



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Ingegneria Informatica, Modellistica, Elettronica e Sistemistica - DIMES

Scuola di Dottorato "LIFE SCIENCES"

Dottorato di Ricerca in Ambiente, Salute e Processi Eco-sostenibili

XXVI CICLO

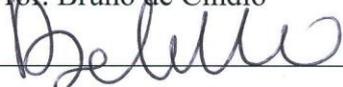
**NUOVE TECNICHE ESTRATTIVE DI FITOCOMPLESSI E SINGOLI PRINCIPI
ATTIVI OTTENUTI DA PIANTE DI PARTICOLARI AREE GEOGRAFICHE E
VALUTAZIONE DELLE LORO POTENZIALI APPLICAZIONI IN PUVA TERAPIA
E TERAPIA FOTODINAMICA**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/15 Biologia Farmaceutica

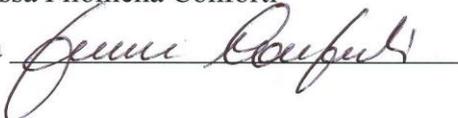
Direttore: Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Firma 

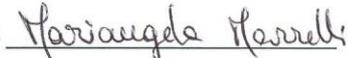
Coordinatore: Ch.mo Prof. Bruno de Cindio

Firma 

Supervisore: Dott. ssa Filomena Conforti

Firma 

Dottorando: Dott.ssa Mariangela Marrelli

Firma 

INDICE

| | | |
|---|-----|----|
| INTRODUZIONE | pag | 1 |
| CAPITOLO 1 | | |
| Fotochemioterapia | pag | 3 |
| 1.1 Introduzione | pag | 3 |
| 1.2 Fototerapia e fotochemioterapia..... | pag | 3 |
| 1.3 PUVA terapia e furanocumarine | pag | 5 |
| 1.4 Terapia fotodinamica (PDT, <i>photodynamic therapy</i>)..... | pag | 8 |
| 1.4.1 Introduzione..... | pag | 8 |
| 1.4.2 Meccanismi d'azione..... | pag | 10 |
| 1.4.2.1 <i>Produzione di specie reattive dell'ossigeno</i> | pag | 10 |
| 1.4.2.2 <i>Danno vascolare e risposta infiammatoria ed immunitaria</i> | pag | 11 |
| 1.4.2.3 <i>Localizzazione selettiva nel tessuto tumorale</i> | pag | 12 |
| 1.4.3 Morte cellulare | pag | 13 |
| 1.4.4 Applicazioni cliniche della PDT..... | pag | 14 |
| 1.4.4.1 <i>Tumori cutanei</i> | pag | 14 |
| 1.4.4.2 <i>Altri tumori</i> | pag | 16 |
| 1.4.4.3 <i>Altre applicazioni in dermatologia ed oftalmologia</i> | pag | 17 |
| 1.4.4.4 <i>Effetti collaterali</i> | pag | 18 |
| 1.5 Molecole impiegate in terapia fotodinamica o studiate per le loro potenziali applicazioni | pag | 19 |
| 1.5.1 Porfirine | pag | 23 |
| 1.5.1.1 <i>Photofrin® (Porfimer Sodium)</i> | pag | 25 |
| 1.5.1.2 <i>Acido aminolevulinico (ALA) e metil aminolevulinato (MAL)</i> | pag | 26 |
| 1.5.2 Molecole non porfiriniche | pag | 28 |
| 1.5.2.1 <i>Ipericina ed altri antrachinoni</i> | pag | 28 |
| 1.5.2.2 <i>Poliacetileni e tiofeni</i> | pag | 29 |
| 1.5.2.3 <i>Altri agenti fotosensibilizzanti di origine naturale</i> | pag | 30 |
| 1.6 Estratti vegetali con proprietà fotocitotossiche..... | pag | 34 |
| CAPITOLO 2 | | |
| Specie vegetali con potenziali applicazioni in fotochemioterapia | pag | 36 |
| 2.1 <i>Cachrys pungens</i> Jan | pag | 36 |
| 2.1.1 Aspetti botanici | pag | 36 |
| 2.1.2 Caratteristiche fitochimiche e proprietà biologiche..... | pag | 38 |
| 2.2 <i>Ficus carica</i> L. cv. Dottato | pag | 39 |
| 2.2.1 Aspetti botanici | pag | 39 |
| 2.2.2 Contenuto fitochimico e proprietà biologiche | pag | 41 |
| 2.2.2.1 <i>Frutti</i> | pag | 41 |
| 2.2.2.2 <i>Foglie</i> | pag | 42 |
| 2.2.2.3 <i>Lattice</i> | pag | 43 |
| 2.3 <i>Hypericum perforatum</i> L. | pag | 43 |

| | |
|--|---------------|
| 2.3.1 Aspetti botanici | pag 43 |
| 2.3.2 Composizione fitochimica | pag 45 |
| 2.3.2.1 Derivati antrachinonici (naftodiantroni)..... | pag 45 |
| 2.3.2.2 Fluoroglucinololi prenilati | pag 46 |
| 2.3.2.3 Polifenoli | pag 46 |
| 2.3.2.4 Composti volatili..... | pag 46 |
| 2.3.3 Impieghi tradizionali dell'iperico e proprietà farmacologiche.... | pag 47 |
| 2.3.3.1 Attività antidepressiva | pag 47 |
| 2.3.3.2 Attività antibatterica ed antivirale | pag 48 |
| 2.3.3.3 Effetti collaterali | pag 48 |
| | |
| CAPITOLO 3 | |
| Parte sperimentale: materiali e metodi | pag 50 |
| 3.1 Materiale vegetale e procedure estrattive..... | pag 50 |
| 3.1.1 <i>Cachrys pungens</i> Jan..... | pag 50 |
| 3.1.2 <i>Ficus carica</i> L. cultivar Dottato | pag 51 |
| 3.1.3 <i>Hypericum perforatum</i> L. subsp. <i>veronense</i> | pag 52 |
| 3.2 Analisi fitochimica | pag 53 |
| 3.2.1 Analisi dei composti apolari: GC e GC-MS..... | pag 53 |
| 3.2.2 Determinazione del contenuto fenolico totale..... | pag 53 |
| 3.2.3 Analisi del contenuto fenolico: HPTLC..... | pag 54 |
| 3.3 Attività biologica..... | pag 55 |
| 3.3.1 <i>Free radical scavenging activity</i> (FRSA)..... | pag 55 |
| 3.3.2 Inibizione della perossidazione lipidica: β -carotene <i>bleaching test</i> | pag 56 |
| 3.3.3 Proprietà fotodinamiche e citotossiche | pag 57 |
| 3.3.3.1 <i>Linee cellulari</i> | pag 57 |
| 3.3.3.2 <i>Valutazione dell'attività fototossica dei campioni</i> | pag 57 |
| 3.3.3.3 <i>Osservazioni al microscopio della morfologia cellulare</i> | pag 59 |
| 3.3.4 Analisi statistiche | pag 59 |
| | |
| CAPITOLO 4 | |
| Parte sperimentale: risultati | pag 60 |
| 3.1 Introduzione..... | pag 60 |
| 3.2 <i>Cachrys pungens</i> Jan..... | pag 61 |
| 3.2.1 Analisi fitochimica | pag 62 |
| 3.2.2 Attività antiossidante..... | pag 67 |
| 3.2.3 Fotocitotossicità..... | pag 69 |
| 3.3 <i>Ficus carica</i> L. cv. Dottato..... | pag 73 |
| 3.3.1 Lattice | pag 73 |
| 3.3.1.1 <i>Analisi fitochimica</i> | pag 73 |
| 3.3.1.2 <i>Attività antiossidante</i> | pag 74 |
| 3.3.1.3 <i>Attività fotocitotossica</i> | pag 75 |
| 3.3.2 Parti aeree..... | pag 77 |
| 3.3.2.1 <i>Analisi fitochimica</i> | pag 78 |
| 3.3.2.2 <i>Attività antiossidante</i> | pag 79 |
| 3.3.2.3 <i>Fotocitotossicità</i> | pag 81 |

| | |
|---|---------|
| 3.3.3 Frutti..... | pag 83 |
| 3.3.3.1 <i>Analisi fitochimica</i> | pag 83 |
| 3.3.3.2 <i>Attività antiossidante</i> | pag 85 |
| 3.3.3.3 <i>Attività fotocitotossica</i> | pag 87 |
| 3.4 <i>Hypericum perforatum</i> L. | pag 88 |
| 3.4.1 <i>Analisi fitochimica</i> | pag 88 |
| 3.4.2 <i>Attività antiossidante</i> | pag 93 |
| 3.4.3 <i>Attività fotocitotossica</i> | pag 96 |
| | |
| CONCLUSIONI | pag 101 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | pag 106 |

INTRODUZIONE

La fotochemioterapia è una metodica terapeutica che richiede la somministrazione di un agente fotosensibilizzante che può essere successivamente attivato da una radiazione luminosa.

Il ricorso a questo tipo di trattamento risale a migliaia di anni fa. In India e in Egitto diverse piante, quali ad esempio *Psoralea corylifolia* L. e *Ammi majus* L., erano impiegate per il trattamento di varie affezioni cutanee. L'impiego di queste specie nella medicina tradizionale per la loro azione fotosensibilizzante ha motivato negli ultimi decenni una serie di studi volti all'identificazione dei principi attivi in esse contenuti, e le ricerche condotte hanno consentito di evidenziare la presenza di varie furanocumarine. Negli ultimi decenni le proprietà biologiche e in particolare quelle fotobiologiche di questi composti, incluso il loro spettro d'azione e gli effetti mutageni e cancerogeni, sono state oggetto di molteplici studi pubblicati su riviste internazionali. Il trattamento basato sull'impiego per via orale o topica di psoraleni ed esposizione ai raggi ultravioletti UV-A (320-360 nm) è una forma di fotochemioterapia oggi indicata con la sigla PUVA, impiegata nel trattamento del linfoma cutaneo a cellule T, della vitiligine e della psoriasi.

Un'altra importante forma di fotochemioterapia è rappresentata dalla terapia fotodinamica (PDT, *photodynamic therapy*). La PDT è particolarmente impiegata in campo oncologico ed è basata sull'azione di molecole fotosensibilizzanti in grado di accumularsi preferenzialmente a livello del tessuto tumorale e che esercitano un'azione citotossica quando eccitate ad opportune lunghezze d'onda.

La PUVA terapia e la terapia fotodinamica costituiscono attualmente due nuove ed importanti opzioni terapeutiche impiegate nella cura del cancro.

Sono stati identificati diversi composti ad azione fotosensibilizzante, alcuni dei quali presenti in commercio. Molti agenti fotoattivi, come ad esempio le clorofille, sono di origine naturale. Un altro gruppo di molecole è rappresentato dai poliacetileni, presenti abbondantemente nelle Asteraceae e nelle Apiaceae, e dai tiofeni, riscontrabili prevalentemente nelle piante appartenenti alla famiglia delle Asteraceae.

Nonostante queste prime scoperte, ancora poca attenzione è stata rivolta all'attività fototossica delle specie vegetali. Le risorse naturali sono ancora largamente inesplorate e da questo consegue che, potenzialmente, molti composti ad azione fotosensibilizzante utili in campo oncologico potrebbero essere ancora individuati.

In conformità a queste osservazioni, obiettivo dell'attività di ricerca è stato quello di individuare piante a specifica distribuzione geografica selezionate tra specie di particolare interesse per il loro elevato contenuto in principi attivi con proprietà fotosensibilizzanti.

Lo studio è stato dedicato, in particolare, ad alcune specie vegetali particolarmente ricche di furanocumarine, quali *Cachrys pungens* Jan e *Ficus carica* L. cv. Dottato. L'attenzione è stata rivolta, inoltre, allo studio di diversi campioni di *Hypericum perforatum* subsp. *veronense*, pianta che si caratterizza per l'elevata concentrazione di sostanze fotoattive potenzialmente utili in terapia fotodinamica, quali l'ipericina e le iperforine. Il contenuto fitochimico dei campioni in esame è stato analizzato mediante gas-cromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS) e cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (HPTLC).

Le proprietà fotobiologiche dei vari estratti sono state testate *in vitro* su linee cellulari tumorali umane di melanoma, allo scopo di individuare nuovi fitocomplessi e principi attivi potenzialmente applicabili in fotochemioterapia.

CAPITOLO 1

FOTOCHEMIOTERAPIA

1.1 INTRODUZIONE

I tumori della pelle costituiscono uno dei tipi più comuni di cancro e sono principalmente suddivisi in melanotici e non-melanotici. Questi ultimi comprendono i carcinomi a cellule basali e quelli a cellule squamose. A differenza dei tumori non melanotici, che hanno un decorso generalmente benigno, il melanoma è correlato ad un elevato tasso di mortalità (Narayanan et al., 2010). Secondo recenti indagini epidemiologiche, ogni anno si verificano nel mondo circa due o tre milioni di casi di tumori non melanotici, con un aumento medio annuo compreso tra il tre e l'otto per cento. Tra queste forme tumorali, il carcinoma a cellule basali costituisce il tumore più diffuso negli Stati Uniti. Tuttavia, poiché per la loro natura fondamentalmente benigna in alcuni casi queste patologie non sono diagnosticate, si ritiene che la loro incidenza sia sottostimata. Si calcola che oltre centotrentamila nuovi casi di melanoma si verifichino ogni anno nel mondo.

La cute è sensibile all'azione delle radiazioni ultraviolette comprese tra 250 e 400 nm. L'esposizione alla luce solare è considerata, insieme ai fattori genetici ed ereditari, uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di diverse malattie cutanee, e in particolar modo dei tumori della pelle (Moehrle, 2008). Tuttavia, sebbene le radiazioni ultraviolette siano considerate un importante fattore eziologico, la relazione tra dosaggio, tempi e natura dell'esposizione e lo sviluppo del tumore non è ancora chiara. D'altra parte, è ben noto che la luce solare possa esplicare anche degli effetti benefici, da sola o in combinazione con agenti chimici (Jones, 2005).

1.2 FOTOTERAPIA E FOTOCHEMIOTERAPIA

Il trattamento basato semplicemente sull'impiego della luce, che non richiede l'applicazione di agenti fotosensibilizzanti, è definito "fototerapia". Obiettivo della fototerapia è quello di sfruttare le azioni benefiche della radiazione luminosa riducendo al minimo gli effetti collaterali. Il termine "fotochemioterapia" è invece riferito ad una metodica terapeutica che richiede la somministrazione di un agente

fotosensibilizzante che può essere successivamente attivato da una radiazione luminosa (Marrelli et al., 2013c).

Il ricorso a questo tipo di trattamento risale a migliaia di anni fa. In India e in Egitto diverse piante, quali ad esempio *Psoralea corylifolia* L. e *Ammi majus* L., erano impiegate in combinazione all'esposizione alla luce solare per il trattamento di varie affezioni cutanee (Kar et al., 1990; Mitton & Ackroyd, 2008). Anche nella medicina tradizionale cinese varie piante, quali ad esempio *Angelica dahurica* (Fish. Ex Hoffm.), conosciuta in Cina con il nome di "BaiZhi" (Lee & Rasnussen, 2000), o i frutti di *Cnidium monnieri* L. (Li & Chen, 2004), erano impiegate per il trattamento di alcune patologie cutanee. Dioscoride, già nell'anno 50 a.C. aveva suggerito l'utilizzo delle foglie di fico (*Ficus carica* L.) per la cura della vitiligine (Bowers, 1999). L'impiego di queste piante nella medicina tradizionale per la loro attività fotosensibilizzante ha motivato una serie di studi volti all'identificazione delle molecole in esse presenti, e le ricerche condotte negli ultimi decenni hanno effettivamente consentito di identificare la presenza di varie furanocumarine, principi attivi ad azione fotosensibilizzante. Nel 1957 furono identificati per la prima volta i composti 8-metossipsoralene (8-MOP, **1**, Fig.1) e 5-metossipsoralene (5-MOP, bergaptene, **2**), e nello stesso anno alcuni pazienti furono trattati con 8-MOP e cicli di esposizione al sole (Liu et al., 2004; Roelandts, 2002; Wang et al., 2007a).

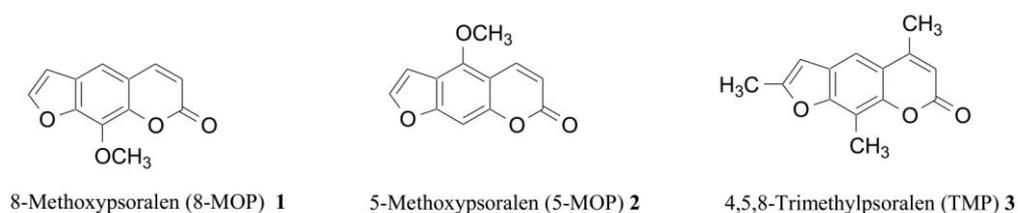


Fig. 1. Struttura chimica delle principali furanocumarine generalmente impiegate in PUVA terapia.

Negli ultimi anni molti studi sono stati dedicati all'analisi degli effetti terapeutici della radiazione luminosa e alle sue potenziali applicazioni cliniche. Alla fine del diciannovesimo secolo Downes e Blunt (1878) scoprirono l'efficacia della luce solare contro i batteri e Niels Finsen scoprì i possibili impieghi della radiazione luminosa nel trattamento del *lupus vulgaris* (Møller et al., 2005).

Differenti lunghezze d'onda possono essere utilmente impiegate in fotochemioterapia. Le radiazioni UV-B, ad esempio, non penetrano attraverso il derma, ma esercitano i loro effetti sui cheratinociti e sulle cellule di Langherans dell'epidermide e sono impiegate nel trattamento della psoriasi. La fototerapia che sfrutta invece radiazioni UV-A è impiegata per la cura della sclerodermia e dell'eczema atopico. Questo tipo di radiazione penetra più a fondo delle precedenti attraverso la pelle e determina la produzione di ossigeno singoletto, che può reagire con diversi tipi di molecole. Anche la luce visibile è utilizzata in medicina: essa è impiegata, infatti, nel trattamento dell'ittero neonatale (Jurkowitsch & Knobler, 2008). Nel corso degli ultimi decenni si sono registrati progressi significativi nella cura del cancro, ma ancora non si dispone di farmaci efficaci contro molti tipi di tumori. La PUVA terapia e la terapia fotodinamica costituiscono due nuove modalità terapeutiche che stanno assumendo notevole importanza in campo oncologico.

1.3 PUVA TERAPIA E FURANOCUMARINE

Il trattamento basato sull'impiego per via orale o topica di psoraleni ed esposizione ai raggi ultravioletti UV-A (320-360 nm) (Ebermann et al., 1996) è una forma di fotochemioterapia indicata con la sigla PUVA, attualmente impiegata nel trattamento del linfoma cutaneo a cellule T, della vitiligine e della psoriasi (Diffey, 2006). Gli psoraleni sono furanocumarine lineari. Le furanocumarine sono derivati del 5,6-benzo-2-pirone. Questi composti sono presenti soprattutto in piante che appartengono alle Apiaceae (Umbelliferae), come sedano e pastinaca, ma sono comuni anche in piante appartenenti alle famiglie Asteraceae, Fabaceae (Leguminosae), Lamiaceae, Moraceae (quali il fico), Poaceae, Rutaceae (come limone e bergamotto) e Solanaceae. Le furanocumarine presentano un anello furanico legato in posizione 6,7, caratteristico delle furanocumarine lineari come il bergaptene (5-metossipsoralene, 2), oppure 7,8, nei derivati angolari. Il contatto con piante contenenti livelli significativi di psoraleni, quali il prezzemolo (*Petroselinum crispum* L.) o la ruta (*Ruta graveolens* L.), può provocare reazioni avverse definite fitodermatiti (Dewick, 2001). Anche per il bergamotto sono stati descritte reazioni fototossiche (Bowers, 1999; Kaddu et al., 2001).

Negli ultimi decenni le proprietà biologiche e in particolare quelle fotobiologiche delle furanocumarine, inclusi lo spettro d'azione e gli effetti mutageni e cancerogeni, sono state oggetto di molteplici studi pubblicati su autorevoli riviste. Il meccanismo di fotosensibilizzazione di queste molecole sembra essere legato alla capacità di interferire con il DNA formando ponti fra le sue coppie di filamenti (Samuelsson, 2003). Gli psoraleni, a causa della loro struttura planare, si intercalano facilmente nel DNA, e questo consente una reazione di cicloaddizione promossa dalla radiazione UV tra le basi pirimidiniche (principalmente la timina) e l'anello furanico e pironico degli psoraleni (Dewick, 2001). La radiazione UV attiva infatti i doppi legami dello psoralene: quelli in posizione 3,4 reagiscono quindi con i doppi legami 5,6 della base pirimidinica di un filamento del DNA, mentre si verifica un'altra reazione fra i doppi legami 4',5' dell'anello furanico dello psoralene con la base pirimidinica del secondo filamento (Fig. 2). Le due catene dell'acido nucleico vengono dunque legate covalentemente e questo inibisce la replicazione e la trascrizione del DNA, impedendo la sintesi di RNA e proteine e quindi la divisione cellulare (Samuelsson, 2003).

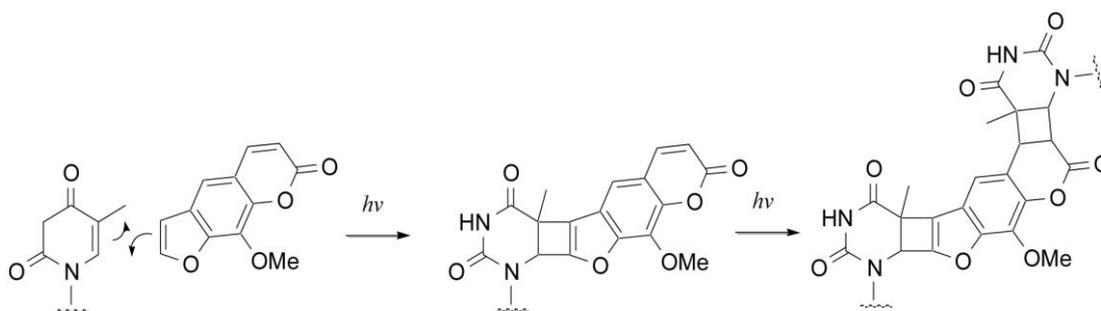


Fig.2. Schema dell'interazione degli psoraleni con la molecola di DNA.

La scoperta dell'interazione con gli acidi nucleici ha indotto i dermatologi ad impiegare questi composti nel trattamento della psoriasi, patologia caratterizzata da infiammazione della cute ed iperproliferazione dei cheratinociti. Recenti evidenze hanno dimostrato che gli effetti benefici della PUVA terapia non sono legati esclusivamente agli effetti antiproliferativi sulle cellule cutanee, ma anche all'azione su quelle coinvolte nella risposta immunitaria (Caffieri, 2001). Negli ultimi quindici

anni, in conformità a queste osservazioni, gli psoraleni stanno assumendo importanza non solo come sostanze fotosensibilizzanti, ma anche come agenti fotochemioprotettivi contro tumori e disturbi del sistema immunitario (Pathak, 1992). La PUVA terapia è attualmente impiegata, oltre che nel trattamento della vitiligine e della psoriasi, nella cura del linfoma cutaneo a cellule T (CTCL, *Cutaneous T-cell Lymphoma*), del *lichen planus*, del granuloma anulare, della malattia acuta da rigetto (GVHD, Graft Versus Host Disease) e della malattia di Grover (Jurkowitsch, 2008). Gli psoraleni sono impiegati inoltre nella fotochemioterapia extracorporea (fotoferesi), utilizzata nella prevenzione del rigetto dei trapianti, nel trattamento del linfoma cutaneo a cellule T e di patologie autoimmunitarie quali il lupus eritematoso e la sclerosi sistemica (Barraja et al., 2006). Questo tipo di fotochemioterapia può influenzare le cellule nucleate che circolano nel flusso sanguigno (Jurkowitsch, 2008).

E' stato ipotizzato che le furanocumarine possano agire non solo a livello del DNA, ma anche di altri *target* biologici quali proteine e lipidi. Questi composti, inoltre, provocano la formazione di specie reattive dell'ossigeno, che danneggiano i substrati biologici. Recentemente l'attenzione dei ricercatori è stata rivolta anche all'identificazione e allo studio dei prodotti formati dalla degradazione delle furanocumarine in seguito all'azione delle radiazioni, poiché è stato suggerito che tali molecole potrebbero possedere attività biologica (Caffieri, 2001). Per la loro capacità di interagire con il DNA, le furanocumarine sono inoltre impiegate quali utili strumenti nello studio della struttura degli acidi nucleici (Repanovici et al., 1997). Oggi è stata riconosciuta loro anche un ruolo quali agenti antivirali, in particolar modo contro herpes simplex e il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) (Hesse & Kirsch, 2003).

Infine, recenti evidenze hanno dimostrato che le furanocumarine presentano anche proprietà farmacologiche indipendenti da quelle fotobiologiche. Sembra, ad esempio, che esse potrebbero essere utili nel trattamento della sclerosi multipla, per la loro capacità di bloccare i canali del potassio (Vedaldi et al., 2004).

I composti generalmente impiegati in terapia sono l'8-metossipsoralene (8-MOP), il 5-metossipsoralene (5-MOP) ed il 4,5',8-trimetilpsoralene (TMP, **3**, Fig. 1). Tuttavia queste molecole, in virtù della loro natura bifunzionale, presentano alcuni effetti collaterali quali eritema e genotossicità (Marzano et al., 2002). Sono stati quindi

studiati diversi derivati monofunzionali, in particolar modo analoghi dell'angelicina (iso-psoraleni), la cui struttura angolare previene, per motivi geometrici, la formazione di legami crociati con il DNA, e alcuni di questi composti mostrano un'evidente attività antiproliferativa ed effetti genotossici più bassi di quelli determinati dagli psoraleni (Mosti et al., 1998; Conforti et al., 2009a).

1.4 TERAPIA FOTODINAMICA (PDT, *PHOTODYNAMIC THERAPY*)

1.4.1 Introduzione

La terapia fotodinamica (PDT, *Photodynamic Therapy*) è una modalità di trattamento basata sull'azione di molecole fotosensibilizzanti (PS, *photosensitizer*) in grado di accumularsi preferenzialmente a livello del tessuto tumorale e che esercitano un'azione citotossica quando eccitate ad opportune lunghezze d'onda (Vrouenraets et al., 2003). I composti fotosensibilizzanti sono molecole non tossiche che possono essere somministrate per via topica o sistemica, e il cui uso è seguito dall'esposizione della zona interessata dalla patologia alla luce visibile (generalmente luce rossa). In presenza di ossigeno, i composti fotosensibilizzanti provocano la formazione di molecole citotossiche che inducono la morte del tessuto tumorale (Castano et al., 2004).

I primi studi su questa modalità terapeutica sono stati pubblicati all'inizio del XX secolo, quando fu dimostrata per la prima volta l'attività di alcuni agenti fotosensibilizzanti come i coloranti derivati dell'anilina e l'arancio di acridina (4, Fig. 3) (Gold, 2011).

La terapia fotodinamica può essere utile per il trattamento di diverse patologie, sebbene essa sia principalmente impiegata in campo oncologico. Alcuni tumori della pelle sono attualmente spesso trattati con PDT (Jurkowitsch, 2008). L'uso di agenti fotosensibilizzanti in oncologia è stato approvato per i tumori della testa e del collo e anche per quelli che possono essere raggiunti endoscopicamente (Wolfsen, 2005). Tumori attualmente trattati con PDT o per i quali inizia ad essere ipotizzato un possibile impiego riguardano, ad esempio, l'esofago, le ossa, il seno, i polmoni, la vescica e perfino il cervello (Jurkowitsch, 2008).

La PDT sembra essere interessante soprattutto per il trattamento dei tumori cutanei. L'acido aminolevulinico (ALA, *aminolevulinic acid*, **5**, Fig. 3) ed il metilaminolevulinato (MAL, *methyl aminolevulinate*, **6**) sono due importanti composti approvati per il trattamento del cancro della pelle (Bissonnette, 2011; Zeitouni et al., 2010).

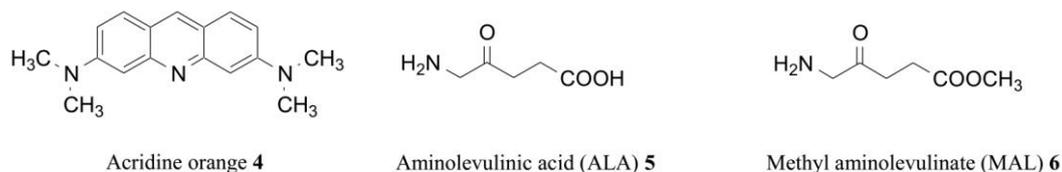


Fig.3. Struttura chimica dei primi agenti fotosensibilizzanti impiegati in PDT.

Alcuni composti fotoattivi, come l'acido aminolevulinico, sono strumenti utili anche per la diagnosi fotodinamica (PDD, *Photodynamic Diagnosis*). La PDD sfrutta la fluorescenza per localizzare il tessuto tumorale ed è in grado di rilevare lesioni neoplastiche che non possono essere viste con i metodi convenzionali (Jocham et al., 2008).

Si definisce “azione fotodinamica” un tipo di fotosensibilizzazione che richiede la partecipazione di ossigeno molecolare. Tuttavia questo termine è ora impiegato per descrivere qualunque forma di fototerapia che utilizzi un agente fotosensibilizzante esogeno, anche se non è dimostrata una effettiva azione fotodinamica (Jones, 2005). Le lunghezze d'onda tipicamente impiegate nella PDT si trovano nella regione del rosso o vicino all'infrarosso (600-800 nm), poiché queste radiazioni sono in grado di penetrare più in profondità nei tessuti umani e, a differenza delle lunghezze d'onda minori, causano minore fotosensibilizzazione della pelle (Castano et al., 2004; Allison & Sibata, 2010). Sono necessarie lunghezze d'onda superiori ai 600 nm anche perché molte molecole endogene, come l'emoglobina, assorbono la luce a lunghezze d'onda inferiori ai 600 nm, e potrebbero ridurre la quantità di luce che penetra nei tessuti da trattare (Schmidt-Erfurth & Hasan, 2000).

1.4.2 Meccanismi d'azione

1.4.2.1 Produzione di specie reattive dell'ossigeno

L'azione citotossica degli agenti fotosensibilizzanti è legata alla loro capacità di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Quando una molecola fotoattiva assorbe energia luminosa essa passa dal suo stato elettronico fondamentale ad uno stato eccitato. Per una molecola organica lo stato fondamentale è generalmente uno stato di singoletto S_0 , in cui tutti gli elettroni sono accoppiati. L'assorbimento della radiazione luminosa induce la formazione di uno stato di singoletto eccitato S_1 . Il tempo di vita dello stato di singoletto eccitato è molto breve (dell'ordine dei nanosecondi) e la molecola ritorna allo stato fondamentale emettendo fluorescenza oppure disperdendo l'energia sotto forma di calore (Cavrini & Andrisano, 2013). L'emissione di fluorescenza è sfruttata nella diagnosi fotodinamica (Allison & Sibata, 2010).

Tra i vari processi di disattivazione dello stato di singoletto eccitato esiste la "conversione intersistema" (*intersystem crossing process*), cioè la transizione di uno stato di singoletto eccitato ad uno di tripletto. Il decadimento dello stato eccitato di tripletto allo stato fondamentale S_0 può avvenire attraverso l'emissione di radiazione definita in questo caso di fosforescenza. A causa della minore energia dello stato di tripletto rispetto a quello di singoletto eccitato S_0 , la fosforescenza si verifica ad energie più basse (e quindi lunghezze d'onda maggiori) rispetto alla fluorescenza. Lo stato di tripletto eccitato, inoltre, è caratterizzato da un tempo di vita molto più lungo (dal microsecondo al secondo) di quello del singoletto eccitato (Cavrini & Andrisano, 2013). Questo tempo è sufficiente per permettere fenomeni di trasferimento energetico e di carica a molecole circostanti, con la generazione di specie citotossiche. Queste ultime possono formarsi mediante due tipologie di reazioni. Nelle reazioni di tipo I avviene un trasferimento elettronico dal fotosensibilizzatore nello stato di tripletto eccitato a vari substrati biologici quali lipidi, steroidi ed aminoacidi aromatici, con conseguente formazione di specie radicaliche che a loro volta reagiscono con l'ossigeno molecolare per produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi intermedi, come il radicale ossidrilico $\cdot\text{OH}$, l'anione superossido $\cdot\text{O}^{2-}$ e l'acqua ossigenata H_2O_2 , sono altamente reattivi e forti ossidanti.

Nelle reazioni di tipo II, invece, l'energia è trasferita dal fotosensibilizzatore nello stato di tripletto direttamente all'ossigeno molecolare per formare ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), che ha un ruolo chiave nella terapia fotodinamica.

Durante il trattamento possono avvenire entrambi i processi (Castano et al., 2004; Allison & Sibata, 2010) e le specie radicaliche prodotte causano la morte delle cellule tumorali mediante induzione di apoptosi o necrosi (Castano et al., 2005a).

Le cellule tumorali possono sviluppare alcuni meccanismi protettivi in grado di ridurre, in alcuni casi, gli effetti citotossici della PDT, come ad esempio un aumento dei livelli di molecole antiossidanti espresse nei tessuti tumorali (ad esempio glutathione, vitamina C ed E) oppure l'espressione di enzimi che possono inattivare i ROS. Per esempio, in vari tipi di cellule tumorali, è stato osservato un aumento dell'attività dell'enzima superossido dismutasi in seguito a terapia fotodinamica (Agostinis et al., 2011).

Un altro parametro che può limitare la distruzione diretta delle cellule è costituito dalla disponibilità di ossigeno nei tessuti trattati. La terapia fotodinamica comporta inevitabilmente il consumo di ossigeno molecolare (Detty et al., 2004). Per risolvere questo problema è oggi utilizzata una emissione frazionata della luce, che consente il rifornimento di ossigeno durante i periodi di buio (Dougherty et al., 1998).

In terapia possono essere utilizzate differenti sorgenti luminose. Attualmente sono maggiormente impiegate le lampade a diodi con emissione rossa oppure i laser, indispensabili per il trattamento di tessuti tumorali che possono essere raggiunti solo mediante impiego di fibre ottiche (Zeitouni et al., 2003; Stylli & Kaye, 2006; Marrelli et al., 2013c).

1.4.2.2. Danno vascolare e risposta infiammatoria ed immunitaria

La terapia fotodinamica è anche in grado di danneggiare il sistema vascolare associato al tessuto tumorale, privando i tessuti di ossigeno e nutrienti, con conseguente distruzione del tumore. Il danno vascolare indotto è utile, in particolar modo, per il controllo a lungo termine del cancro, perché esso determina una persistente ipossia. Agenti fotosensibilizzanti diversi possono indurre diversi effetti a livello vascolare, come ad esempio vasocostrizione o formazione di trombi. La distruzione del tessuto tumorale indotta dalla terapia fotodinamica è anche legata ad una forte reazione infiammatoria che interviene durante il trattamento. L'azione

fotocitotossica, infatti, può non essere necessariamente letale per le cellule, ma al contrario costituire uno stimolo infiammatorio (Castano et al., 2005a; Juarranz et al., 2008, Marrelli et al., 2013c). Il danno ossidativo a carico dei lipidi di membrana, ad esempio, determina il rilascio di mediatori dell'infiammazione quali i metaboliti dell'acido arachidonico (Dougherty et al., 1998).

Infine, a differenza di molti altri trattamenti antitumorali, la terapia fotodinamica è in grado di stimolare una risposta immunitaria contro le cellule tumorali, un altro importante fenomeno nel controllo a lungo termine della patologia. I macrofagi e le cellule dendritiche in grado di fagocitare le cellule tumorali morte o danneggiate costituiscono cellule presentanti l'antigene, che presentano il peptide antigenico complessato con le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità sulla loro superficie, consentendo ai linfociti T di riconoscerlo. Questo fenomeno determina una risposta immunitaria contro il tumore (Korbelik, 1996).

In virtù della risposta infiammatoria ed immunitaria che essa induce, la terapia fotodinamica può essere utilmente impiegata in associazione ad alcuni protocolli di immunoterapia per il controllo a lungo termine del cancro (Dougherty et al., 1998).

1.4.2.3. Localizzazione selettiva nel tessuto tumorale

È stato dimostrato che gli agenti fotosensibilizzanti si localizzano preferenzialmente nelle cellule tumorali, sebbene i meccanismi che sottendono a questo fenomeno non siano stati ancora del tutto compresi (Croce et al., 2002).

Questa selettività sembra essere verosimilmente correlata alle proprietà del tessuto tumorale, quali la struttura anormale dello stroma, caratterizzato da un sistema vascolare anormale, un ampio spazio interstiziale ed un drenaggio linfatico insufficiente (Dougherty et al., 1998).

A seconda della loro carica ionica, dimensioni molecolari e solubilità, gli agenti fotosensibilizzanti possono entrare nelle cellule con meccanismi diversi, e spesso mostrano selettività per specifici organuli. Ad esempio, i coloranti anionici si accumulano nelle membrane plasmatiche e nel citoplasma, mentre quelli cationici legano il DNA e le membrane mitocondriali. Anche il tempo necessario affinché l'agente fotosensibilizzante si accumuli varia in base al tipo di molecola impiegata (Jones, 2005). La localizzazione intracellulare è cruciale per l'insorgenza di un effetto citotossico, poiché il danno indotto dalla PDT avviene in prossimità delle molecole

eccitate, la cui emivita è generalmente molto breve. Conseguentemente, affinché possa esplicare un effetto terapeutico, un composto fotoattivo deve essere localizzato vicino al suo *target* biologico (Oleinick et al., 2002; Dougherty et al., 1998; Jones, 2005).

La terapia fotodinamica non induce danno al DNA, mutazioni e carcinogenesi, poiché i composti utilizzati non si accumulano a livello del nucleo cellulare (Dougherty et al., 1998).

La localizzazione preferenziale dei composti fotosensibilizzanti nel tessuto tumorale determina l'alta selettività contro le cellule tumorali tipica della PDT. Inoltre, la luce viene irradiata solo sulle lesioni che devono essere trattate, e ciò contribuisce ulteriormente alla selettività della terapia (Castano et al., 2005b). L'irradiazione che segue la somministrazione di un agente fotosensibilizzante è realizzata appositamente dopo un periodo necessario per l'assorbimento del composto attivo nelle cellule tumorali, in modo che i ROS possano essere formati direttamente nel tessuto tumorale (Lang et al., 2004).

Una delle strategie che può consentire di aumentare la capacità di un PS di attraversare la membrana plasmatica è quella di realizzare delle modificazioni strutturali della molecola. I derivati modificati agiscono da substrati fluorogenici che possono essere convertiti da enzimi specifici nelle molecole attive corrispondenti (Panzarini et al., 2011; Bottioli et al., 1997).

