Science* 78:2434 – 2442.

Kharchoufa L, Merrouni IA, Yamani A, Elachouri M (2018) Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: toxicity concerns. *Toxicon* 154:90-113.

Lefranc E (1868) Sur l'acide atractylique et les atractylates, produits immédiats de la racine de l'*Atractylis gummifera*. *Comptes Rendus* 69:954-961.

Machado M, Queiroz CRR, Wilson TM, Sousa DER, Castro MB, Saravia A, Lee AG, Armien SS, Barros F (2021) Endemic *Xanthium strumarium* poisoning in cattle in flooded areas of the Araguari River, Minas Gerais, Brazil. *Toxicon* 200:23–29.

Monsalve LN, Rosselli S, Bruno M, Baldessari A (2005) Enzyme-catalyzed transformations of *ent*-kaurane diterpenoids. *Eur J Org Chem* 10:2106-2115.

Mssillou I, Agour A, Allali A, Saghrouchni H, Bourhia M, El Moussaoui A, Salamatullah AM, Alzahrani A, Aboul-Soud MAM, Giesy JP, Lyoussi B, Derwich E (2022) Antioxidant, antimicrobial, and insecticidal properties of a chemically characterized essential oil from the leaves of *Dittrichia viscosa* L. *Molecules* 27:2282.

Pavela R (2015) Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch. *Ind Crops Prod* 67:108–113.

Pavela R, Murugan K, Canale A, Benelli G (2017a) *Saponaria officinalis*-synthesized silver nanocrystals as effective biopesticides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae* Koch. *Ind Crops Prod* 97:338-344.

Pavela (2017b). Extract from the roots of *Saponaria officinalis* as a potential acaricide against *Tetranychus urticae*. *J Pest Sci* 90:683–692.

Pavela R, Dall'Acqua S, Sut S, Baldan V, Kamte SLN, Nya PCB, Benelli G (2018) Oviposition inhibitory activity of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) polar extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *Physiol Mol Plant Path* 101:85-92.

Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA (2013) Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE* 8.

- Rosselli S, Bruno M, Maggio A, Bellone G, Chen TH, Bastow KF, Lee KH (2007) Cytotoxic activity of some natural and synthetic *ent*-kauranes. *J Nat Prod* 70:347-352.
- Sut S, Pavela R, Kolarčik V, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F, Dall'Acqua S, Benelli G (2017) Identification of *Onosma visianii* roots extract and purified shikonin derivatives as potential acaricidal agents against *Tetranychus urticae*. *Molecules* 22:1002.
- Todisco S, Di Noia MA, Onofrio A, Parisi G, Punzi G, Redavid G, De Grassi A, Pierri CL (2015). Identification of new highly selective inhibitors of the human ADP/ATP carriers by molecular docking and in vitro transport assays. *Biochem Pharmacol* 100:112-132.
- Vallejo JR, Peral D, Gemio P, Carrasco M, Heinrich C (2009) *Atractylis gummifera* and *Centaurea ornata* in the Province of Badajoz (Extremadura, Spain)-Ethnopharmacological importance and toxicological risk. *J Ethnopharmacol* 126:366-370.
- Vasaturo M, Fiengo L, De Tommasi N, Sabatino L, Ziccardi P, Colantuoni V, Bruno M, Cerchia C, Novellino E, Lupo A, Lavecchia A, Dal Piaz F (2017) A compound-based proteomic approach discloses 15-ketoatractyligenin methyl ester as a new PPAR γ partial agonist with anti-proliferative ability. *Sci Rep* 7:41273.
- Vignais PM, Vignais PV, Defaye G (1978) In *Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*; Piccin Medical Books: Padova, Italy, pp 39– 68.
- Wybouw N, Van Leeuwen T, Dermauw W (2018). A massive incorporation of microbial genes into the genome of *Tetranychus urticae*, a polyphagous arthropod herbivore. *Insect Mol Biol* 27:333-351.
- Wu M, Adesanya AW, Morales MA, Walsh DB, Lavine LC, Lavine MD, Zhu F (2019) Multiple acaricide resistance and underlying mechanisms in *Tetranychus urticae* on hops. *J Pest Science* 92:543-555.
- Xiao Y, Lv L, Gou P, Xie H (2019) Acyl atractyligenin and carboxyatractyligenin glycosides from *Antennaria rosea* subsp. *confinis*. *Phytochemistry* 157:151-157.

