

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Metaboliti secondari da Iberis amara L.: isolamento, modificazione e screening preliminari

Relatore

Candidato

Prof.ssa Federica Pollastro

Riccardo Gozzi

Correlatori

Prof.ssa Michela Bosetti

Prof.ssa Letizia Fracchia

Prof. Diego Caprioglio

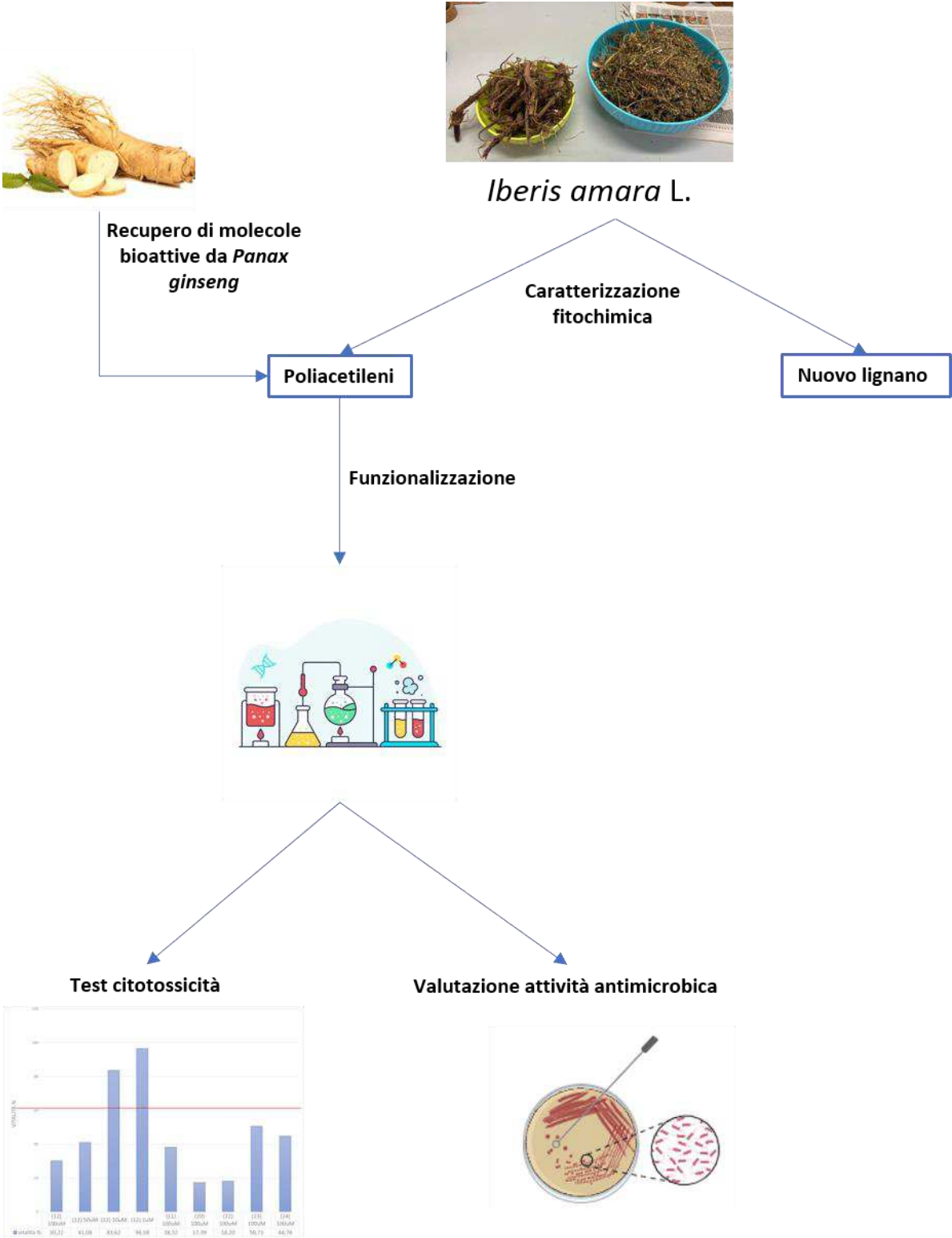
Anno Accademico 2022-2023

Sessione straordinaria

“In natura l’azione e la reazione sono continue. Tutto è legato a tutto. Niente è separato. Tutto è collegato, interdipendente. Ovunque, ogni cosa è collegata a tutte le altre. Ogni domanda riceve la risposta che le corrisponde.”

S. Prajnanapada

Graphical abstract



Indice

Lista delle abbreviazioni	1
Prefazione.....	5
1. Scopo del lavoro.....	7
2. Introduzione	9
2.1 <i>Iberis amara</i> L.	11
2.2 Dall'etnobotanica ad oggi	12
2.3 Composizione fitochimica di <i>Iberis amara</i> L.	13
2.4 Iberide amara, possibili effetti e possibili target	16
2.5 Attività antibiotica dei poliacetileni	19
2.6 Cheratinociti: un possibile target per i poliacetileni	26
3. Risultati e discussione.....	27
3.1 Analisi fitochimica <i>Iberis amara</i> L.....	29
3.2 Sintesi analoghi	32
3.3 Test di citotossicità.....	38
3.4 Valutazione dell'attività antibatterica e antifungina di falcarinolo, falcarindiolo, analoghi semi-sintetici e estratti primari di parti aeree e radici di <i>Iberis amara</i> L.....	48
4. Conclusioni e sviluppi futuri.....	51
5. Parte sperimentale	55
5.1 Caratterizzazione parti aeree <i>Iberis amara</i> L.....	57
5.2 Caratterizzazione radici <i>Iberis amara</i> L.	63
5.3 Sintesi analoghi	71
5.4 Materiali e metodi per test citotossicità	81
5.4 Materiali e metodi per valutazione attività antibatterica e antifungina.....	83
7. Bibliografia	91
8. Sitografia.....	96

Lista delle abbreviazioni

AIC	Autorizzazione Immissione in Commercio
Al₂O₃	Ossido di alluminio
AlCl₃	Alluminio tricloruro
BBr₃	Boro tribromuro
BF₃-EtO	Boro trifloruro eterato
C.C.G.	Colonna Cromatografica a Gravimetria
CH₃COOH	Acido acetico
CuE	Cucurbitacina E
DAC	Dermatite allergica da contatto
DCM	Diclorometano
DIC	Dermatite irritativa da contatto
DMP	Dess-Martin Periodinane
DMSO	Dimetilsolfossido
EtOAc	Etil acetato
FDA	Food and Drug Administration
FDA	Food and Drug Administration
FeCl₃	Ferro tricloruro
GABA_A	Acido Gamma-Amminobutirrico
GLS	Glucosinolati
H₂Cr₂O₇	Acido dicromico
H₂CrO₄	Acido cromico
HCl	Acido cloridrico

HPLC	High Performance liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Cromatography
HTS	High throughtput screening
ITS	Isotiocianati
KCl	Potassio cloruro
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multi-Drug Resistant
MeOH	Metanolo
MHB	Mueller Hinton Broth
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MW	Molecolar Weight
MYR	Mirosinasi
Na₂CO₃	Carbonato di sodio
Na₂HPO₄	Idrogenofosfato di disodio
Na₂SO₄	Sodio solfato
NaCl	Sodio cloruro
NaHCO₃	Sodio bicarbonato
Nf-kB	Nuclear factor kappa B
NMR	Risonanza Magnetica Nucleare
Pe	Petroletere
PET	Polietilene tereftalato
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PPAA	Acido propanfosfonico

RP C-18	Reverse Phase C-18
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SnCl₄	Stagno tetracloruro
TEA	Trietilammina
THF	Tetraidrofurano
TLC	Thin Layer Cromatography
TNFα	Tumor necrosis factor α
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unità Formanti Colonie
UV	Ultravioletti
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor 2

Prefazione

Questo lavoro di ricerca nasce con lo scopo di collegare diversi aspetti scientifici necessari ad un percorso multidisciplinare di modern drug discovery, ed in particolare:

- La caratterizzazione dei metaboliti secondari da fonte vegetale.
- Il problema della sostenibilità ed approvvigionamento di molecole bioattive.
- La semi-sintesi per lo studio di relazioni struttura-attività.
- Alcuni preliminari saggi biologici.

A tale scopo, il mio lavoro di tesi è iniziato vedendo nello specifico la caratterizzazione fitochimica di *Iberis amara* L. presso il laboratorio di fitochimica coordinato dalla Prof.ssa Pollastro. La funzionalizzazione dei metaboliti secondari è stata sviluppata sotto la supervisione del Prof. Caprioglio presso il laboratorio di sintesi organica. La valutazione dell'attività biologica è stata eseguita presso il laboratorio di Rigenerazione tissutale e presso il laboratorio di Microbiologia coordinati rispettivamente dalla Prof.ssa Bosetti e dalla Prof.ssa Fracchia dove la parte sperimentale è stata supervisionata rispettivamente dalla Dr.ssa Beatrice Castiglioni e la Dr.ssa Chiara Ceresa.

1. Scopo del lavoro

Con questo lavoro di tesi si è voluto indagare il profilo fitochimico di *Iberis amara* L. isolandone i composti naturali con successiva funzionalizzazione di quelli di più rilevante interesse al fine di ottenere dei composti con una attività specifica su target identificati. I composti funzionalizzati e caratterizzati chimicamente sono stati infine testati in vitro per valutarne l'attività biologica su cellule eucariote e procariote.

Il progetto inizia prendendo in considerazione un campione spontaneo di *Iberis amara* L. raccolto presso zone montuose della Valsesia gentilmente fornito da Professoressa Angela Maria Vicario, responsabile dell'orto botanico Guardabosone Valsesia. La caratterizzazione fitochimica della pianta è stata svolta sia sulle parti aeree, sia sulle radici, isolando come metaboliti secondari di maggior interesse i poliacetileni falcarinolo e falcarindiolo. Il secondo step è stato quello di identificare una fonte di questi metaboliti abbastanza importante da poterne garantire un approvvigionamento per modificazioni semi-sintetiche. Tale fonte è stata identificata in uno scarto di lavorazione di radici da *Panax ginseng* (Indena - Milano) da cui i poliacetileni sono stati purificati.

A partire da queste due molecole, considerando la loro struttura chimica, è stato intrapreso un lavoro di semi-sintesi organica per ottenere dei derivati. In seguito, tali derivati sono stati testati *in vitro* per valutare la citotossicità dose/dipendente, utilizzando cheratinociti. Parallelamente, l'attività antibatterica e antifungina è stata testata utilizzando colture di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Sono stati anche testati sugli stessi target gli estratti primari sia delle parti aeree che delle radici per verificare un possibile effetto entourage dato dal fitocomplesso rispetto ai singoli composti.

2. Introduzione

2.1 *Iberis amara* L.

Iberis amara L. è una pianta erbacea che appartiene alla famiglia delle Brassicacee e distribuita prevalentemente nell'Europa meridionale. In Italia è una pianta alloctona casuale che cresce tra gli 0 e i 300 m s.l.m., è conosciuta anche come TMIberide bianca o Iberide amara e la si può trovare principalmente in Lombardia, Friuli-Venezia Giulia e Trentino. Molte specie hanno origini che risalgono alla penisola Iberica; infatti, il nome Iberis, deriva dal greco *Ιβηρία*, antico nome della penisola. L'iberide è più conosciuta come 'candytuft' ovvero "cesto di caramelle", termine che tuttavia è legato alla regione Candia, antico nome del comune di Heraklion sull'isola di Creta alla quale alcune tesi ne attribuiscono l'origine.

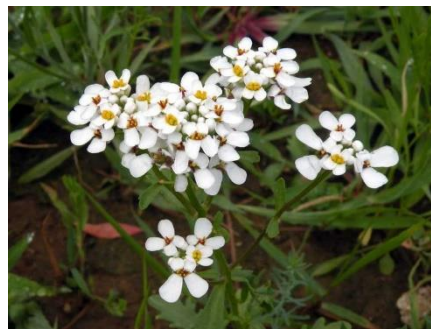


Fig. 1 Fiori di *Iberis amara* L.

<https://www.actaplantarum.org/forum/viewtopic.php?&t=100071>

È una pianta annuale che cresce prevalentemente in prossimità di campi di grano soleggiati e asciutti, predilige terreni argillosi, loess e ricchi di calcio (Reichling J. and R. Sallerb, 2002); presenta una fioritura tra maggio e luglio a piccoli mazzetti di colore bianco o violetto in base alla specie di appartenenza (Fig. 1).

È una pianta commestibile e presenta un gusto amaro; al giorno d'oggi viene spesso utilizzato per riempire i giardini rocciosi di tutta Europa ma in passato fu utilizzata come surrogato della senape per questo fu disprezzata dalle classi più abbienti.

La pianta è utilizzabile in tutte le sue parti, di particolare interesse sono i semi che si caratterizzano per essere ricchi di sostanze oleose utilizzabili come cosmetici, lubrificanti e per la produzione di biocarburante. (Liu *et al.*, 2020).

2.2 Dall'etnobotanica ad oggi



Fin dai tempi più antichi per il trattamento di pazienti con disturbi gastro-intestinali ci si è affidati a piante dal gusto amaro. Il meccanismo d'azione dei composti “amari” non è ancora stato completamente chiarito ma vi sono indicazioni secondo cui, anche a basse concentrazioni, siano in grado di stimolare le secrezioni gastriche e rafforzare la muscolatura liscia del tratto digestivo tramite il nervo vago, il sistema nervoso enterico. È stato possibile osservare che il rafforzamento del tratto digestivo attraverso il sistema enterico sembra stimolare il sistema nervoso centrale portando a una maggiore tonicità generale. A dosi più alte probabilmente si potrebbe avere un effetto diretto sulle mucose dello stomaco e dell'intestino (Saller R. *et al.*, 2001). La prima testimonianza che riporta l'utilizzo di Iberide amara è di Galeno (131-215 a.C.), un medico greco che somministrò i suoi fiori ad un paziente iberico. Nel tardo medioevo diventa un rimedio casalingo facile da reperire ed usato per il trattamento di crampi o stati infiammatori sottoforma di enoliti.

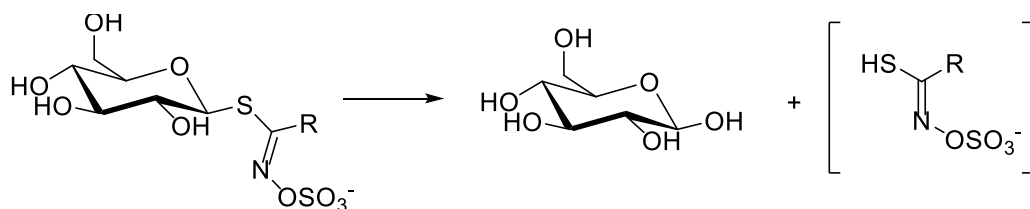
Oggi giorno questa pianta è ancora utilizzata da erboristi americani che si servono di tutte le parti della pianta: foglie, stelo, radici e in particolare i semi. È da sempre indicata per il trattamento di gotta, reumatismi e patologie simili e ora è utilizzata in combinazione con altre piante per le stesse patologie ma in forma acuta. È considerata un rimedio molto efficace in caso di bronchiti, attacchi d'asma o edema.

Attualmente la pianta trova applicazione nella formulazione di fitoterapico indicato come Iberogast, consistente in una preparazione di nove componenti composta da estratto della pianta fresca di iberide e da estratti secchi di altre otto piante (caledonia, cardo mariano, melissa, cumino, liquerizia, angelica, camomilla, menta). Il fitoterapico è indicato per il trattamento di disordini gastrointestinali dell'alto e basso addome e studi sperimentali hanno evidenziato che l'attività del preparato è di tipo sinergico: l'intero estratto secco ha infatti dimostrato di avere un'attività spasmolitica mentre l'estratto ottenuto

dalla sola iberide amara fresca ha un effetto tonico. L'estratto fresco in combinazione con Iberogast è stato valutato come fitoterapico sicuro e le reazioni avverse sono rare se rispettata la posologia. Due trials clinici hanno confrontato Iberogast con metoclopramide e cisapride. L'efficacia terapeutica della preparazione fitoterapica nel trattamento della dispepsia è paragonabile a quella dei due farmaci procinetici. Si è riscontrata una sua specifica attività solo sul tratto gastro-intestinale e sul sistema enterale escludendo il sistema nervoso centrale in modo che, comprovata la sua efficacia e tollerabilità, Iberogast possa essere considerato una prima scelta per il trattamento di disfunzioni gastrointestinali e dei rispettivi sintomi (R. Saller *et al.*, 2001).

2.3 Composizione fitochimica di *Iberis amara* L.

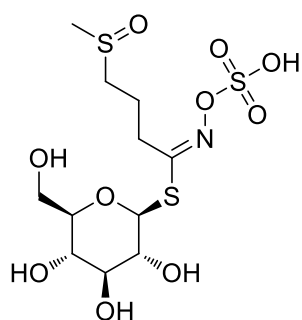
L'*Iberis amara* L. è una pianta appartenente alla famiglia della Brassicacea o Crucifere e come tale contiene i metaboliti secondari tipici e caratterizzanti la famiglia: i glucosinolati (GLS). Oltre a questi composti, il profilo fitochimico della pianta consiste anche nella presenza di cucurbitacina, flavonoidi, lignani e poliacetileni. Le concentrazioni di queste molecole all'interno della pianta sono organo specifico, infatti solo nei semi di Iberide amara è stato possibile isolare la cucurbitacina E (1).



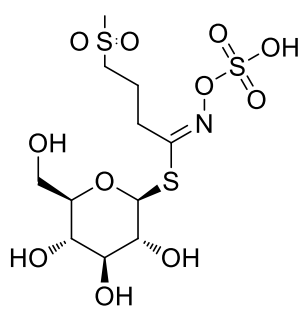
Idrolisi di GLS catalizzata da MYR in seguito a lesione tissutale (R= alchile, aril, indolo).

I glucosinolati invece sono un gruppo di sostanze fitochimiche che comprendono una miscela di più di 130 differenti composti largamente distribuiti soprattutto nella famiglia delle Crucifere. Da un punto di vista chimico sono costituiti da un glicone comune, caratterizzato da un tioglucosio, da una ossima sulfonata e da un aglicone derivato da aminoacidi, in particolare metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano. In seguito alla rottura del tessuto vegetale, i glucosinolati contenuti nella cellula sono rapidamente idrolizzati da mirosinasi (MYR) (tioglucosidasi) a intermedi instabili che si riarrangiano spontaneamente in isotiocianati (ITS), tiocianati o nitrili. Questi prodotti di idrolisi sembra svolgano una funzione nei meccanismi di difesa delle piante contro erbivori, parassiti e batteri patogeni (Carratù Brunella e Sanzini Elisabetta, 2005).

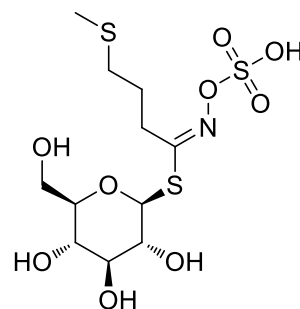
I glucosinolati sono stati isolati in tutte le parti della pianta di iberide e sono: glucoiberina (2), glucocheirolina (3) e glucoibervirina (4) e sono tutti biosintetizzati a partire dalla metionina; durante il periodo vegetativo glucoibervirina (4) viene ossidata a glucoiberina (2), il glicoside più concentrato in Iberide amara (Harald Schempp *et al.*, 2003).



Glucoiberina (2)

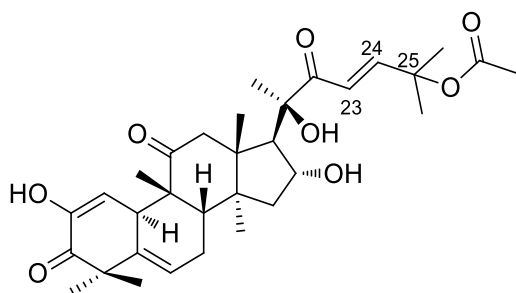


Glucocheirolina (3)

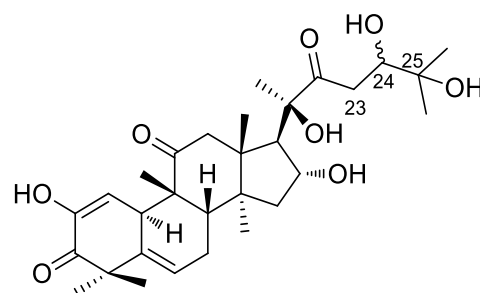


Glucoibervirina (4)

Le cucurbitacine furono inizialmente isolate come principio attivo amaro dalle Cucurbitaceae e successivamente furono poi individuate in forma sia glicosilata che non-glicosilata in piante della famiglia delle Brassicaceae, Scrophulariaceae, Begoniaceae, Elaeocarpaceae, Datisceae, Desfontainiaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae, Rosaceae, e Thymelaeaceae. Sono composti triterpenici ben noti per la tossicità e il gusto amaro e strutturalmente sono caratterizzate per avere uno scheletro tetraciclico denominato come 19-(10→9β)-abeo-10-α-lanost-5-ene, possono essere classificate in base alla diversa posizione dei diversi gruppi funzionali sullo scheletro base in 12 categorie (denominate da A a T). (Chen J. *et al.*, 2005). Tra le cucurbitacine riportate in letteratura e importanti per il nostro progetto ricordiamo l'isoforma E (1), J (6) e K (7). La cucurbitacina J e K differiscono tra di loro per la conformazione del gruppo ossidrilico in posizione 24 mentre la cucurbitacina E (1) a differenza delle prime due citate presenta un'insaturazione tra i C23 e C24 e la presenza di un gruppo acetile su C25. (Chen J. *et al.*, 2005)



Curcubitacina E (1)

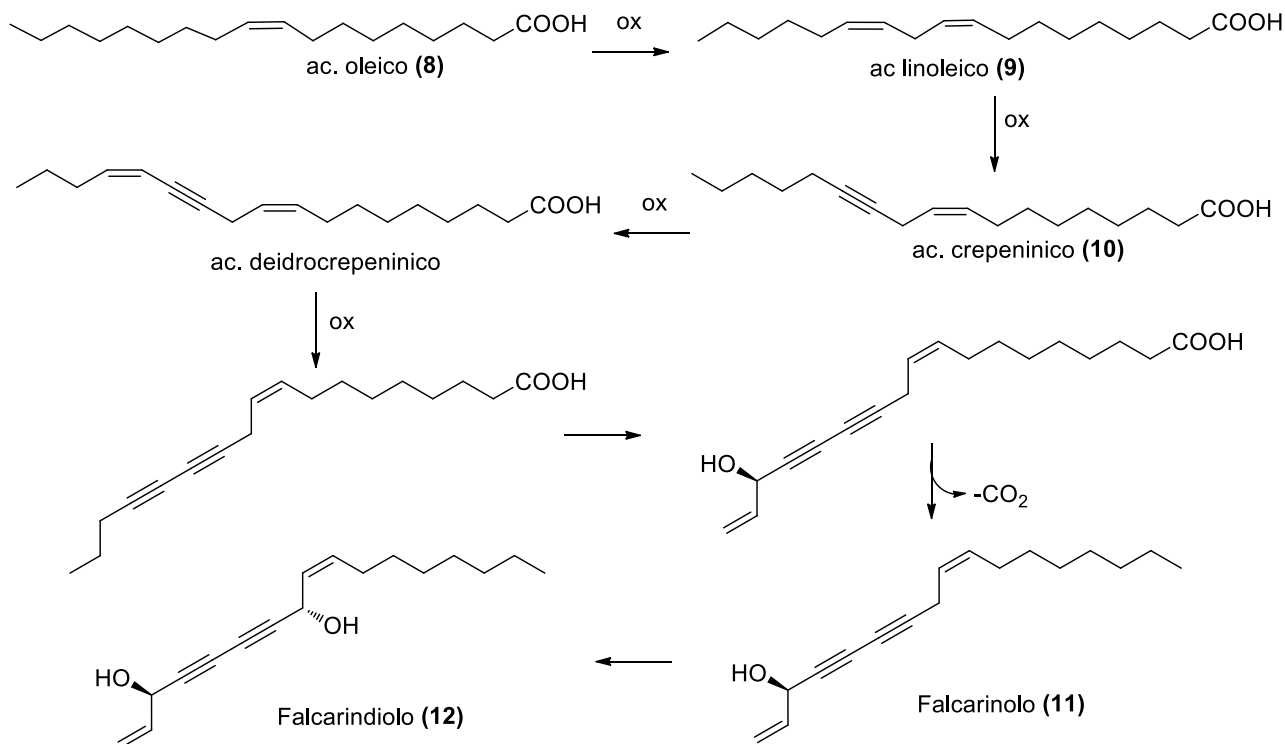


Curcubitacina J e K (6/7)

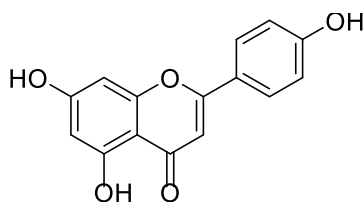
I poliacetileni sono dei metaboliti secondari che vengono sintetizzati a partire da acido oleico (8) e linoleico (9) e che subiscono una iniziale ossidazione ad acido crepeninico (10) e poi, per rimodellazione della catena carboniosa e decarbossilazione, si ha la formazione di due tripli legami coniugati.