1.4.3 Morte cellulare

Entrambi i meccanismi di morte cellulare, apoptosi e necrosi, sono stati osservati *in vitro* ed *in vivo* dopo terapia con agenti fotosensibilizzanti. Il tipo di morte cellulare dipende da diversi fattori, quali la localizzazione subcellulare del composto fotoattivo ed il tipo di cellula trattata. La risposta infiammatoria indotta dalla PDT può indurre apoptosi nei tessuti tumorali (Agostinis et al., 2002).

Generalmente, basse dosi inducono apoptosi mentre dosi maggiori provocano la necrosi nei tessuti trattati.

Esiste anche un terzo meccanismo di morte cellulare, definito "bystander effect". È stato osservato *in vitro* che gli effetti citotossici si manifestano non solo nelle cellule trattate, ma anche in quelle vicine, propagati attraverso una catena di cellule

adiacenti. L'effetto *bystander* si riferisce infatti alle risposte biologiche osservate in cellule non irradiate quando cellule vicine vengono colpite dalle radiazioni. Si ritiene che alla base di questo effetto vi sia la comunicazione spaziale tra cellule irradiate e non attraverso il terreno di coltura oppure *gap junction*, sebbene le molecole che mediano questa comunicazione non siano state ancora individuate (Castano et al., 2005b).

1.4.4 Applicazioni cliniche della PDT

1.4.4.1. Tumori cutanei

La prima applicazione clinica della PDT risale al 1903, quando von Tappeiner e Jesionek testarono gli effetti del colorante eosina (**7**, Fig. 4) in combinazione all'esposizione alla luce solare nel trattamento del cancro della pelle (Von Tappeiner, & Jesionek, 1903). Nel 1960 Lipson sintetizzò il derivato dell'ematoporfirina (HPD, *hematoporphyrin derivative*), il primo farmaco impiegato in terapia fotodinamica, ottenuto dalla reazione tra l'ematoporfirina (**8**) ed un acido forte (Lipson et al., 1961). Questo farmaco è in realtà costituito da una miscela di molecole che includono monomeri, dimeri e oligomeri dell'ematoporfirina (Detty et al., 2004). La fototerapia fu approvata negli anni Sessanta e l'impiego della PDT in oncologia è aumentato a partire dal 1980 (Jones, 2005).

La terapia fotodinamica è stata approvata per il trattamento della cheratosi attinica, del carcinoma basocellulare superficiale, del carcinoma basocellulare nodulare e del carcinoma a cellule squamose *in situ* (malattia di Bowen).

Queste forme tumorali rientrano nei tumori epiteliali della cute non melanoma, e sono alcune delle neoplasie più comuni nella popolazione bianca. Sono disponibili varie tecniche per il trattamento di questi tumori cutanei, ma la PDT ha dimostrato i migliori risultati da un punto di vista estetico e, pertanto, risulta essere preferibile ai trattamenti invasivi (Zeitouni et al., 2010; Sidoroff & Thaler, 2010).

Negli Stati Uniti, l'uso di acido aminolevulico (Levulan® Kerastick®, acido aminolevulinico HCl per soluzione topica, 20%, DUSA Pharmaceuticals, Inc., **9**) in combinazione all'esposizione alla luce blu visibile (BLU-U®, DUSA Pharmaceuticals, Inc.) è stato approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*)

per il trattamento della cheratosi attinica. In Australia e Regno Unito, il metilaminolevulinato (MAL, Metvix[®], metil aminolevulinato cloridrato crema 160 mg/g, 16,0%, PhotoCure ASA, **10**) è utilizzato allo stesso scopo in associazione ad irradiazione con luce rossa (570-670 nm) ed è stato approvato anche contro altri tipi di tumori cutanei non melanoma (Zeitouni et al., 2010; Tarstedt et al., 2005; Rivard & Ozog, 2006).

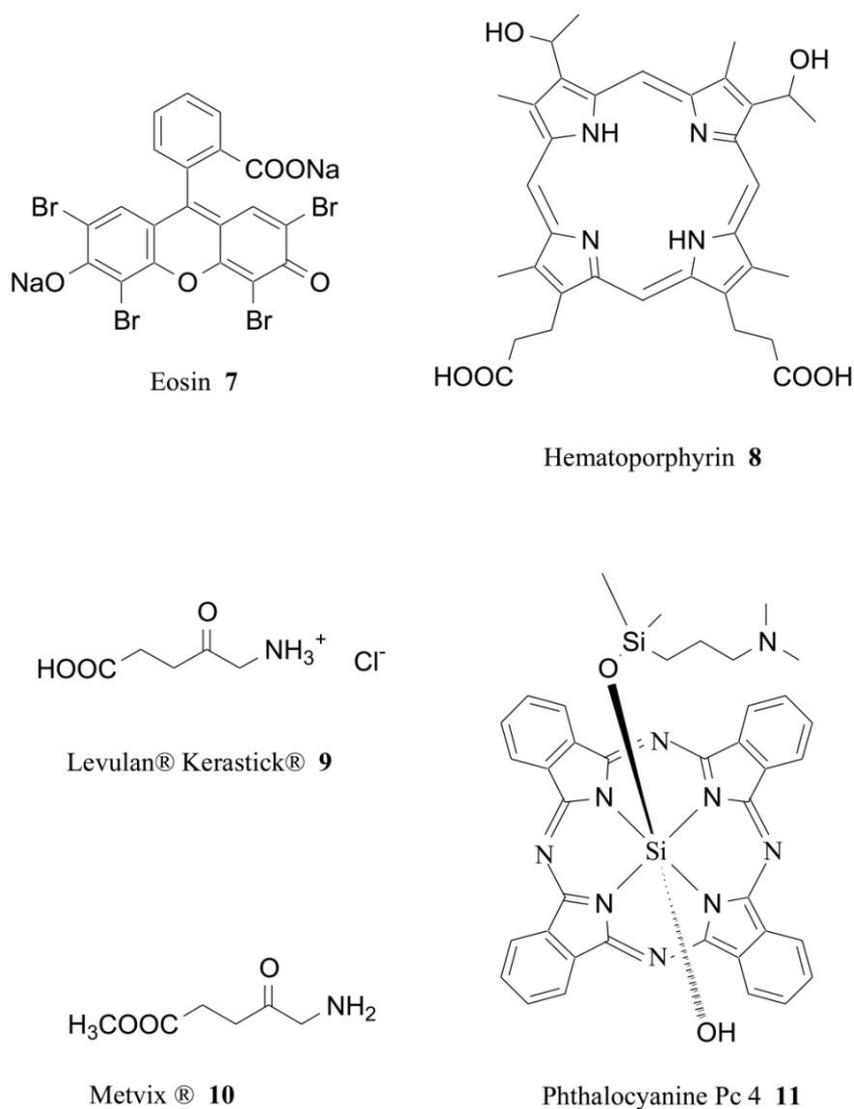


Fig. 4. Alcuni PS impiegati nel trattamento dei tumori cutanei.

La terapia con acido 5-aminolevulinico è stata utilizzata con successo anche in alcuni casi di linfoma cutaneo a cellule T, in particolar modo la micosi fungoide. Anche la Ftalocianina di silicone Pc 4 (**11**) ha mostrato dei buoni risultati preliminari.

Lo scopo della terapia è quello di eliminare il cancro garantendo al contempo un risultato estetico accettabile. Tuttavia, sebbene la terapia fotodinamica offra un miglior risultato estetico, l'assenza di controllo istologico è un'importante limitazione di questo trattamento non invasivo. La terapia fotodinamica, infatti, non consente la conferma istologica dell'eliminazione completa del tumore.

Al contrario, il tumore può essere asportato chirurgicamente insieme ad un margine variabile di tessuto sano, che può essere esaminato istologicamente. Per queste ragioni, la terapia fotodinamica è generalmente utilizzata per trattare tumori a basso rischio (Telfer et al., 2008).

1.4.4.2. Altri tumori

L'uso di agenti fotosensibilizzanti in oncologia è stato approvato anche per il trattamento di tumori che possono essere raggiunti per via endoscopica ed irradiati utilizzando fibre ottiche (Wolfsen, 2005). Alcune forme tumorali che sono già trattate con PDT o per le quali l'applicazione sembra possibile riguardano l'esofago, l'osso, la mammella, il polmone, la vescica e anche il cervello (Jurkowitsch & Knobler, 2008).

Nel trattamento del cancro del polmone, per esempio, i farmaci fotoattivi sono somministrati per iniezione e l'irradiazione è eseguita in anestesia mediante fibre laser flessibili che trasmettono la luce di opportuna lunghezza d'onda. Molti fattori, come ad esempio le dimensioni non uniformi delle biforcazioni tracheobronchiali, rendono la dosimetria molto complessa, ma diversi studi di fase II hanno dimostrato il potenziale curativo della PDT del tumore del polmone in fase iniziale (Sutedja & Postmus, 1996; Kato, 1998).

La PDT è una modalità di trattamento efficace anche contro il carcinoma nasofaringeo, anche se, a causa della difficoltà di accesso alle cavità nasofaringea e alla sua complessa ed irregolare geometria, anche in questo caso è molto difficile ottenere un'esposizione ottimale alla sorgente luminosa (Wildeman et al., 2009).

Hopper e colleghi hanno confrontato il costo e l'efficacia della terapia fotodinamica con quelli della chemioterapia palliativa e dell'intervento chirurgico palliativo in pazienti con tumori della testa e del collo. La PDT ha mostrato i migliori risultati, consentendo un aumento dell'aspettativa di vita ed un risparmio economico (Hopper et al., 2004). In un altro studio, la PDT ha determinato un significativo effetto

palliativo nel 53% dei pazienti con cancro orale avanzato. Sorprendentemente, nonostante la natura avanzata della malattia, il controllo completo del tumore è stato ottenuto nel 17% dei pazienti (Hopper, 2000).

La PDT mostra anche ottimi risultati in pazienti debilitati. È stato dimostrato, ad esempio, che essa costituisce un ottimo trattamento complementare nella cura di pazienti anziani o debilitati affetti da aggressivi tumori cutanei non melanomatosi della testa e del collo, ovviando alla necessità di effettuare interventi di chirurgia ricostruttiva (Schweitzer, 2009).

1.4.4.3. Altre applicazioni in dermatologia ed oftalmologia

Sebbene la terapia fotodinamica sia impiegata prevalentemente in oncologia, altre malattie possono essere trattate con questa modalità terapeutica (Ibbotson et al., 2004). La PDT è indicata attualmente per il trattamento di infezioni virali cutanee correlate al virus del papilloma umano (HPV), come condilomi acuminati, verruche delle mani e dei piedi, verruche periungueali ed epidermodisplasia verruciforme. L'efficacia della PDT in questo tipo di infezioni è legata all'attività dei radicali citotossici generati, che danneggiano i cheratinociti infetti inducendone l'apoptosi selettiva o la necrosi. Tuttavia, anche altri tipi di infezioni, come l'herpes simplex ed il mollusco contagioso, possono essere trattati con la terapia fotodinamica. L'efficacia della PDT è stata dimostrata, inoltre, contro altre condizioni patologiche quali l'acne e la cheilite attinica, una lesione precancerosa causata dalla prolungata esposizione alle radiazioni ultraviolette (Choudhary et al., 2009).

In ambito dermatologico la PDT è applicata anche nella cura della psoriasi, anche se in questo caso essa non costituisce una terapia di prima scelta a causa del dolore che insorge durante il trattamento (Taub, 2007).

In oftalmologia, la PDT è applicata nel trattamento della degenerazione maculare senile, una patologia causata dalla proliferazione di nuovi vasi sanguigni al di sotto della retina e che porta alla cecità. La terapia fotodinamica induce apoptosi nelle cellule endoteliali dei vasi proliferanti. L'agente fotosensibilizzante utilizzato, la verteporfina, è somministrato con una serie di 3-6 trattamenti nel corso di uno o due anni. Nel 2000 questo trattamento è stato approvato dalla FDA ed è stato utilizzato in più di un milione di casi (Taub, 2007).

La terapia fotodinamica è anche considerata uno strumento utile per la disinfezione dei prodotti del sangue (PACT, *photodynamic antimicrobial chemotherapy* chemioterapia fotodinamica antimicrobica antimicrobica) (Wainwright , 1998).

1.4.4.4. Effetti collaterali

La terapia fotodinamica non provoca gli effetti collaterali che caratterizzano la chemioterapia e la radioterapia e può essere utilizzata anche in associazione a queste modalità terapeutiche convenzionali o alla chirurgia senza compromettere la loro efficacia.

La PDT è intrinsecamente molto sicura: l'applicazione di ALA in quantità da 0,05 g/cm² a 0,2 g/cm², per esempio, non causa livelli misurabili di porfirine nell'uomo. L'effetto collaterale più importante è rappresentato da una reazione fototossica caratterizzata da dolore durante alcuni protocolli di trattamento e fotosensibilizzazione cutanea persistente (Agostinis et al., 2011; Choudhary et al., 2009).

Il dolore e gli effetti infiammatori, citotossici ed immunomodulatori della PDT sembrano essere correlati alla reazione fotochimica che porta alla generazione di specie reattive dell'ossigeno, ma il meccanismo che spiega questo fenomeno non è ancora del tutto noto (Ibbotson, 2011). Altri effetti indesiderati comuni della PDT includono sensazioni di bruciore o formicolio legati all'esposizione alla fonte di luce. A volte possono essere osservati anche eritema, edema e formazione di croste e vescicole. Queste reazioni fototossiche possono presentare intensità variabile e sono esacerbate dall'esposizione al sole o a potenti luci artificiali nei due giorni che seguono l'applicazione topica (Choudhary et al., 2009).

Tra gli effetti collaterali a breve termine sono da annoverare iperpigmentazione ed ipopigmentazione, orticaria e dermatite da contatto (Choudhary et al., 2009). Inoltre, sebbene la PDT topica sia meno frequentemente associata ad infezioni rispetto ad altri approcci non chirurgici convenzionali, come la crioterapia, anche questa eventualità deve essere considerata. La terapia fotodinamica è solitamente il trattamento di scelta per la sua superiorità in termini di risultato estetico rispetto ad altri approcci non chirurgici convenzionali. Tuttavia, sebbene raramente, essa può causare la formazione di eventuali cicatrici nelle zone trattate. Per quanto riguarda i

rischi a lungo termine, anche per la PDT, come per altre terapie antitumorali, esistono diverse teorie su eventuali effetti cancerogeni. La PDT topica è stata utilizzata a partire dal 1990 e in letteratura sono riportati alcuni casi isolati dello sviluppo di tumori della pelle nei siti trattati. In conclusione, fino ad oggi, non è stato rilevato nessun effetto causale o sinergico di questa terapia sul rischio di cancro della pelle (Ibbotson, 2011).

1.5 MOLECOLE IMPIEGATE IN TERAPIA FOTODINAMICA O STUDIATE PER LE LORO POTENZIALI APPLICAZIONI

I composti fotoattivi utilizzati in PDT, come ad esempio l'ipericina, presentano uno spettro di assorbimento esteso alla regione del rosso e del vicino infrarosso (600-800 nm): queste lunghezze d'onda possono penetrare efficacemente i tessuti animali permettendo così di trattare le porzioni più profonde del tumore (Camerin et al., 2010). Per evitare un'eccessiva fotosensibilizzazione cutanea i composti impiegati devono inoltre presentare un assorbimento minimo tra 400 e 600 nm (luce diurna). Inoltre, un buon agente fotosensibilizzante non dovrebbe indurre effetti tossici al buio (Castano et al., 2004), non deve essere tossico, e deve essere stabile nei confronti dell'ossidazione indotta dai ROS che vengono prodotti (Lang et al., 2004). Un primo gruppo di agenti fotoattivi impiegati in PDT è costituito dai derivati porfirinici, che sono ulteriormente classificati in tre classi. L'ematoporfirina (Hp) ed i suoi derivati sono stati i primi PS utilizzati (Paszko et al., 2011). La fotosensibilizzazione indotta da questa molecola fu scoperta nel 1913 da Meyer-Betz, che ne testò su se stesso gli effetti. Nel 1924 fu scoperta la peculiare tendenza delle porfirine ad accumularsi nel tessuto tumorale e nel 1960 Lipson e Baldes sintetizzarono l'ematoporfirina derivato (HPD). La forma più importante di HPD è il farmaco Photofrin® (**12**, Fig. 5), che può essere considerato il precursore dei moderni agenti fotosensibilizzanti impiegati in PDT (Allison & Sibata, 2010; Nyman & Hynninen, 2004).

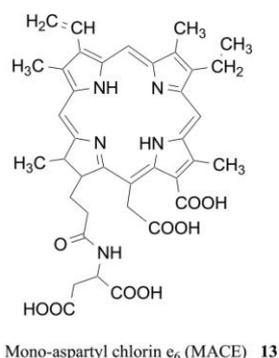
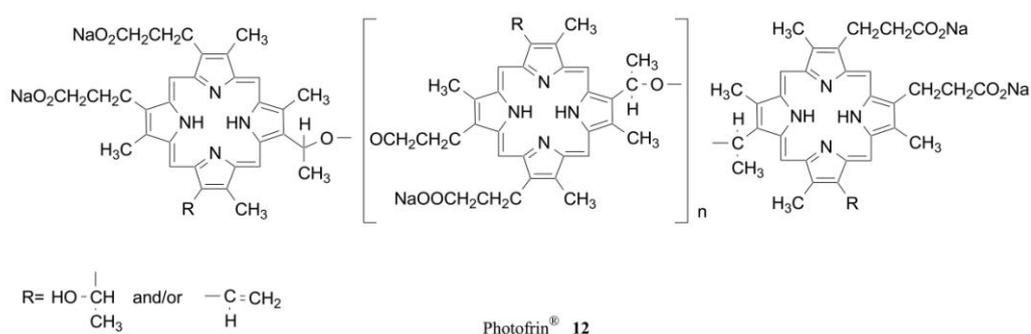


Fig. 5. Struttura chimica dei composti Photofrin[®] e mono-aspartil clorina e₆.

L'introduzione di questo farmaco ha dato il via, infatti, allo sviluppo di una seconda generazione di agenti fotosensibilizzanti, quali ad esempio la mono-aspartil clorina e₆ (MACE, mono-aspartyl chlorin e₆, **13**) (Boyle & Dolphin, 1996).

Questa classe di farmaci, che comprende porfirine, ftalocianine, naftalocianine, clorine e batterioclorine (Fig. 6), induce minore tossicità rispetto a quella precedente. Queste molecole mostrano anche un maggiore assorbimento tra 650 e 800 nm, con una penetrazione ottimale nei tessuti e, dal momento che il loro tempo di accumulo è più breve, non causano fotosensibilità cutanea prolungata (Nyman & Hynninen, 2004).

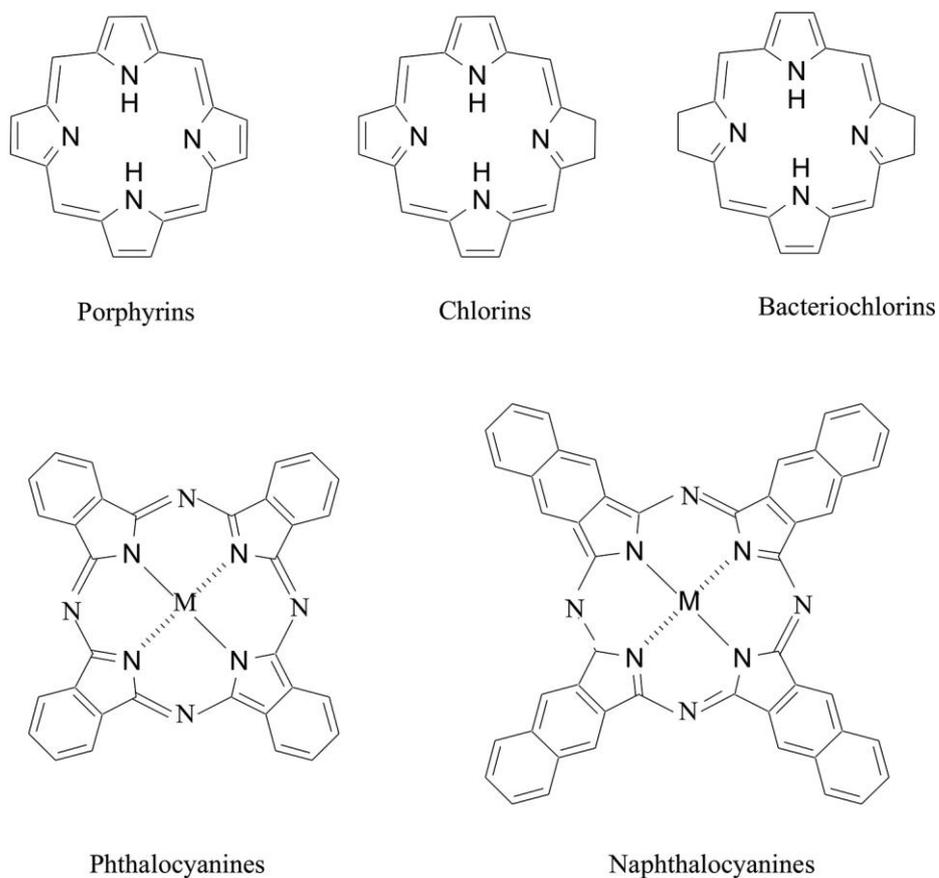


Fig. 6. Struttura di porfirine, ftalocianine, naftalocianine, clorine e batterioclorine.

Un importante agente fotosensibilizzante di seconda generazione è l'acido aminolevulinico (ALA, *aminolevulinic acid*, **5**). Questo composto è un intermedio della biosintesi di tetrapirroli e porfirine, un gruppo di molecole che include l'eme e le clorofille. Questo profarmaco è convertito in protoporfirina IX, precursore dell'eme. La somministrazione esogena di ALA può dunque indurre significativi livelli intracellulari di protoporfirina IX, che è un efficace fotosensibilizzante (Fukuda et al., 2005).

Molti di questi composti, tuttavia, sono idrofobici e, di conseguenza, obiettivo della ricerca attualmente in corso è quello di ottenere una terza generazione di agenti fotosensibilizzanti: queste molecole sono dei profarmaci o sono coniugati a molecole *carrier* che trasportano i PS ai tessuti tumorali (Paszko et al., 2011).

Composti fotoattivi non porfirinici interessanti sono costituiti dai poliacetileni, presenti in Asteraceae e Apiaceae e dai tiofeni, rinvenuti soprattutto nelle Asteraceae (Fig. 7).

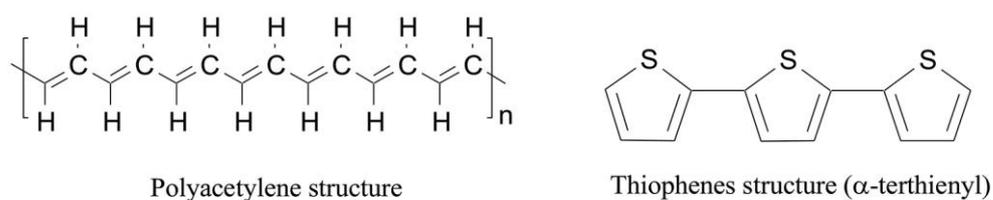


Fig. 7. Struttura di poliacetilene e tiofeni.

Gli antrachinoni ipericina (**14**, Fig. 8), il principale composto fotoattivo presente in *Hypericum perforatum*, e fagopirina (**15**) sono altri importanti PS (Spikes et al., 1999).

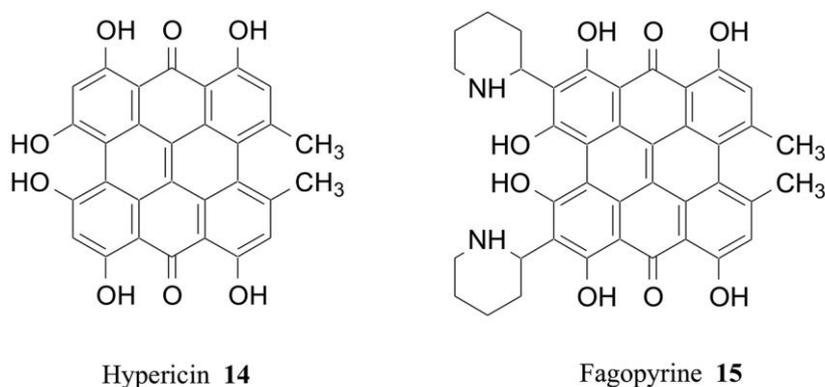


Fig. 8. Alcuni importanti antrachinoni con proprietà fotosensibilizzanti.

Sono stati ottenuti e studiati per la loro attività fotosensibilizzante anche molti composti di sintesi, come i coloranti rosa bengala (**16**) ed il blu di toluidina (**17**) (Fig. 9) (Spikes et al., 1999; Tremblay et al., 2002).

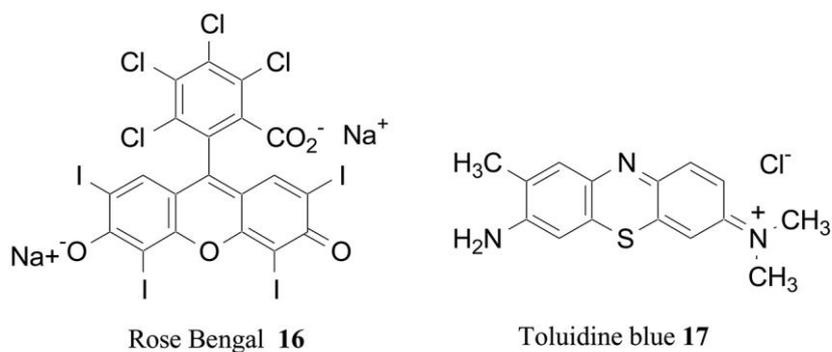


Fig. 9. Alcuni agenti fotosensibilizzanti di origine sintetica.

1.5.1. Porfirine

La struttura di molti pigmenti naturali è caratterizzata dalla presenza di un nucleo aromatico tetrapirrolico. Queste molecole incluso l'eme, sono chiamate "porfirine", e raggiungono il massimo assorbimento alla lunghezza d'onda di 630 nm. La combinazione delle porfirine con il ferro determina la formazione dell'eme, il gruppo prostetico dell'emoglobina e dei citocromi, mentre l'inserimento di un atomo di magnesio nel nucleo tetrapirrolico porta alla formazione della clorofilla (Castano et al., 2004; Fukuda et al., 2005).

La scoperta delle potenziali applicazioni delle porfirine risale al 1911, quando Hausman scoprì che l'ematoporfirina attivata dalla radiazione luminosa poteva indurre fotosensibilizzazione nel topo e nella cavia. Successivamente fu dimostrato che questa molecola è in grado di concentrarsi maggiormente in alcuni tessuti tumorali della pelle piuttosto che nei tessuti normali circostanti (Gold, 2011).

Nel 1978 Dougherty e collaboratori dimostrarono che il derivato dell'ematoporfirina (HpD) costituiva un potenziale farmaco nel trattamento dei tumori cutanei (Dougherty et al., 1978). In Canada, nel 1993, questa molecola fu il primo agente fotosensibilizzante approvato per l'applicazione clinica e, successivamente, fu approvato negli Stati Uniti, in Europa ed in Giappone (Detty et al., 2004).

I composti in cui il doppio legame di uno degli anelli pirrolici è ridotto sono classificati come "clorine". Lo spettro di assorbimento di queste molecole è compreso tra 650 e 690 nm (Castano et al., 2004). La clorofilla (**18**, Fig. 10), ad esempio, presenta un anello clorinico e questa molecola ed i suoi analoghi sono degli attivi agenti fotosensibilizzanti (Ebermann et al., 1996). Un interessante derivato clorinico è l'etere esilico del pirofeoforbide a "HPPH" (*2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a*, **19**) che, in uno studio di fase I, ha mostrato attività contro il cancro del polmone (Allison & Sibata, 2010).

Un importante derivato clorinico è l'agente fotosensibilizzante MACE (*monoaspartyl chlorin e₆*, anche noto come Photolon, LitxTM, ApoptosinTM e NPe6, **13**) un composto idrofilico attivo a 664 nm (Allison & Sibata, 2010; Boyle and Dollphin, 1996).

Un altro potente composto fotoattivo appartenente alla famiglia delle clorine è il temoporfin (**20**), un farmaco disponibile in commercio (Foscan®, Biolitec Pharma Ltd). Questo PS è utile contro il tumore della testa e del collo, anche se causa una prolungata fotosensibilizzazione della pelle (Allison & Sibata, 2010).

Il Verteporfin (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals, **21**), un derivato benzoporfirinico, è un potente PS di seconda generazione e rappresenta un modello esemplare per la terapia fotodinamica. Questo agente fotosensibilizzante di tipo clorinico è attivato a 690 nm ed è rapidamente eliminato: infatti, dopo iniezione, presenta un'emivita di circa sei ore ed è eliminato dall'organismo entro ventiquattro ore. Questo farmaco danneggia le cellule endoteliali neovascolari ed è utilizzato nel trattamento della degenerazione maculare senile, una patologia degenerativa che causa cecità irreversibile. Il verteporfin ha anche mostrato attività contro vari tumori cutanei (Allison & Sibata, 2010; Schmidt-Erfurth & Hasan, 2000; Awan & Tarin, 2006).

Sono stati descritti molti derivati sintetici delle porfirine. Un gruppo interessante di molecole è costituito dalle ftalocianine, seguito dalle naftalocianine. Le ftalocianine presentano un alto assorbimento nella regione UVA dello spettro elettromagnetico, con un massimo a 350 nm, e nella regione del visibile tra 650 e 700 nm, con un massimo a 670 nm (Kolarova et al., 2007).

Questi composti assorbono la luce a lunghezze d'onda maggiori dei derivati ematoporfirini e questo può provocare diversi danni alle cellule dopo il trattamento. Le ftalocianine hanno una struttura porfirinica con un atomo centrale costituito da zinco, silicio o alluminio, che aumentano la produzione di ossigeno singoletto. A causa della loro idrofobicità questi PS sono somministrati mediante liposomi (Allison & Sibata, 2010; Kolarova et al., 2007).

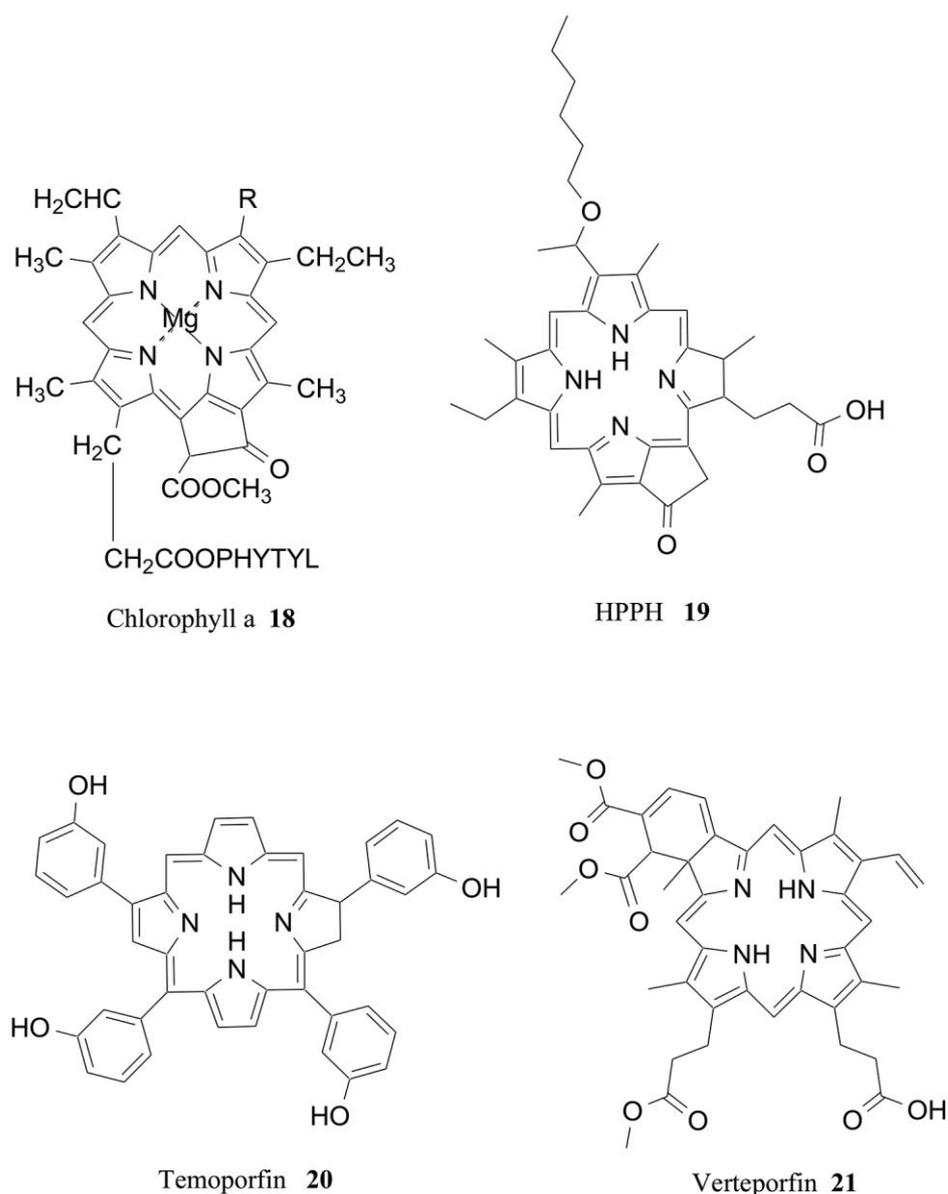


Fig. 10. Struttura di alcuni derivati clorinici.

1.5.1.1 Photofrin[®] (Porfimer Sodium)

Il Photofrin (*Porfimer Sodium*, Axcan Pharma, **12**, Fig. 5) è un efficace derivato dell'ematoporfirina costituito da una miscela di monomeri, dimeri ed oligomeri derivati dalla parziale purificazione e da modificazioni chimiche dell'ematoporfirina. Tale miscela è formata da circa sessanta composti e questa complessità la rende difficilmente riproducibile (Detty et al., 2004). Questo farmaco è attivo a 630 nm, ma può essere attivato anche alla lunghezza d'onda di 408 nm (luce blu) e 510 nm (luce

verde). Quarantotto ore dopo l'iniezione, il Photofrin si accumula nei tessuti tumorali e l'irradiazione induce la distruzione del sistema vascolare tumorale. L'inconveniente nell'impiego di questo composto è costituito dal fatto che esso persiste nei tessuti per circa quattro-sei settimane, causando una prolungata fotosensibilizzazione. L'impiego di questo PS è stato approvato in molti paesi per il trattamento dei tumori cutanei, della vescica, del polmone e dell'esofago (Allison & Sibata, 2010; Awan & Tarin, 2006).

1.5.1.2 Acido aminolevulinico (ALA) e metil aminolevulinato (MAL)

L'introduzione dell'acido 5-aminolevulinico (*5-aminolevulinic acid*, ALA, **5**) da parte di Kennedy e collaboratori è stata una grande scoperta nella storia della terapia fotodinamica. Questo composto è un profarmaco convertito nelle cellule della pelle nella sua forma attiva, la protoporfirina IX (PPIX) (Kennedy et al, 1990). L'ALA è stato il primo derivato porfirinico per uso topico: esso può infatti essere somministrato per via topica, orale ed intravenosa, ed è attivo a 630 nm (Biel, 1996; Peng et al, 1997). L'acido aminolevulinico è un aminoacido endogeno sintetizzato attraverso differenti vie biosintetiche: negli animali, nei lieviti e nei funghi questo composto deriva dal succinato e dalla glicina, mentre nelle piante, nelle alghe e in molti batteri esso è sintetizzato partendo dal glutammato (Beale, 2006). L'ALA è un intermedio nella sintesi dei tetrapirroli, che avviene sia negli animali che nelle piante e richiede diversi step catalizzati da enzimi. Questo processo richiede otto molecole di ALA: due di esse condensano a formare un anello pirrolico chiamato porfobilinogeno. Quattro anelli si uniscono per formare il protoporfirinogeno IX, che è successivamente ossidato a protoporfirina IX, un attivo fotosensibilizzante.

La somministrazione di ALA può determinare significativi livelli intracellulari di protoporfirina IX, poiché la conversione ad eme di questa molecola è limitata ed essa tende ad accumularsi. Inoltre, questo composto tende ad essere più concentrato nei tessuti neoplastici piuttosto che nelle circostanti cellule normali, sebbene i motivi che spiegano questo fenomeno non siano stati ancora completamente chiariti (Allison & Sibata, 2010; Ishizuka et al., 2011).

L'accumulo di protoporfirina IX nel tumore causa fluorescenza rossa in seguito ad irradiazione. Di conseguenza, questo composto è utile sia in PDT che in diagnosi

fotodinamica (PDD). L'ALA (GliolanTM), infatti, è disponibile in commercio in Europa per la diagnosi del glioma (Ishizuka et al., 2011).

L'impiego di ALA in PDT è stato valutato nel trattamento dei tumori cutanei, come ad esempio i carcinomi a cellule basali e a cellule squamose ed il linfoma cutaneo a cellule T, ma anche nella cura di altri tipi di tumori, quali quello della vescica, dell'endometrio, della cavità orale, dell'esofago e persino del cervello. L'impiego di questa molecola sembra essere promettente anche nel trattamento di patologie non tumorali come la psoriasi e l'alopecia areata (Fukuda et al., 2005).

L'ALA non è in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari a causa della sua natura idrofila e, per questo motivo, è stato inizialmente utilizzato solo per il trattamento delle patologie cutanee. Uno degli obiettivi della ricerca è quello di ottenere nuovi derivati dell'acido aminolevulinico, in modo da aumentare l'assorbimento del farmaco (Casas et al., 2002; Fotinos et al., 2006; Casas & Batle, 2006). Uno di questi derivati lipofili è l'estere **22** (ALA Undecanoyl ester, Und-ALA Fig. 11). Sfortunatamente, anche queste molecole non hanno mostrato un'attività eccellente poiché inducono bassi livelli di porfirine, probabilmente a causa della loro ritenzione nello strato corneo. Attualmente sono in corso di sviluppo nuovi formulati a base di liposomi dell'acido aminolevulinico che hanno lo scopo di migliorare le proprietà farmacocinetiche del farmaco (Di Venosa et al., 2009).

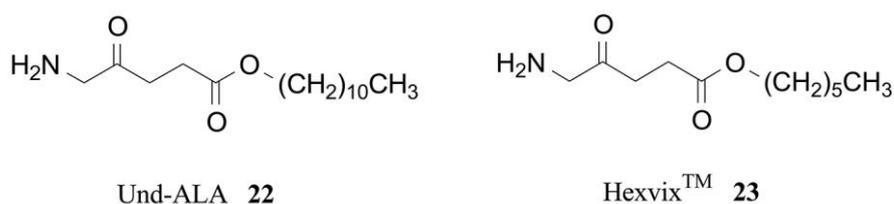


Fig. 11. Derivati dell'acido aminolevulinico.