Conclusioni generali e prospettive future

Questa tesi di dottorato intende essere uno studio multidisciplinare incentrato sulla sintesi di agenti tumorali da fonti vegetali e sull'isolamento di insetticidi naturali o ispirati alla natura. Sono state sviluppate strategie sintetiche efficienti per la preparazione di nuovi agenti antitumorali contro differenti linee cellulari a partire da farmacofori naturali tossici quali l'atractyligenina; sono stati condotti, inoltre, molteplici studi sulla morte cellulare e sul meccanismo d'azione. Allo stesso tempo, con l'obiettivo di migliorare l'utilizzo di prodotti vegetali inutilizzati in ambiente fitosanitario, abbiamo testato estratti, metaboliti secondari e oli essenziali contro differenti insetti patogeni.

Nella prima parte, abbiamo concentrato i nostri sforzi nel progettare una nuova serie di derivati dell'atractyligenina. Dalla valutazione dell'attività antiproliferativa di tutti i nuovi composti ottenuti da reazioni successive di bromurazione, riduzione, eliminazione e di riarrangiamento, è emerso che i nuovi composti hanno mostrato un'attività sorprendente, *in vitro*, contro due linee cellulari tumorali (A375, una linea cellulare di melanoma maligno umano, e CaCo2, una linea cellulare di cancro epiteliale del colon umano) e una linea cellulare normale (HaCaT, cheratinociti umani), ottenendo valori di IC₅₀ anche migliori dello stesso cisplatino. Al fine di valutare l'importanza biologica delle funzionalità chetoniche all'interno della struttura diterpenica, è stata messa a punto una via sintetica che ha portato all'ottenimento di differenti strutture ammidiche e dei corrispettivi ossidati. Indagando gli effetti antitumorali su una linea cellulare di carcinoma del colon (HCT116), si è dimostrato che i soli composti diossidati determinano maggiori effetti citotossici, già alla dose 10 μ M, sulle cellule tumorali di colon in maniera dose-dipendente, rispetto agli starter di partenza ammidati. I dati ottenuti, oltre a supportare la valenza biologica delle funzionalità chetoniche introdotte, hanno evidenziato che alla base dell'effetto antiproliferativo mostrato vi è una riduzione della vitalità cellulare che si accompagna a morte per apoptosi. Ulteriori studi verranno messi in atto per chiarire l'esatta correlazione struttura-attività.

Passando alla filiera alimentare, ci siamo concentrati sugli agenti acaricidi e anti-insetticidi. In questo caso, abbiamo identificato alcuni metaboliti secondari estratti da *C. gummifer* e *D. pancraticum*. I diterpeni *ent*-kaurenici (carboxyatractyloside, atractyloside e atractyligenina) sono risultati tossici per *T. urticae*, portando a mortalità significativa, inibizione della deposizione delle uova, ridotta schiusa delle uova e inibizione della natalità. Analizzando i dati, alla dose più bassa, $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, la carboxyatractyloside era la più efficace, portando a mortalità $> 60\%$ dopo 5 giorni di esposizione, inibendo la deposizione delle uova $> 70\%$ e riducendo la natalità dell'80%. I bufadienolidi estratti da *D. pancraticum* sono stati testati per le loro proprietà acaricide contro l'acaro polifago *Tetranychus urticae*, noto come ragnetto rosso, e contro lo scarabeo *S. paniceum*, noto come tarlo dei biscotti. I nostri risultati hanno mostrato un'eccellente attività del composto (5 α)-4,5-diidro-16 β -idrossiscillirosidin-3-*O*- α -L-tevetopiranoside, con un LD₅₀ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di 0.29 e un LD₉₀ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di 0.96, mentre gli altri composti hanno mostrato un'attività moderata. Da notare, dopo 96 h di esposizione, l'attività acaricida del composto in questione era superiore a quella del controllo positivo, esistiazox. Nel complesso, inoltre, l'estratto butanico di *D. pancraticum* è risultato significativamente tossico nel test per ingestione contro *Stegobium paniceum*.