Falcarinolo (11) è un C₁₇- poliacetilene con un gruppo ossidrilico in posizione 3 con configurazione R ed è ampiamente distribuito in piante della famiglia delle Apiaceae come la carota, il prezzemolo

o il sedano o in piante medicinali come il *Panax ginseng*. I poliacetileni con una struttura “falcarinolo-tipo” si caratterizzano per avere un gruppo dieno coniugato e una lunga catena alchilica a cui è stata attribuita attività biologica (Li *et al.*, 2021); il falcarindiolo (12) si differenzia dal falcarinolo (11) per la presenza di un ulteriore centro stereogenico in posizione 8 recante un gruppo ossidrilico.

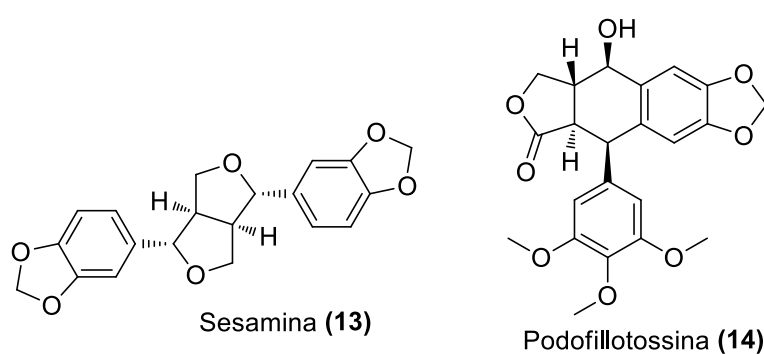


I polifenoli nel mondo vegetale sono composti chimici ubiquitari e fondamentali perché contribuiscono alla resistenza della pianta agli insetti e a microrganismi, alla pigmentazione e alle caratteristiche organolettiche. Con polifenoli si intende una vasta classe di composti con una struttura chimica in comune: sono derivati dal benzene con uno o più gruppi ossidrilici associati all’anello. All’interno di questa classe sono compresi i flavonoidi, una categoria di sostanze polifunzionali ad elevata bioattività; dal punto di vista chimico sono difenilpropani suddivisibili in diverse classi in base al grado di ossidazione dell’anello eterociclico (Brunella Carratù, Elisabetta Sanzini, 2005).



Struttura generale flavonoidi

I composti fenolici in molti casi possono andare incontro a polimerizzazione in seguito a coupling ossidativo dell'unità difenilpropanica per formare ad esempio le pro-antocianidine (ovvero tannini condensati) o i lignani (MacRae, W. D., & Towers, G. N., 1984). Quest'ultimi sono un sottogruppo di composti fenolici non-flavonoidi caratterizzati da due unità fenilpropaniche unite da un legame β - β . (Pulok K. Mukherjee, 2019) e possono essere idrolizzabili se derivati da esteri di acido gallico, oppure non idrolizzabili e quindi definiti condensati. I lignani possono essere considerati degli elementi strutturali di sostegno se organizzati in polimeri a formare lignina oppure possono rappresentare anche molecole singole utilizzabili come integratori alimentari (sesamina (13) tipica dell'olio di sesamo) o farmaceutico (podofillotossina (14) dal podofillo).



2.4 Iberide amara, possibili effetti e possibili target

In base al profilo fitochimico dell'iberide, si potrebbero supporre molti target oggetto di un suo estratto. Infatti, è ben nota l'attività dei glucosinolati come agenti chemopreventivi ed attivatori di enzimi di fase II grazie ai prodotti ottenuti per idrolisi in seguito all'attivazione dell'enzima mirosinasi che risultano essere quindi biologicamente attivi. Evidenze epidemiologiche a partire da studi di coorte e caso-controllo suggeriscono una relazione inversa tra il consumo di vegetali facenti parte della famiglia delle crucifere e il rischio di tumore al polmone, stomaco, colon-retto, ghiandola mammaria, vescica, prostata. Oltre ad avere un'azione antiossidante, ITS è in grado di modulare la crescita cellulare, inibire il ciclo cellulare e la neo-angiogenesi. (Maria Traka e Richard Mithen, 2009)

Inoltre, i glucosinolati hanno dimostrato di avere ulteriori attività biologiche che sono indirettamente connesse con la prevenzione ai tumori. Queste sono: attività antinfiammatoria attraverso la modulazione del fattore di trascrizione nucleare Nf-kB (nuclear factor kappa B) e i segnali della cascata in seguito all'attivazione, inibizione di TNF α , proprietà antibatterica contro *Helicobacter pylori* e attività cardioprotettiva. (Maria Traka e Richard Mithen, 2009)

La cucurbitacina E (**1**), anche conosciuta come α -elaterina, ha da sempre mostrato interesse scientifico grazie ad un'attività antitumorale, immunomodulatoria, antinfiammatoria, neuroprotettiva, epatoprotettiva e purgante. (Xingquan Liu *et al.* 2020). Tra le varie cucurbitacine, la **1** è la più abbondante nelle specie vegetali ed è stata comprovata la sua attività adiuvante nella terapia chemioterapica a base di 5-fluoro uracile e oxalilplatino nel trattamento del carcinoma del colon-retto (Yang *et al.*, 2020), ovvero un prodotto naturale che, se co-somministrato a farmaci antineoplastici, permette la diminuzione degli effetti collaterali con una maggiore tollerabilità della terapia. L'attività antitumorale, come riportano diversi studi, è data dall'attivazione della via apoptotica causando un arresto del ciclo cellulare attraverso la regolazione di vie di PI3K/Akt, STAT3, mTOR, e MAPK. Inoltre, ulteriori evidenze suggeriscono che l'attività inibitoria di CuE (**1**) su neo-angiogenesi e genesi di metastasi è in parte contribuito dal blocco di VEGFR2 mediato dal segnale JAK2-STAT3 e blocco della polimerizzazione dell'actina. Tuttavia, il potenziale target intracellulare rimane ancora ignoto (Yang *et al.*, 2020).

I poliacetileni sono composti di origine lipidica e rappresentano una classe atipica di metaboliti secondari perché in base alla loro concentrazione possono avere diversa attività biologica. A basse concentrazioni hanno dimostrato avere una buona attività citotossica in vitro su diverse linee cellulari tumorali umane ed è stata anche stimata una potenziale attività antitumorale in vivo. Le proprietà antimutagene delle radici del ginseng, per esempio, e il suo effetto immunostimolante durante infezioni batteriche sono probabilmente attribuite al falcarinolo (**11**). D'altro canto, questa molecola se assunta a elevate concentrazioni può portare a effetti negativi come dermatiti o neurotossicità (Susanne L. Hansen *et al.*, 2003). Possono anche sviluppare attività neurotossica a causa di un'azione sul recettore GABA qualora si presenti sulla loro struttura un diolo ed un doppio legame coniugato, caratteristiche tuttavia non presenti sui poliacetileni "falcarinolo-tipo".

Poliacetileni come il falcarinolo (**11**) hanno evidenziato attività antinfiammatoria, antiaggregante, citotossica, antitumorale così come antimicrobica. La bioattività del falcarinolo (**11**) è probabilmente

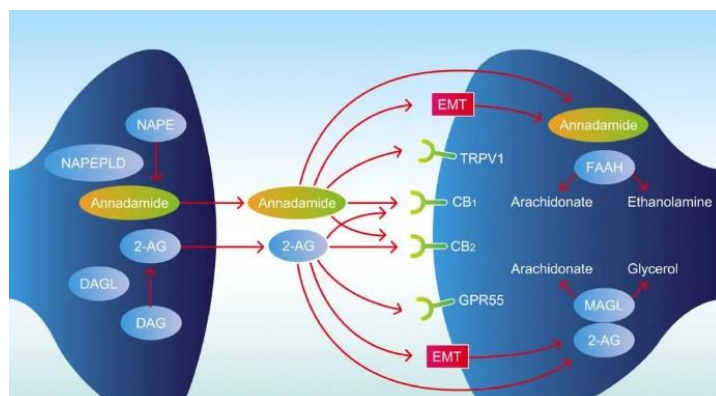
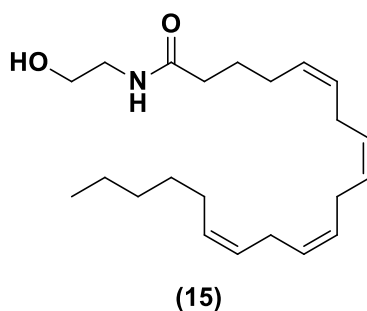


Fig. 2 Sistema endocannabinoide

associata alla sua idrofobicità e alla capacità di formare in mancanza di acqua carbocationi estremamente stabili che lo portano ad essere un agente fortemente alchilante per determinate proteine. A causa della sua lipofilia e del rapido assorbimento nell'uomo è stata attribuita attività neurotrofica e neuroprotettiva (Purup *et al.*, 2009).

Il falcarinolo (11) è stato inoltre identificato come un'agonista reversibile del recettore per i cannabinoidi CB1 ed è in grado di alchilare selettivamente il sito per l'anandamide (15) (Li *et al.*, 2021), un acido grasso insaturo che subisce una reazione di idrolisi i cui prodotti sono acido arachidonico ed etanolamina. Anandamide (15), insieme a 2-arachidonilglicerolo, sono conosciuti come i due maggiori endocannabinoidi ovvero i ligandi endogeni per i recettori cannabinoidi (Ueda N. *et al.*, 2015).



Falcarindiolo (12), con due gruppi idrossilici stereogenici, si è scoperto essere un potente modulatore allosterico sul recettore GABA_A, possibilmente modulando il legame dell'agonista e desensibilizzando il recettore, ma falcarinolo (11) possiede un'affinità maggiore per il recettore GABA_A e possiede sostanzialmente anche una diversa azione farmacologica rispetto a falcarindiolo (12). (Li *et al.*, 2021)

I lignani hanno suscitato particolare interesse per la loro attività antitumorale, in particolar modo per quelli del gruppo della podofillotossina presenti all'interno di un medicamento resinoso estratto da piante della specie *Podophyllum*. Molte podofillotossine hanno mostrato avere attività antimitotica e a partire da questi composti sono state ottenute le epipodofillotossine, una famiglia di farmaci che, oltre ad avere attività sul citoscheletro della cellula tumorale, inibiscono anche l'enzima topoisomerasi II. È noto da molti anni che la resina di molte specie di *Podophyllum* è efficace per il trattamento di condiloma acuminato. (MacRae, W. D., & Towers, G. N., 1984).

2.5 Attività antibiotica dei poliacetileni

Poliacetileni come falcarinolo (**11**) e falcarindiolo (**12**) hanno dimostrato avere attività antimicrobica e antifungina (Dawid *et al.*, 2015).

Come riportato da letteratura, estratti contenenti i due poliacetileni di interesse sono stati testati su *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ma solo **12** ha riportato attività antimicrobica sui due ceppi batterici. (Rollinger *et al.*, 2003).

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus è un batterio facente parte della famiglia delle Staphylococcaceae. (Antonelli *et al.*, 2017) ed è stato identificato per la prima volta nel 1884 dal ricercatore tedesco Anton Rosenbach che fu in grado di isolare due ceppi di stafilococchi (*S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*); la cui nomenclatura fa riferimento alla pigmentazione delle loro colonie (Oliveira D. *et al.*, 2018).

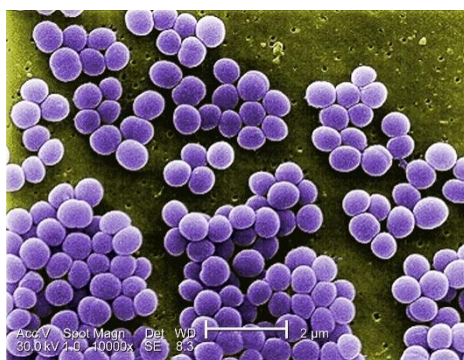


Fig. 3 Staphylococcus aureus

Details - Public Health Image Library(PHIL)
(cdc.gov)

Questi microrganismi si distinguono per le seguenti caratteristiche: sono di forma sferica o ovale, si dispongono a formare dei grappoli regolari (dal greco stafulé che significa grappolo), sono Gram-positivi, immobili, asporigeni, anaerobi facoltativi e acapsulati. (Antonelli *et al.*, 2017). Sono catalasi, ureasi e fosfatasi positivi e molti ceppi producono coagulasi; considerando queste attività metaboliche sono stati introdotti test per distinguere stafilococchi e streptococchi come il test della catalasi, oppure il test della coagulasi per distinguere tra *S. aureus* e *S. epidermidis* (Reddy *et al.*, 2017).

S. aureus produce molteplici fattori di virulenza classificabili in diverse classi in base alla funzione, all'adesione, all'invasione e alla penetrazione, alla capacità di evadere le difese dell'ospite, alla produzione di enzimi e tossine e alla presenza di proteine di membrana. Alcuni di questi fattori di virulenza contribuiscono alla capacità del microrganismo di infettare un organismo ospite come (I) *proteine di membrana* (adesine, clumping factor A, proteine leganti fibrinogeno e fibrinectina) che

promuovono l'adesione e la colonizzazione del tessuto ospite; (II) *invasine* che favoriscono la crescita batterica nel tessuto ospite (leucocidine, chinasi e ialuronidasi); (III) *fattori di superficie* che inibiscono la fagocitosi da parte del sistema immunitario dell'ospite (capsula); (IV) *proprietà biochimiche* che promuovono la sopravvivenza all'interno dell'ospite (carotenoidi e catalasi); (V) *immuno-mimetismo* (coagulasi e proteina-A); (VI) *tossine* che promuovono il danno alla membrana causando la lisi della cellula ospite (emolisine, leucotossine e leucocidine) e *tossine secrete* che danneggiano i tessuti dell'ospite e promuovono la comparsa dei sintomi dell'infezione (enterotossine); (VII) innata o acquisita resistenza ad agenti antibatterici (Reddy *et al.*, 2017).

L'uomo è un serbatoio naturale di *S. aureus* e si considera che circa il 37% dei soggetti adulti ne sia colonizzato, ovvero ne sia portatore. Tra questi si possono considerare delle sottopopolazioni di pazienti che mostrano una maggiore probabilità di essere esposti a una sua infezione come diabetici, pazienti HIV-positivi, pazienti sottoposti a dialisi e pazienti con dermatite atopica (Kluytmans *et al.*, 1997). Il vestibolo nasale è la principale nicchia ecologica di *S. aureus*, tuttavia, in molteplici parti del corpo come pelle, vagina, perineo, ascella e tratto gastrointestinale sono state trovate colonie di questo microrganismo (Sangvik, 2013). È considerato un microrganismo patogeno opportunisto (Oliveira *et al.*, 2018) ed è tale quando il sistema immunitario è debilitato (Reddy *et al.*, 2017). Le infezioni da *S. aureus* sono estremamente variabili per gravità e sede di infezione. È possibile classificarle in:

- Infezioni cutanee superficiali e lievi infezioni tissutali suppurative;
- Infezioni potenzialmente mortali come endocarditi, osteomieliti, polmoniti, meningiti e infezioni sistemiche;
- Tossinfezioni causate dalle tossine rilasciate dal batterio come, ad esempio, intossicazioni alimentari date dall'ingestione di alimenti contaminati. La sintomatologia comprende sintomi generali (febbre) e sintomi locali (vomito e diarrea) che compaiono rapidamente dopo l'ingestione dei cibi per poi evolvere spontaneamente a guarigione o a morte per shock tossico. (Antonelli *et al.*, 2017; Aires de Sousa *et al.*, 2004).

L'antibiotico resistenza è la resistenza di un organismo, generalmente di un patogeno verso un farmaco, ad una terapia precedentemente efficace. Questo fenomeno è serio ed in costante crescita e ha generato grande preoccupazione nella comunità scientifica globale (Reddy *et al.*, 2017). Prendendo in considerazione diversi dati forniti da differenti nazioni, ogni anno il maggior numero di morti causate dall'antibiotica resistenza è data da *S. aureus* meticillino resistente (MRSA - Methicillin Resistant *S. aureus*) (Dubourg *et al.*, 2017). *S. aureus* è un microrganismo in grado di adattarsi facilmente a composti antimicrobici; dopo pochi anni dalla scoperta delle penicilline nel 1928 da

parte di Alexander Fleming furono isolati ceppi in grado di produrre β -lattamasi, un enzima che, idrolizzando l'anello lattamico, inattiva il farmaco (Lowy, 2003). Per combattere questa resistenza è stato introdotto un analogo semisintetico delle penicilline conosciuto come meticillina, ma poco dopo dalla sua introduzione in terapia sono stati riportati casi di fallimento terapeutico in seguito allo sviluppo di ceppi MRSA (Reddy *et al.*, 2017). La resistenza alla meticillina conferisce resistenza anche agli altri antibatterici β -lattamici comprese le cefalosporine (Katayama *et al.*, 2000). Il trattamento di infezioni MDR (Multi Drug-Resistant) *S. aureus* è possibile solo con farmaci di ultima linea come vancomicina e linezolid. Il maggiore utilizzo di vancomicina per il trattamento di infezioni causate da MRSA ha però causato un emergente resistenza a questo farmaco (Reddy *et al.*, 2017).

2.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli fu per la prima volta isolato dalle feci di un bambino nel 1885 da Theodor Escherich, un microbiologo tedesco che inizialmente lo classificò come *Bacterium coli commune* (Escherich, 1885; Cooke, 1974). Nel 1919 venne cambiata la nomenclatura in onore del ricercatore tedesco.

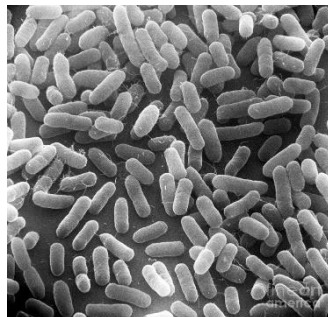


Fig. 4 Fotografia ottenuta al microscopio elettronico di *E. coli*. Fotografia di David M. Phillips – 30 Giugno 2014.

<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/escherichia-coli/>

È tradizionalmente classificato come un microrganismo anaerobio facoltativo, Gram-negativo appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae (Riley, 2020). *E. coli* è un microrganismo commensale che, dopo poche ore dalla nascita, colonizza e occupa il tratto gastrointestinale del neonato (Pakbin *et al.*, 2021). Il microrganismo coesiste senza effetti avversi con l'ospite ma, in pazienti debilitati o con lesioni ai tessuti all'apparato gastro-intestinale può essere causa di diverse patologie (Tenailon, *et al.*, 2010). La capacità di crescere sia in ambiente aerobio che anaerobio, lo ha reso un importante microrganismo utilizzato in campo biotecnologico. È usato in varie applicazioni, in ambito industriale e medico, ed è molto usato nelle tecnologie con DNA ricombinante (Allocati *et al.*, 2013). *E. coli* presenta diversi fattori di virulenza; oltre a quelli comuni a tutti i batteri della famiglia delle Enterobacteriaceae, hanno un ruolo specifico le adesine e le esotossine. È in grado

di produrre diversi tipi di tossine come le Shiga-like, le enterotossine termostabili, le emolisine e le enterotossine termolabili. Le adesine, invece, permettono l'adesione del batterio alle cellule epiteliali dell'ospite. (Antonelli *et al.*, 2017). *E. coli* è in grado di causare un ampio spettro di malattie intestinali ed extraintestinali (Pakbin *et al.*, 2021). Le principali infezioni di cui *E. coli* è la causa sono:

- Setticemia: infezione la cui origine può essere il distretto gastrointestinale (per esempio un'infezione addominale secondaria a perforazione intestinale) o le vie urinarie. È favorita da patologie di base come diabete, neoplasie o immuno-compromissione;
- Infezione delle vie urinarie;
- Meningiti neonatali: *E. coli* insieme a streptococchi del gruppo B possono provocare infezioni al sistema nervoso centrale. Sono maggiormente esposti i neonati prematuri e sottopeso;
- Gastroenteriti. (Antonelli *et al.*, 2017)

In Europa, l'antimicrobico resistenza nei batteri Gram-negativi è in aumento, particolarmente in *E. coli*. La diffusione di ceppi di *E. coli* resistenti alle terapie farmacologiche complica il trattamento di infezioni severe e le *Enterobacteriaceae*, in particolare *E. coli*, sono la più frequente causa di infezioni nosocomiali (Allocati *et al.*, 2013). In *E. coli* la più importante forma di resistenza è la produzione dell'enzima β -lattamasi, di cui ne sono state identificate diverse isoforme (Poirel *et al.*, 2012). *E. coli* ha dimostrato essere resistente anche alla classe dei fluorochinoloni, aminoglicosidi e ai carbapenemi; quest'ultima è stata maggiormente riscontrata in ambiente nosocomiale. Recentemente, l'aumentata antibiotico-resistenza e la diminuzione dell'efficacia degli antibiotici ha portato alla ricerca di nuove terapie come la terapia fagica, peptidi antimicrobici oppure la combinazione di più antibiotici (Allocati *et al.*, 2013). La terapia fagica fa affidamento a fagi bioingegnerizzati che infettano e lisano i batteri nel sito di infezione (Lin *et al.*, 2017); presenta diversi vantaggi rispetto ai farmaci classici: ha una elevata specificità, è sicura e può essere modificata in caso di insorgenza di una nuova resistenza (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

I peptidi antimicrobici sono un abbondante ed eterogeneo gruppo di molecole prodotte da organismi eucarioti e procarioti o codificati da fagi. Sono di norma sintetizzati dai batteri per eliminare organismi che competono nella loro stessa nicchia ecologica. Sono generalmente piccoli peptidi anfipatici che si inseriscono nella membrana cellulare creando un canale che risulta mortale. Numerosi di questi peptidi sono stati sviluppati come farmaci e hanno dimostrato essere battericidi (Allocati *et al.*, 2013). Un nuovo farmaco indicato specificatamente per i Gram-negativi è, in caso di resistenza ai farmaci β -lattamici, il cefiderocol. È un composto sintetico e coniugato costituito da una cefalosporina e un gruppo sideroforo. Il gruppo sideroforo lega un atomo di ferro e sfrutta i

trasportatori del ferro per entrare all'interno del batterio. In seguito, il farmaco si dissocia dall'atomo metallico e la cefalosporina inibisce la sintesi della parete batterica. (McCreary *et al.*, 2021).