Il metil aminolevulinato (*methyl-ester-5-ALA*, MAL, Metvix[®], PhotoCure ASA, **10**) è un estere dell'acido aminolevulinico, che è convertito ad ALA da enzimi intracellulari. Questo composto ha una maggiore lipoficità dell'acido aminolevulinico e può penetrare maggiormente nei tessuti da trattare. Molti studi clinici hanno dimostrato un'eccellente attività contro i tumori non melanoma della

pelle e le lesioni precancerose, e questo composto è stato approvato per la prevenzione ed il trattamento delle cheratosi attiniche (Bissonnette, 2011; Wiegell et al., 2006).

La somministrazione topica di ALA (Levulan[®], DUSA Pharmaceuticals, Inc.) e di MAL (Metvix[®], PhotoCure ASA) è stata approvata dalla *Food and Drug Administration* per il trattamento e la prevenzione delle cheratosi attiniche. La *European Medicines Agency* (EMA) e la *Food and Drug Administration* hanno inoltre approvato l'impiego di un derivato esil estere dell'ALA (Hexvix[™], PhotoCure, **23**) per la diagnosi del cancro papillare della vescica (Bissonnette, 2011; Ishizuka et al., 2011).

1.5.2. Molecole non porfiriniche

1.5.2.1 Ipericina ed altri antrachinoni

Tra i composti di origine naturale, altri agenti fotosensibilizzanti molto importanti sono costituiti da composti diversi dai derivati tetrapirrolici. L'ipericina, isolata dall'*Hypericum perforatum* L. e da altre trecento specie appartenenti al genere *Hypericum*, è uno dei più potenti agenti fotosensibilizzanti ritrovati in natura (Skalkos et al, 2006). L'ingestione dell'iperico, infatti, causa una reazione fototossica nota come "ipericismo" (Barnes et al., 2001). In queste piante sono stati identificati altri derivati naftodiantronici, denominati "ipericine", quali la pseudoipericina (**24**), la protoipericina (**25**) e la protopseudoipericina (**26**) (Skalkos et al., 2006).

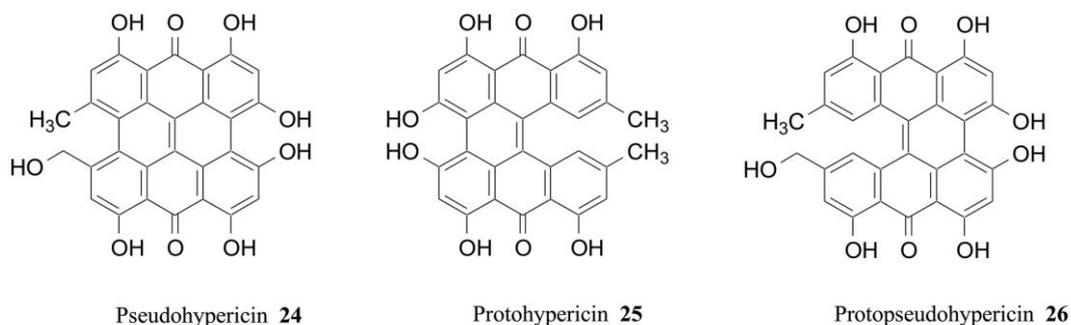


Fig. 12. Ipericine.

L'ipericina ha mostrato attività antitumorale sia *in vitro* sia *in vivo* dopo irradiazione a 595 nm (Skalkos et al., 2006). Questa molecola si accumula nelle membrane di vari organuli, inclusi i lisosomi, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi (Theodossiou et al., 2009). In base a queste osservazioni, si ritiene che le membrane biologiche siano il principale *target* cellulare dell'ipericina. Molti studi *in vitro* hanno dimostrato che dopo irradiazione l'ipericina induce perossidazione delle membrane lipidiche, inibisce la proteina chinasi C, danneggia le funzioni mitocondriali, aumenta i livelli di superossido dismutasi e diminuisce quelli di glutatione (Agostinis et al., 2002).

Molti studi hanno provato che la fotoattivazione di questo composto a concentrazioni nanomolari induce apoptosi e necrosi delle cellule tumorali. Agostinis e collaboratori hanno dimostrato che un aumento della concentrazione di ipericina e della dose di luce utilizzata causa il passaggio dall'apoptosi alla necrosi. I *trials* clinici condotti hanno confermato le potenzialità dell'ipericina nella terapia fotodinamica per il trattamento dei carcinomi a cellule basali ed a cellule squamose e del linfoma cutaneo a cellule T. A causa della sua lipofilità questo composto è somministrato per via topica e non per via intravenosa (Agostinis et al., 2002).

1.5.2.2 Poliacetileni e tiofeni

I poliacetileni ed i tiofeni, loro derivati, sono due gruppi di composti fotoattivi di origine naturale. I poliacetileni sono presenti soprattutto nelle Asteraceae e nelle Apiaceae (Ebermann et al., 1996). Molte di queste molecole esercitano un effetto insetticida dopo irradiazione con lunghezze d'onda nella regione del vicino ultravioletto (Guillet et al., 1997). Ad esempio, il composto *phenylheptatriyne* (**27**, Fig. 13), presente nelle foglie delle specie *Bidens* e *Coreopsis* (Hudson & Towers, 1991b), esercita effetti fototossici contro molti batteri e funghi. Il problema nell'impiego di questi composti, come ad esempio l'ictiotereolo (**28**), è dato dal fatto che essi esercitano i loro effetti anche al buio (Ebermann et al., 1996).

I composti **29** (*trans-1,3,5,11-tridecatetraen-7,9-diyne*) e **30** (*1,cis-3,trans-5,trans-11-tridecatetraen-7,9-diyne*), isolati dalle foglie di *Viguiera annua* (M.E. Jones) Blake (Asteraceae), sono altri due esempi di poliacetileni fotoattivi (Guillet et al., 1997).

I tiofeni sono invece presenti nelle Compositae e l'attivazione di questi composti avviene intorno a 300-400 nm. L'attività nematocida del tertienile, ad esempio, è favorita dalla luce e questo composto è risultato essere attivo anche contro *Candida albicans* (Ebermann et al., 1996).

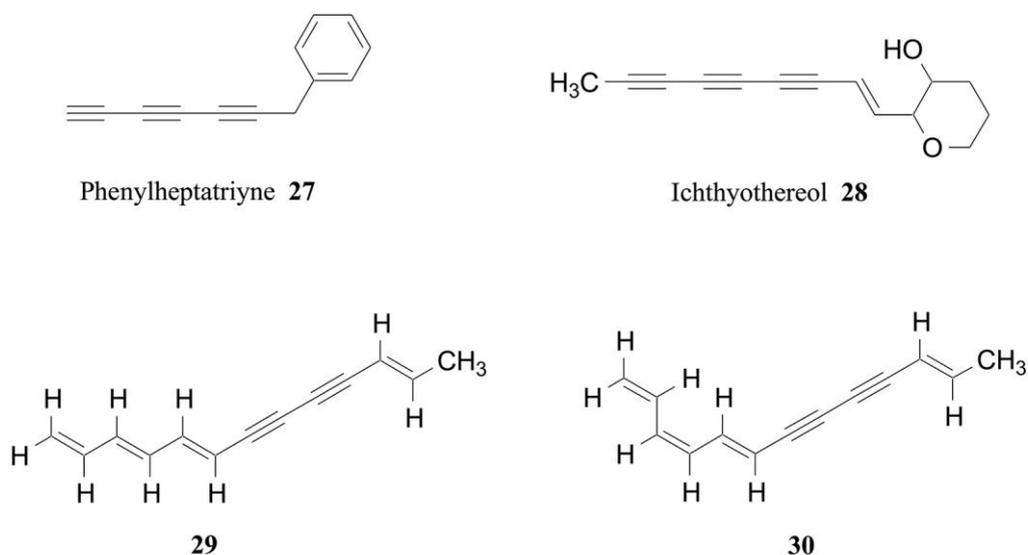


Fig. 13. Struttura di alcuni poliacetileni.

1.5.2.3 Altri agenti fotosensibilizzanti di origine naturale

Gli agenti fotosensibilizzanti di origine naturale includono anche altri composti, diversi dai precedenti, come ad esempio alcuni alcaloidi quali la berberina (**31**) e la sanguinarina (**32**, Fig. 14).

Questi alcaloidi fototossici includono le beta-carboline, comuni nelle Rutaceae e nelle Simaroubaceae. Un esempio è dato dall'alcaloide armano (**33**).

Altri esempi sono costituiti dalle furano chinoline, come i composti dictamina (**34**) e skimmianina (**35**), presenti in *Dictamnus alba* L. e altre Rutaceae (Hudson & Towers, 1991b).

Alcuni studi più recenti sono stati dedicati allo studio delle proprietà fotobiologiche della feoforbide a (**36**), un prodotto di degradazione della clorofilla. Questa molecola deriva dalla rimozione di un gruppo fitile e di uno ione magnesio dalla clorofilla a e può essere purificato da molte fonti, come la pianta *Scutellaria barbata* D. Don (Ban

Zhi Lian, BZ), impiegata nella medicina tradizionale cinese, o la specie *Psychotria acuminata* Benth. (Bui-Xuan et al., 2010).

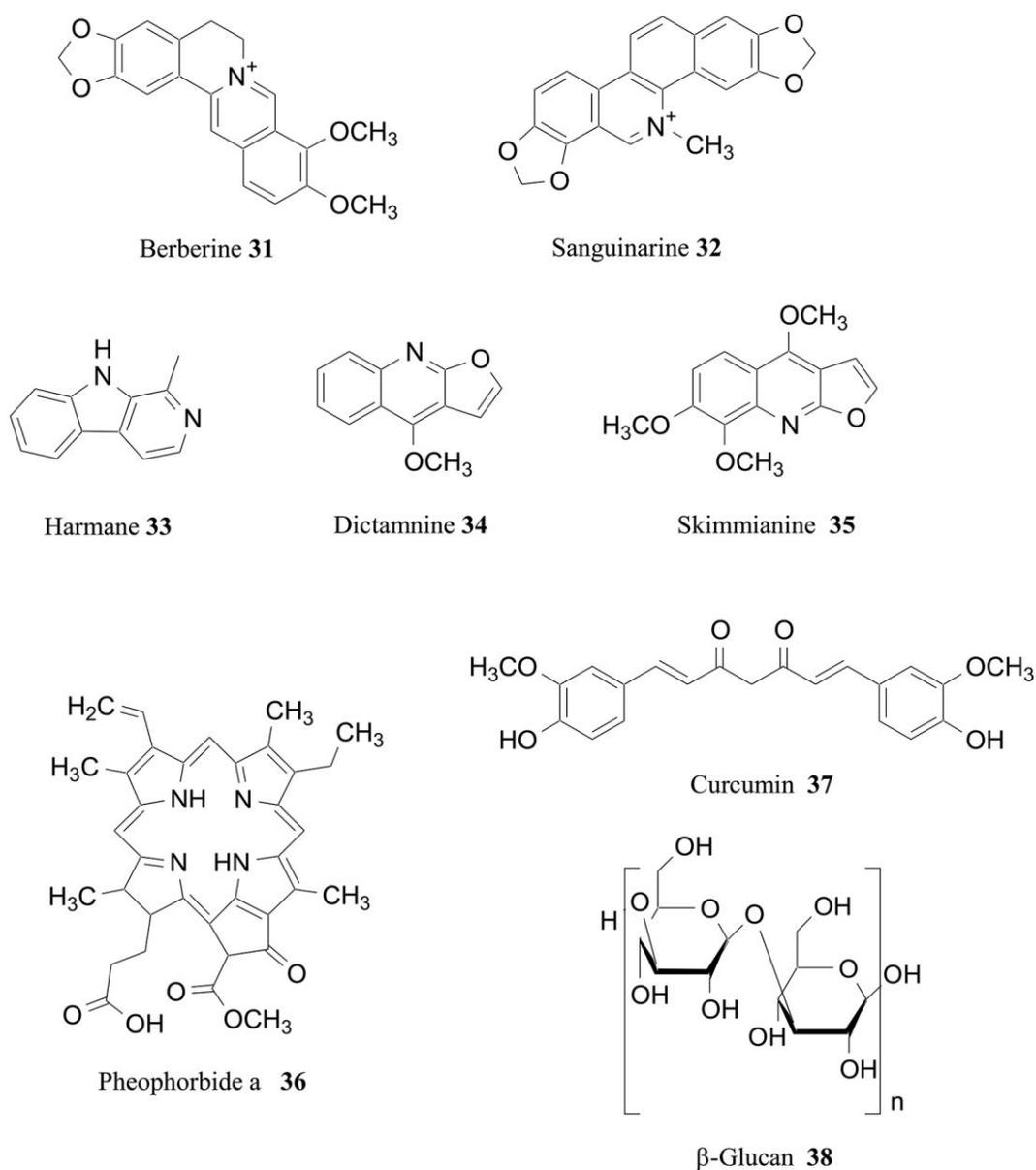


Fig. 14. Struttura di alcuni PS di origine naturale.

La feoforbide è un agente fotosensibilizzante attivo contro diverse linee cellulari tumorali umane. E' stato dimostrato, infatti, che la fotoattivazione di questo composto induce apoptosi nelle cellule tumorali linfocitiche umane Jurkat (Lee et al., 2004) e che esso è efficace contro le cellule di tumore mammario MDA-MB-231 (Bui-Xuan et al., 2010) e di adenocarcinoma del colon HT29 (Hajri et al., 2002).

Altri studi hanno evidenziato le proprietà fotobiologiche della curcumina (**37**), un composto naturale isolato dal rizoma di *Curcuma longa* L., pianta impiegata nella medicina tradizionale asiatica. Gli effetti di questa molecola sono stati utilmente testati contro la flora microbica della cavità orale, in associazione alla lunghezza d'onda di 450 nm (luce blu). In base ai risultati ottenuti, questo tipo di trattamento sembrerebbe una valida alternativa alle altre terapie impiegate per ridurre i rischi di infezioni post-operatorie (Araújo et al., 2012). La feoforbide ha dimostrato i suoi effetti fotocitotossici anche su diverse cellule tumorali, sia *in vitro* che *in vivo* (Dujic et al., 2009; Koon et al., 2006).

Studi molto interessanti sono stati condotti, inoltre, sulle potenziali applicazioni in PDT del β -glucano (**38**) dell'orzo. In esperimenti condotti su modelli animali è stato osservato, infatti, che la cosomministrazione di Photofrin[®] e β -glucano potenzia gli effetti fotocitotossici della terapia fotodinamica (Akramiene et al., 2009).

Vari antrachinoni con proprietà fotosensibilizzanti (**39-44**, Fig. 15) sono stati poi isolati dalla *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae), la cui ingestione provoca negli animali una caratteristica reazione fototossica caratterizzata da dermatite e, nei casi più gravi, cecità (Núñez Montoya et al., 2008).

Comini e colleghi (2011) hanno studiato l'attività fotodinamica delle molecole rubiadina (**45**) e *soranjidiol* (**46**) e dei loro derivati metilati **39** e **40**. Questi PS sono stati testati su cellule di carcinoma mammario umano MCF-7 irradiate a 420 nm ad una dose di 1 J/cm². Tutte le molecole saggiate hanno mostrato attività in modo concentrazione dipendente, mentre nessun effetto è stato osservato in assenza di radiazione luminosa.

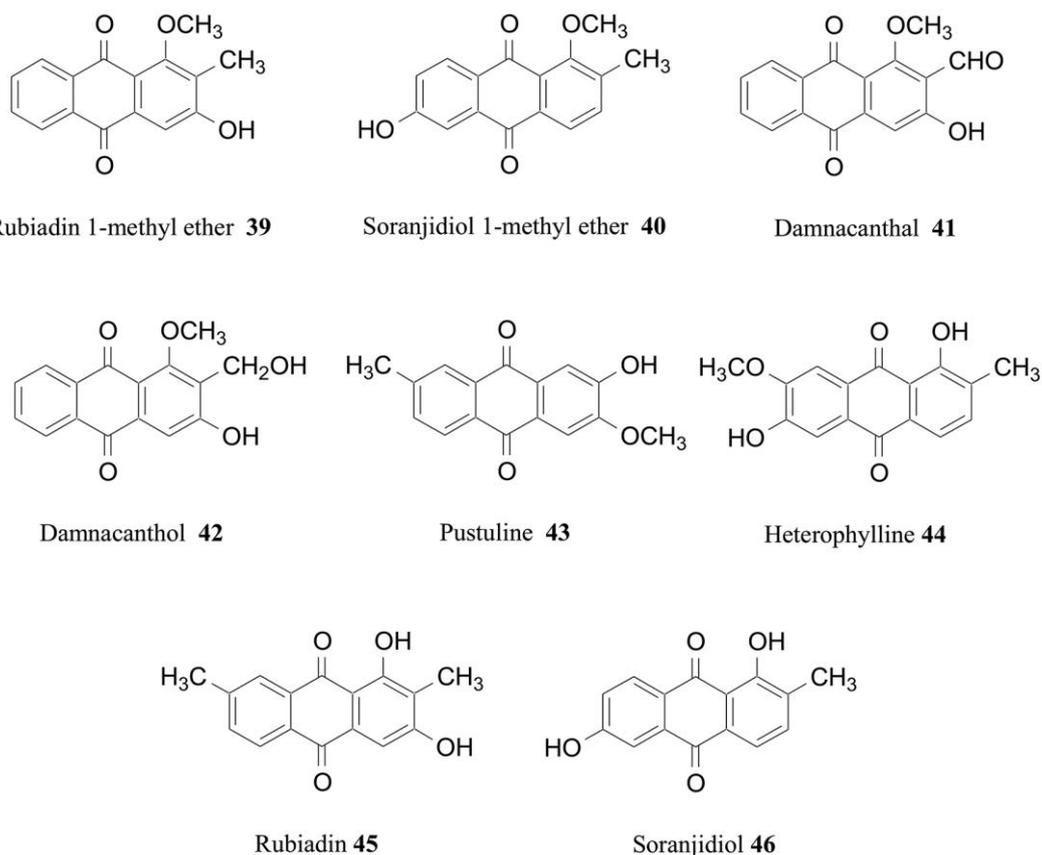


Fig. 15. Alcuni antrachinoni ad attività fotosensibilizzante.

Proprietà fotosensibilizzanti sono state anche evidenziate per alcuni tiofeni (**47-50**) isolati dalle radici di *Echinops latifolius* Tausch (Fig. 16). Queste molecole sono state testate contro le linee cellulari tumorali umane A375-S2 ed HeLa. Tutti questi composti hanno mostrato attività in combinazione a radiazioni UVA, con valori di IC₅₀ da 3,1 a 13,5 mmol/l (Wang et al., 2007b).

Altre due molecole di origine vegetale che presentano proprietà fototossiche sono il composto **51** (*15^l-hydroxypurpurin-7-lactone ethyl methyl diester*, Fig. 16), che ha mostrato attività *in vitro* contro le linee cellulari tumorali di carcinoma orale HSC2 e HSC3 e di carcinoma nasofaringeo HK1 e c666-1 (Kim et al., 2003), e l'aloemodina (**52**, Fig. 16), che si è dimostrata in grado di indurre effetti fotocitotossici *in vitro* contro le cellule umane di osteosarcoma U2OS e di fibrosarcoma HT-1080 (Cárdenas et al., 2006).

L'aloe emodina è un idrossiantrachinone isolato da varie piante, tra cui l'*Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) (Cárdenas et al., 2006). Anche la fototossicità di questa molecola è stata testata con risultati positivi su fibroblasti umani in associazione a luce UV e luce visibile. Nel corso di questo studio sono stati analizzati anche gli effetti fototossici dell'Aloina A (**53**), il C-glicoside dell'aloe emodina. I risultati ottenuti hanno dimostrato che aloina A non è direttamente fotocitotossica: i fibroblasti cutanei umani possono trasformare l'aloina A in aloe emodina, che è il metabolita farmacologicamente attivo dell'aloina e dei sennosidi (Wamer et al., 2003).

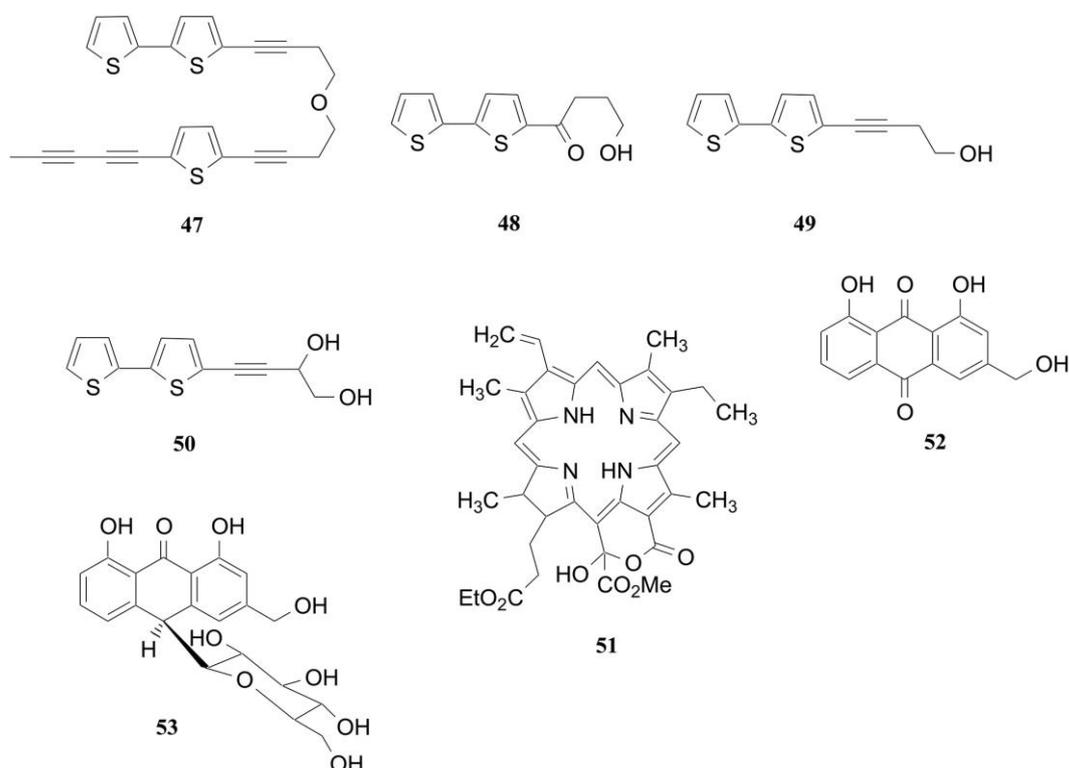


Fig. 16. Struttura chimica di alcuni composti recentemente studiati per le loro proprietà fotobiologiche.

1.6 ESTRATTI VEGETALI CON PROPRIETÀ FOTOCITOTOSSICHE

Numerosi studi sulla terapia fotodinamica, i suoi effetti e le sue applicazioni sono stati pubblicati negli ultimi dieci anni, ma una minore attenzione è stata rivolta alle proprietà fotobiologiche degli estratti vegetali e dei composti fototossici di origine

naturale. Solo recentemente la crescente importanza attribuita alla PDT ha determinato un interesse significativo della ricerca nei confronti degli estratti vegetali, con l'obiettivo di individuare nuovi composti naturali potenzialmente utili in terapia o che potrebbero comunque costituire un modello per la sintesi di nuovi farmaci (Marrelli et al., 2013c).

Ong e collaboratori (2009), ad esempio, hanno di recente analizzato *in vitro* le proprietà fototossiche di novantatre piante provenienti dalla Malesia. Ventuno estratti hanno mostrato una promettente attività contro la linea cellulare di leucemia HL60, tra cui gli estratti di *Micromelum minutum* (G.Forst.) Wight & Arn., *Irvingia malayana* Oliv. ex Benn., *Knema curtisii* Warb. e *Dysoxylum sericeum* (Blume) Adelb.

Anche la specie *Lonicera japonica* T. ha mostrato effetti fotocitotossici. Gli estratti ottenuti da questa pianta sono stati testati sulla linea cellulare CH27 (carcinoma polmonare) irradiate con lunghezze d'onda nell'intervallo 400-700 nm e alle dosi di 0,4 , 0,8 e 1,2 J/cm². La pianta non ha mostrato alcuna tossicità al buio, mentre ha indotto significativi effetti citotossici in associazione ad irradiazione (Leung et al., 2008).

CAPITOLO 2

SPECIE VEGETALI CON POTENZIALI APPLICAZIONI IN FOTOCHEMIOTERAPIA

2.1 *CACHRYS PUNGENS* JAN

2.1.1 Aspetti botanici

Il genere *Cachrys* appartiene alla famiglia delle Apiaceae (Umbelliferae), che comprende 300 generi e 2500-3000 specie che si distinguono per la presenza di caratteristiche infiorescenze (Wiart, 2006).

Le piante appartenenti a questa famiglia sono dicotiledoni, generalmente erbacee, raramente arbusti o piccoli alberi. Le foglie sono alterne, senza stipole, di solito partite (tripartite o variamente pennate). I fiori sono riuniti in infiorescenze ad ombrella, spesso polimorfe, in posizione terminale e laterale.

Il calice risulta interamente saldato all'ovario e qualche volta presenta alla sommità cinque denti; la corolla è costituita da cinque petali liberi; l'androceo è formato da cinque stami inseriti su una formazione circolare; l'ovario, infero e bicarpellare, porta due stili nettariiferi e possiede due logge con un ovulo anatropo. Il frutto è un diachenio che presenta da cinque a nove coste sporgenti, talvolta tubercolate o spinose; tra due coste si trova un avvallamento in corrispondenza del quale, profondamente nel tessuto, esistono canali resiniferi chiamati vitte (Vallusi, 2005).

Il genere *Cachrys* è ampiamente presente in Europa e Asia (Tutin et al., 1968; Zohary, 1972). In Italia sono state rinvenute cinque specie, tutte con distribuzione meridionale: *C. sicula* L., *C. libanotis* L., *C. cristata* DC., *C. ferulacea* (L.) Calestani e *C. pungens* Jan.

La prima specie è anche denominata "basilisco dentellato". Questa pianta presenta un fusto eretto, striato, di circa 150 cm. Le foglie basali presentano una guaina larga 1,5 cm e una lamina pennatosetta, completamente divisa in segmenti lineari, che sono scabri sul bordo. Ha ombrelle a 20-30 raggi. Questa pianta presenta, inoltre, numerose brattee, mentre i petali sono gialli e brevi. Il frutto è piriforme, lungo e largo con coste dorsali dentellate. Fiorisce generalmente tra giugno e luglio. Questa pianta è presente in Puglia, Basilicata, Calabria e Sicilia (Pignatti, 1982).



Fig. 1. *Cachrys sicula* L.

La specie *C. libanotis* L., invece, è denominata “basilisco liscio” ed è molto simile alla precedente. Presenta delle foglie lisce a segmento breve. Le ombrelle sono a 8-15 raggi. Anche questa specie fiorisce tra giugno e luglio e si ritrova esclusivamente nelle regioni meridionali: Puglia (soprattutto da Manfredonia ad Otranto), Calabria (prevalentemente a Castrovillari), Sicilia e Sardegna (Pignatti, 1982).

La specie *C. cristata* DC. è denominata “basilisco spinoso”. Anche questa pianta presenta caratteristiche simili alla *C. sicula*. Le ombrelle sono a 10-12 raggi, le brattee sono interne. La fioritura avviene tra giugno e luglio e anche questa specie è diffusa soprattutto nelle regioni meridionali (Pignatti, 1982).

La *C. ferulacea* ha invece una distribuzione più ampia ed è rinvenibile non solo in Puglia, Calabria e Sicilia ma anche nelle Marche, in Umbria e in Abruzzo.

Definito anche “basilisco comune”, questa specie presenta un fusto eretto, striato e ramoso. Le foglie, pennatosette e divise in segmenti lineari, sono lunghe circa 2-5 dm; le ombrelle sono a 8-15 raggi, mentre le brattee e le bratteole sono lineari. La pianta presenta dei petali gialli, ovali con apice ripiegato e possiede dei piccoli frutti dalle dimensioni di 15-30 mm. La fioritura avviene tra giugno e settembre (Pignatti, 1982).

Infine, la specie oggetto di studio del presente lavoro di tesi, *C. pungens* Jan, è anche denominata “basilisco filiforme”. Questa pianta è simile alla specie *sicula*, ma presenta delle foglie meno divise, con segmenti filiformi e lisci. Fiorisce, anche questa, tra giugno e luglio ed è presente nelle regioni meridionali, precisamente Puglia, Calabria e Sicilia (Pignatti, 1982).

2.1.2 Caratteristiche fitochimiche e proprietà biologiche

Pochi studi sono presenti in letteratura sulla composizione chimica e l'attività biologica delle piante appartenenti al genere *Cachrys*. Le specie sulle quali sono attualmente note più informazioni sono due: *C. ferulacea* e *C. sicula*. La prima specie è comunemente impiegata nel Caucaso come ingrediente delle insalate, nonché come rimedio per i disturbi digestivi (Baser et al., 2000). Varie furanocumarine sono state isolate in queste piante, quali ad esempio bergaptene, imperatorina ed isoimperatorina (Camarda et al., 1987; Pistelli et al., 1989).

Doković ed i suoi collaboratori (2004) hanno isolato il composto *3,5-nonadiyne* dalle radici di *C. farulacea* e hanno dimostrato che questo composto è in grado di inibire il rilascio di ossido nitrico endogeno da parte dei macrofagi murini.

Anche l'analisi fitochimica della specie *C. sicula* ha portato all'identificazione di diverse furanocumarine, quali isoimperatorina, imperatorina, bergaptene, xantotossina ed isopimpinellina (Grande et al., 1986).

Vari terpeni sono stati invece identificati negli oli essenziali di parti aeree di *C. sicula* (Pala-Paul et al., 2002).

Uno studio condotto sull'estratto etanolic della specie *C. libanotis* L. ha consentito l'identificazione di 5- metossipsoralene, 8-metossipsoralene e 5,8-dimetossipsoralene (Ena et al., 1991) e, anche in questo caso, la presenza di diversi terpeni è stata identificata nell'olio essenziale (Bouderdara et al., 2011).

Diverse furanocumarine sono state ritrovate anche nelle specie *C. pubescens* (Pall) Schischnk and *C. odontalgica* Pall (Ignat'eva NS et al., 1972; Komissarenko, 1969).

Abad e collaboratori hanno valutato le proprietà antinfiammatorie di alcuni costituenti isolati da *C. trifida* Miller, ottenendo buoni risultati per le furanocumarine imperatoria ed isoimperatorina (Abad et al., 2001).

2.2 *FICUS CARICA* L. CV. DOTTATO

2.2.1 Aspetti botanici

Il fico appartiene alla famiglia delle Moraceae, che comprende piante monoiche o dioiche, erbacee, arbustive e arboree. Le foglie possono essere semplici o raramente composte, alterne oppure opposte. I fiori delle Moraceae sono unisessuali, raccolti in infiorescenze cimose a forma di capolino. L'asse infiorescenziale, a volte, si allarga in modo da formare il caratteristico siconio. Il frutto è generalmente drupaceo e in alcune specie è presente un'infruttescenza (Maugini et al., 2006; Senatore, 2004).

La famiglia delle Moraceae è convenzionalmente suddivisa in due sezioni: le *Moroideae*, cui appartiene il genere *Morus*, e le *Arctocarpeae*, cui appartiene il genere *Ficus*, che con oltre 700 specie costituisce il genere più ricco. La caratteristica preminente delle piante appartenenti a questo secondo gruppo è costituita dalla particolare infiorescenza dalla forma sferica o piriforme: il siconio. Dopo la fecondazione il siconio diviene un'infruttescenza contenente al suo interno i veri frutti, costituiti da piccole nucule (Fiori, 1970).

La specie *Ficus carica* L. comprende due sottospecie: *Ficus carica sativa* (fico comune) e *Ficus carica caprificus* (fico selvatico o caprifico). Il fico comune è diffuso nei climi subtropicali temperati. Il termine "carica" deriva dal nome "Caria", regione dell'Asia Minore. Le prime testimonianze relative alla coltivazione di questa pianta risalgono alle prime civiltà agricole della Mesopotamia e dell'Egitto, da cui si diffuse successivamente in tutto il bacino del Mediterraneo.

Il fico caprifico è spontaneo nelle zone rupestri ed asciutte del Mediterraneo e dell'Asia occidentale e presenta caratteristiche vegetative simili a quelle del fico domestico, dal quale tuttavia si differenzia per le dimensioni ridotte e per i siconi non commestibili.

Le foglie sono grandi, ruvide e oblunghe, con contorno ovale con 5 lobi palmati, di colore verde scuro nella parte superiore e più chiare e ricoperte da una lieve peluria in quella inferiore (Fig. 2).

Il tronco può raggiungere altezze di 4-10 metri. La corteccia è liscia e i rami presentano gemme terminali acuminate coperte da due squame brunastre.

Quello che comunemente è ritenuto essere il frutto è in realtà una grossa infiorescenza carnosa, piriforme, detta “siconio”, all’interno della quale sono contenuti i veri frutti, denominati in botanica “achenii”.



Fig. 2. *Ficus carica* L. cv. Dottato.

Queste pseudo infruttescenze (i siconi) possono presentare un colore variabile dal giallo al violaceo e maturano in tre diversi stadi, a cui corrispondono altrettanti tipi di siconi: i fichi fiori (anche detti primaticci o fioroni), che sono prodotti dalle gemme dell’anno precedente e maturano nei mesi di giugno e luglio; i fichi propriamente detti (mammoni o fòrniti), che sono prodotti dalle gemme dell’annata e maturano da agosto a settembre; i fichi tardivi o cràtiri, autunnali (Tutin et al., 1993).

La coltivazione del fico si è sviluppata in maniera significativa nel bacino del Mediterraneo. Importanti coltivazioni si trovano in Turchia, Grecia, Spagna, Francia, Algeria, Egitto, Libia e Marocco. Altri paesi in cui la produttività è notevole sono il Portogallo, la Siria, l’India, il Giappone e la California.

In Italia le regioni maggiormente dedite alla coltivazione del fico sono la Puglia, la Campania e la Calabria.

Le varietà coltivate sono moltissime; quelle italiane sono suddivise in due gruppi principali: le unifere, che fruttificano una sola volta all’anno e producono fichi estivo-autunnali (ad esempio *Marchesano*, *Cantano*, *Meloncello*, *Brigiotto nero*,

Coppa ed *Arneo*) e le bifere, che fruttificano invece due volte l'anno e producono frutti a maggio (i cosiddetti *fioroni*) e poi ad agosto-settembre (detti fichi veri, dalle dimensioni più piccole).

Le bifere possono essere ulteriormente distinte in *Caprificabili* (ad esempio *Fracazzano*, *Piombinese* e *Napoletano*) e *Partenocarpiche*, che comprendono i fichi *Dottato* (o *Ottano*) e *Del Vescovo* (Zangheri, 1976).

Il fico Dottato è una delle cultivar più pregiate in Italia. La pianta si distingue per una vegetazione florida e vigorosa, per la carnosità della sua polpa, che ben si presta all'essiccazione ed alla trasformazione, e per le dimensioni del suo fiorone che, eccezione rarissima, non è mai più grande del fico serotino (che matura in autunno).

Il Fico serotino è il vero prodotto del Dottato, poiché molti fioroni avvizziscono e non giungono a maturità. Il Dottato è uno dei fichi più grandi, dalla forma oblunga e dalla buccia inizialmente verdastra e poi tinta di un colore canarino chiaro. La buccia è particolarmente liscia, e ciò conferisce una particolare lucidità al frutto.

Grazie alla facilità con cui questo fico si presta all'essiccazione e alla morbidezza che mantiene in questo stato, il Dottato costituisce sia un ottimo frutto da tavola sia un prodotto adatto alla lavorazione e dunque importante da un punto di vista economico. In Toscana questo tipo di fico è denominato Dottato, mentre altrove esso è detto Ottato o Fico della goccia d'oro. La Calabria è la regione più famosa in Italia per la coltivazione del Fico Dottato, particolarmente intensa nella zona del cosentino, specializzata nella produzione di fichi secchi (Palopoli, 1990).

2.2.2 Contenuto fitochimico e proprietà biologiche

2.2.2.1 Frutti

I frutti del Fico sono conosciuti e consumati in tutto il mondo e diversi studi hanno confermato le virtù salutistiche attribuite loro dalla tradizione popolare. Il frutto del fico è stato infatti utilizzato sotto forma di impacco per la cura degli ascessi, mentre il decotto è stato impiegato come emolliente per la cura delle irritazioni della gola e come sedativo della tosse. Il frutto era impiegato anche contro le infiammazioni urinarie ed era raccomandato ad anziani, bambini e soggetti in convalescenza per i suoi effetti tonificanti ed energetici (Veberic, 2008).

I frutti sono noti per le loro capacità nutritive. Essi sono ricchi di minerali, vitamine, calcio, potassio, tiamina (Vit. B1) e riboflavina (Vit. B2). I frutti del fico contengono 17 tipi di amminoacidi, tra i quali l'acido aspartico e l'acido glutammico sono i maggiori rappresentanti. I fichi freschi, inoltre, contengono grandi quantità di fibre. Più del 28% di esse sono solubili e sono di aiuto nel controllo della glicemia e dei livelli di colesterolo nel plasma ed anche nella perdita del peso. Il frutto contiene, inoltre, un'elevata concentrazione di polifenoli e diversi carotenoidi quali licopene, criptoxantina ed α - e β -carotene (Su et al., 2002).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'attività antiossidante del frutto protegge le lipoproteine plasmatiche dall'ossidazione e produce un aumento nel plasma della capacità antiossidante per quattro ore dopo il consumo (Vinson et al., 2005).

Diverse antocianine sono state identificate nei frutti, quali la cianidina 3-ramnoglicoside (che rappresenta circa il 75% dei pigmenti totali), la 3-glucosio cianidina, la cianidina 3,5-diglucoside e la pelargonidina 3-ramnoglicoside (Robinson & Robinson, 1932; Puech et al., 1975; Solomon et al., 2006; Del Caro & Piga, 2007). Il contenuto totale di antocianine, polifenoli e flavonoidi nella buccia e nella polpa della varietà commerciale di fichi con differente colore (nero, rosso, giallo e verde) è stato recentemente analizzato da Solomon e collaboratori (2006), che hanno dimostrato che la buccia contribuisce maggiormente all'attività antiossidante rispetto alla polpa, soprattutto nelle varietà scure.

2.2.2.2 Foglie

Numerosi studi hanno descritto le proprietà terapeutiche delle foglie del fico, ed in particolar modo l'elevata attività antiossidante legata alla presenza di diversi polifenoli (Konyaltoglu et al., 2005).

E' noto, inoltre, il contenuto in furanocumarine delle foglie, ed in particolare di psoralene e bergaptene. Il contatto con queste parti della pianta in primavera o in estate, in particolare negli addetti alla coltivazione, può notoriamente determinare dermatiti da contatto, note come fitodermatiti (Bassioukas et al., 2004). Athnasios e collaboratori (1962) hanno isolato queste cumarine dall'estratto in etere di petrolio delle foglie, insieme ad altri tipi di molecole tra le quali γ -sitosterolo e taraxasterolo. Diversi triterpeni sono stati isolati dalle foglie (Abu-Mustafa et al., 1963; Saeed & Sabir, 2002).