In conclusione, gli estratti grezzi e alcuni metaboliti secondari possono essere considerati fonte verde di nuovi acaricidi e insetticidi efficaci contro gli acari di importanza agricola in attesa di un'adeguata convalida sul campo e della valutazione degli effetti non bersaglio su altre specie di invertebrati.

Produzione scientifica

Articoli pubblicati:

1. **Badalamenti N**, Vaglica A, Maggio A, Bruno M, Quassinti L, Bramucci M, Maggi F. Cytotoxic activity of several ent-kaurane derivatives of atractyligenin. Synthesis of unreported diterpenic skeleton by chemical rearrangement. *Phytochemistry*. 2022. 204, 113435. Doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113435.
2. 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, Basile A, 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. *Phytochemistry*. 2022. 203, 113373. Doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113373.
3. Pirrone A, Prestianni R, Naselli V, Todaro A, Farina V, Tinebra I, Raffaele G, **Badalamenti N**, Maggio A, Gaglio R, Settanni L, Bruno M, Moschetti G, Alfonzo A, Francesca N. Influence of indigenous *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* from sugar-rich substrates on the aromatic composition of loquat beer. *Int J Food Microbiol*. 2022. 379, 109868. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109868.
4. Prestianni R, Matraxia M, Naselli V, Pirrone A, **Badalamenti N**, Ingrassia M, Gaglio R, Settanni L, Columba P, Maggio A, Bruno M, Francesca N, Moschetti G, Alfonzo A. Use of sequentially inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* strains isolated from honey by-products to improve and stabilize the quality of mead produced in Sicily. *Food Microbiol*. 2022. 107:104064. Doi: 10.1016/j.fm.2022.104064.
5. **Badalamenti N**, Bruno M, Pavela R, Maggi F, Marinelli O, Zeppa L, Benelli G, Canale A. Acaricidal Activity of Bufadienolides Isolated from *Drimys panchration* against *Tetranychus urticae*, and Structural Elucidation of Arenobufagin-3-O- α -L-rhamnopyranoside. *Plants*. 2022. 11 (13):1629. Doi: 10.3390/plants11131629.
6. 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(1):243. Doi: 10.3892/mmr.2022.12759.
7. Fontana G, **Badalamenti N**, Bruno M, Castiglione D, Notarbartolo M, Poma P, Spinella A, Tutone M, Labbozzetta M. Synthesis, In Vitro and In Silico Analysis of New Oleanolic Acid and Lupeol Derivatives against Leukemia Cell