2.5.3 *Candida albicans*

Infezioni fungine causate da *Candida* stanno emergendo come uno dei maggiori problemi di salute pubblica e sono causa di un alto tasso di mortalità per i pazienti ospedalizzati e dell'aumento della spesa sanitaria per i governi. Il genere *Candida* è responsabile della maggiore parte di infezioni fungine nell'uomo (Lopes and Lionakis, 2021) e l'incremento delle morti può essere attribuito all'aumento delle candidosi sistemiche, specialmente in pazienti immunocompromessi (Medici ad Poeta, 2015; Sakagami *et al.*, 2019).

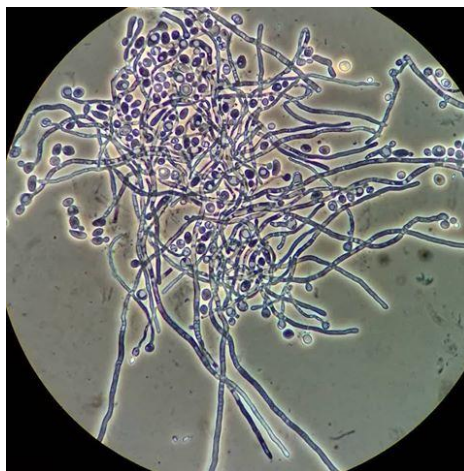


Fig. 5 Immagine di *C. albicans* acquisita in microscopia ottica in contrasto di fase.

<https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/candida-albicans/>

C. albicans è un fungo che presenta una natura polimorfica essendo in grado di differenziarsi come lievito gemmante, come lievito allungato chiamato pseudoifa e sotto forma di filamenti polarizzati definite ife (Pereira *et al.*, 2021). La capacità di una cellula di cambiare da un tipo ad un altro è determinata da fattori ambientali; temperatura elevate (37 °C), pH elevato, differenti fonti di carbonio e presenza di siero stimolano la formazione ifale mentre basse temperature (30 °C), basso pH e l'assenza di siero favoriscono la formazione della forma a lievito (Antonelli *et al.*, 2017). I fattori di virulenza che caratterizzano *C. albicans* sono la capacità di differenziarsi da lievito gemmante a ifa, l'espressione di adesine e invasine sulla membrana cellulare, la formazione di biofilm e la secrezione di enzimi idrolitici (Nicholls *et al.*, 2011). È uno tra i più comuni patogeni opportunisti che risiede nel cavo orale, nel tratto genitourinario e nel tratto gastrointestinale (Nami *et al.*, 2018), tuttavia danni tissutali o una diminuita risposta immunitaria dell'ospite permette al fungo di migrare attraverso gli epitelii e causare infezioni in siti anatomici più profondi (Lopes and Lionakis, 2021).

Molti fattori contribuiscono all'aumentato numero di infezioni fungine. I pazienti immunocompromessi sono quelli maggiormente esposti e comorbidità come neutropenia, tumori, HIV o danno tissutale (ad esempio severe ustioni) ne facilitano l'infezione. Altri fattori possono contribuire ad una infezione come: cateteri non sterili, nutrizione parenterale totale, ventilazione meccanica, ospedalizzazione prolungata, iperglicemia, utilizzo di steroidi e uso prolungato di antibiotici ad ampio spettro (Pfaller and Diekema, 2007; Pereira *et al.*, 2021).

Le candidosi si possono classificare a grandi linee in due sottocategorie: candidosi delle mucose e sistemiche (Lopes and Lionakis, 2021). Le prime si possono manifestare in diverse forme cliniche: mugghetto, balanite e vulvovaginite. Il mugghetto è un'infezione del cavo orale e si presenta come uno strato biancastro e asportabile sulla lingua che appare rossa, erosa e tendente al sanguinamento. La vulvovaginite si presenta con perdite biancastre spesso associate a irritazione ed eritema e in casi meno frequenti anche a disuria. Nei maschi, l'infezione causata da *Candida albicans* si localizza sul glande e prende il nome di balanite (Antonelli *et al.*, 2017). Si possono anche manifestare candidosi come quella orale, esofagea e, meno frequentemente, sotto forma di onicomicosi (Lopes and Lionakis, 2021). Candidosi sistemiche colpiscono parti del corpo sterili come il circolo ematico dal quale possono diffondersi al sistema nervoso centrale, fegato, milza, cuore e reni (Pappas *et al.*, 2018).

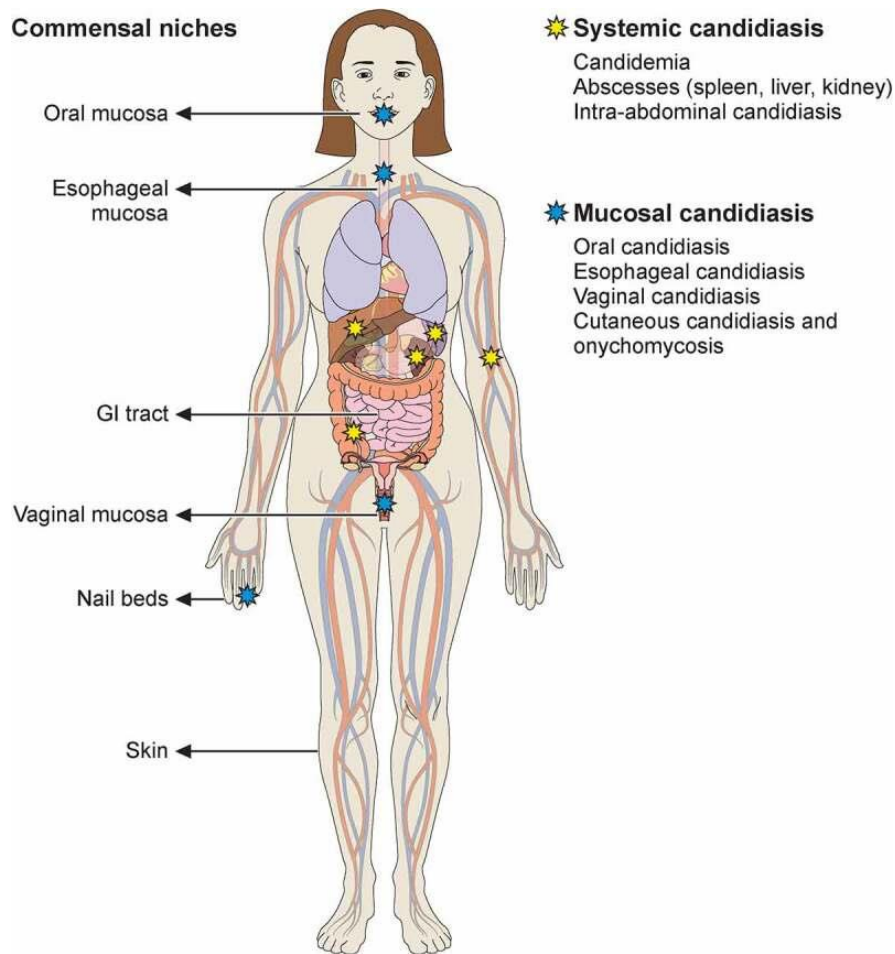


Fig. 6 Siti commensali di *C. albicans* nel corpo umano e sedi di infezione

La terapia delle candidosi prevede la somministrazione di azoli (fluconazolo è il più utilizzato) ed echinocandine. Le seconde sono state introdotte successivamente in terapia rispetto agli azoli e sono consigliate come prima linea di trattamento per le candidosi. A differenza degli azoli presentano un maggiore profilo di sicurezza, una buona selettività e una minore interazione con altri farmaci (Lee *et al.*, 2021). Tra le echinocandine ricordiamo la caspofungina acetato, primo farmaco di questa classe a ricevere l'approvazione alla commercializzazione da parte della Food and Drug Administration (FDA). La caspofungina è inoltre indicata per il trattamento di specie di *Candida* resistenti ai triazoli.

2.6 Cheratinociti: un possibile target per i poliacetileni

La cute è l'organo umano più esteso e rappresenta la principale barriera chimica, fisica e microbiologica con il mondo esterno (Chieosilapatham *et al.*, 2021). Si presenta composta da tre strati principali: epidermide, derma e ipoderma. Ognuno è composto da molteplici popolazioni di cellule come cheratinociti, melanociti, fibroblasti, mastociti, cellule di Langherans e cellule di Merkel. (Vidal Yucha *et al.*, 2019; Dixon *et al.*, 2012).

Anche se il recettore CB₁ è maggiormente espresso nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nei gangli della base e nel cervelletto (Matsuda *et al.*, 1990; Howlett *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2019), nella milza, nei polmoni, nel timo, nel cuore e nei vasi sanguigni (Feng *et al.*, 2014; Bonz *et al.*, 2003) ed il recettore CB₂ in cellule e strutture facenti parte del sistema immunitario tra cui leucociti, milza, tonsille, timo oltre che in polmoni e testicoli (Munro *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010); è stato osservato che gli stessi recettori sono presenti praticamente in tutti i tipi di pelle. In particolare i cheratinociti esprimono i recettori per i cannabinoidi CB₁ e CB₂ (Ständer *et al.*, 2005).

Nella cute l'attivazione del sistema endocannabinoide media diversi effetti fisiologici (Leonti *et al.*, 2010): mentre una stimolazione del recettore CB₂ ha mostrato essere potenzialmente pro-infiammatorio (Oka *et al.*, 2005), lo stimolo di tutto il sistema endocannabinoide pare invece avere effetti benefici nell'insorgenza di stati infiammatori cutanei (Karsak *et al.*, 2007). Karsak *et al.*, studiando dei topi CB knockout, hanno osservato che il sistema endocannabinoide e CB₁, se attivati, possono inibire la patogenesi della dermatite da contatto. Quest'ultima è una risposta infiammatoria cutanea causata dal contatto con agenti ambientali di diversa natura. È possibile distinguerne due forme: irritativa (DIC) o allergica (DAC) (Trevisan, V., & Ferrucci, S.).

La dermatite allergica da contatto è una risposta infiammatoria cutanea causata da una sensibilizzazione cellula-mediata (di tipo IV secondo la classificazione di Gell e Combs) e si caratterizza per avere una natura immunologica. Anche la DIC è una risposta infiammatoria cutanea, la cui eziologia è data da agenti esogeni chimici, fisici o biologici. La sua patogenesi non è ancora completamente conosciuta, ma si pensa che l'agente irritante perturbi l'omeostasi della cute, inducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie innescando il processo della flogosi cutanea (Trevisan, V., & Ferrucci, S.).

3. Risultati e discussione

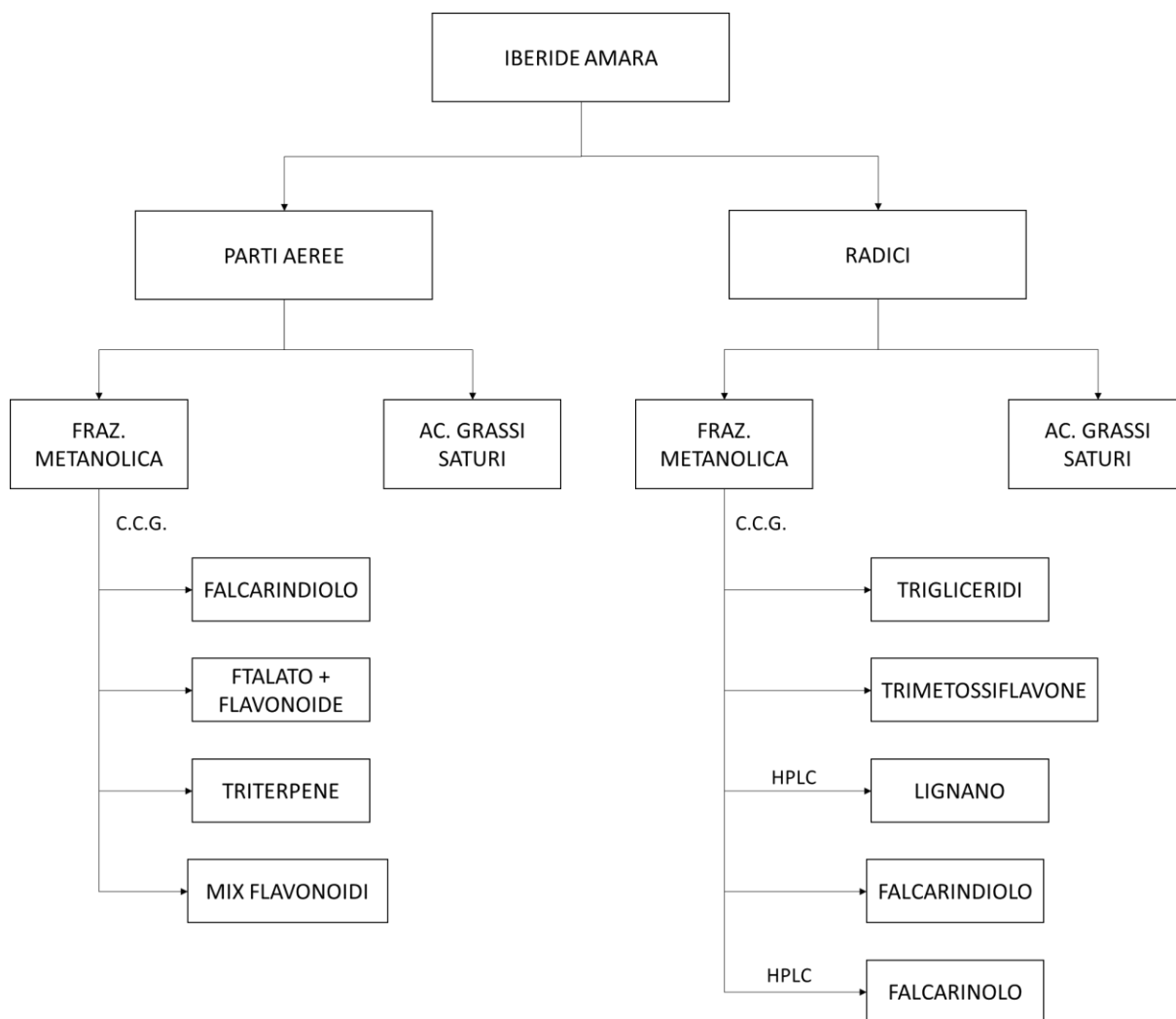
3.1 Analisi fitochimica *Iberis amara* L.



Fig. 7 Radici e parti aeree essiccate di Iberis amara L. prima dell'estrazione

Il mercato dei prodotti naturali è in continua espansione soprattutto grazie all'introduzione di strategie che mirano al loro sviluppo salvaguardandone la buona qualità e la composizione come tecniche di screening di molecole attive, approcci genomici e metabolomici (analisi avanzate che permettono di misurare le concentrazioni di metaboliti), concetto di fitoequivalenza (che determina una standardizzazione di estratti).

Infatti, oggi il consumo di prodotti fitoterapici e di botanicals è in crescita. Da un punto di vista legislativo, però è bene sottolineare che vi è differenza tra medicinale fitoterapico e botanical: il primo è considerato un farmaco ed è necessario che sia registrato con AIC e la sua dispensazione talvolta richiede una prescrizione medica; con il termine botanical, invece si intende un integratore alimentare per il quale non è richiesta una prescrizione medica e sull'etichetta non deve comparire attività terapeutica ma solo dei claim consentiti. All'interno di integratori, l'attività integrativa non deve essere attribuita a un singolo principio attivo inteso come un'entità monomolecolare o bimolecolare, ma all'intero fitocomplesso.



Schema processo estrattivo

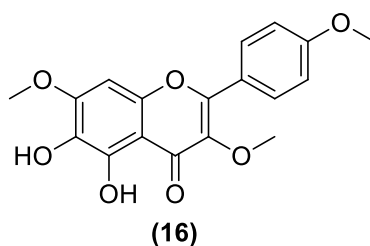
3.1.1 Analisi fitochimica parti aeree

La definizione del profilo fitochimico del campione di *Iberis amara* L. è stata eseguita a partire dalle radici e dalle parti aeree ottenendo un estratto acetone primario di colore verde brillante per le parti aeree e marrone scuro per le radici. Questo processo estrattivo è stato eseguito immergendo separatamente per 12 h sia le radici, preventivamente triturate, che le parti aeree in acetone; è stato scelto questo solvente perché ha un punto di ebollizione basso, una polarità adeguata, una bassa tossicità e può essere riciclato per molteplici estrazioni.

Successivamente si è proseguito su entrambe le frazioni con un processo di winterizzazione per eliminare la componente lipofila. La winterizzazione è un processo molto vantaggioso perché si basa su un processo fisico che sfrutta l'insolubilità di sostanze altamente lipofile in etanolo o metanolo a bassa temperatura. L'operazione costituisce un passaggio fondamentale nella caratterizzazione

fitochimica perché permette di eliminare una frazione altamente apolare costituita da acidi grassi, trigliceridi saturi e cere, che renderebbe difficoltosa l'identificazione di nuove molecole contenute nella frazione polare. Questa porzione lipofila è poi separata tramite filtrazione o decantazione permettendo un più facile esame della frazione più polare costituita dal surnatante.

L'analisi è proseguita quindi dalla frazione decerata e degrassata delle parti aeree della pianta attraverso filtrazione su RP C-18 al fine di eliminare gli acidi grassi insaturi che non condensano a freddo con la winterizzazione e le clorofille. La frazione depigmentata e totalmente degrassata è stata successivamente studiata tramite tecnica cromatografica a gravimetria con fase diretta (silice-Pe/EtOAc gradiente) e flash chromatography (Biotage) a fase inversa. Si sono ottenute 8 frazioni: con la prima frazione è stato possibile isolare il faltarindio (12) (R= 0,08%), per le frazioni successive si è optato per un'ulteriore separazione utilizzando una HPLC semipreparativa sempre in fase diretta. In seguito ad analisi ^1H NMR è stato possibile identificare tracce di ftalati, un trimetossiflavone e la tanetina (16).



Per due frazioni a polarità intermedia è stata utilizzata una cromatografia a gravimetria, usando come fase stazionaria Al_2O_3 e eluenti gradiente di Pe e EtOAc. Si è scelta questa fase stazionaria perché essendo basica permette di trattenere tutte quelle molecole che presentano una pKa minore o uguale a 10 che potrebbero interferire e ha permesso di isolare in due frazioni distinte un triterpene e un mix di flavonoidi polimetossilati.

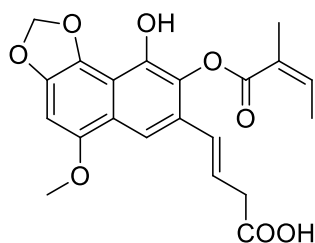
Le frazioni più polari sono state eliminate perché composte essenzialmente da zuccheri.

3.1.2 Analisi fitochimica radici

Successivamente si è spostata la concentrazione sull'analisi dell'estratto acetone ottenuto a partire dalle radici.

Con il processo di winterizzazione si sono ottenute tre diverse frazioni: una frazione solubile in MeOH a freddo che si presenta come un olio di colore nero-violaceo, una frazione insolubile amorfa/oleosa e infine un precipitato caratterizzato da acidi grassi saturi e cere.

Solo sulla prima è continuata l'indagine essendo quella decerata e degrassata. Tramite tecnica cromatografica a gravimetria, flash chromatography (Biotage) a fase inversa ed HPLC semipreparativa su fase diretta ed analisi con ^1H NMR sono state identificate le seguenti molecole: un trimetossiflavone, falcarinolo (**11**) impuro ed un nuovo lignano (**17**) la cui struttura molecolare è ancora in definizione.



(17)

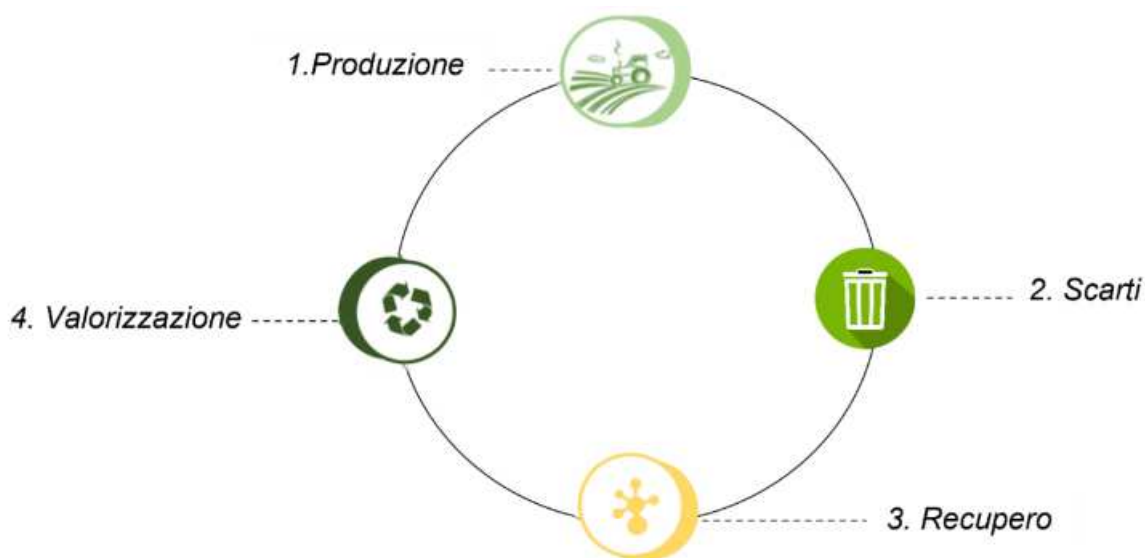
3.2 Sintesi analoghi

In seguito all'isolamento dei due poliacetileni contenuti nelle radici e parti aeree, si è proseguito con la sintesi di nuovi analoghi andando a modificare la catena laterale e aggiungendo delle porzioni amminiche che potessero mimare gli stessi legami dell'anandamide (**15**) con i recettori per i cannabinoidi.

Considerando che i poliacetileni quali metaboliti secondari di iberide in base alla quantità a noi disponibile, non sono presenti in un quantitativo sufficiente da permettere un ampio studio di semi-sintesi, si è ricorso all'utilizzo di uno scarto industriale in cui queste molecole fossero concentrate: le radici di *Panax ginseng* residue dall'estrazione di ginsenosidi introducendo quindi il concetto di green economy. Con green economy si intende un modello teorico di sviluppo economico in cui viene valutato l'impatto ambientale del processo produttivo e della trasformazione delle materie prime; introducendo metodi produttivi sostenibili e che mettano al centro il benessere dell'individuo e l'ambiente.

Gli obiettivi della green economy sono:

- Ridurre le emissioni di CO_2 e gas serra, principali responsabili di inquinamento e del cambiamento climatico;
- Riduzione delle materie di scarto e di rifiuti dei processi produttivi;
- Evitare la perdita di biodiversità e la conservazione dell'ecosistema.



Sistema circolare alla base della green economy

Mettendo a punto un nuovo metodo estrattivo si è riusciti a riciclare il materiale esausto rendendolo una nuova fonte di falcarinolo (**11**) e falcarindiolo (**12**); l'obiettivo è anche quello di massimizzare le rese e definire un protocollo da seguire in futuro per poterne riciclare grandi quantità.

3.2.1 Estrazione poliacetileni

Il materiale di partenza è un olio scuro e oleoso di *Panax ginseng* (25,00 g) che viene ripartito in MeOH e Pe, il primo un solvente polare e il secondo apolare. La scelta dei due solventi è dettata dalla natura delle molecole contenute nell'olio: i poliacetileni, di natura apolare, verranno trattenuti solo nella frazione petroleterea, mentre altre molecole più polari verranno estratte tramite lavaggi metanolici.