3.2.2.3 *Lattice*

Anche il lattice, come le foglie, è in grado di causare fitodermatiti a causa del noto contenuto in furanocumarine. Tradizionalmente, esso era impiegato per rendere più digeribile la selvaggina e nella preparazione dei formaggi, perché ricco di enzimi proteolitici come proteasi e amilasi. Il lattice contiene, inoltre, un enzima con attività antielmintica chiamato *ficina*, che è in grado di distruggere diversi parassiti intestinali (Devaraj et al., 2008). Tuttavia, è stato dimostrato che il lattice del fico non può essere utilizzato per la sua attività antielmintica, poiché esso causa tossicità acuta con emorragia enterica (De Amarin A. et al., 1999). Sono stati studiati, infine, gli effetti della ficina sulla coagulazione del sangue, ed è stato dimostrato come essa sia un attivatore del fattore X, una glicoproteina plasmatica vitamina K-dipendente che ha un ruolo fondamentale nell'emostasi (Richter et al., 2002).

2.3 *HYPERICUM PERFORATUM L.*

2.3.1. Aspetti botanici

Il genere *Hypericum* L. comprende oltre cinquecento specie. La collocazione tassonomica del genere è stata discussa a lungo. Esso era stato inizialmente classificato all'interno della famiglia delle Clusiaceae (Guttiferae). In base ad una più recente classificazione, il genere *Hypericum* appartiene invece alla famiglia delle Hypericaceae. Questa famiglia comprende tre sottofamiglie: *Hypericeae*, che ha una distribuzione quasi ubiquitaria e comprende cinque generi (*Hypericum*, *Triadenum*, *Thornea*, *Santomasia* e *Lianthus*), e le tribù tropicali *Cratoxyleae* (*Eliea* e *Cratoxylon*) e *Vismieae* (*Harungana*, *Vismia* e *Psorospermum*) (Meseguer & Sanmartín, 2012).

Le piante appartenenti al genere *Hypericum* sono caratterizzate dalla presenza di ghiandole contenenti oli essenziali, visibili sotto forma di piccoli punti traslucidi sui petali. I fiori sono a cinque petali e possiedono molti stami. La loro distribuzione geografica si estende nelle regioni temperate e sub tropicali di Europa, Russia, India, Cina, Turchia e America Settentrionale e la specie *perforatum* è quella più presente ed utilizzata in Europa.



Fig. 3. *Hypericum perforatum* L.

L' *Hypericum perforatum* L. (Iperico) è una pianta erbacea, rizomatosa, perenne, nativa dell'Europa e dell'Asia ed introdotta anche negli USA (Bombardelli & Morazzoni, 1995). La pianta è alta fino a 60 cm, ha un caule esile, lignificato e ramificato con foglie opposte oblunghe intere caratterizzate da una punteggiatura traslucida. Esse sono infatti picchiettate di minuscole ghiandole trasparenti, da cui deriva il nome *perforatum*, che contengono resina e oli essenziali e che in controluce appaiono come forellini. I fiori presentano cinque sepali e cinque petali dal caratteristico colore giallo. La massima fioritura avviene intorno al 24 Giugno (ricorrenza di San Giovanni) e, per questo motivo, la specie *H. perforatum* è comunemente chiamata “erba di San Giovanni” (Bruni & Nicoletti, 2003).

L'Iperico ha proprietà sedative ed astringenti ed è stato tradizionalmente usato per il trattamento di nevralgie, sciatica, ansia, depressione, nevrosi in menopausa e nel trattamento delle ferite per la sua anche azione analgesica ed antisettica locale. Questa specie è usata in erboristeria da oltre 2000 anni ed oggi il suo impiego è molto diffuso; essa, infatti, è una delle erbe medicinali più vendute negli USA ed è impiegata nel trattamento della depressione lieve (Newall et al. 1996). Il mercato supera i 210 milioni di dollari ogni anno negli Stati Uniti e 570 milioni di dollari in

tutto il mondo (Sirvent et al., 2002). La droga della pianta è costituita dalle sommità fiorite. Inizialmente si riteneva che il principio attivo responsabile dell'effetto antidepressivo fosse l'ipericina, ma studi più recenti hanno invece confermato che sia l'iperforina a ricoprire questo ruolo (Cervo et al., 2002).

In Italia sono presenti due sottospecie di *H. perforatum*: *angustifolium* e *veronense* (Maggi et al., 2010).

2.3.2 Composizione fitochimica

I principali costituenti dell'Iperico sono l'ipericina (**14**), un naftodiantrone, (precisamente un diantrachinone policiclico altamente coniugato di derivazione biogenetica polichetidica) e l'iperforina (**54**, Fig. 4), un floroglucinolo prenilato caratterizzato da un nucleo centrale biciclico dichetonico al quale sono legati cinque gruppi laterali di cui quattro isoprenoidi. Sono presenti altri costituenti biologicamente attivi come flavonoidi e tannini (Nahrstedt & Butterweck 1997; Barnes et al., 2001). Tuttavia, notevoli differenze nel contenuto dei vari principi attivi sono state riportate tra le varie popolazioni raccolte in diverse parti del mondo, dall'Australia alla Turchia (Southwell & Campbell, 1991; Cirak et al., 2006).

2.3.2.1 Derivati antrachinonici (naftodiantroni)

Nel materiale vegetale fresco sono presenti diversi derivati antrachinonici: ipericina, pseudoipericina, ciclopseudoipericina, isoipericina, protoipericina e protopseudoipericina (questi ultimi precursori biosintetici rispettivamente di ipericina e pseudoipericina). Il contenuto di ipericina (riferito all'ipericina totale, e quindi alla somma di ipericina e pseudoipericina) è di circa 0,1-0,15% (Vanhaelen & Vanhaelen-Fastre, 1983).

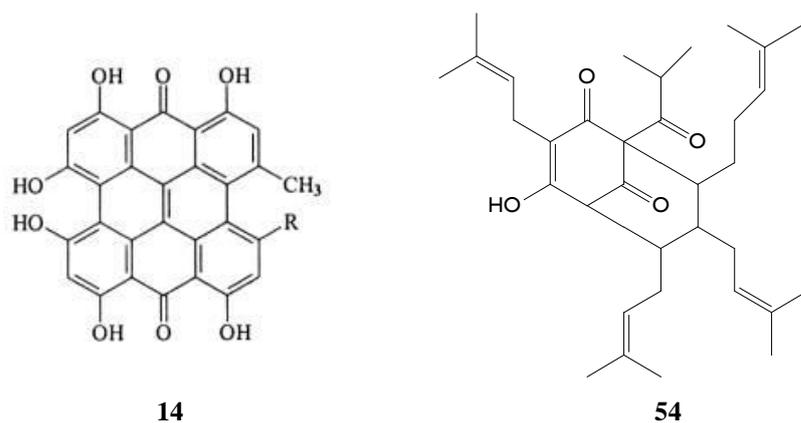


Fig. 4. Struttura chimica di ipericina (14) ed iperforina (54).

2.3.2.2 Fluoroglucinosi prenilati

La specie *H. perforatum* L. contiene inoltre fluoroglucinosi prenilati quali iperforina (da 2.0 a 4.5%), adiperforina (da 0.2 a 1.9%) ed analoghi ossigenati dell'iperforina (Barnes et al., 2001).

2.3.2.3 Polifenoli

Nella specie *H. perforatum* sono presenti flavonoli (kaempferolo e quercetina), flavoni (luteolina), glicosidi (iperoside, isoquercitrina, quercitrina e rutina), biflavonoidi (biapigenina e amentoflavone) (Berghofer & Holzl 1987; 1989) e catechina (Hoelzl & Ostrowski 1987; Dorossiev 1985). Oltre ai flavonoidi citati sono presenti altri composti fenolici, quali ad esempio acido caffeico, acido clorogenico, acido *p*-cumarico, acido ferulico, acido *p*-idrossibenzoico ed acido vanillico (Barnes et al., 2001).

2.3.2.4 Composti volatili

Il componente volatile maggiore (30%) è il metil-2-ottano; altri composti presenti includono *n*-nonano, metil 2-decano, *n*-undecano, α - e β - pinene, α - terpinolo, geraniolo, e tracce dei monoterpeni mircene e limonene e dei sesquiterpeni cariofillene ed umulene (Mathis & Ourisson, 1964).

2.3.3 Impieghi tradizionali dell'iperico e proprietà farmacologiche

Nella tradizione popolare, ma anche nella moderna erboristeria, l'iperico è considerato il rimedio per eccellenza di tutte le lesioni della cute: in primo luogo delle ustioni ma anche di piaghe e ferite di diversa natura. L'iperico per uso esterno si utilizza sotto forma di oleolito, il cosiddetto "Olio di iperico". L'iperico è considerato, inoltre, il rimedio principe per alcuni stati di depressione psicogena e disturbi nervosi derivanti da disfunzioni endocrine, è utilizzato negli stati infiammatori dei bronchi e delle vie urinarie e, infine, ha un effetto vasoprotettore sul circolo capillare ed una attività ipotensiva. L'azione antiflogistica viene esercitata anche a livello delle vie urinarie, dove riduce la sintomatologia dolorosa legata al processo infiammatorio (Benigni R, 1962; Castleman, 2007; Lieutaghi, 1995).

Molte proprietà farmacologiche possono essere attribuite agli estratti di iperico, quali l'attività antidepressiva, antivirale ed antibatterica (Bombardelli & Morazzoni, 1995; Chatterjee et al., 1998a; Schulz et al., 1998; Nathan, 1999; Mills & Bone, 2000).

2.3.3.1 Attività antidepressiva

Inizialmente si riteneva che il costituente responsabile degli effetti antidepressivi dell'iperico fosse l'ipericina. Studi più recenti hanno invece dimostrato che il principale composto utile per l'attività antidepressiva è l'iperforina (Chatterjee et al., 1998a; Laakmann et al., 1998).

Il preciso meccanismo d'azione alla base dell'attività antidepressiva dell'iperico non è stato completamente chiarito (Barnes et al., 2001). Studi biochimici hanno dimostrato che l'estratto di iperico inibisce l'*uptake* nelle sinapsi di serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT), dopamina e noradrenalina, con un'affinità più o meno simile, e induce una *down-regulation* dei recettori β e una *up-regulation* dei recettori 5-HT₂ nella corteccia frontale dei ratti (Müller et al., 1997).

E' stato inoltre dimostrato che l'iperforina è un inibitore dell'*uptake* di serotonina, dopamina, noradrenalina, GABA e L-glutammato in preparati sinaptosomiali (Chatterjee et al., 1998b; Wonnemann et al., 2000) e che questa molecola è in grado di inibire l'assorbimento di serotonina anche nelle cellule peritoneali dei ratti in modo dose dipendente (Chatterjee et al., 1998b).

Dai risultati di alcuni studi sembrerebbe che l'iperforina non sia, tuttavia, il solo componente responsabile degli effetti osservati (Chatterjee et al., 1998b; Gobbi et al., 1999). È stato riportato che il meccanismo d'azione dell'iperforina nell'inibizione dell'*uptake* di serotonina potrebbe essere associato ad un aumento delle concentrazioni intracellulari di ioni sodio (Singer et al., 1999) e che ciò potrebbe essere secondario all'attivazione dello scambiatore Na^+ / H^+ , come risultato di un diminuito pH intracellulare (Nathan, 2001). Tuttavia è stato osservato che il legame con le proteine plasmatiche potrebbe essere un fattore limitante per l'inibizione della serotonina da parte dell'iperforina *in vivo* (Uebelhack & Franke, 2000).

2.3.3.2 Attività antibatterica ed antivirale

L'iperforina presenta attività antibatterica contro lo *Staphylococcus aureus* resistente ai farmaci antimicrobici e contro batteri Gram positivi quali *Streptococcus pyogenes* e *Corynebacterium diphtheriae*. Gli effetti antibatterici dell'iperforina, tuttavia, sono stati osservati solo con l'impiego di alte concentrazioni. L'iperforina non mostra invece alcun effetto contro i batteri Gram negativi, come per esempio *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, o contro *Candida Albicans* (Barnes et al., 2001).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'ipericina e la pseudoipericina sono in grado di inibire *in vitro* alcuni virus, quali Herpes Simplex di tipo 1 e 2 e il virus dell'immunodeficienza umana (HIV)-1. L'attività antivirale dell'ipericina sembra coinvolgere un processo di fotoattivazione (Hudson et al., 1991a; Wood et al., 1990; Weber et al., 1994; Barnes et al., 2001).

2.3.3.3 Effetti collaterali

I dati ottenuti da studi *post marketing* di sorveglianza e forniti da organismi di controllo sulla sicurezza dei farmaci nazionali ed internazionali indicano, complessivamente, che l'iperico sia ben tollerato. Gli effetti avversi sono generalmente blandi: quelli principali includono sintomi gastrointestinali, vertigini, confusione, stanchezza e sedazione. (Ernst et al., 1998).

La reazione di fotosensibilizzazione causata dall'assunzione di iperico è conosciuta come con il nome di "ipericismo". Questa reazione tossica, tuttavia, sembra essere

un evento estremamente raro alle dosi terapeutiche comunemente impiegate (Barnes et al., 2001).

In uno studio che ha coinvolto tredici volontari sani che hanno ricevuto il placebo e un estratto di iperico a dosi differenti non è stata osservata alcuna evidenza di fotosensibilizzazione dopo esposizione a luce UV-A e UV-B quattro ore dopo la somministrazione (Brockmöller et al., 1997).

E' stato inoltre dimostrato, in uno studio condotto su soggetti sani, che dopo la somministrazione di 300 mg di iperico tre volte al giorno per sette giorni la concentrazione di ipericina totale nel siero era di 12,5 ng/ml, concentrazione al di sotto di quella considerata fototossica (> 100 ng/ml) (Schempp et al., 1999).

CAPITOLO 3

PARTE SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALE VEGETALE E PROCEDURE ESTRATTIVE

3.1.1. *Cachrys pungens* Jan

Nel corso del primo anno di dottorato l'attività di ricerca è stata dedicata allo studio dell'attività biologica di estratti di *Cachrys pungens* Jan.

Il materiale vegetale in esame è stato estratto mediante due diverse tecniche estrattive, la macerazione e l'estrazione mediante CO₂ supercritica, al fine di poter individuare la metodica più adatta all'ottenimento di estratti particolarmente attivi.

L'estrazione è un'operazione che consente la separazione dei principi attivi desiderati da droghe vegetali, e può essere effettuata in maniera diversa secondo la natura della droga.

Le parti aeree sono state raccolte nel Comune di Calopezzati (CS) e sottoposte ad essiccamento. In una prima fase i composti presenti nel materiale vegetale (682 g) sono stati estratti mediante la tecnica della macerazione, impiegando come solvente di estrazione il metanolo (72 ore, n. 3 estrazioni). La macerazione è una tecnica che consiste nel mantenere una quantità stabilita di droga in contatto con un opportuno solvente a temperatura ambiente, per un tempo variabile. Il fitocomplesso ottenuto è stato risospeso in una soluzione MeOH/H₂O 9:1 e la soluzione acquosa risultante è stata ulteriormente estratta con solventi a differente polarità (*n*-esano, cloroformio ed acetato di etile), in modo da separare i composti appartenenti a classi differenti (Tab. 1).

In una seconda fase, il materiale vegetale (6,15 g) è stato estratto con l'impiego di un estrattore che utilizza la CO₂ supercritica per l'estrazione dei composti a bassa polarità (Tab. 1). L'estrazione mediante CO₂ supercritica è una tecnica innovativa che può ragionevolmente consentire di ottenere estratti di qualità superiore e quindi con valore aggiunto rispetto agli estratti ottenuti con le tecniche tradizionali.

L'anidride carbonica in fase supercritica assume le caratteristiche di solvente non polare consentendo, pertanto, l'estrazione di composti a bassa polarità da matrici

solide. La CO₂ risulta essere un fluido ideale per l'estrazione poiché la temperatura e la pressione critiche sono facilmente raggiungibili. Poiché la temperatura di lavoro è vicina alla temperatura ambiente, questa tecnica risulta, inoltre, particolarmente adatta a materiale sensibile al calore, che verrebbe decomposto dal trattamento termico. La CO₂ supercritica, inoltre, è poco costosa e garantisce un maggior livello di sicurezza rispetto ai solventi organici, notoriamente pericolosi ed inquinanti ed il cui smaltimento ha un costo piuttosto elevato. Il recupero del solvente, infine, è semplice e conveniente, e questo abbrevia notevolmente i tempi di lavorazione (Smith, 1999; Marr & Gamse, 2000).

Tab. 1. Rese di estrazione ottenute per gli estratti di *C. pungens* Jan.

| Campione | Resa (%) |
|--|----------|
| Estratto totale (macerazione) | 12.4 |
| Frazione in <i>n</i> -esano | 1.1 |
| Frazione in diclorometano | 3.5 |
| Frazione in acetato di etile | 0.5 |
| Estratto totale ottenuto mediante CO ₂ supercritica | 1.7% |

3.1.2 *Ficus carica* L. cultivar Dottato

Obiettivo dell'attività di ricerca è stato quello di analizzare gli effetti fototossici e, conseguentemente, le potenziali applicazioni in fotochemioterapia di tutta la parte epigea della pianta. Non abbiamo riscontrato in letteratura studi precedenti di questo tipo sul Fico Dottato. I campioni di *F. carica* L. cv. Dottato sono stati raccolti nel Comune di Bisignano in Provincia di Cosenza. I campioni di frutti, foglie, corteccia e parte legnosa sono stati sottoposti a macerazione, impiegando come solvente di estrazione una soluzione idroalcolica (48 ore, n. 3 estrazioni). Il fitocomplesso ottenuto dai frutti è stato successivamente sospeso in una soluzione MeOH/H₂O 9:1 e la soluzione acquosa risultante è stata ulteriormente estratta con solventi a differente polarità (*n*-esano, diclorometano ed acetato di etile) in modo da separare composti appartenenti a classi differenti. Il lattice è stato invece raccolto manualmente dai

frutti e dalle foglie: i campioni sono stati ottenuti goccia a goccia senza spremitura e conservati alla temperatura di -20°C fino al giorno delle analisi.

Tab. 2. Rese di estrazione ottenute per gli estratti delle parti aeree di *F. carica* L cv Dottato.

| Campione | Resa (%) |
|---------------|----------|
| Foglie | 12.01 |
| Corteccia | 2.68 |
| Parte legnosa | 3.70 |

Tab. 3. Rese di estrazione ottenute per l'estratto idroalcolico dei frutti di *F. carica* L cv Dottato e le sue frazioni.

| Campione frutti <i>F. carica</i> | Resa (%) |
|----------------------------------|----------|
| Estratto totale | 6.34 |
| Frazione in <i>n</i> -esano | 1.82 |
| Frazione in diclorometano | 0.77 |
| Frazione in acetato di etile | 1.70 |

3.1.3. *Hypericum perforatum* L. subsp. *veronense*

Le parti aeree di quattro diversi campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense* sono state raccolte nel mese di Giugno 2011, nel periodo di massima fioritura, nel territorio dell'altopiano della Sila in Calabria.

Le informazioni concernenti luogo e data di raccolta delle diverse specie analizzate sono elencate in Tabella 4. I campioni n. 1 e n. 2 sono stati raccolti nella fascia pre-silana, ad altitudini di 370 m e 840 m s.l.m., mentre gli altri due ad altitudini maggiori (Righitano nel comune di Pedace a 1320 m s.l.m., Righio nel comune di Spezzano piccolo ad un'altitudine di 1650 m circa).

Le sommità fiorite sono state dunque estratte mediante macerazione, impiegando come solvente di estrazione una soluzione idroalcolica (EtOH 70%, 2l). La procedura di estrazione è stata ripetuta per tre volte, per un tempo di circa 48 ore.

Le soluzioni così ottenute, dopo essere state filtrate e riunite, sono state essiccate sotto ridotta pressione, in modo da abbassare la temperatura di ebollizione del solvente, utilizzando un evaporatore rotante con bagno d'acqua a 40 °C, per

preservare la composizione chimica dell'estratto. Le rese ottenute sono elencate in Tabella 4.

Tab. 4. Campioni di Iperico analizzati, sito di raccolta e rese di estrazione.

| Campione | Sito di raccolta | Altitudine [m s.l.m.] | Peso fresco (g) | Estratto (g) | Resa (%) |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------|-----------------|-------------|
| 1 | Zumpano | 370 | 79.06 | 17.54 | 22.19 |
| 2 | San Pietro in Guarano | 840 | 29.72 | 7.24 | 24.36 |
| 4 | Righio | 1650 | 53.34 | 14.06 | 26.36 |
| 3 | Righitano | 1320 | 80.46 | 15.95 | 19.82 |

3.2 ANALISI FITOCHIMICA

3.2.1 Analisi dei composti apolari: GC e GC-MS

I composti apolari sono stati identificati mediante gas cromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS). E' stato impiegato un gas cromatografo Hewlett-Packard (modello 6890 N) associato ad uno spettrometro di massa Hewlett-Packard (modello 5973 N), utilizzando una programmata di temperatura da 60 a 280°C, con una *rate* di 16°C al minuto. Il sistema è corredato di colonna capillare (30 m; 0.25 mm), con fase stazionaria metilsilicone SE-30 e fase mobile elio.

Le analisi quantitative sono state realizzate mediante gas cromatografia (GC), impiegando un gas cromatografo Shimadzu GC17A con colonna capillare (30 m di lunghezza; 0.25 mm; 0.25 µm film; fase stazionaria metilsilicone SE-30) e un detector a ionizzazione di fiamma controllato dal Software Bordwin. Tutte le analisi sono state effettuate in condizioni isoterme (180°C) ed in triplicato.

3.2.2 Determinazione del contenuto fenolico totale

Il contenuto di polifenoli totali dei campioni è stato valutato utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteu (Marrelli et al., 2012).

Una soluzione 2 mg/ml di ciascun campione in una miscela acetone/metanolo/acqua/acido acetico (40:40:20:0.1) è stata posta in bagno d'acqua alla temperatura di 60 °C

per un'ora. Successivamente, 200 μl di ogni campione sono stati fatti reagire con 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu ed 1 ml di soluzione di carbonato di sodio 7.5%. L'assorbanza è stata misurata dopo due ore alla lunghezza d'onda di 765 nm. L'acido clorogenico è stato impiegato come standard e ciascun esperimento è stato condotto in triplicato. Il contenuto in polifenoli totali è stato espresso come equivalenti di acido clorogenico in mg/g di materiale vegetale.

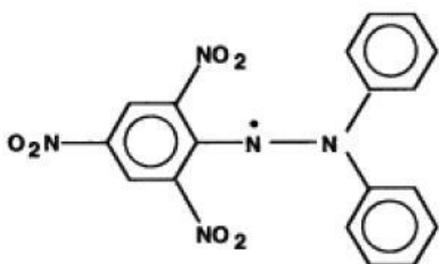
3.2.3 Analisi del contenuto fenolico: HPTLC

I polifenoli presenti nelle formulazioni analizzate sono stati identificati mediante HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*, cromatografia su strato sottile ad alte prestazioni). L'apparato utilizzato (CAMAG, Muttenz, Svizzera) è costituito dallo strumento Linomat 5, utilizzato per la deposizione dei campioni mediante una siringa da 100 μl e connesso ad un flusso di azoto, e dallo strumento TLC Visualizer dotato del software WinCats. Sono state impiegate lastre in gel di silice 60 (2 μm) dalle dimensioni 20 cm x 10 cm (VWR International s.r.l., Milano). Prima di realizzare le analisi, le lastre sono state lavate con metanolo e accuratamente asciugate alla temperatura di 100 °C per circa tre minuti. La velocità di iniezione della siringa è stata di 100 nl/s e sono state utilizzate le seguenti condizioni operative: volume di iniezione, 1 μl ; larghezza di banda, 8 mm; distanza dal fondo, 8 mm; posizione fronte del solvente, 9 mm. Come solvente di eluizione è stata utilizzata una miscela acetato di etile/diclorometano/acido acetico/acido formico/acqua (100:25:10:10:11; v/v/v/v/v) per l'identificazione dei composti ipericina, quercetina, quercitrina, rutina, biapigenina ed acido clorogenico. Le lastre sono state derivatizzate con NPR (*Natural Product Reagent*, 1 g diphenylborinic acid aminoethylester in 200 mL di acetato di etile) ed anisaldeide (1,5 ml di *p*-anisaldeide, 2,5 ml di H_2SO_4 , 1 ml di AcOH in 37 ml di EtOH). Le lastre sono state osservate mediante luce UV alle lunghezze d'onda di 254 e 366 nm e alla luce visibile, prima e dopo la derivatizzazione. Per l'identificazione dell'iperforina è stata invece impiegata una miscela eluente toluene/diclorometano (4:2; v/v) e le lastre sono state derivatizzate con il reattivo di Godin.

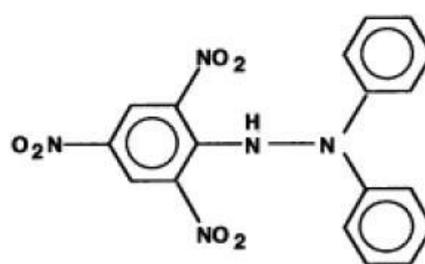
3.3 ATTIVITÀ BIOLOGICA

3.3.1 Free radical scavenging activity (FRSA)

Questo saggio prevede l'impiego di un radicale libero, il composto *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH). Il radicale DPPH è di un colore rosso porpora, ma l'aggiunta di un agente antiossidante ne determina la decolorazione. La percentuale di decolorazione è proporzionale all'attività antiossidante (attività "scavenger") degli estratti esaminati (Conforti et al., 2009b).



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

Nel presente studio è stata valutata l'attività antiradicalica di differenti concentrazioni dei campioni in esame (da 0,005 a 1 mg/ml). Come controllo positivo è stato utilizzato l'acido ascorbico.

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato. Ad ogni provetta sono stati aggiunti 0,8 ml di soluzione etanolica di DPPH 1×10^{-4} M e 0,2 ml di soluzione contenente l'estratto. Le provette sono state riposte al buio per un periodo di tempo pari a trenta minuti. Successivamente, è stata valutata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 517 nm, utilizzando un bianco di solo etanolo.

L'attività antiossidante degli estratti è stata calcolata come percentuale di inibizione nei confronti del radicale DPPH secondo la seguente equazione:

$$\% \text{ inibizione} = [1 - (\text{assorbanza DPPH con estratto} - \text{assorbanza estratto}) / \text{assorbanza DPPH senza estratto}] \times 100.$$

3.3.2 Inibizione della perossidazione lipidica: β -carotene bleaching test

Questo secondo metodo si basa sull'ossidazione accoppiata del β -carotene e dell'acido linoleico. La tecnica consiste nella misurazione della decolorazione (*bleaching*) del β -carotene dovuta all'ossidazione causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico. L'aggiunta alla miscela di reazione (β -carotene e acido linoleico) di una sostanza antiossidante inibisce l'ossidazione del β -carotene e mantiene costante nel tempo i valori di assorbanza (Marrelli et al., 2012).

Per la realizzazione del test, 2 ml di una soluzione di β -carotene 0,5 mg/ml in cloroformio sono stati aggiunti a 0,04 ml di acido linoleico e 0,4 ml Tween 20. Il solvente è stato poi allontanato mediante l'impiego di un evaporatore rotante. Dopo l'evaporazione, la miscela è stata immediatamente diluita con 150 ml di acqua distillata. L'acqua è stata aggiunta lentamente alla miscela, che è poi stata agitata vigorosamente per formare un'emulsione. Cinque ml di emulsione sono quindi stati aggiunti a 0,2 ml di campioni a diverse concentrazioni (100, 50, 25, 10, 5, 1 μ g/ml). Le provette sono state agitate lentamente e poste a 45 °C in un bagno di acqua. L'assorbanza è stata letta alla lunghezza d'onda di 470 nm ad un tempo iniziale ($t = 0$) e successivamente a 30 e 60 min.

L'attività antiossidante (AA) è stata misurata usando la seguente equazione.

$$AA = [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^\circ - A_t^\circ)] \times 100$$

dove:

A_0 = valore di assorbanza del campione misurato al tempo iniziale, $t = 0$, di incubazione;

A_0° = valore di assorbanza del controllo misurato al tempo iniziale, $t = 0$, di incubazione;

A_t = valore di assorbanza del campione misurato dopo 30 o 60 minuti di incubazione;

A_t° = valore di assorbanza del controllo misurato dopo 30 o 60 minuti di incubazione.

3.3.3 Proprietà fotodinamiche e citotossiche

Le proprietà fotodinamiche e citotossiche dei campioni in esame sono state determinate mediante l'impiego di una procedura descritta da Barraja e collaboratori (Barraja et al., 2006) con qualche opportuna modifica (Marrelli et al., 2012). Gli effetti sono stati testati su cellule di melanoma umano.

3.3.3.1 Linee cellulari

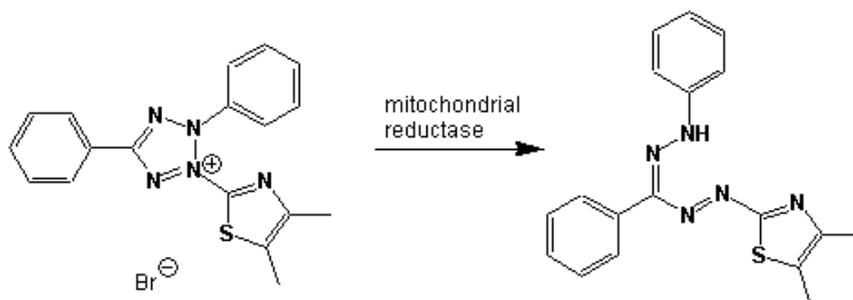
Gli effetti fototossici degli estratti in esame sono stati testati sulle linee cellulari A375 e C32 (melanoma amelanotico). Le due linee cellulari sono state poste in coltura, rispettivamente, in DMEM ed RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) a cui sono stati addizionati 10% di siero fetale bovino (FBS, *fetal bovine serum*), 1% di L-glutamina e 1% di una soluzione di penicillina/streptomina. Le colture sono state poste alla temperatura di 37°C in presenza di 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. Dopo circa 5 giorni le cellule sono state rimosse dalle flask e centrifugate a 1500 rpmi per 5 minuti. Il mezzo è stato dunque rimosso e la soluzione cellulare è stata risospesa in mezzo fresco. La conta cellulare è stata effettuata mediante l'impiego di trypan blue. Le cellule sono dunque state poste in coltura in piastre da 96 pozzetti (1 x 10⁴ cellule/pozzetto), impiegate per gli esperimenti ventiquattro ore dopo.

3.3.3.2 Valutazione dell'attività fototossica dei campioni

Dopo ventiquattro ore il mezzo è stato rimosso e 100 µL dei campioni in esame (concentrazioni da 0,078 a 100 µg/ml), solubilizzati in DMSO e diluiti in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7.2), sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Dopo 30 minuti di incubazione a 37 °C, le piastre sono state irradiate a 365 nm mediante l'impiego di una lampada HPW 125 Philips (dose di 1,08 J/cm²). Successivamente, la soluzione è stata sostituita con il mezzo, e le piastre sono state incubate per 48 ore. Per completezza, l'esperimento è stato condotto anche su una piastra non sottoposta ad irradiazione, al fine di valutare l'effettiva influenza della luce UV sulla proliferazione cellulare. Come composto di riferimento è stato utilizzato il bergaptene, nota molecola di origine naturale ad azione fotosensibilizzante.

La vitalità cellulare è stata quindi determinata mediante il test MTT (Marrelli et al., 2012), basato sull'impiego di un agente cromogeno, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), corrispondente ad un sistema policiclico ($C_{18}H_{16}BrN_5S$).

Questo test è un saggio colorimetrico ampiamente utilizzato, che permette di misurare la proliferazione e la vitalità cellulare attraverso la valutazione dell'efficienza mitocondriale. Il bromuro di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-fenil)-2,5-difenile è un sale di tetrazolio (di colore giallo) che nelle cellule vitali viene ridotto dalla deidrogenasi mitocondriale. La riduzione determina la formazione di cristalli di formazano, che attribuiscono una caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. Questa reazione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, e pertanto in cellule non proliferanti la colorazione risulterà meno intensa.



I cristalli di formazano possono essere solubilizzati per aggiunta di un idoneo reagente. Il numero di cellule sopravvissute è direttamente proporzionale ai livelli di formazano prodotti e l'intensità del colore può essere valutata con l'ausilio di uno spettrofotometro. La produzione di formazano nelle cellule trattate viene valutata in confronto al controllo.

Brevemente, al termine del periodo di incubazione il mezzo è stato rimosso e sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 μ l di MTT 0.5% p/v solubilizzato in DPBS (*Dulbecco phosphate buffer saline*). Dopo quattro ore la soluzione di MTT è stata rimossa e sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 microlitri di DMSO, per disciogliere i cristalli di formazano. L'assorbanza è stata letta a 570 nm mediante un lettore di micropiastre. La percentuale di inibizione della vitalità cellulare è stata valutata secondo la seguente formula:

% inibizione = $(1 - \text{assorbanza campione} / \text{assorbanza controllo}) \times 100$

La citotossicità è stata espressa come valore di IC₅₀, la concentrazione in grado di determinare il 50% di inibizione in confronto al controllo (cellule non trattate).

3.3.3.3 Osservazioni al microscopio della morfologia cellulare

I cambiamenti della morfologia cellulare sono stati visualizzati utilizzando un microscopio invertito (AE20 Motic Motic, Instruments, Inc., VWR, Milano, Italia). Le immagini sono state scattate mediante l'impiego di una macchina fotografica digitale VWR VisiCam USB 3.0 (Milano, Italia).

3.3.4 Analisi statistiche

I saggi biologici per la valutazione dell'attività antiossidante sono stati condotti in triplicato mentre gli esperimenti atti a valutare la fotocitotossicità dei campioni sono stati condotti in sestuplicato. I dati sono stati espressi come valore medio \pm S.E.M. La concentrazione in grado di indurre una inibizione del 50% (IC₅₀) è stata calcolata tramite un'analisi di regressione non lineare utilizzando il Software Prism GraphPad (San Diego, CA, USA). La significatività statistica è stata valutata mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA, *one-way analysis of variance*) utilizzando il software SigmaStat (Jantel software scientifico, San Rafael, CA, USA). Differenze significative nei vari esperimenti sono valutate con il test di Tukey. Le differenze sono state considerate significative per valori di $P < 0,05$.

CAPITOLO 4

PARTE SPERIMENTALE: RISULTATI

3.1. INTRODUZIONE

Sono stati identificati diversi composti ad azione fotosensibilizzante, alcuni dei quali presenti in commercio. Molti agenti fotoattivi sono di origine naturale. Dalla ricerca bibliografica condotta nel corso del primo anno di dottorato è emerso che il numero dei lavori in letteratura che riguardano la terapia fotodinamica è in continuo aumento (Fig. 1). Il dato che stupisce, al contrario, è il numero veramente esiguo di studi relativi alla valutazione dell'attività fototossica degli estratti vegetali. Le risorse naturali sono ancora largamente inesplorate e da questo consegue che, potenzialmente, molti composti ad azione fotosensibilizzante utili in campo oncologico potrebbero essere ancora individuati.

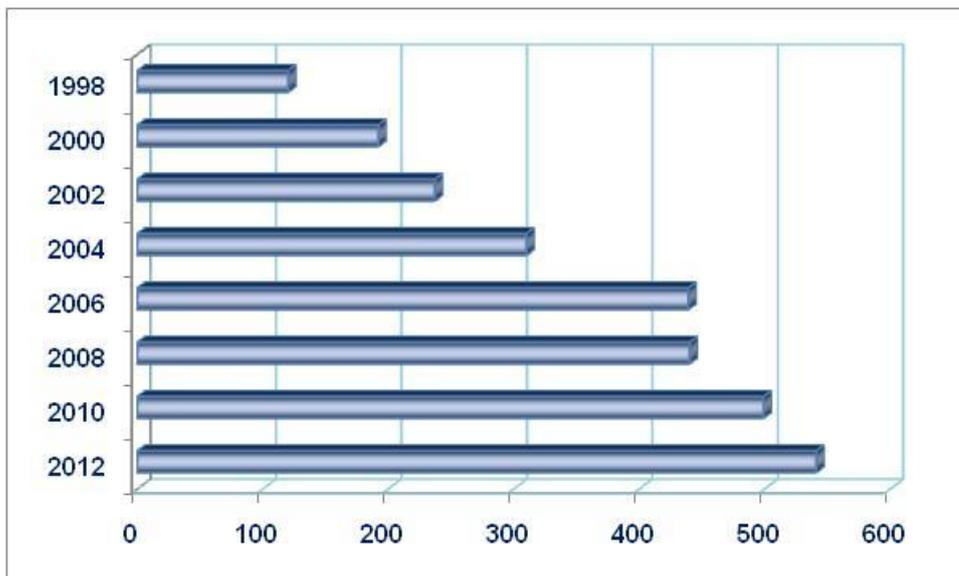


Fig. 1. “Photodynamic therapy”: studi citati da Pubmed dal 1998 ad oggi (numero di pubblicazioni che riportano nel titolo il termine “terapia fotodinamica”).

Obiettivo dell'attività di ricerca è stato quello di individuare fitocomplessi e nuovi principi attivi potenzialmente applicabili in PUVA terapia ed in terapia fotodinamica, due nuove ed importanti opzioni terapeutiche impiegate nella cura del cancro.

Il lavoro sperimentale è stato dedicato allo studio di diverse specie, scelte per l'elevato contenuto in sostanze ad azione fotosensibilizzante: la specie *Cachrys pungens* Jan, appartenente ad un genere che si caratterizza per un'elevata concentrazione di furanocumarine, la specie *Ficus carica* L., ed in particolar modo la cultivar Dottato e, infine, diversi campioni di *Hypericum perforatum* L., pianta ricca di sostanze ad azione fotosensibilizzante potenzialmente utili in terapia fotodinamica, come l'ipericina e le iperforine.

Il progetto di ricerca ha previsto l'analisi del contenuto fitochimico delle specie in esame nonché la successiva valutazione dell'attività biologica degli estratti, sottoposti anche a frazionamento al fine di ottenere campioni particolarmente attivi. Il materiale vegetale così selezionato è stato nuovamente soggetto a test *in vitro* per la valutazione dell'attività fotosensibilizzante.

La fotocitotossicità degli estratti e delle frazioni da essi ottenute è stata testata *in vitro* su linee cellulari tumorali umane.

Abbiamo valutato, inoltre, anche l'attività antiossidante dei campioni in esame, poiché è noto che la produzione di radicali liberi è anche correlata ad alcuni step della carcinogenesi. Pertanto, un fitocomplesso dotato di attività antiossidante potrebbe essere utilmente impiegato in terapia per le sue proprietà fotosensibilizzanti.

3.2 CACHRYS PUNGENS JAN

L'attività di ricerca è stata inizialmente dedicata allo studio di estratti di *Cachrys pungens* Jan. La specie in esame è endemica dell'Italia meridionale ed è presente soprattutto in Puglia, Calabria e Sicilia. Scopo del lavoro di tesi è stato quello di isolare ed identificare i composti presenti nelle parti aeree e di valutare le proprietà biologiche della pianta, sulla quale non abbiamo riscontrato lavori precedenti in letteratura.