- Lines: Involvement of the NF- κ B Pathway. *Int J Mol Sci*. 2022. 23 (12):6594. Doi:10.3390/ijms23126594.
8. **Badalamenti N**, Modica A, Bazan G, Marino P, Bruno M. The ethnobotany, phytochemistry, and biological properties of *Nigella damascena* - A review. *Phytochemistry*. 2022. 198:113165. Doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113165.
 9. Francesca N, Gaglio R, Matraxia M, Naselli V, Prestianni R, Settanni L, **Badalamenti N**, Columba P, Bruno M, Maggio A, Alfonzo A, Moschetti G. Technological screening and application of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermented honey by-products for the sensory improvement of Spiritu re fascitrari, a typical Sicilian distilled beverage. *Food Microbiol*. 2022. 104:103968. Doi: 10.1016/j.fm.2021.103968.
 10. **Badalamenti N**, Bruno M, Schicchi R, Geraci A, Leporini M, Tundis R, Loizzo MR. Reuse of Food Waste: The Chemical Composition and Health Properties of Pomelo (*Citrus maxima*) Cultivar Essential Oils. *Molecules*. 2022. 27 (10):3273. Doi: 10.3390/molecules27103273.
 11. **Badalamenti N**, Bruno M, Formisano C, Rigano D. Effect of Germacrene-Rich Essential Oil of *Parentucellia latifolia* (L.) Caruel Collected in Central Sicily on the Growth of Microorganisms Inhabiting Historical Textiles. *Nat Prod Commun*. 2022. 17 (4). Doi: 10.1177/1934578X221096963.
 12. **Badalamenti N**, Bruno M, Schicchi R, Geraci A, Leporini M, Gervasi L, Tundis R, Loizzo MR. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Essential Oils, and Their Combinations, Obtained from Flavedo By-Product of Seven Cultivars of Sicilian *Citrus aurantium* L. *Molecules*. 2022. 27(5):1580. Doi: 10.3390/molecules27051580.
 13. **Badalamenti N**, Sottile F, Bruno M. Ethnobotany, Phytochemistry, Biological, and Nutritional Properties of Genus *Crepis*-A Review. *Plants*. 2022. 11 (4):519. Doi: 10.3390/plants11040519.
 14. Basile S, **Badalamenti N**, Riccobono O, Guarino S, Ilardi V, Bruno M, Peri E. Chemical Composition and Evaluation of Insecticidal Activity of *Calendula incana* subsp. *maritima* and *Laserpitium siler* subsp. *siculum* Essential Oils against Stored Products Pests. *Molecules*. 2022. 27 (3):588. Doi: 10.3390/molecules27030588.
 15. Cicio A, **Badalamenti N**, Bruno M. The ethnobotany, phytochemistry, and biological properties of genus *Phagnalon* (Asteraceae): a review. *Nat Prod Res*. 2022. 17:1-15. Doi: 10.1080/14786419.2022.2112039.
 16. **Badalamenti N**, Bruno M, Loizzo MR, Puccio V, Gaglio R, Francesca N, Settanni L, Sottile F. Antibacterial activity and chemical characterization of

- almond (*Prunus dulcis* L.) peel extract. *Nat Prod Res.* 2022. 24:1-7. Doi: 10.1080/14786419.2022.2103556.
17. Bancheva S, **Badalamenti N**, Fontana G, Catinella G, Porrello A, Bruno M. Chemical composition of the essential oil of *Cyanus adscendens* (Bartl.) Soják and *C. orbelicus* (Velen.) Soják growing wild in Bulgaria, and PCA analysis of genus *Cyanus* Mill. *Nat Prod Res.* 2022. 4:1-7. Doi: 10.1080/14786419.2022.2095381.
 18. **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.* 2022. 13:1-7. Doi: 10.1080/14786419.2022.2074995.
 19. **Badalamenti N**, Vaglica A, Ilardi V, Bruno M. The chemical composition of essential oil from *Seseli tortuosum* subsp. *tortuosum* and *S. tortuosum* subsp. *maritimum* (Apiaceae) aerial parts growing in Sicily (Italy). *Nat Prod Res.* 2022. 24:1-6. Doi: 10.1080/14786419.2022.2078819.
 20. **Badalamenti N**, Vaglica A, Ilardi V, Bruno M. The chemical composition of essential oil from *Seseli bocconei* (Apiaceae) aerial parts growing in Sicily (Italy). *Nat Prod Res.* 2022. 31:1-5. Doi: 10.1080/14786419.2022.2057973.
 21. Geraci A, Schicchi R, Sgadari F, **Badalamenti N**, Bruno M. The essential oil compositions of three Sicilian accessions of *Viscum album* L. growing on three different host trees. *Nat Prod Res.* 2022. 31:1-5. Doi: 10.1080/14786419.2022.2058940.
 22. **Badalamenti N**, Modica A, Ilardi V, Bruno M. The chemical composition of the aerial parts essential oil of *S. spreitzenhoferi* Heldr. (Lamiaceae) growing in Kythira Island (Greece). *Nat Prod Res.* 2022. 17:1-5. Doi: 10.1080/14786419.2022.2041008.
 23. Garofalo G, Busetta G, Maniaci G, Sardina MT, Portolano B, **Badalamenti N**, Maggio A, Bruno M, Gaglio R, Settanni L. Development of "Quadrello di Ovino", a Novel Fresh Ewe's Cheese. *Foods.* 2022. 11 (1):25. Doi: 10.3390/foods11010025.
 24. **Badalamenti N**, Modica A, Ilardi V, Bruno M. The chemical composition of the essential oil of *Ptilostemon gnaphaloides* subsp. *pseudofruticosus* (Asteraceae) growing in Kythira Island, Greece. *Nat Prod Res.* 2022. 36 (18):4746-4750. Doi: 10.1080/14786419.2021.2005055.
 25. Modica A, **Badalamenti N**, Ilardi V, Maggi F, Bruno M. The chemical composition of the aerial parts essential oil of *Acinos alpinus* subsp. *Nebrodenensis* (Lamiaceae) growing in Sicily (Italy). *Nat Prod Res.* 2022. 36 (16): 4249-4253. Doi: 10.1080/14786419.2021.1973465.