La frazione petroleterea è successivamente lavata con una soluzione satura di Na_2CO_3 per eliminare gli acidi grassi liberi e poi purificata tramite C.C.G. su fase diretta isolando falcarinolo (**11**) e poi falcarindiolo (**12**) (Fig. 8).

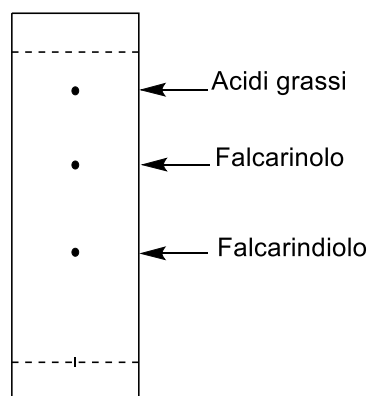


Fig. 8 TLC rappresentativa dell'estrazione da olio Indena

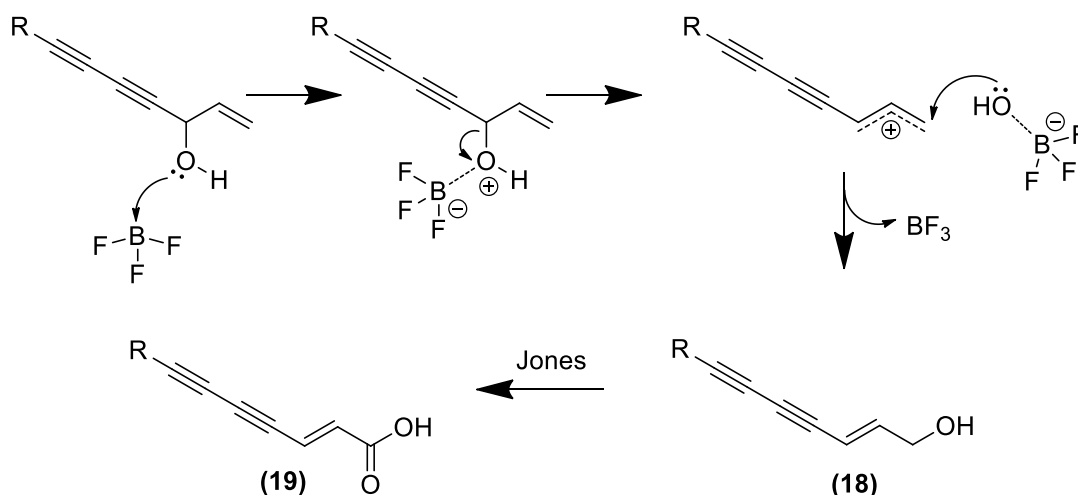
3.2.1 Sintesi

La sintesi è stata pianificata con l'intento di trasporre il gruppo ossidrilico del falcarinolo (**11**) dalla posizione C3 alla posizione C1 utilizzando un acido di Lewis, ovvero reattivi che hanno orbitali di valenza vuoti e possono accettare una coppia di elettroni in condivisione. In questo modo è possibile ottenere un alcol primario facilmente ossidabile ad acido carbossilico, in modo da ottenere un derivato dalla struttura comparabile ad un acido grasso polinsaturo.

Questa reazione è stata studiata utilizzando diversi acidi di Lewis tra cui: AlCl_3 , BBr_3 , FeCl_3 , SnCl_4 e $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$. Solo quest'ultimo ha portato al prodotto richiesto (**18**) in rese moderate ($R=43,00\%$).

L'alcol primario così ottenuto è fatto quindi reagire con il reattivo di Jones, un reagente ossidante che si presenta come una soluzione di acido cromatico H_2CrO_4 in equilibrio con l'acido dicromico $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. In seguito ad una prima aggiunta di reagente si ha ossidazione dell'alcol primario ad aldeide, e con un'ulteriore aggiunta di agente ossidante, si ha la formazione del prodotto di interesse (**19**) ($R=21,65\%$). L'ossidazione del gruppo ossidrilico ad acido carbossilico è considerata terminata quando si ha viraggio della soluzione da arancione a marrone scuro e confermata da TLC.

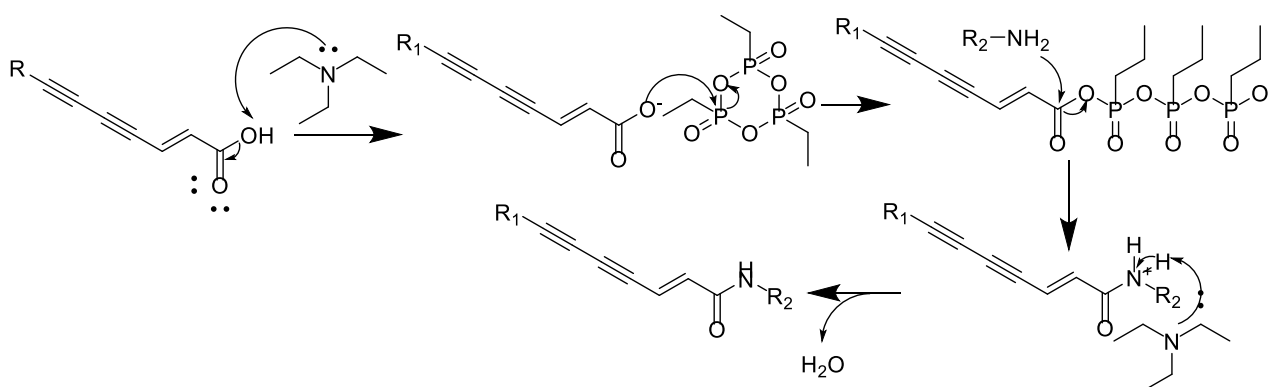
Questo step sintetico è fondamentale perché a partire dal gruppo funzionale ottenuto è possibile aggiungere per ammidazione diverse porzioni amminiche.



Meccanismo trasposizione alcol e sua ossidazione con reattivo di Jones

3.2.3 Ammidazione

L'ultimo step sintetico consiste in una reazione di ammidazione, che vede l'impiego di un'ammina e dell'acido carbossilico (19) come reagenti. La reazione si sviluppa in due stadi: il primo vede l'attivazione dell'acido carbossilico, che nel secondo stadio viene attaccato dall'ammina a dare il prodotto ammidico e acqua. Affinché si formino correttamente queste molecole è necessario che i reagenti siano aggiunti rispettando rigorosamente il seguente ordine: TEA, ammina e l'anidride ciclica dell'acido propanfosfonico (PPAA o T3P). L'iniziale addizione di TEA, una base, garantisce la formazione del carbossilato che attacca il PPAA; questo step permette l'attivazione dell'acido carbossilico, che viene quindi attaccato dall'ammina portando alla formazione dell'ammido. Il sottoprodotto della reazione consiste in una molecola d'acqua e al PPAA in forma acida, che viene tranquillamente eliminato tramite work-up acquoso.



Meccanismo reazione di ammidazione con PPAA

Le ammine utilizzate come reagenti sono state scelte in base a precedenti dati di letteratura, in cui venivano riportate determinate ammidi derivanti da acidi grassi dotati di attività sui recettori per i cannabinoidi. Non tutte le ammine scelte hanno portato alla formazione del prodotto di interesse; i tentativi fatti utilizzando come reagenti propilammina, 2-cloroetilammina, benzilammina e ciclopropilammina hanno portato alla formazione di un prodotto ma con rese molto basse. Il tentativo fatto utilizzando come reagente la vanillammina e la 2-idrossi-etilammina non ha dato il risultato sperato perché i due reagenti presentano un gruppo ossidrilico che probabilmente interferisce con il PPAA portando alla formazione di una miscela di esteri ed ammidi difficili da purificare.

Dalla reazione tra **19** e allilammina in seguito a controllo con TLC è stato possibile individuare un prodotto (**21**) ma, in seguito a una prima separazione per C.C.G. e successivamente per HPLC non è stato possibile isolare e individuare il prodotto della reazione, che probabilmente è instabile e va incontro a degradazione durante i processi di purificazione

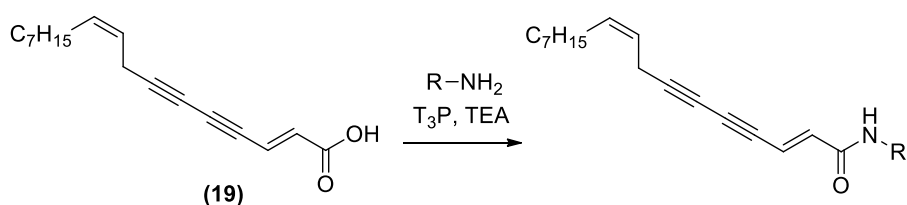
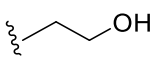
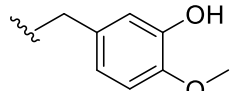


Tabella 1 Porzioni amminiche aggiunte

Nome prodotto	R	Resa
(20)		35,30%
(21)		Degradato in colonna
(22)		20,70%
(23)		27,70%
(24)		5,20%

(25)		Miscela complessa
(26)		Miscela complessa

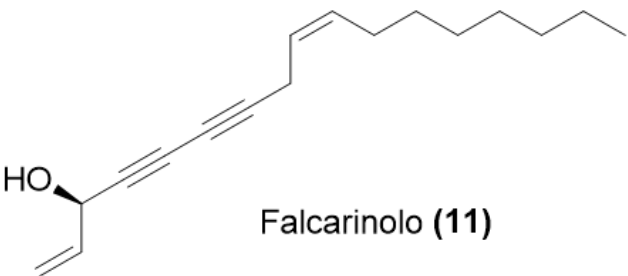
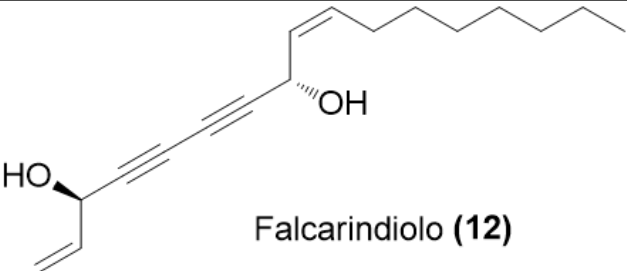
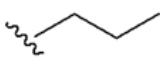
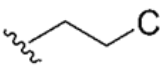
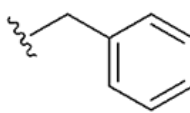
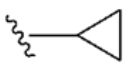
Sono state ipotizzate ulteriori strategie sintetiche a partire dal falcarinolo (11) isolato dall'estratto Indena. Inizialmente si è tentato di ossidare il gruppo ossidrilico a chetone utilizzando DMP come reagente e DCM come solvente, una reazione già riportata in letteratura con questo tipo di substrati, senza però portare alla formazione di nessun prodotto. Il DMP è in grado di ossidare alcoli primari ad aldeidi e alcoli secondari a chetoni e presenta diversi vantaggi rispetto a ossidanti a base di cromo e DMSO che includono condizioni più miti (temperatura ambiente, pH neutro), tempi di reazioni più brevi e rese più elevate.

Utilizzando come reagente palladio e H₂ è stata tentata l'idrogenazione dei tripli legami a doppi legami, questa reazione non ha portato alla formazione dei prodotti richiesti perché si è ottenuta la riduzione di tutte le insaturazioni presenti nel reagente, nonostante l'utilizzo di catalizzatore appositi come il catalizzatore di Lindlar.

3.3 Test di citotossicità

Il lavoro di tesi è proseguito con lo studio di citotossicità di falcarindiolo (indicato nelle figure dei risultati con il numero di composto **12**), falcarinolo (indicato nelle figure dei risultati con il numero di composto **11**) e degli analoghi ottenuti (indicati nella tabella qui sotto nelle modificazioni strutturali R e nelle figure dei risultati con i numeri di composto **20**, **22**, **23**, **24**) utilizzando cheratinociti di linea (HaCat-ATCC) come modello cellulare.

Tabella 2 Composti testati

 <p>Falcarinolo (11)</p>	<p>R</p>
 <p>Falcarindiolo (12)</p>	 <p>(20)</p>
 <p>(22)</p>	 <p>(23)</p>
 <p>(24)</p>	

Tutti i campioni sono stati solubilizzati in DMSO, solvente polare aprotico che permette di solubilizzare composti polari ed apolari, ottenendo una soluzione madre con concentrazione di 1 M. Per evitare che il solvente stesso esercitasse un'attività tossica sulle cellule, si sono effettuate delle diluizioni in terreno di coltura della soluzione madre in modo tale da utilizzare concentrazioni finali di DMSO pari od inferiori all'1,50% ed utilizzando il DMSO a queste concentrazioni come controllo nei test di citotossicità.

La citotossicità dei composti è stata testata *in vitro* mediante test MTT su cheratinociti (HaCaT) trattati 24 ore con i composti studiati. Quest'ultimo è un test di tipo colorimetrico e prende il nome dal reattivo utilizzato: bromuro di 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia). Il composto (giallo), dopo essere stato assorbito all'interno del mitocondrio cellulare, subisce una riduzione a formazano che impartisce alle cellule una colorazione blu/violetto. Con questo saggio è possibile valutare la percentuale di vitalità delle cellule.

Le HaCaT sono state seminate in una multiwell da 48 pozzetti ad una concentrazione cellulare pari a 5.000 cellule/pozzetto in 250,00 µL di terreno DMEM HG supplementato con il 10,00% di FBS inattivato e successivamente poste in incubatore a 37 °C overnight (O/N).

Dopo 24 ore, sono stati aggiunti i seguenti stimoli:

- Controllo di vitalità cellulare (CTR) costituito da sole cellule;
- Controllo di vitalità in presenza di DMSO solvente testato alle concentrazioni presenti nei composti (0,02% - 2,00%) affinché si possa valutare la citotossicità del solvente stesso.
- Controllo negativo di vitalità, indice di morte cellulare (TRITON): Triton X-100 al 10% (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia);
- I composti **11, 12, 20, 22, 23, 24** testati a concentrazioni comprese tra 1 e 100 µM;

I risultati d'assorbanza sono espressi come % di vitalità rispetto al controllo in presenza di DMSO alla concentrazione corrispondente.

La percentuale di vitalità accettata è posta essere pari o superiore al 70%, segnato con linea rossa nei grafici a barre, parametro considerato come limite dalla normativa ISO (Standardization IOF. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In vitro Cytotoxicity. ISO: Geneva, Switzerland. 2009). Gli esperimenti sono stati svolti in triplicato in 3 repliche sperimentali n=9.

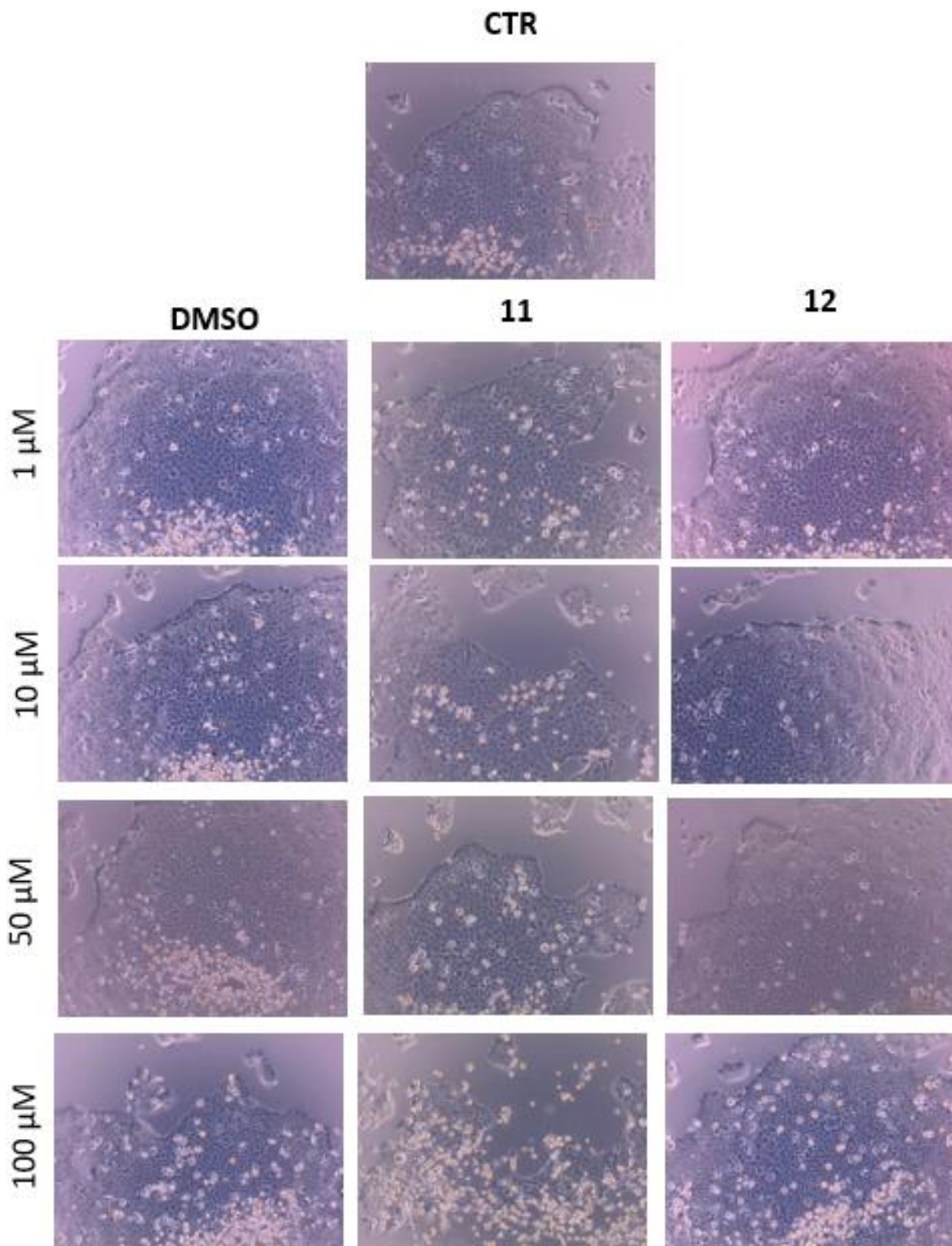


Fig. 9 In questo pannello di immagini sono riportate fotografie rappresentative delle colture cellulari di HaCaT utilizzate per valutare la tossicità di tutti i composti. Tutti i composti sono stati utilizzati a concentrazioni crescenti comprese tra 1 μM e 100 μM . Queste immagini sono state acquisite in microscopia a contrasto di fase ad ingrandimento 10x. In alto al centro è riportata un'immagine del controllo in cui non è stato inoculato nessun composto e tutte le cellule sono sane.

Nella prima colonna a sinistra sono riportate immagini di cheratinociti trattati con DMSO per poter valutare se il solvente in cui sono disciolti i composti possa interferire con la valutazione della citotossicità degli stessi. Nella colonna centrale sono riportate fotografie delle colture cellulari in cui

è stato testato falcarinolo (**11**). Alla concentrazione pari a 100 μM le cellule si presentano poco adese con numerose cellule morte a causa della tossicità del composto. Alle concentrazioni minori in tutte le colture cellulari i cheratinociti presentano una buona vitalità con cellule ben adese e isole di grandi dimensioni.

Nella colonna di destra sono riportate le fotografie delle colture cellulari in cui è stato testato falcarindiolo (**12**). A concentrazioni pari a 1 μM e 10 μM si può vedere che i composti non sono tossici, le cellule sono sane, ben adese e formano grandi isole. La morfologia delle colture a concentrazioni pari a 50 μM e 100 μM non mostra particolari segni di tossicità anche se si nota qualche sofferenza cellulare (cellule tondeggianti non adese) per il composto **11** utilizzato alla concentrazione 100 μM .

Nella colonna A della Fig. 10 sono riportate le immagini raffiguranti le colture cellulari in cui è stato testato il composto **20**. A concentrazioni pari a 1 μM e 10 μM le cellule sono sane e non evidenziano segni di tossicità. A 50 μM le cellule sono sofferenti con una scarsa proliferazione cellulare e numerosi corpi necrotici. A 100 μM , la massima concentrazione testata, la maggior parte delle cellule sono morte evidenziando l'elevata tossicità di questo composto.

Nella colonna B della Fig. 10 sono riportate immagini delle colture cellulari in cui è stato testato il composto **22**. A concentrazioni pari a 1 μM e 10 μM le cellule si presentano sane e la proliferazione cellulare non è inibita dal composto saggiato. A 50 μM il composto risulta essere tossico evidenziando un cambiamento morfologico della coltura cellulare con poche cellule adese e un numero cospicuo di cellule morte. A 100 μM il composto risulta essere altamente tossico, dall'immagine riportata nel pannello non si possono osservare cellule adese e la proliferazione cellulare risulta essere quasi totalmente inibita dal composto **22**.

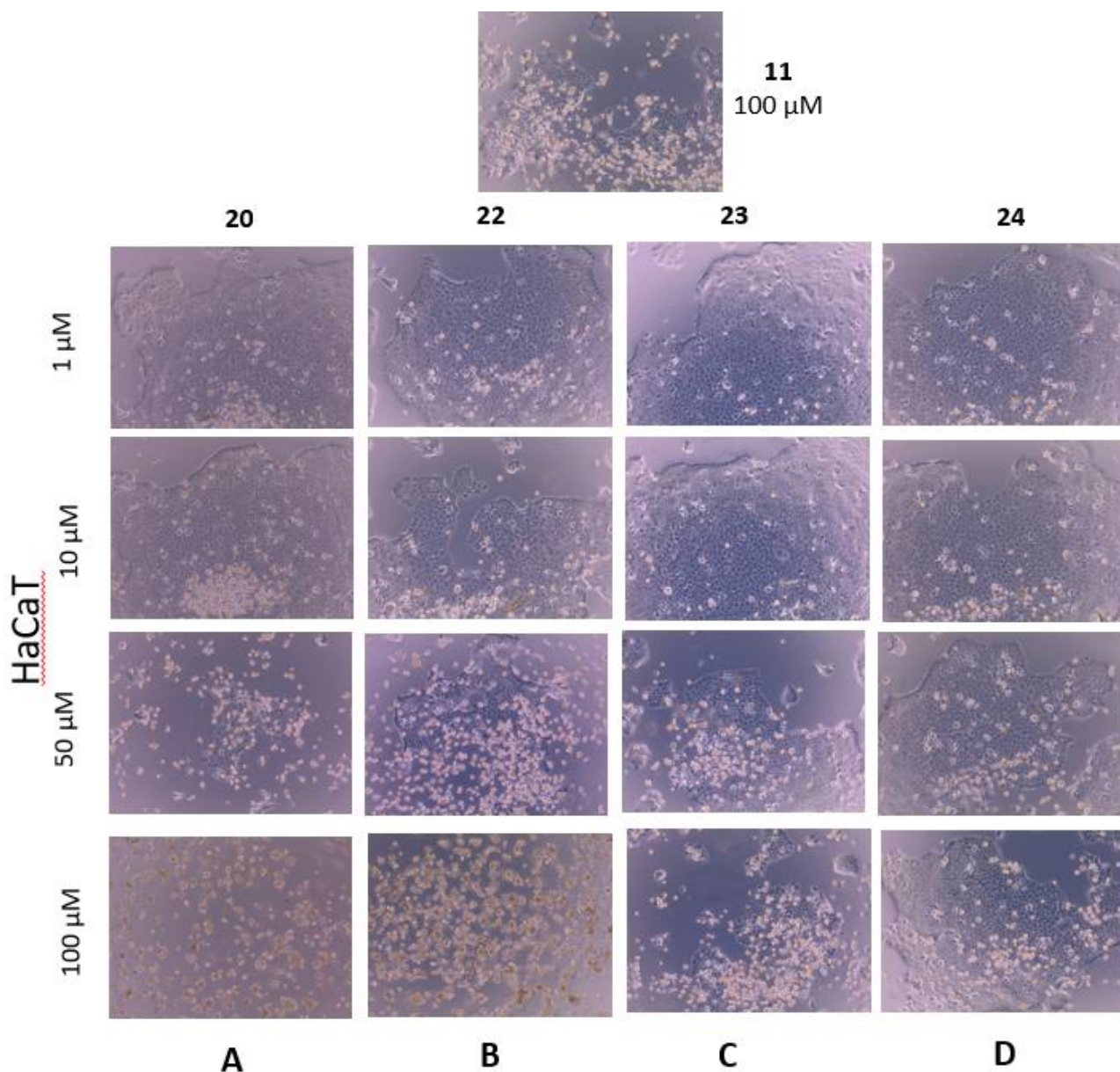


Fig. 10 In figura sono riportate fotografie delle colture cellulari di cheratinociti di linea (HaCat-ATCC) utilizzate per valutare la tossicità di tutti i composti sintetizzati con modificazione strutturale del composto 11. Queste immagini sono state acquisite in microscopia a contrasto di fase ad ingrandimento 10x.