Si è scelto di utilizzare diverse tecniche estrattive del materiale vegetale in esame, in modo da poter individuare la metodica più adatta all'ottenimento di estratti particolarmente attivi. Il progetto ha previsto, in particolare, oltre all'impiego della tecnica della macerazione, l'utilizzo di un estrattore che impiega la CO₂ supercritica per l'estrazione di composti a bassa polarità.

L'impiego dei fluidi supercritici costituisce un'ottima alternativa ai metodi di estrazione classici. Per la possibilità di escludere o minimizzare l'impiego di solventi organici, la CO₂ supercritica rappresenta un validissimo strumento nella ricerca farmaceutica tecnologica ed applicativa. Essa può costituire un mezzo ideale, anche da un punto di vista ecologico, per l'estrazione di prodotti biologicamente attivi da matrici vegetali.

3.2.1. Analisi fitochimica

Il contenuto fenolico totale dell'estratto metanolico è stato analizzato mediante il reattivo di Folin-Ciocolteau, ed è risultato essere di 18 mg/g di materiale vegetale secco (Menichini et al., 2012a). La composizione fitochimica delle frazioni apolari è stata determinata mediante gas-cromatografia abbinata a spettrometria di massa (GC-MS).

La Tabella 1 riporta la composizione chimica della frazione in *n*-esano. Sono stati identificati 39 composti: 5 monoterpeni, 10 sesquiterpeni ed un alcol sesquiterpenico, 1 diterpene, 1 triterpene, 10 acidi grassi, 6 fitosteroli, 4 alcani e la vitamina E (tocoferolo). I terpeni sono risultati essere i composti più numerosi, sebbene presenti nella frazione in quantità modeste. Tra queste molecole, i due sesquiterpeni valeranone e β -bisabolene sono apparsi i costituenti maggiori (0,7% e 0,2%, rispettivamente).

Complessivamente, i composti più abbondanti sono stati i tre acidi grassi acido esadecanoico (2,5%), metil estere dell'acido esadecanoico (1,1%) e metil estere dell'acido 8,11-ottadecadienoico (2,2%), l'alcano nonacosano (1,5%) ed il fitosterolo γ -sitosterolo (1,2%).

Tab. 1. Composizione chimica della frazione in *n*-esano dell'estratto di *C. pungens* Jan.

| Composto | R _t | RAP |
|---|----------------|-----|
| β-Myrcene | 8.054 | Tr |
| α-Phellandrene | 8.343 | Tr |
| β-Phellandrene | 8.797 | 0.1 |
| β-Ocimene | 9.117 | Tr |
| Carvacrol | 12.701 | 0.1 |
| α-Cubebene | 13.221 | Tr |
| α-Capaene | 13.535 | Tr |
| <i>trans</i> -caryophyllene | 14.038 | 0.1 |
| Clovene | 14.118 | Tr |
| β-Farnesene | 14.267 | 0.1 |
| β-Selinene | 14.393 | Tr |
| α-Longipinene | 14.776 | 0.1 |
| β-Bisabolene | 14.827 | 0.2 |
| Dodecanoic acid | 15.301 | Tr |
| γ-Cadinene | 16.153 | 0.1 |
| Caryophyllenol-II | 16.456 | 0.1 |
| Valeranone | 16.513 | 0.7 |
| Tetradecanoic acid, methyl ester | 17.073 | 0.3 |
| Pentadecanoic acid, methyl ester | 17.526 | Tr |
| Neophytadiene | 17.645 | 0.3 |
| Hexadecanoic acid, methyl ester | 18.336 | 1.1 |
| Hexadecanoic acid | 18.742 | 2.5 |
| Hexadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester | 19.085 | 0.2 |
| Heptadecanoic acid | 19.394 | 0.2 |
| 8,11-octadecadienoic acid, methyl ester | 19.639 | 2.2 |
| 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- | 20.565 | 0.2 |
| Pentacosane | 22.246 | 0.7 |
| Docosanoic acid, methyl ester | 22.474 | 0.3 |
| Octacosane | 24.635 | 0.2 |
| Nonacosane | 25.755 | 1.5 |
| Docosane | 28.647 | Tr |
| Vitamin E | 29.710 | 0.4 |
| Campesterol | 31.779 | 0.1 |
| Stigmasterolo | 32.596 | 2.3 |
| γ-Sitosterol | 34.156 | 1.2 |
| β-Amyrin | 35.088 | 0.1 |
| Stigmast-7-en-3-ol, (3β, 5α, 24S) | 35.982 | 0.1 |
| Cycloartenol | 36.202 | 0.1 |
| 9,19-Ciclolanostan-3-ol, 24-methylene, (3β) | 38.214 | 0.1 |

Composti elencati in ordine di eluizione dalla colonna SE30 MS; R_t, Tempo di ritenzione (min); RAP, *relative area percentage* (area del picco rispetto all'area totale dei picchi %); Tr, valori minori di 0,1% sono indicati come tracce.

L'analisi della frazione in cloroformio è stata particolarmente interessante perché ha consentito di identificare molte cumarine, come mostrato in Tabella 2. Sono stati individuati 12 composti, tra i quali 8 cumarine: 5 furanocumarine lineari (psoralene, xantotossina, bergaptene, isopimpinellina ed ossipeucedanina) ed una angolare (columbianetina), una piranocumarina (jatamansina) e la cumarina 3-metilsuberosina. Quest'ultimo composto è risultato essere il più abbondante (25,2% della frazione cloroformica). Una percentuale significativa è stata osservata anche per le furanocumarine lineari isopimpinellina (8,7%), xantotossina (6,4%) e bergaptene (5,2%) e per la piranocumarina jatamansina (5,7%).

Tab. 2. Composizione chimica della frazione cloroformica dell'estratto di *C. pungens* Jan.

| Composto | R _t | RAP |
|---------------------------|----------------|------|
| Carvacrol | 12.615 | 0.1 |
| Psoralene | 17.782 | 0.2 |
| Tetradecanoic acid | 18.114 | 0.1 |
| Xanthotoxin | 19.399 | 6.4 |
| Bergapten | 19.662 | 5.2 |
| 3-Methylsuberosine | 20.097 | 25.2 |
| Isopimpinellin | 20.868 | 8.7 |
| Columbianetin | 21.360 | 1.2 |
| 9,12-octadecadienoic acid | 21.731 | 0.5 |
| Isooxypeucedanin | 22.611 | 0.4 |
| Jatamansin | 24.652 | 5.7 |
| Vitamin E | 29.333 | 0.4 |

Composti elencati in ordine di eluizione dalla colonna SE30 MS; R_t, Tempo di ritenzione (min); RAP, *relative area percentage* (area del picco rispetto all'area totale dei picchi %).

La frazione cloroformica è stata inoltre analizzata mediante cromatografia su colonna, che ha consentito di isolare un'interessante frazione particolarmente ricca in cumarine, analizzata mediante gas-cromatografia (Fig. 2). Xantotossina ed isopimpinellina sono risultati essere i composti più abbondanti ($2,64 \pm 0,04$ e $1,27 \pm 0,01$ mg/g di pianta, rispettivamente).

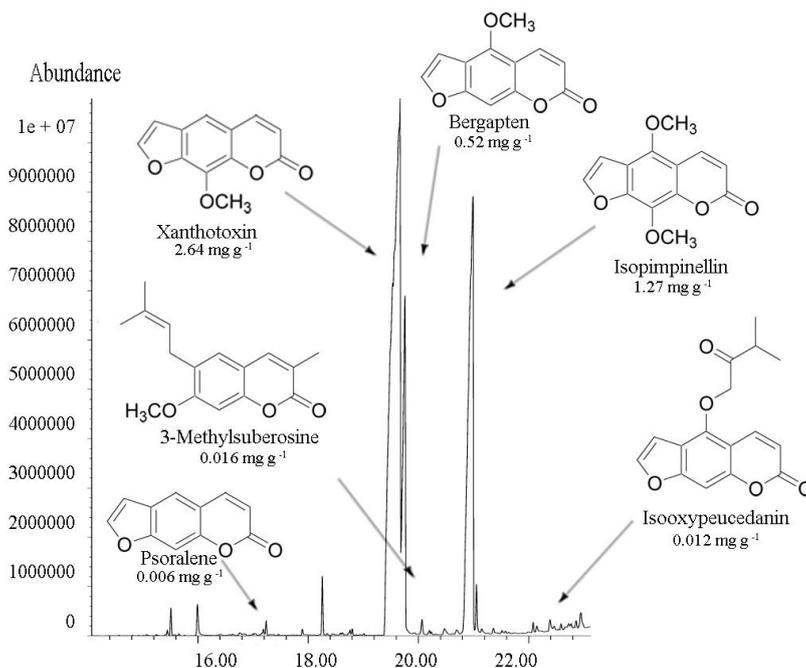


Fig. 2. Cromatogramma della frazione cumarinica isolata dall'estratto in cloroformio di *C. pungens* e strutture chimiche dei costituenti principali. Le concentrazioni sono state espresse in mg/g di materiale vegetale secco.

Anche il contenuto di bergaptene è apparso rilevante ($0,52 \pm 0,005$ mg/g di frazione), mentre i composti 3-metilsuberosina, isoossipeucedanina e psoralene sono stati rilevati in concentrazioni più basse (rispettivamente $0,016 \pm 0,002$, $0,012 \pm 0,001$ e $0,006 \pm 0,001$ mg/g).

Nel corso delle analisi fitochimiche, inoltre, è stato possibile osservare la formazione di un precipitato nell'estratto metanolico. La struttura di questo composto è stata analizzata mediante risonanza magnetica nucleare, analisi che ha consentito di identificare, dal confronto con i dati presenti in letteratura (Markham & Ternai, 1976), il glicoside flavanico esperidina (esperetina-7-O-rutinoside, Fig. 3).

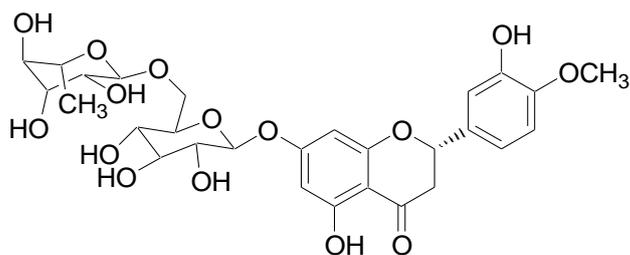


Fig. 3. Struttura chimica del glicoside flavanico esperidina.

Una volta appurata l'attività fotobiologica dell'estratto, scopo successivo dell'attività di ricerca è stato quello di individuare la metodica estrattiva più adatta all'ottenimento di campioni molto attivi. Il progetto ha dunque previsto, oltre all'impiego della tecnica della macerazione, la realizzazione di un'estrazione mediante CO₂ supercritica. La procedura estrattiva è stata realizzata presso il Laboratorio di Reologia ed Ingegneria alimentare del Dipartimento di Ingegneria Informatica, Modellistica, Elettronica e Sistemistica (DIMES) dell'Università della Calabria.

Il contenuto fitochimico dell'estratto ottenuto è stata analizzato, anche in questo caso, mediante gas-cromatografia abbinata alla spettrometria di massa. I composti identificati sono riportati in Tabella 3.

Tab. 3. Composizione chimica dell'estratto di *C. pungens* Jan ottenuto mediante CO₂ supercritica.

| Componente | R _t | RAP |
|--|----------------|-----|
| Neophytadiene | 17.502 | 3.5 |
| Tetradecanoic acid | 18.468 | 3.3 |
| Xanthotoxin | 19.314 | 0.8 |
| 9-Octadecen-1-ol, (Z)- | 19.325 | Tr. |
| 9,17-Octadecadienal, (Z)- | 19.388 | Tr. |
| Bergapten | 19.462 | 4.2 |
| 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11-tetramethyl- [R[R*,R*-(E)]]- | 19.611 | 7.2 |
| 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) | 19.754 | Tr. |
| Osthol | 19.937 | 2.3 |
| Isopimpinellin | 20.691 | 1.1 |
| Tricosane | 20.834 | 2.0 |
| Pentacosane | 22.097 | 4.1 |
| Heptadecene-(8)-carbonic acid-(1) | 22.606 | Tr. |
| Heptacosane | 23.526 | 1.8 |
| Nonadecane | 23.554 | 5.6 |
| Tetracosanoic acid, methyl ester | 23.834 | 0.8 |
| Jatamansin | 24.521 | 3.2 |
| Nonacosane | 25.515 | 3.7 |
| Stigmasterolo | 32.162 | 4.8 |
| γ-Sitosterol | 33.632 | 9.8 |
| 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (3b) | 35.751 | 1.8 |

Composti elencati in ordine di eluizione dalla colonna SE30 MS; R_t, Tempo di ritenzione (min); RAP, relative area percentage (area del picco rispetto all'area totale dei picchi %).

Le analisi hanno consentito di identificare 21 molecole, tra le quali tre furanocumarine: xantotossina, bergaptene ed isopimpinellina. Sono stati inoltre

individuati, tra gli altri, la piranocumarina jatamansina, la cumarina ostolo, il metil estere dell'acido lignocericico e diversi alcani. Il dato più interessante concernente l'estrazione in anidride carbonica supercritica è costituito dalle elevate concentrazioni di fitosteroli che è stato possibile ottenere. Sono stati identificati infatti stigmasterolo (4,8%), γ -sitosterol (9,8%) e 9,19-cyclolanost-24-en-3-ol (3 β) (1,8%), presenti in quantità superiori a quelle riscontrate nell'estratto ottenuto per macerazione.

3.2.2. Attività antiossidante

L'attività antiossidante dell'estratto metanolico di *C. pungens* e delle sue frazioni è stata testata utilizzando il DPPH test ed il B-carotene *bleaching test*. Entrambi i saggi biologici hanno dimostrato l'efficacia degli estratti in confronto ai controlli positivi utilizzati. Gli estratti esaminati sono stati in grado di ridurre il radicale DPPH in modo concentrazione dipendente. La frazione in acetato di etile è risultata essere la più attiva, con un valore di IC₅₀ di 12,15 \pm 0,02 μ g/ml (Tab. 4, Fig.4). Per l'estratto metanolico è stato ottenuto un valore di IC₅₀ pari a 145,60 \pm 0,02 μ g/ml. Un'attività minore è stata osservata, invece, per le frazioni in cloroformio ed in *n*-esano (IC₅₀ pari rispettivamente a 281,0 \pm 0,04 e 391,0 \pm 0,15 μ g/ml).

Tab. 4. Attività *radical scavenging* dell'estratto e delle frazioni di *C. pungens* Jan.

| Estratto | DPPH (IC ₅₀ μ g/ml) |
|------------------|------------------------------------|
| Metanolo | 145,60 \pm 0,02 ^c |
| <i>n</i> -Esano | 391,00 \pm 0,15 ^e |
| Cloroformio | 281,00 \pm 0,04 ^d |
| Acetate di etile | 12,15 \pm 0,02 ^b |
| Acido ascorbico | 2,00 \pm 0,01 ^a |

I dati sono espresso come media \pm S.E.M. (n=3); Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). L'acido ascorbico è stato impiegato come controllo positivo.

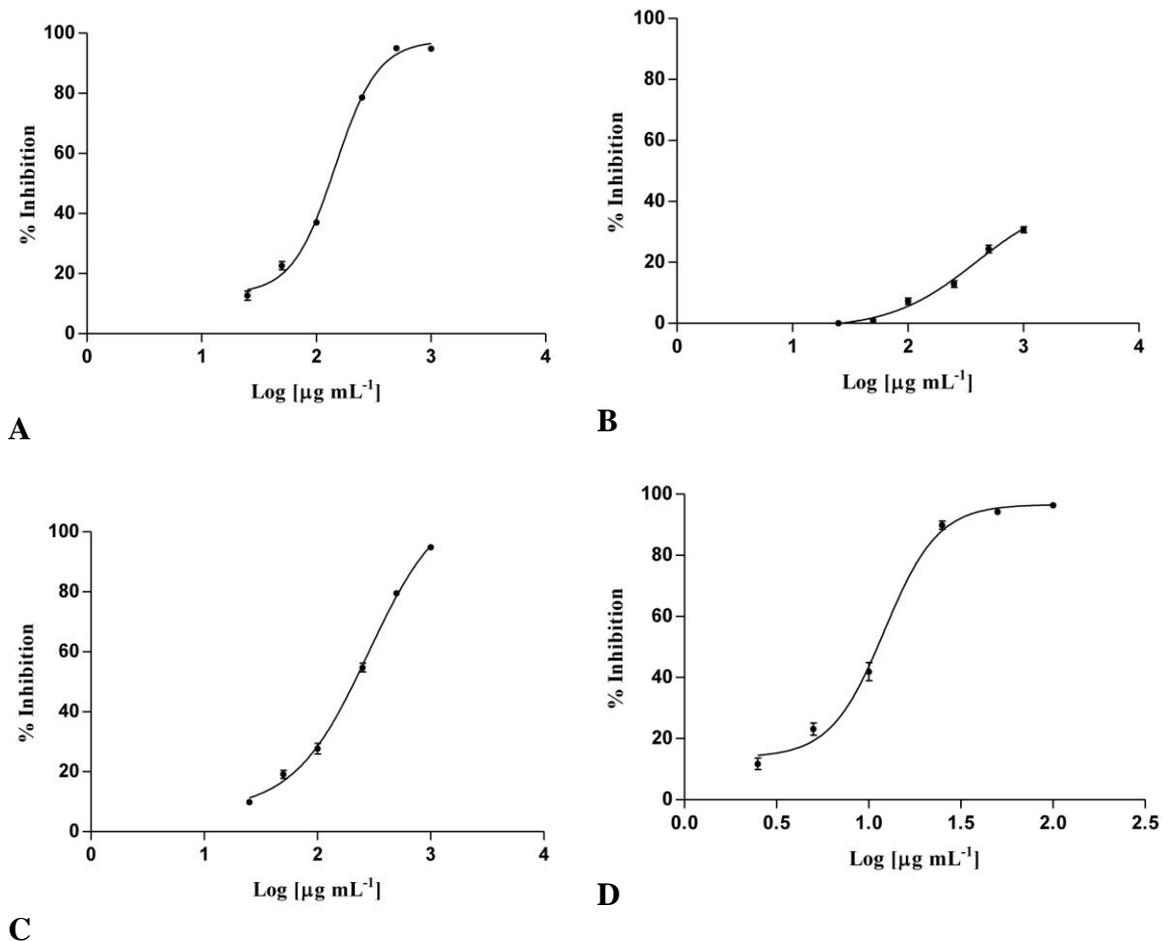


Fig. 4. Attività *free radical scavenging* nei confronti del radicale DPPH dei campioni di *C. pungens*. A: estratto metanolico; B: frazione in *n*-esano; C: frazione in cloroformio; D: frazione in acetato di etile. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n=3$); Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). L'acido ascorbico ($IC_{50} = 2.00 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo.

La Tab. 5 riporta invece i risultati del secondo saggio effettuato, il β -carotene *bleaching test*. Anche in questo caso la frazione in acetato di etile e l'estratto metanolico hanno mostrato la migliore attività inibitoria, con valori di IC_{50} , rispettivamente, di $8,33 \pm 0,03$ e $9,16 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$ dopo 30 minuti di incubazione (Fig. 5). L'analisi statistica (test di Tukey) non ha mostrato differenze statistiche significative nell'attività dei due campioni.

Tab. 5. Attività antiossidante degli estratti di *Cachrys pungens* Jan.

| Estratto | β -carotene bleaching test (IC_{50} μ g/ml) | |
|--------------------|--|-----------------------|
| | 30 min di incubazione | 60 min di incubazione |
| Metanolo | $9,16 \pm 0,27^b$ | $21,53 \pm 0,34^d$ |
| <i>n</i> -Esano | N.D. | N.D. |
| Cloroformio | $19,73 \pm 0,61^c$ | $29,82 \pm 0,05^e$ |
| Acetato di etile | $8,33 \pm 0,03^b$ | $19,48 \pm 0,05^c$ |
| Gallato di propile | $1,00 \pm 0,02^a$ | $1,00 \pm 0,02^a$ |

I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n=3$); Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). N.D.: non determinabile. Il gallato di propile è stato impiegato come controllo positivo.

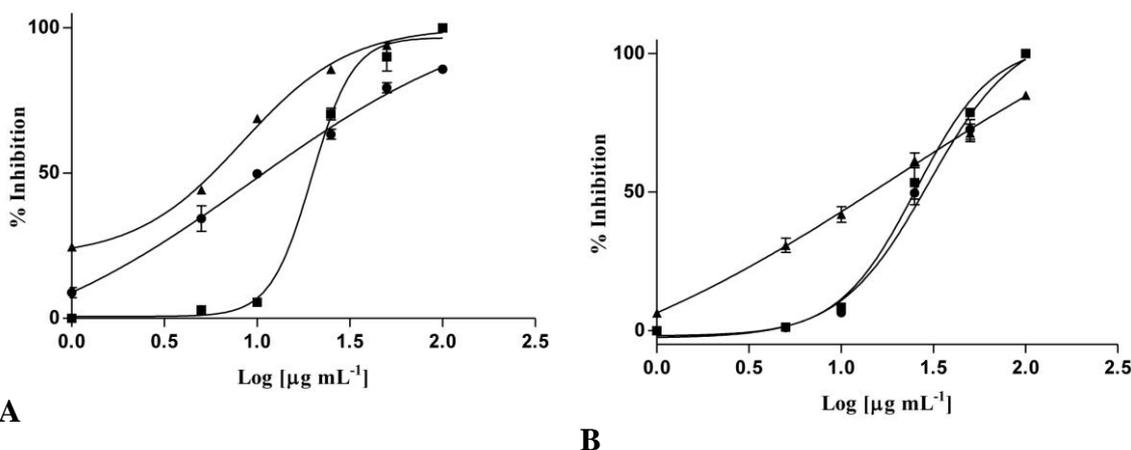


Fig. 5. Inibizione della perossidazione lipidica analizzata mediante il test del dopo 30 e 60 minuti di incubazione. ●: estratto metanolico; ■: frazione cloroformica; ▲: frazione in acetato di etile; A: 30 minuti; B: 60 minuti; I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n=3$). Il gallato di propile ($IC_{50} = 1,00 \pm 0,02$ μ g/ml) è stato impiegato come controllo positivo.

Effetti minori sono stati osservati per la frazione cloroformica, con un valore di IC_{50} pari a $19,73 \pm 0,61$ μ g/ml, mentre la frazione in *n*-esano non ha mostrato attività significativa ($IC_{50} > 100$ μ g/ml). Dopo 60 minuti di incubazione è stato osservato un significativo aumento nel valore di IC_{50} , dato che indica una diminuzione dell'attività antiossidante in funzione del tempo di incubazione.

3.2.3. Fotocitotossicità

L'attività fototossica degli estratti di *C. pungens* è stata studiata sulla linea cellulare tumorale umana A375 (melanoma). Le cellule sono state irradiate con luce UVA ad

una lunghezza d'onda di 365 nm e ad una dose di 1,08 J/cm². Per completezza, gli stessi esperimenti sono stati realizzati anche su cellule non sottoposte ad irradiazione, per verificare l'effettiva influenza della radiazione luminosa nell'attività citotossica dei campioni, e su cellule sottoposte ad irradiazione ma incubate in assenza del campione in esame (Tab. 6).

Tab. 6. Effetti dell'estratto di *C. pungens* Jan e delle frazioni da esso ottenute sulle cellule A375 esposte a radiazioni UVA (365 nm).

| Estratto | MTT test (IC ₅₀ µg/ml) | |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | Cellule A375 irradiate | Cellule A375 non irradiate |
| Metanolo | 0,487 ± 0,037 ^d | 49,950 ± 0,018 ^a |
| Cloroformio | 0,286 ± 0,067 ^e | 34,280 ± 0,022 ^b |
| Frazione cumarinica | 0,209 ± 0,033 ^e | 31,620 ± 0,018 ^c |
| Bergaptene | 0,0416 ± 0,008 ^f | N.D. |

Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame (0,010–100 µg/mL) e irradiate ad una dose di 1,08 J/cm². Come controllo cellule irradiate e non irradiate sono state incubate in presenza di DMSO 0,5% v/v. I dati sono espressi come media ± S.E.M. ($n = 6$). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). N.D.: non determinabile. Il bergaptene è stato impiegato come controllo positivo.

La migliore attività antiproliferativa è stata ottenuta per l'estratto in cloroformio e per la frazione cumarinica, con valori di IC₅₀ di 0,286 ± 0,067 e 0,209 ± 0,033 µg/ml (Fig. 6). I loro effetti antiproliferativi possono essere attribuiti alla presenza delle furanocumarine identificate in entrambi i campioni. Esse costituiscono infatti un'importante classe di agenti fotosensibilizzanti naturali (Conforti et al., 2009a). Le analisi statistiche hanno evidenziato che gli effetti fotocitotossici dei due estratti non mostrano differenze significative. Questo risultato conferma ulteriormente che le proprietà fototossiche della frazione cloroformica possono essere attribuite al contenuto in furanocumarine evidenziato dall'analisi fitochimica. L'estratto metanolico ha mostrato, invece, un'attività minore (IC₅₀ = 0,487 ± 0,037 µg/ml).

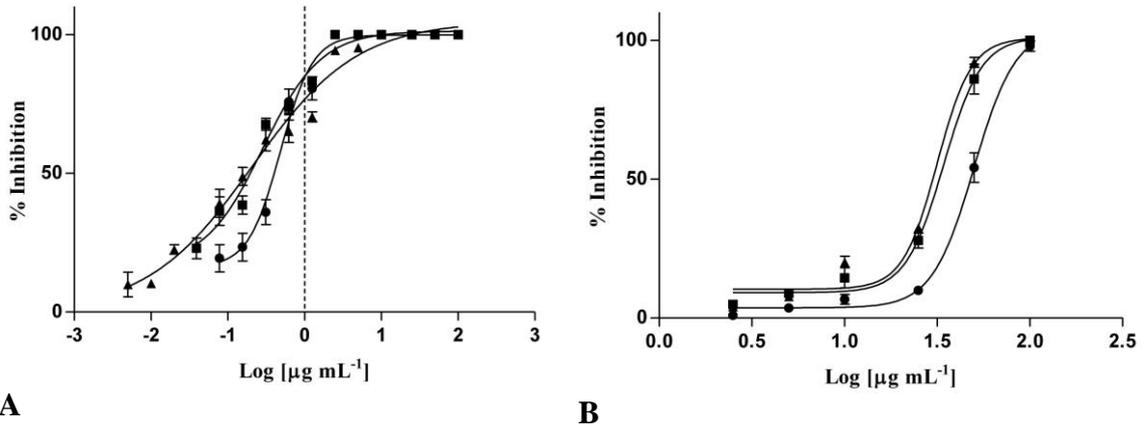


Fig. 6. Effetti citotossici indotti dall'estratto di *C. pungens* Jan e dalle sue frazioni sulla linea cellulare A375 dopo esposizione a radiazioni UVA. ●: estratto metanolico; ■: frazione cloroformica; ▲: frazione cumarinica; A: dopo irradiazione con raggi ultravioletti di tipo A (UVA); B: senza irradiazione. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. (n = 6). Il bergaptene ($IC_{50} = 0.0416 \pm 0.008$ $\mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo.

La Fig. 7 mostra la morfologia cellulare dopo trattamento con diverse concentrazioni della frazione cumarinica di *C. pungens* ed esposizione a raggi ultravioletti di tipo A (UVA). Dopo l'irradiazione è possibile osservare differenze notevoli. Nessun effetto è osservabile nel controllo, costituito da cellule incubate in DMEM 0,5% di DMSO irradiate in assenza dell'estratto (a). In figura è possibile osservare, inoltre, le notevoli differenze tra le cellule trattate con la frazione cumarinica alla concentrazione di 5 $\mu\text{g/ml}$ dopo irradiazione (c) e senza (d), pozzetto in cui la morfologia è molto simile a quella del controllo (a). La frazione cumarinica isolata dall'estratto in cloroformio ha determinato una notevole diminuzione del numero di cellule e anche considerevoli cambiamenti della loro morfologia.

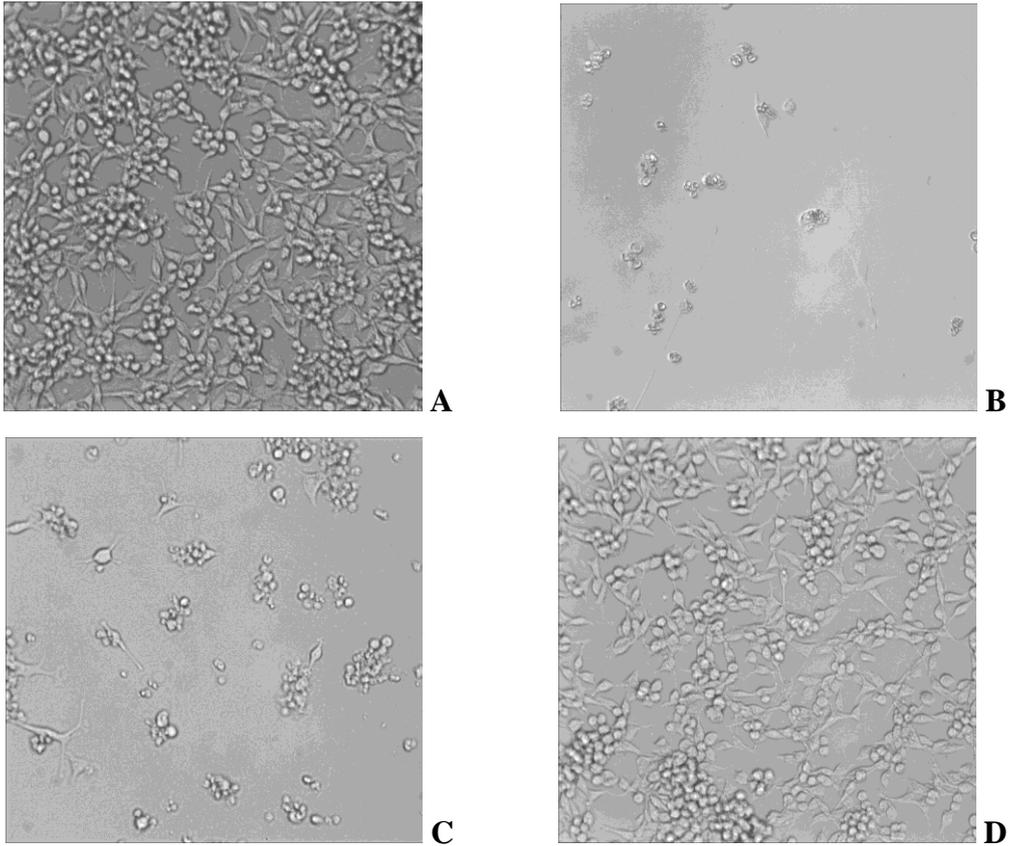


Fig. 7. Cambiamenti morfologici delle cellule A375 dopo 48 ore di incubazione in presenza della frazione cumarinica di *C. pungens*. A: controllo, cellule irradiate in DMEM 0,5% DMSO, senza campione; B: cellule irradiate, 100 µg/ml; C: cellule irradiate, 5 µg/ml; D: cellule non sottoposte ad irradiazione, 5 µg/ml.

3.3 *FICUS CARICA* L. CV. DOTTATO

In una seconda fase, l'attività di ricerca è stata dedicata alla valutazione delle potenziali applicazioni terapeutiche di estratti di *Ficus carica* L. cultivar Dottato in combinazione con la luce UV del trattamento del melanoma. È stato analizzato, per tutti i campioni, il contenuto in furanocumarine e, successivamente, l'attività fotosensibilizzante *in vitro*. Le foglie, ed in particolare il lattice del fico, sono noti per il loro contenuto in furanocumarine. Il nostro obiettivo è stato quello di analizzare gli effetti fototossici e, conseguentemente, le potenziali applicazioni in fotochemioterapia di tutta la parte epigea della pianta. Non abbiamo riscontrato studi precedenti di questo tipo sul Fico Dottato.

3.3.1. Lattice

Il lattice è stato ottenuto manualmente dai frutti e dalle foglie. I campioni sono stati ottenuti goccia a goccia senza spremitura e conservati a -20 °C fino al giorno delle analisi (Menichini et al., 2012b).

3.3.1.1 Analisi fitochimica

Al fine di identificare i composti apolari, il lattice è stato estratto con metanolo e successivamente con *n*-esano. Le frazioni ottenute sono state analizzate mediante gas-cromatografia abbinata alla spettrometria di massa, che ha consentito l'identificazione di due furanocumarine: psoralene e bergaptene. Entrambi i composti sono stati ritrovati in percentuali maggiori nel lattice fogliare (1,6% per lo psoralene e 1,8% per il bergaptene, contro 0,8% e 1,1% per il lattice ottenuto dai frutti). Nei campioni in esame è stato inoltre possibile evidenziare la presenza di sei fitosteroli e di sei terpeni (Tab. 7).

Il contenuto fenolico totale dei due campioni di lattice è stato invece analizzato mediante il test di Folin Ciocalteu. Il lattice fogliare e quello ottenuto dai frutti hanno presentato, rispettivamente, un contenuto di $34,0 \pm 0,7$ mg/g e $29,0 \pm 0,6$ mg/g.

Tab. 7. Composizione chimica del lattice di *Ficus carica* L. cv. Dottato.

| Composto ^(a) | RT ^(b) | RAP ^(c) | |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | Lattice frutti | Lattice foglie |
| Epi-bicyclosesquiphellandrene | 14.456 | ND | Tr ^(d) |
| Psoralene | 17.770 | 0.8 | 1.6 |
| Heptacosane | 19.056 | ND | Tr |
| Bergaptene | 19.456 | 1.1 | 1.8 |
| Eicosane | 21.074 | ND | Tr |
| β -Amyrin | 34.202 | Tr | 0.3 |
| D:C-Friedours-7-en-3-ol, (3 β)- | 35.031 | 0.2 | 1.2 |
| Lup-20(29)-en-3-ol (3 β)- | 35.482 | 0.7 | 1.1 |
| Lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate (3 β)- | 36.134 | 2.1 | 1.4 |
| Olean-12-en-3-ol, acetate, (3 β)- | 37.305 | Tr | 14.8 |
| Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester,(+)- | 38.786 | 6.3 | Tr |
| A-Neoleana-3(5), 12-diene | 38.860 | 0.9 | 18.8 |
| 5 α -Lanosta-9(11), 25-dien-3 β -ol acetate | 39.049 | 1.7 | 7.0 |
| 5 α -Lanosta-7,24-dien-3 β -ol acetate | 38.912 | Tr | 4.2 |
| A'-Neogammacer-22(29)-en-3-ol, acetate, (3 β), | 42.432 | 1.5 | 3.1 |
| β -Sitosterol | 43.241 | 3.2 | 9.4 |

^a Composti elencati in ordine di eluizione dalla colonna SE30 MS.

^b Tempo di ritenzione (Retention time, min).

^c RAP, *relative area percentage* (area del picco rispetto all'area totale dei picchi %).

^d Valori minori di 0.1% sono indicati come tracce.

3.3.1.2 Attività antiossidante

L'attività antiradicalica degli estratti metanolici dei due campioni di lattice é stata testata mediante il test del DPPH. Entrambi i campioni hanno dimostrato attività *radical scavenging* in modo concentrazione dipendente (Fig. 8). Le analisi statistiche non hanno evidenziato differenze significative nell'attività dei due campioni (valori di IC₅₀ di 0,24 ± 0,04 e 0,30 ± 0,08 mg/ml per il lattice ottenuto dai frutti e dalle foglie, rispettivamente, Tab. 8).

Tab. 8. Attività *radical scavenging* dell'estratto metanolico del lattice di *F. carica* L. cv Dottato.

| Campione | DPPH (IC ₅₀ mg/ml) |
|------------------|-------------------------------|
| Lattice siconio | 0,24 ± 0,04 ^b |
| Lattice fogliare | 0,30 ± 0,08 ^b |
| Acido ascorbico | 0,002 ± 0,00001 ^a |

I dati sono espresso come media ± S.E.M. (n=3); Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0.05$ (test di Tukey). N.D.: non determinabile. L'acido ascorbico è stato impiegato come controllo positivo.

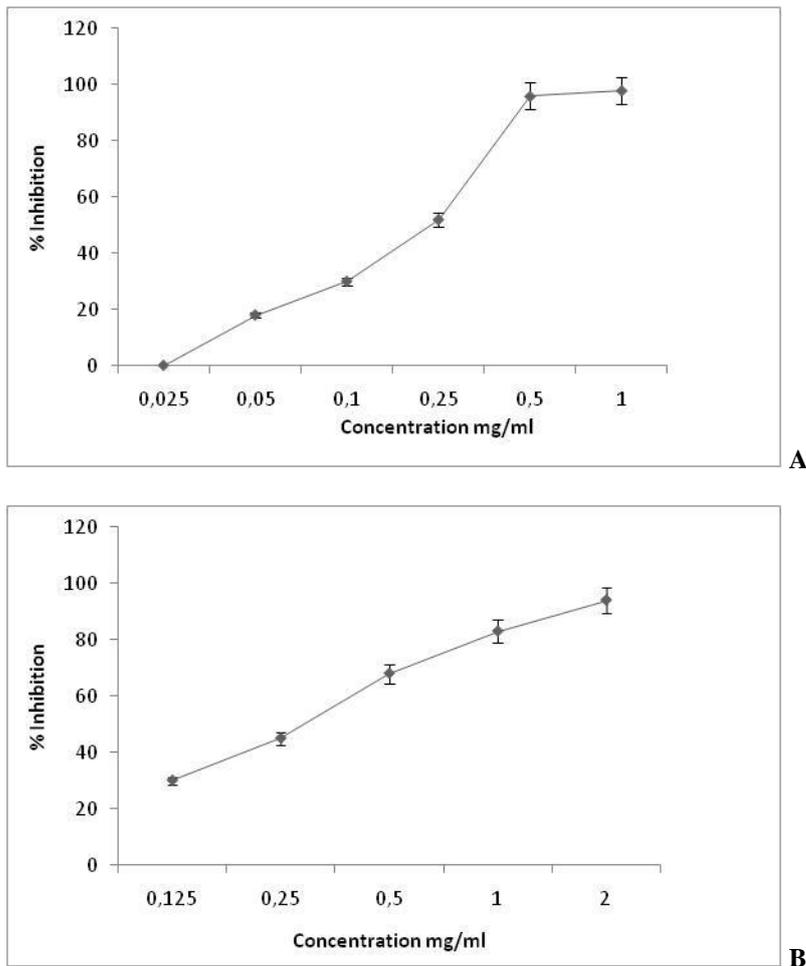


Fig. 8. Attività *radical scavenging* del lattice ottenuto dai frutti (A) e dalle foglie (B) di *Ficus carica* L. cv. Dottato. I dati sono espressi come media \pm D.S. (n=3).