26. D'Agostino G, **Badalamenti N**, Franco P, Bruno M, Gallo G. The chemical composition of the flowers essential oil of *Inula crithmoides* (Asteraceae) growing in aeolian islands, Sicily (Italy) and its biocide properties on microorganisms affecting historical art crafts. *Nat Prod Res.* 2022. 36 (12):2993-3001. Doi: 10.1080/14786419.2021.1938040.
27. Ilardi V, **Badalamenti N**, Bruno M. Chemical composition of the essential oil from different vegetative parts of *Foeniculum vulgare* subsp *piperitum* (Ucria) Coutinho (Umbelliferae) growing wild in Sicily. *Nat Prod Res.* 2022. 36 (14):3587-3597. Doi: 10.1080/14786419.2020.1870227.
28. **Badalamenti N**, Bruno M, Gagliano Candela R, Maggi F. Chemical composition of the essential oil of *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol subsp. *meoides* (Desf.) Fiori (Umbelliferae) collected wild in Central Sicily and its antimicrobial activity. *Nat Prod Res.* 2022. 36 (3):789-797. Doi: 10.1080/14786419.2020.1805607.
29. Alfonzo A, Prestianni R, Gaglio R, Matraxia M, Maggio A, Naselli V, Craparo V, **Badalamenti N**, Bruno M, Vagnoli P, Settanni L, Moschetti G, Francesca N. Effects of different yeast strains, nutrients and glutathione-rich inactivated yeast addition on the aroma characteristics of Catarratto wines. *Int J Food Microbiol.* 2021. 360:109325. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109325.
30. **Badalamenti N**, Russi S, Bruno M, Maresca V, Vaglica A, Ilardi V, Zanfardino A, Di Napoli M, Varcamonti M, Cianciullo P, Calice G, Laurino S, Falco G, Basile A. Dihydrophenanthrenes from a Sicilian Accession of *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge Showed Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities. *Plants.* 2021. 10 (12):2776. Doi: 10.3390/plants10122776.
31. **Badalamenti N**, Modica A, Ilardi V, Bruno M. Chemical Constituents and Biological Properties of Genus *Doronicum* (Asteraceae). *Chem Biodivers.* 2021. 18 (12):e2100631. Doi: 10.1002/cbdv.202100631.
32. Candela RG, Lazzara G, Piacente S, Bruno M, Cavallaro G, **Badalamenti N**. Conversion of Organic Dyes into Pigments: Extraction of Flavonoids from Blackberries (*Rubus ulmifolius*) and Stabilization. *Molecules.* 2021. 26 (20):6278. Doi: 10.3390/molecules26206278.
33. 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 (8):1508. Doi: 10.3390/plants10081508.