Nella colonna C sono riportate le immagini delle colture cellulari in cui è stata valutata la citotossicità del composto **23**. A concentrazioni pari a 1 μM e 10 μM la proliferazione cellulare non risulta essere inibita, si possono osservare “isole” di grandi dimensioni composte da cellule sane. A 50 μM si possono osservare un maggior numero di corpi necrotici rispetto alle concentrazioni minori, ma comunque vi sono molte cellule adese a formare una grande “isola”. Nell’immagine riportante la coltura cellulare in cui è stato testato il composto **23** a 100 μM le cellule sono in sofferenza evidenziando la tossicità del composto. Nella colonna D sono riportate le immagini delle colture cellulari in cui è stata valutata la citotossicità del composto **24**. A concentrazioni pari a 1 μM e 10

μM la proliferazione cellulare non risulta essere inibita, si possono osservare “isole” di grandi dimensioni composte da cellule sane. A $50 \mu\text{M}$ non si mettono in evidenza segni di tossicità da parte del composto saggiato, le cellule sono sane e proliferanti. A $100 \mu\text{M}$ la coltura cellulare presenta una maggiore sofferenza rispetto alle concentrazioni minori, vi sono un maggior numero di corpi necrotici e la proliferazione cellulare risulta essere maggiormente inibita.

In Fig. 9 e Fig. 10 sono riportati due pannelli di immagini rappresentative della morfologia delle cellule sottoposte a trattamento con i vari composti testati prima di effettuare il test dell'MTT a 24 ore di trattamento. Si può osservare un cambiamento morfologico delle colture cellulari su cui sono stati testati i composti presi in esame.

Nel controllo le cellule sono ben adese ed organizzate in isole, disposizione tipica di questa linea cellulare; questa morfologia non evidenzia modificazioni, che sarebbero un indice di sofferenza, nei controlli in DMSO alle varie % testate.

In tutte le colture cellulari, i composti testati a concentrazioni pari a $100 \mu\text{M}$ si sono dimostrati tossici, dato poi confermato con il test MTT, ma già dalla valutazione morfologica si può notare come microscopicamente le colture cellulari mostrano scarsa adesione, con cellule tondeggianti non adese e luminescenti rispetto ad una scarsa popolazione cellulare vitale in adesione in piastra, riconoscibile per l'aspetto descritto per i controlli. È particolarmente visibile per i composti **20** e **22** dove il rapporto cellule morte/vive risulta fortemente sbilanciato a favore di quelle morte dimostrando così la forte tossicità di questi composti. A parità di concentrazione ($100 \mu\text{M}$) i composti **23** e **24** mostrano un minor numero di corpi necrotici rispetto ai composti **20** e **22** e quindi minor tossicità.

Tutte le colture cellulari contenenti i composti a una concentrazione pari a $50 \mu\text{M}$ presentano una vitalità maggiore rispetto a quelle aventi i composti a $100 \mu\text{M}$. In particolare, per le colture contenenti i composti **11**, **23** e **24**, la crescita cellulare non risulta essere inibita mostrando morfologia confrontabile al controllo. A parità di concentrazione, invece, le colture cellulari in cui sono stati inoculati i composti **20** e **22** presentano un cospicuo numero di cheratinociti morti confermando l'elevata tossicità riscontrata in presenza dei composti alla concentrazione maggiore.

In tutte le colture cellulari, contenenti composti testati a concentrazioni tra $1 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, sono visibili un minor numero di corpi necrotici e la crescita cellulare non è inibita da nessuno dei composti saggiati.

In Fig. 11, 12 e 13 sono riportati i dati di assorbanza dell'MTT cellulare eluito da cellule trattate con tutti i campioni precedentemente descritti e permette di ottenere una quantificazione della vitalità cellulare ed indirettamente della tossicità di ogni singolo composto.

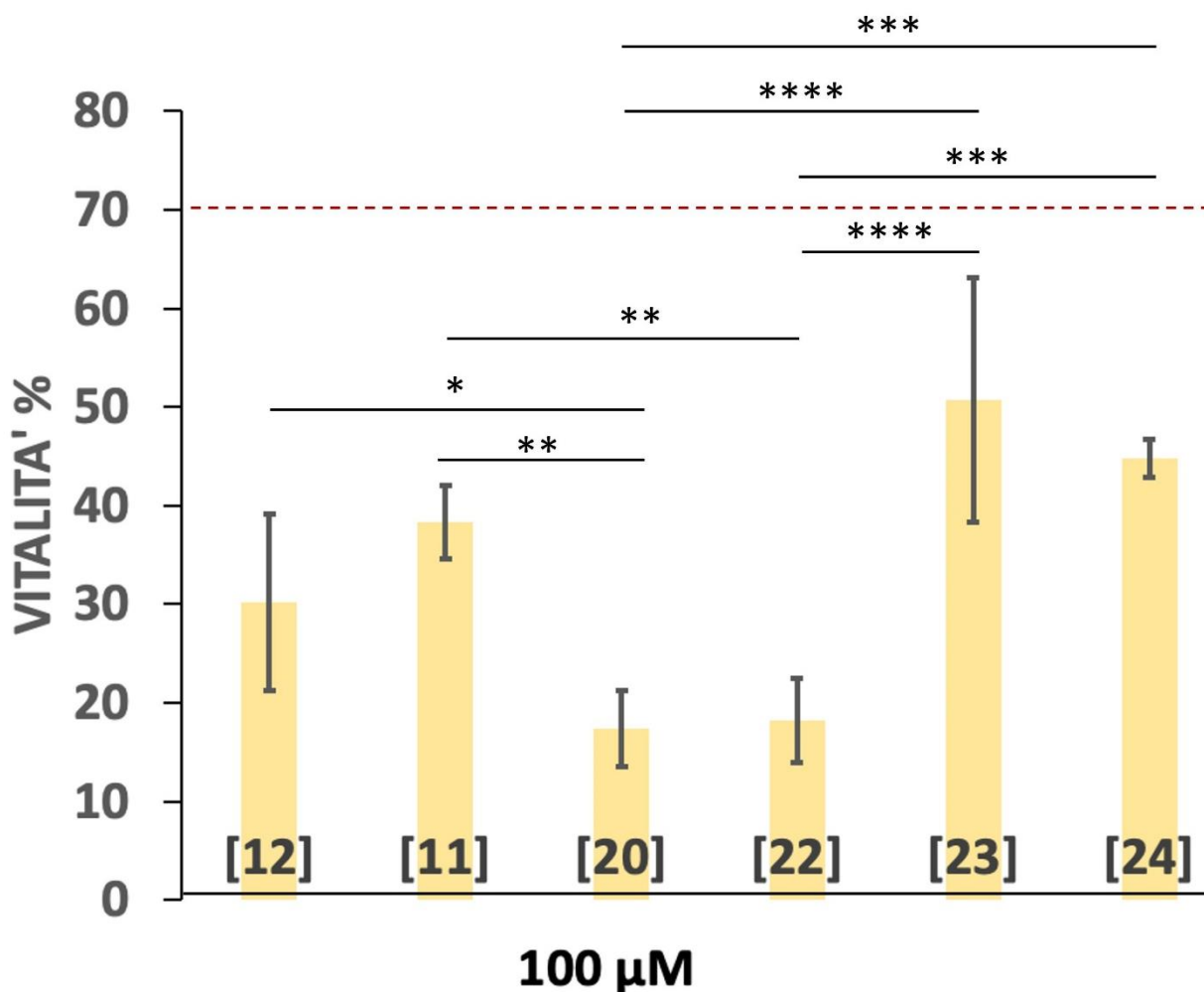


Fig. 11 In questo istogramma sono riportate le % di vitalità dei composti testati su cheratinociti di linea (HaCat-ATCC) in presenza dei composti testati utilizzati alla concentrazione pari a 100 µM.

Analisi statistica One-Way ANOVA, Tukey Test \pm deviazione standard. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Confrontando i due poliacetileni di partenza a concentrazione pari a 100 µM, falcarindiolo (**12**) risulta essere più tossico di falcarinolo (**11**) con una vitalità % rispettivamente pari a 30,22% e 38,32% ma senza evidenziare differenze statisticamente significative.

È possibile osservare come tutti i composti testati derivati dal falcarinolo (**11**), alla concentrazione più alta, pari a 100 µM (Fig. 11), siano citotossici con valori di vitalità inferiori al 70% seppur con alcune differenze. È possibile osservare che con l'aggiunta di una porzione amminica con struttura ciclica al falcarinolo (**11**) di partenza (composti **23** e **24**) si può avere una riduzione della citotossicità, seppur senza significatività statistica, vista come incremento di vitalità anche alla concentrazione più elevata. I composti **23** e **24** infatti rispetto al composto di partenza (**11**), alla concentrazione pari a 100 µM hanno mostrato una % di vitalità rispettivamente del 50% e del 44%. L'aggiunta invece di una porzione amminica alifatica (composti **20** e **22**) porta a una riduzione statisticamente significativa con $p < 0,01$ della vitalità % come evidenziato in Fig. 11. Prendendo in considerazione più nel dettaglio

i composti **20** e **22**, alla concentrazione pari a 100 μM si denota una percentuale di vitalità approssimativamente simile.

Il composto **20** risulta essere il più tossico tra i composti saggiati essendo quello con la vitalità % più bassa (17,39%). Anche il composto **22** mostra una spiccata tossicità paragonabile al composto **20** e per entrambi la tossicità è confermata dalla morfologia cellulare riportata in Fig. 10. I composti **23** e **24** a cui è stata aggiunta una porzione amminica ciclica sono quelli che presentano a questa concentrazione (100 μM) la minor tossicità avendo mostrato rispettivamente una vitalità % del 50,71% e 44,78%. Facendo un confronto tra i dati quantitativi ottenuti per i composti **23** e **24** e le immagini acquisite dalle colture cellulari contenenti questi composti (Fig. 10), il composto **23** non porta a un incremento di vitalità rispetto al composto di partenza **11**. Il composto **24** come riportato da Fig. 10 ha invece portato a un incremento di vitalità cellulare. L'immagine acquisita dei cheratinociti trattati con il composto **24** non rispecchia però il resto della morfologia della coltura cellulare.

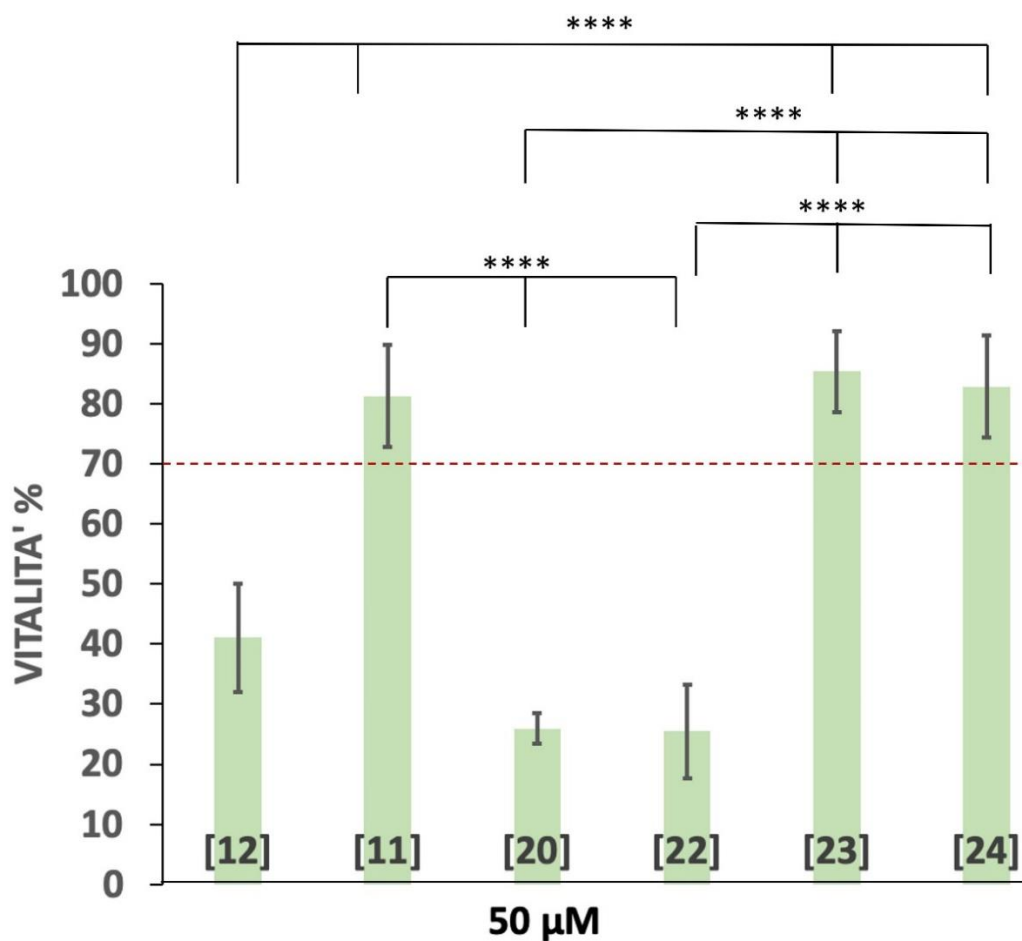


Fig. 12 In questo istogramma sono riportate le % di vitalità dei composti testati su cheratinociti di linea (HaCat-ATCC) alla concentrazione pari a 50 μM .

Analisi statistica One-Way ANOVA, Tukey Test \pm deviazione standard. **** $p < 0,0001$.

Confrontando i due poliacetileni di partenza il falcarindiolo (**12**) risulta essere molto più tossico di falcarinolo (**11**). Mentre a 100 μM la % di vitalità tra i due composti presenta valori simili, alla concentrazione di 50 μM il composto **12** è spiccatamente più tossico con una vitalità % del 41,08%. Tra i due poliacetileni isolati è emerso infatti che, a parità di concentrazione (50 μM), falcarindiolo (**12**) risulta essere molto più tossico di falcarinolo (**11**) (Fig. 12) con un valore di vitalità % quasi dimezzato rispetto al composto **11** rispettivamente del 41% e 81%.

Il composto **11** non risulta essere citotossico a questa concentrazione (Fig. 12), dato che la % di vitalità è maggiore del 70%. I composti **23** e **24** testati a 50 μM , hanno mostrato una % di vitalità tra loro molto simile rispettivamente del 85% e del 82% confermando quanto riportato dall'analisi morfologica riportata in Fig. 10. A parità di concentrazione per i composti **20** e **22** si denota una % di vitalità che si pone essere per entrambi intorno al 25% confermando la morfologia cellulare riportata precedentemente in Fig. 10.

I cheratinociti trattati con i composti alle concentrazioni di 10 μM e 1 μM presentano un'elevata vitalità % mostrata in Fig. 13, confermando l'assenza di tossicità evidenziata morfologicamente in Fig. 10 e Fig. 9. A entrambe le concentrazioni è confermata la maggiore tossicità del composto **12** rispetto al composto **11**. A queste concentrazioni tutti i composti non possono essere considerati tossici essendo la vitalità % maggiore del 70%. Facendo un raffronto tra i due poliacetileni di partenza la maggiore tossicità di falcarindiolo (**12**) rispetto a falcarinolo (**11**) è confermata anche a queste concentrazioni con una vitalità % di 83,63% rispetto a 96,24%.

Tutti gli analoghi semisintetici ottenuti a partire da **11** a queste concentrazioni hanno confermato le valutazioni morfologiche fatte in Fig. 10 mostrando una vitalità cellulare in alcuni casi superiore al 100%. A concentrazione 10 μM solo i composti **22** e **24** hanno avuto valori di vitalità inferiori, rispettivamente del 76,68% e 85,21%.

Facendo un raffronto tra la vitalità % dei composti **20** e **22** a cui è stata aggiunta una porzione alifatica, è possibile evidenziare che il composto **22** risulta essere più tossico con una % di vitalità pari a 76,68% rispetto al 100,96% del composto **20**. A parità di concentrazione i composti **23** e **24** non sono tossici manifestando una % di vitalità maggiore del 70%.

I composti **11**, **20**, **22**, **23** e **24** alla concentrazione pari a 1 μM mostrano una % di vitalità maggiore del 100% (Fig. 13). Questo risultato potrebbe far pensare che questi composti a tale concentrazione possano stimolare la proliferazione cellulare; per poter confermare questa ipotesi sarebbero necessari studi più approfonditi, che non erano obiettivo di questo progetto di tesi ma potrebbero essere uno sbocco sperimentale futuro.

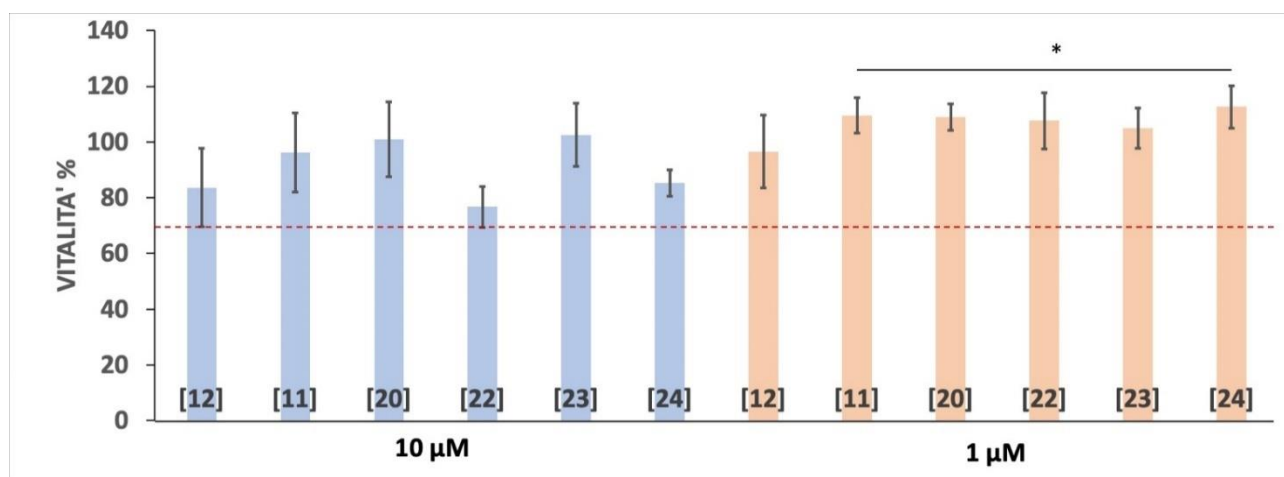


Fig. 13 In questo istogramma sono riportate le % di vitalità dei composti testati su cheratinociti di linea (HaCat-ATCC) utilizzati alle concentrazioni di 10 µM e 1 µM.

Analisi statistica One-Way ANOVA, Tukey Test ± deviazione standard. * $p < 0,05$.

In conclusione, in seguito ai risultati ottenuti sui cheratinociti, i dati hanno mostrato una citotossicità dose dipendente per tutti i campioni testati. Le modifiche chimiche effettuate per ottenere i composti **20** e **22** non sono state efficaci perché hanno prodotto dei composti più citotossici del composto di partenza (**11**). L'aggiunta di un gruppo ciclico, invece, ha portato alla formazione di composti (**23** e **24**) che presentano una minore tossicità sui cheratinociti.

3.4 Valutazione dell'attività antibatterica e antifungina di falcarinolo, falcarindiolo, analoghi semi-sintetici e estratti primari di parti aeree e radici di *Iberis amara* L.

Questo lavoro di tesi è terminato con la valutazione dell'efficacia antibatterica e antifungina dei due poliacetileni di partenza (falcarinolo (**11**) e falcarindiolo (**12**)), dei composti semi-sintetici ottenuti a partire da **11** (**20**, **22**, **23**, **24**) e degli estratti primari ottenuti inizialmente da *Iberis amara* L.

Mediante la misurazione dell'attività metabolica cellulare tramite il saggio colorimetrico del MTT, è stato possibile valutare l'eventuale efficacia antibatterica e antifungina dei composti su cellule planctoniche dei ceppi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231 in seguito a incubazione di 24 ore.

Falcarinolo (**11**), falcarindiolo (**12**) e i composti semi-sintetici sono stati testati a concentrazioni pari a 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M e 50 μ M. Gli estratti primari, invece, sono stati saggiati a concentrazioni pari a 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M poiché fitocomplessi e quindi composti per i quali è necessaria una concentrazione maggiore per poterne osservare attività biologica. Le concentrazioni utilizzate sono state stabilite a partire dai risultati di citotossicità ottenuti precedentemente dal laboratorio della Prof.ssa Bosetti; a concentrazioni pari o inferiori a 50 μ M, la vitalità cellulare dei cheratinociti è maggiore del 70%, valore ritenuto accettabile secondo la normativa normalmente seguita per i test di biocompatibilità [Standardization IOF. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In vitro Cytotoxicity. ISO: Geneva, Switzerland. 2009].

L'attività antimicrobica è stata valutata tramite il saggio della microdiluizione in brodo, in cui i ceppi indicatori sono stati co-incubati con differenti concentrazioni dei composti da testare per 24 ore a 37 °C in statica. Al termine delle 24 ore, è stata valutata l'attività metabolica dei ceppi testati.

L'attività antibatterica e antifungina dei poliacetileni è riportata in letteratura. Per questo lavoro di tesi ci si è affidati a precedenti studi in cui falcarinolo (**11**) estratto da *Daucus carota* e *Brassica oleracea* è stato saggiato su *E. coli* e *S. aureus* (Hinds *et al.*, 2017). Nello studio di Hinds *et al.* (2017), il falcarinolo (**11**) presenta su *S. aureus* una MIC pari a 18,80 μ g/mL. Il composto non ha però manifestato attività biologica nei confronti del ceppo di *E. coli*. Gli autori ipotizzano che l'assenza di attività antibatterica, può essere causata dall'utilizzo di ceppi di *E. coli* differenti rispetto a quelli utilizzati in altri studi (Hinds *et al.*, 2017; Kobaisy *et al.*, 1997)

Nello studio di Kobaisky et al. (1997), i due poliacetileni sono stati saggiati su *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* dimostrando che falcarinolo (**11**) presentava rispettivamente una MIC di 6,25 µg/mL, 3,10 µg/mL e 6,25 µg/mL, mentre il falcarindiolo (**12**) presentava una MIC di 25,00 µg/mL per tutti e tre i ceppi studiati (Kobaisy et al, 1997).