3.3.1.3 Attività fotocitotossica

La fotocitossicità del lattice di *F. carica* L. cv. Dottato è stata analizzata sulla linea cellulare di melanoma umano A375. La Fig. 9 mostra il grado di sopravvivenza cellulare dopo incubazione con i campioni in esame ed irradiazione a luce ultravioletta di tipo A (lunghezza d'onda di 365 nm, dose di 1,08 J/cm²). Esperimenti condotti in assenza di campione oppure in assenza di radiazione luminosa non hanno determinato effetti citotossici degni di nota.

Il lattice fogliare ha mostrato i migliori effetti antiproliferativi, con un valore di IC₅₀ pari a 1,5 \pm 0,01 μ g/ml. Una concentrazione di 50 μ g/ml in associazione alla luce UV ha determinato una completa inibizione della proliferazione cellulare. Il lattice

ottenuto dai frutti ha mostrato un'attività minore, con un valore di IC_{50} di $10,8 \pm 0,27$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 9).

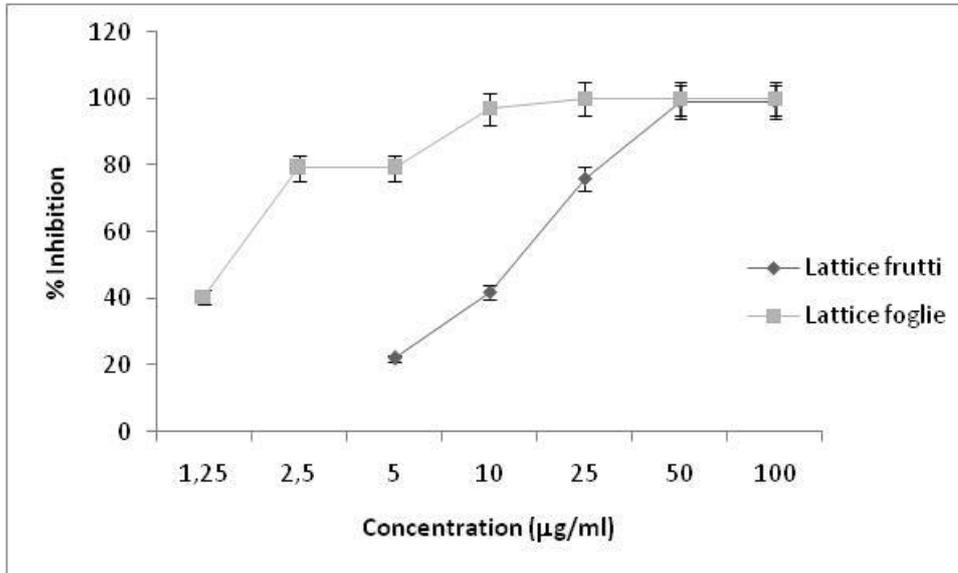


Fig. 9. Effetti del lattice di *F. carica* L. cv. Dottato sulla linea cellulare A375. Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame (0,001–100 $\mu\text{g/ml}$) e irradiate ad una dose di $1,08 \text{ J/cm}^2$. Come controllo, cellule irradiate e non irradiate sono state incubate in presenza di DMSO 0,5% v/v. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n = 4$). Il bergaptene ($IC_{50} = 0,04 \mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo.

Tab. 9. Effetti del lattice di *F. carica* L. cv. Dottato sulle cellule A375 esposte a luce UVA (365 nm).

| Estratto | MTT test (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) | |
|------------------|---|----------------------------|
| | Cellule A375 irradiate | Cellule A375 non irradiate |
| Lattice siconio | $10,80 \pm 0,27^a$ | > 50 |
| Lattice fogliare | $1,50 \pm 0,01^b$ | > 50 |
| Bergaptene | $0,0416 \pm 0,008^c$ | N.D. |

Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame (0,00125–100 $\mu\text{g/ml}$) e irradiate ad una dose di $1,08 \text{ J/cm}^2$. Come controllo cellule irradiate e non irradiate sono state incubate in presenza di DMSO 0.5% v/v. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n = 6$). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey, $n=4$). N.D.: non determinabile. Il bergaptene è stato impiegato come controllo positivo.

La Fig. 10 mette in evidenza le differenze tra la morfologia del controllo (cellule non trattate con i campioni) (A) a delle cellule incubate con il lattice fogliare (2 $\mu\text{g/ml}$) senza irradiazione (B) e con irradiazione (C). La figura evidenzia anche gli effetti

dell'esposizione alla luce ultravioletta su cellule incubate con lattice fogliare alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ (D).

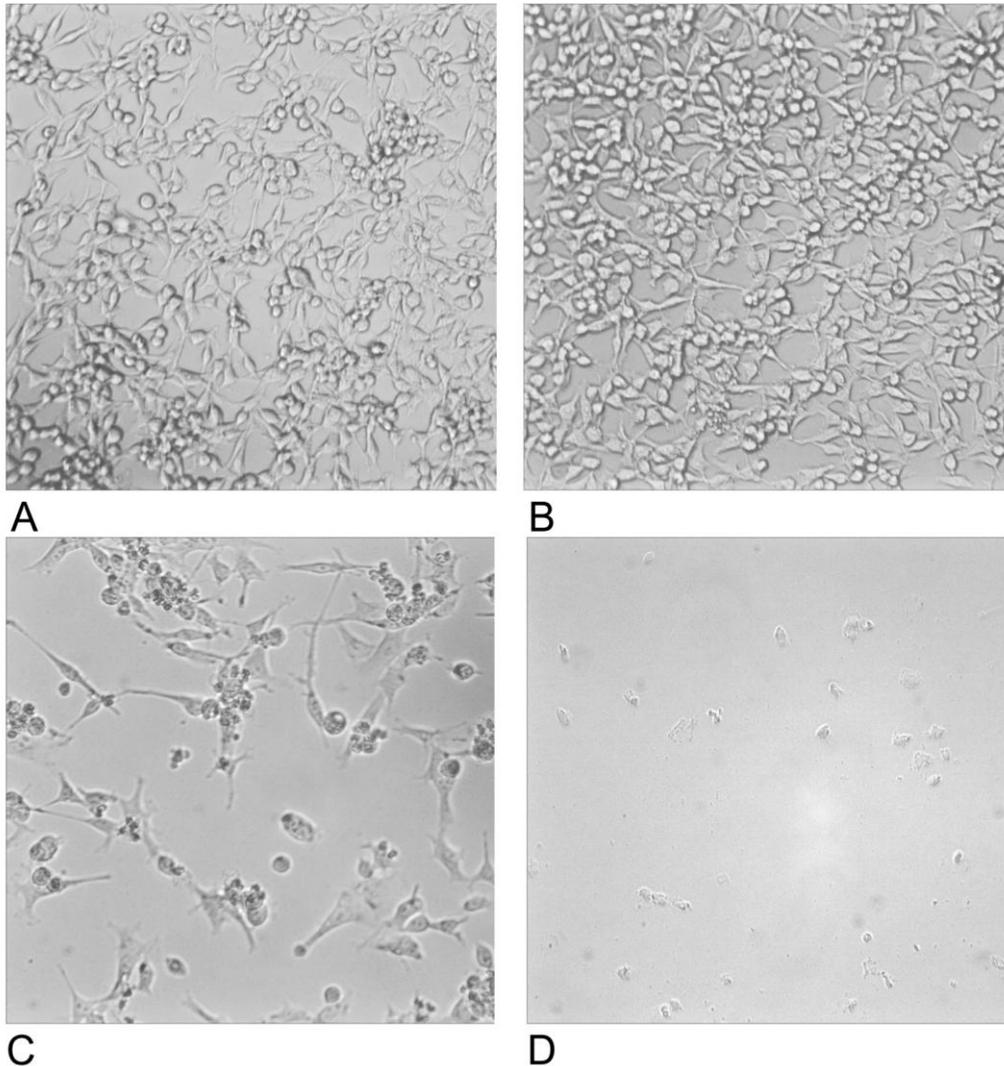


Fig. 10. (A) Controllo, cellule irradiate in assenza di campione e incubate in presenza di DMSO (0,5 v/v); (B) Cellule non irradiate trattate con una concentrazione 2 $\mu\text{g/ml}$ di lattice fogliare; (C) Cellule irradiate trattate con una concentrazione 2 $\mu\text{g/ml}$ di lattice fogliare; (D) Effetti della radiazione UV su cellule trattate con una concentrazione 50 $\mu\text{g/ml}$ di lattice fogliare.

3.3.2. Parti aeree

L'attività di ricerca è stata quindi dedicata all'analisi del contenuto fitochimico e dell'attività biologica, antiossidante e fotocitotossica, di tutta la parte epigea della pianta, alcune componenti della quale sono stati trascurati dagli studi precedenti presenti in letteratura.

3.3.2.1. Analisi fitochimica

I composti apolari sono stati identificati mediante GC-MS. Le cumarine e gli acidi grassi sono risultati essere i principali costituenti di tutti i campioni, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (Marrelli et al., 2013a). Tra le cumarine, lo psoralene ed il bergaptene sono apparsi i più abbondanti. Le analisi hanno evidenziato che lo psoralene è presente nelle diverse parti della pianta in concentrazioni significativamente differenti, seguendo la seguente scala gerarchica: corteccia>foglie>parte legnosa (rispettivamente 23,3%, 19,2% e 8,6, Tab. 10). Il bergaptene è risultato essere maggiormente presente, invece, nel campione ottenuto dalle foglie (7,5%).

Tab. 10. Cumarine presenti negli estratti delle parti aeree di *F. carica* cv. Dottato.

| Campione | RAP | |
|----------------------|------------|-------------|
| | Psoralene* | Bergaptene* |
| <i>Foglie</i> | 19,2 | 7,5 |
| <i>Corteccia</i> | 23,3 | 6,6 |
| <i>Parte legnosa</i> | 6,9 | 2,3 |

* RAP, *relative area percentage* (area del picco rispetto all'area totale dei picchi %).

La tab. 11 riporta invece il contenuto di acidi grassi dei vari estratti. Per quanto concerne le foglie, l'etil estere dell'acido stearico, il metil estere dell'acido linoleico, l'etil estere dell'acido linoleico e l'acido linoleico sono stati identificati come gli acidi grassi maggiormente presenti (8,7%, 7,9%, 6,8% e 5,8%).

Nella corteccia l'acido grasso presente in quantità superiore è stato l'acido palmitico (7,9%), mentre nella parte legnosa gli acidi grassi predominanti sono stati l'etil estere dell'acido linolenico (14.1%) e l'etil estere dell'acido palmitico (11.8%).

Tab. 11. Acidi grassi presenti negli estratti delle parti aeree di *F. carica* cv. Dottato.

| Campione | RAP | | |
|-----------------------------|--------|-----------|---------------|
| | Foglie | Corteccia | Parte legnosa |
| Palmitic acid methyl ester | 0.4 | 1.2 | 0.7 |
| Palmitic acid ethyl ester | 2.8 | 3.4 | 11.8 |
| Palmitic acid | 4.4 | 7.9 | 6.4 |
| Linolenic acid methyl ester | 7.9 | 0.2 | Tr |
| Linoleic acid | 5.8 | 2.9 | 3.7 |
| Linolenic acid ethyl ester | 3.2 | 2.8 | 14.1 |
| Linoleic acid ethyl ester | 6.8 | 3.2 | 6.1 |
| Stearic acid ethyl ester | 8.7 | 0.8 | 1.0 |

* RAP, *relative area percentage* (area del picco rispetto all'area totale dei picchi %). Tr, tracce (< 0.1).

Le diverse parti aeree di *F. carica* L. cv. Dottato hanno mostrato anche un diverso contenuto in composti polari (Tab. 12). Le concentrazioni più abbondanti sono state osservate nelle foglie, con un contenuto di fenoli totali pari a $8,9 \pm 0,2$ mg/g di materiale vegetale secco e di flavonoidi pari a $2,1 \pm 0,16$ mg/g. Nella corteccia sono stati rinvenuti $2,2 \pm 0,09$ mg/g di polifenoli totali (di cui $0,6 \pm 0,03$ mg/g flavonoidi). La parte legnosa è la parte aerea più povera di questi componenti, con solo $0,8 \pm 0,02$ mg/g di polifenoli totali.

Tab. 12. Contenuto fenolico totale e contenuto in flavonoidi delle diverse parti aeree di *F. carica* L. cv. Dottato.

| Campione | Polifenoli (mg/g) | Flavonoidi (mg/g) | Flavonoidi/Polifenoli |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Foglie | $8,9 \pm 0,20$ | $2,1 \pm 0,16$ | 0,2 |
| Corteccia | $2,2 \pm 0,09$ | $0,6 \pm 0,03$ | 0,3 |
| Parte legnosa | $0,8 \pm 0,02$ | $0,5 \pm 0,01$ | 0,6 |

Il contenuto fenolico totale è espresso come equivalenti di acido clorogenico in mg/g di materiale vegetale secco. I flavonoidi totali sono espressi come equivalenti di quercetina in mg/g di materiale vegetale secco. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M. (n=3). Lettere differenti lungo le colonne indicano differenze statisticamente significative con $P < 0.05$ (test di Tukey).

3.3.2.2. Attività antiossidante

Le diverse parti aeree di *F. carica* L. cv. Dottato hanno mostrato attività *radical scavenging* (Fig. 11). I dati ottenuti indicano l'estratto ottenuto dalla corteccia come il più attivo, con un valore di IC_{50} pari a $67,00 \pm 1,09$ μ g/ml (Tab. 13). Anche l'estratto ottenuto dalle foglie ha mostrato attività antiradicalica, con un valore di IC_{50} pari a $92,30 \pm 1,67$ μ g/ml. La parte legnosa, che presentava un esiguo contenuto

in composti fenolici, ha mostrato un'attività decisamente inferiore ($IC_{50} = 365,5 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$).

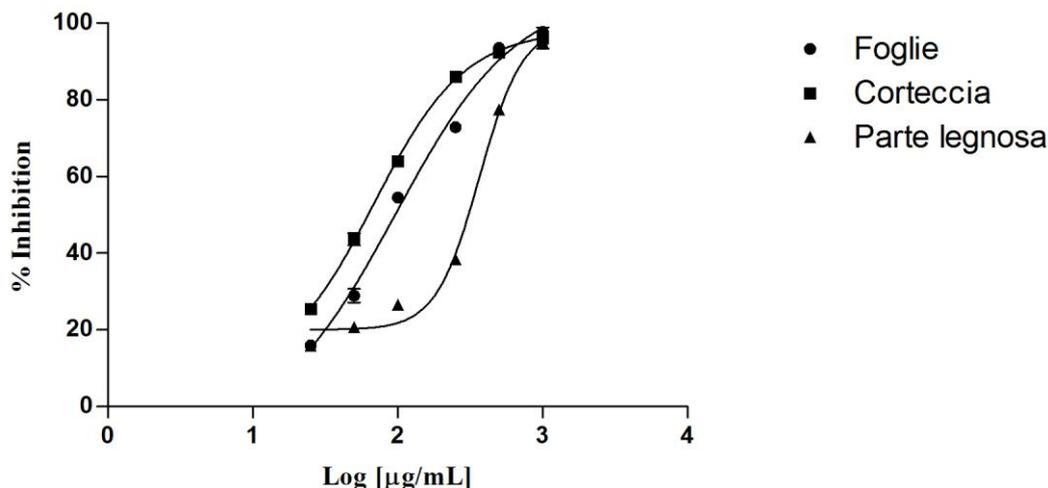


Fig. 11. Attività *radical scavenging* degli estratti ottenuti dalle parti aeree di *F. carica* L. cv Dottato. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. (n=3). L'acido ascorbico ($IC_{50} = 2 \mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo.

Tab. 13. Attività *radical scavenging* degli estratti ottenuti dalle parti aeree di *F. carica* L. cv Dottato.

| Campione | DPPH ($IC_{50} \mu\text{g/ml}$) |
|-----------------|-----------------------------------|
| Foglie | $92,30 \pm 1,67^c$ |
| Corteccia | $67,00 \pm 1,09^b$ |
| Parte legnosa | $365,5 \pm 0,02^d$ |
| Acido ascorbico | $2,00 \pm 0,01^a$ |

I dati sono espresso come media \pm S.E.M. (n=3). Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). L'acido ascorbico è stato impiegato come controllo positivo .

Per quanto concerne invece i risultati del secondo test effettuato, il β -carotene *bleaching* test, tutti i campioni hanno strato una buona attività antiossidante dopo 30 minuti di incubazione (Tab. 14). L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative nell'attività dei tre campioni dopo 30 minuti.

Tab. 14. Attività antiossidante degli estratti delle parti aeree di *F. carica* L. cv. Dottato.

| Estratto | β -carotene bleaching test (IC ₅₀ µg/ml) | |
|--------------------|---|---------------------------|
| | 30 min di incubazione | 60 min di incubazione |
| Foglie | 4,95 ± 0,09 ^c | 17,03 ± 0,56 ^e |
| Corteccia | 4,50 ± 0,05 ^{b,c} | 14,55 ± 0,78 ^d |
| Parte legnosa | 4,57 ± 0,07 ^{b,c} | 6,59 ± 0,06 ^c |
| Gallato di propile | 1,00 ± 0,02 ^a | 1,00 ± 0,02 ^a |

I dati sono espressi come media ± S.E.M. (n=3). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con $P < 0.05$ (test di Tukey). Il gallato di propile è stato impiegato come controllo positivo.

3.3.2.3. Fotocitotossicità

La fotocitotossicità dei campioni ottenuti dalle parti aeree dei fichi sono stati testati per la prima volta su una linea cellulare tumorale umana di melanoma (C32). La Fig. 12 illustra gli effetti degli estratti di foglie, corteccia e parte legnosa sulle cellule esposte a radiazione ultravioletta di tipo A alla lunghezza d'onda di 365 nm e alla dose di 1,08 J/cm². Come controllo, sono stati condotti anche in questo caso esperimenti in assenza di campione e su cellule non sottoposte ad irradiazione.

I migliori risultati sono stati ottenuti per le foglie, con un valore di IC₅₀ di 6,13 ± 0,43 µg/ml (Tab. 15). Poco più bassa è stata l'attività fotocitotossica esibita dalla corteccia, con un valore di IC₅₀ di 7,06 ± 0,21 µg/ml. Questi stessi campioni non hanno mostrato effetti citotossici quando la loro somministrazione non è stata accompagnata da esposizione a radiazione UV. I migliori risultati sono stati ottenuti per i campioni che presentavano un contenuto maggiore di furanocumarine.

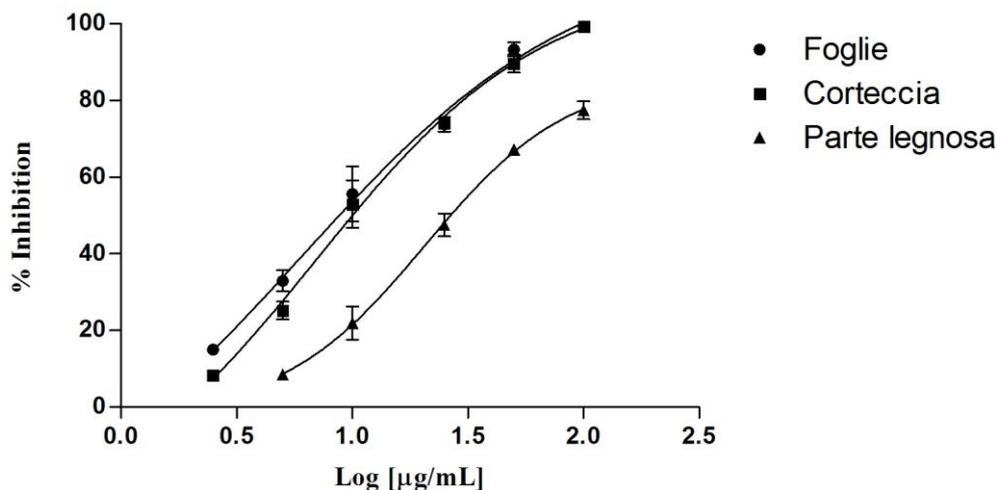


Fig. 12. Effetti citotossici indotti dalle parti aeree di *F. carica* L. cv. Dottato sulla linea cellulare C32 dopo esposizione a radiazioni UVA. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n = 6$). Il bergaptene ($IC_{50} = 0,0416 \pm 0,008 \mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo.

Tab. 15. Effetti degli estratti ottenuti dalle parti aeree di *F. carica* cv. Dottato sulle cellule C32 esposte a radiazioni UVA (365 nm).

| Estratto | MTT test ($IC_{50} \mu\text{g/ml}$) | |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------|
| | Cellule C32 irradiate | Cellule C32 non irradiate |
| Foglie | $6,13 \pm 0,43^b$ | > 100 |
| Corteccia | $7,06 \pm 0,21^c$ | > 100 |
| Parte legnosa | $20,68 \pm 0,07^d$ | > 100 |
| Bergaptene | $0,0416 \pm 0,008^a$ | N.D. |

Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame ($0,00125$ – $100 \mu\text{g/ml}$) e irradiate ad una dose di $1,08 \text{ J/cm}^2$. Come controllo cellule irradiate e non irradiate sono state incubate in presenza di DMSO 0,5% v/v. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. ($n = 6$). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey, $n=4$). N.D.: non determinabile. Il bergaptene è stato impiegato come controllo positivo.

3.3.3. Frutti

Per quanto concerne l'analisi dei frutti di *F. carica* L. cv Dottato si è proceduto alla realizzazione di un frazionamento dell'estratto idroalcolico totale con solventi a polarità differente, in modo da separare composti appartenenti a classi differenti. Sono state quindi ottenute le frazioni in *n*-esano, diclorometano ed acetato di etile.

3.3.3.1. Analisi fitochimica

Il contenuto fenolico totale, determinato mediante il reattivo di Folic-Ciocolteau, è stato pari a 3.9 ± 0.2 mg/g di materiale vegetale (Marrelli et al., 2012)

L'analisi dei componenti apolari mediante GC-MS ha consentito di identificare sei furanocumarine, psoralene, 8-metossipsoralene, angelicina, bergaptene, rutaretina e pimpinellina, ed una piranocumarina, la seselina (Tab. 16). I composti psoralene, seselina e bergaptene sono risultati particolarmente abbondanti nella frazione in *n*-esano (rispettivamente 23,3%, 19,5% e 15,2%), mentre la frazione in diclorometano si è distinta soprattutto per il contenuto di rutaretina (21.1%). La pimpinellina, inoltre, è stata identificata esclusivamente nella frazione in diclorometano (1,9%), mentre l'angelicina (2,5%) solo in quella in *n*-esano.

Tab. 16. Cumarine identificate nei frutti di *F. carica* L. cv. Dottato.

| Composto | Concentrazione relative dei composti (%) | |
|--------------------|--|---------------|
| | <i>n</i> -esano | diclorometano |
| Psoralene | 23,30 | tr |
| 8-Metossipsoralene | 3,65 | tr |
| Angelicina | 2,50 | - |
| Bergaptene | 15,20 | tr |
| Rutaretina | tr | 21,10 |
| Pimpinellina | - | 1,90 |
| Seselina | 19,50 | tr |

I valori rappresentano valori medi ($n=3$); Tr: valori < 0,1% sono indicati come traccia.

In tabella 17 sono invece riportati gli acidi grassi identificati nelle due frazioni apolari. Nella frazione in *n*-esano sono stati identificati 15 composti, mentre in quella in diclorometano ne sono stati identificati 12. Gli acidi grassi presenti in quantitativi superiori nella frazione in esano sono stati gli esteri etilici dell'acido palmitico (5,39%) e dell'acido pentadecanoico (1,72%). Nella frazione in diclorometano il composto più abbondante è stato l'etil estere dell'acido pentadecanoico (18,92%),

seguito da acido palmitico (7,28%), acido pentadecanoico (5,46%) ed etile estere dell'acido margarico (2,34%).

Tab. 17. Acidi grassi identificati nei frutti di *F. carica* L. cv. Dottato.

| Composto | Concentrazione relative dei composti (%) | |
|---|--|---------------|
| | <i>n</i> -esano | diclorometano |
| Hexanoic acid methyl ester | 0.51 | - |
| (<i>E</i>) 2-Heptenoic acid ethyl ester | 0.18 | - |
| Caprylic acid ethyl ester | 0.13 | - |
| Decanoic acid | - | 2.08 |
| Pentadecanoic acid ethyl ester | 1.72 | 18.92 |
| Palmitic acid methyl ester | 0.93 | - |
| Palmitic acid | - | 7.28 |
| Myristic acid | 0.58 | 0.70 |
| Palmitoleic acid ethyl ester | - | - |
| Palmitic acid ethyl ester | 5.39 | 2.12 |
| 14-Hexadecanoic acid methyl ester | 0.13 | - |
| Pentadecanoic acid | - | 5.46 |
| Margaric acid ethyl ester | 0.38 | 2.34 |
| Linoleic acid methyl ester | - | - |
| 7,10,13-Hexadecatrienoic methyl ester | - | 0.66 |
| Stearic acid methyl ester | 0.14 | - |
| Stearic acid | 0.24 | 1.00 |
| Oleic acid ethyl ester | 0.31 | 0.88 |
| Linoleic acid ethyl ester | 0.68 | 0.52 |
| Stearic acid ethyl ester | 0.44 | 0.87 |

I valori rappresentano valori medi ($n=3$); Tr: valori < 0,1% sono indicati come traccia.

Inoltre, come mostrato in Tab.18, nella frazione in esano dell'estratto idroalcolico di *F. carica* L. cv. Dottato sono stati identificati vari steroli e terpeni. Fra questi, il β -sitosterolo (15,14%), la β -amirina acetato (10,58%) ed il composto *urs-12-en-24-oic acid-3-oxo-methyl ester* (8,60%) sono risultati i composti predominanti.

Tab. 18. Steroli e terpeni identificati nella frazione in *n*-esano dei frutti di *F. carica* L. cv. Dottato

| Composto | Concentrazione relative dei composti (%) |
|--|--|
| | <i>n</i> -esano |
| Campesterol | 1.00 |
| Stigmasta-5.23-dien-3 β -ol | 0.58 |
| Stigmasterol | 0.66 |
| β -Sitosterol | 15.14 |
| β -Amyrin | 0.56 |
| 3-Cheto-urs-12-ene | 2.75 |
| Stigmasta-3,5-dien-7-one | 2.31 |
| β -Amyrin acetate | 10.58 |
| Motiol | 1.14 |
| Methyl moronate | 1.25 |
| Olean-13(18)-ene | 0.94 |
| Urs-12-en-24-oic acid-3-oxo-methyl ester | 8.60 |

I valori rappresentano valori medi ($n=3$).

3.3.3.2. Attività antiossidante

Per quanto riguarda l'attività antiradicalica, i migliori risultati sono stati osservati per la frazione in acetato di etile, con un valore di IC_{50} pari a $1,254 \pm 0,111$ mg/ml, e quella in diclorometano, con un valore di $1,590 \pm 0,213$ (Tab. 19, Fig. 13). L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative tra le due frazioni.

Tab. 19. Attività *radical scavenging* degli estratti ottenuti dall'estratto idroalcolico dei frutti di *F. carica* L. cv. Dottato e le varie frazioni.

| Campione | DPPH (IC_{50} mg/ml) |
|------------------|-------------------------|
| Estratto totale | 3.751 ± 0.015^c |
| <i>n</i> -esano | N.D. |
| Diclorometano | 1.590 ± 0.213^b |
| Acetato di etile | 1.254 ± 0.111^b |
| Acido ascorbico | 0.002 ± 0.00001^a |

I dati sono espresso come media \pm S.E.M. ($n=3$). Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). N.D.: non determinabile. L'acido ascorbico è stato impiegato come controllo positivo.

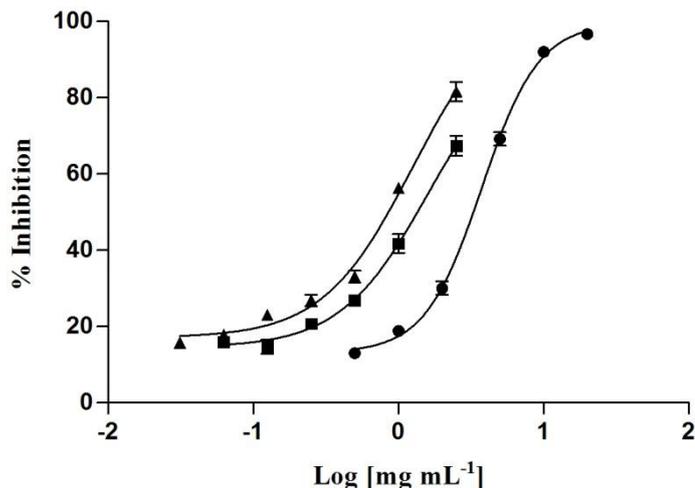


Fig. 13. Attività *radical scavenging* dell'estratto totale dei fichi di *F. carica* L. cv. Dottato e le varie frazioni. ●: estratto idroalcolico; ■: frazione in diclorometano; ▲: frazione in acetato di etile. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. (n=3). L'acido ascorbico ($IC_{50} = 2 \mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo.

Per quanto concerne invece il secondo test effettuato, il β -carotene *bleaching* test, abbiamo riscontrato i migliori risultati per l'estratto idroalcolico totale, con un valore di IC_{50} pari a $4,0 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ dopo 30 min di incubazione (Tab 20).

Tab. 20. Attività antiossidante dell'estratto totale di frutti di *F. carica* L. cv. Dottato e le varie frazioni.

| Estratto | β -carotene <i>bleaching</i> test ($IC_{50} \mu\text{g/ml}$) | |
|--------------------|--|-----------------------|
| | 30 min di incubazione | 60 min di incubazione |
| Estratto totale | $4,00 \pm 0,1^b$ | $10,10 \pm 0,4^c$ |
| n-esano | N.D. | N.D. |
| Diclorometano | N.D. | N.D. |
| Acetato di etile | $64,00 \pm 1,2^d$ | N.D. |
| Gallato di propile | $1,00 \pm 0,02^a$ | $1,00 \pm 0,02^a$ |

I dati sono espressi come media \pm S.E.M. (n=3). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). N.D.: non determinabile. Il gallato di propile è stato impiegato come controllo positivo.

3.3.3.3. Attività fotocitotossica

L'attività fototossica dei frutti di *F. carica* cv. Dottato è stata studiata per la prima volta sulla linea cellulare tumorale umana di melanoma (C32). Sebbene non sia stata osservata attività citotossica per l'estratto totale e la frazione in acetato di etile, la frazione in esano è risultata abbastanza attiva, con un valore di IC₅₀ pari a 30,23 µg/ml (Tab. 21). L'estratto in diclorometano è risultato essere il più attivo, con un valore di IC₅₀ inferiore alla minore concentrazione testata (5 µg/ml). Per valutare l'effettiva influenza della radiazione UV sulle proprietà citotossiche degli estratti sono stati effettuati, in parallelo, degli esperimenti in assenza di luce UV. In tali esperimenti è stata osservata una totale assenza di attività citotossica (Tab. 21).

Tab. 21. Effetti degli estratti ottenuti dai frutti di *F. carica* cv. Dottato sulle cellule C32 esposte a radiazioni UVA (365 nm).

| Estratto | MTT test (IC ₅₀ µg/ml) | |
|------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Cellule A375 irradiate | Cellule A375 non irradiate |
| Estratto totale | > 100 | > 100 |
| <i>n</i> -esano | 30,23 ± 0,11 | > 100 |
| Diclorometano | < 5 | > 100 |
| Acetato di etile | > 100 | > 100 |
| Bergaptene | 0,0416 ± 0,008 ^a | N.D. |

Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame (0,00125–100 µg/ml) e irradiate ad una dose di 1,08 J/cm². Come controllo cellule irradiate e non irradiate sono state incubate in presenza di DMSO 0,5% v/v. I dati sono espressi come media ± S.E.M. (*n* = 6). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con *P* < 0,05 (test di Tukey, *n*=6). N.D.: non determinabile. Il bergaptene è stato impiegato come controllo positivo.

Il prossimo obiettivo della ricerca sperimentale sarà quello di indagare ulteriormente le proprietà fotosensibilizzanti della frazione più attiva, al fine di verificare se essa sia dipendente o meno dalla principale furanocumarina presente, la rutaretina, molecola sulle cui proprietà fotobiologiche non sono presenti studi specifici in letteratura.

3.4 *HYPERICUM PERFORATUM* L.

Il lavoro sperimentale è stato dunque dedicato alla valutazione comparativa del contenuto fitochimico e dell'attività biologica di vari campioni di *Hypericum perforatum* L. subsp. *veronense* raccolti in diverse zone del territorio silano (Marrelli et al., 2013b).

Questo paesaggio naturale è caratterizzato da un vasto altopiano di 1200-1500 m di altezza e dalla presenza di diverse montagne di altezza superiore ai 1600 m. Parte del territorio rientra nella riserva naturale del Parco Nazionale della Sila (73.695 ha), dominato da una vegetazione molto importante in termini di biodiversità e di conservazione ecologica.

3.4.1 Analisi fitochimica

I quattro diversi campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense* hanno mostrato delle differenze significative nel contenuto fenolico totale (Marrelli et al., 2013b). Gli estratti n. 2 e n. 1 hanno mostrato il contenuto maggiore ($41,77 \pm 0,29$ e $35,83 \pm 1,02$ mg/g, rispettivamente). Per il campione n. 3 è stato invece osservato il contenuto più basso ($27,87 \pm 1,34$ mg/g, Tabella 22).

Tab. 22. Contenuto fenolico totale dei campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense*.

| Campione | mg/g pianta fresca |
|----------|-----------------------------------|
| 1 | 35.83 (± 1.02) ^b |
| 2 | 41.77 (± 0.29) ^a |
| 3 | 27.87 (± 1.34) ^d |
| 4 | 31.37 (± 2.00) ^c |

Il contenuto fenolico totale è espresso come equivalenti di acido clorogenico in mg/g di materiale vegetale fresco. I risultati sono espressi come media \pm D.S. (n=3). Lettere differenti lungo le colonne indicano differenze statisticamente significative con $P < 0,05$ (test di Tukey).

La presenza di diversi polifenoli e di ipericina ed iperforina negli estratti di *H. perforatum* L. è stata verificata mediante HPTLC. La cromatografia su strato sottile ad alta prestazione è una tecnica ben consolidata, impiegata per l'identificazione di componenti vegetali ed impurezze e per la determinazione quantitativa di sostanze organiche. Questa tecnica cromatografica è stata scelta nel presente studio come

metodo preciso, riproducibile e pratico per studiare le complesse miscele di sostanze presenti nei prodotti naturali (Nicoletti, 2011; Piccin et al., 2012).

Le analisi HPTLC sono state eseguite per confermare, il più possibile, la produzione totale di metaboliti secondari nelle piante selezionate in modo da ottenere un *fingerprint* degli estratti in esame. In questo modo, ogni estratto è caratterizzato dalla sua traccia cromatografica, che può essere diversamente evidenziata nella piastra dalla lampada UV con e senza derivatizzazione.

È stata dunque verificata la presenza di ipericina ed iperforina, molecole caratteristiche della specie *H. perforatum*, e di diversi composti fenolici: quercetina, quercitrina, rutina, biapigenina ed acido clorogenico.

Sono state ottenute diverse immagini delle formulazioni in esame. La Fig. 14 riporta una lastra in cui è evidente il *fingerprint* dei quattro campioni analizzati e degli standard dei flavonoidi presi in considerazione. Le ultime tracce sono invece riferite al composto fenolico acido clorogenico, inserito perché costituente ampiamente diffuso nel regno vegetale e connesso a molti *pathway* biogenetici dei costituenti aromatici.

Le varie tracce presentano delle similitudini ma le intensità delle bande sono molto diverse, inclusa quella dell'ipericina, che sembra essere contenuta in minore quantità nell'estratto n. 1. L'analisi rivela inoltre la presenza di una rilevante quantità di rutina, evidenziabile esclusivamente nei campioni n. 3 e n. 4. La traccia n. 1 presenta inoltre una spot fluorescente non ancora identificato. I risultati ottenuti sono mostrati in Fig. 15, che riporta il profilo cromatografico dei campioni analizzati e dei loro componenti identificati per confronto con i corrispondenti standard. La Figura 16 riporta invece l'analisi del contenuto di iperforina nei quattro diversi campioni di *H. perforatum* L. La traccia n. 1 risulta molto diversa dalle altre per la presenza di molte bande addizionali.

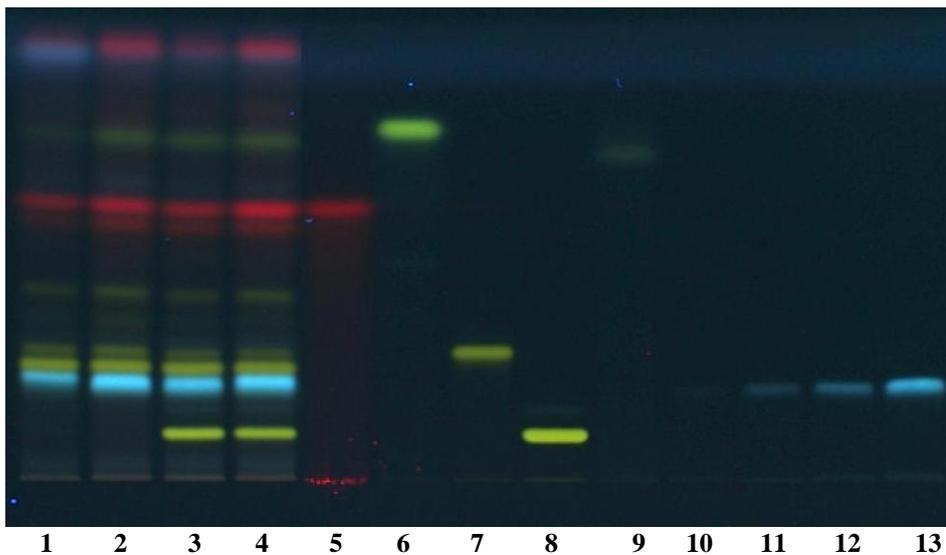
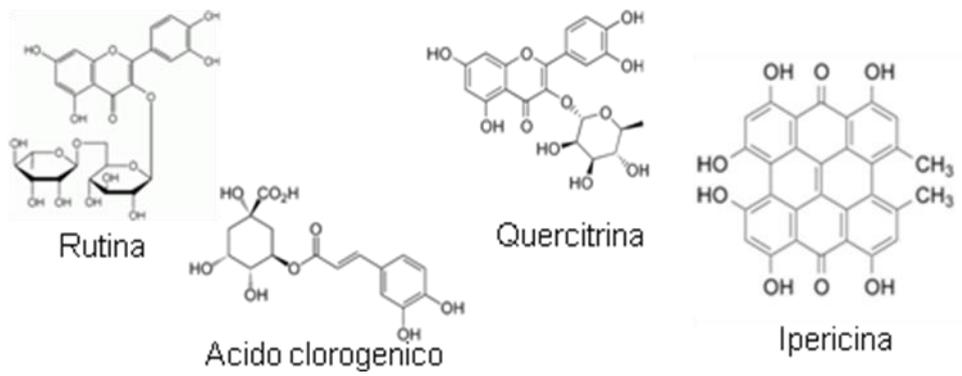


Fig. 14. Analisi HPTLC dei quattro campioni di *H. perforatum* subsp. *veronense*. Fase mobile: AcOEt/CH₂Cl₂/CH₃COOH/HCOOH/H₂O (100:25:10:10:11; v/v/v/v/v.). Derivatizzazione: NPR. Visualizzazione: 366 nm. Tracce: 1-4, campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense*; 5, ipericina; 6, quercetina; 7, quercitrina; 8, rutina; 9, biapigenina; 10-13, acido clorogenico a differenti concentrazioni.