34. **Badalamenti N**, Ilardi V, Rosselli S, Bruno M. The ethnobotany, phytochemistry and biological properties of genus *Ferulago* - A review. *J Ethnopharmacol.* 2021. 274:114050. Doi: 10.1016/j.jep.2021.114050.
35. **Badalamenti N**, Ilardi V, Bruno M, Pavela R, Boukouvala MC, Kavallieratos NG, Maggi F, Canale A, Benelli G. Chemical composition and broad-spectrum insecticidal activity of the flower essential oil from an ancient sicilian food plant, *ridolfia segetum*. *Agriculture.* 2021. 11 (4):304. Doi: 10.3390/agriculture11040304.
36. Catinella G, **Badalamenti N**, Ilardi V, Rosselli S, De Martino L, Bruno M. The Essential Oil Compositions of Three *Teucrium* Taxa Growing Wild in Sicily: HCA and PCA Analyses. *Molecules.* 2021. 26 (3):643. Doi: 10.3390/molecules26030643.
37. **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.* 2021. 19:1-6. Doi: 10.1080/14786419.2021.2018588.
38. Bancheva S, **Badalamenti N**, Bruno M. The essential oil composition of the endemic plant species *Centaurea vandasii* and chemotaxonomy of section *Phalolepis* (Asteraceae). *Nat Prod Res.* 2021. 21:1-8. Doi: 10.1080/14786419.2021.1992627.
39. Bancheva S, **Badalamenti N**, Bruno M. The essential oil composition of *Centaurea immanuelis-loewii* Degen growing wild in Bulgaria and chemotaxonomy of section *Acrocentron*. *Nat Prod Res.* 2021. 25:1-8. Doi: 10.1080/14786419.2021.1931190.
40. **Badalamenti N**, Rosselli S, Zito P, Bruno M. Phytochemical profile and insecticidal activity of *Drimia pancration* (Asparagaceae) against adults of *Stegobium paniceum* (Anobiidae). *Nat Prod Res.* 2021. 35 (22):4468-4478. Doi: 10.1080/14786419.2020.1729154.
41. Gagliano Candela R, Ilardi V, **Badalamenti N**, Bruno M, Rosselli S, Maggi F. Essential oil compositions of *Teucrium fruticans*, *T. scordium* subsp. *scordioides* and *T. siculum* growing in Sicily and Malta. *Nat Prod Res.* 2021. 35 (20):3460-3469. Doi: 10.1080/14786419.2019.1709193
42. Napoli MD, Maresca V, Varcamonti M, Bruno M, **Badalamenti N**, Basile A, Zanfardino A. (+)-(E)-Chrysanthenyl acetate: A molecule with interesting biological properties contained in the *Anthemis secundiramea* (asteraceae) flowers. *Applied Sciences.* 2020. 10 (19): 6808. Doi: 10.3390/app10196808.

43. **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 from Sicily (Italy): Isolation of Essential Oil and Evaluation of Its Bioactivity. *Molecules*. 2020. 25 (14):3249. Doi: 10.3390/molecules25143249.
44. Sut S, Maggi F, Bruno S, **Badalamenti N**, Quassinti L, Bramucci M, Beghelli D, Lupidi G, Dall'Acqua S. Hairy Garlic (*Allium subhirsutum*) from Sicily (Italy): LC-DAD-MSⁿ Analysis of Secondary Metabolites and In Vitro Biological Properties. *Molecules*. 2020. 25 (12):2837. Doi: 10.3390/molecules25122837.
45. Rosselli S, Tundis R, Bruno M, Leporini M, Falco T, Gagliano Candela R, **Badalamenti N**, Loizzo MR. *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Seeds Oil: Fatty Acids Profiling by GC-MS and NMR and Bioactivity. *Molecules*. 2020. 25(5):1037. Doi: 10.3390/molecules25051037.
46. Rigano D, Formisano C, Rosselli S, **Badalamenti N**, Bruno M. GC and GC—MS analysis of volatile compounds from *ballota nigra* subsp. *Uncinata* collected in Aeolian islands, Sicily (Southern Italy). *Nat Prod Commun*. 2020. 15 (4), 1-7. Doi: 10.1177/1934578X20920483