I dati ottenuti in questo studio non hanno potuto confermare quanto riportato precedentemente in letteratura. L'assenza di bioattività dei prodotti testati può essere attribuibile all'elevata instabilità chimica dei composti poliacetilenici alla luce (Dawid et al., 2015), che può portare a prodotti di polimerizzazione o ossidazione. Anche se le molecole sono state ben purificate e conservate correttamente, probabilmente essendo trascorse alcune settimane tra la fase di sintesi e il saggio biologico, non è stato possibile inibire tali processi di degradazione rendendo i composti biologicamente inattivi. In futuro sarebbe interessante valutare l'introduzione di conservanti compatibili (ad esempio un antiossidante) con le linee cellulari al fine di prolungarne l'attività.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

L'obiettivo di questo progetto di tesi è stato quello di delineare il profilo fitochimico delle foglie e radici di *Iberis amara* L., isolare i composti di maggiore interesse e ottenere degli analoghi semi-sintetici valutandone infine l'attività sia su cellula eucariote sia su cellule procariote.

L'analisi fitochimica ha permesso di identificare un nuovo lignano, tanetina, falcarinolo e falcarindiolo. A partire dagli ultimi due composti si è poi focalizzata l'attenzione del progetto isolando le molecole da uno scarto industriale ed ottenendo dei derivati semi-sintetici ispirandosi all'anandamide. Di questi derivati e dei composti originali è stata valutata l'attività biologica. Attraverso test di citotossicità, utilizzando cheratinociti di linea (HaCat-ATCC) come modello cellulare, è stato possibile osservare che tutti i composti a concentrazioni pari a 100 μ M si sono dimostrati citotossici. A concentrazioni pari a 50 μ M solo i composti **12**, **20** e **22** hanno espresso una vitalità % minore del 70% quindi non accettabile per l'utilizzo con cellule eucariote mentre i composti **11**, **24** e **25**, a pari concentrazioni, non si sono dimostrati tossici. Tutti i composti testati alle concentrazioni minori non sono risultati con inibizione di vitalità cellulare tale da ritenerli citotossici con le cellule eucariote.

Le stesse molecole, infine, sono state testate su *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* per poterne verificare l'attività antimicrobica. Tutti i composti si sono dimostrati essere biologicamente inattivi su tutti i ceppi presi in considerazione. L'inefficacia dei composti, a partire da quelli di partenza, noti per inibire la crescita microbica, può essere attribuibile ai seguenti fattori: alla loro difficoltà di solubilizzazione in DMSO, alla foto-instabilità che hanno portato all'ossidazione del carbonio α dei legami multipli, alla modificazione semi-sintetica.

In ottica futura, un possibile proseguimento di questo lavoro di tesi, può includere la scelta di un solvente adeguato per ottenere maggior solubilità dei composti ed un possibile studio di strategie per incrementare la stabilità.

5. Parte sperimentale

5.1 Caratterizzazione parti aeree *Iberis amara* L.

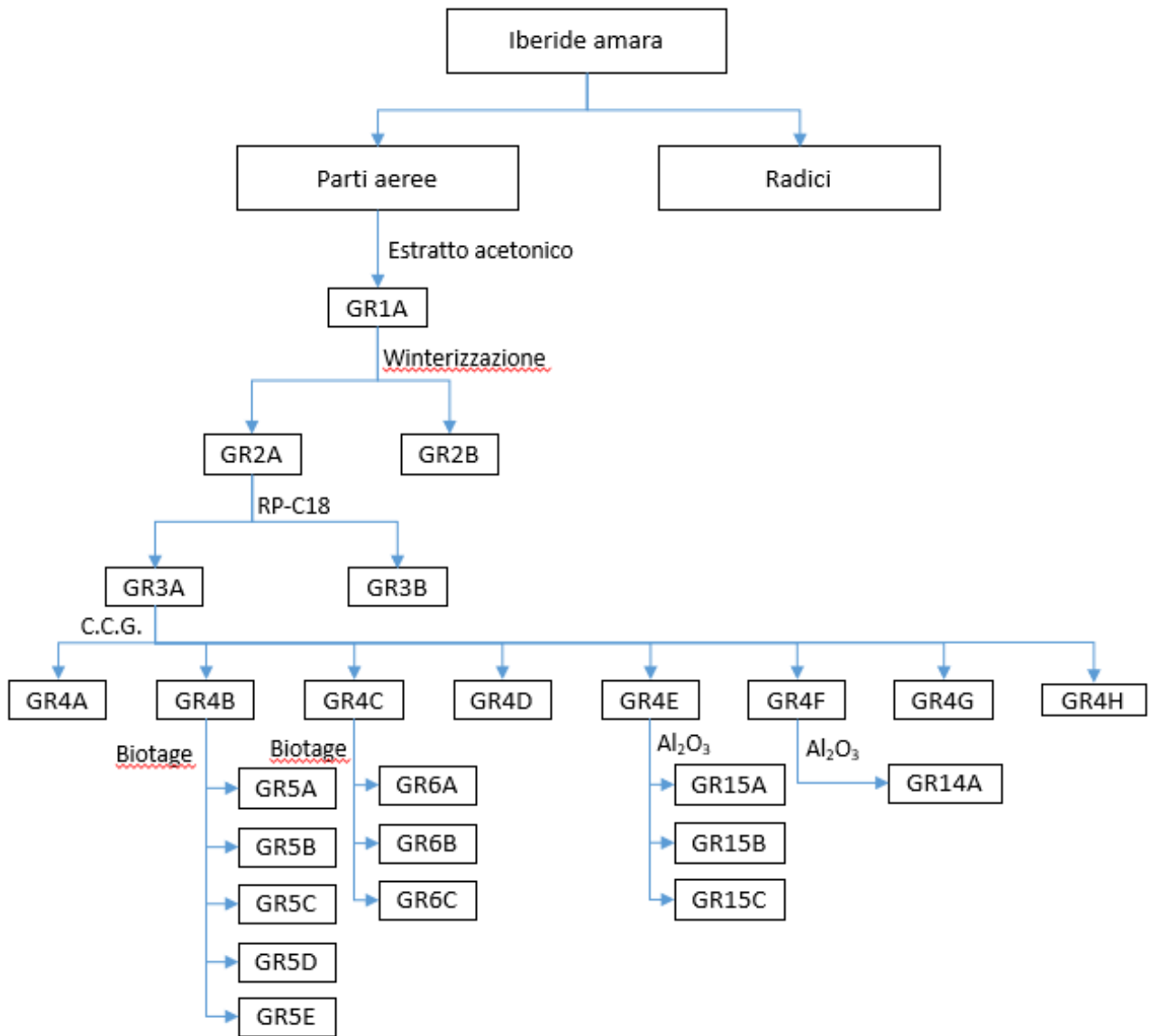


Grafico caratterizzazione *I.amara* L. parti aeree

5.1.1 Ottenimento estratto acetonicoprincipale

Materiale e vetreria: percolatore, vetreria standard.

Procedimento: 149,51 g di parti aeree di *Iberis amara* vengono posti in percolatore verticale in acciaio inox ed estratti con acetone (droga/solvente p/V 1:10, 2 estrazioni per 12 h). Il materiale vegetale è poi filtrato ed il soluto è evaporato tramite evaporazione a pressione ridotta, si ottiene un estratto oleoso di colore verde GR1A 1,56 g (R=1%).

5.1.2 Winterizzazione di GR1A

Scopo: eliminazione di grassi saturi e cere per prevenire l'ossidazione radicalica e semplificare la purificazione.

Materiale e vetreria: pallone da 100,00 mL, imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtro di carta, pompa a vuoto, celite, metanolo.

Procedimento: 1,56 g di GR1A è sciolto in un pallone da 50 mL a 45 °C in 15,00 mL di MeOH (1:10 p/V) fino a completa dissoluzione, si lascia raffreddare a RT e si ripone in freezer (t=-8 °C) per 12 h al termine delle quali si filtra a vuoto su un letto di celite in un imbuto dotato di setto sinterizzato protetto da filtro di carta. Si ottiene un surnatante GR2A 1,14 g e una frazione solida GR2B 559,60 mg in cui sono presenti cere, acidi grassi saturi e trigliceridi.

5.1.3 Filtrazione su RP C-18 di GR2A

Scopo: rimozione acidi grassi insaturi e clorofille

Procedimento: GR2A viene filtrato a vuoto su un letto di RP C-18 (rapporto 1:3) in un imbuto dotato di setto sinterizzato con MeOH, segue evaporazione a rotavapor ottenendo GR3A 948,90 mg.

Successivamente si lava la fase stazionaria con THF per eliminare eventuali residui e si ottiene GR3B il cui peso a secco è di 53,00 mg.

5.1.4 Colonna cromatografica a gravimetria di prima generazione di GR3A

Scopo: frazionare il campione per procedere con ulteriore isolamento dei metaboliti.

Carico: GR3A in polverino di silice, fase stazionaria: 50,00 mL di silice gel, eluente: 8/2 Pe/EtOAc a gradiente

Sigle	Provette	Eluente	UV	Q.tà	Note
GR4A	2-3	8/2	-	121,70 mg	Falcarindiolo (12) R= 0,08% g/g
GR4B	4-8	8/2	+	97,00 mg	Biotage RP C-18
GR4C	9-11	8/2	+	112,70 mg	Biotage RP C-18
GR4D	12-16	7/3	+/-	294,20 mg	Triterpene
GR4E	17-26	7/3	+/-	225,70 mg	C.C.G. su Al ₂ O ₃
GR4F	27-33	6/4	+/-	589,30 mg	C.C.G. su Al ₂ O ₃
GR4G	34-40	4/6	+	35,90 mg	Miscela complessa di flavoni
GR4H	40-75	0/10	+/-	141,40 mg	Miscela complessa di flavoni

4.1.5 Biotage su frazione GR4B

Scopo: purificazione per flash cromatografia RP C-18.

Strumenti: Biotage Isolera

Campione: GR4B 97,00 mg

Tipo di colonna: SNAP C-18 12,00 g

Solvente A: H₂O + 0,30% acido formico, B: MeOH + 0,30% acido formico

Metodo: a gradiente

Volume frazioni: 15,00 mL

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

CV	Solvente A%	Solvente B%
0-3	20	80
3-12	0	100
12-18	0	100

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	UV	Q.tà	Note
GR5A	+	6,90 mg	OUT
GR5B	+	3,20 mg	Ftalato + acido grasso
GR5C	+	3,40 mg	Acido grasso
GR5D	+	6,50 mg	Flavonoide (16) R= 0,01% g/g
GR5E	+	3,20 mg	OUT

5.1.6 Biotage su frazione GR4C

Scopo: purificazione per flash cromatografia RP C-18

Strumenti: Biotage Isolera

Campione: GR4C 112,70 mg

Tipo di colonna: SNAP C-18 12,00 g

Solvente A: H₂O + 0,30% acido formico, B: MeOH + 0,30% acido formico

Metodo: a gradiente

Volume frazioni: 15,00 mL

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

CV	Solvente A%	Solvente B%
0-3	20	80
3-13	0	100
13-18	0	100

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	UV	Q.tà	Note
GR6A	-	4,10 mg	Acido grasso
GR6B	-	17,90 mg	Acido grasso
GR6C	+	39,90 mg	Acido grasso

5.1.7 Colonna cromatografica a gravimetria di seconda generazione di GR4E

Scopo: frazionare il campione per procedere con ulteriore isolamento dei metaboliti.

Carico: GR4E (225,70 mg) in polverino di silice, fase stazionaria: 20,00 mL di Al₂O₃, eluente: 8/2 Pe/EtOAc.

Sigle	Provette	Eluente	UV	Q.tà	Note
GR15A	3-4	8/2	+	13,70 mg	Dimetossiderivato R= 0,01%
GR15B	5-8	8/2	-	18,70 mg	Triterpene R= 0,01%
GR15C	9-10	8/2	+/-	1,40 mg	OUT

5.1.8 Colonna cromatografica a gravimetria di seconda generazione di GR4E

Scopo: frazionare il campione per procedere con ulteriore isolamento dei metaboliti.

Carico: GR4F (589,30 mg) in polverino di silice, fase stazionaria: circa 40,00 mL di Al₂O₃, eluente di partenza: 8/2 Pe/EtOAc gradiente 6/4.

Sigle	Provette	Eluente	UV	Q.tà	Note
GR14A	17-21	7/3 e 6/4	+	50,70 mg	Tanetina (16) R= 0,34%

5.2 Caratterizzazione radici *Iberis amara* L.

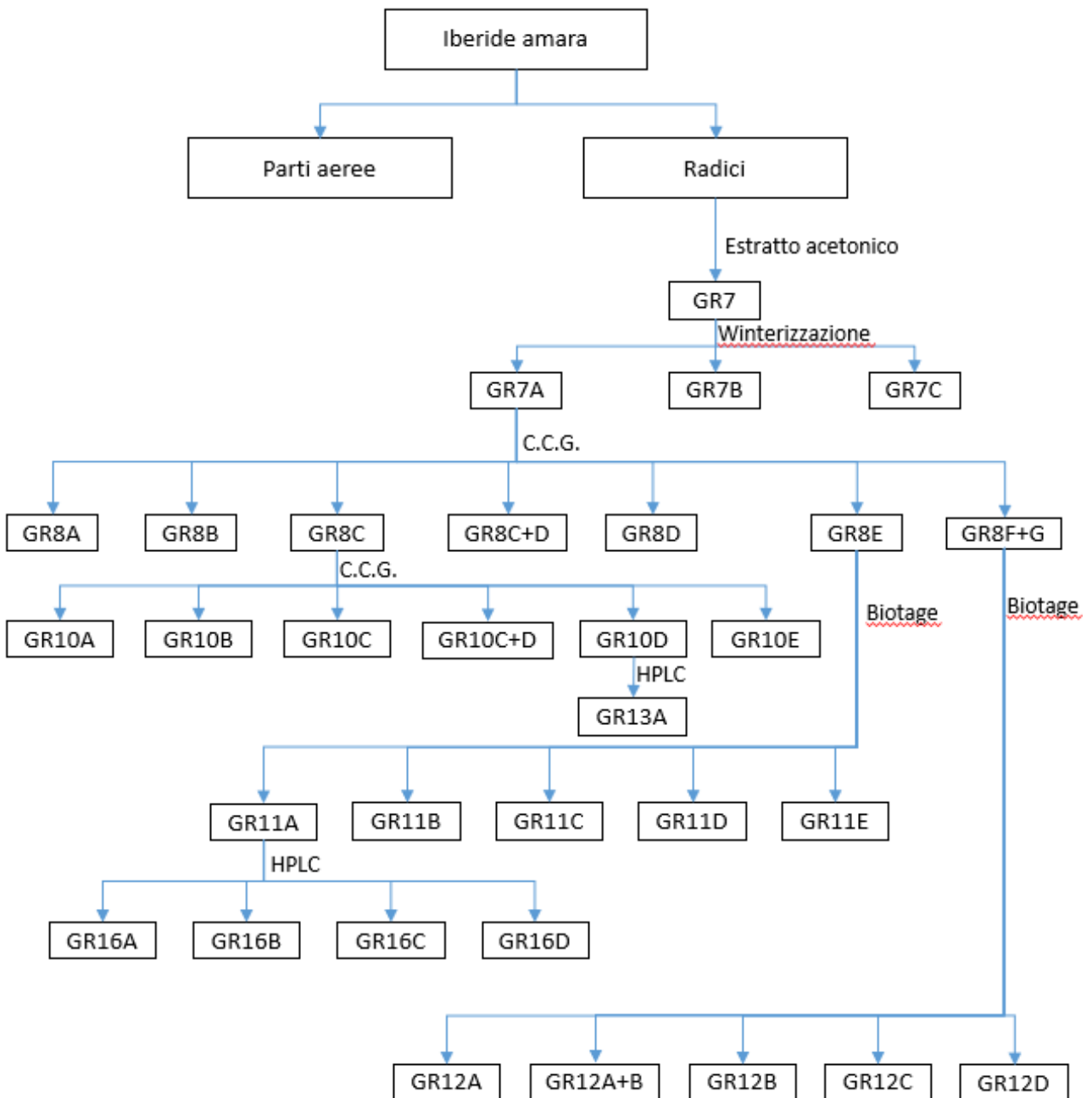


Grafico caratterizzazione *I. amara* L. radici

5.2.1 Estratto acetonicoprincipario di radici di *Iberis amara* L.

Materiale: bottiglia PET 1 L.

Procedimento: 94,29 g di radici, precedentemente essiccate e tritate si pongono in bottiglia PET con acetone (droga/solvente 1:10 p/V, 2 estrazioni da 12 h), successivamente si filtra su filtro sinterizzato per rimuovere il materiale vegetale. Segue concentrazione a rotavapor in un pallone da 2 L e si ottiene un estratto acetonicoprincipario di 3,92 g (GR7 R 4,36%) dal colore rosso-arancio e dalla consistenza oleosa.

5.2.2 Winterizzazione di GR7

Scopo: eliminazione di grassi e cere per prevenire l'ossidazione radicalica e semplificare la purificazione.

Materiale e vetreria: pallone da 100 mL, imbuto dotato di setto sinterizzato e raccordo per pompa a vuoto, filtro di carta, pompa a vuoto, celite, metanolo.

Procedimento: 3,92 g di GR7 è sciolto in un pallone da 50 mL a 45 °C in 30,00 mL di MeOH (1:10 p/V) fino a completa dissoluzione, si lascia raffreddare e si ripone in freezer (t = -8 °C) per 12h al termine delle quali si nota la formazione di un corpo di fondo. Si filtra a vuoto su un letto di celite in un imbuto dotato di setto sinterizzato protetto da filtro di carta. Si ottiene un filtrato GR7A 3,29 g dal colore nero-violaceo e dalla consistenza oleosa e una frazione solida GR7B 155,00 mg dal colore arancio in cui sono presenti cere, acidi grassi saturi e trigliceridi. Si ottiene, inoltre un precipitato GR7C 13,50 mg che non si è solubilizzato in MeOH prima dell'inserimento in freezer per cui filtrato.

5.2.3 Colonna cromatografica a gravimetria di prima generazione di GR7A

Scopo: frazionare il campione per procedere con ulteriore isolamento dei metaboliti.

Materiale: provette da 20 mL

Carico: GR7A 3,29 g in polverino di silice, fase stazionaria: 200,00 mL di silice gel, eluente: 9/1 Pe/EtOAc gradiente 0/10.

Sigle	Provette	Eluente	UV	Q.tà	Note
GR8A	3-10	9/1	+/-	61,10 mg	Trigliceridi + flavonoidi
GR8B	12-18	8/2	+	84,60 mg	Tanetina

GR8C	18-23	8/2	+/-	385,00 mg	C.C.G GR10
GR8C+D	22-26	8/2	+/-	94,30 mg	Tracce falcarindiolo (12)
GR8D	27-35	7/3	+	162,50 mg	Falcarindiolo (12) impuro
GR8E	35-45	6/4	+/-	424,20 mg	Biotage RP C-18
GR8F	45-55	6/4	+/-	1,40 g	Biotage RP C-18
GR8G	55-70	2/8-0/10	+/-	847,70 mg	Unito a GR8F

5.2.4 Colonna cromatografica a gravimetria di seconda generazione di GR8C

Scopo: frazionare il campione per procedere con ulteriore isolamento dei metaboliti.

Materiale: provette da 10 mL

Carico: GR8C 385,00 mg in polverino di silice, fase stazionaria: 20,00 mL di silice gel, eluente: 9/1 Pe/EtOAc gradiente 7/3.

Sigle	Provette	Eluente	UV	Q.tà	Note
GR10A	7-9	9/1	+/-	7,60 mg	OUT
GR10B	11-13	9/1	+/-	13,20 mg	OUT
GR10C	17	8/2	+/-	30,00 mg	OUT
GR10C+D	18	8/2	+/-	36,70 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR10D	19-22	8/2	+/-	86,70 mg	HPLC
GR10E	22-34	8/2 e 7/3	+/-	24,10 mg	OUT

5.2.5 Biotage su frazione GR8E

Scopo: purificazione per flash cromatografia RP C-18

Strumenti: Biotage Isolera

Campione: GR8E 424,20 mg

Tipo di colonna: SNAP C-18 12g

Solvente A: H₂O + 0,30% acido formico, B: MeOH + 0,30% acido formico

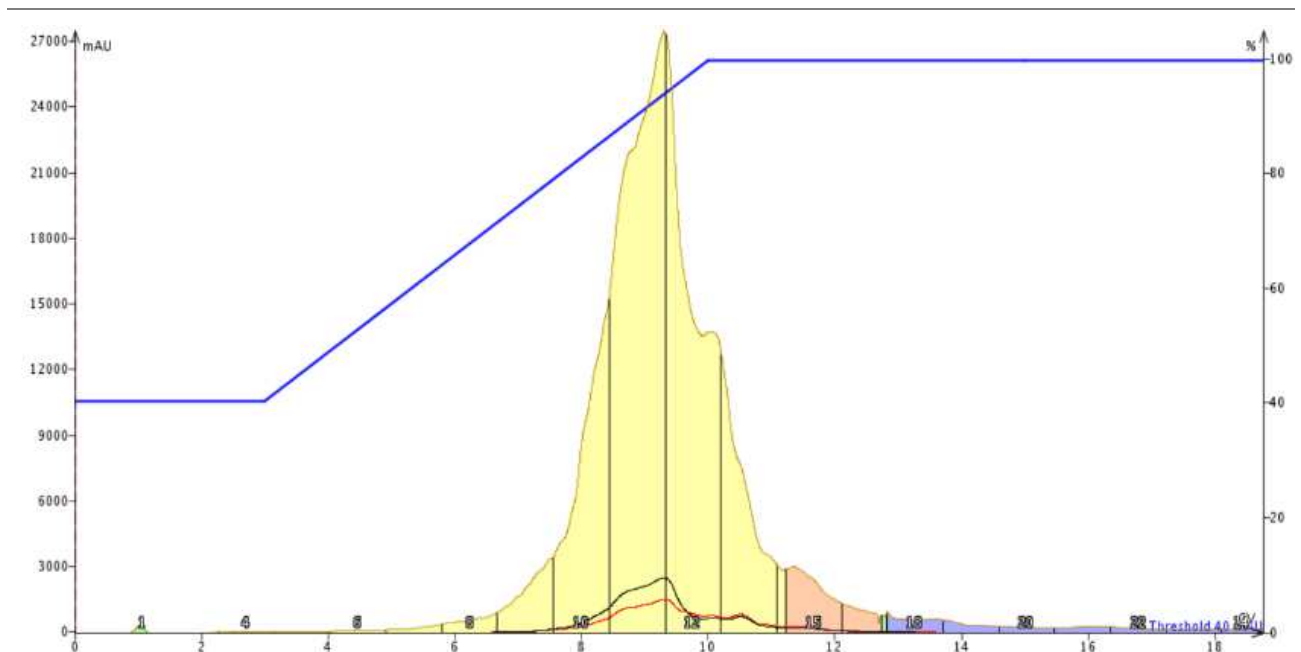
Metodo: a gradiente

Volume frazioni: 15,00 mL

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

CV	Solvente A%	Solvente B%
0-3	20	80
3-10	0	100
10-18	0	100



Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	UV	Q.tà	Note
GR11A	+/-	186,00 mg	HPLC
GR11B	+/-	28,10 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR11C	+/-	37,20 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR11D	+/-	37,10 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR11E	+/-	38,10 mg	Miscela di fenoli inseparabili

5.2.6 Biotage su frazione GR8F

Scopo: purificazione per flash cromatografia RP C-18

Strumenti: Biotage Isolera

Campione: GR8F 2,25 g (due iniezioni)

Tipo di colonna: SNAP C-18 12,00g

Solvente A: H₂O + 0,30% acido formico, B: MeOH + 0,30% acido formico

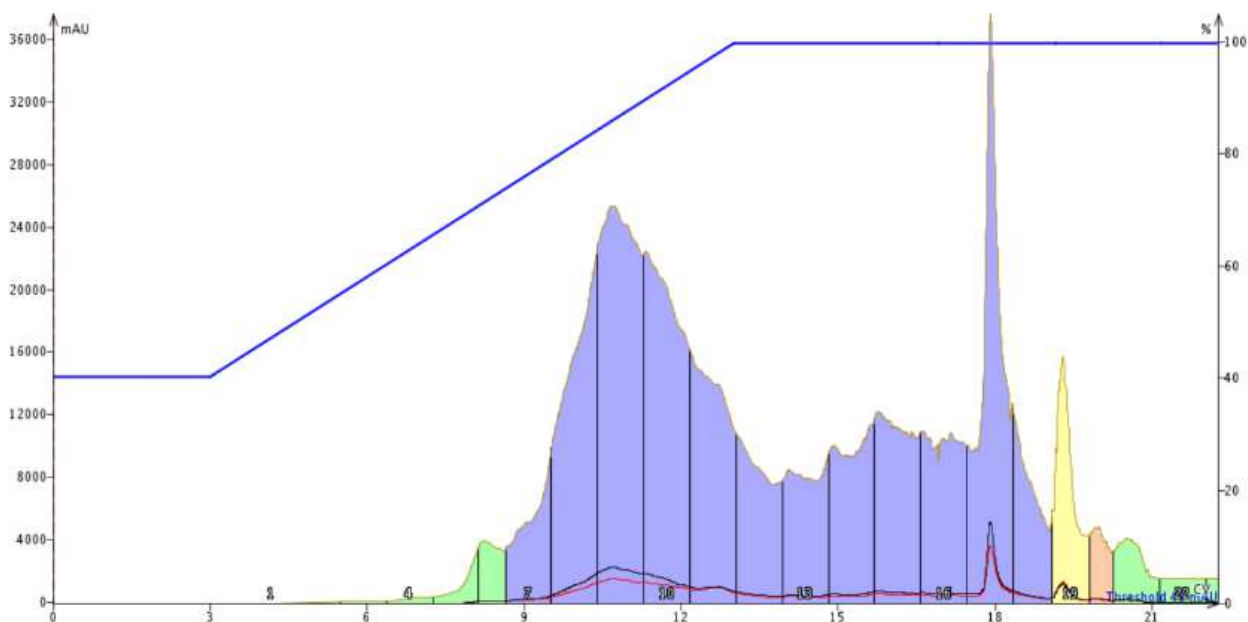
Metodo: a gradiente

Volume frazioni: 15,00 mL

Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm (rosso), UV 280 nm (nero), λ -all (marrone)

CV	Solvente A%	Solvente B%
0-3	20	80
3-13	0	100
13-21	0	100



Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	UV	Q.tà	Note
GR12A	+/-	350,00 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR12A+B	+/-	318,00 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR12B	+/-	59,60 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR12C	+/-	99,30 mg	Miscela di fenoli inseparabili
GR12D	+/-	90,70 mg	Miscela di fenoli inseparabili

5.2.7 HPLC GR10D

Si purifica campione GR10D (86,70 mg) per HPLC.