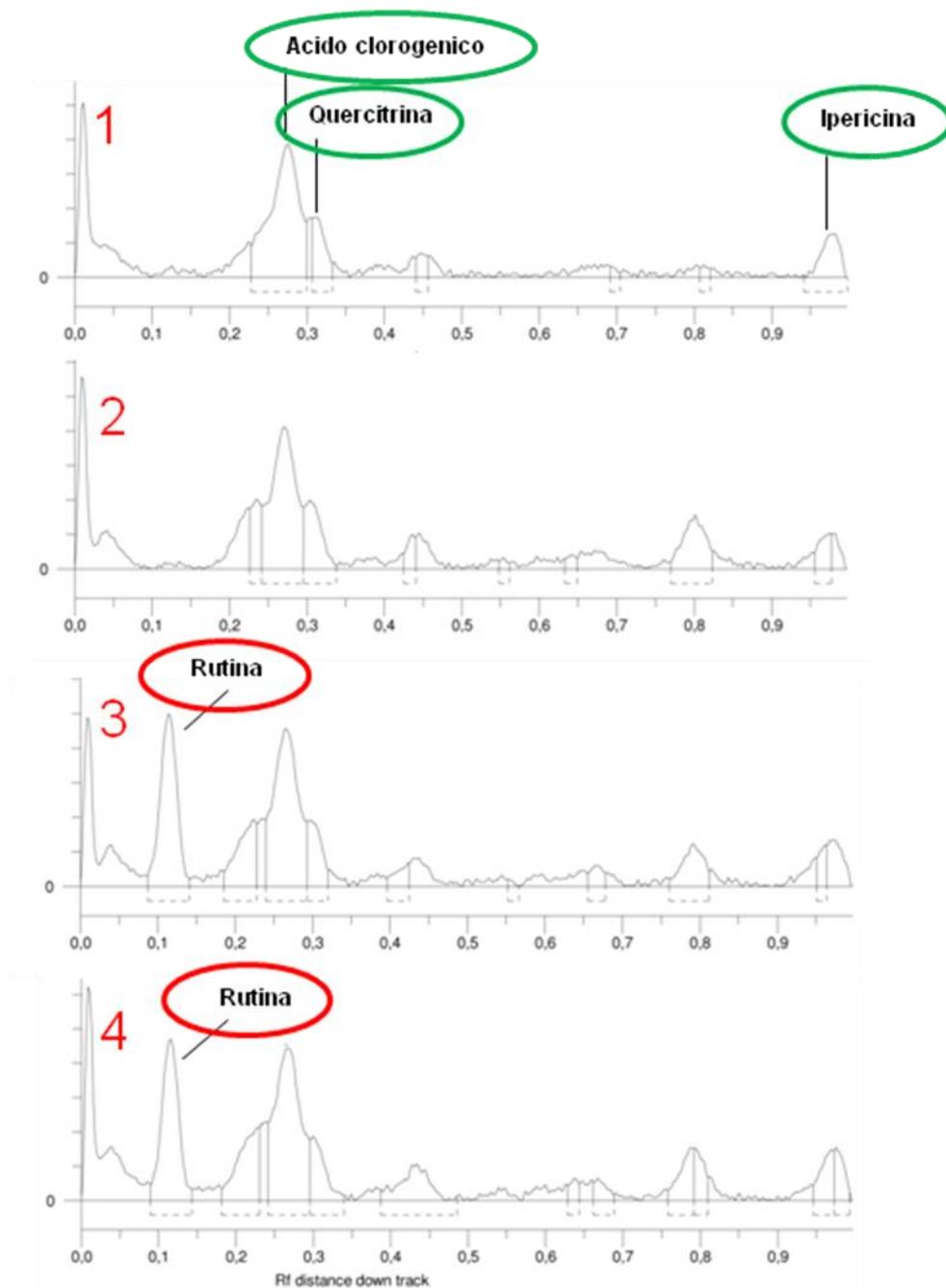


Fig. 15. Profilo cromatografico dei campioni analizzati e degli standard impiegati. Fase mobile: AcOEt/CH₂Cl₂/CH₃COOH/HCOOH/H₂O (100:25:10:10:11).

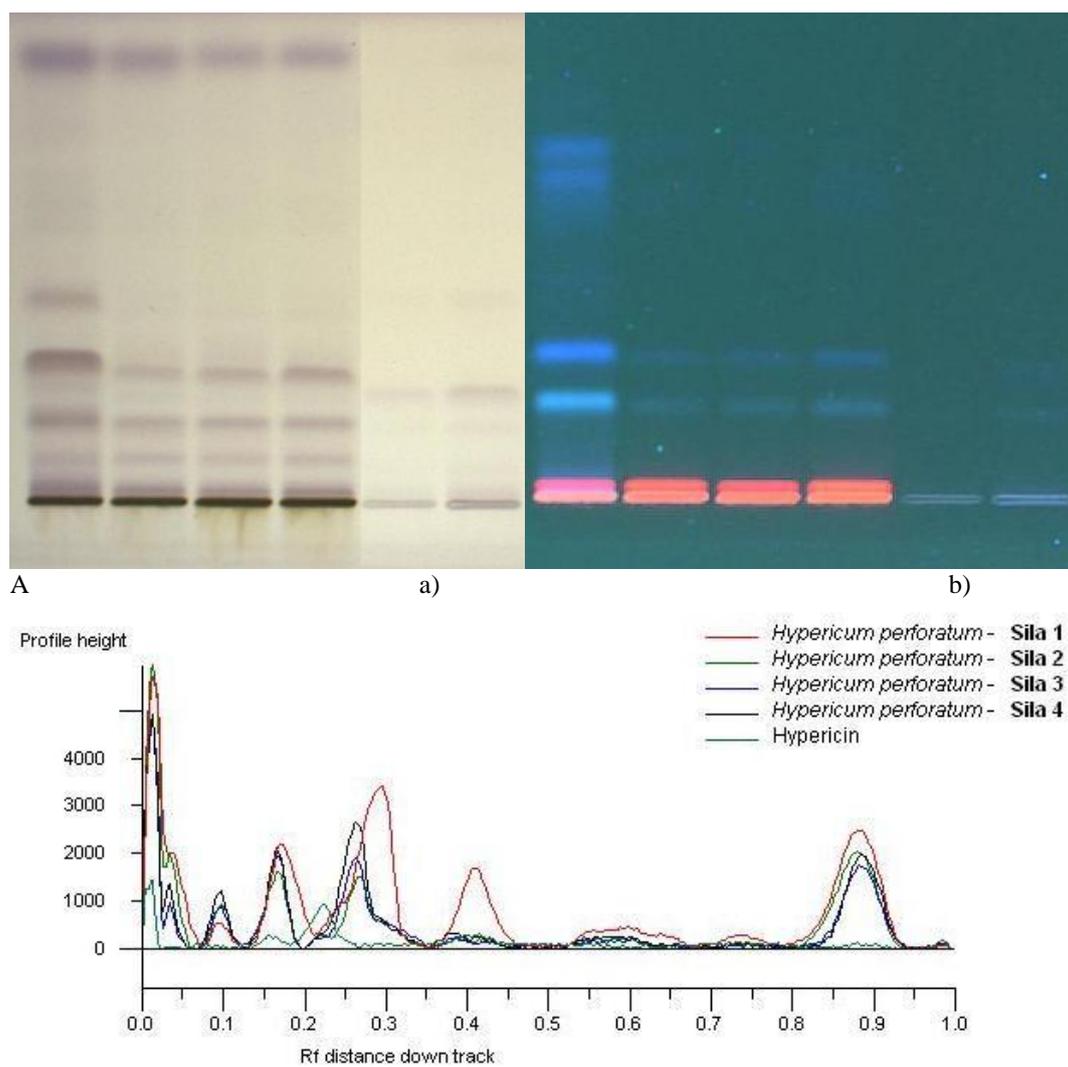
**B**

Fig. 16. A. Analisi HPTLC del contenuto di iperforina. Fase mobile: toluene/ CH_2Cl_2 (4:2; v/v). Derivatizzazione: reattivo di Godin. Visualizzazione: a) luce bianca; b) 366 nm. Tracce: 1-4, campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense*; 5, iperforina. B. Analisi densitometrica della lastra A.

3.4.2 Attività antiossidante

Vari studi presenti in letteratura riportano l'attività antiossidante della specie *H. perforatum* L. (Radulović et al., 2007; Sagratini et al., 2008), legata ad un'elevata presenza di composti fenolici. I risultati riportati, tuttavia, differiscono notevolmente in funzione della zona di raccolta della pianta.

Nel presente lavoro di tesi l'attività antiossidante dei quattro campioni è stata valutata mediante l'impiego di due metodi differenti: il *DPPH radical scavenging assay* ed il *β-carotene bleaching test*. Il DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) è un radicale impiegato spesso nella valutazione dell'attività antiossidante degli estratti vegetali. Questa molecola possiede un'assorbimento caratteristico a 517 nm (colore viola), che diminuisce significativamente quando esposta a sostanze *radical-scavenger* che trasformano il radicale DPPH nella sua forma ridotta DPPH-H.

L'estratto n. 1 ha mostrato la migliore attività antiradicalica, con un valore IC_{50} di $9,18 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 23, Fig. 17). L'analisi statistica (test di Tukey) ha evidenziato una differenza significativa tra l'attività biologica di questo campione e quella degli estratti n. 4 e n. 2 ($9,30 \pm 0,03$ e $9,97 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$, rispettivamente).

Il campione n. 3, che contiene la minore quantità di composti fenolici, ha mostrato l'attività più bassa ($IC_{50} = 14,69 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$), in conformità a vari studi che hanno riportato una stretta correlazione tra il contenuto fenolico e l'attività antiossidante. La correlazione è mostrata in Fig. 18 (Marrelli et al., 2013b).

Tab. 23. Attività *radical scavenging* dei campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense*.

| Campione | IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------------|--------------------------------|
| 1 | $9,18 (\pm 0,03)^b$ |
| 2 | $9,97 (\pm 0,03)^d$ |
| 3 | $14,69 (\pm 0,02)^e$ |
| 4 | $9,30 (\pm 0,03)^c$ |
| Acido ascorbico | $2,00 (\pm 0,01)^a$ |

I risultati sono espressi come media \pm S.E.M. (n= 3). Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). L'acido ascorbico è stato impiegato come controllo positivo.

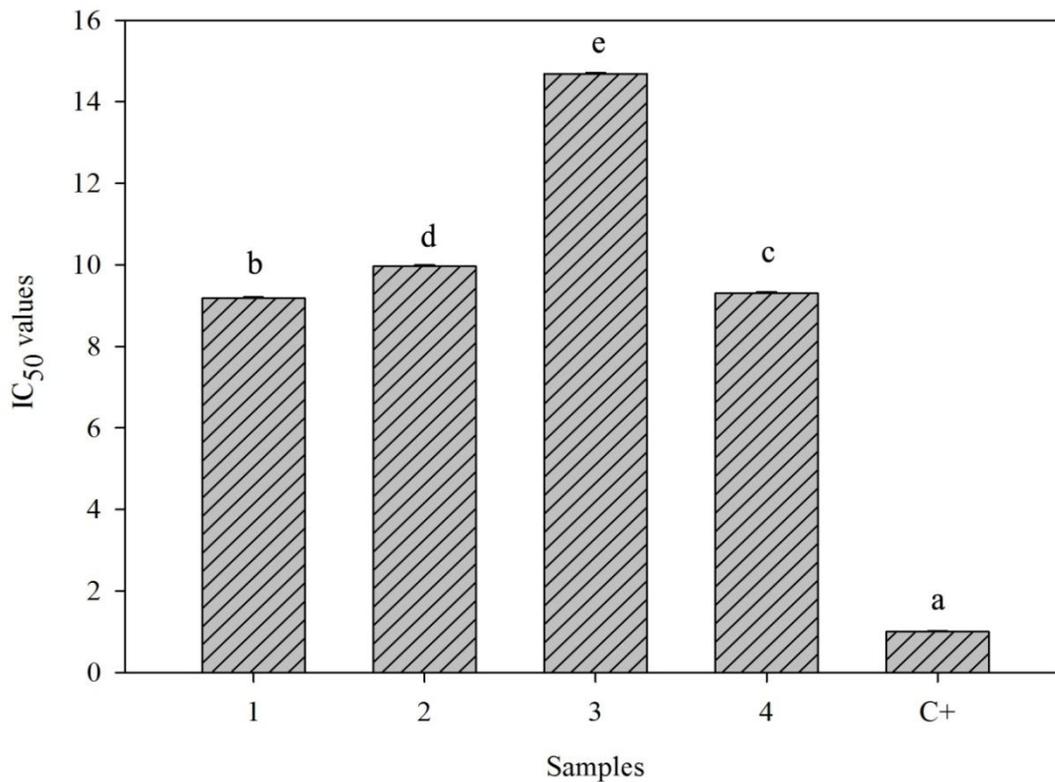


Fig. 17. Attività *radical scavenging* degli estratti di *H. perforatum* subsp. *veronense*. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M. (n= 3). Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative con $P < 0.05$ (test di Tukey). L'acido ascorbico (C+, $IC_{50} = 2.00 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$) è stato impiegato come controllo positivo .

Una tendenza simile è stata osservata nel *β -carotene bleaching test*. Il campione n. 1, infatti, ha mostrato anche in questo caso la migliore attività antiossidante dopo 30 minuti di incubazione, con un valore IC_{50} di $10,04 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 24, Fig. 19). Anche in questo esperimento il campione n. 3 ha mostrato l'attività più bassa ($IC_{50} = 106,50 \pm 0,63 \mu\text{g/ml}$ dopo 30 min di incubazione). La correlazione è mostrata in Fig. 18.

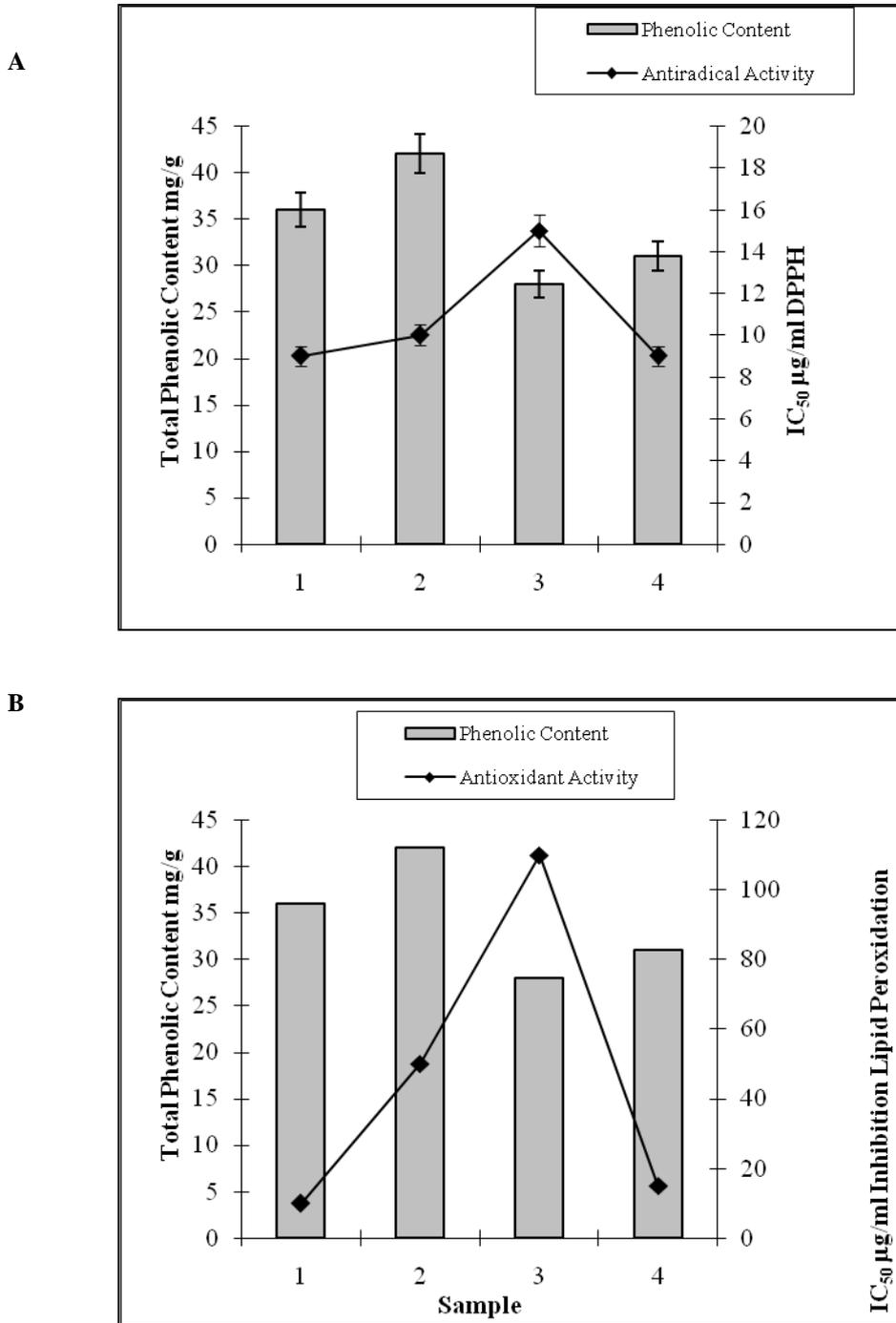


Fig. 18. Correlazione tra il contenuto fenolico e l'attività antiradicalica (A) ed antiossidante (B).

Tab. 24. Attività antiossidante dei campioni di *H. perforatum* subsp. *veronense*.

| Sample | IC ₅₀ (µg/ml) | |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 30 min | 60 min |
| 1 | 10,04 (±0,03) ^b | 18,22 (±0,08) ^d |
| 2 | 49,37 (±0,15) ^f | 170,40 (±0,53) ⁱ |
| 3 | 106,50 (±0,63) ^g | 109,50 (±0,23) ^h |
| 4 | 13,57 (±0,02) ^c | 25,29 (±0,01) ^e |
| Propyl gallate | 1,00 (±0,02) ^a | 1,00 (±0,02) ^a |

I risultati sono espressi come media ± S.E.M. (n= 3). Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). Il gallato di propile è stato impiegato come controllo positivo.

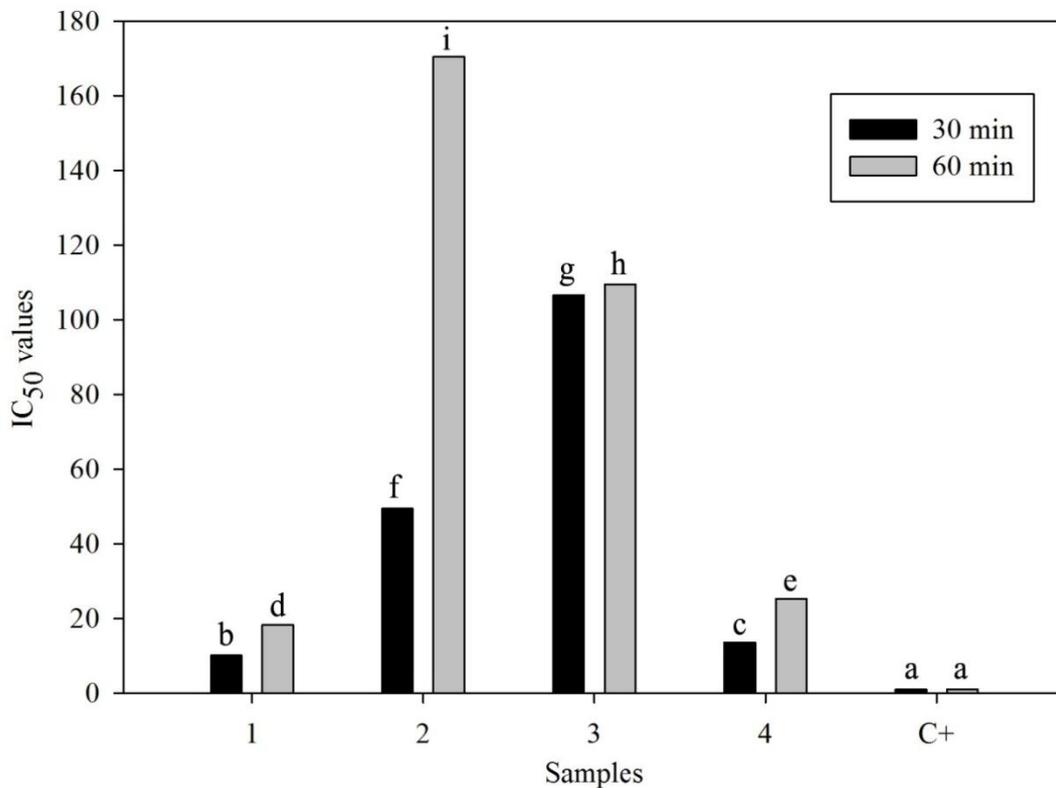


Fig. 19. Inibizione della perossidazione lipidica indotta dai campioni di *H. perforatum* dopo 30 e 60 minuti di incubazione. I risultati sono espressi come media ± S.E.M. (n= 3). Lettere differenti indicano differenze significative con $P < 0,05$ (test di Tukey). Il gallato di propile (C+, IC₅₀ = 1,00 µg/ml ± 0,02 µg/ml) è stato impiegato come controllo positivo.

3.4.3 Attività fotocitotossica

Mentre molti studi sono stati dedicati alla valutazione delle proprietà fotobiologiche dell'ipericina (Agostinis et al., 2002; Theodossiou et al., 2009), le proprietà fototossiche dell'intero estratto di iperico non sono state ancora indagate in modo

esaustivo. Kapsokalyvas e collaboratori (2005) hanno testato l'applicazione dell'estratto metanolico di iperico in caso di trapianto di midollo osseo autologo, verificandone gli effetti sia sulle cellule leucemiche HL-60 sia sulle cellule progenitrici sane. Gli esperimenti effettuati hanno evidenziato una buona attività ad una concentrazione di 50 µg/ml, con una irradiazione a 532 nm e a una dose di 74,87 J/cm². Sfortunatamente, i risultati ottenuti hanno dimostrato che anche le cellule progenitrici normali erano sensibili all'effetto fotocitotossico dell'estratto di iperico, dimostrando, in questo caso, un'azione non selettiva sulle cellule leucemiche. L'efficacia della frazione polare dell'estratto è stata testata *in vitro* anche contro il carcinoma della vescica, utilizzando cellule umane di cancro della vescica T24 e RT4. In campione ha mostrato buona fotocitotossicità su entrambe le linee cellulari ad una concentrazione di 60 µg/ml dopo irradiazione alla lunghezza d'onda di 630 nm ad una dose di 4-8 J/cm² (Stavropoulos et al., 2006).

Nel presente lavoro di tesi, le proprietà fotocitotossiche di quattro estratti di *H. perforatum* sono stati testati per la prima volta contro cellule di melanoma umano A375. Tutti i campioni hanno mostrato attività (Marrelli et al., 2013b). Il campione più attivo è risultato essere in n. 1, con un valore di IC₅₀ pari a 24,61 ± 0,02 µg/ml (Tab. 25, Fig. 20).

Tab. 25. Effetti fotocitotossici indotti dagli estratti di *H. perforatum* su cellule A375 esposte a radiazioni UVA.

| Campione | IC ₅₀ (µg/ml) | |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Cellule irradiate | Cellule non irradiate |
| 1 | 24,61 (±0.02) ^b | 30,58 (±0,07) ^d |
| 2 | 25,62 (±0.209) ^c | 39,94 (±0,03) ^g |
| 3 | 33,05 (±0.03) ^f | > 100 |
| 4 | 25,38 (±0.07) ^c | 31,20 (±0,05) ^e |
| Bergaptene* | 0,0416 (±2.00) ^a | N.D. |

Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame (2,5–100 µg/mL) e irradiate ad una dose di 1,08 J/cm². Come controllo cellule irradiate e non irradiate sono state incubate in presenza di EtOH 0,5% v/v. I dati sono espressi come media ± S.E.M. (*n* = 6). Lettere differenti nelle due colonne indicano differenze significative con *P* < 0,05 (test di Tukey). N.D.: non determinabile. Il bergaptene è stato impiegato come controllo positivo.

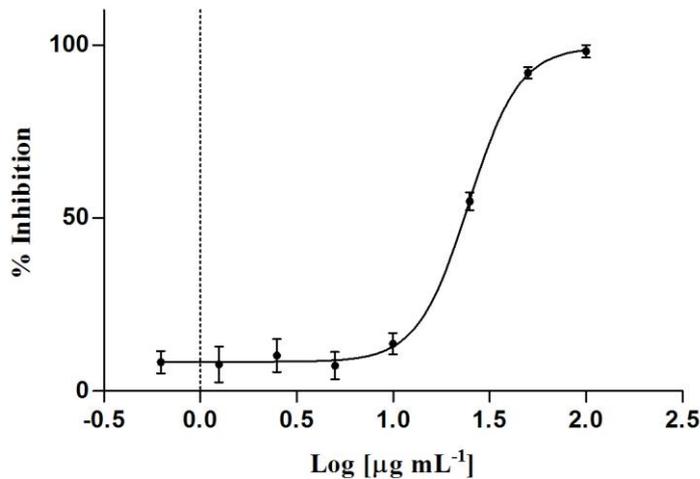


Fig. 20. Effetti dell'estratto n. 1 di *H. perforatum* su cellule A375 esposte a radiazione UV. Le cellule sono state pretrattate (30 min) con i campioni in esame (2,5–100 µg/mL) e irradiate ad una dose di 1,08 J/cm².

Effetti molto interessanti sono stati osservati per l'estratto n. 3 che, sebbene abbia mostrato un'attività fotobiologica inferiore a quella degli altri estratti ($IC_{50} = 33,05$ µg/ml), non ha causato effetti citotossici significativi in assenza di radiazione luminosa ($IC_{50} > 100$ µg/ml). Le analisi statistiche condotte non hanno evidenziato invece differenze significative nell'attività degli altri due campioni, n. 2 e 4, con valori di IC_{50} di 25,62 e 25,38 µg/ml.

In Fig. 21 sono illustrati i cambiamenti morfologici indotti dagli estratti. L'incubazione delle colture cellulari con concentrazioni di 100 µg/ml di ciascun estratto ha inibito significativamente la sopravvivenza cellulare.

I migliori effetti biologici sono state presentati dal campione n. 1, raccolto in località Zumpano, nel territorio della Presila, ad una altitudine di 429 m. s.l.m.. Questi risultati sono conformi ai dati fitochimici, come il contenuto fenolico totale e il particolare profilo metabolomico (Fig. 22).

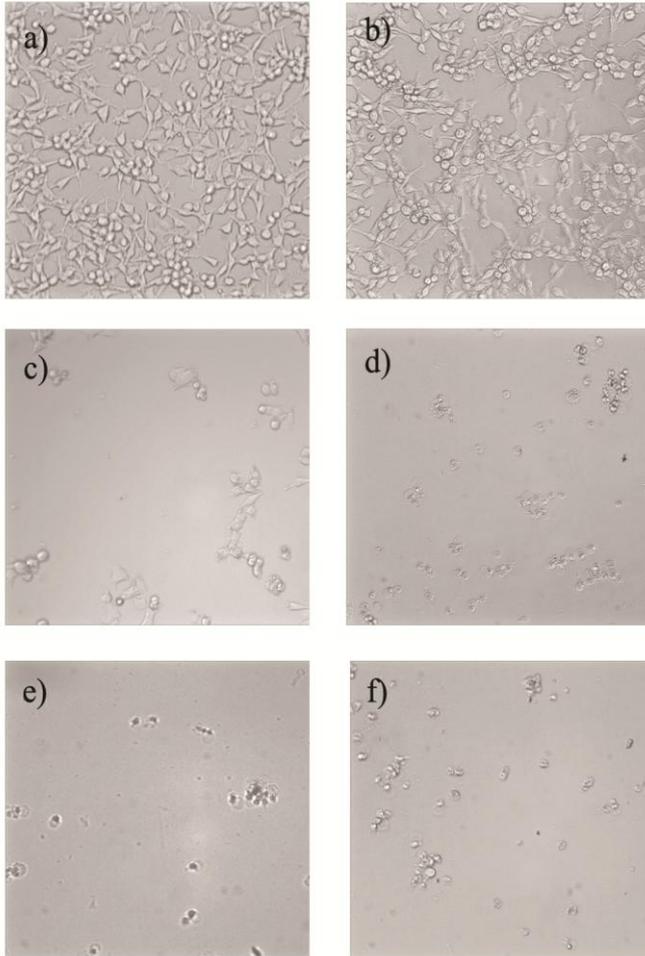


Fig. 21. Cambiamenti morfologici delle cellule A375 dopo 48 ore di incubazione: a) controllo, cellule non irradiate in DMEM 0,5% v/v EtOH 70%, senza campione; b):cellule irradiate (365 nm, dose di 1,08 J/cm²); c): *H. perforatum* n.1, 100 µg/ml, con irradiazione; d): *H. perforatum* n.2, 100 µg/ml con irradiazione; e) *H. perforatum* n.3, 100 µg/ml con irradiazione; f) *H. perforatum* n.4, 100 µg/ml con irradiazione.

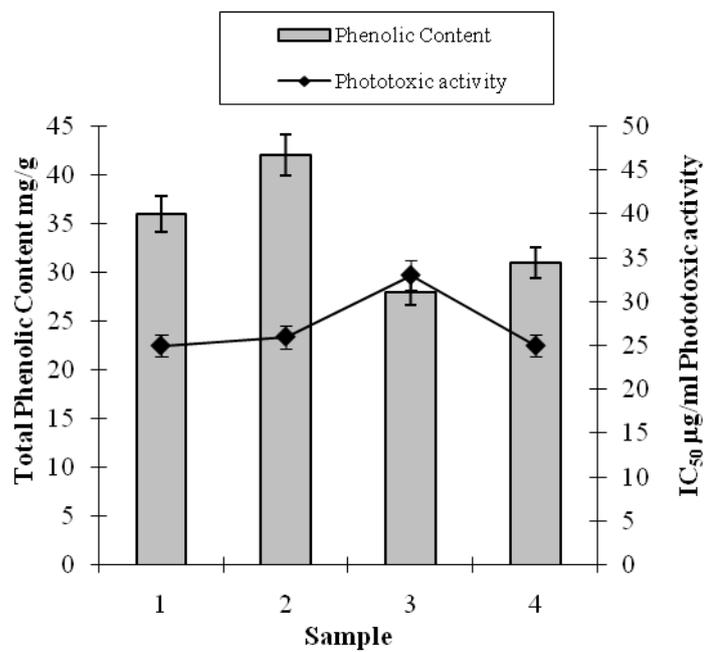


Fig. 22. Correlazione tra il contenuto fenolico e l'attività fotocitotossica dei quattro campioni di *H. perforatum* analizzati.

CONCLUSIONI

L'attività di ricerca ha avuto l'obiettivo di individuare nuovi fitocomplessi e nuovi principi attivi potenzialmente applicabili in PUVA terapia ed in terapia fotodinamica, due nuove ed importanti opzioni terapeutiche impiegate nella cura del cancro. La fotochemioterapia, basata sull'uso di agenti chemioterapici fotoattivabili, può essere considerata infatti un approccio molto promettente nel trattamento del cancro per la sua bassa tossicità sistemica e la sua azione selettiva sulle cellule tumorali rispetto ai trattamenti convenzionali in campo oncologico.

Obiettivo del lavoro svolto è stato quello di individuare piante di particolare interesse per il loro elevato contenuto in principi attivi con proprietà fotosensibilizzanti. Le analisi condotte hanno consentito di verificare il contenuto in principi attivi fototossici negli estratti esaminati e di verificare *in vitro* le loro potenziali applicazioni in fotochemioterapia per il trattamento del melanoma. La fototossicità degli estratti è stata infatti testata *in vitro* su diverse linee cellulari tumorali umane di melanoma (A375 e C32). È stata valutata, inoltre, anche l'attività antiossidante dei campioni in esame, dato il ruolo noto che radicali liberi ricoprono in alcuni step della carcinogenesi. Pertanto, un fitocomplesso dotato di attività antiossidante potrebbe essere utilmente impiegato per le sue proprietà fotosensibilizzanti.

In modo particolare, le analisi hanno consentito di identificare diverse cumarine nella specie *C. pungens* Jan, sulla quale non erano presenti studi precedenti in letteratura.

Il genere *Cachrys* rappresenta una notevole risorsa di furanocumarine, uno dei principali gruppi di principi attivi di origine naturale ad azione fotosensibilizzante. La frazione cloroformica è stata analizzata mediante cromatografia su colonna, che ha consentito di isolare un'interessante frazione particolarmente ricca in cumarine, analizzata mediante gas-cromatografia e costituita principalmente da xantotossina ed isopimpinellina ($2,64 \pm 0,04$ and $1,27 \pm 0,01$ mg/g, rispettivamente) e, in minor misura, anche da bergaptene, 3-metilsuberossina, isoossipeucedanina e psoralene.

Lo studio effettuato ha confermato che i composti naturali di origine vegetale sono un'importante risorsa per lo sviluppo di farmaci antitumorali, e ha dimostrato le

notevoli proprietà fotocitotossiche della frazione in cloroformio dell'estratto metanolico di *C. pungens* e della frazione cumarinica da essa isolata.

L'attività fototossica degli estratti di *C. pungens* è stata studiata sulla linea cellulare tumorale umana A375 (melanoma) in associazione ad esposizione alla luce ultravioletta di tipo A (alla lunghezza d'onda di 365 nm) ad una dose di 1.08 J/cm². Le due frazioni, quella cloroformica e quella cumarinica, hanno mostrato un'eccellente attività antiproliferativa, con valori di IC₅₀, rispettivamente, di 0,286 ± 0,067 e 0,209 ± 0,033 µg/ml. Le analisi statistiche non hanno evidenziato differenze significative tra gli effetti fotocitotossici dei due estratti. Questo risultato conferma che le proprietà fototossiche della frazione cloroformica possono essere attribuite al contenuto in furanocumarine evidenziato dall'analisi fitochimica.

In una seconda fase, l'attività di ricerca è stata dedicata alla valutazione delle proprietà fotobiologiche della specie *F. carica* L., ed in particolare della cultivar Dottato, su cui non abbiamo riscontrato studi simili in letteratura. È stato verificato il contenuto in composti fotoattivi (noto in letteratura esclusivamente per il lattice e le foglie di fico) di tutte le componenti della parte epigea della pianta: frutti, corteccia, parte legnosa, foglie e lattice.

In accordo agli studi precedenti, anche nel lattice e nelle foglie della cultivar Dottato di *F. carica* sono state identificate le furanocumarine psoralene e bergaptene, oltre a diversi altri composti. I campioni sono stati testati su cellule di melanoma umano e i risultati dei test biologici hanno, anche in questo caso, evidenziato ottime proprietà fotocitotossiche. Il lattice fogliare ha mostrato, in particolare, ottimi effetti antiproliferativi, con un valore di IC₅₀ pari a 1,5 ± 0,01 µg/ml. Per le foglie è stato ottenuto invece un valore di IC₅₀ di 6,13 ± 0,43 µg/ml. Nel prosieguo del lavoro sono state analizzate le altre parti aeree della pianta, corteccia e parte legnosa. Le foglie si sono confermate le più attive, con un valore di IC₅₀ di 6,13 ± 0,43, seguite dalla corteccia (IC₅₀ = 7,06 ± 0,21 µg/ml). Questi stessi campioni non hanno mostrato effetti citotossici quando la loro somministrazione non era accompagnata da esposizione a radiazione UV. Dai dati si evince che i migliori effetti sono stati ottenuti per i campioni che presentavano un contenuto maggiore di furanocumarine.

Per quanto concerne i frutti, si è proceduto, oltre all'analisi dell'estratto idroalcolico totale, ad un frazionamento con solventi a polarità differente, al fine di poter isolare frazioni particolarmente attive. I composti apolari presenti nelle frazioni in *n*-esano e

diclorometano sono stati identificati mediante GC-MS. Sono state isolate sei furanocumarine, psoralene, 8-metossipsoralene, angelicina, bergaptene, rutaretina e pimpinellina, ed una piranocumarina, la seselina. La rutaretina (21,1%) è stata la principale cumarina identificata nella frazione in diclorometano. L'analisi delle proprietà fototossiche dei frutti ha consentito di evidenziare una certa attività per l'estratto in esano, con un valore di IC_{50} pari a 30,23 $\mu\text{g/ml}$. La migliore attività è stata osservata per l'estratto in diclorometano, con un valore di IC_{50} inferiore alla minore concentrazione testata, minore quindi di 5 $\mu\text{g/ml}$. Il nostro prossimo obiettivo sarà quello di indagare ulteriormente le proprietà fotosensibilizzanti di questa frazione, e di verificare se essa sia dipendente o meno dalla principale furanocumarina presente, la rutaretina, molecola sulle cui proprietà fotobiologiche non sono presenti studi in letteratura.

Infine, l'attività di ricerca è stata rivolta all'analisi della specie *H. perforatum* L., ad in particolare della sottospecie *veronense*.

Sono state dunque indagate le variazioni nel contenuto fitochimico e nell'attività biologica di quattro campioni di *Hypericum perforatum* L. subsp. *veronense*, raccolti in diverse zone dell'Altopiano della Sila in Calabria. L'iperico è una specie che si caratterizza per la presenza di composti ad elevata attività fotosensibilizzante, dette ipericine. Sebbene molti studi siano stati condotti sulla fototossicità dell'iperforina, le proprietà fototossiche dell'intero estratto di iperico non sono state finora ancora indagate in modo esaustivo. Nel presente lavoro di tesi, le proprietà fotocitotossiche di quattro estratti di *H. perforatum* sono state testate per la prima volta contro cellule di melanoma umano A375. Obiettivo dell'attività di ricerca è stato, in questo caso, anche quello di valutare quanto le condizioni ambientali potessero influire sulla composizione chimica degli estratti e, di conseguenza, anche sulla loro attività biologica.

I primi due campioni (n. 1 e 2) sono stati raccolti nella fascia pre-silana, ad altitudini di 370 m e 840 m s.l.m., mentre i campioni n. 3 e n. 4 ad altitudini maggiori (Righitano nel comune di Pedace a 1320 m s.l.m., Righio nel comune di Spezzano piccolo ad un'altitudine di 1650 m circa).