Manoscritti in fase di sottomissione:

1. **Badalamenti N**, Bruno M, Pavela R, Maggi F, Benelli G. Structural characterization of carboxyatractyloside and acaricidal activity of natural *ent*-kaurene diterpenoids isolated from *Chamaeleon gummifer* against *Tetranychus urticae*. *Crop Protection*.
2. **Badalamenti N**, Maggio A, Fontana G, Bruno M, D'Anneo A. Antitumor effects of amide derivatives and related dioxidates of *ent*-kaurene atractyligenina. *Journal of Medicinal Chemistry*.

Comunicazioni orali a Congressi Internazionali:

Advanced Materials
 WebCongress, 16 January 2021,
 Oral Presentation
 “Essential Oils in Conservation of Cultural Heritage”
Natale Badalamenti^{1*}, Maurizio Bruno^{1,2}

Websymposium on Environmental and Green Materials, Advanced Materials
WebCongress, 19-20 January 2021,

Oral Presentation

“Essential Oils in Conservation of Cultural Heritage”.

Natale Badalamenti^{1,*}, Rossella Gagliano Candela¹ and Maurizio Bruno^{1,2}

3rd WEBINAR ON AGRICULTURE & FOOD RESEARCH, 29-30 April 2021,

Oral Presentation

“Plant extracts such as insecticides”

Natale Badalamenti^{1,*}, Maurizio Bruno^{1,2}

ISOPS, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 22-25 June
2021,

Oral Presentation

“Essential and fixed oils of Sicilian plants as phytotherapeutic sources”

Badalamenti, N. and ^{1,2}Maurizio, B.

Trens in Natural Products Research: A PSE Young Scientists’ Meeting, May 23-26
2022- Kolymbari, Crete, Greece

“Cytotoxic activity of new *ent*-kaurane derivatives of atractyligenin. Synthesis of a
novel diterpenic skeleton by chemical rearrangement”

Natale BADALAMENTI,¹ Alessandro VAGLICA,¹ Maurizio BRUNO,¹ Filippo
MAGGI,² Massimo BRAMUCCI,² Luana QUASSINTI²

52nd International Symposium on Essential Oils, 4-7 September-Wroclaw, Poland
Reuse of Food Waste: Chemical Compositions and Health Properties of Essential
Oils from Several Cultivars of Sicilian *Citrus aurantium* L. and *Citrus maxima*
(Burm.) Merr.

Natale Badalamenti^{1,*}, Maurizio Bruno¹, Rosario Schicchi², Anna Geraci¹,
Mariasosaria Leporini³, Rosa Tundis³, Monica Rosa Loizzo³

Partecipazione a Workshop:

December 2020 Workshop della Sezione Sicilia 2020.

“STUDIO DEGLI Oli ESSENZIALI E DEGLI ESTRATTI APOLARI DI SETTE
CULTIVAR DI ARANCE AMARE”

Natale Badalamenti^{1,*}, Maurizio Bruno^{1,2}

14-16 July 2022 Workshop on traditional medicines: A sustainable lifestyle towards
climate change. University of Athens.

Partecipazione a Congressi:

116° Congresso della Società Botanica Italiana, 8-10 September 2021.

Abstract

“*Foeniculum piperitum* and *F. vulgare*: a comparison between the two chemotypes”.

Natale Badalamenti¹, Maurizio Bruno^{1,2}, Angelo Troia¹, Vincenzo Ilardi³

Partecipazione a school:

Summer School on Natural Drug Products: From theory to current research and application, 4-7 July 2022, Athens.

Oral Presentation: “New derivatives of atractyligenina: chemical rearrangement of a novel *ent*-kaurane and related cytotoxic activity

Natale Badalamenti