Tipo colonna: Hichrom, 250 x 25 silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

Velocità di flusso: 6mL/min

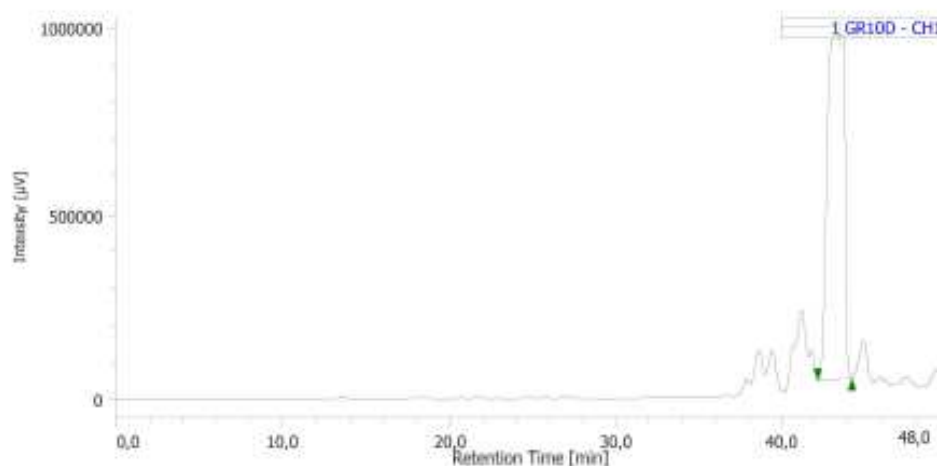
Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 86,7 mg di GR10D in 1 mL di Pe/EtOAc 9:1

Tempo min	Solvente A %	Solvente B %
0-15	90	10
15-30	80	20
30-50	80	20

Chromatogram



Si ottiene:

Sigla	Quantità	UV	Note
GR13A	36,10 mg	+/-	Lignano (17) R= 0,04%

5.2.8 HPLC GR11A

Si purifica campione GR11A (186,00 mg) per HPLC

Tipo colonna: Hichrom, 250 x 25, silice, Jasco

Solvente: A: Pe, B: EtOAc

Metodo: a gradiente

Velocità di flusso: 6mL/min

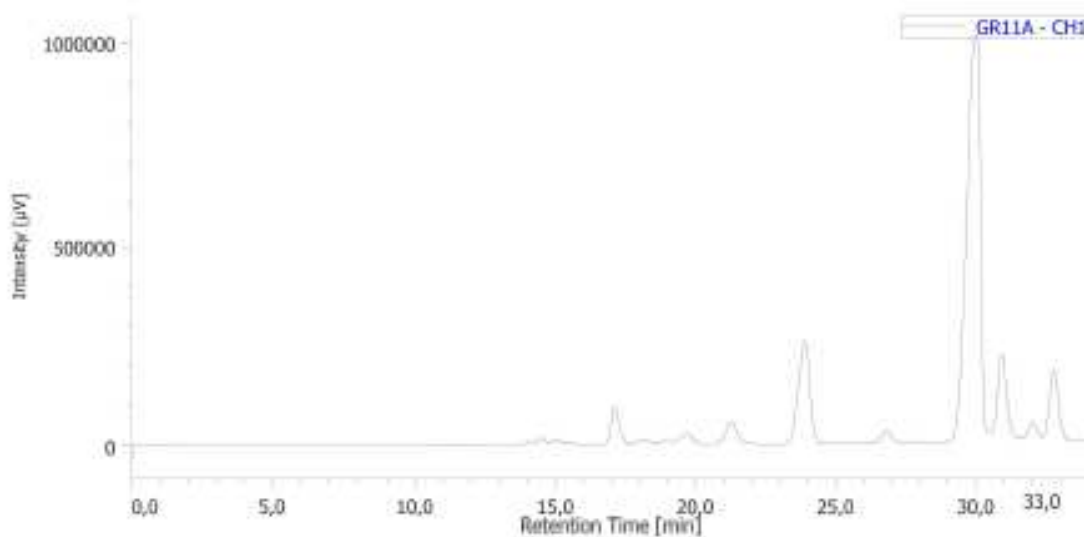
Temperatura: RT

Metodo di rilevazione: UV 254 nm

Carico: 186,00 mg di GR11A in 1,00 mL di Pe/EtOAc

Tempo min	Solvente A %	Solvente B %
0-10	60	40
10-30	30	70
30-45	30	70

Chromatogram



Sigla	Quantità	UV	Note
GR16A	15,70 mg	+	Falcarinolo (11) R= 0,02%

5.3 Sintesi analoghi

5.3.1 Estratto primario Pe di estratto Indena

Scopo: ottenimento falcarinolo (**11**) e falcarindiolo (**12**) da estratto Indena

Materiale: imbuto separatore da 3 L, provette da 35 mL

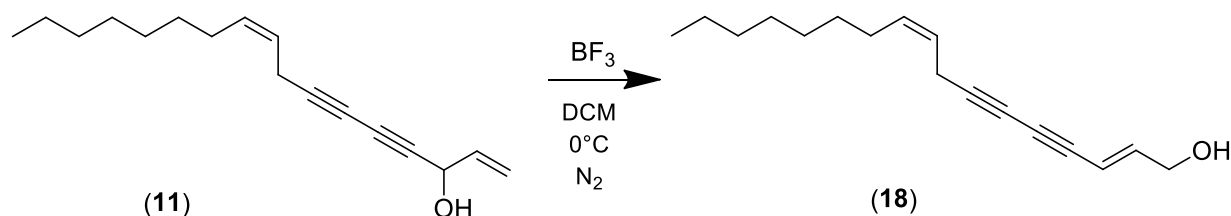
Procedimento: a partire da olio di scarto della lavorazione del *Panax ginseng* dell'industria Indena (Milano), vengono prelevati circa 25 g di un estratto oleoso di colore scuro e viene ripartito in MeOH/Pe in modo da riuscire ad eliminare la frazione marrone scuro insolubile nella fase petrolerea. Dopo avere effettuato l'estrazione sotto forte e lunga agitazione per tre volte sulla stessa frazione si elimina la frazione metanolica. Si procede ad aggiunta di Na₂CO₃ soluzione satura all'interno dell'imbuto separatore per rimuovere gli acidi grassi.

Successivamente si effettua purificazione su C.C.G. Carico: frazione Pe circa 5 g in polverino di silice, fase stazionaria: silice gel, eluente: gradiente 100% Pe/EtOAc fino a gradiente 5/5.

Sigle	Provette	Eluente	UV	Q.tà	Note
11	19-26	9/1	+	731,00 mg	(11) R= 2,92%
12	65-95	5/5	+	602,00 mg	(12) R= 2,41%

5.3.2 Sintesi analoghi del falcarinolo

Trasposizione alcol



Reagente/Solvente	MW (g/mol)	Peso/Volume	Eq	mmol
Falcarinolo (11)	244,37	540,00 mg	1	0,409
BF_3 -OEt	141,43	55,00 μL	1.1	0,499
DCM	-	2,00 mL	-	-
N_2	-	-	-	-

Materiale e vetreria: pallone, ancoretta magnetica, agitatore e vetreria standard.

Procedimento: 603,80 mg di falcarinolo (11) (MW 244,37 g/mol, 1 eq, 0,409 mmol) sono sciolti in 8,00 mL di DCM dry all'interno di un pallone precedentemente anidrificato a cui sono aggiunti 0,06 mL di BF_3 -OEt (MW 141,43 g/mol, 1 eq, 0,4999 mmol). La reazione è mantenuta in agitazione, in ambiente anidro e a 0°C per 1 min e immediatamente si esegue un controllo per TLC notando la formazione di un prodotto con R_f inferiore, è possibile inoltre osservare un repentino cambio di colore da giallo a marrone all'aggiunta del reagente. Segue work-up con ripartizione liquido/liquido in NaHCO_3 soluzione satura, anidificazione della fase organica con Na_2SO_4 , filtrazione ed evaporazione. Segue purificazione con C.C.G. del campione così ottenuto.

Carico: deposizione indiretta silice (1:2 p/p)

Fase stazionaria: 20,00 mL gel di silice

Eluente di carico: Pe 100%

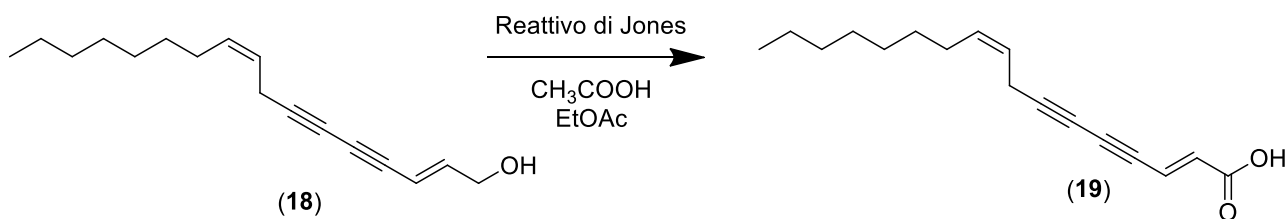
Volume frazioni: 10,00 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR47A	42-56	Pe/EtOAc (9:1)	-	-	Sottoprodotto
GR47B	65-75	Pe/EtOAc (8:2)	234,00 mg	+	Alcol trasposto (18)

Resa= 43,00%

Ossidazione alcol



Reagente/Solvente	MW (g/mol)	Peso/Volume	Eq	mmol
(18)	246,19	234,00 mg	-	0,951
Reattivo di Jones	-	gtt	-	-
CH ₃ COOH	-	2,00 mL	-	-
EtOAc	-	2,00 mL	-	-

Materiale e vetreria: pallone, ancoretta magnetica, agitatore e vetreria standard.

Procedimento: 234,00 mg di GR47A (MW 246,19 g/mol, 1 eq, 0,409 mmol) sono sciolti in 2,00 mL di CH₃COOH e 2,00 mL di EtOAc all'interno di un pallone a cui è aggiunto goccia a goccia reattivo di Jones (MW 141,43 g/mol). La reazione è mantenuta in agitazione e a RT fino a quando non si osserva un cambiamento di colorazione dal verde ad arancione. Si esegue un controllo per TLC notando la formazione di un prodotto con R_f inferiore. Segue work-up con ripartizione liquido/liquido in EtOAc e Na₂S₂O₃, anidificazione della fase organica con Na₂SO₄, filtrazione ed evaporazione. Segue purificazione con C.C.G. del campione così ottenuto.

Carico: deposizione indiretta silice (1:2 p/p)

Fase stazionaria: 30,00 mL di silice

Eluente di carico: Pe 100%

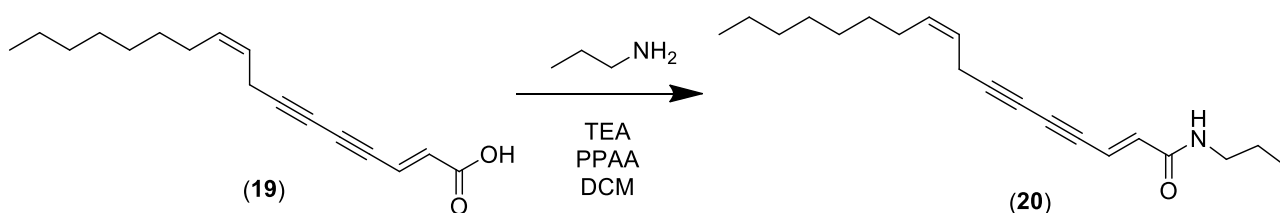
Volume frazioni: 10,00 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR48A	17-18	Pe/EtOAc (95:5)	36,80 mg	+	Aldeide
GR48B	42-53	Pe/EtOAc (7:3)	54,00 mg	+	Ac. carbossilico (19)

Resa= 21,65%

Procedura generale di ammidazione: ammidazione con propilammina come esempio



Reagente/Solvente	MW (g/mol)	Peso/Volume	Eq	mmol
(19)	262,19	54,00 mg	-	0,205
DCM dry	-	1,50 mL	-	-
TEA	101,19	0,13 mL	4,00	0,92
Propilammina	59,11	0,02 mL	1,20	0,276
PPAA	318,19	0,81 mL	1,20	0,276

Materiale e vetreria: pallone, ancoretta magnetica, agitatore e vetreria standard.

Procedimento: ad una soluzione di GR48A (MW 262,19 g/mol, 1 eq, 0,23 mmol) in un pallone si aggiunge nel seguente ordine: TEA (MW 101,19 g/mol), propilammina (MW 59,11 g/mol) e PPAA (MW 318,19 g/mol). La reazione è mantenuta in agitazione e a RT per 1 h, al termine si esegue un controllo per TLC notando la formazione di un prodotto con Rf superiore. Segue work-up con ripartizione liquido/liquido in H₂SO₄ 2 N e EtOAc, anidrifcazione della fase organica con Na₂SO₄, filtrazione ed evaporazione. Segue purificazione con C.C.G. del campione così ottenuto GR49 (20).

Carico: deposizione indiretta silice (1:2 p/p)

Fase stazionaria: 10,00 mL di silice

Eluente di carico: 9:1 Pe:EtOAc

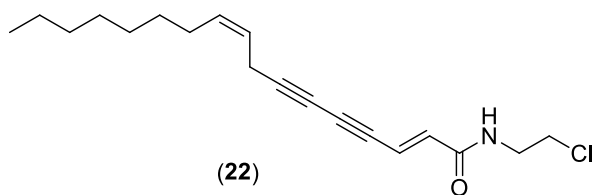
Volume frazioni: 10,00 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR49A	13-17	Pe/EtOAc (8:2)	22,00 mg	+	Prodotto (20)

Resa= 35,30%

Ammidazione con C₂H₆ClN – GR61



GR61 (22)

Carico: deposizione indiretta silice (1:2 p/p)

Fase stazionaria: 10,00 mL di silice

Eluente di carico: Pe

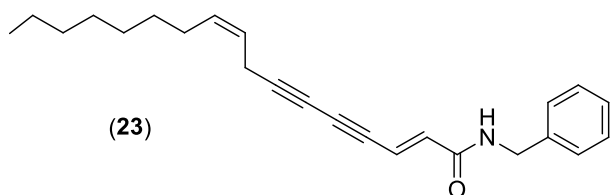
Volume frazioni: 10,00 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR62A	6-18	Pe/EtOAc (9:1)	18,50 mg	-	(22)
GR62B	32-34	Pe/EtOAc (7/3)	7,30 mg	-	(19)

Resa= 20,70%

Ammidazione con C₇H₉N – GR73



GR73 (23)

Carico: deposizione indiretta silice (1:2 p/p)

Fase stazionaria: 10,00 mL di silice

Eluente di carico: Pe

Volume frazioni: 10,00 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

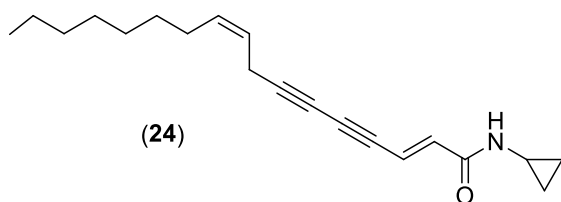
Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR73	15-23	Pe/EtOAc (9:1)	-	-	Prodotto non separato correttamente, si prosegue con purificazione con flash cromatografia in fase diretta.

Purificazione per flash cromatografia in fase diretta:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR74A	7-11		14,80 mg	-	(19)
GR74B	15-18		17,50 mg	+	(23)

Resa= 27,70%

Ammidazione con C₃H₇N – GR72



GR72 (24)

Carico: deposizione indiretta silice (1:2 p/p)

Fase stazionaria: 10,00 mL di silice

Eluente di carico: Pe

Volume frazioni: 10,00 mL

Si ottengono le seguenti frazioni:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR72	7-19	Pe/EtOAc (9:1)	-	-	Prodotto non separato correttamente, si prosegue con purificazione con flash cromatografia in fase diretta.

Purificazione per flash cromatografia in fase diretta:

Sigla	Frazione	Eluente	Quantità	UV	Note
GR75A	6 e 11-12		3,00 mg	-	(24)

Resa= 5,20%

5.4 Materiali e metodi per test citotossicità

5.4.1 Modello Cellulare: HaCaT

Il modello cellulare utilizzato per lo studio della citotossicità prevede l'uso di cheratinociti umani di linea (HaCaT ATCC, Manassas, VA, USA). Il terreno di coltura base utilizzato è l'DMEM HG (Euroclone S.p.A., Milano, Italy) integrato con 10% di siero fetale bovino inattivato termicamente (Euroclone S.p.A., Milano, Italy), L-glutamina 2,00 mM (LGlu, Euroclone S.p.A., Milano, Italy) e antibiotici 100,00 U/mL penicillina, 100,00 µg/mL streptomina (P/S, Aurogene s.r.l., Roma, Italy). Negli esperimenti, le HaCaT sono state seminate ad una densità cellulare pari a 5.000 cellule/pozzetto in piastre da 48 pozzetti e lasciate in incubazione overnight (O/N) prima del trattamento. Per studiare l'effetto dei composti **11**, **12**, **20**, **22**, **23** e **24** sono state testate concentrazioni degli stessi, a partire da 1,00 µM fino a 100,00 µM e come controllo negativo le HaCaT sono state coltivate in solo terreno di coltura. In seguito all'aggiunta dei composti da testare le cellule sono lasciate in incubazione per 24 h.

5.4.2 Saggio M.T.T

Le cellule HaCaT dopo essere state seminate (5.000 cellule/pozzetto) e trattate come indicato nel paragrafo precedente, sono state sottoposte al saggio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Il protocollo prevede la rimozione del terreno, un lavaggio con una soluzione di tampone fosfato (NaCl 1,37 M, KCl 27,00 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 81,00 mM, KH₂PO₄ 19,00 mM) ed infine l'aggiunta di un volume di soluzione di MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) pari al 10% del volume totale presente in ciascun pozzetto. La multiwell viene incubata a 37 °C in presenza di CO₂ al 5% per tre ore, al termine delle quali, il surnatante contenente MTT viene rimosso. L'attività mitocondriale delle cellule, evidente per colorazione blu/violetto dovuta all'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano (Fig. 10), viene quantificata sull'eluato ottenuto aggiungendo a ciascun pozzetto 200,00 µL di una soluzione di isopropanolo + HCl 1,00 M.

Dopo 20 minuti di incubazione della piastra a 37 °C, da ogni pozzetto, sono stati prelevati 200,00 µL e sono stati trasferiti in una piastra per la lettura allo spettrofotometro, la soluzione di isopropanolo/HCl è stato utilizzato come controllo negativo dell'esperimento. L'assorbanza è stata misurata a 570 nm utilizzando uno spettrofotometro UV/visibile (Viktor X4 PerkinElmer).

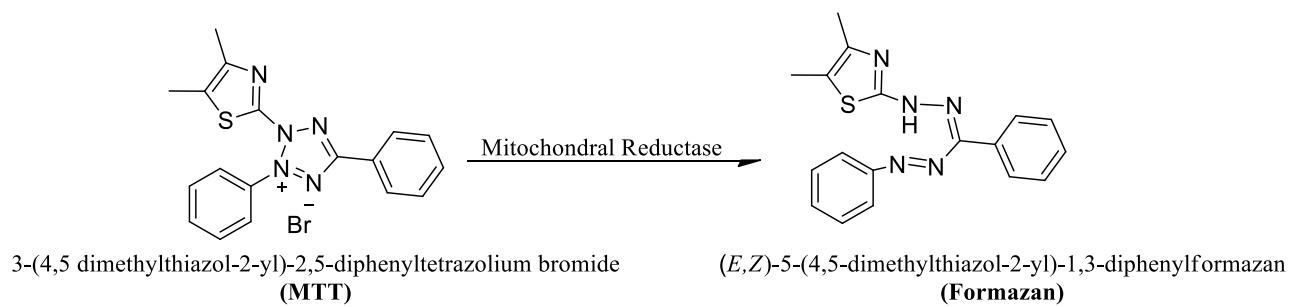


Fig. 14 Reazione MTT: Riduzione del 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide in formazano

5.4 Materiali e metodi per valutazione attività antibatterica e antifungina

5.4.1 Materiali

5.4.1.1 Terreni

Mueller- Hinton Broth (MHB)

Conforme alle direttive del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e dello European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), è un terreno non selettivo utilizzabile per la coltivazione di un'ampia gamma di microrganismi aerobi a crescita rapida o anaerobi facoltativi esigenti e non, ordinariamente utilizzato per le prove di sensibilità antibiotica. L'idrolizzato acido di caseina e l'estratto di carne bovina forniscono aminoacidi e altre sostanze azotate, alcune vitamine, minerali e altri composti nutritivi. L'amido ha la funzione di collante protettivo nei confronti delle tossine rilasciate dai batteri in modo che non possano interferire con l'azione degli antibiotici saggiati. L'idrolisi dell'amido durante la sterilizzazione in autoclave, inoltre, fornisce una piccola quantità di destrosio che può essere usata come fonte di energia.

Il terreno è stato preparato dissolvendo 8,40 g di polvere (Scharlab, Barcellona, Spagna) in 400,00 mL di acqua deionizzata. Il pH è stato portato ad un valore di 7,30 ed il terreno è stato poi sterilizzato in autoclave per 15 minuti a 121 °C.