I quattro diversi campioni di *H. perforatum* L. subsp. *veronense* hanno mostrato delle differenze significative per quanto concerne il loro contenuto fenolico totale. Gli estratti n. 2 e n. 1 hanno mostrato il contenuto maggiore ($41,77 \pm 0,29$ e $35,83 \pm 1,02$

mg/g, rispettivamente), mentre per il campione n. 3 è stato osservato il contenuto più basso.

Mediante HPTLC è stato possibile verificare la presenza nei vari estratti di ipericina ed iperforina, molecole caratteristiche della specie *H. perforatum*, e di diversi composti fenolici. La rutina, dato molto interessante, è stata riscontrata solo nei campioni n.3 e n.4, raccolti ad altitudini maggiori.

L'estratto n. 1 ha mostrato la migliore attività antiradicalica, con un valore IC_{50} di $9,18 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$. In conformità a vari studi che hanno riportato una stretta relazione tra il contenuto fenolico e l'attività antiossidante, l'attività minore è stata osservata per il campione n. 3, che contiene la minore quantità di composti fenolici.

Tutti gli estratti hanno mostrato attività fotobiologica. Il campione più attivo è risultato essere in n. 1, raccolto in località Zumpano, con un valore di IC_{50} pari a $24,61 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$.

I risultati ottenuti hanno evidenziato delle differenze sia nel contenuto fitochimico sia, conseguentemente, sull'attività biologica dei quattro campioni di *Hypericum perforatum* L. subsp. *veronense* analizzati.

Il diverso contenuto fitochimico dimostra che numerosi fattori ambientali quali luce, temperatura, umidità, natura del terreno, altitudine e latitudine, sono in grado di provocare, singolarmente o in compartecipazione, delle variazioni sensibili nel contenuto in principi attivi della pianta. Campioni appartenenti a specie diverse o alla stessa specie possono manifestare proprietà biologiche diverse in relazione al differente contenuto in principi attivi.

Una volta appurata l'attività fotobiologica degli estratti analizzati, l'interesse è stato rivolto alla realizzazione di una diversa tecnica estrattiva, allo scopo di identificare la procedura che consentisse di ottenere estratti particolarmente attivi. In questa fase, l'estrazione dei principi attivi contenuti nella specie *C. pungens* Jan è stata effettuata con una seconda metodica, grazie all'ausilio di un estrattore che impiega anidride carbonica supercritica. La procedura è stata realizzata presso il Laboratorio di Reologia ed Ingegneria alimentare del Dipartimento di Ingegneria Informatica, Modellistica, Elettronica e Sistemistica (DIMES) dell'Università della Calabria.

Il contenuto fitochimico dell'estratto ottenuto è stata analizzato anche in questo caso mediante gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa. Le analisi hanno consentito di identificare tre furanocumarine: xantotossina, bergaptene ed

isopimpinellina. Dato interessante, l'estratto ottenuto ha presentato alte quantità di fitosteroli, stigmasterolo (4,8%), γ -Sitosterol (9,8%) e 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (3 β) (1,8%), rispetto a quelle ottenute per macerazione.

Nel prosieguo dell'attività di ricerca, il prossimo obiettivo sarà quello di applicare questa tecnica estrattiva alle altre piante oggetto del presente studio e valutarne l'attività biologica.

Il numero di studi relativi alla valutazione dell'attività fototossica di estratti vegetali è ancora esiguo. Le risorse naturali sono ancora largamente inesplorate e da questo consegue che, potenzialmente, molti composti ad azione fotosensibilizzante utili in campo oncologico potrebbero essere ancora individuati. Lo studio condotto conferma come il mondo vegetale costituisca una risorsa inesauribile di farmaci e offre una nuova prospettiva per lo sviluppo di nuove formulazioni potenzialmente utili il fotochemioterapia per il trattamento del melanoma e di altre malattie.

BIBLIOGRAFIA

- Abad, M.J.; de las Heras, B.; Silvan, A.M.; Pascual, R.; Bermejo, P.; Rodriguez, B.; Villar, A.M., Effects of furocoumarins from *Cachrys trifida* on some macrophage functions. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53(8), 1163-1168.
- Abu-Mustafa, E.; El-Tawil, B. A. H.; Fayed, M.B.E., Constituents of local plants-IV. *Ficus carica* L., *F. sycomorus* L. and *F. salicifolia* L. leaves. *Phytochemistry*, **1963**, 3(6), 701-703.
- Agostinis, P; Vantieghem, A; Merlevede, W; de Witte, P.A.M., Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2002**, 34(3), 221-41.
- Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K.A.; Foster, T.H.; Girotti, A.W.; Gollnick, S.O.; Hahn, S.M.; Hamblin, M.R.; Juzeniene, A.; Kessel, D., Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: Cancer J. Clin.*, **2011**, 61(4), 250-81.
- Akramiene, D.; Grazeliene, G.; Didziapetriene, J.; Kevelaitis, E., Treatment of Lewis lung carcinoma by photodynamic therapy and glucan from barley. *Medicina (Kaunas)*, **2009**, 45(6), 480.
- Allison, R.R.; Sibata, C.H., Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2010**, 7(2), 61-75.
- Anderson, L. A.; Phillipson J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) : a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm.& Pharmacol.*, **2001**, 53(5): 583-600.
- Araújo, N.C.; Fontana, C.R.; Gerbi, M.E.M.; Bagnato, V.S., Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed. Laser Surg.*, **2012**, 30(2), 96-101.
- Athnasios, A.K., El Kholy, I.E., Soliman, G., Shaban, M.A.M. Constituents of the leaves of *Ficus carica* L. Part I: isolation of psoralen, bergapten, g-taraxasterol and β -sitosterol. *Int. J. Chem. Soc.*, **1962**, 62, 4253-4254.
- Awan, M.; Tarin, S., Review of photodynamic therapy. *Surgeon*, **2006**, 4(4), 231-236.
- Barnes, J.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D., St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53(5), 583-600.

-
- Barraja, P.; Diana, P.; Montalbano, A.; Dattolo, G.; Cirrincione, G.; Viola, G.; Vedaldi, D.; Dall'Acqua, F., Pyrrolo[2,3-h]quinolinones: a new ring system with potent photoantiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*(24), 8712-8728.
 - Baser, K.H.; Demirci, B.; Demirci, F.; Bedir, E.; Weyerstahl, P.; Marschall, H.; Duman, H.; Aytac, Z.; Hamann, M.T., A new bisabolene derivative from the essential oil of *Prangos uechtrizii* fruits. *Planta Med.*, **2000**, *66*(7) 674-677.
 - Bassioukas, K.; Stergiopoulou, C.; Hatzis, J., Erythrodermic phytophotodermatitis after application of aqueous fig-leaf extract as an artificial suntan promoter and sunbathing. *Contact dermatitis*, **2004**, *51*(2):94-95.
 - Beale, S. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. Grimm, B.; Porra, R.J.; Rudiger, W.; Scheer, H., Eds.; sgringer: Netherlands, **2006**, pp 147-158.
 - Benigni R., (1962), Le piante medicinali. Chimica farmacologia e terapia. Ed Inverni e Della Beffa, Milano.
 - Berghöfer, R.; Hölz, J., Isolation of I3, II-biapigenin (amentoflavone) from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.*, **1989**, *55*: 91.
 - Berghöfer, R., Hölz, J. (1987) Biflavonoids in *Hypericum perforatum* Part 1. Isolation of 13, II8-biapigenin. *Planta Med.* *53*(2): 216-17.
 - Biel, M.A., Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **1996**, *14*(5), 239-244.
 - Bissonnette, R. In *Photodynamic Therapy in Dermatology*. Gold, M.H., Ed.; Springer: New York, **2011**, pp 139-147.
 - Bombardelli, E.; Morazzoni, P., *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, **1995**, *66*:43-68.
 - Bottioli, G.; Croce, A.; Balzarini, P.; Locatelli, D.; Baglioni, P.; Nostro, P.L.; Monici, M.; Pratesi, R., Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for an efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The rose bengal fluorogenic substrate. *Photochem. Photobiol.*, **1997**, *66*(3), 374-383.
 - Bouderdara, N.; Elomri, A.; Djarri, L.; Medjroubi, K.; Seguin, E.; Verite, P.; Chemical composition of the essential oil of *Cachrys libanotis* from Algeria. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*(1), 115–117.
 - Bowers, A.G., Phytophotodermatitis. *Am. J. Contact Dermat.*, **1999**, *10*(2), 89-93.
 - Boyle, R.W.; Dolphin, D., Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.*, **1996**, *64*(3), 469-485.

-
- Brockmöller, J.; Reum, T.; Bauer, S.; Kerb, R.; Hübner, W. D.; Roots, I., Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, **1997**, 30(Suppl): 94-101.
 - Bruni A.; Nicoletti M., Dizionario Ragionato di Erboristeria e Fitoterapia, **2003**, Piccin.
 - Bui-Xuan, N.H.; Tang, P.M.K.; Wong, C.K.; Fung, K.P., Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, 131(1), 95-103.
 - Caffieri S. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**:149-157. Caffieri, S., Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects. *Photochem Photobiol Sci.*, **2002**, 1,149–157.
 - Camarda, L.; Mazzola, P.; Sprio, V., Coumarins from the fruits of *Cachrys ferulacea*. *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50(2), 310.
 - Camerin, M.; Magaraggia, M.; Soncin, M.; Jori, G.; Moreno, M.; Chambrier, I.; Cook, M.J.; Russell, D.A., The *in vivo* efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur. J. Cancer*, **2010**, 46(10), 1910-1918.
 - Cárdenas, C.; Quesada, A.; Medina, M., Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, 63(24), 3083-3089.
 - Casas, A.; Batlle, A., Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2002**, 2(4), 465-475.
 - Casas, A.; Batlle, A., Photodynamic therapy in Argentina. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2006**, 3(4), 205-213.
 - Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one--photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2004**, 1(4), 279-293
 - Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R., Mechanisms in photodynamic therapy: Part three--Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005a**, 2(2), 91-106.
 - Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R., Mechanisms in photodynamic therapy: part two--cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005b**, 2(1), 1-23.

-
- Cavrini, V.; Andrisano, V., Principi di analisi farmaceutica. Società Editrice Esculapio. Milano, **2013**, 349-350.
 - Cervo, L.; Rozio, M.; Ekalle Soppo, C.B., Riva, A.; Morazzoni, P.; Caccia, C., Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *H. perforatum* extract. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **2002**, *164*(4):423-28.
 - Chatterjee, S.S., Nöldner, M.; Koch, E.; Erdelmeier, C., Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, **1998a**, *31*(Suppl) : 7-15
 - Chatterjee, S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W.E. (1998b) Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci.* *63*: 499-510;
 - Choudhary, S.; Nouri, K.; Elsaie, M.L., Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med. Sci.*, **2009**, *24*(6), 971-980.
 - Cirak, C.; Ayan, A.K.; Kevseroglu, K.; Ozen, T., Variation of Hypericin in St John's Wort (*Hypericum perforatum*) from wild populations of Northern Turkey. *Acta Bot. Hung.*, **2006**, *48*(1), 55–64.
 - Comini, L.; Fernandez, I.; Vittar, N.; Núñez Montoya, S.; Cabrera, J.; Rivarola, V., Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f.(Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine*, **2011**, *18*(12), 1093-5.
 - Conforti, F.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Statti, G.; Provenzano, E.; Menichini, F.. Natural and Synthetic Furanocoumarins as Treatment for Vitiligo and Psoriasis. *Current Drug Therapy*, **2009a**, *4* (1): 38-58. Review
 - Conforti, F.; Sosa, S.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G. A.; Uzunov, D.; Tubaro, A.; Menichini, F. **2009b**. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol content. *Food Chemistry*, *112* (3): 587-594.
 - De Amorin, A.; Borba, H. R.; Carauta, J.P.P; Lopes, D.; Kaplan, M.A.C. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *J. Ethnopharm.* **1999**. *64*(3):255–258.
 - Del Caro, A.; Piga, A., Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruits cultivars (*Ficus carica* L.). *European Food Research and Technology*, **2007**, *226*(4): 715-719.
 - Detty, M.R.; Gibson, S.L.; Wagner, S.J., Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*(16), 3897-3915.

-
- Devaraj, K.B.; Kumar, P.R.; Prakash, V., Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *J Agric. Food. Chem.*, **2008**, 56(23): 11417–11423.
 - Dewick PM. *Chimica, biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*. Piccin. **2001**.
 - Diffey, B. The contribution of medical physics to the development of psoralen photochemotherapy (PUVA) in the UK: a personal reminiscence. *Phys. Med. Biol.* **2006**, 51,R229–R244.
 - Di Venosa, G.; Hermida, L.; Fukuda, H.; Defain, M.V.; Rodriguez, L.; Mamone, L.; MacRobert, A.; Casas, A.; Batlle, A., Comparison of liposomal formulations of ALA Undecanoyl ester for its use in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2009**, 96(2), 152-158.
 - Dokovic, D.D.; Bulatovic, V.M.; Bozic, B.D.; Kataranovski, M.V.; Zratic, T.M.; Kovacevic, N.N., 3,5-Nonadiyne isolated from the rhizome of *Cachrys ferulacea* inhibits endogenous nitric oxide release by rat peritoneal macrophages. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2004**, 52(7), 853–854.
 - Dorossiev, I., Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum*. *Pharmazie*, **1985**, 40: 585-586.
 - Dougherty, T.J.; Henderson, B.W.; Gomer, C.J.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, 90(12), 889-905.
 - Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.; Mittleman, A., Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.*, **1978**, 38(8), 2628-2635.
 - Downes, A.; Blunt, T.P., On the influence of light upon protoplasm. *Proceedings of the Royal Society of London*, **1878**, 28(190-195), 199-212.
 - Dujic, J.; Kippenberger, S.; Ramirez-Bosca, A.; Diaz-Alperi, J.; Bereiter-Hahn, J.; Kaufmann, R.; Bernd, A.; Hofmann, M., Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int. J. Cancer*, **2009**, 124(6), 1422-1428.
 - Ebermann, R.; Alth, G.; Kreitner, M.; Kubin, A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **1996**, 36,95-97.
 - Ena, P.; Cerri, R.; Dessi, G.; Manconi, P.M.; Atzei, A.D., Phototoxicity due to *Cachrys libanotis*. *Contact Dermatitis*, **1991**, 24(1), 1–5.

-
- Ernst, E.; Rand, J. I.; Barnes, J.; Stevinson, C., Adverse effects profile of the herbal antidepressant St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Eur J. Clin. Pharmacol.*, **1998**, *54*(8): 589-594
 - Fiori, A., Nuova flora analitica d'Italia. Firenze, **1970**.
 - Fotinos, N.; Campo, M.A.; Popowycz, F.; Gurny, R.; Lange, N., 5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives. *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*(4), 994-1015.
 - Fukuda, H.; Casas, A.; Batlle, A., Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2005**, *37*(2), 272-276.
 - Gobbi, M.; Valle, F.D.; Ciapparelli, C.; Diomede, L.; Morazzoni, P.; Venotta, L.; Caccia, S.; Cervo, L.; Mennini, T., *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **1999**, *360*(2): 262-269
 - Gold, M.H. In *Photodynamic Therapy in Dermatology*. Gold, M.H., Ed.; Springer: New York, **2011**, pp 1-4.
 - Guillet, G.; Chauret, D.; Arnason, J.T., Phototoxic polyacetylenes from *Viguiera annua* and adaptations of a chrysomelid beetle, *Zygogramma continua*, feeding on this plant. *Phytochemistry*, **1997**, *45*(4), 695-699.
 - Hajri, A.; Wack, S.; Meyer, C.; Smith, M.; Leberquier, C.; Kedinger, M.; Aprahamian, M., *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Photofrin® and Pheophorbide a, a Bacteriochlorin, in Photodynamic Therapy of Colonic Cancer Cells. *Photochem. Photobiol.*, **2002**, *75*(2), 140-148.
 - Hesse, S.; Kirsch, G., Synthesis of new furocoumarin analogues via cross-coupling reaction of triflate. *Tetrahedron Letters*. **2003**, 44:97-99.
 - Hoelzl, J.; Ostrowski, E., St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). HPLC analysis of the main components and their variability in a population. *Deutsch Apoth Ztg*, **1987**, *127*: 1227-1230.
 - Hopper, C., Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.*, **2000**, *1*(4), 212-219.
 - Hopper, C.; Niziol, C.; Sidhu, M., The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol.*, **2004**, *40*(4), 372-382.
 - Hudson, J.B.; Lopez-Bazzocchi, I.; Towers, G. H., Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res.*, **1991a**, *15*: 101-112.

-
- Hudson, J.; Towers, G., Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmacol. Ther.*, **1991b**, 49(3), 181-222.
 - Ibbotson, S.; Moseley, H.; Brancalion, L.; Padgett, M.; O'Dwyer, M.; Woods, J.; Lesar, A.; Goodman, C.; Ferguson, J., Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinical and research experience. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2004**, 1(3), 211-223.
 - Ibbotson, S.H., Adverse effects of topical photodynamic therapy. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **2011**, 27(3), 116-130.
 - Ignat'eva, N.S.; Vandyshev, V.V.; Pimenov, M.G., Coumarins from the roots of *Cachrys pubescens*. *Chem. Nat. Compd.* **1972**, 8, 381.
 - Ishizuka, M.; Abe, F.; Sano, Y.; Takahashi, K.; Inoue, K.; Nakajima, M.; Kohda, T.; Komatsu, N.; Ogura, S.; Tanaka, T., Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int. immunopharmacol.*, **2011**, 11(3), 358-65.
 - Jocham, D.; Stepp, H.; Waidelich, R., Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Europ. Urol.*, **2008**, 53(6), 1138-1150.
 - Jones, L.J. *The Science of Phototherapy: An Introduction*. Springer: Netherlands, **2005**.
 - Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S., Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Transl. Oncol.*, **2008**, 10(3), 148-154.
 - Jurkowitsch, T.; Knobler, R. In *Photobiology: The Science of Life and Light*. Björn, L.O., Ed.; Springer: New York, **2008**, pp 577-590.
 - Kacerovská, D.; Pizinger, K.; Majer, F.; Šmíd, F., Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical *Hypericum perforatum* extract-a pilot study. *Photochem. Photobiol.*, **2008**, 84(3), 779-785.
 - Kaddu, S.; Kerl, H.; Wolf, P., Accidental bullous phototoxic reactions to bergamot aromatherapy oil. *J Am Acad Dermatol.* **2001**, 45(3):458-461.
 - Kapsokalyvas, D.; Dimitriou, H.; Skalkos, D.; Konstantoudakis, G.; Filippidis, G.; Stiakaki, E.; Papazoglou, T.; Kalmanti, M., Does *Hypericum perforatum* L. extract show any specificity as photosensitizer for HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy? *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2005**, 80(3), 208-216.
 - Kar, P.; Snehi, P.; Jha, P., Treatment of vitiligo with psoralen. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, **1990**, 56(2), 121.

-
- Kato, H., Photodynamic therapy for lung cancer-a review of 19 years' experience. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1998**, 42(2), 96-99.
 - Kennedy, J.; Pottier, R.; Pross, D., Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: Basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1990**, 6(1-2), 143-148.
 - Kim, K.K.I.; Kawano, Y.; Yamazaki, Y., A novel porphyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines. *Anticancer Res.*, **2003**, 23(3B), 2355-2361.
 - Kolarova, H.; Nevrelouva, P.; Bajgar, R.; Jirova, D.; Kejlouva, K.; Strnad, M., *In vitro* photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicol. in vitro*, **2007**, 21(2), 249-253.
 - Komissarenko, N.F., Pranchimigin from *Cachrys odontalgica*. *Chem. Nat. Compd.*, **1969**, 5, 151.
 - Konyaltoglu, S; Saglam, H; Kivçak, B. α -Tocopherol, Flavonoid, and Phenol Contents and Antioxidant Activity of *Ficus carica* Leaves. *Pharm. Biol.*, **2005**, 43(8), 683-686.
 - Koon, H.; Leung, A.; Yue, K.; Mak, N.K., Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. *J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol.*, **2006**, 25(1-2), 205.
 - Korbelik, M., Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **1996**, 14(5), 329-334.
 - Ishizuka, M.; Abe, F.; Sano, Y.; Takahashi, K.; Inoue, K.; Nakajima, M.; Kohda, T.; Komatsu, N.; Ogura, S.; Tanaka, T., Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int. immunopharmacol.*, **2011**, 11(3), 358-65.
 - Laakman, G.; Schüle, C.; Baghai, T.; Kieser, M., St John's Wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*, **1998**, 31 (Suppl). 54-59
 - Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerová, D., Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, 248(3-4), 321-350.
 - Lee, W.Y.; Lim, D.S.; Ko, S.H.; Park, Y.J.; Ryu, K.S.; Ahn, M.Y.; Kim, Y.R.; Lee, D.W.; Cho, C.W., Photoactivation of pheophorbide a induces a mitochondrial-mediated apoptosis in Jurkat leukaemia cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2004**, 75(3), 119-126.
 - Leung, H.W.C.; Hour, M.J.; Chang, W.T.; Wu, Y.C.; Lai, M.Y.; Wang, M.Y.; Lee, H.Z., P38-associated pathway involvement in apoptosis induced by

- photodynamic therapy with *Lonicera japonica* in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, 4(11), 3389-3400.
- Li, H.B.; Chen, F., Preparative isolation and purification of bergapten and imperatorin from the medicinal plant *Cnidium monnieri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *J. Chromatog. A*, **2004**, 1061(1), 51-54.
 - Lieutaghi P. (1995) *Il libro delle erbe*, Biblioteca universale Rizzoli.
 - Lim, S.H.; Lee, H.B.; Ho, A.S., A new naturally derived photosensitizer and its phototoxicity on head and neck cancer cells. *Photochem. Photobiol.*, **2011**, 87(5), 1152-1158.
 - Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Olsen, A.M., The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1961**, 26, 1-11.
 - Liu, R.; Li, A.; Sun, A., Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth, et Hook. f (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatog. A*, **2004**, 1052(1-2), 223-227.
 - Maggi, F.; Cecchini, C.; Cresci, A.; Coman, M.M.; Tirillini, B.; Sagratini, G.; Papa, F., Vittori, S., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* Taxa (Guttiferae) growing in Central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chem. Biodiver.*, **2010**, 7(2), 447-466.
 - Markham, K.R.; Ternai, B., ¹³C NMR of flavonoids-II: flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, **1976**, 32, 2607-2612.
 - Marr, R.; Gamse, T., Use of supercritical fluids for different processes including new developments-a review. *Chem Eng and Process*, **2000**; 39:19-28.
 - Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G. A.; Bonesi, M.; Duez, P.; Menichini, F.; Conforti, F., Changes in the phenolic and lipophilic composition, in the enzyme inhibition and antiproliferative activity of *Ficus carica* L. cultivar Dottato fruits during maturation. *Food and Chemical Toxicology*, **2012**, 50(3-4): 726-733.
 - Marrelli, M.; Statti, G.A.; Tundis, R.; Menichini, F.; Conforti, F., Fatty acids, coumarins and polyphenolic compounds of *Ficus carica* L. cv. Dottato: variation of bioactive compounds and biological activity of aerial parts. *Nat. Prod. Res.*, **2013a**. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.841689>.
 - Marrelli, M.; Conforti, F.; Toniolo, C.; Nicoletti, M.; Statti, G.; Menichini, F., *Hypericum perforatum*: influences of the habitat on chemical composition,

- photo-induced cytotoxicity and antiradical activity. *Pharm. Biol.* **2013b**, Accettato per la pubblicazione.
- Marrelli, M.; Menichini, G.; Provenzano, E.; Conforti, F., Application of natural compounds in the photodynamic therapy of skin cancer. *Current Medicinal Chemistry, Review.* **2013c**, Accettato per la pubblicazione.
 - Marzano, C.; Chilin, A.; Bordin, F.; Baccichetti, F.; Guiotto, A. , DNA damage and biological effects induced by photosensitization with new N1-unsubstituted furo[2,3-h]quinolin-2(1H)-ones. *Bioorg Med Chem.* **2002**, 10:2835–2844.
 - Mathis, C.; Ourisson, G., Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* – II. Identification de constituants de diverse huiles essentielles d'*Hypericum*. *Phytochemistry*, **1964**, 3, 115-131.
 - Maugini, E.; Maleci Bini, L.; Mariotti Lippi M., Manuale di botanica farmaceutica. VIII Edizione. Picci, Padova, **2006**.
 - Menichini, G.; Alfano, C.; Provenzano, E.; Marrelli, M.; Statti, G. A.; Menichini, F.; Conforti, F. *Cachrys pungens* Jan inhibits human melanoma cell growth through photo-induced cytotoxic activity. *Cell Proliferation*, **2012a**, 45(1): 39-47.
 - Menichini, G.; Alfano, C.; Provenzano, E.; Marrelli, M.; Statti, G.A.; Somma, F.; Menichini, F.; Conforti, F. Fig latex (*Ficus carica* L. cultivar Dottato) in combination with UV irradiation decreases the viability of A375 melanoma cells *in vitro*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2012b**, 12(8): 959-965.
 - Meseguer, A. S.; Sanmartín, I., Paleobiology of the genus *Hypericum* (Hypericaceae): a survey of the fossil record and its palaeogeographic implications. *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* **2012**, 69(1): 97-106.
 - Mills, S.; Bone, K., *Principles and Practice of Phytoterapy.* Edinburgh; Churchill Livingstone, **2000**.
 - Mitton, D.; Ackroyd, R., A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2008**, 5(2), 103-111.
 - Moehrle, M., Outdoor sports and skin cancer. *Clin. dermatol.*, **2008**, 26(1), 12-15.
 - Møller, K.I.; Kongshoj, B.; Philipsen, P.A.; Thomsen, V.O.; Wulf, H.C., How Finsen's light cured lupus vulgaris. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **2005**, 21(3), 118-124.
 - Mosti, L., Lo Presti, E., Menozzi, G., Marzano, C., Baccichetti, F., Falfone, G., Filippelli, W., Pucci, B. Synthesis of angelicin heteroanalogues:

- preliminary photobiological and pharmacological studies. *Farmaco*, **1998**, 53: 602-610.
- Müller, W.E.; Rolli, M.; Schafer, C.; Hafner, U., Effect of *Hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, **1997**, 30(Suppl): 102-107.
 - Nahrstedt, A.; Butterweck, V., Biologically active and other chemical constituents of the herb of the *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, **1997**, 30 Suppl 2:129-34
 - Narayanan, D. L.; Saladi, R.N.; Fox, J.L., Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J.Dermatol.*, **2010**, 49(9), 978–986.
 - Nathan, P.J., *Hypericum perforatum* (St John's Wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, **2001**, 15(1), 47–54.
 - Nathan, P.J., The experimental and clinical pharmacology of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.), *Molecular Psychiatry*, **1999**, 4,333-338.
 - Newall, C. A.; Anderson, L.; Phillipson, J. D., *Herbal Medicines. A Guide for Health-care Professionals*, 1st edn. London : Pharmaceutical Press, **1996**.
 - Nicoletti M., HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of Botanicals. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2011**, 21: 818-823.
 - Núñez Montoya, S.C.; Comini, L.R.; Rumie Vittar, B.; Fernández, I.M.; Rivarola, V.A.; Cabrera, J.L., Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*, **2008**, 51(8), 1409-1415.
 - Oleinick, N.L.; Morris, R.L.; Belichenko, I., The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, 1(1), 1-21.
 - Ong, C.Y.; Ling, S.K.; Ali, R.M.; Chee, C.F.; Samah, Z.A.; Ho, A.S.H.; Teo, S.H.; Lee, H.B., Systematic analysis of *in vitro* photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2009**, 96(3), 216-222.
 - Pala-Paul, J.; Velasco-Negueruela, A.; Perez-Alonso, M.J.; Sanz, J., Essential oil composition of the aerial parts of *Cachrys sicula* L. *Flavour Fragr. J.*, **2002**, 17, 64–68.
 - Palopoli, G., (La produzione ed utilizzazione del fico in provincia di Cosenza. *Agricoltura Ricerca*, **1990**, 112/113, 23-26.

-
- Panzarini, E.; Inguscio, V.; Dini, L., Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy. *Int. J. Photoenergy*, **2011**, doi: 10.1155/2011/713726.
 - Paszko, E.; Ehrhardt, C.; Senge, M.O.; Kelleher, D.P.; Reynolds, J.V., Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2011**, 8(1), 14-29.
 - Pathak MA, Fitzpatrick TB. *J Photochem Photobiol B*. **1992**, 14(1-2):3-22.
 - Peng, Q.; Warloe, T.; Berg, K.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Giercksky, K.E.; Nesland, J.M., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer*, **1997**, 79(12), 2282-2308.
 - Piccin, A.; Toniolo, C.; Nicoletti, M., Analytical tools for digestive plant extracts. *Nutrifoods*, **2012**, 11(1): 29-35.
 - Pignatti S., Flora d'Italia, 2, 210. Edagricole, **1982**.
 - Pistelli, L.; Catalano, S.; Manunta, A.; Marsili, A., Coumarins from *Cachrys ferulacea* collected in Sardinia. *Planta Med.*, **1989**, 55, 203.
 - Puech, A.A.; Rebeiz, C.A.; Catlin, P.B.; Crane, J.C., Characterization of anthocyanins in fig (*Ficus carica* L.) fruits. *Journal of Food Science*, **1975**, 40, 775–780.
 - Radulović, N.; Stankov.Jovanović, V.; Stojanović, G.; Šmelcerović, A.; Spiteller, M.; Asakawa, Y, Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity on nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chem.* **2007**, 103, 15-21.
 - Repanovici, R.; Plesa, A.; Anton, G., Transformation of *Escherichia coli* cells by pH 2.3 plasmid DNA treated with psoralens plus near-UV light. *J Photochem and Photobiol B: Biology*.**1997**, 37:26-30.
 - Richter, G.; Schwarz, H.P.; Dorner, F.; Turecek, P.L. Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*. *British Journal of Haematology*, **2002**, 119(4):1042–1051.
 - Rivard, J.; Ozog, D., Henry Ford Hospital dermatology experience with Levulan Kerastick and blue light photodynamic therapy. *J. Drugs Dermatol.*, **2006**, 5(6), 556-61.
 - Robinson, G.M.; Robinson, R., A survey of anthocyanins. II. *Biochemical Journal*, **1932**, 26, 1647–1664.
 - Roelandts, R., The history of phototherapy: Something new under the sun? *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2002**, 46(6), 926-930.

-
- Saeed, M.A.; Sabir, A., Irritant potential of triterpenoids from *Ficus carica* leaves. *Fitoterapia*, **2002**, *73*, 417-420.
 - Sagratini, G.; Ricciutelli, M.; Vittori, S.; Öztürk, Y.; Maggi, F., Phytochemical and antioxidant analysis of eight *Hypericum* taxa from central Italy. *Fitoterapia*, **2008**, *79*, 210-13.
 - Samuelsson G. Farmacognosia. *Farmaci di origine naturale*. EMSI. **2003**.
 - Schempp, C.; Winghofer, B.; Langheinrich, M.; Schopt, E.; Simon, J. C., Hypericin levels in human serum and interstitial skin blister fluid after oral single-dose and steady-state administration of *Hypericum perforatum* extract (St John's wort). *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **1999**, *12*, 299-304.
 - Schmidt-Erfurth, U.; Hasan, T., Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.*, **2000**, *45*(3), 195-214.
 - Schulz, V.; Hänsel, R.; Tyler, V., *Rational Phytotherapy. A Physicians' Guide to Herbal Medicine*. Berlin : Springer-Verlag, **1998**.
 - Schweitzer, V.G., Photofrin-mediated photodynamic therapy for treatment of aggressive head and neck nonmelanomatous skin tumors in elderly patients. *Laryngoscope*, **2009**, *111*(6), 1091-1098.
 - Senatore F. *Biologia e botanica farmaceutica*. Piccin, Padova, **2004**.
 - Sidoroff, A.; Thaler, P., Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer-The place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, *7*(1), 24-32.
 - Singer, A.; Wonnemann, M.; Muller, W.E., Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *290*, 1363-1368;
 - Sirvent, T.; Walker, L.; Vance, N.; Donna, G., Variation in hypericins from wild populations of *Hypericum perforatum* L. in the Pacific Northwest of the U.S.A. *Econ. Bot.*, **2002**, *56*, 41-49.
 - Skalkos, D.; Gioti, E.; Stalikas, C.; Meyer, H.; Papazoglou, T.G.; Filippidis, G., Photophysical properties of *Hypericum perforatum* L. extracts-Novel photosensitizers for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2006**, *82*(2), 146-151.
 - Smith, R. M., Supercritical fluids in separation science — the dreams, the reality and the future. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *856*, 83-115.

-
- Solomon, A.; Golubowicz, S.; Yablowicz, Z.; Grossman, S.; Bergman, M.; Gottlieb, H.E.; Altman, A.; Kerem, Z.; Flaishman, M.A., Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. & Food Chem.*, **2006**, *54*, 7717–7723.
 - Southwell, I.A.; Campbell, M.H., Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* L. in Australia. *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 475–478.
 - Spikes, J.D.; Shen, H.R.; Kopečková, P.; Kopeček, J., Photodynamic crosslinking of proteins. III. Kinetics of the FMN-and rose bengal-sensitized photooxidation and intermolecular crosslinking of model tyrosine-containing n-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *70*(2), 130-137.
 - Stavropoulos, N.E.; Kim, A.; Nseyo, U.U.; Tsimaris, I.; Chung, T.D.; Miller, T.A.; Redlak, M.; Nseyo, U.O.; Skalkos, D., *Hypericum perforatum* L. extract – Novel photosensitizer against human bladder cancer cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2006**, *84*, 64-9.
 - Stylli, S.S.; Kaye, A.H., Photodynamic therapy of cerebral glioma-A review Part II-Clinical studies. *J. Clin. Neurosci.*, **2006**, *13*(7), 709-717.
 - Su, Q.; Rowley, K.G.; Itsiopoulos, C.; O’Dea, K. Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2002**, *56*, 1149-1154.
 - Sutedja, T.G.; Postmus, P.E., Photodynamic therapy in lung cancer. A review. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1996**, *36* (2), 199-204.
 - Tarstedt, M.; Rosdahl, I.; Berne, B.; Svanberg, K.; Wennberg, A., A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix®)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm. Venereol.*, **2005**, *85*(5), 424.
 - Taub, A.F., Photodynamic therapy: other uses. *Dermatol.Clin.*, **2007**, *25*(1), 101-110.
 - Theodossiou, T.A.; Hothersall, J.S.; De Witte, P.A.; Pantos, A.; Agostinis, P., The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin. *Mol. Pharm.*, **2009**, *6*, 1775-89.
 - Tremblay, J.F.; Dussault, S.; Viau, G.; Gad, F.; Boushira, M.; Bissonnette, R., Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*(11), 852-856.

-
- Tutin, T.G., Heywood, V.H.; Valentine, D.H.; Burges, N.A.; Moore, D.M.; Walters, S.M. et al. *Flora Europaea*. London: Cambridge University Press, **1968**.
 - Tutin, T.G.; Burges, N.A.; Chater, A.O., *Flora Eurpaea*, seconda edizione, **1993**.
 - Valdés, B.; Talavera. S.; Fernàndez-Galiano, E., *Flora vascular de Andalucía occidental*, Ketres Editora s.a. **1987**.
 - Vallusi, M., *Il grande manual dell'aromaterapia. Fondamenti di scienza degli oli essenziali*, Tecniche nuove, **2005**.
 - Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastre, R., Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography-densitometry. *J. Chromatogr.* **1983**, 281, 263-71.
 - Veberic, R.; Colaric, M.; Stampar, F, Phnolis acids and flavonoids of fig fruit *Ficus carica* in the northern Mediterranean region. *Food Chem.* **2008**, 106, 153-157.
 - Vedaldi, D.; Dolmella, A.; Moro, S.; Miolo, G.; Viola, G.; Caffieri, S.; Dall'Acqua, F. 1-Thioangelicin: crystal structure, computer-aided studies and photobiological activity. *Il farmaco*, **2004**, 59:125-132
 - Vinson, J.A.; Zubik, L.; Bose, P.; Samman, N.; Proch, J., Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, **2005**, 4, 44–50.
 - Von Tappeiner, H.; Jesionek, A., Therapeutische versuche mit fluoereszierenden stoffen. *Münch. Med. Wochenschr.*, **1903**, 47, 2042-2044.
 - Vrouenraets, M.B.; Visser, G.; Snow, G.; Van Dongen, G., Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res.*, **2003**, 23(1B), 505.
 - Wainwright, M., Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.*, **1998**, 42(1), 13.
 - Wamer, W.G.; Vath, P.; Falvey, D.E., *In vitro* studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A. *Free Rad. Bio. Med.*, **2003**, 34(2), 233-242.
 - Wang, T.; Jin, H.; Li, Q.; Cheng, W.; Hu, Q.; Chen, X.; Bi, K., Isolation and simultaneous determination of coumarin compounds in *Radix Angelica dahurica*. *Chromatographia*, **2007a**, 65(7), 477-481.

-
- Wang, Y.; Li, X.; Li, L.H.; Meng, D.L.; Li, Z.L.; Li, N., Two new thiophenes from *Echinops latifolius* and their phototoxic activities. *Planta Med.*, **2007b**, 73(7), 696-698.
 - Weber, N.D.; Murray, B.K.; North, J.A.; Wood, S.G., The antiviral agent hypericin has in vitro activity against HSV-1 through non-specific association with viral and cellular membranes. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **1994**, 5: 83-90.
 - Wiart C., *Ethnofarmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific*, Humana press, **2006**.
 - Wiegell, S.R.; Wulf, H.C., Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. *J. Am. Acad.f Dermatol.*, **2006**, 54(4), 647-651.
 - Wildeman, M.A.M.; Nyst, H.J.; Karakullukcu, B.; Tan, B.I., Photodynamic therapy in the therapy for recurrent/persistent nasopharyngeal cancer. *Head Neck Oncol.*, **2009**, 1, 40.
 - Wolfsen, H.C., Present status of photodynamic therapy for high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *J. Clin. Gastroenterol.*, **2005**, 39(3), 189.
 - Wonnemann, M.; Singer, A.; Muller, W.E., Inhibition of synaptosomal uptake of 3H-L-glutamate and 3H-GABA by hyperforin, a major constituent of St Johns' wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacology*, **2000**, 23, 188-197
 - Wood, S.; Huffman, J.; Weber, N.; Andersen, D.; North, J.; Murray, B.; Sidwell, R.; Hughes, B., Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Planta Med.*, **1990**, 56, 651-652.
 - Zangheri P., *Flora italica*. Cedam, **1976**.
 - Zeitouni, N.C.; Oseroff, A.R.; Shieh, S., Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers: Current review and update. *Mol. immunol.*, **2003**, 39(17-18), 1133-1136.
 - Zeitouni, N.C.; Oseroff, A.; Najarian, D.J. In *Skin Cancer Management A Practical Approach*. MacFarlane, D.F., Ed.; Springer: New York, **2010**, pp 41-56.
 - Zohary M., *Flora Palaestina*. Jerusalem: Goldberg, **1972** .