Tryptic Soy Agar (TSA)

È un terreno nutritivo che supporta la crescita di un'ampia gamma di microrganismi, soprattutto i più comuni aerobi e gli anaerobi facoltativi. I peptoni di caseina e soia sono fonti di azoto, carbonio, minerali e vitamine. Il cloruro di sodio contenuto serve per mantenere l'equilibrio osmotico.

Il terreno è stato preparato sciogliendo 28,00 g di polvere (Scharlab, Barcellona, Spagna) in 700,00 mL di acqua deionizzata. Il pH è stato portato ad un valore di 7,30 e successivamente il terreno è stato sterilizzato in autoclave per 15 minuti a 121 °C.

SDA (Sabouraud Dextrose Agar)

SDA è un terreno solido, non selettivo utilizzato per l'isolamento e la coltivazione di specie non patogene e patogene di lieviti e muffe. La crescita del fungo è migliorata grazie al pH acido e all'alto contenuto di zucchero del terreno; che, inoltre, inibisce leggermente la crescita batterica.

Il peptone fornisce azoto e vitamine, elementi necessari per la proliferazione del microrganismo. Il destrosio è fonte di energia e di carbonio e l'agar funge da agente solidificante.

Il terreno è stato preparato sciogliendo in 500,00 mL di acqua deionizzata 32,50 g di polvere (Scharlab, Barcellona, Spagna). Dopo aver portato il pH ad un valore di 5,60, è stata eseguita la sterilizzazione del terreno in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 contenente 2% di glucosio

Questo terreno è raccomandato per il saggio di determinazione della Minima Concentrazione Inibitoria di un antimicotico secondo le linee guida stilate dalla Commissione Europea per i Saggi di Suscettibilità agli Antimicrobici. Terreno (Merck Life Science S.r.l., Milano, Italia) e glucosio (Scharlab Italia S.r.l, Lodi, Italia) sono stati solubilizzati in acqua deionizzata secondo le istruzioni fornite dal fornitore. In seguito, il terreno a pH=7,00, è stato sterilizzato mediante autoclave.

5.4.1.2 Reattivi

Soluzioni madre di partenza

Ogni composto testato è stato diluito in DMSO ottenendo una concentrazione di 1,00 M.

I composti utilizzati sono: **11, 12, 20, 22, 23, 24** e due estratti primari ottenuti da parti aeree e radici di *Iberis amara* L.

PBS

Il tampone è stato preparato sciogliendo 6,40 g di sodio cloruro (NaCl) (Sigma-Aldrich, Italia, Milano), 0,16 g di potassio cloruro (KCl) (Sigma-Aldrich, Italia, Milano), 1,15 g di sodio fosfato dibasico (Na₂HPO₄) (Sigma-Aldrich, Italia, Milano) e 0,19 g di potassio fosfato monobasico

(KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich, Italia, Milano) in 800,00 mL di acqua deionizzata. La soluzione è stata portata a pH 7,40 e in seguito sterilizzata in autoclave per 15 minuti a 121 °C.

Soluzione glucosio 20%

La soluzione è stata preparata sciogliendo 10,00 g di glucosio in 50,00 mL di acqua deionizzata e successivamente sterilizzata mediante filtrazione su membrana da 0,22 μm .

Soluzione di Menadione 1mM

La soluzione madre di menadione (10,00 mM) è stata preparata dissolvendo 0,017 g di menadione (Sigma-Aldrich, Italia, Milano) in 10,00 mL di acetone (Sigma-Aldrich, Italia, Milano). Questa soluzione può essere conservata al buio a -20 °C per un massimo di 7 giorni.

La soluzione di lavoro alla concentrazione di 1,00 mM è stata ottenuta diluendo la soluzione madre 1:10 v/v in PBS.

Soluzione di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) 0,075%

La soluzione è stata ottenuta sciogliendo 0,01 g di MTT (Scharlab, Barcellona, Spagna) in 9,85 mL di PBS. Sono stati poi addizionati 100,00 μL di soluzione di menadione 1,00 mM e 50,00 μL di soluzione di glucosio 20%. La soluzione deve essere posta al riparo dalla luce perché fotosensibile.

Tampone di glicina 0,1 M

Per la preparazione della soluzione sono stati disciolti 0,75 g di glicina (Sigma-Aldrich, Italia, Milano) in 100,00 mL di acqua deionizzata ed il pH è stato portato a 10,20. Il tampone ottenuto è stato sterilizzato mediante filtrazione su membrana da 0,22 μm .

Soluzione di lisi

La soluzione è stata ottenuta miscelando 1 parte di tampone di glicina 0,10 M e 7 parti di DMSO (Sigma-Aldrich, Italia, Milano).

5.4.1.2 Ceppi batterici

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Il ceppo di *S. aureus* ATCC 25923 è stato acquistato presso l'American Type Culture Collection (ATCC). Le brodoculture pure del ceppo sono state conservate a -80 °C in TSB addizionato di glicerolo (25,00% v/v) (Scharlab, Barcellona, Spagna). Relativamente alle esigenze sperimentali, il ceppo è stato scongelato su piastre di TSA ed incubato per 16-20 ore a 37 °C.

Escherichia coli ATCC 25922

Il ceppo di *E. coli* ATCC 25922 è stato acquistato presso l'American Type Culture Collection (ATCC). Le brodoculture pure del ceppo sono state conservate a -80 °C in Luria Bertani (Scharlab, Barcellona, Spagna) addizionato di glicerolo (25,00% v/v) (Scharlab, Barcellona, Spagna). Relativamente alle esigenze sperimentali, il ceppo è stato scongelato su piastre di TSA ed incubato per 16-20 ore a 37 °C.

Candida albicans ATCC 10231

Il ceppo di *C. albicans* ATCC 10231 è stato acquistato presso l'American Type Culture Collection (ATCC). Le brodoculture pure del ceppo sono state conservate a 80 °C in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) addizionato di glicerolo (25,00% v/v). Per esigenze sperimentali, il ceppo è stato scongelato su piastre di SDA, e successivamente incubate per 16-20 ore a 37 °C.

5.4.2 Metodi

5.4.2.1 Valutazione dell'attività antibatterica e antifungina dei poliacetileni di riferimento, degli analoghi di falcarinolo e degli estratti delle parti aeree e delle radici di *Iberis amara* L.

È stata valutata l'attività antibatterica e antifungina di:

- Falcarinolo (**11**) e falcarindiolo (**12**);
- Analoghi semi-sintetici ottenuti a partire da falcarinolo (**11**);
- Estratti primari delle parti aeree e delle radici di *Iberis amara* L.

Tutti i composti citati sono stati testati nei confronti delle cellule planctoniche dei ceppi indicatori (1 Gram-positivo, 1 Gram-negativo e 1 fungo) mediante il saggio di microdiluizione in brodo. Il protocollo è stato eseguito come indicato da Wiegand et al. per i ceppi batterici (Wiegand et al., 2008),

apportando delle piccole variazioni. Per il ceppo fungino sono state seguite le linee guida EUCAST (Arendrup *et al.*, 2012) con delle piccole modifiche.

I ceppi indicatori utilizzati nello studio sono stati: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231.

La densità cellulare finale di *S. aureus* e *E. coli* dell'inoculo in piastra è stata pari a $5,0 \times 10^4$ Unità Formanti Colonia per millilitro (UFC/mL). La densità cellulare finale dell'inoculo in piastra di *C. albicans*, invece, è di $0,50-2,50 \times 10^5$ UFC/mL.

Per quantificare l'attività antibatterica e antifungina, i ceppi indicatori batterici e quelli fungini sono stati coltivati rispettivamente in MHB e in terreno colturale RPMI al 2,00% di glucosio. Falcarindiolo (12), falcarinolo (11) e i suoi analoghi semi-sintetici sono saggiati a concentrazioni che variano da 1,00 μ M a 50,00 μ M. Gli estratti ottenuti dalle parti aeree e dalle radici di *Iberis amara* L. sono testati a concentrazioni di 12,50 μ M, 25,00 μ M e 50,00 μ M.

Utilizzando il saggio colorimetrico dell'MTT è stato possibile misurare l'attività metabolica delle cellule batteriche e fungine trattate con i composti. I saggi sono stati condotti in triplicato.

5.4.2.2 Allestimento degli inoculi

I due ceppi batterici *S. aureus* e *E. coli* sono stati seminati su piastre di terreno TSA e posti in incubazione per 16-20 ore a 37 °C. Per ciascun ceppo batterico è stato allestito un inoculo preliminare con una Densità Ottica (OD) a 600 nm pari a 0,257, equivalente a una concentrazione di $3,00 \times 10^8$ UFC/mL, disperdendo diverse colonie batteriche in terreno MHB. La sospensione così ottenuta è stata diluita in MHB (1:6000 v/v) ottenendo un'inoculo da aggiungere alla piastra di lavoro con densità cellulare di $5,00 \times 10^4$ UFC/mL.

Per saggiare i composti su *C. albicans*, è stato preparato inizialmente un pre-inoculo (OD₅₃₀ pari a 0,12 – 0,15) equivalente a una concentrazione di $1-5 \times 10^6$ UFC/mL stemperando alcune colonie in terreno sterile. In un secondo momento, la sospensione fungina è stata diluita in terreno sterile ottenendo un'inoculo con una densità cellulare di $0,50-2,50 \times 10^5$ UFC/mL.

5.4.2.3 Allestimento delle piastre

La soluzione madre di **11, 12, 20, 22, 23, 24** (come menzionato nella sezione 3.1.2) è stata diluita in acqua deionizzata sterile per ottenere una soluzione di lavoro 20x per ogni concentrazione testata. Per gli estratti delle parti aeree e delle radici sono state preparate soluzioni di lavoro delle concentrazioni da testare 2x.

Sono state preparate tre piastre da 96 pozzetti, una per ogni target biologico su cui testare i composti. Ognuna è suddivisa come illustrato nella Fig. 15, in modo da avere:

- 3 repliche per il controllo positivo di crescita (CTRL+), in ogni pozzetto sono contenuti 180,00 μL dell'inoculo del ceppo di interesse e 20,00 μL di acqua deionizzata sterile oppure 199,00 μL dell'inoculo del ceppo di interesse e 1,00 μL di DMSO;
- 3 repliche per ciascuna concentrazione saggata, contenenti 180,00 μL di inoculo del ceppo di interesse e 20,00 μL dei composti in studio;
- 3 repliche per ciascuna concentrazione saggata di estratto delle parti aeree e radici contenenti 100,00 μL di inoculo del ceppo di interesse e 100,00 μL degli estratti in studio;
- 3 repliche per il controllo di sterilità (BIANCO), in ogni pozzetto sono contenuti 180,00 μL di MHB o RPMI e 20,00 μL di acqua deionizzata sterile.

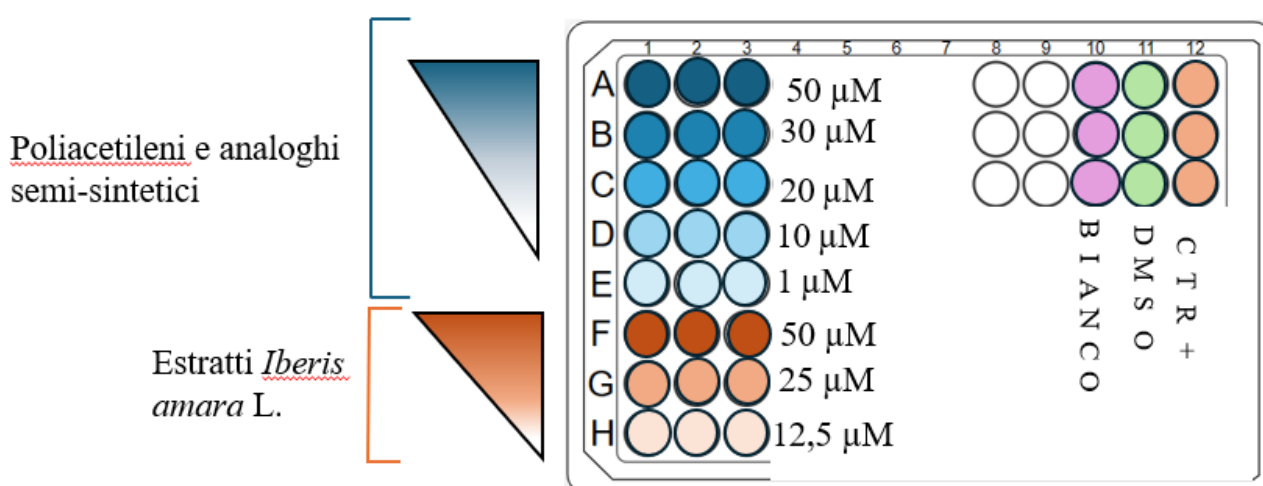


Fig. 15 Immagine riportante lo schema con cui tutti i composti sono stati saggiati su microrganismi in studio

Per mantenere la concentrazione cellulare riportata da protocollo, l'inoculo è stato aggiunto nei rispettivi pozzetti entro 30 minuti dalla preparazione. Successivamente, la piastra è stata incubata per 24 ore a 37 °C.

5.4.2.4 Quantificazione dell'attività metabolica cellulare di *S. aureus* e *E. coli* attraverso il saggio colorimetrico dell'MTT

Il saggio dell'MTT è un test colorimetrico che valuta la vitalità cellulare e indirettamente la citotossicità di un agente terapeutico. Il saggio valuta la capacità dell'enzima deidrogenasi di ridurre il sale di tetrazolio (MTT), di colore giallo, a cristalli di formazano insolubili in acqua, di colore bluvioletto. Maggiore è l'attività metabolica cellulare della coltura e maggiore sarà l'intensità di colorazione della soluzione derivante dalla solubilizzazione del formazano, accumulatosi all'interno della cellula. Al termine delle 24 ore di incubazione, il contenuto di ciascun pozzetto è stato trasferito in tubi da 1,50 mL e centrifugato a 13600,00 rpm per 15 minuti a 4 °C. Una volta rimosso il surnatante, il pellet è stato risospeso con 200,00 µL della soluzione di MTT 0,08% (paragrafo 5.4.1.2). In seguito ad un tempo di incubazione di 10 minuti per i ceppi batterici e di 30 minuti per il ceppo fungino a 37 °C, i campioni sono stati centrifugati a 13600 rpm per 15 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato rimosso ed il pellet risospeso con 200,00 µL della soluzione di lisi (paragrafo 5.4.1.2). Infine, le soluzioni ottenute dopo opportuna diluizione sono state trasferite in una piastra a 96 pozzetti per la lettura spettrofotometrica.

5.4.2.5 Lettura e spiegazione dei risultati

Successivamente è stata calcolata l'assorbanza delle soluzioni contenute nei 96 pozzetti mediante lettura spettrofotometrica a 570,00 nm (A). Sono stati presi in considerazione:

1. i valori medi di assorbanza relativi al controllo positivo di crescita (A_{CTRL+});
2. alle differenti concentrazioni dei composti saggiati ($A_{campione}$);

a cui è stato sottratto il valore medio di assorbanza del controllo di sterilità (A_B).

Le percentuali di inibizione sono state calcolate utilizzando i valori normalizzati mediante la seguente formula:

$$Inibizione (\%) = 1 - \left(\frac{A_{campione}}{A_{CTRL+}} \right) \times 100$$

5.4.2.6 Analisi statistica

Le medie e la deviazione standard sono state calcolate con il programma Microsoft Office® Excel. L'analisi statistica dei dati sperimentali ottenuti è stata conteggiata con il t-test Student. La significatività statistica è indicata con il simbolo *, dove * $p < 0,05$; **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

7. Bibliografia

- Aires de Sousa, M., & Lencastre de, H. (2004). Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40(2), 101-111.
- Allescher, H. D., & Wagner, H. (2007). STW 5/iberogast: multi-target-wirkung bei funktioneller dyspepsie und reizdarmsyndrom. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 13(157), 301-307.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.
- Antonelli Guido, Clementi Massimo, Pozzi Gianni, Rossolini Gian Maria. *Principi di Microbiologia medica*, III edizione, 2017, Casa editrice ambrosiana
- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., & EUCAST-AFST. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E246-E247.
- Bonz, A., Laser, M., Küllmer, S., Kniesch, S., Babin-Ebell, J., Popp, V., ... & Wagner, J. A. (2003). Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 41(4), 657-664.
- Brown, S. M., Wager-Miller, J., & Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1576(3), 255-264.
- Carratù, B., & Sanzini, E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali-Istituto Superiore Di Sanita*, 41(1), 7.
- Chen, J. C., Chiu, M. H., Nie, R. L., Cordell, G. A., & Qiu, S. X. (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Natural product reports*, 22(3), 386-399.
- Chen, X. P., Yang, W., Fan, Y., Luo, J. S., Hong, K., Wang, Z., ... & Zhou, N. M. (2010). Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to Gs and Gi. *British journal of pharmacology*, 161(8), 1817-1834.
- Chieosilapatham, P., Kiatsurayanon, C., Umehara, Y., Trujillo-Paez, J. V., Peng, G., Yue, H., ... & Niyonsaba, F. (2021). Keratinocytes: Innate immune cells in atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 204(3), 296-309.
- Cooke, E. M. (1974). *Escherichia coli* and man. *Escherichia coli* and man.
- Dawid, C., Dunemann, F., Schwab, W., Nothnagel, T., & Hofmann, T. (2015). Bioactive C17-polyacetylenes in carrots (*Daucus carota* L.): current knowledge and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9211-9222.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *cell*, 149(5), 1060-1072.

- Dubourg, G., Abat, C., & Raoult, D. (2017). Why new antibiotics are not obviously useful now. *International journal of antimicrobial agents*, 49(5), 549-553.
- Escherich, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medicin*, 3(16 und 17), 515-554.
- Feng, Z., Alqarni, M. H., Yang, P., Tong, Q., Chowdhury, A., Wang, L., & Xie, X. Q. (2014). Modeling, molecular dynamics simulation, and mutation validation for structure of cannabinoid receptor 2 based on known crystal structures of GPCRs. *Journal of chemical information and modeling*, 54(9), 2483–2499.
- Hansen, S. L., Purup, S., & Christensen, L. P. (2003). Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(10), 1010-1017.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., ... & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, 54(2), 161-202.
- Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., ... & Zimmer, A. (2007). Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *science*, 316(5830), 1494-1497.
- Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), 1549-1555.
- Kluytmans, J. A. N., Van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 505-520.
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chemical reviews*, 121(6), 3390–3411.
- Leonti, M., Casu, L., Raduner, S., Cottiglia, F., Floris, C., Altmann, K. H., & Gertsch, J. (2010). Falcarinol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces pro-allergic effects in skin. *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1815-1826.
- Li, Y., Tan, W. L., Guo, K., Gao, X. W., Wei, J., Yi, D., ... & Wang, Q. (2021). Synthesis and Biological Evaluation of Falcarinol-Type Analogues as Potential Calcium Channel Blockers. *Journal of Natural Products*, 84(8), 2138-2148.
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 8(3), 162.
- Liu, X., Ou, H., Xiang, Z., & Gregersen, H. (2020). Ultrasound pretreatment combined with supercritical CO2 extraction of *Iberis amara* seed oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 18, 100265.
- Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89-121.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1265-1273.
- MacRae, W. D., & Towers, G. N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23(6), 1207-1220.

- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, *346*(6284), 561–564.
- McCreary, E. K., Heil, E. L., & Tamma, P. D. (2021). New perspectives on antimicrobial agents: cefiderocol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *65*(8), 10-1128.
- Medici, N. P., & Del Poeta, M. (2015). New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*, 966-973.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61-65.
- Nami, S., Mohammadi, R., Vakili, M., Khezripour, K., Mirzaei, H., & Morovati, H. (2019). Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: a comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *109*, 333-344.
- Nicholls, S., MacCallum, D. M., Kaffarnik, F. A., Selway, L., Peck, S. C., & Brown, A. J. (2011). Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(3), 297-305.
- Oka, S., Yanagimoto, S., Ikeda, S., Gokoh, M., Kishimoto, S., Waku, K., ... & Sugiura, T. (2005). Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(18), 18488-18497.
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins* *10*: 252.
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. *International journal of molecular sciences*, *22*(18), 9922.
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1), 1-20.
- Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., De Brito, E. H. S., & De Morais, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(1), 11-22.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, *20*(1), 133-163.
- Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2012). Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(5), 883-893.
- Purup, S., Larsen, E., & Christensen, L. P. (2009). Differential effects of faltarinol and related aliphatic C17-polyacetylenes on intestinal cell proliferation. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(18), 8290-8296.
- Reddy, P. N., Srirama, K., & Dirisala, V. R. (2017). An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, *10*, 1179916117703999.

- Reichling, J., & Saller, R. (2002). *Iberis amara* L.(Bittere Schleifenblume)–Profil einer Heilpflanze. *Complementary Medicine Research*, 9(Suppl. 1), 21-33.
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 8(4), 8-4.
- Rollinger, J. M., Zidorn, C., Dobner, M. J., Ellmerer, E. P., & Stuppner, H. (2003). Lignans, phenylpropanoids and polyacetylenes from *Chaerophyllum aureum* L.(Apiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8), 553-557.
- Sakagami, T., Kawano, T., Yamashita, K., Yamada, E., Fujino, N., Kaeriyama, M., ... & Mikamo, H. (2019). Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25(1), 34-40.
- Saller, R., Iten, F., & Reichling, J. (2001). Dyspeptische Beschwerden und Phytotherapie–eine Übersicht über traditionelle und moderne Phytotherapeutika. *Complementary Medicine Research*, 8(5), 263-273.
- Saller, R., Pfister-Hotz, G., Iten, F., Melzer, J., & Reichling, J. (2002). Iberogast (r): Eine moderne phytotherapeutische Arzneimittelkombination zur Behandlung funktioneller Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts (Dyspepsie, Colon irritabile)–von der Pflanzenheilkunde zur «Evidence Based Phytotherapy». Eine systematische Übersicht. *Complementary Medicine Research*, 9(Suppl. 1), 1-20.
- Sangvik, M. (2013). *Staphylococcus aureus* colonisation and host-microbe interactions.
- Schallreuter, K. U., & Wood, J. M. (1995). The human epidermis. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 54(1), 191–195.
- Schempp, H., Totha, A., Weiser, D., & Elstner, E. F. (2003). Antioxidative properties of *Iberis amara* extracts in biochemical model reactions. *Arzneimittelforschung*, 53(08), 568-577.
- Ständer, S., Schmelz, M., Metze, D., Luger, T., & Rukwied, R. (2005). Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *Journal of dermatological science*, 38(3), 177-188.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris Jr, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3), 649-659.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 8(3), 207-217.
- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry reviews*, 8, 269-282.
- Trevisan, V., & Ferrucci, S. La dermatite da contatto.
- Ueda, N., Tsuboi, K., & Uyama, T. (2015). Metabolic enzymes for endocannabinoids and endocannabinoid-like mediators. In *The Endocannabinoidome* (pp. 111-135). Academic Press.
- Vidal Yucha, S. E., Tamamoto, K. A., & Kaplan, D. L. (2019). The importance of the neuro-immuno-cutaneous system on human skin equivalent design. *Cell proliferation*, 52(6), e12677.

- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.
- Yang, P., Liu, W., Fu, R., Ding, G. B., Amin, S., & Li, Z. (2020). Cucurbitacin E chemosensitizes colorectal cancer cells via mitigating TFAP4/Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(48), 14148-14160.
- Ye, L., Cao, Z., Wang, W., & Zhou, N. (2019). New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Current molecular pharmacology*, 12(3), 239–248.

8. Sitografia

https://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=501579

<https://www.iberogast.co.za/power-of-nature/iberis-amara>

<https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/candida-albicans/>

<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/escherichia-coli/>